

**MINISTÉRIO EDUCAÇÃO E DESPORTOS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**Regina Célia Lacerda de Santana Azevedo**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE  
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Actinoplanetes*  
ISOLADOS DO SOLO DE CERRADO GOIANO**

**Dissertação de Mestrado**

**Goiânia-GO, 2003**

**MINISTÉRIO EDUCAÇÃO E DESPORTOS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**Regina Célia Lacerda de Santana Azevedo**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE  
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Actinoplanetes*  
ISOLADOS DO SOLO DE CERRADO GOIANO**

**Orientador:**

Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**Dissertação apresentada ao  
CPGMT/IPTSP/UFG como requisito  
parcial para obtenção do Grau de  
Mestre em Medicina Tropical, área de  
concentração: Microbiologia**

**Goiânia-GO, 2003**

Candidato(a): REGINA CÉLIA LACERDA DE SANTANA AZEVEDO

Título da Dissertação: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA  
DE EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *Actinoplanetes* ISOLADOS DO  
SOLO DE CERRADO GOIANO

---

A comissão julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação, em sessão pública  
realizada no dia 24/09/2003 considerou o(a) candidato(a):

(    )Aprovado(a)                      (    )Reprovado(a)

**1. Examinador(a)** \_\_\_\_\_

**2. Examinador(a)** \_\_\_\_\_

**3. Presidente** \_\_\_\_\_

---

“Vivendo, se aprende;  
mas o que se aprende mais,  
é só a fazer outras maiores perguntas.”

Guimarães Rosa

Aos meus filhos Bruno, Gabriela e Henrique,  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Goiás e ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Dr. José Daniel Gonçalves Vieira, pela orientação e oportunidade dada.

Aos Professores do mestrado, que tanto me enriqueceram o aprendizado e aos funcionários, pela atenção dispensada.

Ao Professor Dr. José Realino de Paula, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFG, pela valiosa colaboração.

A todos aqueles que me auxiliaram direta ou indiretamente neste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 Actinomicetos .....	01
1.2 Drogas antibióticas.....	08
1.3 Agentes antitumorais .....	12
1.4 Seleção para novas drogas.....	13
1.5 <i>Actinoplanetes</i> .....	14
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Meios de cultura utilizados .....	18
3.2 Isolamento dos <i>Actinoplanetes</i> .....	19
3.3 Microrganismos indicadores da atividade antimicrobiana .....	20
3.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos isolados.....	20
3.5 Produção da substância antibiótica.....	21
3.6 Extração da substância bioativa.....	21
3.7 Determinação da atividade citotóxica do extrato etanólico bruto frente a <i>Artemia salina</i> .....	22

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
4.1	<b>Isolamento .....</b>	<b>23</b>
4.2	<b>Atividade antimicrobiana.....</b>	<b>24</b>
4.3	<b>Atividade citotóxica do extrato etanólico bruto em <i>Artemia salina</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>38</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um actinomiceto.....	01
Figura 2- Porcentagem de instituições envolvidas com pesquisa de metabólitos de interesse industrial, produzidos por actinomicetos.....	06
Figura 3- Porcentagem de pesquisa de metabólitos de interesse industrial, produzidos pelos actinomicetos por país .....	07
Figura 4- Produção mundial de metabólitos originados de actinomicetos.....	07
Figura 5- Colônias de <i>Actinoplanetes</i> em ágar ACT após 14 dias de cultivo .....	24
Figura 6- Características macroscópicas do cultivo dos isolados <i>Actinoplanetes</i> ACR4 (A) e <i>Actinoplanetes</i> ACR7 (B) em ágar ACT, após 14 dias de cultivo .....	24
Figura 7- Atividade antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 dos <i>Actinoplanetes</i> cultivados em ágar ACT após 24 h a 30°C.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição do número de antibióticos produzidos por actinomicetos .....	10
Tabela 2- Diversidade de antibióticos produzidos por actinomicetos .....	11
Tabela 3- Características macroscópicas do cultivo de <i>Actinoplanetes</i> isolados em ágar ACT após 14 dias de cultivo .....	23
Tabela 4- Determinação da atividade antimicrobiana dos <i>Actinoplanetes</i> isolados frente a bactérias gram-positivas .....	27
Tabela 5- Avaliação do efeito citotóxico dos isolados de <i>Actinoplanetes</i> em <i>Artemia salina</i> (% de mortalidade) .....	28

## RESUMO

Os actinomicetos pertencem a um seletivo grupo de microrganismos por apresentarem um respeitável potencial biotecnológico devido à sua magnífica capacidade de produção de compostos secundários. Em decorrência da altíssima aplicabilidade dos compostos bioativos produzidos por essa bactéria “especial”, este trabalho objetivou isolar actinomicetos do solo de cerrado goiano pertencente ao “genera” *Actinoplanetes*. Seis isolados do solo de cerrado foram caracterizados como *Actinoplanetes* e avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana em dois diferentes meios de cultura, ACT e MPE. Observou-se que quatro *Actinoplanetes* isolados (ACR 4, ACR 7, ACR 13 e ACR 23) demonstraram atividade frente a bactérias gram-positivas e apenas o isolado ACR4 apresentou atividade frente a bactérias gram-negativas. Não foi observada atividade antifúngica. A atividade antimicrobiana foi observada somente quando os *Actinoplanetes* foram cultivados no ágar ACT. As cepas que apresentaram atividade antibacteriana foram selecionadas para a determinação de citotoxicidade através da utilização de larvas de *Artemia salina* como indicadoras. Observou-se que os isolados testados não apresentaram atividade citotóxica, sugerindo um potencial de emprego dos mesmos na terapêutica das infecções causadas por microrganismos gram-positivos.

## ABSTRACT

Actinomycetes belong to a select group of microorganisms as they present a respectable biotechnological potential due to their magnificent capacity of production of secondary compounds. Due to the very high applicability of the bioactive compounds produced by this "special" bacterium, this work aimed at isolating actinomycetes from the soil of the savanna in the state of Goiás, pertaining to the genera *Actinoplanetes*. Six isolates from the soil were characterized as *Actinoplanetes* and tested regarding their antimicrobial activity in two different culture media, ACT and MPE. It was observed that four isolates *Actinoplanetes* (ACR 4, ACR 7, ACR 13 and ACR 23) demonstrated activity facing gram-positive bacteria and only isolate ACR4 presented activity facing gram-negative bacteria. No anti-fungous activity was observed. Anti-microbial activity was observed only when *Actinoplanetes* were cultured in the ACT agar. The strains, which presented antibacterial activity, were selected in order to determine cytotoxicity by utilizing larvae of *brine shrimp* as indicators. The tested isolates were found not to present cytotoxic activity, suggesting their potential use in the therapeutics of infections caused by gram-positive microorganisms.

## ABREVIATURAS

µg	: Micrograma
µL	: Microlitro
DNA	: Ácido desoxirribonuclêico
RNA	: Ácido ribonuclêico
RNAr	: RNA ribossômico
G	: Guanina
C	: Citosina
Kda	: Kilodaltons
L	: Litro
mg	: Miligrama
mL	: Mililitro
mm	: Milímetro
nm	: Nanômetro
°C	: Graus Celsius
rpm	: Rotações por minuto
v/v	: Volume a volume
φ	: Diâmetro
ppm	: Partes por milhão
ACT	: Ágar amido caseína
MPE	: Meio de cultura para produção de estreptomicina
ATCC	: American Type Culture Collection (USA)
CCT	: Coleção de Cultura Tropical (Fundação Tropical de Pesquisa e tecnologia “André Toselho” - Campinas – SP)
DAUFPE	: Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Actinomicetos

Os actinomicetos foram considerados, até aproximadamente 1950, como um grupo exótico de microrganismos por apresentarem características similares de fungos e de bactérias. Tiveram então, a partir desta década, confirmada a sua natureza procariota através da determinação de sua estrutura molecular e composição química (Goodfellow et al. 1984).

Os actinomicetos constituem a ordem *Actinomycetales* que compreende mais de 80 gêneros (Monciardini et al. 2000), dentre os quais destacam-se: *Actinomyces*, *Dermatophilus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Thermoactinomyces*. São bactérias gram-positivas, na sua maioria aeróbias (existem espécies anaeróbias pertencente a microbiota bucal) (Jawetz et al. 1998), seu conteúdo de guanina mais citosina (G+C) é maior que 55 mol%. São filogeneticamente relacionados pelo seqüenciamento de oligonucleotídeos (16S RNAr) e estudos de hibridização do ácido nucléico (Goodfellow 1994). Ainda não existem caracteres quimiotaxionômicos claros, mas os gêneros estão ligados em uma série de evidências de estrutura da parede e composição lipídica. Alguns, mas não todos gêneros, formam esporos resistentes à dessecação e a baixas temperaturas (Goodfellow et al. 1984).

