



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-
INSTITUCIONAL EM BIOTECNOLOGIA**

**COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
STREPTOMYCES spp.**

INGRID REIS DA SILVA

MANAUS
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-
INSTITUCIONAL EM BIOTECNOLOGIA**

INGRID REIS DA SILVA

**COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS PRODUZIDOS POR
STREPTOMYCES spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi- Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologias para a Saúde.

Orientador: Dr. Rudi Emerson Procópio
Co – Orientador (a): Dra. Mayra Kassawara Martins

MANAUS
2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

S586c Silva, Ingrid Reis da

Compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* spp /
Ingrid Reis da Silva .- Manaus: UFAM, 2012.

92.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade
Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Profº. Drº. Rudi Emerson Procópio

Co-Orientador: Drª. Mayra Kassawara Martins

1. Actinomicetos 2. Antibióticos I. Procópio, Rudi Emerson
(Orient.) II. Martins, Mayra Kassawara (Co-orient.) III. Universidade
Federal do Amazonas IV. Título

CDU(1997) 579.87(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia

Candidato (a): **Ingrid Reis da Silva**

Título da Dissertação: **Compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces spp.***

Orientador (a): **Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio**

Co-Orientador (a): **Dra. Mayra Kassawara Martins**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação, em sessão pública realizada dia 24 / 02 / 2012, considerou

Aprovado(a) () Reprovado(a)

Presidente (A) Assinatura 

Nome Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Examinador(a) Assinatura 

Nome: Dra. Clarice Maia de Carvalho

Instituição: Centro Universitário do Norte

Examinador(a) Assinatura 

Nome : Dra. Sandra Patrícia Zanotto

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Ofereço

À Deus,

Por ter me dado força nos momentos de fraqueza;

Ânimo nos momentos de tristeza;

Calma nos momentos de desespero;

*Por estar sempre presente em todos os momentos de
minha vida;*

*Obrigada Senhor, pois jamais teria conseguido sem
ti.*

Agradecimentos

Á Dra. Mayra Kassawara Martins, pela orientação e amizade, muito importante em minha construção pessoal e profissional. Agradeço pelo carinho, conhecimentos científicos e confiança depositada em mim ao longo de todos esses anos de trabalho juntas.

Ao Dr. Rudi Procópio, pela orientação, incentivo e apoio na realização deste trabalho. Agradeço os preciosos ensinamentos profissionais e pessoais que tive durante estes anos de convivência.

À amiga e colega de trabalho Clarice Maia pelas sugestões e ajuda imprescindível nas etapas iniciais deste trabalho e, principalmente pela paciência, aprendizado e amizade.

Á Universidade Federal do Amazonas, juntamente com a coordenação do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Á FAPEAM, pelo apoio financeiro desta pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia, em especial a Coordenações de Microbiologia sob coordenação do Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio, pela disponibilização de seus laboratórios para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Microbiologia do CBA, em especial aos queridos amigos do laboratório Andressa Primavera, Anne Caroline Tavares, Flávia Souza, Jussara Farias Isaque Silva e Samara Santos, que muito me ajudaram na realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas Andressa Primavera e Flávia Rafaela, pela amizade, apoio e por sempre estarem ao meu lado nesta caminhada.

Aos amigos do laboratório de Biologia molecular do CBA pelas análises realizadas e em especial ao Dr. André Luis Willerding, pela ajuda nos experimentos estatísticos deste trabalho.

Ao meu querido esposo Dinálvaro Nogueira, pelo amor e incentivo à realização de meus projetos.

À minha avó Juraci Cavalcante (in memoriam) e tia Josefa Peres (in memoriam), obrigada pela excelente criação e educação na fase inicial da minha vida, e pelo exemplo de pessoa que foram em vida, me ensinando valores verdadeiros, que me tornaram a pessoa que sou hoje.

À minha mãe, Maria do Carmo, que apesar de distante, sempre me apóia e torce pelo meu sucesso.

A todas as pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

O aumento crescente de bactérias resistentes a antibióticos incentiva à pesquisa por novas substâncias antibacterianas. Diante disso, a seleção de microrganismos com potencial para a produção de novos compostos antimicrobianos tem sido amplamente estudada. Dentre estes microrganismos uma especial atenção é dada aos actinomicetos que apresentam capacidade de produzir uma variedade de compostos bioativos como antibióticos, antifúngicos, antitumorais entre outros compostos que podem ser aplicados nos mais diversos segmentos da indústria. O gênero *Streptomyces* é considerado de grande importância industrial devido à sua capacidade de produzir muitos metabólitos secundários, respondendo por 80% dos antibióticos utilizados atualmente. Considerando a importância dos actinomicetos e a biodiversidade existente na Amazônia, este trabalho tem como objetivo isolar e selecionar actinomicetos produtores de antibióticos e otimizar a produção dos mesmos. Neste sentido, foi feita uma triagem inicial para detectar a atividade antimicrobiana dos 371 actinomicetos isolados de solo de diferentes localidades da região Amazônica. Foram realizados ensaios de antibiose para avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados frente aos microrganismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos. A partir desses resultados preliminares, 3 isolados foram considerados promissores, pois apresentaram atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC 292123. Estes, foram selecionados para o estudos de produção, utilizando o modelo de superfície de resposta, para avaliar as melhores condições físicas e químicas que possam interferir na produção do antibiótico de interesse. Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o isolado n° 01 é um potencial produtor de novos metabólitos bioativos. A caracterização morfológica e a análise da seqüência parcial da região 16S do rDNA, demonstram a grande diversidade deste grupo de microrganismos, sendo possível assim, a identificação a nível de gênero. Foi demonstrado que as condições ambientais e do substrato são fundamentais na produção de metabólitos secundários, principalmente antimicrobianos.

Palavras-chave: Actinomicetos. Antibiótico. *Streptomyces* spp.

ABSTRACT

The increasing number of antibiotic-resistant bacteria encourages the search for new antibacterial substances. Therefore, the selection of microorganisms with potential for production of new antimicrobial compounds have been extensively studied. Among these organisms a special attention is given to the actinomycetes that have the capacity to produce a variety of bioactive compounds such as antibiotics, antifungal, antitumor and other compounds that can be applied in various industry segments. The genus *Streptomyces* is considered of great industrial importance due to its ability to produce many secondary metabolites, accounting for 80% of currently used antibiotics. Considering the importance of actinomycetes and existing biodiversity in the Amazon, this study aims to isolate and select actinomycetes producing antibiotics and optimize their production. In this sense, he was made an initial screening to detect the antimicrobial activity of 371 actinomycetes isolated from soil from different localities in the Amazon region. Antibiosis trials were conducted to evaluate the antimicrobial activity against the indicator microorganisms isolated Gram-positive and Gram-negative. From these preliminary results, three isolates were considered promising because it showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 and *Enterococcus faecalis* ATCC 292123. These were selected for the study of production, using the response surface model to assess the best physical and chemical conditions that might interfere with production of the antibiotic of interest. The results presented here demonstrate that the isolate No. 01 is a potential producer of new bioactive metabolites. Morphological characterization and partial sequence analysis of 16S rDNA, demonstrate the great diversity of this group of microorganisms, and can thus identify the genus level. It has been shown that environmental conditions and the substrate are critical in the production of secondary metabolites, especially antibiotics.

Word-key: Actinomycetes. Antibiotic. *Streptomyces spp.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Características dos principais gêneros da ordem <i>Actinomycetales</i> ..	15
Figura 2.	Morfologia microscópica dos actinomicetos do gênero <i>Streptomyces</i>	17
Figura 3.	Diversidade morfológica de actinomicetos do gênero <i>Streptomyces</i>	18
Figura 4.	Principais antibióticos e datas das descobertas. Em destaque os obtidos por espécies de <i>Streptomyces</i>	24
Figura 5.	Fluxo de procedimentos para análises dos isolados com atividade antimicrobiana.....	32
Figura 6.	Preparação do inóculo das bactérias patogênicas indicadoras.....	34
Figura 7.	Método de antibiose por difusão em disco de papel.....	35
Figura 8.	Método de antibiose por difusão em ágar.....	36
Figura 9.	Isolamento e purificação dos actinomicetos.....	44
Figura 10.	Ensaio de antibiose contra <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 (A) <i>S.aureus</i> ATCC 25923, (B).....	46
Figura 11.	Gráfico de Contorno: isolado nº01 – Agitação x Tempo.....	51
Figura 12.	Gráfico de Contorno: isolado nº01 – pH x Tempo.....	52
Figura 13.	Gráfico de Contorno: isolado nº01 – Temperatura x Tempo	52
Figura 14.	Gráfico de Contorno: isolado 325 – Agitação x Temperatura.....	53
Figura 15.	Gráfico de Contorno: isolado 325 – Temperatura x pH.....	53
Figura 16.	Gráfico de Contorno: isolado 325 – Tempo x Temperatura	54
Figura 17.	Gráfico de Contorno: isolado 355 – Tempo x pH.....	55
Figura 18.	Gráfico de Contorno: isolado nº01 – Sulfato de Amônio x Amido.	57
Figura 19.	Gráfico de Contorno: isolado nº01 –Sulfato de Amônio x Glicerol	58
Figura 20.	Ensaio de antibiose do isolado nº 01, utilizando como indicadora a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> . Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol	58
Figura 21.	Gráfico de Contorno. Isolado nº 325: Amido x Sulfato de Amônio	60
Figura 22	Gráfico de Contorno: Isolado nº325: Glicerol xSulfato de Amônio	60
Figura 23.	Ensaio de antibiose do isolado nº 325, utilizando como indicadora a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> . Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol	61
Figura 24.	Ensaio de antibiose do isolado nº 355, utilizando como indicadora a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> . Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol	63
Figura 25.	Ensaio de antibiose para avaliação do espectro de ação dos isolados nº 01, nº325 e nº 355.....	64
Figura 26.	Variedade Morfológica dos actinomicetos isolados.....	65
Figura 27.	Morfologia do isolado nº 01. Cultivo em meio Ágar-Amido-Caseína.....	67
Figura 28.	Morfologia do isolado 325. Cultivo em Ágar-Amido-Caseína.....	67
Figura 29.	Morfologia do isolado 355. Cultivo em Ágar-Amido-Caseína.....	67
Figura 30.	Árvore filogenética dos <i>Streptomyces</i> isolados de solo.....	69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1.	Compostos produzidos por espécies do gênero <i>Streptomyces</i>	19
Tabela 2.	Seqüência de <i>Streptomyces</i> com seu genoma disponível para consulta.....	21
Tabela 3.	Fontes de Nitrogênio Utilizadas.....	36
Tabela 4.	Condições experimentais para o ensaio das variáveis físicas: temperatura, pH, agitação e tempo.....	37
Tabela 5.	Condições experimentais para o ensaio das variáveis químicas – Fonte de Carbono: Amido ou Glicerol.....	39
Tabela 6.	Isolamento de actinomicetos de diferentes localidades.....	43
Tabela 7.	Classificação da atividade antibiótica apresentada pelos actinomicetos.....	45
Tabela 8.	Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n° 01.....	47
Tabela 9.	Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n° 325.....	48
Tabela 10.	Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n°355.....	49
Tabela 11.	Resultados da produção do composto antimicrobiano para os isolados n° 01, n°325 e n°355 para o planejamento estatístico executado variando agitação, temperatura, pH e tempo.....	50
Tabela 12.	Análise de variância demonstrando o nível de significância a 95% ($p < 0,05$).....	51
Tabela 13.	Análise de variância demonstrando o nível de significância a 95% ($p < 0,05$) e 90% ($p < 0,1$).....	55
Tabela 14.	Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°01 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.....	56
Tabela 15.	Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°325 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.....	59
Tabela 16.	Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°355 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.....	62
Tabela 17.	Características da macromorfologia de alguns actinomicetos com atividade antimicrobiana.....	66
Tabela 18.	Actinomicetos isolados de solo e sua identificação molecular.....	68
Quadro 1.	Soluções para a reação de PCR.....	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Actinomicetos: Características Gerais.....	14
2.1.1 Gênero <i>Streptomyces</i>	16
2.2 Limitações Nutricionais e Metabolismo.....	21
2.3 Potencial Biotecnológico dos Actinomicetos.....	22
2.3.1 Fármacos a partir de Actinomicetos.....	22
2.3.2 Pesquisa de Novos Fármacos Utilizando Actinomicetos.....	23
2.3.3 Isolamento de Actinomicetos na Busca de Compostos Antimicrobianos.....	26
2.3.4 Estudos com Actinomicetos na Amazônia.....	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Fluxograma de Procedimentos.....	32
4.2 Material Biológico.....	32
4.2.1 Coleta das Amostras de Solo	33
4.2.2 Isolamento dos Actinomicetos	33
4.2.3 Preparação do Pré-inóculo	33
4.2.4 Inóculo das Bactérias Indicadoras	34
4.3 Avaliação e Seleção dos Actinomicetos com Atividade Antimicrobiana	34
4.3.1 Método de Antibiose em Disco	35
4.3.2 Método de Difusão em Agar	35
4.4 Bioensaio para Determinação da Fonte de Nitrogênio	36
4.5 Análise da Influência das Condições de Cultivo	37
4.5.1 Influência das Variáveis Físicas	37
4.5.2 Influência das Concentrações das Variáveis Químicas	38
4.5.3 Avaliação do Espectro de Ação	39
4.6 Caracterização dos Isolados	40
4.6.1 Caracterização Morfológica	40
4.6.2 Caracterização Molecular	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1 Isolamento dos Actinomicetos	43
5.2 Avaliação e Seleção dos Actinomicetos com Atividade Antimicrobiana	44
5.3 Bioensaio para Determinação da Fonte de Nitrogênio	46
5.4 Influência das Variáveis Físicas	49
5.4.1 Resultados das Variáveis Físicas para o Isolado n° 01	49
5.4.2 Resultados das Variáveis Físicas para o Isolado n° 325	53
5.4.3 Resultados das Variáveis Físicas para o Isolado n° 355	54
5.5 Influência das Concentrações das Variáveis Químicas	55
5.5.1 Resultados das Variáveis Químicas para o Isolado n° 01	56
5.5.2 Resultados das Variáveis Químicas para o Isolado n° 325	58
5.5.3 Resultados das Variáveis Químicas para o Isolado n° 355	62
5.6 Avaliação do Espectro de Ação	63
5.7 Caracterização dos Actinomicetos	65
5.7.1 Caracterização Morfológica	65

5.7.2 Caracterização Molecular por meio do 16S rDNA	68
6 CONCLUSÕES	70
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica tem buscado novos medicamentos que possam reduzir efeitos colaterais indesejáveis, o que justifica a busca por novos medicamentos. Sendo assim, a obtenção de produtos oriundos de microrganismos leva uma vantagem em relação às substâncias químicas por serem compostos termoestáveis, específicos e apresentarem estabilidade de pH (COSTELLOE et al., 2010). Como pode ser observada, a literatura está repleta de exemplos que indicam a potencialidade da utilização de microrganismos na produção de compostos de importância comercial e dentre estes microrganismos, grande parte dessa produção é dada aos actinomicetos. Estas características os tornam promissores, estimulando ainda mais a busca de novos microrganismos produtores de compostos bioativos, principalmente na região Amazônica devido à grande diversidade de plantas e nichos exóticos que ainda não foram estudados. Dessa forma, a chance de encontrar novos fármacos, como por exemplo, novas substâncias antimicrobianas, são grandes.

Existem muitas empresas e países interessados nessa potencialidade, entretanto, inversamente proporcional é o investimento em pesquisas aqui no Brasil em relação a essa biodiversidade. Pouco se conhece das espécies de plantas, insetos, animais, e menos ainda ao que se refere aos microrganismos.

Recentemente um grupo de pesquisadores americanos liderados por Smith et al., (2008) identificaram na Amazônia ocidental, várias espécies novas de actinomicetos. Isto ressalta a importância da necessidade de que mais estudos sejam realizados por pesquisadores brasileiros, pois além de promover a conservação da biodiversidade existente na região amazônica, existe a chance de se encontrar novos microrganismos com vasto potencial biotecnológico. Cabe a nós proteger e utilizar em nosso benefício essa potencialidade microbiana existente na região amazônica.

Os microrganismos apresentam uma grande vantagem para a produção de compostos de interesse comercial devido ao fato de serem cultivados em grandes escalas e seus compostos facilmente purificados. Embora na literatura já se tenha conhecido resultados realmente assombrosos envolvendo os actinomicetos, estes relatos não esgotam nem de longe frente aos benefícios científicos que estão por ser descobertos. É evidente que, no Brasil, um número maior de pesquisadores deve ser formado, não só para estudar as espécies já

conhecidas, como também toda a biodiversidade ainda inexplorada, principalmente nas regiões de clima tropical como a Amazônia.

Deste modo, fica evidente a importância de um esforço concentrado na busca de actinomicetos tanto endofíticos como de solo de valor biotecnológico, econômico e acadêmico. Com essa grande diversidade encontrada na região amazônica, resultados expressivos poderão ser obtidos com microrganismos, principalmente os actinomicetos. As perspectivas abertas para o estudo desta microbiota são imensas, no que se refere aos estudos biotecnológicos, tanto a nível molecular descobrindo novos genes ligados ao controle biológico de pragas e doenças, produção de enzimas, produtos aromáticos, corantes, biorremediação de compostos tóxicos como também a produção de metabólitos secundários de atividades terapêuticas.

Outro ponto a ser levado em consideração é que ainda é pequeno o número de pesquisas envolvendo estes microrganismos em plantas tropicais, onde o potencial biotecnológico deve se concentrar. Desta forma há a necessidade de que se faça um inventário nos diferentes nichos encontrados na região amazônica, pois a chance de que novos compostos de importância biotecnológica sejam descobertos é muito grande. Em um ambiente competitivo de mercado, as atividades de bioprospecção são de grande valia e certamente, em pouco tempo, resultados de valor aplicado estarão disponíveis permitindo o uso da biodiversidade microbiana nos mais diversos segmentos. Existem muitas empresas e países interessados nessa potencialidade, cabendo a nós proteger e utilizar em nosso benefício a biodiversidade microbiana existente em regiões tropicais e subtropicais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ACTINOMICETOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

Desde o século XIX, a ordem Actinomycetales é estudada, e compreende um grupo de bactérias filamentosas, Gram-positivas, que apresentam características intermediárias específicas, tais como: células procariontes, portanto, com ausência de membrana nuclear; sensibilidade às lisoenzimas e agentes antibacterianos; crescimento cúbico, formando grânulos em meio de cultura líquido; filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas, mas com diâmetro significativamente menor (0,5 a 1,0 μm) e dimensão análoga a células bacterianas (ALEXANDER *apud* MARCON, 2002).

Os actinomicetos representam um grupo diversificado de microrganismos classificados taxonomicamente através de sua morfologia, coloração do micélio, composição e estrutura do peptídeo-glucano, arranjo dos conidiósporos, porcentagem de G+C, sequência de 16S rDNA, composição fosfolipídica da membrana celular e resistência dos esporos ao calor (OLIVEIRA, 2003).

Seu crescimento em meio favorável inicia-se pela formação de um tubo germinativo que se ramifica formando o micélio vegetativo cenocítico ramificado (fase nutritiva), seguido pela formação do micélio aéreo multicelular (fase reprodutiva). Nesta fase, ocorre a formação de algumas hifas que sofrem metamorfose originando a cadeia de esporos unicelulares (OLIVEIRA, 2004).

As hifas são mais sensíveis ao calor e à dessecação do que os esporos, que por sua vez, são menos resistentes que os endósporos bacterianos. Os esporos possibilitam a sobrevivência em condições ambientais adversas, como períodos de seca ou deficiência nutricional (MARCON, 2002).

Os actinomicetos possuem alta instabilidade genética e uma de suas várias características marcantes, como a produção de antibióticos, é perdida em uma frequência de 0,1 a 1%. Essa perda de função deve-se a deleções de grandes regiões do DNA (INOUE, 2006)

Actinomicetos são amplamente encontrados no solo, constituindo entre 10 a 50% da comunidade microbiana. Degradam substâncias normalmente não decompostas pelas populações de fungos e outras bactérias, como celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina,

queratina, ligninas e húmus. O alto teor de umidade é desfavorável ao crescimento da maioria das espécies destes microrganismos. Espécies do gênero *Streptomyces* são aeróbicos, sendo encontrados raramente em solos com umidade moderada. Solos muito secos inibem o seu crescimento (LOBATO, 2010). Produzem uma grande diversidade de produtos metabólicos, sendo considerados os principais produtores de antibióticos e outras substâncias de interesse biotecnológico (BON, 2008).

Embora muitos actinomicetos sejam saprófitas restritos, alguns são capazes de estabelecer associações simbióticas com plantas, podendo ser encontrados endofiticamente, colonizando assim os tecidos internos das plantas (WILLIAMS et al., 1984). Por outro lado, também existem espécies de actinomicetos que são considerados patogênicos para o homem e animais (PIRET et al., 1988).

Dentro da ordem Actinomycetales os principais gêneros são: *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Gardnerella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Streptomyces*. Cada gênero apresenta características bem distintas, como pode ser observado na Figura 1.

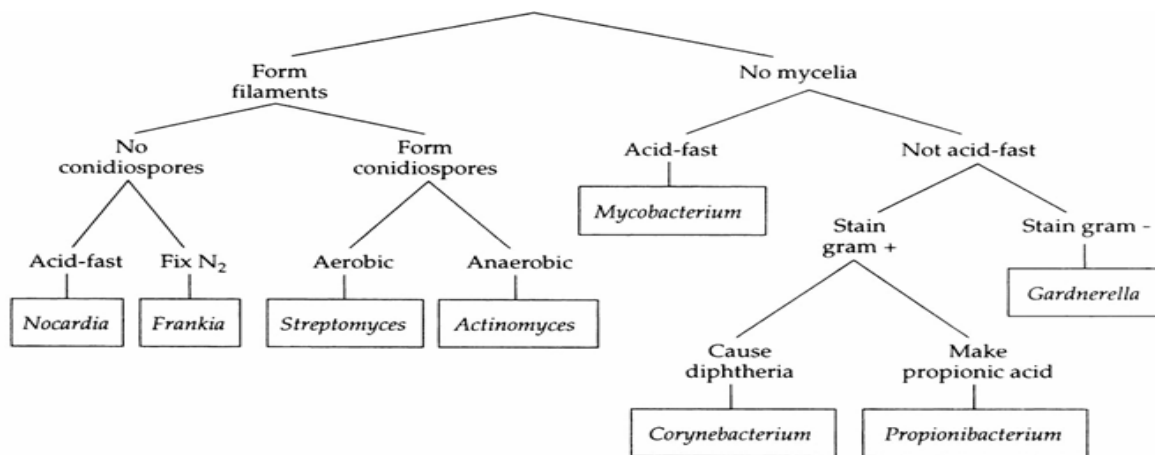


Figura 1 - Características dos principais gêneros da ordem *Actinomycetales*

Fonte: MANSOUR, 2003

Dentre estes, o gênero *Streptomyces* é considerado o mais importante, por conter um grande número de espécies que produzem compostos bioativos de importância industrial (MANSOUR, 2003).

Estes microrganismos também possuem a capacidade de degradar diversos pesticidas, tais como: organoclorados, triazinonas, carbamatos, triazinas, sulfonilúreas e acetanilidas. Essa degradação ocorre pela utilização destes compostos como única fonte de carbono e energia (OLIVEIRA, 2003).

Isolados do gênero *Frankia* são importantes fixadores de nitrogênio em nódulos de plantas leguminosas, sendo considerados essenciais para o balanço de nitrogênio mundial (ARAÚJO, 1998).

2.1.1 Gênero *Streptomyces*

Streptomyces é um gênero de bactéria Gram-positiva que cresce em vários ambientes, mas seu habitat principal é o solo, possui forma filamentosa semelhante a fungos. A diferenciação morfológica em *Streptomyces* envolve a formação de uma camada de hifas que pode se diferenciar em uma cadeia de esporos (OMURA et al., 2001). As colônias em formação metabolizam diversas fontes orgânicas, como proteínas (queratina, elastina), lipídios e compostos aromáticos. O metabolismo secundário é ativado nesta fase, e são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos difusíveis no meio, que está diretamente relacionada ao ciclo celular de *Streptomyces*, sofrendo influência de fatores como variações nas fontes nutricionais e fatores de regulação (PADILHA, 2002). Este processo é único entre as bactérias Gram-positivas, requer um especializado e coordenado metabolismo, é mais complexo do que outras bactérias Gram-positivas (OMURA et al., 2001).

Alguns membros do gênero *Streptomyces* apresentam cromossomo linear, que estão restritos a espécies com estrutura e ciclo de vida sofisticada como os *Streptomyces*, *Nocardia*, *Streptoverticilium*, *Saccharopolispora*, *Actinoplanses*, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (SALAMONI, 2010).

A mais interessante propriedade dos *Streptomyces* é a habilidade de produzir metabólitos secundários bioativos, antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, imunossupressores e principalmente antibióticos (OMURA et al., 2001, PATZER & VOLKMAN, 2010; KHAN, 2011).

