

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIANA VIEIRA PORSANI AZUMA**

**ACTINOBACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL,  
PR, BRASIL**

**CURITIBA**

**2011**

**MARIANA VIEIRA PORSANI AZUMA**

**ACTINOBACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL,  
PR, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel

**CURITIBA  
2011**

**MARIANA VIEIRA PORSANI AZUMA**

**ACTINOBACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL,  
PR, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Co-orientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patricia do Rocio Dalzoto  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hedda Elisabeth Kolm

**CURITIBA  
2011**



Ministério da Educação e Desporto  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE**  
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

### “ACTINOBACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ISOLADOS DA REGIÃO ENTREMARÉS DA ILHA DO MEL, PR, BRASIL”

por

**MARIANA VIEIRA PORSANI AZUMA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ida Chapaval Pimentel (presidente)

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Leise Monteiro

  
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia do Rocio Dalzoto  
(membro suplente)

Curitiba, 25 de fevereiro de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

***Dedico,***

*A "Deus"  
e aos meus familiares;  
em especial minha avó Sylvia Archangelo Vieira;  
meus pais: Dorival e Renata;  
meu irmão, Rafael e meu sobrinho, Tobias  
que sempre estiveram ao meu lado  
incentivando e caminhando juntos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Às minhas professoras Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ida Chapaval Pimentel, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patricia do Rocio Dalzoto e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hedda Elisabeth Kolm. Pela longa jornada de trabalho conjunto, conselhos e ensinamentos.

Sou grata ao Prof<sup>o</sup> Dr. Brás Heleno de Oliveira e ao doutorando Leopoldo Baratto que tanto me auxiliaram neste trabalho.

Ao LabGen principalmente a Daiani C. Savi e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Stringari que me ajudaram muito.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lílian Côcco do LACAUT pela força.

À todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação acadêmica.

Aos meus amigos de jornada Angela, Sabina, Paulo e Izabel.

À aluna de Iniciação Científica Rafaela Amattuzi que tanto contribuiu para este projeto trabalhando lado a lado para a execução das análises

Aos colegas de laboratório: Fabiana Tonial, Patrícia Araújo, Samarina, Juliana B., Diogo, Melissa, Wellison, Alexandre, Juliana, Amanda, Bruno, Dicler, Carolina, Elaine, Emanuelle, Franciele, Francine, João, Mônica, Leny, Tássia e Vivién que sempre me apoiaram e auxiliaram durante meu período de práticas no laboratório e juntos nos momentos de lazer.

Aos meus familiares, em especial meus pais, Dorival e Renata, irmão, Rafael. A todos vocês que apostam em meu potencial e estiveram a todo instante me dizendo palavras de incentivo e estímulo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia e ao financiamento do Programa Reuni através de minha bolsa auxílio.

## RESUMO

Actinobactérias ou actinomicetos são bactérias Gram-positivas com elevado conteúdo de G+C (guanina + citosina) e com alta capacidade de produzir diversos metabólitos secundários. Estas bactérias são comumente isoladas do solo e são muito estudadas pelo grande potencial em produzirem antibióticos. A ocorrência destes micro-organismos nas areias das praias na costa brasileira é raramente descrita na literatura. As comunidades de micro-organismos que estão presentes em regiões entre-marés de ambientes marinhos realizam processos essenciais que contribuem para o funcionamento das zonas costeiras, como por exemplo, a ciclagem do carbono, a transferência de metal e remoção de poluentes orgânicos para níveis tróficos superiores. Portanto, estes micro-organismos podem servir como bioindicadores do ecossistema. As condições da região entre-marés são extremas, devido aos ciclos de maré, resultando em gradientes de umidade, temperatura, a ação das ondas, a radiação UV, nutrientes e salinidade. Tais condições favorecem o desenvolvimento e a disseminação de determinados micro-organismos com processos fisiológicos e metabólitos particulares. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo realizar a bioprospecção destes micro-organismos, previamente isolados na região entre-marés da Ilha do Mel, PR, principalmente para produção de drogas antimicrobianas. Amostras de sedimentos superficiais foram coletadas em quinze estações da região entre-marés da Ilha do Mel (situada na entrada do Complexo Estuarino de Paranaguá, Paraná). As coletas foram realizadas nos dias 01 e 02 de fevereiro de 2007. Sub-amostras de sedimentos foram misturadas com água destilada e alíquotas do sobrenadante inoculadas em meio de cultura Czapeck Dox preparado com água destilada e água salina. As actinobactérias foram isoladas e identificadas por macromorfologia e coloração de Gram e por meio da técnica de microcultivo. Foram obtidas 116 actinobactérias e agrupadas em 10 morfotipos, pertencentes aos gêneros *Nocardia* e *Streptomyces*. Para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados ensaios biológicos qualitativos, em triplicata, pelo método dos poços. A ação das actinobactérias foi evidenciada através da produção de halos de inibição ao redor da colônia que sintetiza o metabólito. As cepas padrão utilizadas para os testes de atividade antimicrobiana foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os resultados evidenciaram que dos 116 isolados, 79 apresentaram atividade contra pelo menos uma cepa patogênica testada. Aproximadamente 72% das amostras testadas apresentaram atividade contra duas ou mais cepas patogênicas padrão. Sendo que 87% dos isolados testados inibiram *C. albicans*, 77% *S. aureus*, 18% *P. aeruginosa* e 4% *E. coli*. Na sequência, os isolados que apresentaram potencial antimicrobiano tiveram seus metabólitos caracterizados quimicamente e foi confirmada a identificação ao nível de gênero, por meio da amplificação com oligonucleotídeos específicos do DNA ribossomal 16S. Estes resultados evidenciam a importância do estudo do potencial biotecnológico das actinobactérias isoladas das regiões entre-marés.

**Palavras-chave:** *Streptomyces*. Sedimento Marinho. Antimicrobianos.

## ABSTRACT

Actinobacteria or actinomycetes are Gram-positive bacteria with high content of G + C (guanine + cytosine) and high capacity of producing several secondary metabolites. These bacteria are commonly isolated from soil and they are much studied by the great potential of producing antibiotics. The occurrence of these microorganisms in sandy beaches along the Brazilian coast is rarely described in literature. The communities of microorganisms present in the intertidal areas of marine perform key processes which contribute to the functioning of coastal areas, such as the carbon cycling, metal transfer and removal of organic pollutants to higher trophic levels. Therefore, these micro-organisms can serve as bioindicators of the ecosystem. The conditions of the intertidal region are extreme, due to tidal cycles, resulting in gradients of humidity, temperature, wave action, UV radiation, nutrients and salinity. Such conditions favor the development and spread of certain microorganisms with particular physiological processes and metabolites. Thus, this paper aims to accomplish these microorganisms Bioprospection, previously isolated from the intertidal zone of Ilha do Mel, Paraná State, mainly for production of antibiotics from strains that produce substances with biotechnological potential. Surface sediment samples were collected at fifteen stations in the intertidal zone of Ilha do Mel (located at the entrance of the Estuarine Complex from Paranaguá, Paraná). Samples were collected on February 01th and 02th, 2007. Sub-samples of sediments were mixed with distilled water and aliquots of supernatant inoculated into culture medium Czapeck Dox prepared with distilled water and saline water. The actinobacteria were isolated and identified by macromorphology and Gram staining technique and by microculture. 116 actinobacteria were obtained and grouped into 10 morphotypes belonging to the genera *Nocardia* and *Streptomyces*. To evaluate the antibacterial activity tests were carried out biological quality, in triplicate, by the method of the wells. The action of these microorganisms was evidenced by the production of inhibition zones around actinobacteria colonies which summarizes the metabolite. The standard strains used were: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Candida albicans* (ATCC 10231). The results showed that the out of the 116 isolated, 79 had activity against at least one pathogenic strain tested. Since 87% of tested strains inhibited *C. albicans*, 77% *S. aureus*, 18% *P. aeruginosa* and 4% *E. coli*. Approximately 72% of the tested samples showed activity against two or more standard pathogenic strains. Further, the isolated which have potential antimicrobial metabolites will be identified and chemically characterized to genera level by means of 16S ribosomal DNA amplification. These results highlight the importance of studying the biotechnological potential of actinobacteria isolated from intertidal zone.