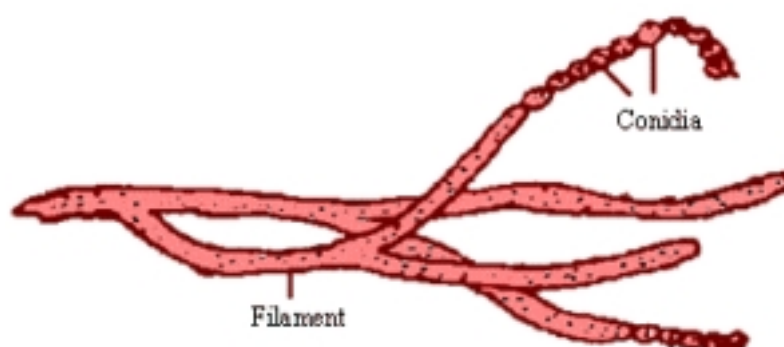


Figura 1 – Representação esquemática de um actinomiceto

Superficialmente sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos, pois possuem micélio filamentoso que permanece unido à superfície do substrato (denominado micélio vegetativo), ou se desenvolve para o meio externo, recebendo a denominação de micélio aéreo, em alguns casos com o desenvolvimento de conídios. Os filamentos individuais (hifas), devido ao crescimento da parede celular em intervalos regulares, se subdividem em vários segmentos, todos contendo uma molécula de DNA (Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003). Entretanto, os seus filamentos consistem em células procarióticas com diâmetro muito menor do que os apresentados pelos fungos. Esse crescimento filamentoso favorece ao actinomiceto formar pontes nos espaços sem água entre as partículas do solo, aumentando a proporção superfície/volume, melhorando sua eficiência nutricional em um solo altamente competitivo devido à quebra de materiais orgânicos insolúveis pelas enzimas extracelulares (Locci & Sharples 1984; Tortora et al. 1998). Estas características provavelmente são unicamente devidas a sua adaptação para a vida em superfícies sólidas, primariamente, o solo (Ensign 1978; Goodfellow et al. 1984; Vobis 1997; Tortora et al. 1998).

Com uma morfologia bastante diversificada, variando de simples a complexa, podem compreender bactérias que multiplicam por simples divisão binária como *Corynebacterium* spp., outras que se apresentam como células envelopadas e algumas ramificações como *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* 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 esporoactinomicetos 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 esporos dos actinomicetos são produzidos em hifas especializadas, muitas das quais desenvolvem-se sobre o filamento aéreo. De maneira geral, os esporos carecem de motilidade, sendo que alguns gêneros produzem esporos flagelados (*Actinoplanetes*). Os esporos produzidos pela maioria das espécies não são resistentes ao calor. Somente a família *Thermoactinomycetaceae* produz esporos semelhantes, na composição química, aos endósporos de *Bacillus* e *Clostridium*. A forma, número e disposição dos esporos são características particulares de cada gênero (Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003). A superfície do

esporo é formada por uma bainha filamentosa estável e útil taxonomicamente. É classificado como liso, espinhoso, ondulado ou filamentoso (Piret & Demain 1988; Vobis 1997).

As células dos actinomicetos possuem uma organização procariótica típica, consistindo de uma região nuclear fibrilar e um citoplasma granular com ribossomos. Este pode conter inclusões, na dependência do organismo, sua idade e meio de cultivo utilizado (Locci & Sharples 1984). A parede celular pode exibir uma variedade de perfis, sendo que na maioria das vezes aparece homogeneamente eletrodensa, ou com um perfil composto por duas camadas eletrodensas separadas por uma zona de menor eletrodensidade. A parede celular é formada por peptidoglicano junto com um ou mais polímeros associados, tais como ácidos teicóicos aniônicos e polissacarídeos neutros (Piret & Demain 1988).

Possuem o DNA em forma condensada, e frequentemente, em múltiplas cópias nas células das hifas; mas, usualmente, somente uma cópia nos esporos. Transportam, com frequência, DNA extra cromossomal (plasmídeos) em uma ampla variedade de tamanho (variam de 10-40 Kb) e número de cópias (menor do que 30). Estes, possuem 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).

São microrganismos saprófitas estritos (maioria), podendo atuar como fixadores de nitrogênio, como o gênero *Frankia*; formarem associações endofíticas (proteção contra patógenos, crescimento e fisiologia dos vegetais); biodegradação de compostos xenobióticos e recalcitrantes (Willians et al. 1984; Sardi et al. 1992; Tortora et al. 1998). Podem predominar na microbiota da rizosfera de árvores cítricas (limão e laranja), desenvolvendo um potencial antagonico à comunidade microbiana desse nicho ecológico (Gesheva 2002).

Encontram-se distribuídos em diferentes ambientes, tendo como reservatório natural o solo, onde exercem a função ecológica de decomposição da matéria orgânica. Compreendem, aproximadamente, de 20 a 60% da população microbiana do solo. Em solos de cerrado com vegetação nativa, a ocorrência das populações de actinomicetos na comunidade bacteriana pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (Pereira et al. 1999). O odor característico de terra úmida deve-se a sua atividade metabólica e à produção de pigmentos terpenóides (Gutiérrez-Lugo & Essayag 2003).

Alterações no solo através de práticas agrícolas como a calagem, têm resultado em desequilíbrio das populações na comunidade microbiana, favorecendo as populações de actinomicetos. Esta alteração no ecossistema leva a alteração da ocorrência de estirpes de



rizóbios (presentes no solo) resistentes a antibióticos, conseqüentemente, alterando a capacidade de nodulação da soja por estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (Pereira et al. 1999).

Alguns podem possuir capacidade parasitária para seres humanos, animais e vegetais. Entre as várias doenças nas quais podem apresentar-se etiologicamente envolvidos, pode-se destacar: a tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), a hanseníase (*M. leprae*), estreptotricoses, cáries e doenças periodontais provocadas pelo *Actinomyces viscosus*, (Baeman 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 (Stetzenback 1997). A maioria das infecções por *Nocardia* spp. é pulmonar ou subcutânea, entretanto, o microrganismo pode se disseminar dos pulmões para outros órgãos em hospedeiro suscetível. *Streptomyces* spp. é o terceiro actinomiceto patogênico mais comumente identificado pelo CDC (Centro para o Controle de Doenças, EUA), sendo o *S. griseus* e o *S. somaliensis* os isolados mais freqüentemente encontrados (Hollick 1995).

Os actinomicetos utilizam uma grande variedade de fontes de carbono, porém, no solo, por ser a fonte primária geralmente insolúvel e polimérica, torna-se necessário a secreção de uma variedade de enzimas extracelulares para que as hifas possam penetrar, colonizar e metabolizar o substrato (Paul & Clark 1996).

São importantes decompositores. Possuem atividade em biodeterioração e biodegradação, decompondo resíduos de plantas e diversas substâncias de difícil degradação, como lignina, quitina, queratina e complexos aromáticos de ácido húmico (Goodfellow & Willians 1983; Lacey 1988; Lechevalier 1988; Paul & Clark 1996). Ambas consistem no mesmo processo, porém, enquanto a biodegradação é desejável, a biodeterioração não é, pois ocasiona perda considerável de divisas devido a mudanças indesejáveis nas propriedades de materiais (hidrocarbonetos, borracha, plástico), produtos agrícolas (feno, palha, milho, arroz, sorgo, aveia, cevada, centeio, cana-de-açúcar, lã), coleções aquáticas, equipamentos e até mesmo, obras de arte como resultado da atividade vital dos organismos (Lacey 1988). A biodeterioração é causada pela produção de enzimas que quebram os constituintes destes materiais, produção de substâncias tóxicas ao homem e animais, produção de odores desagradáveis, descoloração superficial do substrato, entupimento de filtros e dutos de condução (Lacey 1988).

Os microrganismos não são igualmente capazes de produzir metabólitos secundários. Esta habilidade, no momento, é restrita a poucos grupos de bactérias ou micróbios eucarióticos. Estão associados principalmente, dentro do mundo procariótico, com os actinomicetos filamentosos, mixobactéria, pseudomonas e a cianobactéria, e para os micróbios eucarióticos, estão relacionados com a maioria dos fungos filamentosos (Donadio et al. 2002a).

Os actinomicetos apresentam um enorme potencial de aplicação industrial, médica e agrícola, devido a sua produção de importantes metabólitos secundários como os antibióticos, herbicidas e substâncias promotoras do crescimento (Connell 2001).

Os metabólitos secundários são assim considerados, por não serem necessários ao crescimento vegetativo em culturas puras. O processo de produção desses metabólitos, usualmente, está associado com uma fase de rápido crescimento (trofofase) seguida pela fase de síntese de produtos (idiofase). Geralmente, isso é observado em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, onde os nutrientes, provavelmente, reprimam a formação das enzimas capazes de sintetizá-los. Entretanto, em meios que mantêm um crescimento lento, a idiofase sobrepõe a trofofase, talvez devido a fatores limitantes do próprio meio, inibindo o ciclo. Isso demonstra que os nutrientes podem reprimir ou favorecer a síntese de produção de metabólitos secundários durante o crescimento (Piret & Demain 1988).

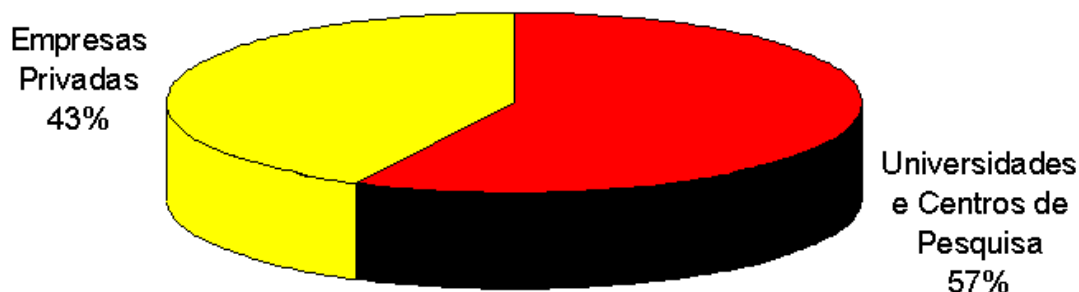
Geralmente, são produzidos com uma mistura de produtos quimicamente relacionados entre si. Por exemplo, uma única cepa de uma espécie do gênero *Streptomyces* pode produzir 32 antraciclinas diferentes. A produção de metabólitos secundários pode perder-se facilmente por mutação espontânea, tornando-se muito importantes as técnicas de conservação destes microrganismos (Tortora et al. 1998; Mateos González 2003).