Outra característica do gênero é seu desenvolvimento multicelular complexo, os esporos germinam para formação das hifas, com micélio aéreo multinuclear, que forma septos em intervalos regulares, formando uma cadeia de esporos uninucleados (OHNISHI et al., 2008). Quando o esporo encontra condições favoráveis de temperatura, nutrientes, umidade, o tubo germinativo é formado e a partir dele são desenvolvidas as hifas. Posteriormente surgem as hifas aéreas e num estágio programado inicia a organização de vários processos como o de crescimento e ciclo celular. A célula esporogênica pode conter 50 ou mais cópias do cromossomo linear sendo que a ordem, o posicionamento e a segregação dos cromossomos

durante a esporulação envolve pelo menos dois sistemas ParAB e FtsK, que conduzem a septação e diferenciação da célula apical em uma cadeia de esporos. Vários outros genes fundamentais para esporulação da hifa aérea têm sido relatados em *S. coelicolor* como, por exemplo, os genes *whiG*, *whiH*, *whiI*, *whiA*, *whiB* e *whiD*. A explicação para a presença de esporos em *Streptomyces* é que provavelmente estes surgiram a partir de fragmentos miceliais, que sob pressão seletiva podem ter envolvido a necessidade de sobreviver fora de invertebrados e plantas, ou seja, em ambientes extremos. A habilidade dos esporos sobreviver nestes ambientes hostis deve ter sido aumentada devido ao pigmento e aroma presentes nos esporos em algumas espécies (CHATER & CHANDRA, 2006). Outro ponto a ser destacado é a extremidade da hifa considerada como sendo a região mais importante, onde proteínas de membranas e lipídeos podem ser secretados e reunidos especialmente na zona apical de crescimento. (FLÄRDH & BUTTNER, 2009).

As extremidades do cromossomo de *Streptomyces* apresentam telômeros com proteínas ligadas covalentemente, permitindo assumir forma circular sob condições naturais ou em laboratório. Essas regiões terminais possuem seqüências repetitivas que codificam principalmente funções relacionadas à regulação, secreção, diferenciação, transporte e biosíntese de antibióticos (SALAMONI, 2010).

A morfologia das colônias de *Streptomyces* pode variar de acordo com a espécie, e geralmente são lisas, apresentando micélio vegetativo e aéreo (Figura 2 e 3).

Filogeneticamente, Estreptomicetos são parte das Actinobactérias, a classe das Gram-positivas seu DNA é rico em CG (70%), quando comparado com outras bactérias como a *Escherichia coli* (50%) (CHATER & CHANDRA, 2006). Essa característica aumenta sua estabilidade genética, ficando entre os mais numerosos e mais versáteis microrganismos do solo. Os *Streptomyces* são importantes por causa da sua ampla taxa de metabólitos e processos de biotransformação, além de possuírem a capacidade de degradar lignocelulose e quitina e ainda sendo fundamentais nos ciclos biológicos da matéria orgânica (BENTLEY et al., 2002).

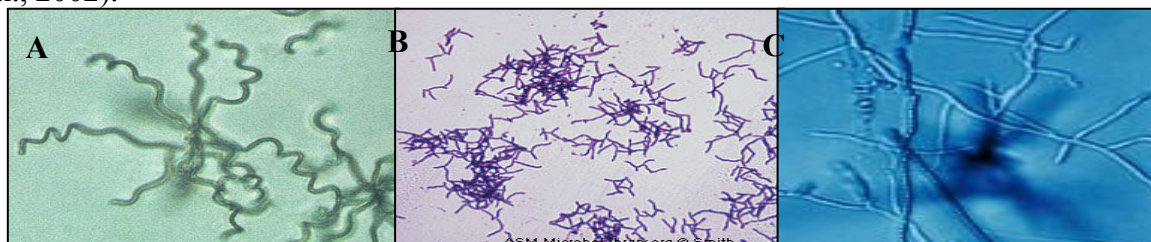


Figura 2: Morfologia microscópica dos actinomicetos do gênero *Streptomyces*

Fonte: (A): www.apsnet.org; (B): www.microbelibrary.org; (C): www.broad.mit.edu;
acessado em 11/02/11



Figura 3: Diversidade morfológica de actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Fotografado no Centro de Biotecnologia da Amazônia – Laboratório de Microbiologia

Estes microrganismos produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela coloração do micélio sob o substrato e micélio aéreo. A temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 35 °C, sendo que algumas espécies são psicrófilas e termófilas. O pH ótimo para crescimento varia entre 6,5 a 8,0 (MARCON, 2002).

Muitos dos antibióticos conhecidos, incluindo aqueles de importância médica tais como a estreptomicina, neomicina, cloranfenicol entre outros, além de um impressionante número de novos compostos com potencial para o combate a sérias doenças são produzidos por actinomicetos do gênero *Streptomyces* (OMURA et al., 2001). Alguns exemplos de compostos produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* estão ilustrados na Tabela 1.

Outras substâncias importantes produzidas por isolados deste gênero incluem enzimas, agentes anti-tumorais, agentes antifúngicos, inseticidas, acaricidas e anti-helmínticos (STROBEL et al., 2004). Existem espécies de *Streptomyces* que produzem mais de um tipo de antibiótico, bem como existem espécies de diferentes habitats que podem produzir o mesmo antibiótico. Essa diversidade dos metabólitos produzidos é devido ao tamanho do seu genoma e por apresentarem centenas de fatores de transcrição que controlam a expressão gênica (HOPWOOD, 1985).

Tabela 1: Compostos produzidos por espécies do gênero *Streptomyces*.

Substância	Linhagem	Referência
<i>Antibiótico</i>		
Aranciamicina	<i>S. sp.</i> Tu 6384	Nachtigall et al., 2010
Caboxamicina	<i>S. sp.</i> NTK 937	Hohmann et al., 2009
Platensimicina	<i>S. platensis</i>	Pearson, 2006
Antimicinas	<i>S. spp.</i> SPA-10191	Hosotani et al., 2005
Pentalenolactona	<i>S. liVidans</i> 1326	Tetzlaff et al., 2006
GE81112	<i>S. sp.</i>	Brandi et al., 2006
Pirrolomicina	<i>S. fumanus</i>	Charan et al., 2005
Chinicomocinas	<i>S. sp.</i> M045	Li et al., 2005
Manopeptimicinas	<i>S. hygrosopicus</i> , LL-AC98	He et al., 2002
Lemonomicina	<i>S. candidus</i>	He et al., 2000
<i>Antitumoral</i>		
Leinamicina	<i>S. atrooliVaceus</i> S-140	Tang et al., 2006
diazaantraquinona	<i>S. sp.</i>	Pettit et al., 2006
1 e 3-(hidroxiacetil)indolo		
Anicemicina	<i>S. sp.</i> TP-A0648	Igarashi et al., 2005
Actinolactomicina	<i>S. flavoretus</i> 18522	Han et al., 2005
Landomicina	<i>S. globisporus</i> 1912	Zhu et al., 2005
Enediina	<i>S. globisporus</i>	Murrell et al., 2004
Pladienolidos	<i>S. platensis</i> Mer-11107	Mizui et al., 2004
Komodoquinona A	<i>S. sp.</i> KS3	Itoh et al., 2003
Mitramicina	<i>S. argillaceus</i> ATCC 12956	Remsing et al., 2003
<i>Antiinflamatório</i>		
Faeochromicinas	<i>S. phaeochromogenes</i> LL-P018	Graziani et al., 2005
ciclomarinas A-C	<i>S. sp.</i> CNB-382	Renner et al., 1999
<i>Inibidor de protease</i>		
Telomestatina	<i>S. anulatus</i> 3533-SV4	Shin-ya et al., 2001
Galtamicina	<i>S. sp.</i> WC76535	Qian-Cutrone et al., 1998
<i>Antifúngico</i>		
Estaurosporina	<i>S. roseoflavus</i> LS-A	Park et al., 2006
4-Fenil-3-Butenoico Acido	<i>S. koyangensis</i> VK-A60	Lee et al., 2005
Yatakemicina	<i>S. sp.</i> TP-A0356	Igarashi et al., 2005
<i>Inseticida</i>		
Tartrolona C	<i>S. sp.</i> CP1130	Lewer et al., 2003
<i>Antimalárico</i>		
Metacicloprodigosina	<i>S. spectabilis</i> BCC 47	Isaka et al., 2002

Esses microrganismos apresentam alta instabilidade genética, onde tem sido observado que vários de seus marcadores genéticos (resistência e biosíntese de antibióticos, pigmentos, proteínas extracelulares) foram perdidos em várias combinações a frequência de 10^{-4} a 10^{-2} por esporos. Essas perdas são ocasionadas por grandes deleções cromossômicas. Os esporos de *Streptomyces* são afetados por deleções em seu cromossoma, que removem cerca de 25% de seu genoma (SALAMONI, 2010).

A produção da maioria dos antibióticos é espécie específica, sendo estes metabólitos secundários importantes para que as espécies de *Streptomyces* possam competir com os outros microrganismos que ele pode entrar em contato, ou mesmo dentro do próprio gênero. Outro processo importante envolvendo a produção de antibióticos é a simbiose entre *Streptomyces* e plantas, enquanto o antibiótico protege a planta contra fitopatógenos, a planta fornece exudatos para o desenvolvimento do *Streptomyces*. Dados encontrados na literatura têm sugerido que alguns antibióticos foram originados como moléculas sinais, podendo induzir mudanças na expressão de alguns genes que não estão relacionados a uma resposta ao stress (CHATER et al., 2010).

A produção de antibióticos em bactérias sempre ocorre após a fase exponencial de crescimento celular. As poucas células presentes no início do crescimento produzem um nível de inibição do antibiótico na fase inicial, onde as fontes de nutrientes são direcionadas para a produção de biomassa. Assim *Streptomyces* geralmente produzem antibióticos na fase estacionária ou em baixa taxa de crescimento (INOUE, 2006).

A maioria dos antibióticos produzidos por *Streptomyces* são geralmente antibióticos polipeptídeos, os quais são sintetizados pela condensação de unidades de ácidos carboxílicos. Esse grupo tornou-se importante alvo de estudo devido ao seu potencial no uso das sínteses polipeptídicas (PKSs – Polyketide Synthases) engenheiradas geneticamente e por produzir, racionalmente novos polipeptídeos pela biossíntese combinatória de bancos de dados de moléculas sintéticas (LOBATO, 2010).

Dois espécies de *Streptomyces* têm sido particularmente bem estudadas: o *S. griseus* (primeiro *Streptomyces* a ser usado para produção industrial de um antibiótico - streptomina) e o *S. coelicolor* o mais utilizado em estudos genéticos. Várias linhagens têm sido seqüenciadas e seus genomas mapeados (Tabela 2). O genoma do *S. coelicolor*, por exemplo, codifica uma grande quantidade de proteínas secretadas (819), incluindo 60 proteases, 13 chitinases/chitosanases, 8 celulasas/endoglucanases 3 amilases e 2 pactato

liases. Os *Streptomyces* são importantes também no processo inicial de decomposição de material orgânico, sendo a maioria das espécies saprófitas (CHATER et al., 2010).

Tabela 2. Seqüência de *Streptomyces* com seu genoma disponível para consulta.

Nome	GenBank	Tamanho Mb	% CG	Proteínas	Importância	Referencia
<i>S. celicolor</i>	AL645882.2	9.05	72.0	7.825	Estudos Genéticos	Bentley et al., 2002
<i>S. avermitilis</i>	BA000030.3	9.11	70.7	7.583	Antibiótico (Avermictina)	Omura et al., 2001
<i>S. griseus</i>	AP009493.1	8.54	72.2	7.138	Antibiótico (Streptomicina)	Ohnishi et al., 2008
<i>S. scabiei</i>	FN554889.1	10		8.746	Fitopatógeno	
<i>S. bingchengensis</i>	CP002047	11,93	70,8	10.023	Antihelmíntico (Milbemicina)	Wang et al., 2010

2.2 LIMITAÇÕES NUTRICIONAIS E METABOLISMO

O metabolismo primário dos *Streptomyces* está associado à atividade metabólica que por sua vez está relacionada ao crescimento microbiano. São exemplos deste metabolismo enzimas, ácidos orgânicos, etanol dentre outros.

Os metabólitos secundários são sintetizados freqüentemente ao final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária, pois esses compostos não são essenciais ao crescimento do microrganismo (INOUE, 2006). Exercem efeito regulatório ou modulador, atuam em interações de antagonismo e sinergismo entre microrganismo, plantas e animais. Estes compostos conferem vantagens competitivas ao organismo produtor, podem também exercer função de molécula sinalizadora (BERDY, 2005). Dados encontrados na literatura demonstram o interesse pelos metabólitos secundários, justificando-se pela grande variedade de compostos com potencial biotecnológico que vêm sendo empregados como antibióticos, fungicidas, antitumorais, inibidores enzimáticos, pigmentos, dentre outras aplicações (VINING, 1986).

O metabolismo secundário é regulado por diferentes fatores físico-químicos, como a limitação nutricional (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fosfato), de oxigênio, temperatura, taxa de crescimento, controle por *feedback*, inativação ou indução (SALAMONI, 2010).

Os microrganismos utilizam uma grande variedade de substratos para o seu crescimento, no entanto, muitos destes podem ter efeito negativo sobre a produção de alguns

produtos de interesse. Dessa forma pode ocorrer a formação de ciclos fúteis, onde o microrganismo excreta compostos parcialmente oxidados (ácidos orgânicos), produzindo assim, metabólitos que são desnecessários a sua sobrevivência. Os *Streptomyces* excretam uma grande variedade de ácidos orgânicos no meio de cultura, dependendo do tipo de limitação empregada. (INOUE, 2006).

Em condições de limitação de um ou mais nutrientes a produção de metabólitos secundários é maior. O crescimento microbiano é mais acelerado quando fontes de carbono, nitrogênio e fosfato estão facilmente assimiláveis no meio de cultura (PAMBOUKIAN, 2003).

A glicose é uma eficiente fonte de carbono para o crescimento de microrganismos, portanto, ocasiona um efeito negativo na produção de diversos metabólitos secundários. Assim, na produção do antibiótico actinomicina por *Streptomyces antibioticus*, a glicose causa repressão da síntese da fenoxazinona sintase, uma enzima da via metabólica da síntese desse antibiótico. Portanto o emprego de substratos facilmente assimiláveis, como a glicose, frequentemente dificulta a produção de metabólitos secundários de interesse. Já os polissacarídeos, oligossacarídeos e lipídeos são mais eficientes na produção de metabólitos secundários (BELLAO, 2010; INOUE, 2006; PAMBOUKIAN, 2003;).

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ACTINOMICETOS

2.3.1 Fármacos a partir de Actinomicetos

Os Actinomicetos são conhecidamente produtores de metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica utilizados na terapêutica de diversas doenças, como antibióticos, anticancerígenos, anti-helmínticos, antifúngicos entre outras. Estas características fazem deste gênero um instrumento de pesquisa importante e atrativo tanto do ponto de vista acadêmico como industrial (ARAÚJO, 2002).

Os Actinomicetos têm sido tradicionalmente os mais promissores na produção de fármacos antimicrobianos sendo que, 85% dos antibióticos atualmente comercializados foram isolados a partir deles. Antibióticos também podem ser produzidos por fungos, entretanto representam apenas 11% dos produtos (ROBBERS et al, 1997).

A descoberta da estreptomicina e espectinomicina e seu uso na clínica nos anos 40 foram seguidos pela descoberta de um grande número de antibióticos obtidos a partir de

microrganismos, em particular de Actinomicetos. Com o avanço tecnológico, houve uma mudança na abordagem terapêutica, utilizando os compostos produzidos por estes microrganismos no tratamento de diversas doenças infecciosas, aumentando assim, a qualidade de vida da população em geral daquela época até os dias atuais (PELAEZ, 2006).

Segundo Waksman (1945), que usou pela primeira vez o termo antibiótico, referia-se a substância química derivada de microrganismos que possui a capacidade de inibir o crescimento ou até mesmo destruir outros microrganismos em soluções diluídas. Estes são produtos naturais também conhecidos como metabólitos secundários, derivados das vias metabólicas essenciais para a célula produtora.

Apesar da palavra antibiótico se referir às combinações naturais com propriedades antimicrobianas, existe também a designação para antibiótico como sendo combinações sintéticas com atividade semelhante. A maioria dos antibióticos já comercializados é de origem natural, representando 70 dos 90 antibióticos comercializados entre os anos 1982–2002 (PELAEZ, 2006).

2.3.2 Pesquisas de novos fármacos utilizando Actinomicetos

Apesar do sucesso da descoberta dos antibióticos, e avanços no processo de sua produção, as doenças infecciosas ainda se mantêm como a segunda maior causa de morte no mundo, sendo que as infecções bacterianas causam aproximadamente 17 milhões de morte anualmente, atingindo principalmente crianças e idosos. A história dos antibióticos derivados de *Streptomyces* começou com a descoberta da estreptotricina em 1942, e posteriormente com a descoberta da estreptomina dois anos mais tarde, houve um aumento nas pesquisas onde cientistas intensificaram a busca de antibióticos dentro deste gênero. Hoje é sabido que 80% dos antibióticos são originados de actinomicetos sendo o gênero *Streptomyces* o mais importante (WATVE et al., 2001). Este fato pode ser constatado como mostrado na Figura 04.

A demanda por antibacterianos em todo o mundo está testemunhando um crescimento constante. Desde a sua descoberta no século 20, os antibióticos reduziram substancialmente a ameaça das doenças infecciosas. O uso dessas "drogas milagrosas", combinado com as melhorias em saneamento, habitação e alimentação, e com o advento dos programas de imunização em massa, levou a uma dramática queda nas mortes por doenças que antes eram generalizadas, e frequentemente fatais. Ao longo dos anos, os antimicrobianos têm salvado

vidas e aliviado o sofrimento de milhões de pessoas. Ao manter muitas doenças infecciosas graves sob controle, esses medicamentos também contribuíram para o aumento da expectativa de vida durante a última parte do século passado. A crescente resistência dos agentes patogênicos, levando a formas de infecção graves que são difíceis de tratar, tem complicado ainda mais a situação. As infecções causadas por bactérias resistentes não respondem ao tratamento, resultando em doença prolongada e maior risco de morte. Os insucessos do tratamento também levam a longos períodos de infecciosidade com alta taxa de resistência, o que aumenta o número de pessoas infectadas em movimento na comunidade e, assim, expõe a população ao risco de contrair uma cepa resistente de infecção (COSTELLOE et al., 2010).

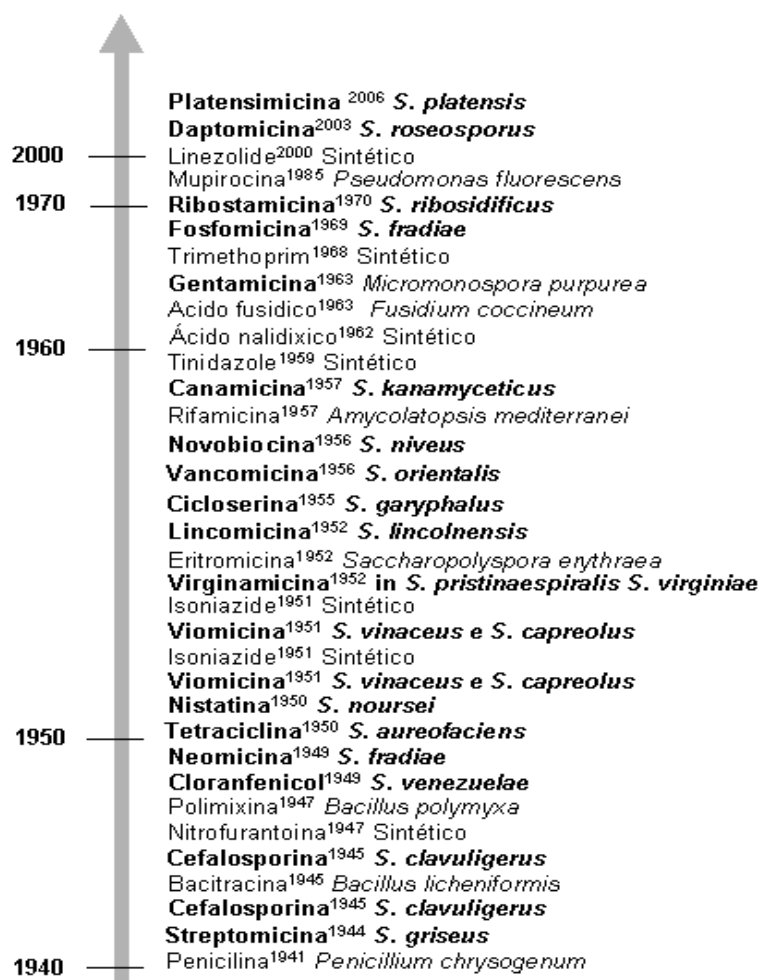


Figura 04. Principais antibióticos e datas das descobertas. Em destaque os obtidos por espécies de *Streptomyces*.

Além do problema da resistência bacteriana, os antibióticos também provocam efeitos sobre a microbiota normal dos organismos, apresentando vários efeitos colaterais indesejáveis

que devem ser eliminados. Seu uso abusivo e indiscriminado é um dos grandes problemas da terapia moderna (AZEVEDO, 1998).

Outro ponto a ser levado em consideração é o número de doenças tropicais que ainda permanecem sem tratamento efetivo, como é o caso da malária e da doença de Chagas, existindo ainda outras doenças como a tuberculose, onde os números de indivíduos doentes e a resistência aos antibióticos crescem a cada ano (PADILHA, 2002). Mesmo que a indústria farmacêutica intensifique os esforços para desenvolver novos fármacos para substituir os em uso, as tendências atuais sugerem que algumas infecções não terão terapias eficazes dentro dos próximos dez anos (TAKESUE et al., 2010). Por estas razões, melhorar a utilização é uma prioridade para evitar o surgimento e propagação da resistência bacteriana.

Encontrar novos antibióticos que sejam eficazes contra a resistência bacteriana não é impossível, mas é uma área complexa e desafiadora de pesquisa. A chance de se isolar novas substâncias com atividade farmacológica é grande, pois há evidências que só uma fração bastante pequena de todas as espécies de actinomicetos e fungos existentes na natureza foram isolados e identificados, provando que o conhecimento sobre esses microrganismos ainda é pequeno. Como exemplo, foi descrito recentemente um novo actinomiceto marinho, que apresenta atividade biológica, inclusive atividade antibiótica (PELAEZ, 2006).

O desenvolvimento de um novo fármaco é uma tarefa difícil, pois os processos são extremamente lentos, demandam anos de pesquisa, levando em média oito anos, além de ser extremamente dispendioso para as indústrias. Isto explicaria o número de novos antibióticos descritos na literatura e conseqüentemente aprovados por órgãos como a FDA (Food and Drug Administration) serem bastante reduzidos, chegando a serem produzidos apenas um ou dois por ano desde 1995 (PADILHA, 2002).

Os antibióticos empregados hoje em sua maioria pertencem às mesmas classes descobertas a mais de 40 anos atrás, correspondendo a antibióticos de terceira e quarta geração. Um dos antibióticos mais recentes introduzidos no mercado é a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico que apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, demonstrando ser mais efetiva que a vancomicina e teicoplanina (KERN, 2006).

O que geralmente ocorre são modificações estruturais nas moléculas já existentes, como é o caso dos fármacos sintéticos. Outro antibiótico recentemente aprovado pelo Food and Drug Administrations (FDA) é a tigeciclina, um novo agente antibacteriano obtido a partir da estrutura química de uma tetraciclina, a minociclina (PELAEZ, 2006). A modificação laboratorial efetuada na estrutura química original da minociclina proporcionou

de imediato, um aumento no espectro de ação *in vitro* e a prevenção dos mecanismos de resistência referentes à classe das tetraciclina, uma classe de antibióticos naturais mais antigas (LOPES, 2006).

O restante dos produtos lançados durante os últimos 20 anos pertence às classes mais antigas, principalmente β -lactâmicos e macrolídeos. Entretanto, as novas gerações apresentam vantagens significantes em espectro, potência ou propriedades farmacocinéticas (PELAEZ, 2006).

Apesar do número de moléculas sintéticas e semi-sintéticas hoje superarem as moléculas naturais, os produtos naturais continuam sendo a base primária das pesquisas, já que a síntese total de um novo antibiótico em laboratório é extremamente difícil (PADILHA, 2002).

2.3.3 Isolamento de actinomicetos na busca de compostos antimicrobianos

O processo para seleção de microrganismos produtores de compostos bioativos envolve cuidados especiais, que vai desde a preparação de meios de cultura apropriados, de acordo com o grupo de microrganismo que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos (AZEVEDO, 1998).

Também podem ser utilizados meios específicos que permitem o crescimento de apenas um determinado tipo de microrganismo que se deseja isolar em particular, como por exemplo, para isolar microrganismos produtores de lipases, utilizar como única fonte de carbono um óleo. Outro exemplo é a utilização do meio seletivo para o isolamento de actinomicetos (meio AC –Amido Caseína), de KÜSTER e WILLIAMS (1964), citados com frequência na literatura. Outra variável é a temperatura de incubação das placas para o isolamento (AZEVEDO, 1998). Outra ação importante é a coleta de microrganismos em ambientes diferentes, como o ambiente marinho para o isolamento de novas substâncias, resultados importantes se têm alcançado avaliando actinomicetos destes ambientes (BALTZ, 2008; FISCHBACH, 2009).

A seleção de microrganismos antagônicos pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. Primeiramente a seleção é realizada através de ensaios em laboratório e posteriormente os ensaios passam a ser realizados em animais. Os métodos de seleção *in vitro* podem ser realizados simultaneamente ao isolamento dos antagonistas, com a finalidade de abreviar o

processo de seleção, sendo os actinomicetos preferencialmente isolados de amostras de solo, utilizando-se suspensões em solução tampão ou água esterilizada, diluídas em série (MARIANO, 1993).

Outro argumento que apóia o potencial de actinomicetes como valiosas fontes para descoberta de novos antibióticos estão nas condições de crescimento para produção de metabólitos secundários. Assim, uma única cultura, crescida em diferentes condições, pode produzir combinações de diferentes substâncias (PELAEZ, 2006).