**Keywords:** *Streptomyces*. Marine sediment. Antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| FIGURA 1 -  | (A) LOCALIZAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ NO BRASIL; (B) LOCALIZAÇÃO DA ILHA DO MEL NA ENTRADA DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ.....   | 20 |
| FIGURA 2 -  | CONTORNO GERAL DA ILHA DO MEL, COM LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DAS ESTAÇÕES DE COLETA, DAS PRINCIPAIS PRAIAS E DELIMITAÇÃO DO ALCANCE DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NA ILHA.....            | 21 |
| FIGURA 3 -  | ESTRUTURAS DE TERPENTECINA (1) E TERPENTETRIENO (2).....   | 30 |
| FIGURA 4 -  | ESTRUTURAS DE LANSAI A-D (1-4).....  | 31 |
| FIGURA 5 -  | ESTRUTURAS DE GELDANAMICINA, DHQ3, E COMPOSTOS 1 E 2 (R = OCONH <sub>2</sub> ).....  | 32 |
| FIGURA 6 -  | ESTRUTURA DE AZALOMICINA F4A.....  | 33 |
| FIGURA 7 -  | ESTRUTURA DE ARENIMICINA (1, R=H).....   | 34 |
| FIGURA 8 -  | ESTRUTURA DE BOHEMAMINA.....   | 35 |
| FIGURA 9 -  | AS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA NA ILHA DO MEL, PARANÁ.....   | 44 |
| FIGURA 10 - | TESTE DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DOS POÇOS.....  | 46 |
| FIGURA 11 - | PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO (G6) DE ACTINOBACTÉRIA ISOLADO AD 3B 17. FASE MÓVEL CHCl <sub>3</sub> :MEOH (95:5 V/V) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA.....                     | 49 |
| FIGURA 12 - | ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DE ISOLADO DE ACTINOBACTÉRIA. CC, CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....  | 50 |
| FIGURA 13 - | CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CC1 (15 G DE SÍLICA GEL 60 0,040-0,063 MM), UTILIZANDO-SE COMO FASE MÓVEL CLOROFÓRMIO (CHCl <sub>3</sub> ):METANOL (MEOH) (98:2 A 95:5, 90:10 E MEOH)..... | 51 |
| FIGURA 14 - | REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEDIMENTO SUPERFICIAL DA REGIÃO  |    |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
|             | ENTRE-MARÉS NAS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NA ILHA DO MEL, PARANÁ-BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO PARA O ISOLAMENTO DE 7 A 14 DIAS A 28°C.....  | 60 |
| FIGURA 15 - | REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 7 A 14 DIAS A 28°C.....   | 64 |
| FIGURA 16 - | A E B. TESTE DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DOS POÇOS.....  | 66 |
| FIGURA 17 - | REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PORCENTAGEM DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. AS ACTINOBACTÉRIAS FORAM CULTIVADAS EM MEIO CZAPECK DOX E SABORAUD POR 7 A 14 DIAS A 28°C.....  | 71 |
| FIGURA 18 - | TESTE DE BIOAUTOGRAFIA DOS EXTRATOS BRUTO DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. CULTIVO EM MEIO ÁGAR MULLER HINTON. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 36 A 48H A 37°C.....  | 73 |
| FIGURA 19 - | PLACAS DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....  | 75 |
| FIGURA 20 - | PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPOSTO ISOLADO G6.1. EXTRAÍDO DO EXTRATO BRUTO G6 DO ISOLADO DE ACTINOBACTÉRIA AD 3B 17. FASE MÓVEL CHCl <sub>3</sub> :MEOH (95:5 V/V CLOROFÓRMIO: METANOL) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA.....   | 77 |
| FIGURA 21 - | MICRO E MACRO MORFOLOGIA (A E B) DE ) DE <i>Nocardia</i> spp e <i>Streptomyces</i> spp ISOLADOS DE SEDIMENTO SUPERFICIAL DE REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR – BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 7 A 14 DIAS A 28°C. MICROMORFOFOLGIA VISUALIZADA NO AUMENTO DE 1000X..... | 80 |
| FIGURA 22 - | MICRO MORFOLOGIA DE <i>Nocardia</i> spp. EMARANHADO DE FINOS FILAMENTOS QUE SE FRAGMENTAM EM FORMAS BACILARES E ESFÉRICAS.....  | 81 |
| FIGURA 23 - | MICRO MORFOLOGIA DE <i>Streptomyces</i> spp. LONGAS HIFAS RAMIFICADAS COM FILAMENTOS QUE PODEM SER RETOS  |    |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | A ONDULADOS COM A PRESENÇA DE FILAMENTOS RAMIFICADOS.....  | 81 |
| FIGURA 24 | COLORAÇÃO DE GRAM DAS ACTINOBACTÉRIAS ISOLADOS DE SEDIMENTO SUPERFICIAL DE REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR – BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 7 A 14 DIAS A 28°C. MICROMORFOFOLGIA VISUALIZADA NO AUMENTO DE 1000X..... | 82 |
| FIGURA 25 | GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A AMPLICAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS UTILIZANDO O PAR DE PRIMER SM6F E SM5R PARA A FAMÍLIA Streptomycetaceae.....  | 84 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| TABELA 1 - | ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESCALA ANALÍTICA.....   | 47 |
| TABELA 2 - | ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEDIMENTO SUPERFICIAL DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NAS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NA ILHA DO MEL, PARANÁ-BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 7 A 14 DIAS A 28 °C..... | 62 |
| TABELA 3 - | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA AS SEGUINTEs CEPAS PATOGÊNICAS: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923), <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) E <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231).....              | 68 |
| TABELA 4 - | ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESCALA ANALÍTICA E PARA O TESTE DE BIOAUTOGRAFIA.....   | 72 |
| QUADRO 1 - | OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTÉRIA .....  | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CMH - Caldo Müller-Hinton

CIA - Clorofórmio Álcool Isoamílico

CTAB - Brometo de Cetiltrimetilamônio

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

GM – Geldamicina

LabGeM - Laboratório de Genética de Microrganismos – UFPR

LabMicro – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – UFPR

MHA - Ágar Müller-Hinton

MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MTT - 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2Htetrazoliumbromide

NCBI - *National Center Biotechnology Information*

pb - Pares de bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEG - Polietilenoglicol

rDNA - DNA ribossomal

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TBE - Solução de Tris- Borato- EDTA

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 19 |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL.....  | 19 |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 19 |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                     | 20 |
| 3.1      | ÁREA DE ESTUDO.....  | 20 |
| 3.2      | LOCALIZAÇÕES E DELIMITAÇÕES.....                                       | 21 |
| 3.3      | ACTINOBACTÉRIAS.....   | 23 |
| 3.4      | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS.....                       | 24 |
| 3.5      | IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS.....                                  | 27 |
| 3.6      | METABÓLITOS DE ACTINOBACTÉRIAS.....                                    | 30 |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 37 |
| 4.1      | MATERIAL BIOLÓGICO.....  | 37 |
| 4.1.1    | Isolados de actinobactérias.....                                       | 37 |
| 4.1.2    | Micro-organismos patogênicos utilizados nos testes de antagonismo..... | 37 |
| 4.2      | MEIOS DE CULTURA.....  | 38 |
| 4.2.1    | Meio Extrato de Malte.....   | 38 |
| 4.2.2    | Caldo Ágar Mueller-Hinton (MH).....                                    | 38 |
| 4.2.3    | Meio Czapeck Dox.....  | 39 |
| 4.2.4    | Meio Saboraud.....   | 39 |
| 4.3      | SOLUÇÕES.....  | 40 |
| 4.3.1    | Lactofenol de Amann.....   | 40 |
| 4.3.2    | Cristal violeta fenicada.....  | 40 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.3.3    | Lugol.....   | 41        |
| 4.3.4    | Fucsina básica.....  | 41        |
| 4.3.5    | Tampão CTAB.....   | 41        |
| 4.3.6    | Clorofil/ CIA – Clorofórmio Álcool isoamílico.....   | 42        |
| 4.3.7    | TBE 5X.....  | 42        |
| 4.4      | COLETA E ISOLAMENTO.....   | 43        |
| 4.5      | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE<br>ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA<br>ILHA DO MEL.....                      | 45        |
| 4.5.1    | Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo<br><i>Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2003</i> )..... | 45        |
| 4.5.2    | Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido.....   | 46        |
| 4.5.3    | Obtenção do extrato bruto e suas frações.....  | 47        |
| 4.5.4    | Bioautografia.....   | 51        |
| 4.5.5    | Elucidação Estrutural do composto isolado G6.1.....  | 52        |
| 4.6      | IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE<br>PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....  | 53        |
| 4.6.1    | Caracterização morfológica dos isolados.....   | 53        |
| 4.6.1.1  | Microcultivo.....  | 53        |
| 4.6.1.2  | Coloração de Gram.....   | 54        |
| 4.6.2    | Caracterização molecular dos isolados.....   | 54        |
| 4.6.2.1  | Extração de DNA (VICENTE, 2000).....   | 54        |
| 4.6.2.2  | Amplificação do rDNA 16S de actinobactérias por PCR.....   | 55        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>  | <b>58</b> |
| 5.1      | COLETA E ISOLAMENTO.....   | 58        |
| 5.2      | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE<br>ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA<br>ILHA DO MEL.....                      | 63        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.2.1    | Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2003)..... | 63        |
| 5.2.2.   | Bioautografia.....  | 71        |
| 5.2.3    | Elucidação estrutural do composto G6.1.....   | 75        |
| 5.3      | IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....                                    | 77        |
| 5.3.1    | Caracterização morfológica dos isolados.....  | 77        |
| 5.3.2    | Caracterização molecular dos isolados.....  | 83        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>7</b> | <b>TRABALHOS FUTUROS.....</b>   | <b>87</b> |
|          | REFERÊNCIAS.....  | 88        |

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma das maiores costas do mundo, com diversos ecossistemas e microhabitats. Apesar disso, pouco se conhece sobre a diversidade de actinobactérias nestas regiões. As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 1960 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No entanto, ainda são poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 Km de litoral brasileiro (PINTO *et al.*, 2002)

O turismo é uma atividade que, em princípio, supõe a possibilidade de conciliar a preservação ambiental e a geração de renda para as comunidades locais. Porém, esta atividade está se expandindo rapidamente e de forma desordenada em muitos lugares da costa brasileira, levando à degradação do ambiente. Além disso, em função da rápida ocupação da linha da costa nas últimas décadas para fins de turismo e veraneio, vários problemas com relação à preservação ambiental foram surgindo ou sendo detectados nas Unidades de Conservação (KIM, 2004).

A ocorrência de micro-organismos nas areias de praia, áreas frequentadas principalmente por banhistas e pescadores, pode levar a altos níveis de poluição e conseqüente proliferação de micro-organismos patogênicos (OBIRI-DANSO; JONES, 2000).