Os antibióticos são os mais importantes metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos. Atualmente somam mais de 5000 antibióticos conhecidos pelo homem, sendo que estes, aumentam numa média aproximada de 300 ao ano (Sanglier et al. 1993 a e b). Estima-se que 75% da produção desses antibióticos produzidos por actinomicetos, sejam em particular, pelo gênero *Streptomyces* (Mateos González 2003).

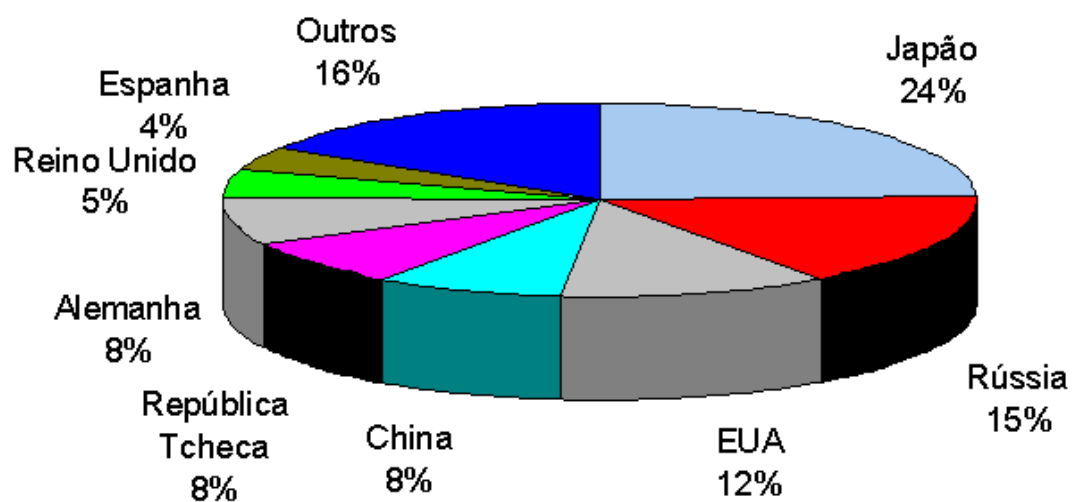
Muita atenção tem sido dispensada ao desenvolvimento de técnicas de isolamento para actinomicetos ditos raros e a busca em locais ainda não explorados (Nolam & Cross 1988), uma vez que os mesmos podem se constituir numa fonte em busca de novos compostos bioativos. Entre estas técnicas empregadas temos o tratamento térmico da amostra de solo,

aplicação da resistência antibiótica para o isolamento de grupos específicos de antimicrobianos (inclusão do antibiótico ao meio de isolamento), tratamento alcalino, quimiotaxia ou técnica de iscagem. No entanto, o número e a variedade de isolados depende da microbiota regional ou ambiental dos solos coletados (Ramsey 1984; MacDonald 1986 a e b; Takahashi et al. 1996). Na busca de novos produtores de compostos bioativos, investigações foram realizadas em ambientes marinhos, incluindo habitantes e sedimentos marinhos, cuja frequência de atividade antibiótica produzida foi comparável à frequência terrestre. Por outro lado, a frequência de isolados obtidos dos sedimentos marinhos foi mais baixa, particularmente, no caso dos actinomicetos (Sponga et al. 1999).

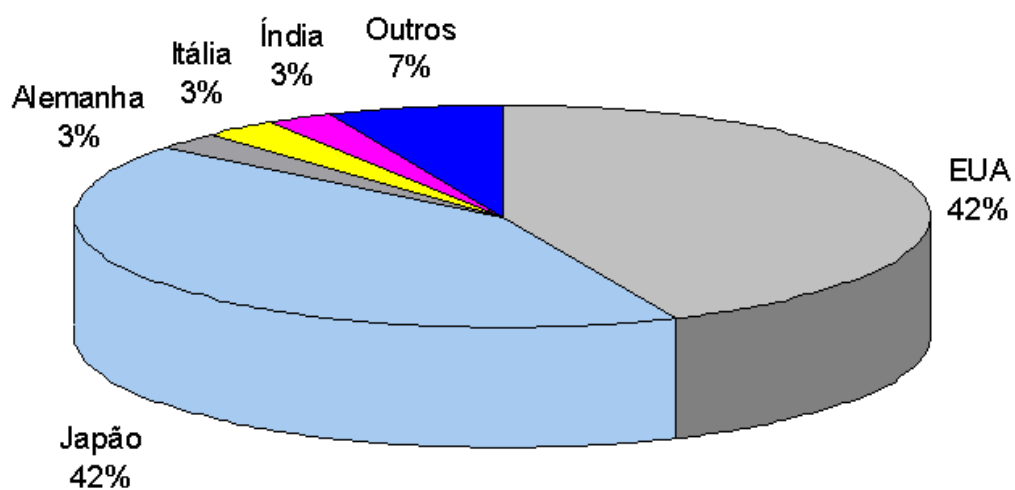
O interesse industrial mundial por metabólitos produzidos pelos actinomicetos está distribuído segundo Manfio & Lemos (2003), em 57% nas universidades e centros de pesquisa e em 43% nas empresas privadas, destacando-se o Japão e os Estados Unidos na pesquisa e produção desses metabólitos (Figuras 1, 2 e 3).



**Figura 2** - Porcentagem de instituições envolvidas com pesquisa de metabólitos produzidos por actinomicetos (Manfio & Lemos 2003).



**Figura 3** - Porcentagem de pesquisa de metabólitos de interesse industrial produzidos pelos actinomicetos por país (Manfio & Lemos 2003).



**Figura 4** - Produção mundial de metabólitos originados de actinomicetos (Manfio & Lemos 2003).

## 1.2 Drogas antibióticas

O nome antibiótico foi definido por Waksman, em 1942, como sendo uma substância produzida por seres vivos antagonista ao desenvolvimento ou à vida de outros microrganismos em altas diluições no meio bioquímico do nosso corpo. São produtos do metabolismo secundário que inibem o processo de crescimento de outros germes, mesmo quando usados em baixas concentrações (Serra 2003).

Embora a penicilina tenha sido descoberta por Fleming, em 1929, após observar a inibição de crescimento de estafilococos, em placa de Petri, por uma cultura contaminante de *Penicillium notatum*, o seu uso clínico somente foi definido em 1940, dando origem a mais variada e mais utilizada classe de antibióticos: os  $\beta$ -lactâmicos (Serra 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 compõe. A população de microrganismos por grama de solo foi estimada, sendo observado que a sua quantidade variava na dependência do tipo de solo, profundidade, estação do ano e temperatura. Em decorrência dessas pesquisas constatou-se que vários desses microrganismos, aqui incluindo os actinomicetos, possuíam grande atividade antimicrobiana, pois forneciam proteção em situações competitivas pela eliminação de outros microrganismos do solo (Gottlieb 1976).

A procura por antibióticos com efeitos menos tóxicos para as células humanas, levou Waksman, em 1944, a isolar a estreptomicina de uma cepa de *Streptomyces*, tornando-se a primeira droga efetiva no tratamento da tuberculose, e, por isso, receber o Prêmio Nobel de Medicina em 1952. Durante a sua vida, Waksman isolou a neomicina além de outros 16 antibióticos, grande parte deles sem uso clínico, devido a sua alta toxicidade (Serra, 2003).

O método de investigação utilizado por Waksman, na descoberta da estreptomicina, dominou a pesquisa dos antibióticos por décadas (Serra, 2003). A descoberta da produção de actinomicina por *Streptomyces antibioticus* promoveu um intenso estudo dos estreptomicetos na comunidade científica e industrial. Conscientes de que estes microrganismos eram fontes promissoras para a produção de antibióticos comercialmente viáveis e altamente lucrativos vários pesquisadores se sentiram estimulados a desenvolverem novos métodos de isolamento e cultivo, sempre visando a descoberta de novos compostos.

Mais de 1000 espécies de *Streptomyces* foram descritas no período compreendido entre 1940 e 1957 (Pridham et al. 1958), tendo aumentado para cerca de 3.000 em 1970, apesar da imensa maioria estar apenas citada na literatura de patentes (Trejo 1970).

Um novo isolado era, geralmente, descrito baseado em critérios subjetivos (propriedades morfológicas e de pigmentação) e raramente eram padronizadas suas condições de crescimento. Em 1960 foi estabelecido o Projeto Internacional para os *Streptomyces* (International *Streptomyces* Project – ISP) visando determinar as relações entre os gêneros e entre as espécies (O'Donnell 1988).

O gênero *Streptomyces*, entre os actinomicetos lidera como o maior produtor de antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas (Tabela 1). A diversidade de moléculas produzidas por estreptomicetos em relação aos outros gêneros de actinomicetos pode ser observada na tabela 2.

Tabela 1 - Distribuição do número de antibióticos produzidos por actinomicetos (modificado segundo Goodfellow & O'Donnell 1989).