A análise genômica de duas espécies de *Streptomyces*, *S. coelicolor* e *S. avermitilis*, revelou a presença de mais de 20 grupos de genes codificando a síntese de policetideos ou peptídeos não-ribossomal. Esses resultados sugerem que ainda estamos longe de ter um bom entendimento de como explorar completamente o potencial metabólico de microrganismo em condições de laboratório (PELAEZ, 2006).

Durante décadas os processos de triagem na busca de novos compostos com potencial biotecnológico, principalmente na produção de antimicrobianos, estiveram dirigidos aos actinomicetos. Sua importância biotecnológica está relacionada principalmente ao gênero *Streptomyces*, onde se concentra a principal obtenção de antimicrobianos. (BON, 2008).

Várias pesquisas já estão sendo realizadas com o objetivo de isolar e selecionar actinomicetos com potencial para produzir novos compostos antimicrobianos. Em trabalhos desenvolvidos por Bachiega et al. (2005), foram isolados e avaliados microrganismos de amostras de solo da região de Araraquara, com o objetivo de selecionar microrganismos produtores de substâncias antibacterianas e antifúngicas.

Os actinomicetos isolados foram analisados quanto ao seu potencial antimicrobiano contra microrganismos padrões (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus oryzae*). Das 64 cepas isoladas, 34 (53,1%) apresentaram atividade antimicrobiana. A cepa Ar 4014 apresentou maior atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Candida albicans* e *A.oryzae* e atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Este microrganismo foi classificado no gênero *Streptomyces*. Após cromatografia em coluna de sílica do extrato bruto, as frações ativas obtidas mostraram picos de absorção UV-VIS característicos de pentaenos normais. O antibiótico foi denominado provisoriamente Ara 4014-75 (BACHIEGA et al., 2005).

Bonfim (2008) em seu trabalho, isolou *Streptomyces* endofíticos de *Momordica charantia* L. e este endófito produziu dois metabólitos ativos contra diferentes cepas de *Candida sp.*, os quais foram caracterizados como macrolídeo poliênico e não-poliênico.

Em trabalhos desenvolvidos por Ndejoung et al. (2010), um novo macrolídeo o hygrobafilomycin, um potente inibidor de células tumorais foi isolado a partir de *Streptomyces varsoviensis*.

Em pesquisas realizadas por Ujikawa (2003), foram isoladas 41 cepas de actinomicetos aeróbios produtoras de metabólitos com atividade antibiótica e antifúngica. Destes, 11 (26,8%) eram macrolídeos tetraênicos, 13 (31,7%) macrolídeos pentaênicos, 1 (2,4%), macrolídeo oxopentaênico, 1 (2,4%) macrolídeo hexaênico e 6 (14,6%) macrolídeos heptaênicos. Foi observado que algumas cepas apresentaram largo espectro de atividade, que era devido à produção simultânea de um antifúngico poliênico juntamente com um antibacteriano polietérico, e não à produção de somente um antibiótico.

Oliveira (2004) avaliou a atividade de 19 linhagens de *Streptomyces*, para produção de β -lactamases. Destas 19, cinco foram selecionadas como produtoras de β -lactamases, três delas (DAUFPE 3036, DAUFPE 3060 e DAUFPE 3133) apresentaram melhores resultados, com maiores halos de inibição.

Lima et al. (2002) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de metabólitos secundários de *Streptoverticillium sp*, bactéria pertencente à família Streptomycetaceae. Das substâncias extraídas e purificadas de seus metabólitos, duas apresentaram atividade antimicrobiana contra sete espécies de *Candida*: (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. utilis*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica* e *C. guillermondii*). Os resultados em relação aos testes citotóxicos e farmacológicos mostram o potencial antitumoral dos metabólitos secundários do *Streptoverticillium sp* DAUFPE 13.729, uma vez que estes foram responsáveis por uma taxa de inibição tumoral igual ou superior a 61,5%.

Pamboukian (2003), em seus estudos, produziu uma cepa mutante de *Streptomyces olindensis*, que através de processos fermentativos, apresentou produtividade de rentamicina superior à linhagem selvagem.

Atika et al. (2011) isolaram uma estirpe de actinomiceto de um solo hipersalinos no sul da Argélia, que foi posteriormente identificado como *Actinopolyspora mortivallis*. Esta estirpe mostrou alta atividade contra a bactéria *Klebsiella pneumoniae*.

Sheng et al. (2009) em seus estudos isolaram 46 actinomicetos de várias plantas medicinais de Florestas Tropicais de Xishuangbanna, China. Quatro isolados apresentaram

amplo espectro de ação contra os microrganismos patogênicos *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Shenin et al. (2010) extraíram duas classes diferentes de antibióticos a partir do micélio de *Streptomyces chrysomallus* R-21 e *Streptomyces globisporus* L-242. A ação antifúngica e antiviral desses complexos também foi demonstrada em plantas de tomate.

2.3.4 Estudos com Actinomicetos na Amazônia

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente na floresta Amazônica. Entretanto, pouco é conhecido dessa biodiversidade, principalmente dos microrganismos (SOUZA et al., 2004).

Torna-se então necessária a conservação dessa biodiversidade ainda desconhecida, que poderá render produtos de grande importância biotecnológica (SMITH et al., 2008).

Pesquisas com actinomicetos isolados da região Amazônica estão sendo feitos, com o objetivo de selecionar novos compostos promissores com potencial biotecnológico. Matsuura, (2004) isolou 52 actinomicetos endofíticos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum) e avaliou sua atividade antimicrobiana. Vinte e três (44,2%) linhagens mostraram atividade antibiótica contra os microrganismos-teste utilizados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus flavus*). Foi detectada atividade antimicrobiana com um amplo espectro de ação, porém os actinomicetos apresentaram maior atividade antifúngica que bacteriana.

Smith et al., (2008) isolaram microrganismos endofíticos de várias espécies de plantas da Amazônia. Eles obtiveram 135 isolados, dentre estes 8 eram actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Algumas espécies não foram identificadas pela comparação através do banco de genomas, sugerindo que sejam espécies novas. Foram avaliados 88 isolados quanto à capacidade de sua atividade antimicrobiana contra alguns fungos e bactérias causadoras de algumas doenças em animais (*Candida albicans*, e *Escherichia coli*) e plantas (*Phytophthora sp*). Dos 88 isolados avaliados, 65 apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos em teste.

Silva et al. (2008) avaliaram o potencial de 100 isolados de actinomicetos quanto a produção de compostos bioativos como antimicrobianos, hormônios vegetais (Acido Indol Acético - AIA) e compostos solubilizadores de fosfato. Além disso, a diversidade genética de alguns isolados foi avaliada por meio de técnicas moleculares. A atividade antimicrobiana foi

verificada em 59% dos isolados avaliados, sendo que a maioria apresentou compostos antifúngicos. A diversidade genética de alguns isolados foi avaliada com base nas sequências parciais do gene 16S do rRNA, onde foi verificado que todos os isolados sequenciados pertencem ao gênero *Streptomyces*.

Souza et al. (2009), investigaram o potencial de substâncias produzidas por actinomicetos isolados da Região Amazônica. Foram isolados 41 actinomicetos, destes, os isolados n° 26, 4 e 29 produziram substâncias anti-fúngicas contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente.

Embora os trabalhos existentes sejam em número reduzido, os resultados são promissores, visto que grande parte destes produtos bioativos é produzida por actinomicetos do gênero *Streptomyces* chegando a atingir 80% dos antibióticos comercializados. Estas características fazem destes microrganismos um instrumento atrativo de pesquisa, tanto do ponto de vista acadêmico como industrial. Desta forma, justifica-se o aumento das pesquisas com este grupo, visando o incremento no isolamento de novas espécies e linhagens produtoras de antibióticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Isolar e selecionar actinomicetos produtores de compostos antimicrobianos e otimizar as condições de cultivo visando a melhor produção dos mesmos.

3.2 Específicos

- Isolar actinomicetos de solos de algumas localidades da cidade de Manaus e algumas regiões próximas a cidade;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados de actinomicetos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Otimizar as condições de cultivo dos isolados de actinomicetos selecionados, visando a melhor produção de metabólitos com atividade antimicrobiana em meios líquidos;
- Identificar através de técnicas moleculares os isolados de actinomicetos com atividade antimicrobiana;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS

As principais atividades desenvolvidas neste trabalho estão apresentadas na Figura 5.

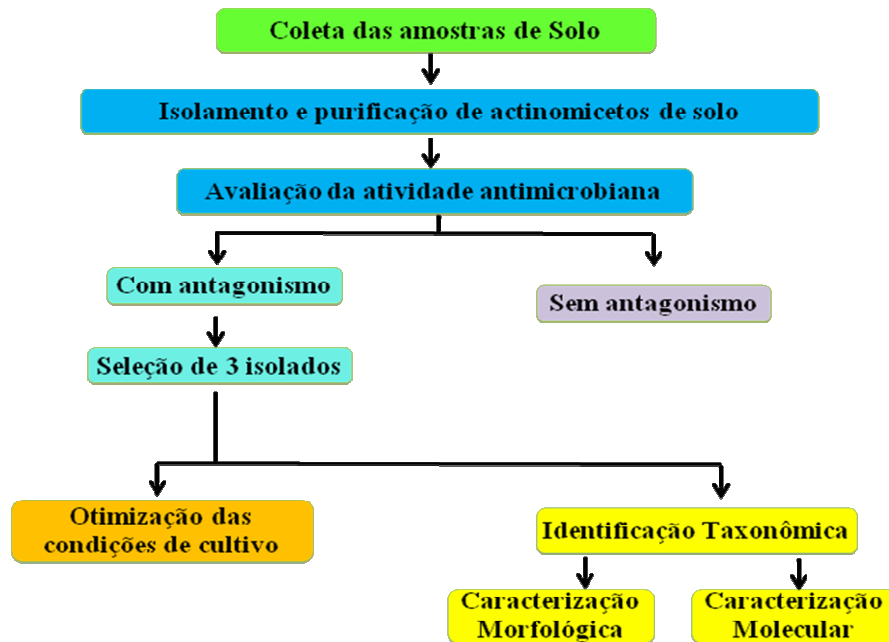


Figura 5. Fluxo de procedimentos para análises dos isolados com atividade antimicrobiana.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

No presente trabalho foram utilizados 371 actinomicetos que estão depositados na Coleção de Culturas do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), que foram previamente isolados de diferentes solos de algumas regiões próximas à cidade de Manaus. As amostras de solo foram colhidas de alguns pontos dos municípios de Presidente Figueiredo, Autazes e Rio Preto da Eva. Na cidade de Manaus as amostras de solo foram coletadas nos bairros de Nova República, Distrito Industrial e Zumbi.

As bactérias indicadoras para os ensaios de antibiose foram:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

4.2.1 Coletas das amostras de solo

As amostras foram coletadas aleatoriamente de cada região. As amostras de solo foram retiradas com auxílio de espátulas a uma camada de profundidade 1 a 10 cm e colocadas em sacos plásticos esterelizados. De cada localidade foram retiradas 10 amostras de solo, onde foram levadas ao laboratório e armazenadas a 4°C até o momento em que foram feitos os isolamentos no Laboratório de Microbiologia do CBA.

4.2.2 Isolamento dos actinomicetos

Os isolamentos foram feitos por diluição em série e plaqueados em meio seletivo. Uma amostra de 10 g de cada solo foi suspensa em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. As amostras foram mantidas sob agitação vigorosa em shaker por 1h e submetidas a diluições em série (10x) até 10^{-6} g solo mL⁻¹ em solução salina. Das 3 últimas diluições, foram semeadas alíquota de 100 µL com auxílio de alça de Drigalsky em placas de petri contendo meio Ágar-Amido-Caseína (KUSTER & WILLIAMS, 1964). As placas foram incubadas a 28°C em estufa bacteriológica até que as colônias pudessem ser visualizadas (em torno de 7 dias).

Colônias isoladas com características de actinomicetos foram transferidas para novas placas com meio amido-caseína, para obtenção de culturas puras.

Os isolados foram conservados em microtubos de 2 mL com meio Amido-Caseína líquido, aos quais foi adicionado glicerol esterelizado na concentração de 20%. Os tubos foram armazenados a – 70°C para preservação da linhagem original.

4.2.3 Preparação do Pré-inóculo para ensaios de atividade antimicrobiana

Para os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, os isolados de actinomicetos foram semeados em placa de Petri contendo o meio Ágar-Amido-Caseína e incubados em estufa BOD a 28°C por 7 dias. Após este período, um quarto de uma placa de crescimento foi transferida para frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 50mL de meio Amido líquido. O meio foi incubado sob agitação (150 rpm), a 28°C por 7 dias. Nos ensaios de otimização, essa primeira etapa foi utilizada como pré-inóculo, no qual foram crescidos por apenas 48h, onde

um volume de 2,5 mL do caldo gerado nesta etapa foi inoculado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 22,5 mL do meio de produção. As condições de cultivo na etapa de produção do composto antimicrobiano foram as estabelecidas pelo planejamento estatístico conforme descrito no item 4.5.

Após sete dias, as células foram separadas da cultura líquida por centrifugação a 5.000 rpm por 8 minutos em uma centrífuga de refrigeração a 4°C (Centrifuge 5417R - Eppendorf). O metabólito microbiano foi então testado para verificar sua atividade antibiótica.

4.2.4 Inóculo das bactérias indicadoras

As bactérias indicadoras que utilizadas nos testes de antibiose foram cultivadas previamente em caldo nutritivo Luria-Bertani (LB) por 16 horas. Estes microrganismos diluídos com solução salina 0,9 %, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %), equivalendo a 10^8 UFC/mL (Figura 6).

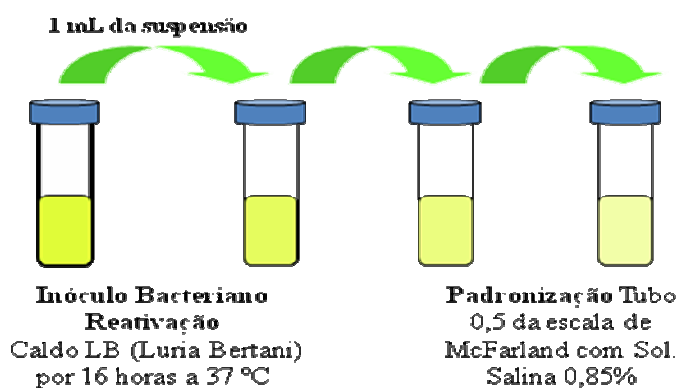


Figura 6. Preparação do inóculo das bactérias patogênicas indicadoras.

4.3 Avaliação e seleção dos actinomicetos com atividade antimicrobiana

A seleção primária visa a identificação de isolados de actinomicetos que apresentem atividade antimicrobiana. Os microrganismos indicadores utilizados foram cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Os microrganismos indicadores foram padronizados de acordo com o item 4.2.4. Essa avaliação foi realizada utilizando o método de difusão em ágar (item 4.3.2). Os

três isolados com resultados mais promissores foram selecionados para análise da influência das condições de cultivo na produção do antibiótico.

4.3.1 Método de antibiose em disco

O método de antibiose em disco foi utilizado para determinação das fontes de nitrogênio para cada isolado selecionado. O meio de cultura utilizado foi Ágar Müeller-Hinton. As bactérias indicadoras foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*. As bactérias foram padronizadas e inoculada com auxílio de um swab estéril por toda a placa de Petri já contendo o meio de cultura. Em cada placa foram colocados 5 discos de papel de 6 mm, onde 30 μL do extrato microbiano de cada isolados de actinomicetos crescidos com as respectivas fontes de nitrogênio foram inoculados em cada disco (Figura 7). A placa permaneceu em geladeira *overnight*, para difusão dos metabólitos no Ágar Müeller-Hinton e após esse tempo foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas, quando foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição.

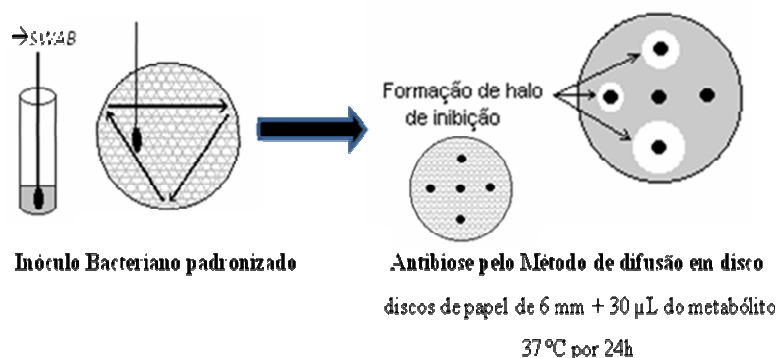


Figura 7. Método de antibiose por difusão em disco de papel

4.3.2 Método de Difusão em ágar

O método de difusão em Agar foi utilizados nos ensaios para determinar a influência das variáveis físicas e químicas. O meio de cultura utilizado foi o Ágar Muller-Hinton, onde foram previamente perfurados de modo a conter 5 orifícios com 6 mm de diâmetro, onde 100 μL do filtrado foi colocado em cada poço (Figura 8). A bactéria teste utilizada para este ensaio foi a bactérias *Staphylococcus aureus*, que foi padronizada e inoculada com swab estéril em toda a placa de Petri contendo o ágar Müeller-Hinton. As placas foram armazenadas em geladeira *overnight*, para a difusão dos metabólitos no ágar Müller-Hinton.

Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após esse tempo, foi realizada a leitura das placas medindo o diâmetro dos halos de inibição.

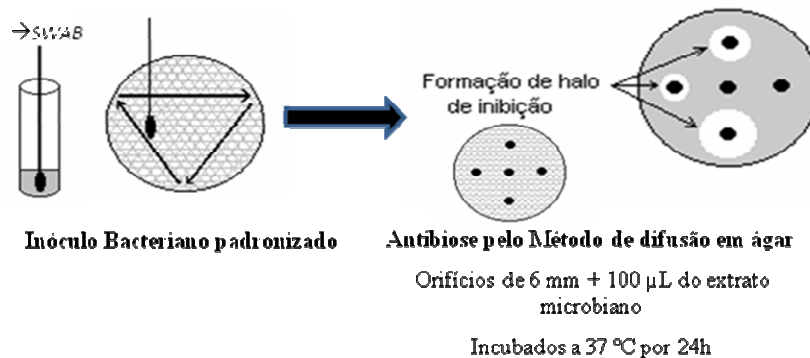


Figura 8. Método de antibiose por difusão em ágar.

4.4 BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Para a determinação da melhor fonte de nitrogênio para produção do antibiótico foram avaliadas as fontes de nitrogênio apresentadas na Tabela 3 e as soluções de aminoácidos foram preparadas na concentração de 0,5 mg/mL;

Tabela 3. Fontes de nitrogênio utilizadas.

Fontes de nitrogênio	
• Alanina	• Asparagina
• Cisteína;	• Glicina;
• Isoleucina;	• Leucina
• Arginina;	• Guanidina;
• Metionina;	• Prolina;
• Fenilalanina;	• Lisina;
• Glutamina;	• Histidina;
• Valina;	• Extrato de levedura;
• Tirosina;	• Extrato de Malte;
• Ácido Aspártico;	• Peptona;
• Triptofano;	• Caseína;
• Serina;	• Sulfato de Amônio;
• Treonina;	

Os ensaios realizados em tubos contendo 4 mL de meio líquido Amido-Caseína + 500 µL de inóculo + 500 µL de solução de aminoácidos. Um total de 25 ensaios foi realizado com os três actinomicetos selecionados. O inóculo foi preparado de acordo com o item 4.2.3. A

avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de antibiose em disco conforme item 4.3.1, utilizando a bactéria teste *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.5 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICO

4.5.1 Influência das variáveis físicas

Um planejamento estatístico fatorial foi realizado pelo método de Superfície de Resposta com 3 repetições no ponto central. Na Tabela 4, estão descritas as condições de cada experimento.

Tabela 4. Condições experimentais para o ensaio das variáveis físicas

Número de Ensaio	Agitação	Temperatura	pH	Tempo (dias)
1	150	35	5,5	15
2	200	40	6,5	10
3	250	25	5,5	5
4	200	30	6,5	10
5	150	35	5,5	5
6	150	25	5,5	15
7	150	35	7,5	5
8	200	30	6,5	20
9	150	25	7,5	15
10	150	25	7,5	5
11	200	30	4,5	10
12	250	25	5,5	15
13	150	35	7,5	15
14	250	35	7,5	5
15	200	30	8,5	10
16	200	20	6,5	10
17	250	25	7,5	5
18	250	35	5,5	15
19	200	30	6,5	10
20	250	35	5,5	5
21	150	25	5,5	5
22	250	35	7,5	15
23	250	25	7,5	15
24	200	30	6,5	1
25	300	30	6,5	10
26	100	30	6,5	10
27	200	30	6,5	10

De acordo com este planejamento, foram realizados 27 experimentos, onde os isolados foram cultivados em meio líquido sob diferentes condições, com variações no pH, agitação e temperatura. Para esse planejamento foi utilizado como base o meio líquido Amido-Caseína (amido 10g/L; caseína 0,3 g/L; KNO₃ 2g/L; NaCl 2g/L; K₂HPO₄ 2g/L; KH₂PO₄ 1g/L; CaCO₃ 0,1g/L; MgSO₄ 0,1 g/L; ZnSO₄ 0,01g/L e FeSO₄ 0,01 g/L) que segundo a literatura, é adequado para um bom crescimento celular dos actinomicetos. O pré-inóculo foi realizado de acordo com o item 4.2.3.

Os ensaios de antibiose foram realizados pelo método de difusão em ágar contra *S. aureus* ATCC 25923 conforme item 4.3.2. O pH de todos os ensaios foram medidos diretamente no meio de cultivo utilizando o método potenciométrico antes de serem autoclavados.

4.5.2 Influência das concentrações das variáveis químicas: fontes de carbono e fontes de nitrogênio

Uma vez definidas as condições físicas de cultivo ideais de trabalho como, temperatura, pH, e a fonte de nitrogênio para cada actinomiceto, o próximo passo foi realizar um outro planejamento estatístico para definir quais as concentrações ideais das fontes de carbono e nitrogênio melhor influenciam a maior produção do composto antimicrobiano. Com esse objetivo foram avaliados a influência de 2 fontes de carbono: amido e glicerol, onde as concentrações de amido e glicerol variaram de 5 e 15 g/L, e as fontes de nitrogênio avaliadas foram: fenilalanina, asparagina, sulfato de amônio, e peptona, onde suas concentrações variaram de 0,5 e 1,5 g/L. Isso resultou em 27 formulações de meios de culturas diferentes, correspondendo cada um em um ensaio experimental, segundo mostra a Tabela 5.

Foi aplicada a metodologia de Superfície de Resposta com 3 repetições no ponto central para a construção do modelo estatístico, que foi ajustado às condições experimentais descritas para otimizar as condições de produção do composto antimicrobiano de interesse. O programa estatístico utilizado foi o MINITAB. Para esse planejamento foi utilizado como base o meio líquido Amido-Caseína e o pré-inóculo foi realizado de acordo com o item 4.3.3. Os ensaios de antibiose foram realizados pelo método de difusão em Ágar contra *S. aureus*

ATCC 25923 conforme item 4.3.2 e os resultados analisados pelo programa estatístico MINITAB.

Tabela 5. Condições experimentais para o ensaio das variáveis químicas – Fonte de Carbono: Amido ou Glicerol.

Número de Ensaio	Amido ou Glicerol	Nitrogênio orgânico	Nitrogênio inorgânico	Peptona
1	12,5	1,25	0,75	1,25
2	7,5	1,25	0,75	0,75
3	12,5	1,25	1,25	0,75
4	7,5	1,25	1,25	1,25
5	10	1	1,5	1
6	15	1	1	1
7	10	1,5	1	1
8	10	1	1	1,5
9	7,5	0,75	0,75	0,75
10	12,5	0,75	1,25	1,25
11	10	1	1	1
12	12,5	1,25	1,25	1,25
13	7,5	0,75	0,75	1,25
14	12,5	0,75	1,25	0,75
15	5	1	1	1
16	7,5	1,25	1,25	0,75
17	7,5	0,75	1,25	1,25
18	10	1	1	1
19	7,5	0,75	1,25	0,75
20	10	1	1	0,5
21	12,5	1,25	0,75	0,75
22	10	1	1	1
23	12,5	0,75	0,75	1,25
24	7,5	1,25	0,75	1,25
25	10	0,5	1	1
26	12,5	0,75	0,75	0,75
27	10	1	0,5	1

4.5.3 Avaliação do espectro de ação do composto antimicrobiano

Para a avaliação do espectro de ação do composto antimicrobiano produzido foram utilizados os filtrados do dia em que o halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* foi maior.

Esta avaliação foi realizada contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

As bactérias Gram positivas:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

As bactérias Gram negativas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

O teste de antibiose foi realizado pelo método de difusão em ágar conforme item 4.3.2

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

4.6.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica foi realizada por meio da análise do aspecto, coloração e textura da colônia, além da produção de pigmentos difusos no meio de cultivo. Essa observação foi feita utilizando o meio de cultura Ágar-Amido-Caseína (Kuster & Williams, 1964) por 7 dias a 30°C.

4.6.2 Caracterização Molecular

Os três isolados de actinomicetos selecionados foram identificados pelo método de amplificação e seqüenciamento do DNA ribossomal 16S. A extração do DNA genômico total dos isolados foi realizada pelo método fenol-clorofórmio.