As influências antrópicas nestas áreas estão se intensificando a cada ano e o seu monitoramento com relação a possíveis contaminações é fundamental. Em função de tais fatos, a obtenção de dados sobre a biologia e caracterização molecular dos micro-organismos presentes nestes ambientes faz-se necessária.

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, com alto conteúdo C+G (VENTURA, *et al.*, 2007). São degradadoras da matéria orgânica como celulose, lignina e quitina, gerando biomassa protéica ou mesmo servindo como alimento para outros organismos (GAVA *et.al.*, 2002).

A importância destes micro-organismos no solo tem sido relacionada com a produção de antibióticos. A ação destes é evidenciada principalmente em meio de cultura, através da produção de halos de inibição, onde se forma uma zona livre de

crescimento microbiano, ao redor da colônia de actinobactéria que sintetiza o antibiótico. A influência dos fatores antibióticos no equilíbrio microbiológico está condicionada à atividade dos micro-organismos antagonistas no solo e à ação dos antibióticos sobre as populações sensíveis. Entretanto, a importância das actinobactérias também tem sido relacionada com a produção de diversas substâncias de aplicação farmacológica e industrial, incluindo enzimas, inibidores enzimáticos e agentes imunomoduladores (NEVES, 2008).

A propagação da resistência bacteriana aos antibióticos ameaça a saúde humana. A substituição das amostras sensíveis por amostras resistentes, na gênese de muitas infecções bacterianas, tem sido um fator constante de diminuição do valor terapêutico de muitos antimicrobianos. A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau de resistência adquirida, é propriedade bastante variável entre bactérias. Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos são essenciais para combater os patógenos resistentes (DEMAIN, 2006).

A identificação e o sequenciamento do genoma de actinobactérias marinhas demonstraram a grande capacidade metabólica destes gêneros em codificar metabólitos secundários que são fontes ricas para produção de novas drogas (UDWARY, 2007), com atividades anticancerígena e antimalárica (PRUDHOMME, 2008). Novos antibióticos provenientes de actinobactérias marinhas estão sendo descobertos e proporcionam esperanças para o combate às cepas bacterianas resistentes (ZHAO, 2009).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas da região entre-maré da Ilha do Mel, Paraná, Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, Paraná, Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial dos isolados em produzir substâncias antimicrobianas, contra diferentes grupos de micro-organismos patogênicos (bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e leveduras);
- Selecionar os isolados potencialmente mais eficientes para produção de antimicrobianos e sugerir as classes de compostos químicos presentes nos metabólitos secundários ativos extraídos dos micro-organismos;
- Identificar, ao nível de gênero e, quando possível, ao nível de espécie, as actinobactérias que tiveram seus metabólitos caracterizados quimicamente, por meio de características macro e micromorfológicas;
- Confirmar a identificação morfológica por meio de amplificação com oligonucleotídeos específicos para gêneros de actinobactérias através da região DNA ribossomal 16S.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDO

O Complexo Estuarino da Baía de Paranaguá ( $25^{\circ}16'34''\text{S}$ ;  $48^{\circ}17'42''\text{W}$ ) é o maior estuário do Estado do Paraná e estende-se por cerca de 50 Km continente adentro. A Ilha do Mel localiza-se na entrada da Baía de Paranaguá ( $25^{\circ}20'\text{S} - 48^{\circ}20'\text{W}$  e  $25^{\circ}35' - 48^{\circ}35'\text{W}$ ), no litoral paranaense (Figura: 1A e B) (BRITEZ, MARQUES, 2005).

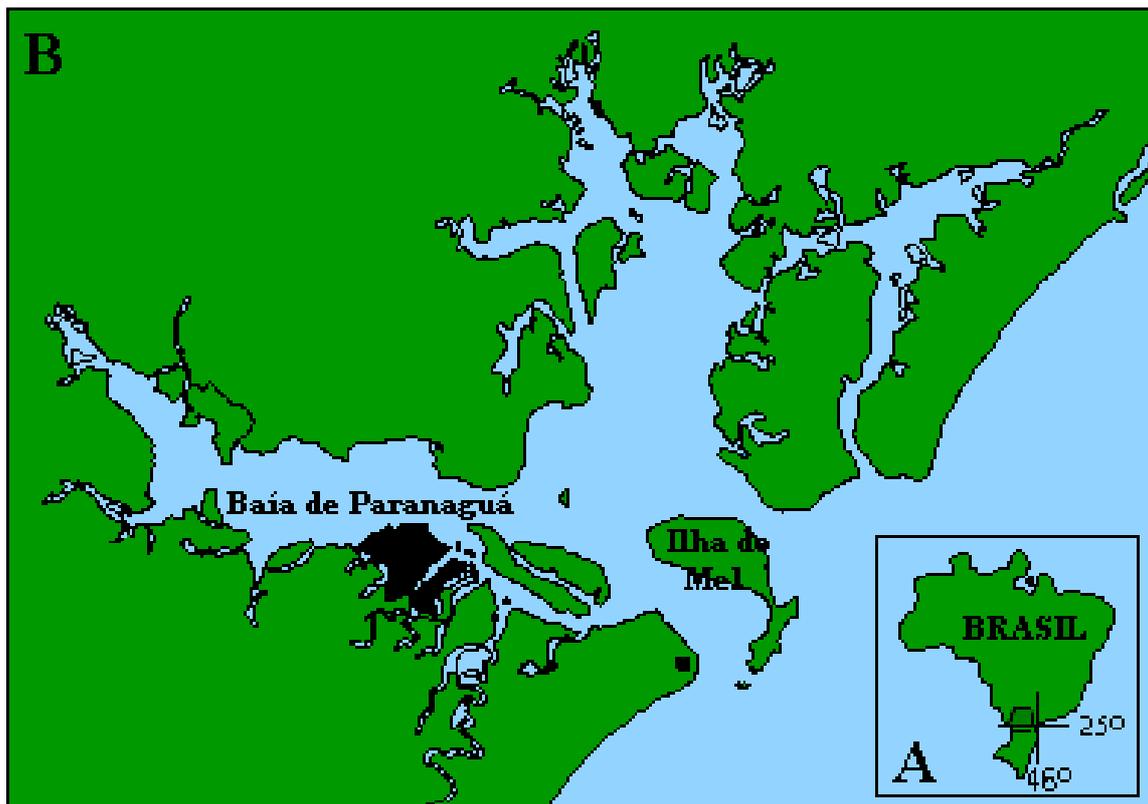


FIGURA 1: (A) LOCALIZAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ NO BRASIL; (B) LOCALIZAÇÃO DA ILHA DO MEL NA ENTRADA DO COMPLEXO ESTUARINO DE PARANAGUÁ.  
FONTE: arquivo pessoal (2008).

### 3.2 LOCALIZAÇÕES E DELIMITAÇÕES

A Ilha do Mel (FIGURAS 1 e 2) está separada do continente (Ponta Inácio Dias, em Pontal do Paraná) por aproximadamente 2.800 metros. Em sua porção oriental afronta o Oceano Atlântico, onde se encontram as ilhas das Palmas e da Galheta. Ao norte se encontram as ilhas das Peças e Superagüi; a oeste é banhada pelo chamado Mar de Dentro e avizinha-se das ilhas das Cobras, da Cotinga e Rasa. É separada, ao norte, pela Ilha das Peças através do canal Sueste e, ao sul, do continente (Balneário de Pontal do Sul) através do canal Sul ou da Galheta.

Sua margem ocidental, região voltada para o continente, chamada de Saco do Limoeiro ou “Mar de Dentro”, é banhada pelas águas “calmas” do Complexo Estuarino de Paranaguá, enquanto que a sua parte voltada para leste sofre ação direta das águas da plataforma continental interna. Dessa forma, apresentam comportamentos dinâmicos diferenciados (PARANHOS - FILHO, 1996).



FIGURA 2: CONTO RNO GERAL DA ILHA DO MEL, COM LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DAS ESTAÇÕES DE COLETA, DAS PRINCIPAIS PRAIAS E DELIMITAÇÃO DO ALCANCE DAS UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NA ILHA.

Fonte: BRITTEZ E MARQUES (2005), modificado por MIQUELANTE (2007).

No perímetro da ilha destacam-se as praias das Conchas (ou do Farol) e da Fortaleza, além da praia de Fora, a praia Grande, a praia do Miguel e a praia do Belo e as localidades denominadas Ponta do Bicho e a Ponta do Cassual (onde se encontra o rio com o mesmo nome).

Com relação à sua ocupação, a Ilha do Mel possui, atualmente, vilas que se separam uma das outras por morros ou pelas praias. Segundo Kim (2004), a maior densidade populacional e conseqüentemente maior concentração dos problemas em relação à ocupação humana se encontra na Vila das Encantadas, localizada no extremo sul da ilha.

Ainda na porção sudeste da ilha a ocupação está situada na região da Praia Grande, com instalações construídas antes da criação do parque e na Vila do Farol, local que comporta o núcleo administrativo da ilha e o único posto de saúde.

Na porção noroeste da ilha (Estação Ecológica) encontram-se três “comunidades” instaladas: a Vila da Fortaleza, constituída principalmente por casas de veranistas e pousadas; a Nova Brasília, onde a maior parte são moradores permanentes; e a Ponta Oeste, que antigamente era a vila mais povoada da ilha e hoje possui cerca de dez ou doze famílias de pescadores. Sua ocupação vem sendo desincentivada pelo fato de ser limítrofe com a Estação Ecológica (KIM, 2004).