Gêneros	Número de antibióticos (a)			
	1974	1980	1984	1988
<i>Streptomyces</i>	1934	2784	3477	4876
<i>Micromonospora</i>	41	129	269	398
<i>Nocardia</i>	45	74	107	262
<i>Actinomadura</i>	0	16	51	164
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95	146
<i>Streptoverticillium (b)</i>	19	41	64	138
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26	39
<i>Dactylosporangium</i>	0	4	19	31
<i>Microbiospora</i>	4	6	6	10
<i>Saccharopolyspora(c)</i>		4	33	44
<i>Actinosynnema</i>	-	-	5	14
<i>Streptoalloteichus</i>	-	3	4	12
<i>Kitasatosporia (b)</i>	-	-	-	11
<i>Kibdelosporangium</i>	-	-	-	7

Legenda:

(a) Dados de Bérty (1974, 1984), Nisbet (1982) e Bérty database (1988).

(b) Os gêneros *Kitasatosporia* e *Streptoverticillium* são atualmente considerados sinônimos de *Streptomyces*.

(c) Gêneros não existentes (descritos) até a data referida.

Tabela 2 – Antibióticos produzidos por actinomicetos (segundo Okami &amp; Hotta 1988).

Gêneros	Grupos de antibióticos										
	AG	ML	AML	BLA	PEP	GP	ANC	TC	NUC	POL	QN
<i>Streptomyces</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Actinomadura</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Actinoplanes</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>Actinosynnema</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ampullariella</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Dactylosporangium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Kibdelosporangium</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Micromonospora</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Nocardia</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
<i>Nocardiosis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudonocardia</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Saccharomonospora</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Saccharopolyspora</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptosporangium</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Legenda:

AG, aminoglicosídeos; ML, macrolídeo; AML, ansamicina; BLA,  $\beta$  -lactâmico; PEP, peptídeo; GP, glicopeptídeo; ANC, antraciclina; TC, tetraciclina; NUC, nucleosídeo; POL, polieno; QN, quinolona.



### 1.3 Agentes antitumorais

A radioterapia, a imunoterapia e a quimioterapia são técnicas individualmente úteis que quando combinadas em situações particulares, oferecem mais eficiência ao tratamento contra tumores. Várias drogas quimioterapêuticas são produtos naturais sintetizados por várias espécies microbianas, principalmente, actinomicetos. Estes, produzem vários compostos que mostram atividade contra linhagens celulares tumorais, e vários desses compostos têm aplicação como agentes quimioterapêuticos no tratamento de vários cânceres (Salas & Méndez 1998).

A demanda por novas drogas antitumorais existe devido a várias razões. A primeira é que o rápido desenvolvimento de resistência para múltiplas drogas quimioterapêuticas constitui um grande problema no tratamento do câncer. Essa resistência está frequentemente associada com o aumento expressivo da P-glicoproteína, que é um transportador do tipo *ATP binding-cassette*, que retira drogas para fora das células em um processo ATP dependente, além de reduzir a concentração intracelular da droga (Salas & Méndez 1998). A segunda é devido à alta toxicidade e aos efeitos colaterais usualmente associados às drogas utilizadas na quimioterapia para câncer. A terceira razão é a limitação dos métodos tradicionalmente usados na quimioterapia, o que faz com que ocorra uma maior demanda de novas drogas com menos efeitos colaterais ou com uma maior eficácia terapêutica (Salas & Méndez 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, glioxalase, adenosina deaminase e os inibidores de tirosina proteína quinase (Umezawa 1988).

A maioria dos agentes antitumorais exerce suas ações citotóxicas interferindo com a função do DNA 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 (Salas & Mendez 1998).

## 1.4 Seleção para novas drogas

Com a seleção de microrganismos multirresistentes às drogas já existentes, ocasionando um aumento na frequência das infecções hospitalares, principalmente entre os idosos e pacientes imunocomprometidos, suscitou-se maior interesse das indústrias farmacêuticas pela busca de novos e melhores agentes antimicrobianos (Donadio et al. 2002b). Novos programas de seleção de alvos direcionados têm sido estabelecidos para maximizar o isolamento de cepas de actinomicetos com habilidade em produzir novos antibióticos e minimizar os testes de cepas produtoras já conhecidas (Okami & Hotta 1988).

A pesquisa de ponta para novas substâncias de importância agrícola ou farmacêutica pode ser conduzida através da triagem de grandes coleções de diversas moléculas químicas (geralmente definidas como bibliotecas), empregando testes designados para se detectar relevantes alvos moduladores (Donadio et al. 2002a).

Os programas de triagem de novos antibióticos geralmente envolvem os seguintes passos: (a) isolamento e cultivo do organismo; (b) teste de atividade antibiótica e (c) caracterização química e identificação das substâncias antibióticas (Okami & Hotta 1988).

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 em tubos 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. 2002b).

No desenvolvimento de novas drogas, os conhecimentos básicos sobre as doenças são utilizados para se encontrar moléculas alvo, as quais são submetidas à interação com compostos químicos, previamente escolhidos, os quais são selecionados através do HTS (*High Throughput Screening*) como “compostos primários” os que apresentarem maior eficiência e potencial para se tornarem um fármaco (Gomes 2003). A segunda metodologia envolve dados estruturais da enzima alvo. É reconhecida como RDD (*Rational Drug Design*). Entretanto, não existe uma separação entre as duas metodologias. Ambas requerem a identificação do alvo molecular (Donadio et al. 2002b). O objetivo do descobrimento de alvos

está na identificação e validação de alvos sensíveis a drogas para intervenções terapêuticas, enquanto que o descobrimento de compostos primários identifica novas moléculas químicas que agem sobre esses alvos (Gomes 2003).

Os rápidos avanços no seqüenciamento do DNA possibilitam obter informações completas dos genes bacterianos numa velocidade sem precedente. Em pouco tempo será possível saber se a escolha do alvo está presente no patógeno de interesse (Donadio et al. 2002b).

### 1.5 *Actinoplanetes*

Pertencem à ordem *Actinomycetales*, família *Actinoplanaceae*. Os *Actinoplanetes* se constituem em membros dos actinomicetos, os quais estão intimamente relacionados com o gênero *Actinoplanes* (Holt et al. 1994). A classificação dos gêneros se baseia na morfologia do esporângio. O nome foi introduzido por Nonomura e Takagi (1977) para caracterizar sua adaptação em ambientes aquáticos com um estágio móvel durante o seu ciclo de vida.

Produzem um micélio ramificado, fino, não fragmentado. São gram-positivos. Possuem micélio aéreo insuficiente ou ausente. Sob certas condições, várias cepas podem ter hifas arrançadas em formação de paliçada. São altamente coloridos com pigmentos difusíveis em várias cores. Seus esporos são esféricos ou subesféricos para irregular, sendo produzidos dentro dos esporângios (vesículas de esporos). Quando a formação em paliçada está presente, os esporângios são produzidos, principalmente, na extremidade da hifa em paliçada. Quando imersos em água, seus esporos tornam-se móveis devido à presença de flagelos polares (Holt et al. 1994).

A parede celular contém ácido-meso-diaminopimérico (meso-DAP), glicina, D-xilose e L-arabinose. São aeróbios, quimiorganotróficos, mesofílicos ou moderadamente termofílicos com uma temperatura de crescimento variando entre 15-35°C. Possuem uma concentração de G+C de 72-73 mol% (Holt et al. 1994).

As mudanças morfológicas características dos *Actinoplanetes* durante o ciclo de vida têm sido descritas por Bland e Couch (1981). *Actinoplanes* formam esporângios nas extremidades de pequenas hastes (hifas) representando parte de um micélio aéreo rudimentar, ou nas extremidades de hifas em paliçadas. Imersão do esporângio em água geralmente resulta na liberação de esporos em aproximadamente uma hora à temperatura ambiente. O

processo pode ser facilitado pela adição de agentes umidificantes (tween 80) desde que a superfície do esporângio seja hidrofóbica (Higgins, 1967).

Cepas de *Actinoplanetes* são encontradas incidentalmente e em pequenos números em ágaros semeados com suspensões de solo, mas o fato do seu ciclo de vida abranger um estágio no qual as células são móveis, tem estimulado a habilidade de pesquisadores interessados em isolar esses organismos. Em um dos mais habilidosos e bem sucedidos procedimentos, amostra do solo é colocada em uma placa de Petri e é adicionada água até cobri-la. Vários tipos de iscas (sementes, pedaços de folhas, pedaços de papel de filtro, grãos de pólen, cabelo, etc) são colocadas na superfície da água ou, parcialmente, submersos. As placas são deixadas intocadas por vários dias à temperatura ambiente e examinadas de tempo em tempo sob microscopia. Ocasionalmente, entre os microrganismos colonizantes da isca, esporângios típicos de *Actinoplanes* podem ser vistos atacando o material por pequenas hastes. Vários pesquisadores têm usado o método de iscagem com sucesso. Uma variação conveniente consiste em fazer um suporte molhado com os grãos de pólen colonizados em uma gota de água em uma lâmina, e seguindo a liberação do esporo, microscopicamente. Quando isso ocorre, o líquido agora enriquecido com os esporos móveis, pode ser usado como um inóculo para o isolamento. Grãos de pólen de diferentes espécies de plantas podem ser usados como iscas, mas Willoughby (1968) e Nonomura e Takagi (1977), entre outros, consideraram que o pólen do *Pinus* apresenta melhores resultados e são altamente específicos para *Actinoplanes*.

Baseado na habilidade dos *Actinoplanetes* em suportar a dissecação Makkar e Cross (1982) desenvolveram um método de isolamento, no qual, o material da amostra é seco e subseqüentemente re-hidratado, sob condições controladas. Com isso obtém uma substancial redução na proporção dos contaminantes. Assim, sugerido pelos autores, o método pode ser usado em combinação com o procedimento capilar.