Os actinomicetos selecionados para identificação molecular foram cultivados em meio líquido Amido-Caseína por 3 dias a 30 °C a 150 rpm, onde foi retirada uma alíquota de 1,5 mL para centrifugação a 12.000 rpm (Centrifuga eppendorf 5200) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso com 500 µL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM), em seguida adicionado 60 µL de SDS 10 % e Glass bead. Os tubos foram homogeneizados e agitados no VORTEX por 20 minutos. Em seguida foi acrescentado 200 µL de Fenol e 350 µL de Clorofil (Clorofórmio e Álcool isoamílico – 24:1). Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm e o sobrenadante transferido para outro tubo e acrescentado 350 µL de Clorofil e novamente centrifugado. O sobrenadante foi precipitado com 0,1 volume de NaCl 5M e 2 volumes de álcool isopropílico gelado com incubação por 1 hora, e

centrifugado sob refrigeração a 4 °C por 12 minutos a 12.000 rpm. O sedimento e a parede do tubo foram lavados com etanol 70 % e secos à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 50 µL de água mili- Q e estocado a -20 °C. A concentração do DNA obtido foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, juntamente com o DNA de fago λ com concentração conhecida. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e observado sobre transiluminador de luz ultravioleta. Fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados a partir do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* universais primer 27f (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') e do primer 1378r (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 3'), homólogas às extremidades conservadas do gene 16S rRNA de bactérias.

Para a amplificação do DNA das amostras foi utilizada uma mistura de soluções conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Componentes da amplificação de DNA dos isolados de actinomicetos e respectivas concentrações das soluções utilizadas em uma reação para amplificação da região 16S r DNA.

<i>Componentes</i>	<i>Concentração estoque</i>	<i>Volume da reação (µL)</i>
Água Mili Q	----	31,4
Tampão	10x	5,0
d’NTPs	2,5 mM	5,0
Primer 16S (094)	10 µM	1,0
Primer 16S (095)	10 µM	1,0
MgCl ₂	50 mM	3,0
Taq polimerase	5 U/µL	0,6
DNA	10 ηg/µL	3,0
Volume Total		50,0

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador com a seguinte programação:

1. **Desnaturação inicial → 3 minutos a 94°C**
 2. **Desnaturação → 30 segundos a 94°C**
 3. **Pareamento → 30 segundos a 60°C**
 4. **Alongamento → 2 minutos a 72°C**
 5. **Extensão final → 10 minutos a 72°C**
- } 30 ciclos

Após o processo de amplificação, 8 µL da reação de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x. O gel foi corado com brometo de

etídio para visualização de um fragmento amplificado de aproximadamente 1400 pb que foi purificados com o Kit PuriLink PCR Purification (Invitrogen). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados nos dois sentidos usando os mesmos *primers* utilizado para as reações de PCR anteriormente descritos. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (<http://genoma.ib.usp.br/>).

As seqüências obtidas foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para conferência dos gêneros e identificação das espécies de actinomicetos em estudo e a arvore filogenética foi construída utilizando o MEGA 4.0 (<http://www.megasoftware.net/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE ACTINOMICETOS

Foram isolados 371 actinomicetos de solo de diferentes localidades da cidade de Manaus e alguns municípios próximos a cidade. A frequência de isolados varia de acordo com o local de coleta, pois no Município de Presidente Figueiredo e no Bairro Nova República foi onde ocorreu o maior número de isolados, enquanto que no Município de Rio Preto da Eva foram isolados apenas três actinomiceto (Tabela 6).

Tabela 6. Isolamento de actinomicetos de diferentes localidades

Local de Coleta	Mês de Coleta	Localização	Nº de Isolados
Bairro Nova República	Abril	3° 06'24.71"S	121
Município de Presidente Figueiredo	Junho	2°08'07.42"S	162
Município de Rio Preto da Eva	Setembro	2°39'26.10"S	03
Município de Autazes	Junho	3°22'52.33"S	43
Bairro Zumbi	Fevereiro	3°04'55.49"S	15
Porto da Ceasa	Fevereiro	3°07'53.35"S	27
TOTAL			371

Um dos fatores observados para o baixo índice de isolados em algumas localidades pode estar relacionado com a composição do solo. A vasta diferença existente na composição e características físicas dos solos resulta na grande diferença no tamanho da população microbiana assim como no tipo de microrganismos que constituem essa população (SALAMONI, 2009).

A época de coleta também pode influenciar no número de microrganismos encontrados em determinada região. Entre os meses de janeiro a junho, foram isolados o maior número de actinomicetos, nesse período ocorre a cheia dos rios ficando o solo mais úmido. Os actinomicetos são conhecidamente produtores de metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica. Estas características fazem deste gênero um grupo importantes. Na Figura 9 é possível observar as características morfológicas dos *Streptomyces*, semelhante aos fungos.

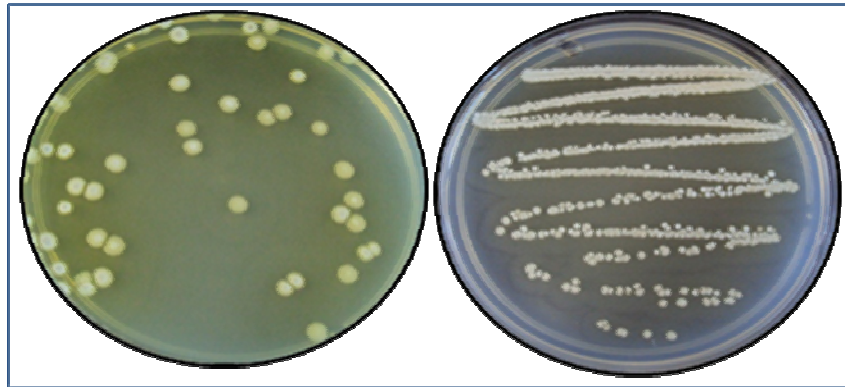


Figura 9. Isolamento e purificação dos actinomicetos

5.2 AVALIAÇÃO DOS ACTINOMICETOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBINA

A atividade antimicrobiana em meio sólido pelo método de difusão em Ágar foi realizado para todos os 371 isolados e a tabela 7 mostra somente os isolados que apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos-testes utilizados.

Pelo método de difusão em Ágar foi detectada atividade antimicrobiana de moderada a alta, com espectro de ação predominante para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*) (Figura 10). Dos 371 isolados, foram selecionados 46 actinomicetos com atividade antimicrobiana, ou seja, 12,4%. Dos actinomicetos selecionados 39 (84,7%) apresentaram espectro de ação para bactérias Gram-positivas (Tabela 7).

Outros autores também verificaram uma alta taxa de inibição em bactérias Gram-positivas por actinomicetos produtores de antimicrobianos (DUARTE *et al.*, 2009; HECK, 2007).

Nenhum dos isolados foi capaz de inibir todas as bactérias Gram-negativas. Essa baixa atividade contra as bactérias Gram-negativas pode estar associada à complexidade da estrutura da membrana externa destas bactérias (DUARTE *et al.*, 2009).

A partir deste ensaio preliminar, novos ensaios foram realizados com outros meios de cultivo, avaliando fontes de carbono e nitrogênio para a obtenção de uma maior produção dos compostos antimicrobianos. Os isolados nº 01, 234, 315, 325 e 355 apresentaram alta atividade antimicrobiana contra três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis*). Para esta etapa do trabalho, apenas os isolados nº 01, 325 e 355 foram escolhidos para dar continuidade aos ensaios de otimização da bioatividade.

Tabela 7. Classificação da atividade antimicrobiana apresentada pelos actinomicetos.

Isolado	Patógenos				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
Nº 01	+++	+++	+++	Neg	Neg
Nº 02	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 81	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 84	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 107	+++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 113		Neg	Neg	Neg	++
Nº 121	+++	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 129		Neg	+++	Neg	Neg
Nº 166	+++	++	++	Neg	Neg
Nº 167	+++	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 168	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 181	Neg	Neg	Neg	++	Neg
Nº 184	Neg	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 189	Neg	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 204	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 210	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 211	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 234	+++	+++	+++	Neg	Neg
Nº 252	Neg	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 256	Neg	Neg	Neg	++	Neg
Nº 265	Neg	Neg	Neg	++	Neg
Nº 279	+++	Neg	+++	+	Neg
Nº 282	+++	Neg	+++	Neg	Neg
Nº 294	Neg	Neg	Neg	++	Neg
Nº 305	+++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 315	+++	+++	+++	Neg	Neg
Nº 325	+++	+++	+++	Neg	Neg
Nº 335	++	Neg	++	Neg	Neg
Nº 343	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 353	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 355	+++	+++	+++	Neg	Neg
Nº 356	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 357	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 358	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 359	Neg	++	Neg	Neg	Neg
Nº 361	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
Nº 365	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 371	+++	++	Neg	Neg	Neg
Nº 372	+++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 376	++	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 377	+	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 379	++	++	Neg	Neg	Neg
Nº 383	+	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 392	+	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 393	+	Neg	Neg	Neg	Neg
Nº 394	+	Neg	Neg	Neg	Neg

- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++): diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.
- Neg (-): ausência de halo de inibição;

Resultados parcialmente semelhantes aos nossos, foram obtidos por Alberton *et al.* (2006), que isolaram uma cepa de *Streptomyces viridosporus*, onde apresentou efeito inibitório frente as cepas patogênicas Gram-positivas (*S. aureus*) porém não inibiu as bactérias Gram-negativas como a *E.coli*. Na Figura 10, é possível observar os diferentes halos de inibição dos diferentes isolados.

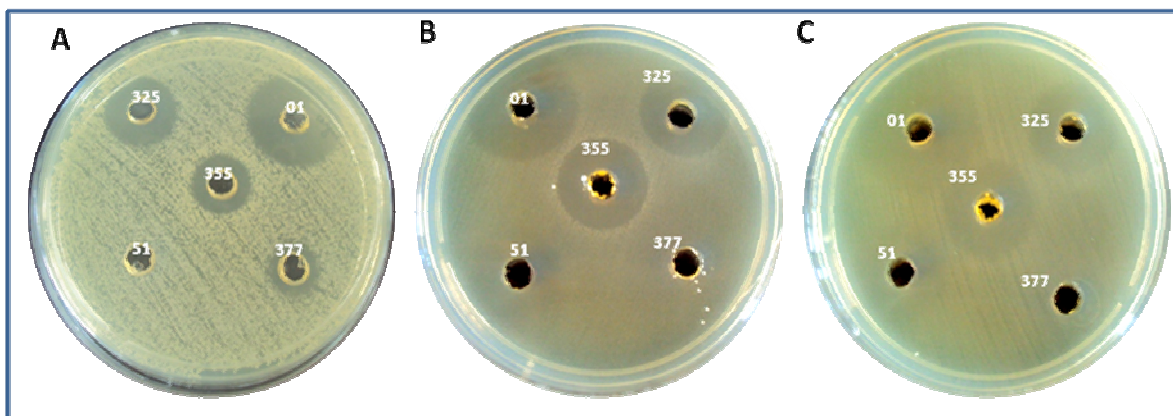


Figura 10. Ensaio de antibiose contra *S. aureus* ATCC 25923 (A); *S. pneumoniae* ATCC 49619 (B); *E. faecalis* (C)

Os isolados selecionados produziram metabólitos secundários capazes de inibir a bactéria *Staphylococcus aureus*, essa bactéria é de grande interesse clínico por ser o patógeno causador do maior número de infecções hospitalares (CONDÉ-ESTEVEZ *et al.*, 2009).

No presente trabalho os isolados selecionados inibiram o crescimento da bactéria *Enterococcus faecalis* apresentando halos de alta inibição (+++). O gênero *Enterococcus* é causador de infecções tais como endocardite e bacteremia (CONDÉ-ESTEVEZ *et al.*, 2009).

5.3 BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR FONTE DE NITROGÊNIO

Para otimização da melhor fonte de nitrogênio para a produção do composto antimicrobiano, foram avaliadas várias fontes de nitrogênio como pode ser verificado nas Tabela 8, 9 e 10 para cada actinomiceto.

De acordo com a Tabela 8, apenas a Prolina não foi considerada uma boa fonte de nitrogênio para a produção do composto antimicrobiano, no teste de antibiose utilizando a bactéria *S. aureus*. As outras fontes de nitrogênio analisadas para o isolado nº 01 forneceram bons resultados, com a formação de halos de inibição considerados de alta atividade (halo de

inibição superior a 1,7 cm). Não havendo, portanto, diferença significativa entre as outras fontes de nitrogênio analisadas.

Tabela 8. Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n° 01.

Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>E.faecalis</i>	Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>E.faecalis</i>
Alanina	2,2	2,4	2,4	Asparagina	2	2,3	2,3
Cisteína	2,1	2,2	2,1	Glicina	1,8	2,3	1,9
Isoleucina	2	2	2,3	Leucina	1,7	1,6	2,2
Arginina	2,3	2	2,4	Guanidina	2,1	2	2,3
Metionina	1,9	1,8	2,1	Prolina	0,9	2,3	2,2
Fenilalanina	2,4	2,3	2,3	Lisina	2	2,4	2,3
Glutamina	2,2	2,3	2,3	Histidina	2	2,2	2,2
Valina	2,3	2,5	2,2	Sulf. Amônio	1,9	2,2	2,3
Tirosina	2	2,4	2,3	Peptona	1,9	2,1	2
Ác. Aspártico	2,1	2,2	2,3	Ext. de Malte	2	2,3	2,1
Triptofano	1,9	2,2	2,3	Ext. Levedura	1,7	2,1	2,2
Serina	2	2,2	2,5	Caseína	1,8	2	2,1
Treonina	1,8	2,2	2,2				

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

Considerando o diâmetro do halo de inibição, as melhores fontes de nitrogênio para o isolado n° 01 foram a Alanina, Fenilalanina e Valina, pois apresentaram os maiores halos de inibição para todas as bactérias indicadoras testadas.

Para o isolado n° 325 a melhor fonte de nitrogênio também foi a Fenilalanina, com halos considerados de moderada a alta atividade.

Mas algumas fontes de nitrogênio foram consideradas inibitórias para a produção do composto antimicrobiano. A Lisina, Sulfato de Amônio e Peptona não apresentaram halo de inibição quando utilizadas como fontes de nitrogênio nos meios de cultura (Tabela 9).

Tabela 9. Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n° 325.

Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumonie</i>	<i>E.faecalis</i>	Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumonie</i>	<i>E.faecalis</i>
Alanina	1,1	1,3	1,4	Asparagina	1,2	1,2	1,8
Cisteína	0,9	1,1	1,7	Glicina	1,1	1,2	1,8
Isoleucina	1	1	1,5	Leucina	1	1	1,5
Arginina	1,1	0,9	1,5	Guanidina	Neg	Neg	1,2
Metionina	Neg	Neg	1,4	Prolina	1	1	1,4
Fenilalanina	1,4	1,7	2,2	Lisina	Neg	Neg	Neg
Glutamina	1,1	1,1	1,6	Histidina	Neg	Neg	Neg
Valina	0,8	1	1,4	Sulf. Amônio	Neg	Neg	Neg
Tirosina	1	1	1,6	Peptona	Neg	Neg	Neg
Ác. Aspártico	1	1	1,7	Ext. de Malte	Neg	Neg	Neg
Triptofano	Neg	1	1,4	Ext. Levedura	Neg	Neg	Neg
Serina	1	1,3	1,6	Caseína	Neg	Neg	Neg
Treonina	1,1	1	1,6				

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

Considerando o tamanho do halo de inibição, as melhores fontes de nitrogênio orgânico para o isolado 355 foram a Asparagina e a Peptona com halos considerados de média atividade.

Algumas fontes de nitrogênio foram consideradas prejudiciais para a produção do composto antimicrobiano.

Os meios suplementados com Metionina, Arginina, Glicina, Fenilalanina, Treonina, Guanidina, Histidina e Sulfato de Amônio não produziram halo de inibição. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10. Seleção da melhor Fonte de Nitrogênio para expressão da atividade antimicrobiana do isolado n°355.

Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoni</i>	<i>E.faecalis</i>	Fonte de N	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumonie</i>	<i>E.faecalis</i>
Alanina	Neg	0,9	0,9	Asparagina	1,2	1,6	1,4
Cisteína	Neg	Neg	1,1	Glicina	Neg	Neg	Neg
Isoleucina	Neg	1,1	1	Leucina	Neg	Neg	Neg
Arginina	Neg	1,1	1,6	Guanidina	Neg	1,1	1
Metionina	Neg	Neg	Neg	Prolina	0,9	1	0,9
Fenilalanina	Neg	Neg	Neg	Lisina	0,9	1,2	1,1
Glutamina	1	1,2	1,1	Histidina	Neg	Neg	Neg
Valina	1,1	1,2	1,2	Sulf. Amônio	Neg	Neg	Neg
Tirosina	1	1,2	1,2	Peptona	1,5	1,5	1,4
Ác. Aspártico	Neg	0,8	1	Ext. de Malte	0,9	1,1	1,1
Triptofano	Neg	0,9	0,9	Ext. Levedura	1	1,1	1,1
Serina	0,8	1,1	1,3	Caseína	1	1,4	1,2
Treonina	Neg	Neg	Neg				

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

5.4 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS FÍSICAS

Foi realizado um planejamento estatístico com o objetivo de analisar se as variáveis: temperatura, pH, agitação e tempo apresentam influência significativa na produção do composto antimicrobiano de interesse.

5.4.1 Resultado das variáveis físicas para o isolado n° 01

Para o isolado n° 01, as variáveis pH, temperatura e agitação não foram significativas ao nível de 95% de confiança para a produção do composto antimicrobiano (Tabela 11). De

acordo com a análise estatística, a variável tempo foi a única que apresentou efeito significativo na produção do composto antimicrobiano (Tabela 12).

A partir do primeiro dia de cultivo, já é possível observar a produção do composto antimicrobiano de interesse.


Tabela 11. Resultados da produção do composto antimicrobiano para os isolados n° 01, n°325 e n°355 para o planejamento estatístico executado variando agitação, temperatura, pH e tempo.

Número de Ensaio	Agitação (rpm)	Temp (°C)	pH	Tempo (dias)	Halo de inibição n°01	Halo de inibição n° 325	Halo de inibição n° 355
1	150	35	5,5	15	3,5	2,1	Neg
2	200	40	6,5	10	3,4	2,0	Neg
3	250	25	5,5	5	3,1	neg	Neg
4	200	30	6,5	10	3,6	2,8	0,9
5	150	35	5,5	5	3,1	1,6	Neg
6	150	25	5,5	15	3,6	neg	1,1
7	150	35	7,5	5	3,6	2,0	1,0
8	200	30	6,5	20	3,7	2,5	0,9
9	150	25	7,5	15	3,7	1,5	1,7
10	150	25	7,5	5	2,8	2,1	1,1
11	200	30	4,5	10	3,6	2,4	Neg
12	250	25	5,5	15	3,5	2,7	Neg
13	150	35	7,5	15	3,5	1,6	1,2
14	250	35	7,5	5	3,2	2,5	Neg
15	200	30	8,5	10	3,6	2,0	1,0
16	200	20	6,5	10	3,7	Neg	0,7
17	250	25	7,5	5	3,0	1,5	1,2
18	250	35	5,5	15	3,5	2,4	1,1
19	200	30	6,5	10	3,6	2,6	0,9
20	250	35	5,5	5	3,3	2,5	Neg
21	150	25	5,5	5	3,5	2,1	Neg
22	250	35	7,5	15	3,5	2,1	1,0
23	250	25	7,5	15	3,5	2,3	1,0
24	200	30	6,5	1	2,2	Neg	Neg
25	300	30	6,5	10	3,6	2,7	1,2
26	100	30	6,5	10	3,6	2,8	1,3
27	200	30	6,5	10	3,6	2,8	0,8

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

Tabela 12. Análise de Variância demonstrando o nível de significância a 95% ($p < 0,05$)

Variáveis	P n°01	P n°325	P n° 355
Agitação (rpm)	0,538	0,473	0,391
Temperatura (°C)	0,929	0,042	0,180
pH	0,790	0,718	0,011
Tempo (dias)	0,000	0,179	0,028
Agitação*Agitação	0,851	0,971	0,344
Temperatura*Temperatura	0,662	0,024	0,225
pH*pH	0,851	0,448	0,385
Tempo*Tempo	0,004	0,048	0,325
Agitação*Temperatura.	0,745	0,658	0,401
Agitação*pH	0,913	0,849	0,749
Agitação*Tempo	0,913	0,095	1,000
Temperatura.*pH	0,246	0,350	0,749
Temperatura*Tempo	0,246	0,704	0,671
pH*Tempo	0,589	0,614	0,346

95% - 

De acordo com os gráficos das Figuras 11 e 12, o tempo ótimo de incubação está em torno de 10 e 15 dias.

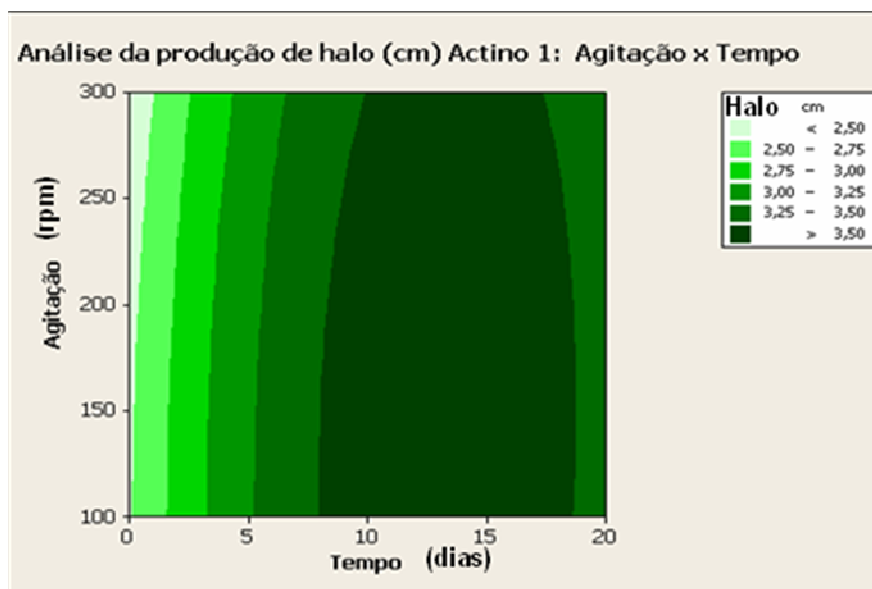


Figura 11. Gráfico de Contorno: isolado n°01 – Agitação x Tempo

De acordo com o gráfico da Figura 13, podemos observar que a uma dada temperatura, e variando o tempo de incubação ocorrem mudanças significativas na produção do composto antimicrobiano. Ao longo do tempo, a produção do composto antimicrobiano aumenta e depois estabiliza, chegando a um pico de produção.

Verificou-se também, que a uma temperatura acima de 35°C ocorre uma redução no diâmetro do halo de inibição (Figura 13). Este comportamento nos permite dizer que a temperatura é um dos fatores limitantes para a produção dos compostos com atividade antimicrobiana. Resultados similares foram observados por Hassan et al (2001) onde nos ensaios com temperaturas superiores a 35 °C tiveram um efeito adverso sobre o crescimento e produção do antibiótico por *Streptomyces violatus*. Quando analisamos o pH em função do tempo de cultivo (Figura 12), a um determinado valor de pH, e variando o tempo de incubação, ocorrem mudanças significativas na produção do composto antimicrobiano.

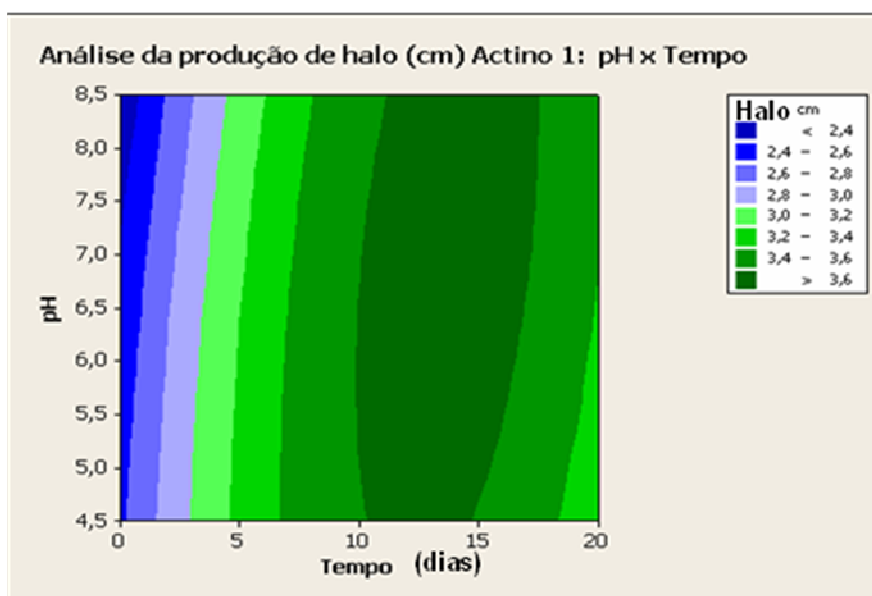


Figura 12. Gráfico de Contorno: isolado nº01 – pH x Tempo

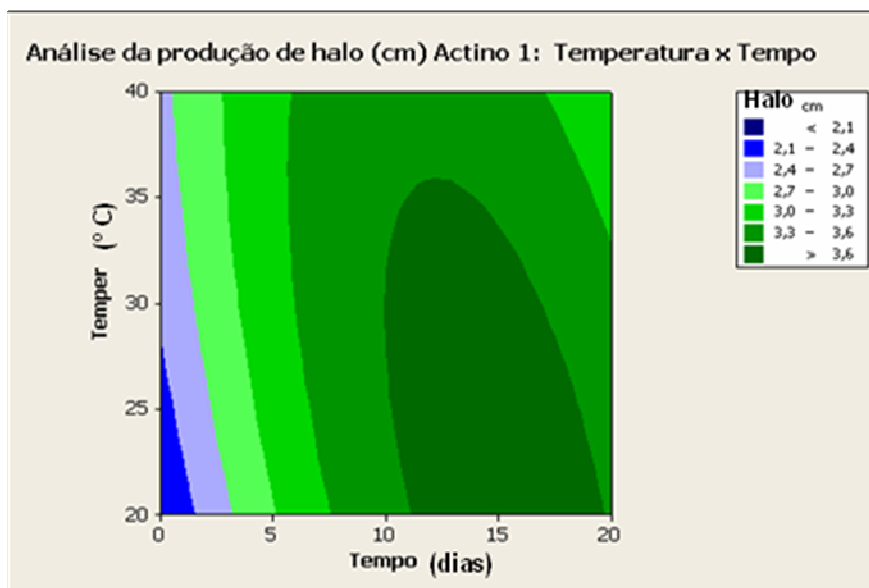


Figura 13. Gráfico de Contorno: isolado nº01 – Temperatura x Tempo

5.4.2 Resultados das variáveis físicas para o isolado n° 325

No presente trabalho, a variável temperatura foi a única significativa ao nível de 95% de confiança para o isolado n° 325 (Tabela 13).