A valorização da ilha como um dos locais mais bonitos do litoral paranaense tem atraído para a região um número cada vez maior de turistas, principalmente no verão, vindos de vários estados do Brasil e do exterior. A população passou definitivamente a ter no aproveitamento do turismo sua principal atividade econômica, prestando vários tipos de serviços aos turistas (Sema/IAP 1996). Com o incremento da atividade turística, houve um aumento significativo de pessoas que vieram morar na ilha, o que aumentou suas áreas de ocupação e conseqüentemente a pressão sobre as áreas protegidas (MARQUES; BRITZ, 2005). Desta forma vêm ocorrendo todo ano uma série de problemas ambientais decorrentes da precariedade dos serviços de saneamento e falta de planejamento prévio das atividades turísticas nesta região (ATHAYDE; TOMAZ, 1995). Quanto à infraestrutura, atualmente, a ilha possui um precário sistema de coleta de resíduos sólidos e nenhum sistema de tratamento e coleta de esgoto.

### 3.3 ACTINOBACTÉRIAS

Actinomicetos ou actinobactérias são bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C (guanina + citosina). São conhecidos oito gêneros: *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio*. Possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos. Podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ et.al., 2002).

Mais recentemente, o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2004), classifica as actinobactérias dentro do Filo e da classe Actinobacteria, a qual compreende 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. As actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram-positivas e apresentam alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% em *Corynebacteria* e mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção a isso é o genoma do patógeno obrigatório *Tropheryma whipplei*, com menos de 50% de G+C em seu DNA.

Actinobactérias exibem uma grande variedade de morfologias, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*), ocorre fragmentação de hifas (por exemplo, *Nocardia* spp.) e podem ser altamente diferenciadas em micélio ramificado (por exemplo, *Streptomyces* spp.). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários. A maioria dos antibióticos em uso hoje são derivados de produtos naturais de actinobactérias e fungos (RAJU et al., 2010).

Além disso, diferentes estilos de vida são encontrados entre Actinobactérias, assim, o filo inclui patógenos (por exemplo, *Mycobacterium* spp, *Nocardia* spp, *Tropheryma* spp, *Corynebacterium* spp, e *Propionibacterium* spp.), os habitantes do solo (*Streptomyces* spp) comensais da planta (*Leifsonia* spp), fixadoras de nitrogênio simbiotes (*Frankia*), e do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp) (VENTURA et.al., 2007).

As actinobactérias produzem elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas fúngicas (SCHLEGEL, 1993). Em algumas espécies, reproduzem-se pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. Os

esporos constituem a principal forma de multiplicação e são produzidos em grande número, cada esporo com potencial de germinação e crescimento, levando ao surgimento de um novo organismo. Embora não sejam resistentes ao calor, os conidiósporos e os esporangiósporos são resistentes às dessecações e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem. Em outras espécies, como *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação, em que as hifas fragmentam-se em muitas células baciliformes e cocóides, cada uma capaz de formar um novo micélio (VENTURA *et.al.*, 2007).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS

O advento da penicilina sinalizou o início da era do antibiótico. O Professor Selman Waksman da Universidade Rutgers e seus alunos conseguiram isolar muitos antibióticos novos a partir de bactérias filamentosas, como as actinobactérias. A mais conhecida delas foi a estreptomicina. No entanto, antes mesmo da estreptomicina, Waksman e Woodruff publicaram em 1940 sobre a descoberta do cromooligopeptídeos, que nomearam como actinomicinas. Um membro deste grupo, actinomicina D, foi usado para combater o tumor de Wilms em crianças e se tornou extremamente importante como ferramenta básica para o desenvolvimento da biologia molecular, agindo como um inibidor de RNA polimerase (DEMAIN, 2006).

Em 1945, Waksman, Schatz e Bugie, citado por Demain, 2006, publicaram seus trabalhos sobre a estreptomicina, o primeiro antibiótico ativo contra a bactéria da tuberculose e também valiosa na luta contra a meningite bacteriana. Em 1948, Lechevalier e Waksman, citado por Demain, 2006, publicaram sobre a descoberta da neomicina, e a candicidina em 1953. A neomicina é um aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces fradiae*, serve como um antibacteriano tópico e a candicidina é um polieno, produzido pelo *Streptomyces griseus*, que é utilizado como produto antifúngico tópico. A ação seletiva exercida sobre as bactérias patogênicas e fungos produzidas por estes metabólitos secundários isolados dos microorganismos inaugurou a era antibiótica e, por muitos anos, vem nos beneficiando através das drogas, tais como as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrolídeos, e muitos outros. O sucesso foi tão

impressionante que esses antibióticos foram praticamente os únicos medicamentos utilizados para a quimioterapia contra micro-organismos patogênicos. Em 2002, mais de 22.000 compostos bioativos haviam sido descobertos a partir de micro-organismos. Estes incluíram antibióticos produzidos, principalmente, por actinobactérias (45%), fungos (38%), e as bactérias unicelulares (17%) principalmente por *Pseudomonas* e *Bacillus* (DEMAIN, 2006).

As actinobactérias são fontes importantes de novos compostos bioativos, como por exemplo, antibióticos produzidos por espécies marinhas que são completamente novos e únicos quando comparados aos provenientes de fontes terrestres (LU, 2009).

O metabolismo secundário de micro-organismos pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Assim, uma das justificativas para a produção destas substâncias seria que, por serem produzidas dentro de uma série de reações bioquímicas que ocorrem nas células, quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, este mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência. Além de que, ao se esgotar um nutriente vital, o metabolismo secundário manteria os mecanismos essenciais para a multiplicação celular, ativando outras vias para a sua produção, principalmente no que diz respeito à produção de enzimas (ZHANG, 2009).

Actinobactérias isoladas de amostras marinhas coletadas da região entre-marés, na China, produziram efeito inibitório em relação a bactérias patogênicas como *Bacillus cereus* (Gram positiva) e *Escherichia coli* (Gram negativa) (LU, 2009).

O gênero *Verrucosispora* da subordem Micromonosporineae isolado de amostras de sedimento marinho, produz um composto policíclico pertencente à família abyssomicina. A abyssomicina C é um potente inibidor de bactérias Gram-positivas, de isolados clínicos multirresistentes e de cepas vancomicina resistentes a *Staphylococcus aureus* (FIEDLER, 2005).

Um novo estreptomiceto, a cepa designada de L0804, isolada de lodo marinho na China, produz dois compostos ativos a partir de seu metabolismo secundário, os quais apresentam atividade antimicrobiana e anti-tumoral, sendo um deles identificado como a griseoviridina (LIN, 2010).

A busca de novos produtos farmacêuticos continua a exigir esforços e hoje muitos medicamentos produzidos foram, originalmente, derivados de fontes naturais, como plantas e micro-organismos. Embora, existam poucos produtos de origem marinha que são utilizados medicinalmente, estes são fonte potencial de produtos farmacêuticos (FENICAL, 2007).

As vantagens, segundo ZHANG (2005), atribuídas à descoberta de fármacos baseados em produtos naturais em relação à química sintética, são resumidas como segue:

- Os produtos naturais oferecem diversidade química com complexidade estrutural;
- Os produtos naturais foram selecionadas pela natureza através de interações biológicas específicas;
- Produtos naturais são as principais fontes de fármacos. Drogas como a ciclosporina A e FK-506 não são apenas ativos como imunossuppressores, mas também, como antivirais, antifúngicos e antiparasitários;
- Os recursos naturais são ainda inexplorados e as novas descobertas levarão a novos compostos bioativos;
- Os produtos naturais podem orientar a síntese de compostos sintéticos.

### 3.5 IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS

As características morfológicas tais como: ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo e sua fragmentação ou produção de esporos, são fatores que auxiliam na identificação das actinobactérias. Nas actinobactérias formadoras de esporos observa-se também o tipo e o número de esporos, bem como o seu arranjo. Desta maneira, os esporos podem ser únicos, como os encontrados em *Micromonospora* e *Thermomonospora*, em pares longitudinais característicos de *Microbispora*, e em cadeias de esporos como *Nocardia* e *Streptomyces* ou contidos dentro de um esporângio, como em *Actinoplanes* e *Streptosporangio* (BULL, 2004).

A análise fenotípica baseia-se na caracterização morfológica e/ou bioquímica e identifica o micro-organismo até gênero, podendo ocorrer identificação até o nível de espécie em alguns casos. As técnicas moleculares, por outro lado, auxiliam na diferenciação dos grupos de micro-organismos, fornecendo informações diretas do DNA do indivíduo. Dessa forma, a biologia molecular vem sendo utilizada para diferenciação de indivíduos e caracterização filogenética dos micro-organismos de interesse (STRINGARI, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações, tanto em pesquisa básica como aplicada, que consiste em fazer cópias de DNA usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (BITTENCOURT, 2008). A PCR é um método “*in vitro*” para amplificação de material genético. Isto ocorre porque através de uma pequena quantidade de ácido nucléico obtém-se uma grande quantidade de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos (SAIKI et al., 1988; MULLIS; FALOONA, 1987).

Entre as grandes vantagens da técnica de PCR, destaca-se a pequena quantidade de DNA necessária para a reação e também a facilidade de não ser necessário isolar a sequência que será amplificada. Dentre as desvantagens, existe a necessidade de conhecer a sequência que flanqueia o segmento a ser amplificado e também os cuidados que devem ser tomados para evitar uma contaminação com DNA exógeno (STRINGARI, 2004).