Estudando o comportamento quimiotático de esporos do *Actinoplanes brasiliensis* (Palleroni 1976) sugeriu as bases para outros métodos de isolamento de *Actinoplanes* da natureza. Esporos dessas espécies são atraídos por íons cloreto e não tinham sido relatados como atraentes para outros organismos móveis. O método quimiotático (Palleroni 1980) consiste em inundar uma amostra de solo em água. Após, aproximadamente uma hora, imergir um microcapilar de 1  $\mu$ L preenchido com uma diluição esterilizada de tampão fosfato (0,01 mol/L, pH 7,0) contendo KCl (0,01mol/L) em uma fase líquida, mantendo a ponta do capilar cerca de 1mm abaixo da superfície do líquido. As operações são convenientemente realizadas usando câmaras que são uma modificação daquelas usadas para os experimentos

quimiotáticos (Palleroni 1976). As câmaras podem ser improvisadas em vários modelos, usando, por exemplo, algumas placas comercialmente designadas para o trabalho de cultura de tecidos. Após uma hora de imersão do capilar, ele é removido, o exterior é cuidadosamente lavado com algumas gotas de água estéril e o conteúdo é vertido em água ou tampão. Dessa suspensão, alíquotas podem ser semeadas em placas com ágar amido-caseína. O método é muito efetivo e demanda consideravelmente menos tempo do que outras técnicas de iscagem. No presente, entretanto, não existe uma boa explicação para o sucesso da técnica, considerando que a atração pelos íons cloreto não é universal entre as espécies de *Actinoplanes* e existe um notável número de cepas indiferentes ao cloreto entre aquelas captadas dentro dos capilares. Outros fatores que podem contribuir são o comportamento microaerófilo dos esporos e a quimiotaxia negativa para repelir o que pode estar presente nas amostras de solo.

As colônias cultivadas em ágar apresentam-se lisas, brilhantes ou enrugadas. A coloração pode apresentar-se em várias tonalidades como amarelo, laranja, vermelho, azul, verde, ocre, púrpura, marrom e preto (Holt et al. 1994).

Os *Actinoplanetes* não diferem de outros actinomicetos em sua manutenção. Bons resultados são obtidos pelo congelamento de suspensões concentradas de esporos em tampão fosfato diluído ou em meio líquido com 5% de glicerol (v/v) a – 20°C. A viabilidade parece melhorar quando parte da massa vegetativa também está presente na suspensão. Micélio e esporângio sobrevivem à liofilização (Parenti & Coronelli 1979).

A escolha desse “*genera*” se justifica na busca por actinomicetos raros, visto que fazem parte de um seleto grupo de microrganismos produtores de metabólitos secundários e por não haver relatos na literatura do isolamento de cepas de *Actinoplanetes* do solo de cerrado.

## 2. OBJETIVOS

- Isolar *Actinoplanetes* do solo de cerrado goiano.
- Comparar 2 meios de cultura na indução da produção de moléculas bioativas por *Actinoplanetes*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos isolados de *Actinoplanetes*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) e no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFG.

A amostra de solo foi coletada a uma profundidade de 0-10 cm em uma área de plantação de soja no cerrado, no município de Acreúna - GO, em agosto de 2.000. A coleta foi realizada em 4 pontos distintos e posteriormente homogeneizada. A escolha da amostra se justifica por tratar-se de um solo em período da entre-safra, rico em matéria orgânica em decomposição.

#### 3.1 Meios de cultura utilizados

Para o adequado isolamento dos *Actinoplanetes* foi utilizado o ágar amido caseína (ACT), segundo Waksman (Palleroni 1980) por ser o meio mais indicado na literatura. Este meio é constituído de (g/L) amido, 10,0 g; caseína, 1,0 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 g; ágar 15,0 g, pH 7,0-7,5. Na purificação dos isolados foi empregado o ágar ISP-2 (Shirling & Gottlieb 1966), constituído de (g/L) glucose, 4,0 g; extrato de levedura, 4,0 g; extrato de malte, 10,0 g; ágar, 20,0 g; pH 7,3. Para a determinação da atividade antimicrobiana foram usados para o cultivo das cepas o ágar ACT (descrito anteriormente) e o ágar MPE (Melo & Sanhueza 1995) constituído de (g/L) farinha de soja, 20,0 g; glucose, 20,0 g;  $\text{CaCO}_3$ , 2,0 g; NaCl, 5,0 g; ágar, 15,0 g; pH 7,0, que posteriormente, foram inoculadas em ágar Müller Hinton, constituído de (g/L) infusão de carne, 1,0 g; caseína hidrolisada, 17,5 g; amido, 1,5 g; ágar, 15,0 g; pH 7,4 e ágar Sabouraud, constituído de (g/L) peptona, 10 g; glicose, 40 g; extrato de levedura, 5 g; infusão de cérebro e coração (BHI), 1,0 g, ágar, 15,0 g; pH 7,0. Para a determinação da produção de substâncias bioativas foi empregado o caldo ACT (ágar ACT em que o ágar foi suprimido) e o caldo MPE (Melo & Sanhueza 1995) constituído de (g/L) farinha de soja, 20,0 g; glucose, 20,0 g;  $\text{CaCO}_3$ , 2,0 g; NaCl, 5,0 g, pH 7,0. Os microrganismos foram mantidos em ágar ACT.

### 3.2 Isolamento dos *Actinoplanetes*

Os *Actinoplanetes* foram isolados pelo método quimiotático, segundo Palleroni (1980). A amostra foi submetida a um pré-tratamento de dessecação por 16 horas à temperatura ambiente. Após o pré-tratamento, 0,5 g de solo foi adicionada em cada compartimento de uma câmara de isolamento. Água esterilizada foi adicionada a cada compartimento da câmara de isolamento até um nível de aproximadamente 2,0 mm acima do canal de conexão. Este conjunto foi incubado a 28-30°C por 1 hora afim de que ocorresse a indução da mobilidade e a liberação dos esporos dos *Actinoplanetes* presentes. (Anexo 1)

Após este período, um tubo capilar esterilizado contendo KCl 0,01 mol/L em tampão fosfato 0,01 mol/L, foi colocado no canal. Este conjunto foi incubado novamente por 1 hora sob as mesmas condições. Posteriormente, o tubo capilar foi removido da câmara e lavado externamente com água esterilizada e o seu conteúdo vertido em um tubo Eppendorf contendo 1,0 mL de água esterilizada (Palleroni 1980).

Alíquotas de 100 µL dessa suspensão foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar ACT. As placas foram incubadas a 30°C, por 7 a 21 dias até o desenvolvimento de colônias características de *Actinoplanetes* (Figuras 5 e 6). As colônias características foram retiradas e semeadas em placas de Petri contendo ágar ISP-2 e novamente incubadas a 30°C até a esporulação. Após a esporulação colônias isoladas foram retiradas e novamente inoculadas em placas de Petri contendo ágar ISP-2 e incubadas a 30°C até a esporulação. Esse processo foi repetido por 5 vezes para se certificar da pureza dos microrganismos isolados. As colônias purificadas foram analisadas quanto à forma, afinidade tintorial, e separadas as que se apresentavam com características de *Actinoplanetes* (Holt et al. 1994). 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 (Holt et al. 1994).



### 3.3 Microrganismos indicadores da atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos *Actinoplanetes* foram utilizadas as seguintes culturas de microrganismos: *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. subtilis* 16, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* CCT 3225, *Rhodococcus equi* CCT 0541, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 0090, *P. fluorescens* CCT 0595, *Salmonella* sp, *Serratia* sp, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Candida albicans* CCT 0776, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Rhodotorula* sp, *Trichosporum* sp.

Esses microrganismos foram preservados através de repiques mensais em meio inclinado e mantidos sob refrigeração.

### 3.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos isolados

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada inoculando os microrganismos previamente isolados no meio ACT e purificados após 5 repiques no meio ISP-2 nos ágaros ACT e MPE (para avaliar o meio de cultura adequado a produção de atividade antimicrobiana). Os *Actinoplanetes* isolados, após serem inoculados nestes ágaros, foram incubados a 28-30°C por 14 dias. Em seguida, cilindros de 7mm de diâmetro foram cortados destes ágaros e colocados sobre placas de Petri contendo o ágar .Müller-Hinton, em cuja superfície haviam sido inoculadas, previamente, as bactérias indicadoras diluídas para a metade da concentração do tubo nº 1 da Escala de McFarland (Woods & Washington 1995). A determinação da atividade antifúngica foi realizada de forma semelhante para bactérias, porém, foi utilizado o ágar Sabouraud. As placas de Petri foram incubadas a temperaturas ideais para o crescimento dos diferentes tipos de microrganismos indicadores utilizados. A leitura da atividade antimicrobiana foi realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento (em mm) dos microrganismos após 24-48 horas para bactérias e fungos, respectivamente. (Anexo 2)

### 3.5 Produção da substância antibiótica

Para se obter um bom rendimento na produção de antibiótico, durante o processo de fermentação líquida, é importante conseguir uma boa quantidade de biomassa, e as células também devem apresentar-se em ótimas condições fisiológicas. Para isto, foi preparado um pré-inóculo dos isolados que apresentaram atividade antimicrobiana em um Erlenmeyer contendo 15 mL de caldo ACT. Este pré-inóculo foi incubado sob agitação em “shaker” a 180 rpm, 30°C por 48 horas. Após este tempo, foram adicionados mais 50mL de caldo ACT novo e todo o conteúdo desse Erlenmeyer foi incubado novamente, sob as mesmas condições anteriores, por um período de 14 dias. (Anexo 3)

### 3.6 Extração da substância bioativa

Após o término da fermentação, todo o conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado para que ocorresse a separação do micélio e do sobrenadante (extrato aquoso). O micélio foi triturado durante 5 minutos com etanol absoluto, numa proporção de 2,0 mL do solvente para cada grama de micélio (Delle Monache et al. 1970). A massa micelial triturada foi filtrada. O filtrado ficou reservado e a massa foi tratada novamente com etanol absoluto por mais 5 minutos. Este processo foi repetido 2 vezes, constituindo o extrato etanólico.