A temperatura de 30°C proporcionou os melhores resultados para a produção do antimicrobiano, considerando o espectro de ação e o diâmetro do halo de inibição (Figuras 14 e 15).

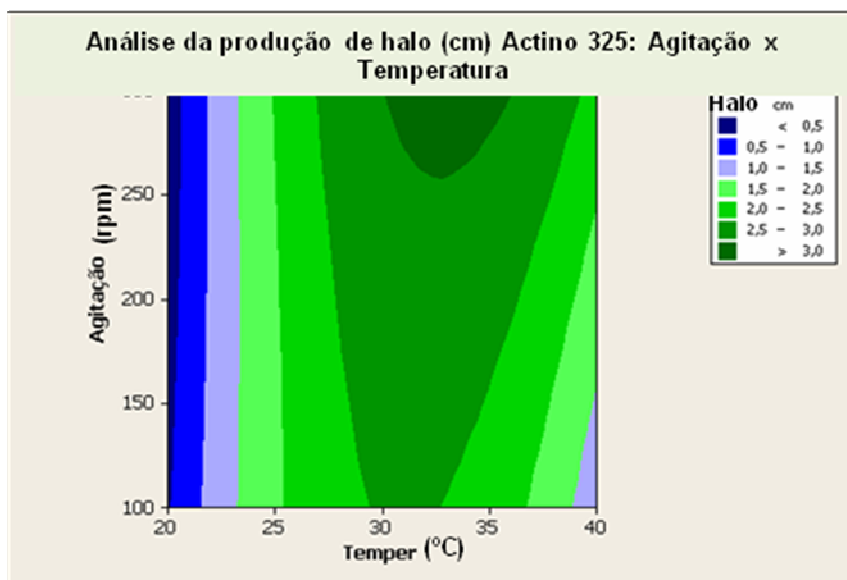


Figura 14. Gráfico de Contorno: isolado 325 – Agitação x Temperatura

Na Figura 14, podemos observar que a uma dada temperatura, a mudança da agitação não tem influência significativa na produção do composto antimicrobiano. Na Figura 15, podemos evidenciar que a temperatura de 30°C, mesmo variando o pH a produção do composto antimicrobiano é a mesma.

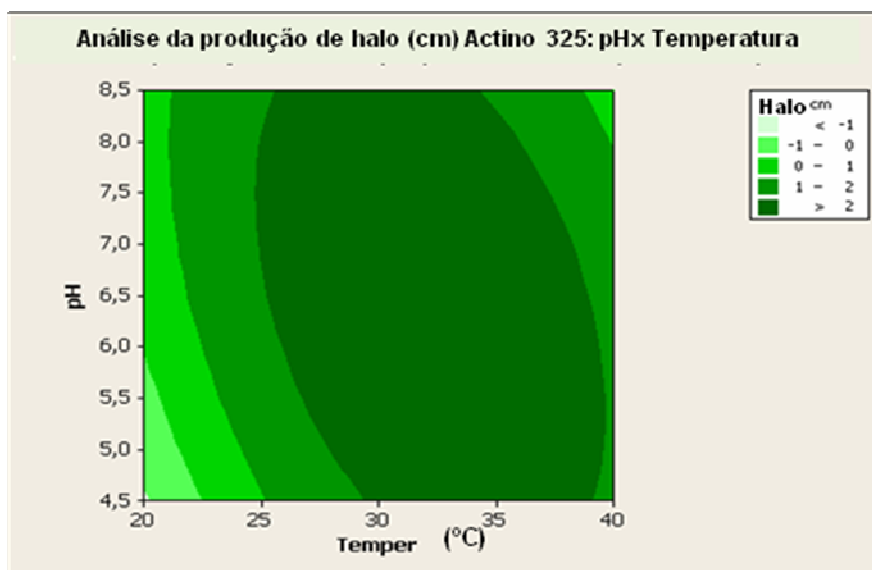


Figura 15. Gráfico de Contorno: isolado 325 – Temperatura x pH

Diversos trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* em diferentes temperaturas, em sua maioria, a temperatura de 30°C tem sido considerada como a ótima para a produção de antimicrobiano, no entanto essa temperatura pode variar de 22 a 37,5 °C de acordo com o microrganismo (HASSAN et al., 2001)

A atividade antimicrobiana foi observada a partir de 5° dia de incubação. Os melhores resultados foram obtidos entre 5 e 15 dias de incubação (Figura 16).

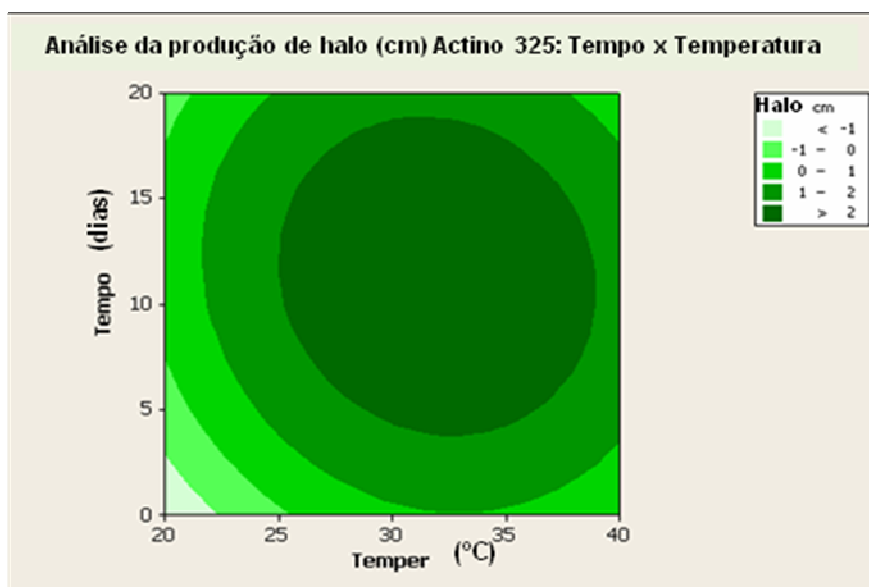


Figura 16. Gráfico de Contorno: isolado 325 – Tempo x Temperatura

5.4.2 Resultados das variáveis físicas para o isolado n° 355

Para o isolado n°355, as variáveis tempo e pH foram significativas ao nível de 95% de confiança para a produção do composto antimicrobiano (Tabela 13). De acordo com a Figura 17, a medida que aumenta o pH, assim como o tempo de incubação, aumenta a produção do composto antimicrobiano. O pH entre 7 e 8,5 entre 10 e 15 dias de incubação, mostrou ser ideal para a produção do composto antimicrobiano do isolado n° 355.

Diversos estudos vêm sendo realizados, empregando o cultivo de *Streptomyces* em diferentes condições de crescimento como fermentação sólida e líquida, em cultura estática ou sob agitação com o objetivo de otimizar a produção de fármacos. Estes trabalhos demonstram influência significativa das condições ambientais na biosíntese destes compostos (HASSAN et al., 2001).

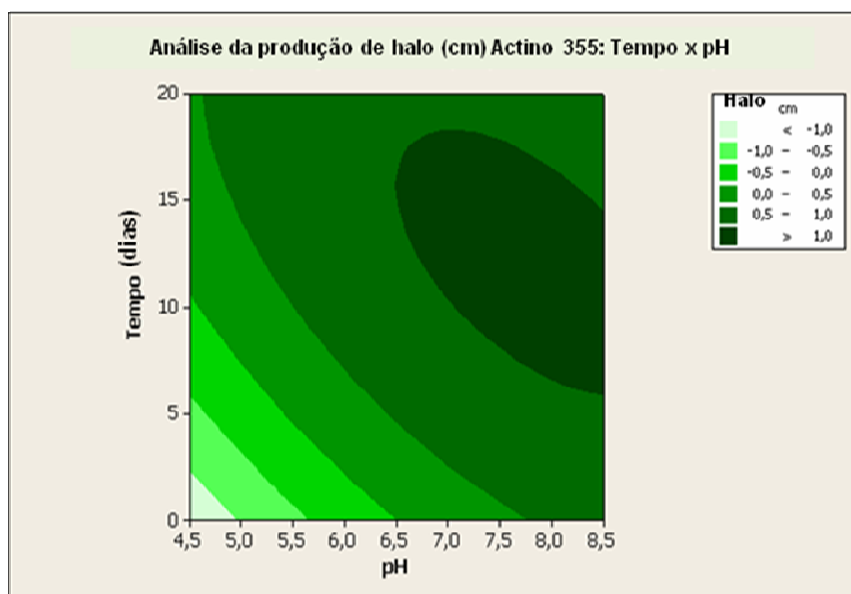


Figura 17. Gráfico de Contorno: isolado 355 – Tempo x pH

5.5 INFLUÊNCIA DAS CONCENTRAÇÕES DAS VARIÁVEIS QUÍMICAS

Os resultados da análise de variância demonstram que algumas variáveis foram muito significativas para a produção do composto antimicrobiano (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de Variância demonstrando o nível de significância a 95% ($p < 0,05$) e 90% ($p < 0,1$)

Variáveis	P n°01 Amido	P n°01 Glicerol	P n° 325 Amido	P n° 325 Glicerol
Carbono	0,086	0,071	0,979	0,582
Nitrog. Orgânico	0,369	0,308	0,190	0,066
Nitrog. Inorgânico	0,186	0,001	0,063	0,000
Peptona	0,649	0,882	0,769	0,812
Carbono*Carbono	0,396	0,002	0,038	0,024
Nitro org.*Nitro org.	0,829	0,700	0,895	0,955
Nitro inog.*Nitro inorg.	0,829	0,056	0,895	0,178
Peptona*Peptona	0,829	0,649	0,895	0,867
Carbono*Nitro org.	0,275	0,586	0,240	0,390
Carbono*Nitro inorg.	0,578	0,855	0,091	0,000
Carbono*Peptona	0,578	0,586	0,720	0,297
Nitro org.*Nitro inorg.	1,000	0,370	0,352	0,222
Nitro org.*Peptona	1,000	0,586	0,581	0,771
Nitro inorg.*Peptona	0,112	0,119	0,720	0,771

90% -

95% -

5.5.1 Análise dos resultados do n° 01

Em relação à produção de compostos antimicrobianos, avaliada através dos halos de inibição produzidos no ensaio de antibiose frente à bactéria *S. aureus*, observou-se que a produção do composto antimicrobiano variou significativamente em resposta à fonte de carbono utilizada no meio de cultura para o crescimento do microrganismo (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°01 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.

Número de Ensaio	Amido /Glicerol	Nitrogênio (Fenilalanina)	Nitrogênio (Sulf. Amônio)	Extrato de Malte	Halo de inibição n°01 (Amido)	Halo de inibição n° 01 (Glicerol)
1	12,5	1,25	0,75	1,25	3,3	2,8
2	7,5	1,25	0,75	0,75	3,3	2,4
3	12,5	1,25	1,25	0,75	3,5	2,9
4	7,5	1,25	1,25	1,25	3,3	2,5
5	10	1	1,5	1	3,3	3,1
6	15	1	1	1	3,5	2,9
7	10	1,5	1	1	3,3	2,5
8	10	1	1	1,5	3,3	2,5
9	7,5	0,75	0,75	0,75	3,2	2,4
10	12,5	0,75	1,25	1,25	3,4	2,9
11	10	1	1	1	3,4	2,6
12	12,5	1,25	1,25	1,25	3,4	2,9
13	7,5	0,75	0,75	1,25	3,3	2,5
14	12,5	0,75	1,25	0,75	3,5	2,9
15	5	1	1	1	3,3	3,1
16	7,5	1,25	1,25	0,75	3,4	2,7
17	7,5	0,75	1,25	1,25	3,4	2,7
18	10	1	1	1	3,2	2,4
19	7,5	0,75	1,25	0,75	3,4	2,9
20	10	1	1	0,5	3,4	2,5
21	12,5	1,25	0,75	0,75	3,2	2,6
22	10	1	1	1	3,4	2,6
23	12,5	0,75	0,75	1,25	3,4	2,7
24	7,5	1,25	0,75	1,25	3,4	2,6
25	10	0,5	1	1	3,4	2,7
26	12,5	0,75	0,75	0,75	3,4	2,7
27	10	1	0,5	1	3,4	2,5

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

Para o isolado n° 01, de acordo com o diâmetro do halo de inibição, a produção do composto antimicrobiano foi maior durante o crescimento do microrganismo em amido do que em glicerol (Figura 20). De acordo com os resultados da análise de variância, os ensaios cuja fonte de carbono foi amido, nenhuma variável apresentou influência significativa ao nível de 95% de confiança (Tabela 13). No entanto, reduzindo o nível de confiança para 90%, a variável fonte de carbono (amido) torna-se significativa.

Nos ensaios cuja fonte de carbono foi glicerol, apenas a variável nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio), apresentou influência significativa ao nível de 95% de confiança para a produção do composto antimicrobiano, de acordo com a análise de variância (Tabela 13). Reduzindo-se o nível de confiança para 90%, a variável fonte de carbono (glicerol), torna-se significativa.

No presente estudo de produção, as melhores condições para o isolado n° 01 foram pH 6,5 - 7,5; 20 – 30°C; 150 – 200 rpm; 10 dias de cultivo. As melhores médias dos halos de inibição foram obtidas com 12,5 – 15 g/L de amido e 1 – 1,25 g/L de Sulfato de amônio. Os melhores halos variaram de 3,5 a 3,7 cm. No entanto, os resultados da análise de variância nos mostram que um aumento nas concentrações das fontes de carbono e nitrogênio inorgânico, acima daquelas propostas neste trabalho, pode favorecer o aumento na produção do antimicrobiano de interesse (Figura 18 e 19). Esses dados também permite-nos desenvolver novos meios visando a melhoria dessa produção.

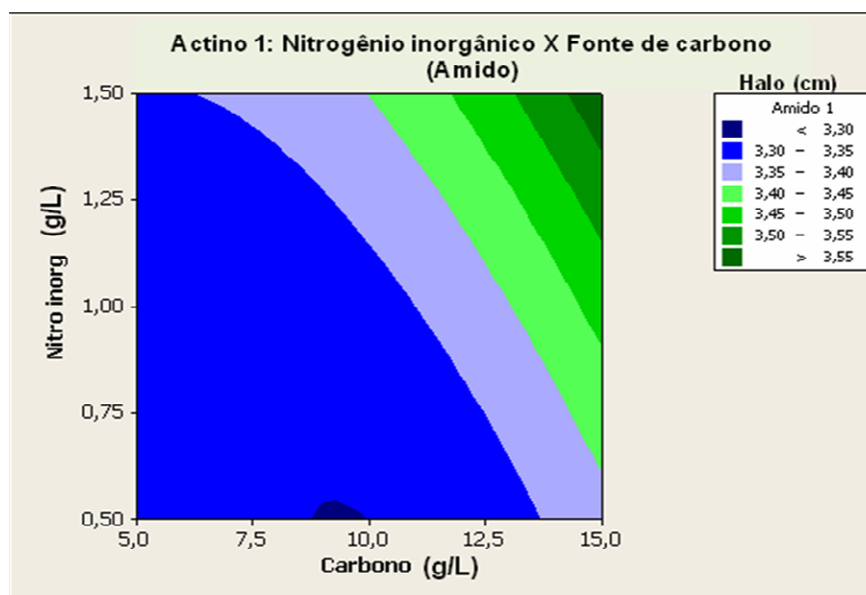


Figura 18. Gráfico de Contorno: isolado n°01 –Sulfato de Amônio x Amido.

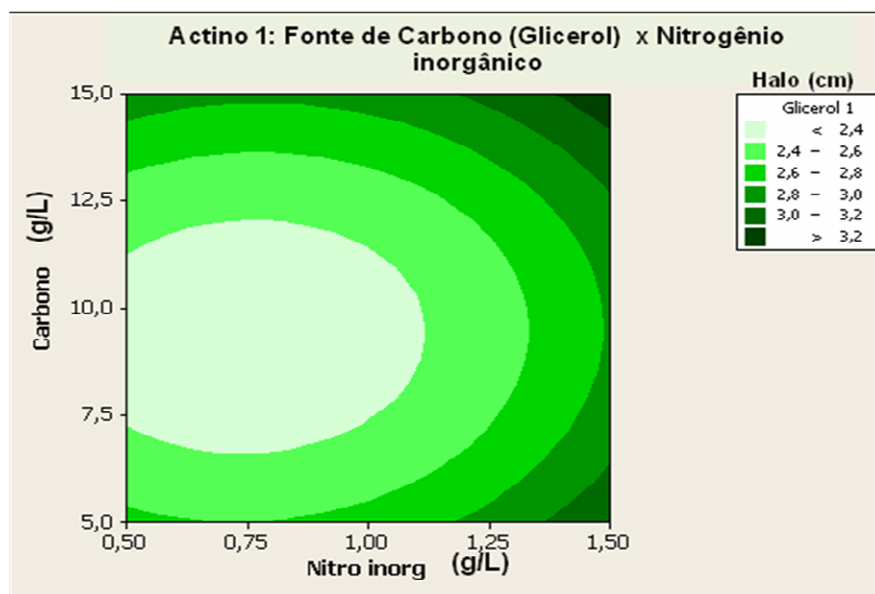


Figura 19. Gráfico de Contorno: isolado n°01 –Sulfato de Amônio x Glicerol.

Resultados semelhantes foram encontrados por Hong *et al.*, (2009), onde empregaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a composição do meio para a produção da avermectina B1a por *Streptomyces avermitilis* 14-12A. Amido de milho e extrato de levedura foram as variáveis significativas, obtendo valores máximos de produção com 149,57 g/L de amido de milho e 8,92 g/L de extrato de levedura.

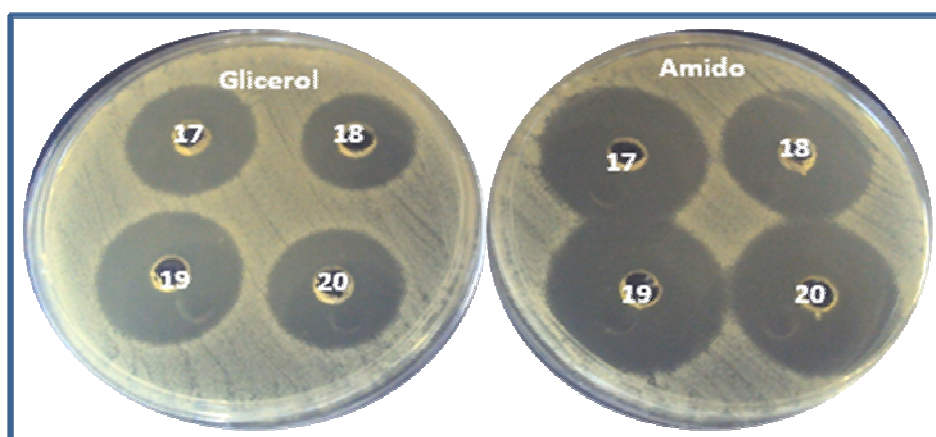


Figura 20. Ensaio de antibiose do isolado n° 01, utilizando como indicadora a bactéria *Staphylococcus aureus*. Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol. Os números correspondem aos ensaios da Tabela 15

5.5.2 Análise dos resultados das variáveis químicas para o isolado n° 325

Para o isolado n° 325, a variável nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio), foi significativa ao nível de 95% de confiança apenas para os ensaios com glicerol. No entanto,

se reduzirmos para 90% o nível de confiança, a mesma, passa a ser significativa também para amido (Tabela 13).

É possível observar que houve diferença significativa na produção do composto antimicrobiano quando comparamos as duas fontes de carbono, amido e glicerol (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°325 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.

Número de Ensaios	Amido / Glicerol	Nitrogênio (Fenilalanina)	Nitrogênio (Sulf. Amônio)	Peptona	Halo de inibição n°325 (Amido)	Halo de inibição n° 325 (Glicerol)
1	12,5	1,25	0,75	1,25	1,9	1,6
2	7,5	1,25	0,75	0,75	1,3	1,0
3	12,5	1,25	1,25	0,75	Neg	2,3
4	7,5	1,25	1,25	1,25	Neg	2,5
5	10	1	1,5	1	Neg	2,2
6	15	1	1	1	1,2	1,8
7	10	1,5	1	1	Neg	1,5
8	10	1	1	1,5	Neg	1,4
9	7,5	0,75	0,75	0,75	1,2	1,0
10	12,5	0,75	1,25	1,25	Neg	1,4
11	10	1	1	1	1,4	1,3
12	12,5	1,25	1,25	1,25	Neg	2,1
13	7,5	0,75	0,75	1,25	1,5	1,0
14	12,5	0,75	1,25	0,75	1,0	1,4
15	5	1	1	1	2,0	2,1
16	7,5	1,25	1,25	0,75	Neg	2,4
17	7,5	0,75	1,25	1,25	2,0	2,4
18	10	1	1	1	Neg	1,4
19	7,5	0,75	1,25	0,75	1,0	2,4
20	10	1	1	0,5	Neg	1,3
21	12,5	1,25	0,75	0,75	2,0	1,8
22	10	1	1	1	Neg	1,8
23	12,5	0,75	0,75	1,25	1,8	1,7
24	7,5	1,25	0,75	1,25	Neg	1,1
25	10	0,5	1	1	Neg	1,3
26	12,5	0,75	0,75	0,75	1,8	1,8
27	10	1	0,5	1	Neg	1,2

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

A influência que a variável nitrogênio inorgânico possui na produção do antimicrobiano, pode ser evidenciada nos gráfico das Figuras 21 e 22. À medida que aumenta a concentração de nitrogênio inorgânico a produção do composto antimicrobiano tende a aumentar.

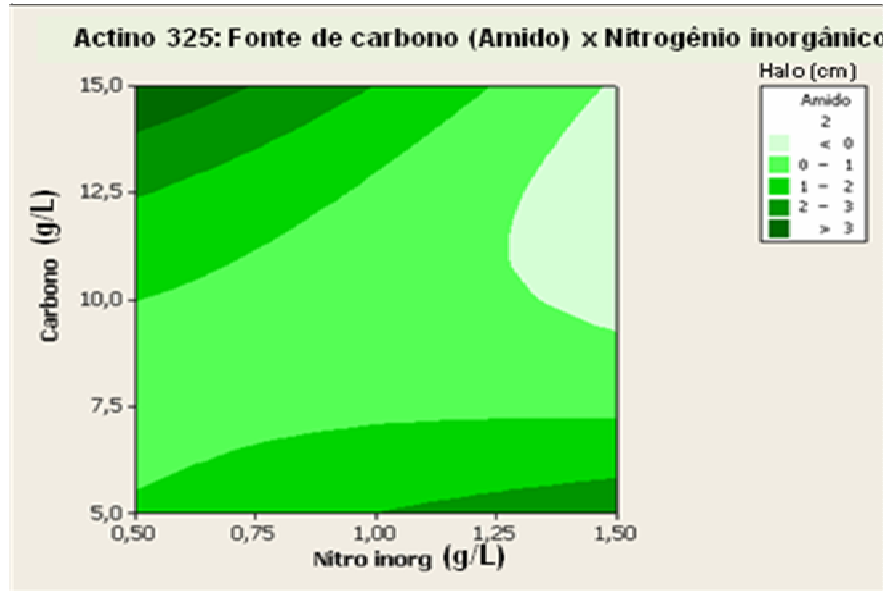


Figura 21. Gráfico de contorno. Isolado nº 325: Amido x Sulfato de Amônio

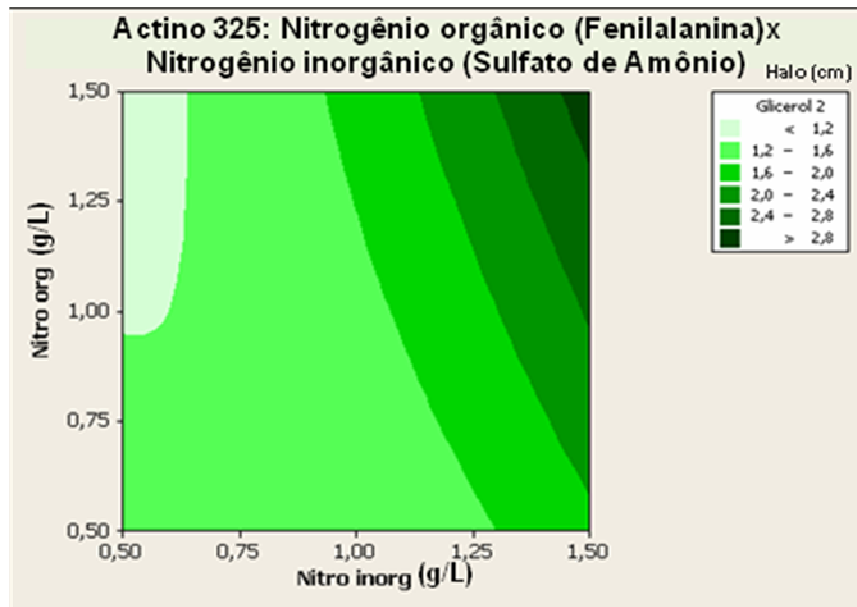


Figura 22. Gráfico de contorno. Isolado nº325: Glicerol x Sulfato de Amônio.