A partir do conceito básico de PCR, são vários os desdobramentos possíveis da metodologia quando associadas a outras ferramentas moleculares, como: detecção de genes em um DNA genômico, sequenciamento, quantificação de sequências específicas, análise de expressão gênica pela amplificação a partir de mRNA; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossômicas; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998; NEIVA, 2007).

Para identificar micro-organismos e suas relações filogenéticas pode-se associar as tecnologias de PCR e sequenciamento de ácidos nucleicos. Dessa forma, pode-se realizar a identificação de bactérias de forma mais rápida (DEVEREUX; HINES; STAHL, 1996). A ribotipagem pode ser utilizada para bactérias, as regiões conservadas são os genes 16S e 23S, portanto para análise de variabilidade amplifica-se a região intergênica 16-23S, que é variável (BRASILEIRO; CARNEIRO, 1998).

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

As actinobactérias representam um grupo diversificado e métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) têm proporcionado uma maneira rápida e precisa para identificar estas bactérias. Em particular, amplificadas de análise de restrição de rDNA revelaram-se muito úteis. Os amplificadas de rDNA 16S de actinobactérias de solo são realizados por um método simples de isolamento de DNA, seguido de PCR. A PCR permite a amplificação específica de uma região de

síntese do DNA e tem sido intensamente aplicada para identificação de numerosos organismos (COOK, 2003).

Amostras de sedimentos marinhos coletados nas águas tropicais do Norte da Costa do Pacífico, do Caribe e da Costa Rica mostraram uma alta diversidade de actinobactérias, tanto em termos de número de espécies como de composição filogenética, com elevada presença do gênero *Streptomyces* (SOLANO, 2009).

As bactérias pertencentes à classe Actinobacteria que foram frequentemente reportadas em ambientes marinhos são principalmente de três gêneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*. As estirpes cultiváveis isoladas deste ambiente marinho foram atribuídas a diversos táxons da classe Actinobacteria, com base nas características morfológicas das colônias e pelo sequenciamento do DNA ribossomal 16S. Muitos isolados representam novas espécies e, portanto, potenciais fontes inovadoras de compostos bioativos (MALDONADO *et al.*, 2005).

Actinobactérias cultiváveis isoladas a partir da esponja marinha *Haliclona* sp. no Mar do Sul da China pertencem aos gêneros *Micronospora* spp. e *Streptomyces*, sendo este o gênero predominante neste ambiente (JIANG, 2007).

Uma nova actinobactéria marinha isolada de lodo marinho, na China, foi caracterizada a partir da região gênica 16S rDNA, e identificada como *Streptomyces roseogilvus* var. marinha (LIN, 2010).

O sequenciamento do gene 16S rDNA é um poderoso método para elucidação das relações genéticas entre organismos procariotos. Embora a região 16S do rDNA seja altamente conservada entre os procariotos, estas sequências contêm regiões variáveis adequadas para distinguir taxas (STACH, 2003). Novas espécies marinhas estão sendo reportadas como pertencentes ao grupo *Streptomyces* e ao gênero *Micromonospora* por meio de análises da região 16S rDNA (MALDONADO, 2009).

### 3.6 METABÓLITOS DE ACTINOBACTÉRIAS

Em termos de estrutura química e propriedades biológicas, os isoprenóides estão entre os mais diversos produtos naturais, assim, esforços significativos tem sido dedicados para a elucidação das formas geradas em relação à origem da diversidade encontrada na natureza. No trabalho realizado por Eguchi (2003), foram estudados os mecanismos de biossíntese do antibiótico terpentecina (FIGURA 3) por *Streptomyces* e verificou-se que reações de ciclização podem ocorrer durante a biossíntese destes diterpenos.

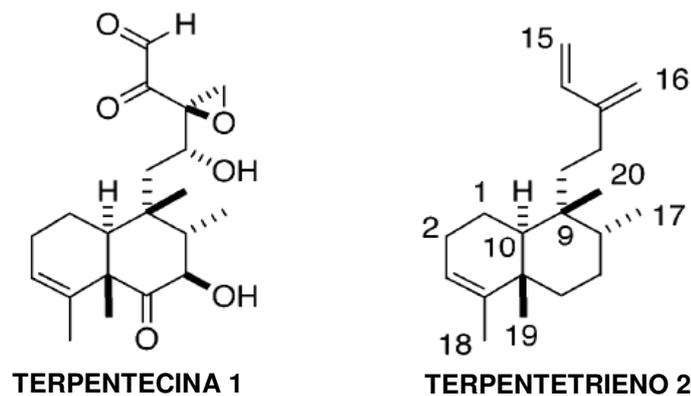
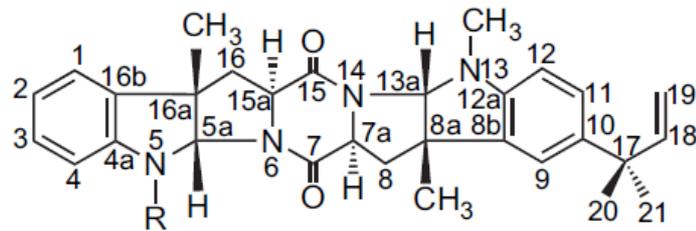
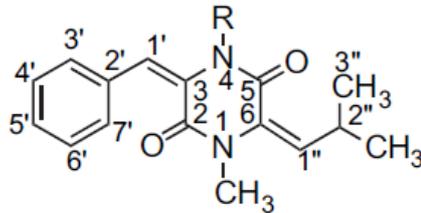


FIGURA 3: ESTRUTURAS DE TERPENTECINA (1) E TERPENTETRIENO (2)  
 Fonte: EGUCHI, 2003

Segundo, Tuntiwachwuttikul (2008), *Streptomyces* são micro-organismos promissores com alta capacidade de produzir actinomicinas biologicamente ativas. Em seu estudo foram isolados e identificados estruturalmente quatro novos compostos, lansai A-D (FIGURA 4), a partir de *Streptomyces* sp. que apresentaram atividades antifúngicas e anti-câncer.



LANSAI A (1): R = H, LANSAI B (2): R = CH<sub>3</sub>



LANSAI C (3): R = OH, LANSAI D (4): R = H

FIGURA 4: ESTRUTURAS DE LANSAI A-D (1-4)

Fonte: TUNTIWACHWUTTİKUL, 2008

A geldanamicina (GM) (FIGURA 5), pertencente à família das ansamicinas provenientes do metabolismo secundário de actinobactérias, é um agente anticancerígeno produzidos por *Streptomyces hygroscopicus*, que se liga ao sítio de ligação do ATP da proteína de choque 90 (HSP90) e inibe atividades dependentes de ATP que são críticas para suas interações com várias proteínas oncogênicas, necessárias para a transdução de sinal e transcrição durante a tumorigênese. Portanto, a GM e seus análogos são considerados anticancerígenos e potenciais agentes quimioterápicos. No entanto, devido à ocorrência de efeitos colaterais indesejados são necessários novos análogos com melhor perfil farmacológico. Neste estudo, verificou-se que a partir de linhagens geneticamente modificadas ocorreu a biossíntese de dois novos análogos de GM tricíclicos, DHQ5 (1) e DHQ6 (2) por alquilação de um C-21 posição C-12 e por adição eletrofílica do grupo hidroxila C-15 e com ótima atividade biológica (HONG, 2010).