Ao extrato aquoso, obtido no processo de separação, foram adicionados 10 mL de acetato de etila, que após agitação em um funil de separação, as interfases obtidas foram separadas, preservando-se a fase orgânica (constituindo o extrato de acetato de etila). O extrato aquoso foi tratado mais 2 vezes com acetado de etila e as diferentes porções obtidas foram reunidas.

O extrato etanólico foi concentrado sob baixa temperatura em um rotavapor. Ao resíduo obtido após a evaporação, foram adicionados os extratos de acetato de etila. Esta mistura foi novamente evaporada no rotavapor. O precipitado final obtido foi ressuspenso em 1 mL de etanol absoluto, constituindo o extrato etanólico bruto. Os extratos etanólicos brutos foram colocados em tubos Eppendorf e armazenados em freezer a – 20°C. (Anexo 3)

### 3.7 Determinação da atividade citotóxica do extrato etanólico bruto frente a *Artemia salina*

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).

Ovos de *A. 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. (Anexo 4)

Uma solução estoque do extrato etanólico bruto foi preparada, solubilizando-o em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1:1 (200 µL deste extrato em 200 µL de DMSO) e o volume completado para 10 mL com a solução salina (solução estoque – 20.000 ppm), previamente preparada. Esta solução foi utilizada para a preparação das demais diluições empregadas, que ocorreram em triplicata. Foram realizadas diluições de 2.500, 5.000, 10.000 e 20.000 ppm. Aos tubos, contendo 1,0 mL destas diluições foram adicionados 10 náuplius de *Artemia salina*. Paralelamente, foram realizados controles do DMSO e do etanol. Os tubos foram incubados sob iluminação a 30°C por 24 horas. Após este período, o número de náuplius mortos ou com perda de movimento foram contados. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da DL<sub>50</sub>.

A DL<sub>50</sub> é a dosagem que mata 50% dos animais experimentais. Ela foi calculada pela análise de regressão dos resultados obtidos, após a determinação da porcentagem de mortalidade das larvas. Essa porcentagem de mortalidade é igual à relação do número total de larvas mortas ou imóveis e o número total de *Artemia salina* X 100 (Takahashi et al. 1989).

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

Os resultados foram também analisados utilizando o programa LC50 (Hamilton et al 1978) para a estimativa da LC50.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento

Foram isolados 6 (seis) morfo-espécies com características de *Actinoplanetes* (Tabela 3). Os isolados foram identificados como: *Actinoplanetes* ACR3, *Actinoplanetes* ACR4, *Actinoplanetes* ACR7, *Actinoplanetes* ACR13, *Actinoplanetes* ACR14 e *Actinoplanetes* ACR23. Um dos fatores que favoreceram ao isolamento de tais cepas talvez tenha sido a época do ano em que a amostra foi coletada (agosto), por se tratar de período de entre-safra, quando o solo se apresenta rico em matéria orgânica em decomposição, estando, portanto, com uma concentração aumentada de nutrientes.

Tabela 3 – Características macroscópicas do cultivo de *Actinoplanetes* isolados em ágar ACT após 14 dias de cultivo.

Isolados	Micélio Aéreo	Micélio de Superfície
<i>Actinoplanetes</i> ACR3	Laranja	Laranja
<i>Actinoplanetes</i> ACR4	Cinza	Marrom
<i>Actinoplanetes</i> ACR7	Cinza	Cinza
<i>Actinoplanetes</i> ACR13	Laranja escuro	Laranja escuro
<i>Actinoplanetes</i> ACR14	Amarelo	Amarelo
<i>Actinoplanetes</i> ACR23	Marrom	Marrom

Verificou-se que quando cultivadas em ágar ACT, as cepas que demonstraram ter uma maior atividade antibacteriana apresentaram-se com micélio aéreo e de superfície nas cores cinza e marrom, enquanto que as demais, apresentaram em cor amarelo, laranja e laranja escuro. As cores dos micélios podem estar associadas a grupos químicos que possuem atividade antimicrobiana dessas cepas de *Actinoplanetes*.

Observou-se que o ágar ACT preconizado por Palleroni (1980) demonstrou ser ideal para o crescimento de *Actinoplanetes* (Figura 5).

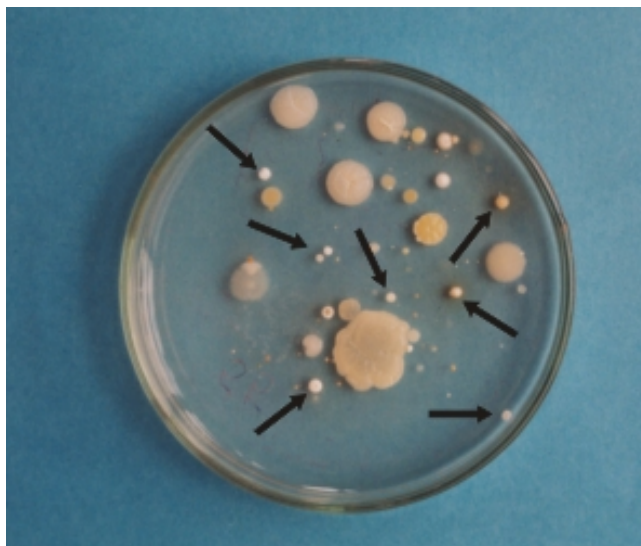


Figura 5 - Colônias de *Actinoplanetes* em ágar ACT após 14 dias de cultivo.

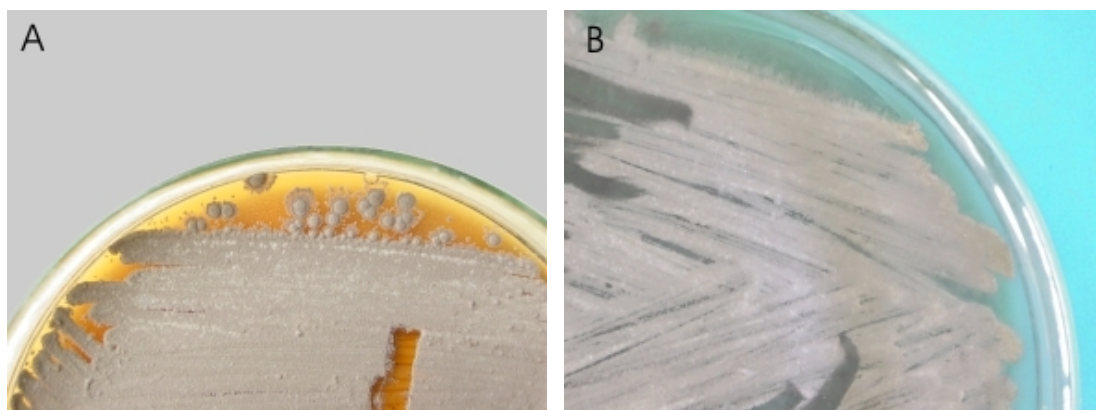


Figura 6 – Características macroscópicas do cultivo dos isolados *Actinoplanetes* ACR4 (A) e *Actinoplanetes* ACR7 (B) em ágar ACT, após 14 dias de cultivo.

## 4.2 Atividade antimicrobiana

A capacidade de produção de moléculas com atividade antimicrobiana pelos isolados foram testadas em dois meios de cultivo diferentes: ágar ACT (Palleroni 1980) e ágar

MPE (Melo & Sanhueza 1995). A utilização de diferentes meios para a produção de moléculas bioativas visou selecionar um meio cuja produção do antimicrobiano fosse maior.

A produção de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana, proveniente de colônias cultivadas no ágar ACT foi maior quando comparada às colônias cultivadas no ágar MPE (Tabela 4). As cepas de *Actinoplanetes* ACR4, ACR7, e ACR23 demonstraram maior atividade frente a bactérias gram positivas quando cultivadas neste meio. A cepa ACR 13, demonstrou atividade frente a *Streptococcus epidermidis* quando cultivada também em meio ágar ACT. Somente a cepa de *Actinoplanetes* ACR7 apresentou atividade antimicrobiana quando cultivada no ágar MPE. Observou-se que os isolados não possuíam atividade frente às bactérias gram negativas e aos fungos testados tanto quando cultivadas em meio ágar ACT quanto MPE, exceto o isolado *Actinoplanetes* ACR4 que apresentou atividade frente a *Pseudomonas fluorescens* CCT 0595 (halo de inibição com 10 mm de  $\phi$ ) quando cultivado em meio ACT.