A produção do composto antimicrobiano para o isolado nº 325 foi maior, quando cultivado com o meio cuja fonte de carbono foi o glicerol, produzindo maiores halos de inibição 2,5 cm enquanto que no meio de amido o maior halo foi de 2,0 cm (Tabela 15).

Nos meios cuja fonte de carbono foi o glicerol, todos os meios produziram halos de inibição contra a bactéria *S.aureus*. No entanto, nos meios cuja fonte de carbono foi o amido, alguns meios não produziram o composto antimicrobiano, não apresentando halo de inibição (Figura 23).

As melhores condições para o isolado n° 325 foram pH 6,5, 30 °C, 100 – 200 rpm, 10 dias de cultivo. As melhores médias dos halos de inibição foram obtidas com 7,5g/L de glicerol e 1,25 g/L de sulfato de amônio. No entanto, os resultados de variância nos mostram que um aumento nessa concentração, pode aumentar a concentração do antimicrobiano.

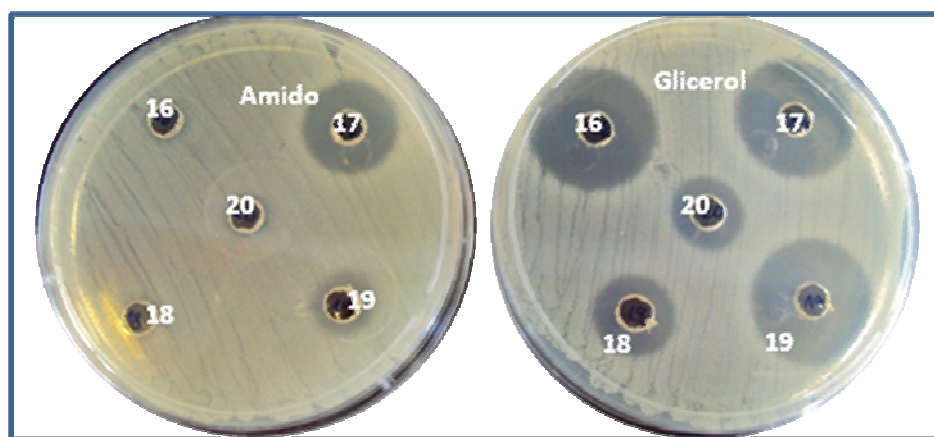


Figura 23. Ensaio de antibiose do isolado n° 325, utilizando como indicadora a bactéria *Staphylococcus aureus*. Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol. Os números correspondem aos ensaios da Tabela 16

Kavali *et al*, (2011), analisaram a influência das fontes de carbono glicerol e glicose na produção do antibiótico produzido por *Streptomyces sp.* M3004. Verificaram que a atividade antimicrobiana do *Streptomyces sp.* M3004 alcança a máxima produção na fase estacionária, enquanto que não se altera significativamente em relação à suplementação de glicose ou glicerol.

Estudos demonstram que a síntese de antibióticos pode ser influenciada tanto pelo tipo e concentração de nutrientes na formulação do meio de cultura, como pelas condições de crescimento do microrganismo. Entre eles, o efeito da fonte de carbono tem sido o principal objeto de estudos para a indústria e grupos de pesquisa, visando aumentar a produção de certos compostos. Carboidratos como a glicose e outros têm sido relatadas como interferindo na síntese de antibióticos, e esse efeito depende de sua rápida utilização ou preferência pelo microrganismo (SANCHEZ *et al.*, 2010). Investigando a influência de carbono e diferentes fontes de nitrogênio na produção do antibiótico macrolídeo AK-111-81 por *Streptomyces hygroscopicus*, Gesheva *et al.* (2005), observaram que a substituição de glicose por lactose ou

glicerol aumentava significativamente a quantidade de antibiótico. Assim como a adição de Íons divalentes como Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} estimulam a biossíntese de AK-111-81. Viana et al. (2010), verificaram a influência de cinco variáveis, pH, temperatura, intensidade de agitação, concentração de glicerol e de farinha de soja na produção de ácido clavulânico (AC) por *Streptomyces* (DAUFPE 3060). As variáveis temperatura e concentração de farinha de soja foram significativas a nível de confiança de 95%. A maior concentração de AC foi obtida após 48h, 150 rpm, 32°C, pH 6,0 e com 5 g/L de glicerol e 20 g/L de farinha de soja. Jicheng et al. (2008), avaliaram o efeito de fontes de carbono e nitrogênio além de pH e temperatura sobre a produção de antibiótico por *Streptomyces rimosus* MY02. As melhores condições para a cepa MY02, foram pH 6,0, 28 ° C, 180 rpm, 4 dias, e 120 h de cultivo. As melhores médias do halos de inibição foram obtidas com 53,313g/L de amido, 9,376g/L de pó de amendoim, 6,244g/L de NH_4SO_4 e 5,836g/L de NaCl.

5.5.3 Análise dos resultados das variáveis químicas para o isolado n° 355

Para o isolado n° 355, os ensaios com os meios de glicerol não produziram halo de inibição e alguns ensaios com os meios de amido, produziram halo de inibição, porém, de baixa intensidade (Tabela 16).

Tabela 16. Resultados do planejamento estatístico experimental para otimização do meio de cultura usado na produção do composto antimicrobiano do isolado n°355 utilizando amido e glicerol como fonte de carbono.

Número de Ensaio	Amido /Glicerol	Nitrogênio (Asparagina)	Nitrogênio (Sulf. Amônio)	Peptona	Halo de inibição n°355 (Amido)	Halo de inibição n° 355 (Glicerol)
1	12,5	1,25	0,75	1,25	1,0	Neg
2	7,5	1,25	0,75	0,75	Neg	Neg
3	12,5	1,25	1,25	0,75	1,0	Neg
4	7,5	1,25	1,25	1,25	Neg	Neg
5	10	1	1,5	1	Neg	Neg
6	15	1	1	1	Neg	Neg
7	10	1,5	1	1	1,0	Neg
8	10	1	1	1,5	Neg	Neg
9	7,5	0,75	0,75	0,75	Neg	Neg
10	12,5	0,75	1,25	1,25	Neg	Neg
11	10	1	1	1	1,0	Neg
12	12,5	1,25	1,25	1,25	Neg	Neg
13	7,5	0,75	0,75	1,25	Neg	Neg
14	12,5	0,75	1,25	0,75	Neg	Neg
15	5	1	1	1	Neg	Neg
16	7,5	1,25	1,25	0,75	1,1	Neg

Número de Ensaio	Amido/Glicerol	Nitrogênio (Asparagina)	Nitrogênio (Sulf. Amônio)	Peptona	Halo de inibição n°355 (Amido)	Halo de inibição n° 355 (Glicerol)
17	7,5	0,75	1,25	1,25	Neg	Neg
18	10	1	1	1	Neg	Neg
19	7,5	0,75	1,25	0,75	Neg	Neg
20	10	1	1	0,5	Neg	Neg
21	12,5	1,25	0,75	0,75	Neg	Neg
22	10	1	1	1	Neg	Neg
23	12,5	0,75	0,75	1,25	Neg	Neg
24	7,5	1,25	0,75	1,25	1,3	Neg
25	10	0,5	1	1	Neg	Neg
26	12,5	0,75	0,75	0,75	1,2	Neg
27	10	1	0,5	1	Neg	Neg

- Neg (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 0,7 a 1,2 cm;
- Moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 1,3 a 1,6 cm;
- Alta (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 1,7 cm.

A suplementação dos meios para melhorar a atividade antimicrobiana, não foi eficiente. As melhores condições para o isolado n° 355 foram pH 7,5, 25 °C, 150 rpm, 15 dias de cultivo. O meio de amido-caseína líquido continuou sendo o melhor meio para o crescimento e produção de compostos antimicrobianos (Figura 24).

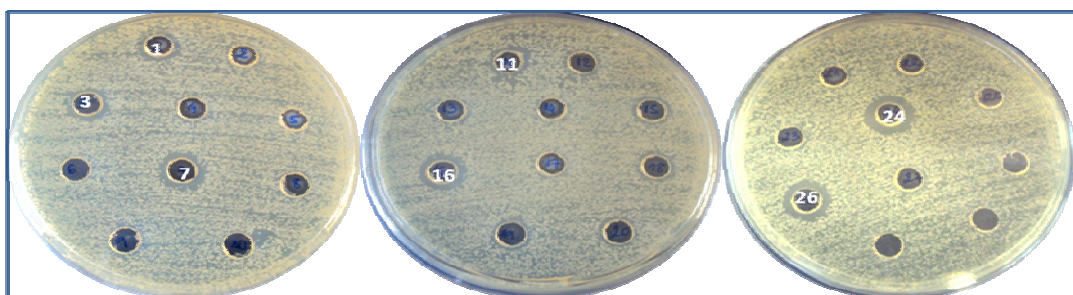


Figura 24. Ensaio de antibiose do isolado n° 355, utilizando como indicadora a bactéria *Staphylococcus aureus*. Comparação entre as fontes de carbono amido e glicerol. Os números correspondem aos ensaios da Tabela 15

5.6 AVALIAÇÃO DO ESPECTRO DE AÇÃO

Não foi detectada nenhuma atividade nas condições de cultivo testadas contra as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC25922, *Klebsiela pneumoniae* ATCC700603).

Confirmou-se a atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram-positivas testadas: (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC29212) (Figura 25).

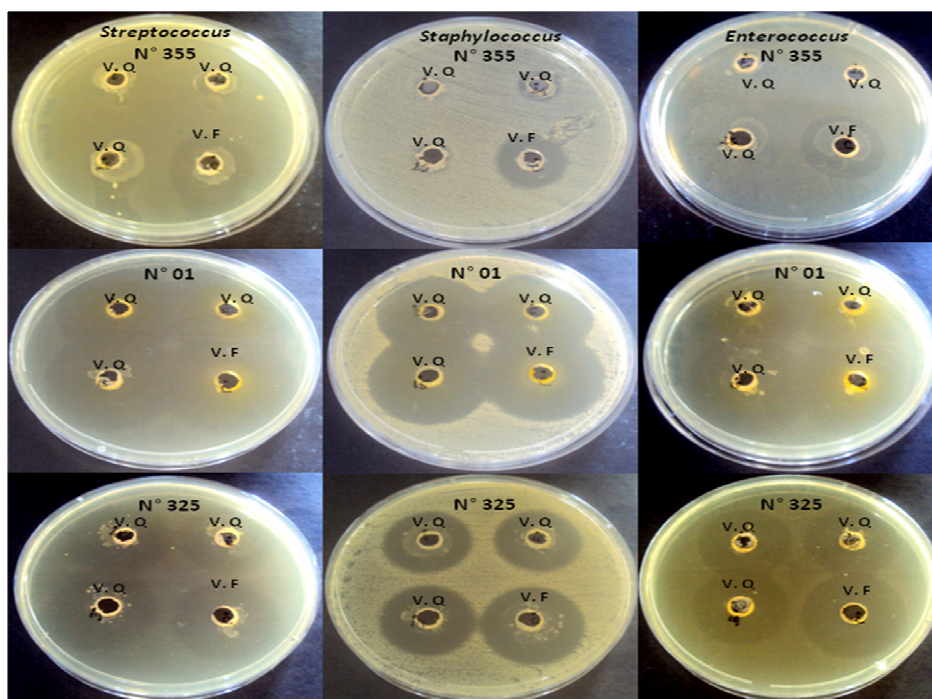


Figura 25. Ensaio de antibiose para avaliação do espectro de ação dos isolados n° 01, n°325 e n° 355. Comparando os melhores halos dos ensaios do planejamento químico (V.Q) com os ensaios do planejamento físico (V.F).

Kayali et al., (2011) avaliaram o efeito das variações na concentração de glicose e glicerol na produção de antibióticos por *Streptomyces sp.* Os isolados de *Streptomyces sp.* M3004 foram cultivadas em meios de cultura contendo 10-20 g / L de glicose ou glicerol como fonte de carbono. Observaram que a atividade antimicrobiana de *Streptomyces sp.* alcançou a sua máxima produção na fase estacionária enquanto, não teve alteração significativamente em relação às fontes de carbono, glicose e glicerol.

As fontes de nitrogênio usualmente favoráveis ao crescimento, como os sais de amônio, em quantidade não limitante, reprime as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio, tais como os aminoácidos, apresentando efeito inibidor sobre o metabolismo secundário (INOUE, 2006).

Fontes de fosfato no meio de cultura também podem causar um efeito inibidor na produção de muitos antibióticos produzidos por *Streptomyces sp.* Concentrações ótimas de fosfato para obter crescimento celular e síntese de antibióticos estão entre 1 e 10 mM (BELLAO, 2010).

Outro fator relevante na produção de antibióticos é a concentração de oxigênio dissolvido. Estudos têm revelado a importância de se controlar a aeração e o pH do meio para melhorar a produtividade desse antibiótico (BELLAO, 2010).

Neves e colaboradores (2001) relataram a importância da qualidade do inóculo nos meios fermentativos. Um inóculo satisfatório deve ter em torno de 3 a 10% do volume do meio, devendo estar em um estado ativo e saudável para minimizar a fase “lag”. Baixas concentrações de antibióticos em meios fermentativos são resultado da variação da concentração da biomassa do inóculo.

Devido ao desconhecimento de todas as capacidades biossintéticas presentes em um único microrganismo, a modulação e a potencialização, bem como as condições de cultivo dos microrganismos para a produção de determinado metabólito secundário devem ser estudadas cuidadosamente. Tais parâmetros podem ser modificados para a otimização e melhoria do processo fermentativo, aumentando a produção do composto de interesse.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS ACTINOMICETOS

5.7.1 Caracterização Morfológica

Primeiramente foi avaliada a cor do micélio aéreo dos actinomicetos isolados, onde foi observada uma variedade de cores, entre elas, amarelo, branco, marrom, cinza, bege, verde e laranja. O micélio vegetativo variou de amarelo a preto (Figura 26).



Figura 26. Variedade Morfológica dos actinomicetos isolados.

Algumas linhagens apresentaram pigmento difuso no meio de cultura com coloração que variou de amarelo a marrom, entretanto a maioria dos isolados não produziu pigmento no

meio de cultura utilizado. A coloração apresentada pelo micélio aéreo e a pigmentação dos actinomicetos podem ser visualizadas na Tabela 17.

Tabela 17. Características da macromorfologia de alguns actinomicetos com atividade antimicrobiana.

Isolado	Coloração do Micélio Aéreo	Produção de Pigmentos	Isolado	Coloração do Micélio Aéreo	Produção de Pigmentos
Nº 01	Marrom	Amarelo	Nº 294	Marrom	Ausente
Nº 02	Bege	Ausente	Nº 305	Marrom	Ausente
Nº 81	Branco	Ausente	Nº 315	Bege	Ausente
Nº 84	Bege	Marrom	Nº 325	Cinza	Marrom
Nº 107	Marrom	Marrom	Nº 335	Branco	Ausente
Nº 113	Branco	Ausente	Nº 343	Branco	Ausente
Nº 121	Branco	Ausente	Nº 353	Branco	Ausente
Nº 129	Verde	Marrom	Nº 355	Cinza	Ausente
Nº 166	Marrom	Ausente	Nº 356	Bege	Ausente
Nº 167	Marrom	Ausente	Nº 357	Marrom	Ausente
Nº 168	Cinza	Ausente	Nº 358	Marrom	Ausente
Nº 181	Branco	Ausente	Nº 359	Branco	Ausente
Nº 184	Verde	Ausente	Nº 361	Laranja	Ausente
Nº 189	Bege	Ausente	Nº 365	Branco	Ausente
Nº 204	Branco	Ausente	Nº 371	Bege	Ausente
Nº 210	Cinza	Ausente	Nº 372	Cinza	Ausente
Nº 211	Cinza	Ausente	Nº 376	Cinza	Ausente
Nº 234	Marrom	Marrom	Nº 377	Marrom	Ausente
Nº 252	Cinza	Ausente	Nº 379	Branco	Ausente
Nº 256	Bege	Ausente	Nº 383	Marrom	Ausente
Nº 265	Amarelo	Ausente	Nº 392	Cinza	Ausente
Nº 279	Amarelo	Ausente	Nº 393	Branco	Ausente
Nº 282	Marrom	Ausente	Nº 394	Branco	Ausente

O isolado nº 01 inicia a formação de hifas a partir de 24 horas de incubação. O micélio aéreo apresenta coloração branca no início e tende a escurecer com o tempo chegando a ficar marrom com 5 dias de incubação a 30°C. Para essa observação o isolado foi crescido em meio Ágar-Amido-Caseína, que apresentou pigmento amarelo difusível no meio a partir de 24 horas de crescimento (Figura 27).

A produção do pigmento amarelo pode indicar a produção do composto antimicrobiano para o isolado nº 01.

O isolado nº 325 inicia a formação de hifas visíveis a partir de 24 horas de incubação. O micélio aéreo apresenta coloração cinza e micélio vegetativo marrom, que escurece ao

longo do tempo (Figura 28). Para essa observação o isolado foi crescido em meio Ágar-Amido Caseína que apresentou pigmento marrom difuso no meio de crescimento.

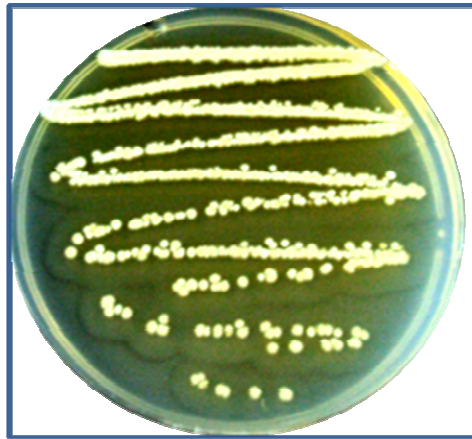


Figura 27. Morfologia do isolado nº 01. Cultivo em meio Ágar-Amido-Caseína

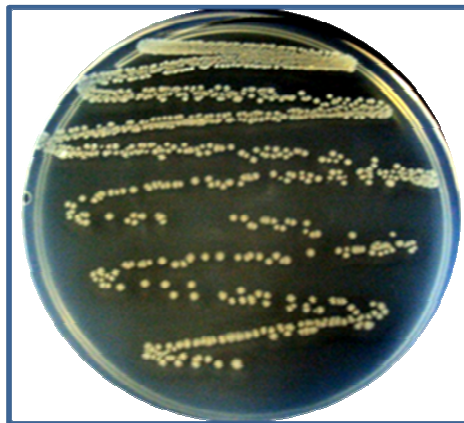


Figura 28. Morfologia do isolado 325. Cultivo em Ágar-Amido-Caseína

O isolado 355 apresenta crescimento mais lento, iniciando a formação de hifas visíveis a partir 72 horas de incubação. O micélio aéreo apresenta coloração cinza e micélio vegetativo branco, não produzindo pigmento difuso no meio de cultura. Para essa observação o meio de cultura utilizado foi Ágar-Amido-Caseína (Figura 29).



Figura 29. Morfologia do isolado 355. Cultivo em Ágar-Amido-Caseína

5.7.2 Caracterização molecular por meio do gene 16S rRNA

A partir do DNA genômico, extraído dos 3 actinomicetos em estudo (n°01, n°325 e n°355), foi possível amplificar o gene 16S rRNA, com aproximadamente 1400 pb.

As seqüências obtidas foram conferidas e alinhadas com auxílio da ferramenta BLAST e comparadas com o banco genômico do NCBI. De acordo com o banco genômico, considerou-se a espécie ou gênero com maior grau de similaridade, conforme apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Actinomicetos isolados de solo e sua identificação molecular.

Actinomiceto	Identificação Molecular	Porcentagem de Identificação
N°01	<i>Streptomyces sp.</i>	100%
N° 325	<i>Streptomyces sp.</i>	99,75%
N° 355	<i>Streptomyces sp.</i>	98,5%

Considerando a importância dos *Streptomyces* em termos biológicos, na produção de metabólitos secundários e adaptação ao ambiente, é importante entendermos sua relação com outras espécies e diversidade deste gênero, indicando que a diversidade química está associado a diversidade biologia das comunidades microbianas complexas, e distribuídas de forma heterogênea (Kumar e Goodfellow, 2008).

As três linhagens avaliadas não formaram grupos filogenéticos entre si, ficando separadas como pode ser visto na Figura 30. Apesar da diferença entre os *Streptomyces* spp. a similaridade foi alta (0,005, ou seja menos de 1%), comum para este gênero (Song et al., 2004). Existe a dificuldade de encontrar linhagens padrões com seqüências e identificação ao nível de espécie, onde a maioria dos trabalhos descrevem as linhagens como *Streptomyces* sp (O'Neill et al., 2009; Kurosawa et al., 2006). Utilizando apenas o gene 16S rRNA é quase impossível identificar um *Streptomyces* a nível de espécie. Kumar; Goodfellow (2010) avaliaram seis linhagens de *S. hygroscopicus* e não foi possível formar um grupo filogenético utilizando o gene 16S rRNA. Song et al.,(2004) sugerem que o gene 16S rRNA é uma importante ferramenta para análise filogenética de bactérias Gram negativas mas não para *Streptomyces*. Apesar da dificuldade de identificação ao nível de espécie utilizando o gene

16S rRNA foi possível confirmar que todas as três linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*.

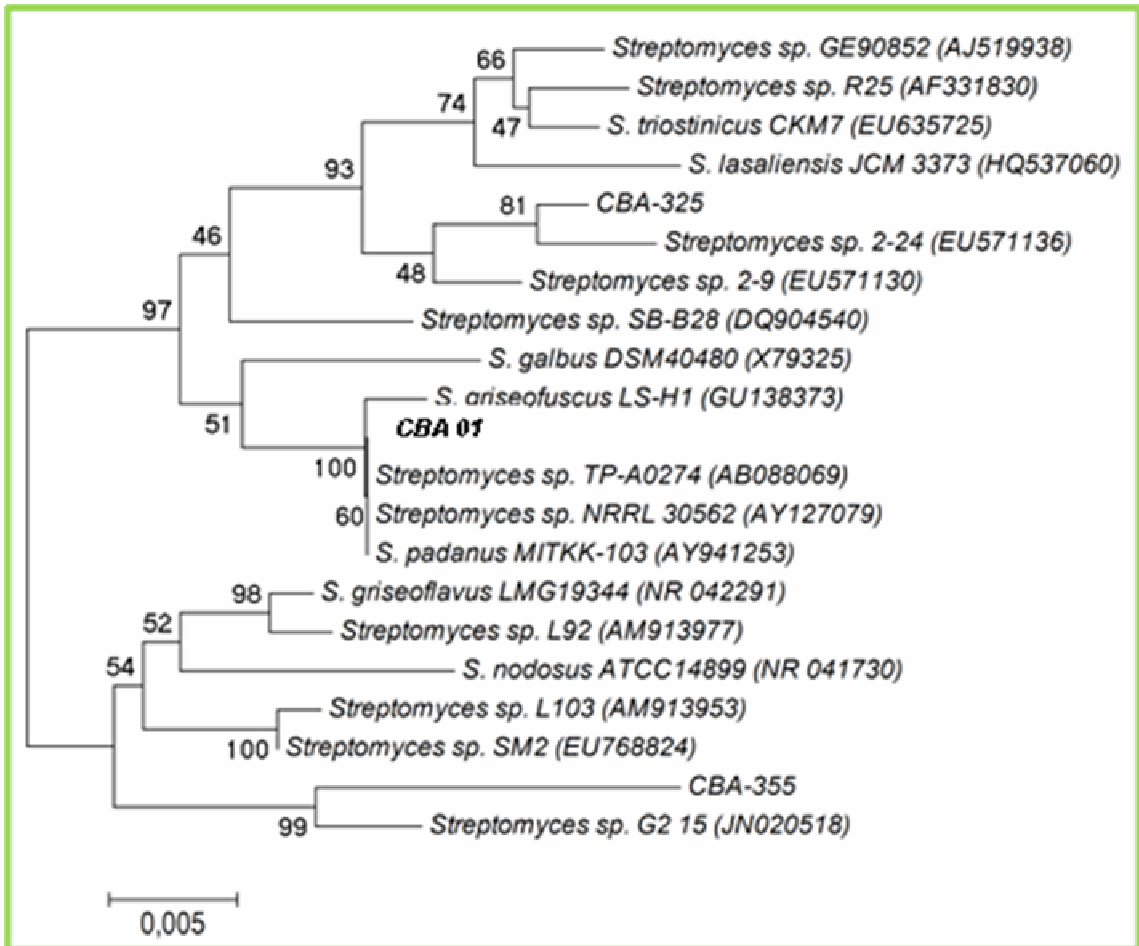


Figura 30. Filogenia de *Streptomyces* baseada no agrupamento das seqüências do gene 16S rRNA, por similaridade de acordo com o coeficiente de Neighbour-joining. Na árvore são observados os valores de bootstrap realizado com 100 subamostragens no grupo de sequencias, e a barra da escala representa a substituição de nucleotídeos em cada 100

6 CONCLUSÕES

1. Foi possível isolar 371 actinomicetos de solo de várias localidades da cidade de Manaus e alguns municípios da cidade;
2. Dos 371 isolados de actinomicetos empregados neste estudo, 46 deles apresentaram atividade antimicrobiana, destes 84,7% apresentaram espectro de ação predominante para bactérias Gram-positivas;
3. Os isolados n°01, 234, 315, 325, e 355 foram os que apresentaram os melhores resultados, inibindo o crescimento das três bactérias Gram-positivas;
4. Apenas os isolados n° 01, 325 e 355 foram escolhidos para dar continuidade aos ensaios de otimização da bioatividade;
5. Este trabalho demonstrou que a temperatura, o tempo de crescimento e as fontes de carbono e nitrogênio influenciam diretamente a produção de metabólitos antimicrobianos;
6. As melhores condições para o isolado n° 01 foram pH 6,5 – 7,5; 20 – 30 °C; 150 – 200rpm, 10 dias de cultivo. As melhores médias dos halos foram obtidas com 12,5 – 15 g/L de amido e 1 – 1,25 g/L de sulfato de amônio;
7. As melhores condições para o isolado n° 325 foram pH 6,5, 30 °C, 100-200 rpm, 10 dias de cultivo; As melhores médias dos halos foram obtidas com 7,5 g/L de glicerol, 1,25 g/L de fenilalanina e 1,25g/L de sulfato de amônio;
8. As melhores condições para o isolado n°355 foram pH 7,5 – 8,5; 10 – 15 dias de cultivo;
9. O isolado n° 01, mostrou ser um potencial produtor de novos compostos antimicrobianos, pois a produção do seu composto antimicrobiano não se alterou quando foi submetido nas diferentes condições de crescimento;
10. O isolado n° 01 inicia a produção do seu composto antimicrobiano após 24 horas de incubação;
11. Os três isolados n° 01, 325 e 355 pertencem ao gênero *Streptomyces* com alta similaridade utilizando o gene 16S rRNA.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados experimentais desta pesquisa nos permitem propor novas etapas a serem realizadas:

- A purificação, caracterização e identificação, dos metabólitos produzidos pelo isolado n° 01.
- O melhoramento genético do isolado n°01, visando aumentar a sua produção;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, L. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; JOINEAU, M. E.; MARTINS, L. A.; PACHALY, J. R.; ASSMAN, R.; CIFFONI, E. M. G.; SOCCOL, C. R. Evaluation of the potential applicability of *Streptomyces viridosporus* T7. A crude fermentation extract in veterinary medicine. **Departamento de Ciências Veterinária e Zoologia da UNIPAR**. v.9, n.1, p. 41-47, 2006.