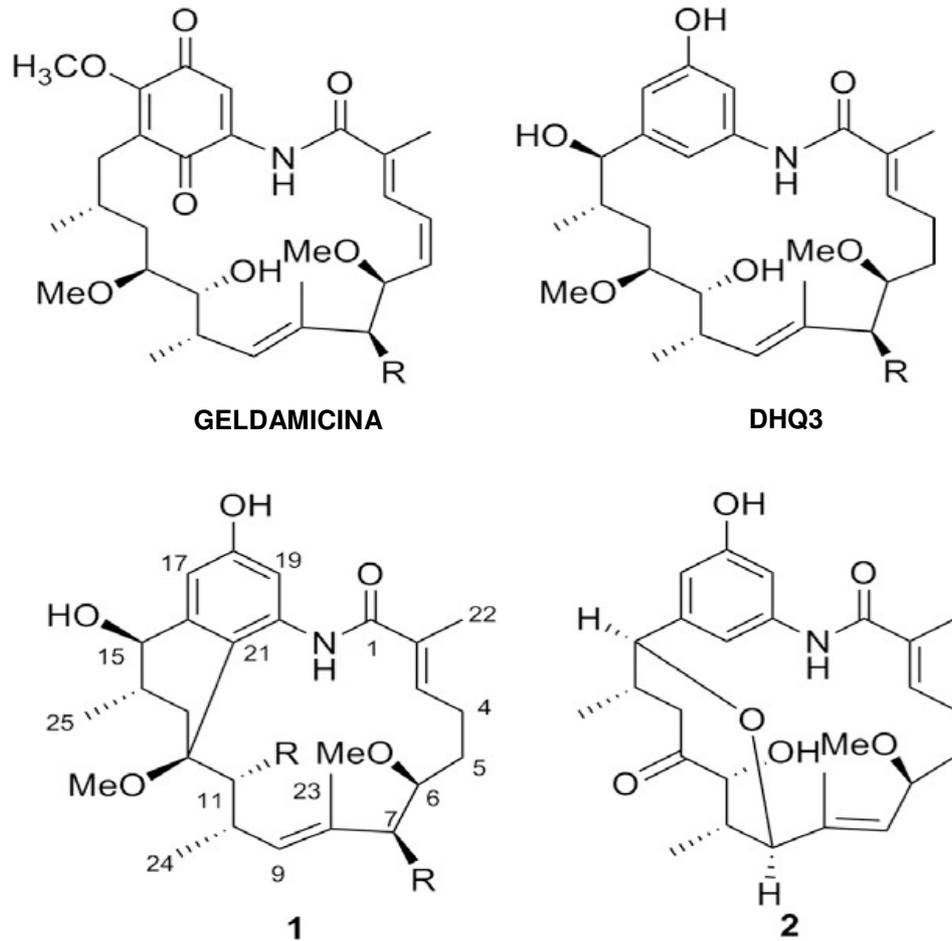


FIGURA 5: ESTRUTURAS DE GELDANAMICINA, DHQ3, E COMPOSTOS 1 E 2 (R = OCONH<sub>2</sub>).  
Fonte: HONG, 2010

Em análise química de metabólitos de actinobactérias realizada por Yuan (2010), a cepa *Streptomyces* sp. 211726, isolada de solo de mangue, apresentou uma produtividade notável de lactonas macrocíclicas. O fracionamento resultou no isolamento de uma nova lactona macrocíclica, cuja estrutura foi caracterizada como 2-1 éster etil pentílico da azalomicina F4A (FIGURA 6) com base em evidências espectroscópicas, e três conhecidas lactonas macrocíclicas azalomicinas F3A, F4A e F5A, foram simultaneamente isoladas dos metabólitos da cepa. Estes quatro compostos apresentaram largo espectro de atividade antifúngica, e as concentrações inibitórias mínimas contra *Candida albicans* ATCC 10231 de azalomicinas F3A, F4A e F5A foram 2,34 mg/mL, 1,56 mg/mL, 3,13 mg/mL e 3,13 mg/mL, respectivamente. Estes compostos, também, apresentaram efeitos citotóxicos contra células de tumor de cólon humano HCT-116.

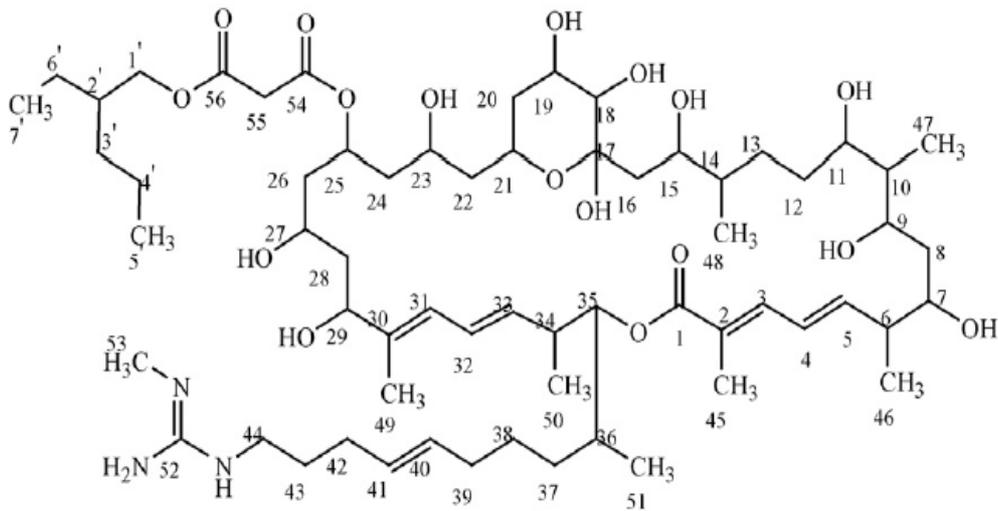


FIGURA 6: ESTRUTURA DE AZALOMICINA F4A  
 Fonte: YUAN, 2010

A incidência de infecções por bactérias resistentes aos medicamentos continua a aumentar e ainda é uma ameaça grave para a saúde humana. Em 2007, nos EUA, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) informou que o número de infecções graves causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) estava perto de 100.000 por ano, com quase 19.000 mortes relacionadas. O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (também conhecido pela sigla MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é uma bactéria que se tornou resistente a vários antibióticos, primeiro a Penicilina em 1947, e logo depois à Meticilina. Foi descoberto originalmente no Reino Unido e atualmente está muito propagado, principalmente em ambientes hospitalares, onde devido à resistência crescente, o *Staphylococcus aureus* (estafilococo dourado) é chamado de super-bactéria (CDC, 2011).

Produtos naturais, como, por exemplo, bactérias marinhas pertencentes à ordem Actinomycetales, oferecem uma rica fonte de moléculas bioativas que têm potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. O gênero *Salinispora* apresentou um impressionante conjunto de compostos estruturalmente diversos, incluindo salinosporamide A, que atualmente está sendo utilizado em ensaios clínicos para o tratamento de câncer. Estes compostos incluem antibióticos potentes da classe rifamicina, que são obtidos a partir de extratos de *Salinispora arenicola*. Foi observado por absorção de UV-Vis, que provavelmente um derivado

de quinona, o novo antibiótico arenimicina (FIGURA 7), obtido a partir do caldo de cultura após fracionamento biomonitorado, seguido de purificação da fração ativa, apresenta potente atividade antimicrobiana contra estafilococos resistentes aos medicamentos. Esta estrutura, que foi isolada a partir da actinobactéria *S. arenicola*, está sendo pela primeira vez identificada como pertencente à classe de antibióticos rifamicina (ASOLKAR *et al.*, 2010).

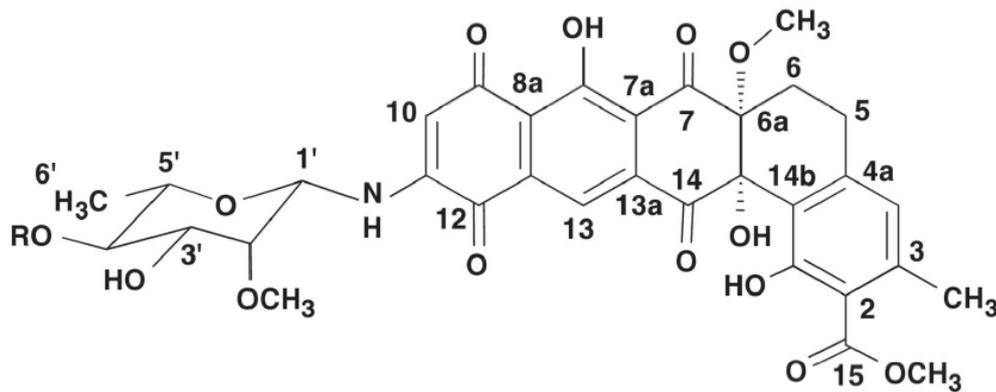


FIGURA 7: ESTRUTURA DE ARENIMICINA (1, R=H)  
Fonte: ASOLKAR, 2010

Em estudo realizado por BUGNI (2006), investigou-se extratos obtidos a partir do cultivo de uma actinobactéria marinha pertencente ao gênero *Streptomyces* sp, como fonte de metabólitos secundários estruturalmente diferentes. Assim, três novos alcalóides pirrolizidínicos tipo bohemamina (FIGURA 8) foram isolados bohemamina B, bohemamina C e C-5-chlorobohemamina, sendo que estes alcalóides foram atribuídos a tais grupos através da metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação ao nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular, é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se nas propriedades físicas e químicas da matéria, interpretando-se como um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos. Em química, a espectroscopia de RMN é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos usando técnicas uni- ou bidimensionais simples. Trata-se de uma

técnica não destrutiva que permite a análise de compostos orgânicos e inorgânicos (CORREIA, 2002).

Desde a sua descoberta, em 1946, Felix Bloch e Edward Purcell, citado por Correia, 2002, a espectroscopia de RMN tem tido um rápido crescimento devido aos contínuos avanços da tecnologia.

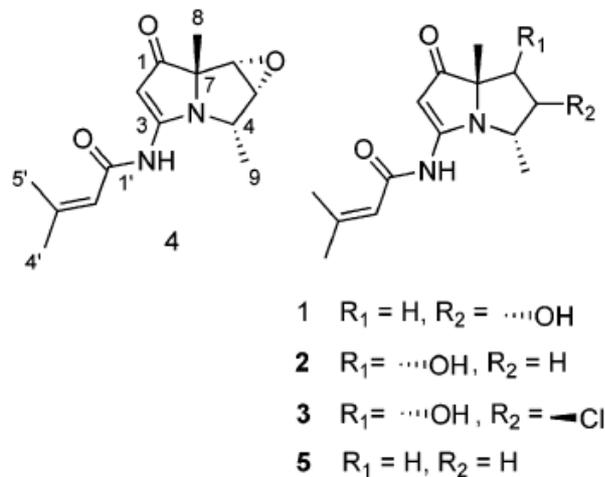


FIGURA 8: ESTRUTURA DE BOHEMAMINA  
 Fonte: BUGNI, 2006

A ressonância magnética baseia-se na observação de que núcleos magnéticos tais como hidrogênio, carbono, fósforo e nitrogênio podem absorver energia em frequências características, quando colocados em um campo magnético (CORRADI *et al.*, 2006).

A espectroscopia RMN depende das variações de energia quantificáveis que podem ser induzidas em pequenas moléculas quando estas são irradiadas por radiação eletromagnética. Os requisitos energéticos da RMN (10-6 kJ/mol) são relativamente pequenos quando comparados com outras técnicas espectrofotométricas (a radiação de infravermelho situa-se nos 10-4 kJ/mol; ultravioleta no intervalo 160-1300 kJ/mol). Este tipo de espectroscopia está relacionado com as transições induzidas pelas radiofrequências (rf) entre estados quantificados de energia dos núcleos orientados num campo magnético. O método funciona, de uma forma geral, da seguinte maneira: o núcleo de certos elementos e

isótopos comporta-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Quando se coloca um composto contendo átomos de  $^1\text{H}$  ou de  $^{13}\text{C}$  num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética os núcleos podem absorver energia num processo denominado de ressonância magnética. A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantificada e dá origem a um espectro característico (CORREIA, 2002).