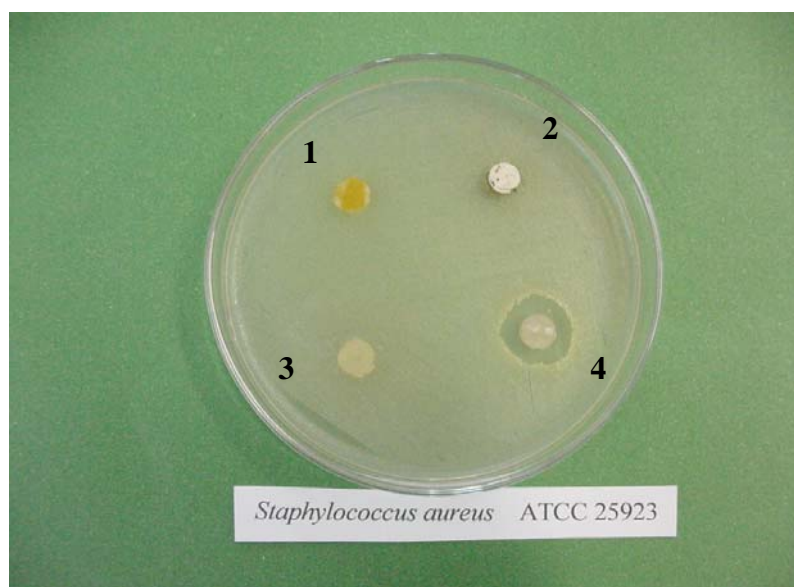


Figura 7 - Atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dos *Actinoplanetes* isolados, cultivados em ágar ACT (1. ACR 3, 2. ACR 14, 3. ACR 13 e 4. ACR 7), após 24 h a 30°C.

O ágar ACT apresentou melhores condições para produção de molécula bioativas (antimicrobianas) quando comparado ao ágar MPE, nas condições experimentais. Esta

característica pode ser devido à relação carbono/nitrogênio do ágar estar mais próxima da concentração ideal para a produção destes antibióticos.

Diferentes constituintes presentes no meio de cultura podem influenciar a produção de moléculas bioativas. Além destes constituintes, o pH, a temperatura, o estado físico (sólido ou líquido) também interferem (Omoto et al. 1979; Shomura et al. 1979; Furlan 1997). Geralmente, a produção de metabólitos secundários é observada em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, onde os nutrientes, provavelmente, reprimam a formação das enzimas inibidoras da síntese destes metabólitos (Piret & Demain 1988).

Analisando a produção de armentomicina por *Streptomyces armentosus*, He et al. (1995) observaram que a produção deste antibiótico é grandemente influenciada pela concentração de amido presente no meio (diferentes relações carbono/nitrogênio). Furlan (1997), comparando a produção do complexo rentamicina por *Streptomyces olindensis* DAUFPE 5622 também observou diferenças nas atividades antimicrobianas do complexo quando testados frente a diferentes meios (MP, STL-5 e R5Mod.). A autora, observou que o meio R5Mod. , apresentava melhor atividade antimicrobiana. Segundo sua descrição, os outros meios apresentavam componentes não refinados e indefinidos, podendo conter impurezas que afetariam a produção (Furlan 1997). Lyra et al. (1968) demonstraram que a glucose é a melhor fonte de carbono para a produção de rentamicina por *Streptomyces olidensis*.

O ágar MPE contém farinha de soja como um de seus constituintes e possui como fonte de carbono a glucose, que é um monossacarídeo mais facilmente assimilado pelos microrganismos do que o amido. Apesar dessas características, nas condições experimentais, ele não apresentou melhor produção de substâncias bioativas para as cepas isoladas.

O fenômeno de repressão da produção ainda não está totalmente esclarecido, parecendo tratar-se de um fenômeno diverso do encontrado nas bactérias enteropatogênicas (Demain 1992). A literatura descreve o exemplo de linhagens produtoras de antibióticos que sofrem este tipo de repressão. Como exemplo podemos citar: a produção de actinomicina por *S. antibioticus* a produção de espectinomicina, por *S. griseus*, tilosina por *S. rimosus*, canamicina por *S. kanamyceticus*, tetraciclina por *S. aureofaciens*, eritromicina por *Saccharopolyspora erythraea*, etc (Demain 1992; Demain & Feng 1995).





Tabela 4 - Determinação da atividade antimicrobiana dos *Actinoplanetes* isolados frente a bactérias gram-positivas.

<b>Bactérias Indicadoras</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR3</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR4</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR7</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR13</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR14</b>	<b><i>Actinoplanetes</i> ACR23</b>
<b><i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579</b>	ACT	-	++	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	-	-
<b><i>Bacillus subtilis</i> 16</b>	ACT	-	+	-	-	-	+
	MPE	-	-	++	-	-	-
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	ACT	-	++	-	-	-	+
	MPE	-	-	-	-	-	-
<b><i>Micrococcus luteus</i> CCT 3225</b>	ACT	-	-	-	-	-	++
	MPE	-	-	+++	-	-	-
<b><i>Rhodococcus equi</i> CCT 0541</b>	ACT	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	-	-
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	ACT	-	++	++	-	-	+
	MPE	-	-	+++	-	-	-
<b><i>S. epidermidis</i></b>	ACT	-	+++	.	+	-	-
	MPE	-	-	-	-	-	-
<b><i>S. saprophyticus</i></b>	ACT	-	+	++	-	-	+
	MPE	-	-	+++	-	-	-

Legenda: +++ 14-16 mm de  $\phi$ ; ++ 11-13 mm de  $\phi$ ; + 9-10 mm de  $\phi$ ; - ausência de halo de inibição, ACT: ágar amido caseína e MPE: meio para produção de estreptomicina

### 4.3 Atividade citotóxica do extrato etanólico bruto em *Artemia salina*

*Artemia salina* vem sendo empregada como um modelo para a determinação da capacidade citotóxica de diferentes materiais, entre eles destacamos: extratos vegetais (Arias et al 1995; Jiménez et al 2001) e antineoplásicos (Badawey & Kappe 1997).

Três isolados *Actinoplanete* ACR4, *Actinoplanete* ACR7 e *Actinoplanete* ACR23, que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas foram testados para a determinação da atividade citotóxica.

Os isolados não apresentaram atividade citotóxica (Tabela 5) nas concentrações testadas. Como o modelo de citotoxicidade em *Artemia salina* também é utilizado como um sistema de seleção primária de atividade antineoplásica e antiparasitária, (Takahashi et al. 1989; Badawey & Kappe 1997) sugere-se que estas cepas (*Actinoplanete* ACR4, *Actinoplanete* ACR7 e *Actinoplanete* ACR23) possuam a capacidade de síntese de moléculas bioativas frente a bactérias gram positivas e com baixa atividade citotóxica. Nas concentrações maiores que 20.000 ppm observou-se que quando comparado com o branco (etanol mais DMSO) ocorria um efeito citotóxico destes sobre a *Artemia salina*.

Tabela 5 – Avaliação do efeito citotóxico dos isolados de *Actinoplanetes* em *Artemia salina* (% de mortalidade)

Concentração (ppm)	<i>Actinoplanetes</i> ACR4	<i>Actinoplanetes</i> ACR7	<i>Actinoplanetes</i> ACR23
2.500	NO	NO	NO
5.000	NO	NO	NO
10.000	NO	NO	NO
20.000	NO	NO	NO

Legenda: NO não observado

Os resultados sugerem um potencial das cepas *Actinoplanete* ACR4, *Actinoplanete* ACR7 e *Actinoplanete* ACR23 na sua utilização em terapêutica antimicrobiana frente a infecções de bactérias gram positivas. Porém, testes em sistemas de cultivo de tecidos deverão

ser realizados para a confirmação ou não da baixa toxicidade das biomoléculas por eles produzidas.

## 5. CONCLUSÕES

- Foram isoladas 6 cepas de *Actinoplanetes*.
- Os isolados de *Actinoplanetes* ACR4, ACR7, ACR13 e ACR23 apresentaram atividade antibiótica frente a bactérias gram positivas, quando previamente cultivadas em ágar ACT, e somente a cepa ACR7 apresentou atividade antibiótica quando previamente cultivada em ágar MPE.
- O melhor indutor para a produção de moléculas bioativas, nas condições experimentais, foi o meio de cultura amido caseína (ACT).
- Apenas o isolado *Actinoplanetes* ACR4 apresentou atividade antibiótica frente a *Pseudomonas fluorescens*, não sendo observada nas demais bactérias gram-negativas testadas.
- Nenhuma das cepas isoladas demonstrou produzir moléculas com atividade antifúngica.
- A baixa, ou ausente citotoxicidade demonstrada nos extratos etanólicos brutos sugere que os isolados de *Actinoplanetes* ACR4, ACR7 e ACR23 apresentam um potencial emprego de suas substâncias bioativas na terapêutica antimicrobiana frente a bactérias gram positivas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias AR, Ferro E, Inchausti A, Ascura M, Ascota N, Rodriguez E & Fournet A 1995. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some *Paraguayan Asteraceae*. *J. of Ethnopharmacology* 45: 35-41.
- Badawey S & Kappe T 1997. Potential antineoplastics. Synthesis and cytotoxicity of certain 4-chloro-3-(chloroethyl)-2-methylquinolines and related derivatives. *Eur J. Med. Chem.* 32: 815-822.
- Baeman BL 1984. Actinomycete pathogenesis. In *The Biology of the Actinomycetes*, Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 457-459, 544p.
- Bland CE & Couch JN 1981. The family *Actinoplanaceae*. In *The Prokaryotes, A handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel (eds), Springer-Verlag, New York, 2004-2010.
- Blizzard TA, Ruby CL, Mrozik H, Preizer FA & Fisher MH 1989. *Brine Shrimp (Artemia salina)* as a convenient bioassay for avermectin analogs. *The J. of Antibiotics* 62(8): 1304-1307.
- Bérdy J 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to structure. *Advances in Appl. Microbiology* 3: 309-406.
- Bérdy J 1984. New ways to obtain antibiotics. *Chinese J. of Antibiotics* 7: 272-290.
- Connell ND 2001. Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Current Opinion in Biotechnol.* 12: 446-449.
- Delle Monache F, Marini-Bettolo GB, Albuquerque IL, Lyra FDA, Lima OG 1970. Sulle composizioni della rentamicina, un complesso antibiotico ed attività antitumorale prodotto da *Streptomyces olidensis*, ed. nov, sp. (DAUFPE e 5622). *Ann. Ist. Super. Sanità* 6: 357-364.**
- Demain AL 1992. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*, Ciba Found Symp 171: 3-23.
- Demain AL & Fang A 1995. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. *Actinomycetol.* 9: 98-117.