ALEXANDER, M. Microbial Ecology. In: WILEY, J. (ed.). **Introduction to Soil Microbiology**. p.36-45, 1977.

AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-SP, p.351-367, 1998.

ARAÚJO, J.M. Genética e Melhoramento de *Streptomyces*. In: MELO, I. S.; VALADARES, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente. v.1, p. 224-244, 2002.

ATIKA, M.; NASSERDINE, S.; NOUREDDINE, B.; ABDELGHANI, Z.; CATHRIN, S.; HANS-PETER, K.; FLORENCE, M.; AHMED, L. A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. **Annals of Microbiol.** 2011.

BACHIEGA, G.L.; VILEGAS, W.; UJIKAWA, K. Antibiótico antifungico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 1, p. 29-37, 2005.

BALTZ, R.H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 557-563, 2008.

BELLAO, C. **Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada**. São Carlos: USC. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade de São Carlos, São Carlos, 2010.

BENTLEY, S.D.; CHATER, K.F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; CHALLIS, G.L.; THOMSON, N.R.; JAMES, K.D.; HARRIS, D.E.; QUAIL, M.A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, 2002.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**. v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, p.71-94, 2008.

BONFIM, S.M. **Isolamento de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3347, endófito de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae)**. Recife: UFP. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BRANDI, L.; LAZZARINI, A.; CAVALETTI, L.; ABBONDI, M.; CORTI, E.; CICILIATO, I.; GASTALDO, L.; MARAZZI, A.; FEROGGIO, M.; FABBRETTI, A.; MAIO, A.; COLOMBO, L.; DONADIO, S.; MARINELLI, F.; LOSI, D.; GUALERZI, C.O.; SELVA, E. Novel tetrapeptide inhibitors of bacterial protein synthesis produced by a *Streptomyces* sp. **Biochemistry**, v. 45, p. 3692-3702, 2006.

CHARAN, R.D.; SCHLINGMANN, G.; BERNAN, V.S.; FENG, X.; CARTER, G.T. Additional pyrrolomycins from cultures of *Streptomyces fumanus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 277-279, 2005.

CHATER, K.F.; BIRÓ, S.; LEE, K.J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 34, n. 2, p.171-98, 2010.

CHATER, K.F.; CHANDRA, G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. **Federation of European Microbiological Societies**, v.30, n. 5, p.651-72, 2006.

CONDE-ESTÉVEZ, D.; SORLI, L.; J. MORALES-MOLINA, J.A.; KNOBEL, H.; TERRADAS, R.; JAVIER, M.A.; HORCAJADA, J.P.; GRAU, S. Differentiating clinical characteristics in bacteriemia caused by *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 7, p. 37-43, 2009.

COSTELLOE, C.; METCALFE, C.; LOVERING, A.; MANT, D.; HAY, A.D. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal**, p. 1-11, 2010.

DUARTE, M.W.; DAMASCENO, R.G.; SALAMONI, S.P.; OLIVEIRA, M.F.; SAND, S.T.V. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. Porto Alegre: UFRGS. TCC (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

FISCHBACH, M. A.; WALSH, C.T. Antibiotics for Emerging Pathogens. **Science**. v. 325, n. 5944, p. 1089-1093, 2009.

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

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological research**, v. 160, n. 3, p. 243-248, 2005.

GRAZIANI, E.I; RITACCO, F.V.; BERNAN, V.S.; TELLIEZ, J.B. Phaeochromycins a-e, anti-inflammatory polyketides isolated from the soil actinomycete *Streptomyces phaeochromogenes* LL-P018. **Journal of Natural Products**, v. 68, p.1262-1265, 2005.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, I.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 1-13, 2010.

HAN, B.; CUI, C.B.; CAI, B.; JI, X.F.; YAO, X.S. Actinolactomycin, a new 2-oxonanonoidal antitumor antibiotic produced by *Streptomyces flavoretus* 18522, and its inhibitory effect on the proliferation of human cancer cells. **Chinese Chemical Letters**, v.16, p. 471-474, 2005.

HASSAN, M.A.; EL-NAGGAR, Y.; SAID, W.; Physiological factors affecting the production of a antimicrobial substance by *Streptomyces violates* in bath cultures. **Egyptian Journal of Biology**. v. 3, p. 1-10, 2001.

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

HE, H.; SHEN, B.; CARTER, G.T. Structural elucidation of lemomycin, a potent antibiotic from *Streptomyces candidus*. **Tetrahedron Letters**, v. 41, p. 2067-2071, 2000.

HECK, M.G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente), Universidade Federal do RS, Porto Alegre, 2007.

HOHMANN, C.; SCHNEIDER, K.; BRUNTNER, C.; IRRAN, E.; NICHOLSON, G.; BULL, A.T.; JONES, A.L.; BROWN, R.; STACH, J.E.M.; GOODFELLOW, M.; BEIL, W.; KRAMER, M.; IMHOFF, J.F.; SUSSMUTH, R.D.; FIEDLER, H.P. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp NTK 937. **Journal of antibiotics**, v. 62, n. 2, p. 99-104, 2009.

HONG, G.; MEI, L.; JINTAO, L.; HUANQIN, D.; XIANLONG, Z.; XIANGYANG, L.; YING, Z.; WENQUAN, Z.; LIXIN, Z. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 4012-4016, 2009.

HOPWOOD, D.A.; MALPARTIDA, F.; KIESER, H.M.; IKEDA, H., DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B. A. M.; FLOSS, H. G.; OMURA, S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v. 314, p. 642-644, 1985.

HOSOTANI, N.; KUMAGAI, K.; NAKAGAWA, H.; SHIMATANI, T.; SAJI, I. Antimycins A(10) similar to A(16), seven new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* spp. SPA-10191 and SPA-8893. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 460-467, 2005.

IGARASHI, Y.; OOTSU, K.; ONAKA, H.; FUJITA, T.; UEHARA, Y.; FURUMAI, T. Anicemycin, a new inhibitor of anchorage-independent growth of tumor cells from *Streptomyces* sp TP-A0648. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 322-326, 2005.

INOUE, O.O. **Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de Retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB 20**. São Paulo: EPSP. Tese (Doutorado em Engenharia). Escola Politécnica de São Paulo, São Paulo, 2006.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; KRAMYU, J.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Potent in vitro antimalarial activity of metacycloprodigosin

isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1112–1113, 2002.

ITOH, T.; KINOSHITA, M.; AOKI, S.; KOBAYASHI, M. Komodoquinone a, a novel neuritogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. ks3. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1373-1377, 2003.

JICHENG, Y.; QIU, L.; QIAO, L.; XIANGDONG, L.; QIANG, S.; JIANFANG, Y.; XIAOHUI, Q.; SHENGDI, F. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 2087-2091, 2008.

KAYALI, H.A.; TARHAN, L.; SAZAK, A.; ŞAHIN, N. Carbohydrate Metabolite Pathways and Antibiotic Production Variations of a Novel *Streptomyces* sp. M3004 Depending on the Concentrations of Carbon Sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 369-381, 2011.

KERN, W.Y. Daptomycin: first in a new class of antibiotic for complicated skin and soft-tissue infections. **International Journal of Clinical Pract.** v. 60, n. 93, p. 370-378, 2006.

KHAN, S.T. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. **Environmental Microbiology Blackwell Science Publishers**, v. 13, n. 2, p. 391-403, 2011.

KUMAR, Y.; GOODFELLOW, M. Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 1369–1378, 2008.

KUMAR, Y.; GOODFELLOW, M. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 769-775, 2010.

KUROSAWA, K.; BUI, V. P.; VANESSENDELFT, J. L.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; GHIVIRIGA, I.; SAMBANDAN, T. G.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X₂-producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 145-154, 2006.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, p. 928-929, 1964.

LEE, J.Y.; LEE, J.Y.; MOON, S.S.; HWANG, B.K. Isolation and antifungal activity of 4-phenyl-3-butenoic acid from *Streptomyces koyangensis* strain VK-A60. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7696-7700, 2005.

LEWER, P.; CHAPIN, E.L.; GRAUPNER, P.R.; GILBERT, J.R.; PEACOCK, C. Tartrolone C: A novel insecticidal macrodiolide produced by *Streptomyces* sp.CP1130. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 143-145, 2003.

LI, F.; MASKEY, R.P.; QIN, S.; SATTLER, I.; FIEBIG, H.H.; MAIER, A.; ZEECK, A.; LAATSCH, H. Chinikomycins a and b: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 349-353, 2005.

LIMA, C. S. A.; SILVA, R.F.; ABREU, S.M.B.; SENA, K.X.F.R.; NASCIMENTO, S.C.; AMORIM, E.L.C. Atividade antimicrobiana e antitumoral de *Streptoverticillium* sp (DAUFPE 13.729). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 161-165, 2002.

LOBATO, AKCL. **Análise de fluxos metabólitos para otimização da síntese do antibiótico cosmomicina por *Streptomyces olindensis* ICB 20**. Natal: UFRGN. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

LOPES, H.V. Tigeciclina: nova arma antibacteriana. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v.8, n. 1, p.45-46, 2006.

MANSOUR, S.R. The occurrence and distribution of soil actinomycetes in saint Catherine area, south Sinai, Egypt. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 7, p. 721-728, 2003.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. Piracicaba: USP. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.

MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)**. Campinas: UEC. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MIZUI, Y.; SAKAI, T.; IWATA, M.; UENAKA, T.; OKAMOTO, K.; SHIMIZU, H.; YAMORI, T.; YOSHIMATSU, K.; ASADA, M. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107 III. In vitro and In vivo antitumor activities **Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 188-196, 2004.

MURRELL, J.M.; LIU, W.; SHEN, B. Biochemical characterization of the *sgca1* r-d-glucopyranosyl-1-phosphate thymidyltransferase from the enediyne antitumor antibiotic c-1027 biosynthetic pathway and overexpression of *sgca1* in *Streptomyces globisporus* to improve c-1027 production **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 206-213, 2004.

NACHTIGALL, J.; SCHULZ, D.; BEIL, W.; SUSSMUTH, R.D.; FIEDLER, H.P. Aranciamycin anhydride, a new anthracycline-type antibiotic isolated from *Streptomyces* sp Tu 6384. **Journal of antibiotics**, v. 63, p. 397-399, 2010

NDEJOUONG, B.L.T.; SATTLER, I.; MAIER, A.; KELTER, G.; MENZEL, K.D.; FIEBIG, H.H.; and HERTWECK, C. Hygrobaafilomycin, a macrolídeo citotóxica and antifúngica tends a portion of anhydride only monoalkylmaleic, of varsoviensis *Streptomyces*. **Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 359-363, 2010.

NEVES, A.A.; VIEIRA, L.M.; MENEZES, J.C. Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 628-633, 2001.

OHNISHI, Y.; ISHIKAWA, J.; HARA, H.; SUZUKI, H.; IKENOYA, M.; IKEDA, H.; YAMASHITA, A.; HATTORI, M.; HORINOUCI, S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal Bacteriology**, v.190. n. 11, p. 4050-4060, 2008.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processos de compostagem**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (mestrado em microbiologia agrícola e do meio ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

OLIVEIRA, P.M.S. **Seleção de *Streptomyces spp.* produtores de inibidores de β -lactamases**. Recife: UFP. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

OMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98. n. 21, p. 12215-20, 2001.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M.T.; GOMES, J.E.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J.E. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Journal Microbial Ecology**, v. 58, n. 1, p. 23-35, 2009.

PADILHA, G. Manipulação Genética e Molecular de Actinomicetos Produtores de Antibióticos. In: MELO, I.S.; VALADARES, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A. C.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, v. 1, p. 246-261, 2002.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Produção do antitumoral Retamicina por *Streptomyces olidensis* em processos descontínuos alimentado e contínuo**. São Paulo: USP. Tese (Doutorado em engenharia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PARK, H.J.; LEE, J.Y.; HWANG, I.S.; YUN, B.S.; KIM, B.S.; HWANG, B.K. Isolation and antifungal and antioomycete activities of staurosporine from *Streptomyces roseoflavus* strain LS-A24. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3041-3046, 2006.

PATZER, S. I.; VOLKMAR, B. Gene Cluster Involved in the Biosynthesis of Griseobactin, a Catechol-Peptide Siderophore of *Streptomyces sp.* ATCC 700974. **Journal of Bacteriology**, v. 192 n. 2, p. 426-35, 2010.

PEARSON, H. Antibiotic faces uncertain future. **Nature**, v. 441, p. 260-261, 2006.

PELAEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 981–990, 2006.

PETTIT, G.R.; DU, J., PETTIT, R.K.; RICHERT, L.A.; HOGAN, F.; MUKKU, V.J.R.V., HOARD, M.S. Antineoplastic agents. 554. The manitoba bacterium *Streptomyces* sp. **Cancer Research Institute and Department of Chemistry and Biochemistry**, Arizona State University, 2006.

PIRET, J. M., DEMAÏN, A. L. An Overview, In: GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T., MORDARSKI, M. (eds.) **Actinomycetes in Biotechnology**. London: Academic Press, p. 461-482, 1988.

QIAN-CUTRONE, J.; KOLB, J.M.; MCBRIEN, K.; HUANG, S.; GUSTAVSON, D.; LOWE, S.E., MANLY, S.P. Quanolirones I and II, two new human cytomegalovirus protease inhibitors produced by *Streptomyces* sp. WC76535. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1379-1382, 1998.

REMSING, L.L.; GONZALEZ, A.M.; NUR-E-ALAM, M.; FERNANDEZ-LOZANO, M.J.; BRANA A.F.; RIX, U.; OLIVEIRA, M.A.; MENDEZ, C.; SALAS, J.A.; ROHR, J.; MITHRAMYCIN, S.K. A novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and Demycarosyl-mithramycin SK: Three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p.5745-5753, 2003.

RENNER, M.K.; SHEN, Y.C.; CHENG, X.C.; JENSEN, P.R.; FRANKMOELLE, W.; KAUFFMAN, C.A.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cyclomarins A-C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 11273-11276, 1999.

ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K; TYLE, V. E. **Farmacognosia e Biotecnologia**. Editorial Premier, São Paulo, 1997.

SALAMONI, S.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas**. Porto Alegre: UFRGS. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SÁNCHEZ, S.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; ÁVALOS, M.; GUZMÁN-TRAMPE, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; LANGLEY, E.; RUIZ, B. Carbon source regulation of antibiotic production. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 442-459, 2010.

SHENG, Q.; JIE, L.; HUA-HONG, C.; GUO-ZHEN, Z.; WEN-YONG, Z.; CHENG-LIN, J.; LI-HUA, X.; WEN-JUN, L. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 19, p. 6176-6186, 2009.

SHENIN, Y.D.; NOVIKOVA, I.I.; SUIKA UARKAJA, P.V. Isolation and characterization of antibiotics produced by *Streptomyces chrysomallus* R-21 and *S. globisporus* L-242 strains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 854-864, 2010.

SHIN-YA, K, et al. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus* **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 1262-1263, 2001.

SILVA, I.R.; MARCON, J.; PROCÓPIO, R.E.L.; AZEVEDO, J.L. ; MARTINS, M. K. **Diversidade de Actinomicetos da Região Amazônica Produtores de Compostos Bioativos**. In: 2º CONGRESSO SOBRE DIVERSIDADE MICROBIANA NA AMAZÔNIA. Manaus, 2008.

SMITH, S.A.; TANK, D.C.; BOULANGER, L.A.; BASCOM-SLACK, C.A., EISENMAN, K.; et al. Bioactive Endophytes Warrant Intensified Exploration and Conservation. **Plos One**, v.3, p. 30-52, 2008.

SONG, J.; CHAN LEE, S.; KANG, J.W.; JIN BAEK, H.; SUH, J.W. Phylogenetic analysis of *Streptomyces spp.* Isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S -23S rDNA internally transcribed spacer sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Berks, United Kingdom, v. 54, p. 203-209, 2004.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI, F.S.; Pinheiro, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, J.V.B.; MORIYA, R.Y.; SOUZA, E.S. Bioprospecção de substâncias anti-fúngicas produzidas por actinomycetes Isolados da Região Amazônica. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, 94-102, 2009.

STROBEL, G.A.; EZRA, D.; CASTILHO,U. A question concerning the identity of *Streptomyces sp.* MSU-2110. **Microbiology**, v.150, p. 3094-3096, 2004.

TAKESUE, Y.; NAKAJIMA, K.; ICHIKI, K.; ISHIHARA, M.; WADA, Y.; TAKAHASHI, Y.; TSUCHIDA, T.; IKEUCHI, H. Impact of a hospital-wide programme of heterogeneous antibiotic use on the development of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 1, p. 28-32, 2010.

TANG, G.-LI; CHENG, Y. Q.; SHEN, B. Polyketide chain skipping mechanism in the biosynthesis of the hybrid nonribosomal peptide-polyketide antitumor antibiotic leinamycin in *Streptomyces atrooli*Waceus S-140. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 387-393, 2006.

TETZLAFF, C.N.; YOU, Z.; CANE, D.E.; TAKAMATSU, S.; OMURA, S.; IKEDA, H. A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic entalenolactonein *Streptomyces avermitilis*. **Biochemistry**, v. 45, p. 6179-6186, 2006.

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

VIANA, D.A.; CARNEIRO-CUNHA, M.N.; ARAÚJO, J.M.; BARROS-NETO, B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PESSOA-JÚNIOR, A.; PORTO, A. L. F. Screening of variables influencing the clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1797-1807, 2010.

VINING, L.C. Secondary metabolism; In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**. VCH, v. 4, p. 19-38, 1986.

WAKSMAN, S.A.; REILLY, H.C. **Microbial antagonisms and antibiotic substances**. Editians Comman on Wealt Fundation, Inengthem Canclyt. Ed., New York, 1945.

WANG, J.; SOISSON, S.M.; YOUNG, K.; SHOOP, W.; KODALI, S.; GALGOCI, A.; PAINTER, R.; PARTHASARATHY, G.; TANG, Y.S.; CUMMINGS, R.; HA, S.; DORSO, K.; MOTYL, M.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J.; HERATH, K.; ZHANG, C.; HERNANDEZ, L.; ALLOCCO, J.; BASILIO, A.; TORMO, J.R.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; COLWELL, L. LEE, S.H.; MICHAEL, B.; FELCETTO, T.; GILL, C.; SILVER, L.L.; HERMES, J.D.; BARTIZAL, K.; BARRETT, J.; SCHMATZ, D.; BECKER, J.W.; CULLY, D.; SINGH, S.B. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, v. 441, p. 358-361, 2006.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; JOG, M.M. BHOLE, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**. v.176, n. 5, p.386-390, 2001.

WILLIAMS, S. T., LANNING, S., WELLINGTON, M. H. Ecology of actinomycetes. In: **The biology of the actinomycetes**. GOODFELLOW, M., MORDARSKI, M., WILLIAMS, S.T. Academic Press, London, p. 481-527, 1984.

ZHU, L.; OSTASH, B.; RIX, U.; NUR-E-ALAM, M.; ALMUTH, M.; LUZHETSKYY, A.; MENDEZ, C.; SALAS, J.A.; BECHTHOLD, A.; FEDORENKO, V.; ROHR, J. Identification of the function of gene *IndM2* encoding a bifunctional oxygenase-reductase involved in the biosynthesis of the antitumor antibiotic landomycin e by *Streptomyces globisporus* 1912 supports the originally assigned structure for landomycinone. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 631-638, 2005.

APÊNDICE A – Meios de Cultura e Soluções

1 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

1.1 Meio Amido Caseína

Amido	10,0g
Caseína	0,3g
KNO ₃	2,0g
NaCl	2,0g
K ₂ HPO ₄	2,0g
KH ₂ PO ₄	1,0g
CaCO ₃	0,1g
MgSO ₄	0,1g
FeSO ₄	0,01g
ZnSO ₄	0,01g
Ágar	15g
H ₂ O destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 6,5.

1.2 Meio Amido-Caseína-Líquido

Preparado segundo o item 1.1 sem ser adicionado ágar.

1.3 Meio Luria Bertani (LB)

Triptona	10,0 g
Extrato de Levedura	5,0 g
NaCl	10,0 g

Água destilada qsp.	1000 mL
pH	7.0

1.4 Meio Ágar Müller Hinton

Infusão de bife	300,0 g
Caseína hidrolisada	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar	17 g
Água destilada qsp.	1000 mL
pH	7.3

1.5 Tampão de corrida TAE 50 x

Trizma-Base	242,0g
Ácido Acético Glacial	57,1mL
EDTA 0,5M pH 8,0	100mL
H ₂ O destilada	1000mL

A solução foi autoclavada e mantida à temperatura ambiente. No momento do uso foram feitas as diluições apropriadas.

1.6 Solução Clorofil

Misturou-se clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

1.7 Solução Clorofane

Misturou-se um volume de fenol com um volume de Clorofil.

1.8 Solução de brometo de etídio (Sambrook *et al.* 1989)

Brometo de etídio	0,01g
-------------------	-------

H ₂ O destilada	10mL
----------------------------	------

A solução foi agitada por várias horas e estocada a temperatura ambiente. No momento do uso, 5 μ L desta solução foram adicionados a 100mL de TAE 1x.

1.9 Solução estoque Tris-HCl 1M pH 8,0

Trizma-Base	121,0g
H ₂ O destilada	1000mL

O pH foi ajustado para 8,0 com HCl concentrado. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

1.10 Solução EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA	37,22g
H ₂ O destilada	100mL

O pH foi ajustado para 8,0 com pastilhas de NaOH. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

1.11 NaCl 5M

NaCl	29,16g
H ₂ O destilada	100mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

1.12 Tampão TE

Tris-HCl 1M pH 8,0	1mL
EDTA 0,5M pH 8,0	0,2mL

O volume foi completado para 100mL com H₂O destilada. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

1.13 SDS 10%

SDS	10,0g
H ₂ O destilada	100mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

1.14 Tampão de amostra (6x)

Azul de bromofenol	0,25g
Glicose	15,0g
H ₂ O destilada	100mL

A solução foi aliquotada e mantida a 4°C.

1.15 *Primers* da região 16S do rDNA

Foram utilizados os *primers* primer 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e do primer 1378r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG- 3') homólogas às extremidades conservadas do gene 16S rRNA de bactérias.

1.16 d'NTPs

Cada um dos nucleotídeos vem em uma concentração de 100mM. Para uso, misturou-se partes iguais de modo a obter uma concentração final de 2,5mM de cada d'NTP. A solução foi mantida a -20°C.