Por volta de 1950, descobriu-se que as frequências de ressonância nuclear não dependem apenas da natureza dos núcleos atômicos, mas também do ambiente químico. A utilidade desta técnica tornou-se então muito óbvia, na medida em que poderia ser utilizada para determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto. Porém, quando associada a outros métodos espectroscópicos, a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN, revolucionou a metodologia de identificação e caracterização das moléculas fornecendo um grande volume de informações, fruto dos efeitos das ações inter- e intramoleculares sobre os valores da força do campo magnético ao nível dos núcleos das moléculas (CORREIA, 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.1.1 Isolados de actinobactérias

Foram selecionados 116 isolados de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*. Os isolados estão depositados no banco biológico do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) na Universidade Federal do Paraná.

#### 4.1.2 Micro-organismos patogênicos utilizados nos testes de antagonismo

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes linhagens de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA - linhagem selvagem, Hospital Universitário de Curitiba, PR) linhagens cedidas gentilmente pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréia Emilia Sthingen do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

### 4.2.1 Meio Extrato de Malte

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Extrato de malte    | 8,0 g     |
| Glicose             | 20,0 g    |
| Extrato de levedura | 4,0 g     |
| Água destilada      | 1.000 mL  |
| pH a 25°C           | 7,3 ± 0,2 |

### 4.2.2 Caldo Mueller-Hinton (MH)

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Infusão de carne bovina  | 30,0 g    |
| Peptona de caseína ácida | 17,5 g    |
| Amido                    | 1,5 g     |
| Água destilada           | 1.000 mL  |
| pH a 25°C                | 7,3 ± 0,2 |

Para a obtenção do meio sólido Ágar Müller-Hinton (AMH) foi acrescentado o ágar em concentração de 17g/L.

#### 4.2.3 Meio Czapeck Dox

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Sacarose            | 30,0 g    |
| Nitrato de Sódio    | 3,0 g     |
| Fosfato Dipotássio  | 1,0 g     |
| Sulfato de Magnésio | 0,5 g     |
| Cloreto de Potássio | 0,5 g     |
| Sulfato Ferroso     | 0,01 g    |
| Água destilada      | 1.000 mL  |
| Ágar                | 15,0 g    |
| pH a 25°C           | 7,3 ± 0,2 |

Para a obtenção do Meio Czapeck Dox salino substituiu-se a água destilada por água salina, que foi preparada misturando-se 750 mL de água salgada envelhecida com 250 mL de água destilada.

#### 4.2.4 Meio Saboraud

|                |           |
|----------------|-----------|
| Glicose        | 40,0 g    |
| Peptona        | 10,0 g    |
| Ágar           | 15,0 g    |
| Água destilada | 1.000 mL  |
| pH a 25°C      | 5,6 ± 0,2 |

Corrigiu-se o pH para  $7,3 \pm 0,2$  adicionando-se NaOH 10% e/ou HCl 10% conforme a necessidade. Os meios de cultura foram autoclavados a  $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atm, por 20 minutos.

### 4.3 SOLUÇÕES

#### 4.3.1 Lactofenol de Amann

|                |         |
|----------------|---------|
| Ácido láctico  | 10,0 g  |
| Ácido fênico   | 10,0 g  |
| Glicerina      | 20,0 g  |
| Água destilada | 10,0 mL |

#### 4.3.2 Cristal violeta fenicada

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Cristal violeta       | 1,0 g  |
| Álcool a $95^{\circ}$ | 10 mL  |
| Fenol fundido         | 2,0 g  |
| Água destilada        | 100 mL |

#### 4.3.3 Lugol

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Iodo metálico      | 1,0 g  |
| Iodeto de Potássio | 2,0 g  |
| Água destilada     | 300 mL |

#### 4.3.4 Fucsina básica

|                |              |
|----------------|--------------|
| Fucsina básica | 0,1 ou 0,2 g |
| Água destilada | 100 mL       |

#### 4.3.5 Tampão CTAB

|                  |              |
|------------------|--------------|
| CTAB             | 2,0 g        |
| Cloreto de sódio | 8,12 g       |
| EDTA             | 4,0 g        |
| Tris             | 10 mL        |
| PVP              | 10,0 g       |
| Água miliq       | q.s.p.100 mL |

#### 4.3.6 Clorofil/ CIA – Clorofórmio Álcool isoamílico

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Clorofórmio       | 96 ml |
| Álcool isoamílico | 4 mL  |

#### 4.3.7 TBE 5X

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris-base    | 54,0 g |
| Ácido bórico | 27,5 g |
| EDTA 0,5M    | 20 mL  |

Os sais foram dissolvidos em 800mL de água mili-Q. Completou-se o volume para 1000 mL.

#### 4.4 COLETA E ISOLAMENTO

As coletas de sedimento foram realizadas nos dias 01 e 02 de fevereiro de 2007, entre as 7 e 11 horas (entre o final da vazante e o início de enchente de sizígia). Foi coletado sedimento superficial (2-3 cm de profundidade) das regiões entre-marés em quinze estações distribuídas em torno de toda a extensão da Ilha do Mel (Figuras 2 e 3). As amostras foram coletadas em dois pontos diferentes (um próximo da linha d'água, ponto A, e outro mais distante, ponto B).

De cada amostra foram medidos 15 cm<sup>3</sup> de sedimento com auxílio de seringas plásticas, com a extremidade seccionada, e colheres de café esterilizada, acondicionados em Erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados e diluídos com 135 mL de água destilada. Os frascos foram agitados em agitador de Erlenmeyers por 10 minutos a 80 rpm e o sedimento decantado durante 10 minutos, seguindo metodologia descrita por KOLM *et al.*, (1999). Em seguida foram retirados 2,0 mL do sobrenadante e distribuídos em 5 placas de Petri (0,2 mL por placa) contendo meio de cultura Czapeck Dox (ITEM 4.2.3) e 5 placas contendo meio de cultura Czapeck Dox salino (ITEM 4.2.3) (0,2 mL por placa). A solução foi espalhada nas placas com o auxílio de uma alça de Drigalsky e incubada em estufa à 28°C por no máximo 7 dias. Depois de isoladas em placas de Petri as colônias de actinobactérias foram repicadas, respectivamente, em tubos de ensaio com meio de cultura Czapeck Dox (ITEM 4.2.3) e Czapeck Dox salino (ITEM 4.2.3) inclinado para a realização do estoque desta coleção. A coleção foi mantida a 4°C, realizando-se repiques a cada 3 meses. A figura 9 mostra as estações de coleta.