Demain AL, Aharonowitz Y & Martín JF 1983. Metabolic control of secondary metabolic pathways. In *Biochemistry and Genetic Regulation Of Commercially Important Antibiotics*, Vining, L.C. & Addison Wesley (eds), Reading, Mass. 49-72.

Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M & Puglia AM 2002a Microbial technologies for the Discovery of novel bioactive metabolites. *J. of Biotechnol.* 99: 187-198.

Donadio S, Carrano L, Brandi L, Serina S, Soffientini A, Raimondi E, Montanini N, Sosio M & Gualerzi CO 2002b. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents. *J. of Biotechnol.* 99: 175-185.

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

Furlan RLA 1997. *Obtenção e Estudo de mutantes com a Produção Alterada do Antibiótico Rentamicina Sintetizado por "Streptomyces olidensis"* DAUPPE 5622. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 76 pp.

Gesheva V 2002 Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. *Eur. J. of Soil Biology* 38: 85-88.

Gomes MVM O uso da bioinformática no desenvolvimento de drogas pelas indústrias farmacêuticas. <http://www.rge.fmrp.usp.br/cursos/topicosiii/paginas/web21/web21.htm>. Acesso em: 05 mar 2003.

Goodfellow M & Cross T 1984. Classification. In *The Biology of the Actinomycetes*, Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 7-164, 544p.

Goodfellow M & O'Donnell AG 1989. Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. In *Microbial Products: New Approaches*, Baumberg S, Rhodes PM (eds) Cambridge University Press, Cambridge. 343-383.

Goodfellow M & Williams ST 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev. Microbiol* 37: 189-216.

Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M 1984. Introduction to and importance of actinomycetes. In *The Biology of the Actinomycetes*, Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 1-6, 544p.

Goodfellow M 1994. Suprageneric classification of Actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4 Williams & Wilkins, Baltimore.

Gottlieb D 1976. The production and role of antibiotics in soil. *The J. of Antibiotics* 29(10): 887-1000.

Gutiérrez-Lugo MT & Mata Essayag R El gênero *Actinomadura* como uma fonte de princípios biodinâmicos de interes medicinal y agroquímico. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap14/> Acesso em 22 fev 2003.

Hamilton MA, Russo RC & Thurston RV 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7): 714-719.

He Jian-Yong, Vining LC, White RL, Horton K.L. & Doull JL 1995. Nutrients effects on growth and armentomycin production in cultures of *Streptomyces armentosus*. *Can. J. Microbiol.* 41: 186-193.

Higgins ML 1967. Releasing of sporangiopores by a strain of *Actinoplanes*. *J. Bacteriol.* 94: 495-498.

Hollick G 1995. Isolation and identification of aerobic actinomycetes. *Clinical Microbiol. Newsletter* 17(4).

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT & Williams ST 1994. Section 28 Actinoplanetes. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 1<sup>st</sup> ed, Williams & Wilkins Co., Batimore. pp 2418-2450, 2647p.

Jawetz, Melnick & Adelberg 1998. *Microbiologia Médica*. 20<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan SA, 437-439.

Jiménez G, Hasegawa M, Rodrigues M, Estradão, Mendez J, Castilho A, Gonzalez-Mujica F, Mota N, Vasquez J & Romero-Vecchione E 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J. of Ethnopharmacology* 77: 77-83.

Lacey J 1988. Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 359-432, 501p.

Lechevalier MP 1988. Actinomycetes in agriculture and forest. In *Actinomycetes in Biotechnology*, Goodfellow M, Willians ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 327-358, 501p.

Locci R & Sharples GP 1984. In *The Biology of the Actinomycetes*. Goodfellow M, Willians ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 165-191, 544p.

Lyra FDA, Araújo JM, Gonçalves de Lima O, Andrade AL & Schumacker IE 1968. Estudos taxonômicos de três cepas de *Streptomyces*, produtoras de antibióticos do grupo das antraciclinas, portadores de ação antitumoral. *Rev. Inst. Antib.* 10: 560-562.

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.

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.

Makkar NS & Cross T 1982. *Actinoplanetes* in soil and on plant litter from freshwater habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 209-218.

**Manfio GP & Lemos M de F Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas microrganismos e aplicações industriais. <http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/4/gilson.html>. Acesso em: 22 fev 2003.**

**Mateos Gonzáles, Pedro F Metabolitos secundarios de interes industrial. <http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema08MI.html>. Acesso em 11 mar 2003.**

**Melo IS, Sanhueza RMV 1995. *Método de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 72p.**

**Monciardini P, Sosio M, Cavaletti L, Chiocchini C & Donadio S 2002. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 419-429.**

Nisbet LJ 1982 Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *J. of Chemical Technol. and Biotechnol.* 32: 251-270.

Nolan RD & Cross T 1988. Isolation and screening of Actinomycetes. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Willians ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 1-32, 501p.



Nonomura H & Takagi S 1977. Distribution of Actinoplanetes in soils of Japan. *J. Ferment. Technol.* 55: 423-428.

O'Donnell AG 1988. Recognition of novel actinomycetes. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 69-85, 501p.

Okami Y & Hotta K 1988. Search and discovery of new antibiotics. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M (eds) Academic Press, 33-58, 501p.

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 (5): 436-441.

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

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

Parenti & Coronelli 1979. Members of the *Actinoplanes* and their antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 389-412.

Paul EA, & Clark FE 1996. Components of the soil biota. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Paul EA & Clark FE (eds), Academic Press, 69-107, 340p.

Pereira JC, Neves MCP & Drozdowics A 1999. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesq. Agrop. Bras.* 34: 99-108.

Piret JM & Demain AL 1988. Actinomycetes in biotechnology: an review. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 461-481, 501p.

Ramsey AJ 1984. Extration of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil boil. Biochem.* 16: 475-481

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.

Salas JA & Méndez C 1998. Genetic Manipulation of antitumor-agent biosynthesis to produce novel drugs. *Trends in Biotechnol.* 16: 475-482.

Sanglier JJ, Haag H, Huck TA & Fehr T 1993a. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* 144: 633-642.

Sanglier JJ, Wellington EMH, Behal V, Fiedler HP, Elloouz-Ghorbel R, Finance C, Hacene M, Kamoun A, Kelly C, Mercer DK, Prinzis S & Trigo C 1993b. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* 144: 661-663.

Sardi P, Saracchi M, Quaroni S, Petrolini B, Borgonovi GE & Merli S 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface sterilized roots. *Appl. Environ. Microbiol* 58(8): 2691-2693.

**Schirling EB & Gottlieb D 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 16(3): 313-340.**

Serra HA A história dos antibióticos. <http://www.medstudents.com.br/historia/fleming/fleming.htm>. Acesso em: 03 mar 2003.

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 (5): 427-435.

Sponga F, Cavaletti L, Lazzarini A, Borghi, Ciciliato I, Losi D & Marinelli F 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. of Biotechnol.* 70: 65-69.

Stetzenback LD 1997. Introduction to aerbiology. In *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Hurst CJ, Knudsar GR, McInerrey MJ, Stzenback LD, Walter MV (eds).

Takahashi A, Kurasawa S, Ikeda D, Okami Y & Takeuchi T 1989. *The J. of Antibiotics* 42(11): 1556-1561.

Takahashi Y, Matsumoto A, Senio A, Iwaí Y & Omura S 1996. Rare actinomycetes isolated from desert soils. *Actinomycetol* 10: 91-97.

Tortora GJ, Funke BR & Case CL 1998. *Microbiologia*. 6 ed., Artmed Editora, página 316.

Trejo WH 1970. *Evaluation of some concepts and criteria used in the speciation of streptomycetes*. Transactions of the New York Academy of Sciences. Series II, 32: 989-997.

Umezawa H 1988. Low-molecular-weight enzyme inhibitors and immunomodifiers. In *Actinomycetes in Biotechnology*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 285-325, 501p.

Vobis G 1997. Morphology of actinomycetes. In *Atlas of Actinomycetes*. Miyadoh S, Hamada M, Hotta K, Kudo T, Seino A, Vobis G & Yokota A (eds), The Society for actinomycetes Japan, 180-191, 223p.

Williams ST, Lanning S & Wellington EMH 1984. In *The Biology of the Actinomycetes*. Goodfellow M, Williams ST & Mordarski M (eds.) Academic Press, 481-528, 544p.

Willoughby LG 1968. Aquatic Actinomycetales with particular reference to the *Actinoplanaceae*. *Veroeff. Inst. Meersforch. Bremerhaven* 3: 19-26.

**Woods & Washington 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray PR, Baron EJ, Tenover FC & Tenover RH (eds.) ASM, 1327-1341, 1482p.**