APÊNDICE B – Análise Estatística – Método de Superfície de Resposta

EXPERIMENTO ISOLADO Nº 1 – VARIÁVEIS FÍSICAS

Response Surface Regression: cm versus Agitação; Temper; pH; Tempo

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for cm

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3,60000	0,13008	27,675	0,000
Agitação	-0,02917	0,04599	-0,634	0,538
Temper	-0,00417	0,04599	-0,091	0,929
pH	-0,01250	0,04599	-0,272	0,790
Tempo	0,23750	0,04599	5,164	0,000
Agitação*Agitação	-0,00938	0,04878	-0,192	0,851
Temper*Temper	-0,02188	0,04878	-0,448	0,662
pH*pH	-0,00938	0,04878	-0,192	0,851
Tempo*Tempo	-0,17187	0,04878	-3,523	0,004
Agitação*Temper	0,01875	0,05633	0,333	0,745
Agitação*pH	-0,00625	0,05633	-0,111	0,913
Agitação*Tempo	0,00625	0,05633	0,111	0,913
Temper*pH	0,06875	0,05633	1,221	0,246
Temper*Tempo	-0,06875	0,05633	-1,221	0,246
pH*Tempo	0,03125	0,05633	0,555	0,589

S = 0,225308 PRESS = 3,5088
R-Sq = 78,90% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 54,28%

Analysis of Variance for cm

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	2,27750	2,27750	0,16268	3,20	0,025
Linear	4	1,37833	1,37833	0,34458	6,79	0,004
Agitação	1	0,02042	0,02042	0,02042	0,40	0,538
Temper	1	0,00042	0,00042	0,00042	0,01	0,929
pH	1	0,00375	0,00375	0,00375	0,07	0,790
Tempo	1	1,35375	1,35375	1,35375	26,67	0,000
Square	4	0,72542	0,72542	0,18135	3,57	0,039
Agitação*Agitação	1	0,02604	0,00188	0,00188	0,04	0,851
Temper*Temper	1	0,01406	0,01021	0,01021	0,20	0,662
pH*pH	1	0,05510	0,00188	0,00188	0,04	0,851
Tempo*Tempo	1	0,63021	0,63021	0,63021	12,41	0,004
Interaction	6	0,17375	0,17375	0,02896	0,57	0,747
Agitação*Temper	1	0,00562	0,00563	0,00563	0,11	0,745
Agitação*pH	1	0,00062	0,00062	0,00062	0,01	0,913
Agitação*Tempo	1	0,00062	0,00062	0,00062	0,01	0,913
Temper*pH	1	0,07562	0,07562	0,07562	1,49	0,246
Temper*Tempo	1	0,07563	0,07563	0,07563	1,49	0,246
pH*Tempo	1	0,01562	0,01562	0,01562	0,31	0,589
Residual Error	12	0,60917	0,60917	0,05076		
Lack-of-Fit	10	0,60917	0,60917	0,06092	*	*
Pure Error	2	0,00000	0,00000	0,00000		
Total	26	2,88667				

Unusual Observations for cm

Obs	StdOrder	cm	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	7	3,600	3,262	0,172	0,338	2,32 R

8 24 3,700 3,388 0,172 0,312 2,15 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for cm using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	3,92682
Agitação	-7,70833E-04
Temper	-0,0252083
pH	-0,340625
Tempo	0,221875
Agitação*Agitação	-3,75000E-06
Temper*Temper	-8,75000E-04
pH*pH	-0,00937500
Tempo*Tempo	-0,00687500
Agitação*Temper	7,50000E-05
Agitação*pH	-1,25000E-04
Agitação*Tempo	2,50000E-05
Temper*pH	0,0137500
Temper*Tempo	-0,00275000
pH*Tempo	0,00625000

EXPERIMENTO ISOLADO Nº 325 – VARIÁVEIS FÍSICAS

Response Surface Regression: actino 2 versus Agitação; Temper; pH; Tempo

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for actino 2

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2,73333	0,4457	6,132	0,000
Agitação	0,11667	0,1576	0,740	0,473
Temper	0,35833	0,1576	2,274	0,042
pH	0,05833	0,1576	0,370	0,718
Tempo	0,22500	0,1576	1,428	0,179
Agitação*Agitação	0,00625	0,1672	0,037	0,971
Temper*Temper	-0,43125	0,1672	-2,580	0,024
pH*pH	-0,13125	0,1672	-0,785	0,448
Tempo*Tempo	-0,36875	0,1672	-2,206	0,048
Agitação*Temper	0,08750	0,1930	0,453	0,658
Agitação*pH	-0,03750	0,1930	-0,194	0,849
Agitação*Tempo	0,35000	0,1930	1,813	0,095
Temper*pH	-0,18750	0,1930	-0,971	0,350
Temper*Tempo	-0,07500	0,1930	-0,389	0,704
pH*Tempo	-0,10000	0,1930	-0,518	0,614

S = 0,772037 PRESS = 41,1048

R-Sq = 66,05% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 26,44%

Analysis of Variance for actino 2

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	13,9142	13,9142	0,99387	1,67	0,190
Linear	4	4,7050	4,7050	1,17625	1,97	0,163
Agitação	1	0,3267	0,3267	0,32667	0,55	0,473
Temper	1	3,0817	3,0817	3,08167	5,17	0,042
pH	1	0,0817	0,0817	0,08167	0,14	0,718
Tempo	1	1,2150	1,2150	1,21500	2,04	0,179
Square	4	6,2917	6,2917	1,57292	2,64	0,086

Agitação*Agitação	1	0,9882	0,0008	0,00083	0,00	0,971
Temper*Temper	1	2,4010	3,9675	3,96750	6,66	0,024
pH*pH	1	0,0017	0,3675	0,36750	0,62	0,448
Tempo*Tempo	1	2,9008	2,9008	2,90083	4,87	0,048
Interaction	6	2,9175	2,9175	0,48625	0,82	0,578
Agitação*Temper	1	0,1225	0,1225	0,12250	0,21	0,658
Agitação*pH	1	0,0225	0,0225	0,02250	0,04	0,849
Agitação*Tempo	1	1,9600	1,9600	1,96000	3,29	0,095
Temper*pH	1	0,5625	0,5625	0,56250	0,94	0,350
Temper*Tempo	1	0,0900	0,0900	0,09000	0,15	0,704
pH*Tempo	1	0,1600	0,1600	0,16000	0,27	0,614
Residual Error	12	7,1525	7,1525	0,59604		
Lack-of-Fit	10	7,1258	7,1258	0,71258	53,44	0,019
Pure Error	2	0,0267	0,0267	0,01333		
Total	26	21,0667				

Unusual Observations for actino 2

Obs	StdOrder	actino 2	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
6	9	0,000	1,188	0,590	-1,188	-2,38 R
21	1	2,100	1,087	0,590	1,013	2,03 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for actino 2 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-28,7453
Agitação	-0,0182917
Temper	1,31042
pH	3,23958
Tempo	0,280000
Agitação*Agitação	2,50000E-06
Temper*Temper	-0,0172500
pH*pH	-0,131250
Tempo*Tempo	-0,0147500
Agitação*Temper	0,000350000
Agitação*pH	-7,50000E-04
Agitação*Tempo	0,00140000
Temper*pH	-0,0375000
Temper*Tempo	-0,00300000
pH*Tempo	-0,0200000

EXPERIMENTO ISOLADO 355 – VARIÁVEIS FÍSICAS

Response Surface Regression: actino 3 versus Agitação; Temper; pH; Tempo

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for actino 3

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,866667	0,26501	3,270	0,007
Agitação	-0,083333	0,09370	-0,889	0,391
Temper	-0,133333	0,09370	-1,423	0,180
pH	0,283333	0,09370	3,024	0,011
Tempo	0,233333	0,09370	2,490	0,028
Agitação*Agitação	0,097917	0,09938	0,985	0,344
Temper*Temper	-0,127083	0,09938	-1,279	0,225
pH*pH	-0,089583	0,09938	-0,901	0,385
Tempo*Tempo	-0,102083	0,09938	-1,027	0,325
Agitação*Temper	0,100000	0,11475	0,871	0,401
Agitação*pH	-0,037500	0,11475	-0,327	0,749

Agitação*Tempo	-0,000000	0,11475	-0,000	1,000
Temper*pH	-0,037500	0,11475	-0,327	0,749
Temper*Tempo	0,050000	0,11475	0,436	0,671
pH*Tempo	-0,112500	0,11475	-0,980	0,346

S = 0,459015 PRESS = 14,5398
R-Sq = 68,22% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 31,15%

Analysis of Variance for actino 3

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	5,42796	5,42796	0,38771	1,84	0,148
Linear	4	3,82667	3,82667	0,95667	4,54	0,018
Agitação	1	0,16667	0,16667	0,16667	0,79	0,391
Temper	1	0,42667	0,42667	0,42667	2,03	0,180
pH	1	1,92667	1,92667	1,92667	9,14	0,011
Tempo	1	1,30667	1,30667	1,30667	6,20	0,028
Square	4	1,15380	1,15380	0,28845	1,37	0,302
Agitação*Agitação	1	0,69696	0,20454	0,20454	0,97	0,344
Temper*Temper	1	0,16044	0,34454	0,34454	1,64	0,225
pH*pH	1	0,07407	0,17120	0,17120	0,81	0,385
Tempo*Tempo	1	0,22231	0,22231	0,22231	1,06	0,325
Interaction	6	0,44750	0,44750	0,07458	0,35	0,894
Agitação*Temper	1	0,16000	0,16000	0,16000	0,76	0,401
Agitação*pH	1	0,02250	0,02250	0,02250	0,11	0,749
Agitação*Tempo	1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00	1,000
Temper*pH	1	0,02250	0,02250	0,02250	0,11	0,749
Temper*Tempo	1	0,04000	0,04000	0,04000	0,19	0,671
pH*Tempo	1	0,20250	0,20250	0,20250	0,96	0,346
Residual Error	12	2,52833	2,52833	0,21069		
Lack-of-Fit	10	2,52167	2,52167	0,25217	75,65	0,013
Pure Error	2	0,00667	0,00667	0,00333		
Total	26	7,95630				

Unusual Observations for actino 3

Obs	StdOrder	actino 3	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	11	0,000	0,608	0,351	-0,608	-2,05 R
6	9	1,700	0,900	0,351	0,800	2,70 R
12	10	0,000	0,608	0,351	-0,608	-2,05 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for actino 3 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-8,40990
Agitação	-0,0244583
Temper	0,227083
pH	2,04792
Tempo	0,214583
Agitação*Agitação	3,91667E-05
Temper*Temper	-0,00508333
pH*pH	-0,0895833
Tempo*Tempo	-0,00408333
Agitação*Temper	0,000400000
Agitação*pH	-7,50000E-04
Agitação*Tempo	-2,32564E-19
Temper*pH	-0,00750000
Temper*Tempo	0,00200000
pH*Tempo	-0,0225000

EXPERIMENTO ISOLADO N° 1 – VARIÁVEIS QUÍMICAS: AMIDO
Response Surface Regression: Amido 1 versus Carbono; Nitro org; ...

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Amido 1

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	3,33333	0,05046	66,058	0,000
Carbono	0,03333	0,01784	1,868	0,086
Nitro org	-0,01667	0,01784	-0,934	0,369
Nitro inorg	0,02500	0,01784	1,401	0,186
Peptona	-0,00833	0,01784	-0,467	0,649
Carbono*Carbono	0,01667	0,01892	0,881	0,396
Nitro org*Nitro org	0,00417	0,01892	0,220	0,829
Nitro inorg*Nitro inorg	0,00417	0,01892	0,220	0,829
Peptona*Peptona	0,00417	0,01892	0,220	0,829
Carbono*Nitro org	-0,02500	0,02185	-1,144	0,275
Carbono*Nitro inorg	0,01250	0,02185	0,572	0,578
Carbono*Peptona	-0,01250	0,02185	-0,572	0,578
Nitro org*Nitro inorg	0,00000	0,02185	0,000	1,000
Nitro org*Peptona	-0,00000	0,02185	-0,000	1,000
Nitro inorg*Peptona	-0,03750	0,02185	-1,716	0,112

S = 0,0874007 PRESS = 0,4344
R-Sq = 50,50% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 0,00%

Analysis of Variance for Amido 1

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	0,093519	0,093519	0,006680	0,87	0,599
Linear	4	0,050000	0,050000	0,012500	1,64	0,229
Carbono	1	0,026667	0,026667	0,026667	3,49	0,086
Nitro org	1	0,006667	0,006667	0,006667	0,87	0,369
Nitro inorg	1	0,015000	0,015000	0,015000	1,96	0,186
Peptona	1	0,001667	0,001667	0,001667	0,22	0,649
Square	4	0,006019	0,006019	0,001505	0,20	0,935
Carbono*Carbono	1	0,005352	0,005926	0,005926	0,78	0,396
Nitro org*Nitro org	1	0,000111	0,000370	0,000370	0,05	0,829
Nitro inorg*Nitro inorg	1	0,000185	0,000370	0,000370	0,05	0,829
Peptona*Peptona	1	0,000370	0,000370	0,000370	0,05	0,829
Interaction	6	0,037500	0,037500	0,006250	0,82	0,576
Carbono*Nitro org	1	0,010000	0,010000	0,010000	1,31	0,275
Carbono*Nitro inorg	1	0,002500	0,002500	0,002500	0,33	0,578
Carbono*Peptona	1	0,002500	0,002500	0,002500	0,33	0,578
Nitro org*Nitro inorg	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	1,000
Nitro org*Peptona	1	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	1,000
Nitro inorg*Peptona	1	0,022500	0,022500	0,022500	2,95	0,112
Residual Error	12	0,091667	0,091667	0,007639		
Lack-of-Fit	10	0,065000	0,065000	0,006500	0,49	0,821
Pure Error	2	0,026667	0,026667	0,013333		
Total	26	0,185185				

Estimated Regression Coefficients for Amido 1 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	2,66667
Carbono	4,51028E-17
Nitro org	0,200000
Nitro inorg	0,366667
Peptona	0,633333

Carbono*Carbono	0,00266667
Nitro org*Nitro org	0,0666667
Nitro inorg*Nitro inorg	0,0666667
Peptona*Peptona	0,0666667
Carbono*Nitro org	-0,0400000
Carbono*Nitro inorg	0,0200000
Carbono*Peptona	-0,0200000
Nitro org*Nitro inorg	1,24326E-16
Nitro org*Peptona	-3,56243E-16
Nitro inorg*Peptona	-0,600000

EXPERIMENTO ISOLADO N° 1 – VARIÁVEIS QUÍMICAS: GLICEROL Response Surface Regression: Glicerol 1 versus Carbono; Nitro org; ...

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Glicerol 1

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	2,33333	0,07743	30,135	0,000
Carbono	0,05417	0,02738	1,979	0,071
Nitro org	-0,02917	0,02738	-1,065	0,308
Nitro inorg	0,12083	0,02738	4,414	0,001
Peptona	0,00417	0,02738	0,152	0,882
Carbono*Carbono	0,11146	0,02904	3,839	0,002
Nitro org*Nitro org	0,01146	0,02904	0,395	0,700
Nitro inorg*Nitro inorg	0,06146	0,02904	2,117	0,056
Peptona*Peptona	-0,01354	0,02904	-0,466	0,649
Carbono*Nitro org	0,01875	0,03353	0,559	0,586
Carbono*Nitro inorg	-0,00625	0,03353	-0,186	0,855
Carbono*Peptona	0,01875	0,03353	0,559	0,586
Nitro org*Nitro inorg	-0,03125	0,03353	-0,932	0,370
Nitro org*Peptona	0,01875	0,03353	0,559	0,586
Nitro inorg*Peptona	-0,05625	0,03353	-1,678	0,119

S = 0,134112 PRESS = 1,1496
R-Sq = 80,63% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 58,02%

Analysis of Variance for Glicerol 1

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	0,89824	0,898241	0,064160	3,57	0,017
Linear	4	0,44167	0,441667	0,110417	6,14	0,006
Carbono	1	0,07042	0,070417	0,070417	3,92	0,071
Nitro org	1	0,02042	0,020417	0,020417	1,14	0,308
Nitro inorg	1	0,35042	0,350417	0,350417	19,48	0,001
Peptona	1	0,00042	0,000417	0,000417	0,02	0,882
Square	4	0,37282	0,372824	0,093206	5,18	0,012
Carbono*Carbono	1	0,26445	0,265023	0,265023	14,73	0,002
Nitro org*Nitro org	1	0,00001	0,002801	0,002801	0,16	0,700
Nitro inorg*Nitro inorg	1	0,10446	0,080579	0,080579	4,48	0,056
Peptona*Peptona	1	0,00391	0,003912	0,003912	0,22	0,649
Interaction	6	0,08375	0,083750	0,013958	0,78	0,604
Carbono*Nitro org	1	0,00563	0,005625	0,005625	0,31	0,586
Carbono*Nitro inorg	1	0,00062	0,000625	0,000625	0,03	0,855
Carbono*Peptona	1	0,00563	0,005625	0,005625	0,31	0,586
Nitro org*Nitro inorg	1	0,01563	0,015625	0,015625	0,87	0,370
Nitro org*Peptona	1	0,00562	0,005625	0,005625	0,31	0,586
Nitro inorg*Peptona	1	0,05063	0,050625	0,050625	2,81	0,119
Residual Error	12	0,21583	0,215833	0,017986		
Lack-of-Fit	10	0,18917	0,189167	0,018917	1,42	0,483
Pure Error	2	0,02667	0,026667	0,013333		
Total	26	1,11407				

Unusual Observations for Glicerol 1

Obs	StdOrder	Glicerol 1	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
6	18	2,700	2,887	0,102	-0,187	-2,17 R
15	17	2,900	2,671	0,102	0,229	2,65 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for Glicerol 1 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	3,86667
Carbono	-0,385000
Nitro org	-0,583333
Nitro inorg	0,0166667
Peptona	0,750000
Carbono*Carbono	0,0178333
Nitro org*Nitro org	0,183333
Nitro inorg*Nitro inorg	0,983333
Peptona*Peptona	-0,216667
Carbono*Nitro org	0,0300000
Carbono*Nitro inorg	-0,0100000
Carbono*Peptona	0,0300000
Nitro org*Nitro inorg	-0,500000
Nitro org*Peptona	0,300000
Nitro inorg*Peptona	-0,900000

EXPERIMENTO ISOLADO Nº325 – VARIÁVEIS QUÍMICAS: AMIDO Response Surface Regression: Amido 2 versus Carbono; Nitro org; ...

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Amido 2

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	0,466667	0,4322	1,080	0,301
Carbono	-0,004167	0,1528	-0,027	0,979
Nitro org	-0,212500	0,1528	-1,391	0,190
Nitro inorg	-0,312500	0,1528	-2,045	0,063
Peptona	-0,045833	0,1528	-0,300	0,769
Carbono*Carbono	0,378125	0,1621	2,333	0,038
Nitro org*Nitro org	-0,021875	0,1621	-0,135	0,895
Nitro inorg*Nitro inorg	-0,021875	0,1621	-0,135	0,895
Peptona*Peptona	-0,021875	0,1621	-0,135	0,895
Carbono*Nitro org	0,231250	0,1871	1,236	0,240
Carbono*Nitro inorg	-0,343750	0,1871	-1,837	0,091
Carbono*Peptona	-0,068750	0,1871	-0,367	0,720
Nitro org*Nitro inorg	-0,181250	0,1871	-0,969	0,352
Nitro org*Peptona	-0,106250	0,1871	-0,568	0,581
Nitro inorg*Peptona	0,068750	0,1871	0,367	0,720

S = 0,748563 PRESS = 34,1448
R-Sq = 62,45% R-Sq(pred) = 0,00% R-Sq(adj) = 18,64%

Analysis of Variance for Amido 2

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	11,1825	11,1825	0,79875	1,43	0,272
Linear	4	3,4783	3,4783	0,86958	1,55	0,250
Carbono	1	0,0004	0,0004	0,00042	0,00	0,979

Nitro org	1	1,0838	1,0838	1,08375	1,93	0,190
Nitro inorg	1	2,3437	2,3438	2,34375	4,18	0,063
Peptona	1	0,0504	0,0504	0,05042	0,09	0,769
Square	4	4,1004	4,1004	1,02510	1,83	0,188
Carbono*Carbono	1	4,0820	3,0502	3,05021	5,44	0,038
Nitro org*Nitro org	1	0,0031	0,0102	0,01021	0,02	0,895
Nitro inorg*Nitro inorg	1	0,0051	0,0102	0,01021	0,02	0,895
Peptona*Peptona	1	0,0102	0,0102	0,01021	0,02	0,895
Interaction	6	3,6037	3,6037	0,60062	1,07	0,430
Carbono*Nitro org	1	0,8556	0,8556	0,85562	1,53	0,240
Carbono*Nitro inorg	1	1,8906	1,8906	1,89062	3,37	0,091
Carbono*Peptona	1	0,0756	0,0756	0,07563	0,13	0,720
Nitro org*Nitro inorg	1	0,5256	0,5256	0,52562	0,94	0,352
Nitro org*Peptona	1	0,1806	0,1806	0,18062	0,32	0,581
Nitro inorg*Peptona	1	0,0756	0,0756	0,07562	0,13	0,720
Residual Error	12	6,7242	6,7242	0,56035		
Lack-of-Fit	10	5,4175	5,4175	0,54175	0,83	0,661
Pure Error	2	1,3067	1,3067	0,65333		
Total	26	17,9067				

Unusual Observations for Amido 2

Obs	StdOrder	Amido 2	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
27	21	0,000	1,004	0,572	-1,004	-2,08 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Estimated Regression Coefficients for Amido 2 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	1,36667
Carbono	-0,921667
Nitro org	0,750000
Nitro inorg	6,75000
Peptona	2,21667
Carbono*Carbono	0,0605000
Nitro org*Nitro org	-0,350000
Nitro inorg*Nitro inorg	-0,350000
Peptona*Peptona	-0,350000
Carbono*Nitro org	0,370000
Carbono*Nitro inorg	-0,550000
Carbono*Peptona	-0,110000
Nitro org*Nitro inorg	-2,90000
Nitro org*Peptona	-1,70000
Nitro inorg*Peptona	1,10000

EXPERIMENTO ISOLADO N° 325 – VARIÁVEIS QUÍMICAS: GLICEROL Response Surface Regression: Glicerol 2 versus Carbono; Nitro org; ...

The analysis was done using coded units.

Estimated Regression Coefficients for Glicerol 2

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	1,50000	0,14569	10,296	0,000
Carbono	-0,02917	0,05151	-0,566	0,582
Nitro org	0,10417	0,05151	2,022	0,066
Nitro inorg	0,31250	0,05151	6,067	0,000
Peptona	0,01250	0,05151	0,243	0,812
Carbono*Carbono	0,14063	0,05464	2,574	0,024
Nitro org*Nitro org	0,00312	0,05464	0,057	0,955
Nitro inorg*Nitro inorg	0,07812	0,05464	1,430	0,178
Peptona*Peptona	-0,00938	0,05464	-0,172	0,867

Carbono*Nitro org	0,05625	0,06309	0,892	0,390
Carbono*Nitro inorg	-0,30625	0,06309	-4,854	0,000
Carbono*Peptona	-0,06875	0,06309	-1,090	0,297
Nitro org*Nitro inorg	0,08125	0,06309	1,288	0,222
Nitro org*Peptona	0,01875	0,06309	0,297	0,771
Nitro inorg*Peptona	-0,01875	0,06309	-0,297	0,771

S = 0,252350 PRESS = 3,9102
R-Sq = 86,66% R-Sq(pred) = 31,72% R-Sq(adj) = 71,09%

Analysis of Variance for Glicerol 2

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	4,96250	4,96250	0,35446	5,57	0,003
Linear	4	2,62833	2,62833	0,65708	10,32	0,001
Carbono	1	0,02042	0,02042	0,02042	0,32	0,582
Nitro org	1	0,26042	0,26042	0,26042	4,09	0,066
Nitro inorg	1	2,34375	2,34375	2,34375	36,80	0,000
Peptona	1	0,00375	0,00375	0,00375	0,06	0,812
Square	4	0,59042	0,59042	0,14760	2,32	0,117
Carbono*Carbono	1	0,42504	0,42188	0,42188	6,62	0,024
Nitro org*Nitro org	1	0,00506	0,00021	0,00021	0,00	0,955
Nitro inorg*Nitro inorg	1	0,15844	0,13021	0,13021	2,04	0,178
Peptona*Peptona	1	0,00188	0,00188	0,00188	0,03	0,867
Interaction	6	1,74375	1,74375	0,29062	4,56	0,012
Carbono*Nitro org	1	0,05062	0,05063	0,05063	0,79	0,390
Carbono*Nitro inorg	1	1,50062	1,50062	1,50062	23,56	0,000
Carbono*Peptona	1	0,07562	0,07562	0,07562	1,19	0,297
Nitro org*Nitro inorg	1	0,10563	0,10563	0,10563	1,66	0,222
Nitro org*Peptona	1	0,00563	0,00563	0,00563	0,09	0,771
Nitro inorg*Peptona	1	0,00562	0,00562	0,00562	0,09	0,771
Residual Error	12	0,76417	0,76417	0,06368		
Lack-of-Fit	10	0,62417	0,62417	0,06242	0,89	0,636
Pure Error	2	0,14000	0,14000	0,07000		
Total	26	5,72667				

Estimated Regression Coefficients for Glicerol 2 using data in uncoded units

Term	Coef
Constant	-0,500000
Carbono	0,0483333
Nitro org	-2,18333
Nitro inorg	2,65000
Peptona	1,45000
Carbono*Carbono	0,0225000
Nitro org*Nitro org	0,0500000
Nitro inorg*Nitro inorg	1,25000
Peptona*Peptona	-0,150000
Carbono*Nitro org	0,0900000
Carbono*Nitro inorg	-0,490000
Carbono*Peptona	-0,110000
Nitro org*Nitro inorg	1,30000
Nitro org*Peptona	0,300000
Nitro inorg*Peptona	-0,300000