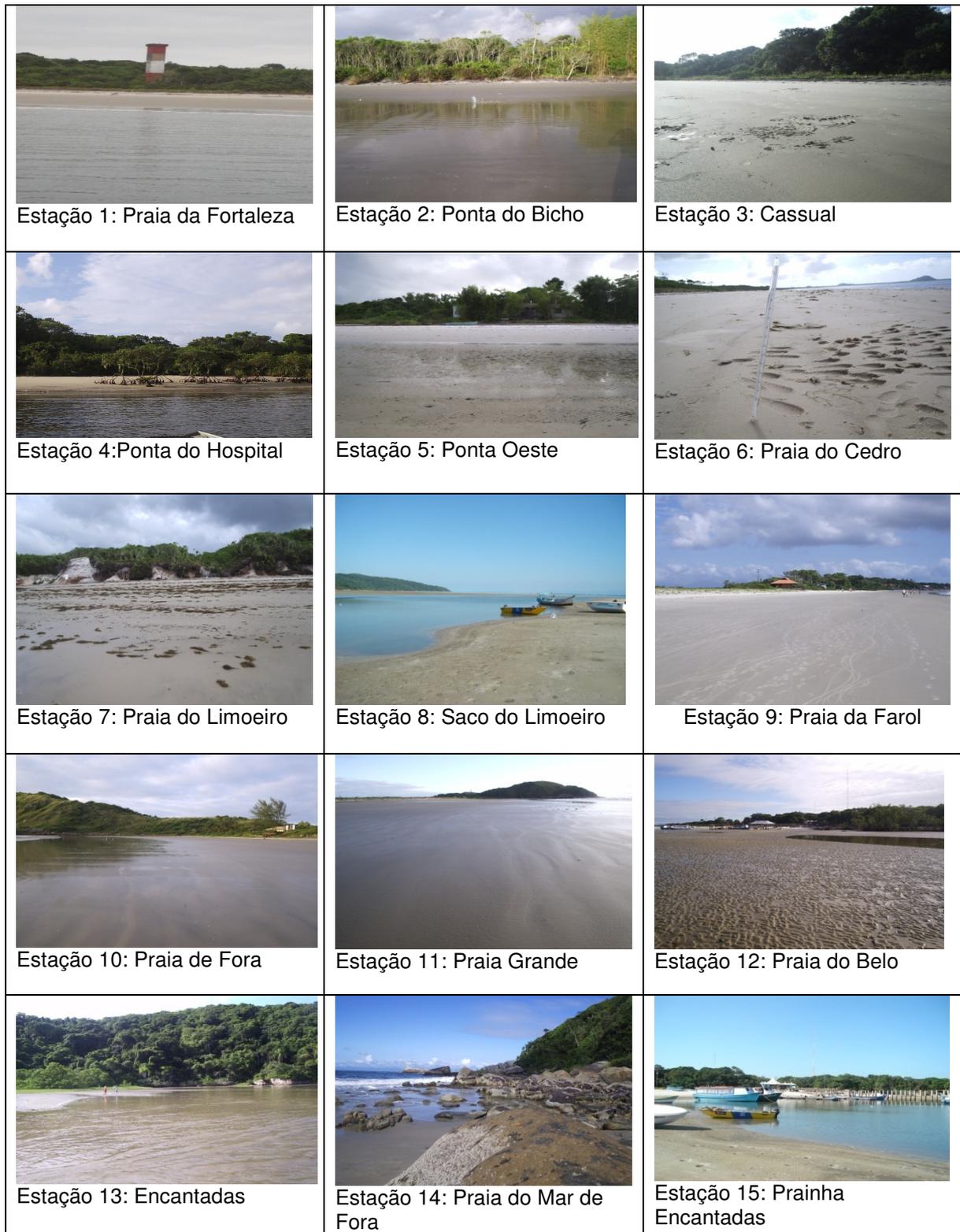


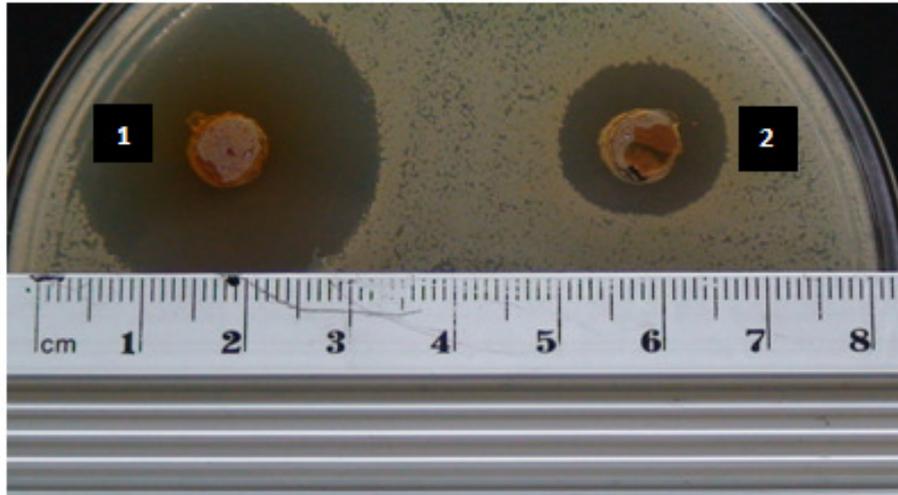
FIGURA 9 - AS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA NA ILHA DO MEL, PARANÁ.  
 FONTE: O autor, 2007.

## 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL

### 4.5.1 Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2003)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada em ensaios biológicos qualitativos, em triplicata. Os 116 isolados de actinobactérias foram incubados em meio Czapeck Dox (ITEM 4.2.3), Czapeck Dox salino (ITEM 4.2.3) e Saboraud (ITEM 4.2.4) por sete a quatorze dias, dependendo da taxa de crescimento do micro-organismo, a 28°C. Com o auxílio de um vazador de rolhas de 6 mm de diâmetro, foram retirados cilindros de ágar com o crescimento bacteriano.

Em placas de Petri contendo 30 mL de Ágar Müller-Hinton (MHA) (ITEM 4.2.2) foram feitos, em cada placa, seis orifícios de 6 mm de diâmetro, sendo um para o controle negativo (somente ágar), um para o controle positivo (gentamicina 0,2mg/mL para bactérias e nistatina 100000UI/mL para leveduras). Feitos os orifícios, inoculou-se com o auxílio de um *swab*, na superfície do meio de cultura, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231), respectivamente. Os inóculos apresentavam uma concentração de 10<sup>6</sup>UFC/mL para bactérias e 10<sup>8</sup>UFC/mL para a levedura e foram originários de uma cultura prévia em meio MHA (ITEM 4.2.2) de 24 horas. A concentração do inóculo foi ajustada com o auxílio de uma escala MacFarland nº5. Em seguida, os cilindros contendo os micro-organismos foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton (ITEM 4.2.2). Cada placa recebeu quatro fragmentos de actinobactérias. Após a distribuição destes fragmentos as placas foram incubadas a 35°C por 24 a 48 horas, respectivamente, para bactérias e levedura. Para a análise dos resultados foi investigada a presença de halos de inibição do crescimento bacteriano ou leveduriforme (FIGURA 10).



Legenda: 1 e 2: Isolados de actinobactérias com a formação de halo de inibição. A placa inoculada com a cepa patogênica foi incubada à 35°C por 24 horas.

FIGURA 10: TESTE DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DOS POÇOS.  
Fonte: O autor (2010)

#### 4.5.2 Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido

Para o cultivo em meio líquido, os isolados de actinobactérias selecionados (TABELA 1) foram inoculados em placas de Petri contendo o meio sólido Czapeck Dox e Czapeck Dox salino (ITEM 4.2.3). Após o crescimento por sete a quatorze dias a 28°C, eles foram inoculados em 50 mL de meio líquido contendo extrato de malte (ITEM 4.2.1) e incubados sob agitação a 150 rpm a 28 °C por 7 dias para a análise em escala analítica.

Após a seleção dos isolados que apresentaram maior rendimento de extrato bruto, estes foram novamente cultivados em placas de Petri contendo meio sólido Czapeck Dox e Czapeck Dox salino (ITEM 4.2.3) (TABELA 1). Após o crescimento por sete a quatorze dias a 28°C, foram inoculados em 5 frascos Erlenmeyers com 50 mL de meio líquido extrato de malte (ITEM 4.2.1) em escala preparativa, com vistas ao isolamento dos compostos que apresentaram atividade antimicrobiana. Após este período, foram transferidos para 5 frascos Erlenmeyers contendo 150 mL de meio líquido extrato de malte (ITEM 4.2.1), sendo cultivados por mais 30 dias sob as mesmas condições da escala analítica.

TABELA 1: ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESCALA ANALÍTICA

| Cepas Patogênicas                                 | Extratos | Isolados de actinobactérias |
|---|----------|-----------------------------|
| <i>C. albicans</i>                                | G2       | AD G32 11A 60               |
| <i>S. aureus/C. albicans</i>                      | G4       | AD G27 12B 83<br>AS 3A 26   |
| <i>S. aureus/E. coli</i>                          | G6       | AD 3B 17                    |
| <i>S.aures/P. aeruginosa/C. albicans</i>          | G8       | AD 11B 76                   |
| <i>S.aures/P. aeruginosa/C. albicans /E. coli</i> | G9       | AD G34 12B 82               |

Legenda: G2 à G9: extratos obtidos dos isolados de actinobactérias. AD: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox realizado com água destilada. AS: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox salino realizado com água marinha. G25 à G35: morfotipos dos isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Nocardia*. Pontos 1A à 15A e 1B à 15B pontos de coleta nas quinze estações de coleta da região entre-marés da Ilha do Mel.

FONTE: O autor (2010)

#### 4.5.3 Obtenção do extrato bruto e suas frações

Após o período de incubação em escala preparativa do isolado selecionado AD 3B 17 (extrato G6), o caldo de fermentação foi filtrado à vácuo com papel filtro em funil de Büchner. Ao volume do filtrado obtido foram adicionados 200 mL de acetato de etila (AcOEt), agitando-se vigorosamente a solução para a formação de duas fases: uma aquosa, na parte inferior, e outra orgânica, na parte superior. A fase orgânica foi separada em um novo recipiente e a aquosa foi submetida a mais três extrações com 100 mL de AcOEt.

A fase orgânica foi evaporada à secura em rotavapor para o cálculo do rendimento (158,5 mg). A fração AcOEt foi submetida à técnicas cromatográficas diversas, utilizando-se solventes de polaridade adequada para o isolamento das substâncias de interesse (FIGURA 12).

A fração AcOEt foi submetida à cromatografia em coluna – CC1 (15 g de sílica gel 60 0,040-0,063 mm), utilizando-se como fase móvel clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>):metanol (MeOH) (98:2 a 95:5, 90:10 e MeOH) e foram coletadas 60 frações (FIGURA 13). As frações foram analisadas por CCD (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 95:5 e 90:10; vanilina sulfúrica) e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas.

As frações CC1 - 9 a 11 (103,2 mg) foram reunidas e purificadas em nova cromatografia em coluna – CC2 (10g de sílica gel 0,040-0,063 mm), utilizando-se como fase móvel AcOEt:hexano (90:10) e AcOEt 100%, coletando-se 73 frações. As frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 95:5; vanilina sulfúrica) e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. As frações CC2 - 15 a 25 (25,7 mg) e CC2 - 26 a 39 (38,5 mg) foram reunidas e submetidas à terceira (CC3) e quarta (CC4) cromatografia em coluna (2g de sílica gel 0,040-0,063 mm), respectivamente, utilizando-se como fase móvel  $\text{CHCl}_3$  100%,  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (99:1 e 98:2) e MeOH. As frações foram analisadas por CCD ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 95:5 e 90:10; vanilina sulfúrica) e a substância ativa majoritária foi isolada. As frações CC3- 2 a 16 (21,2mg) da terceira coluna e as frações CC4 - 1 a 4 (24,7 mg) da quarta coluna foram reunidas. O perfil cromatográfico do isolado AD 3B 17 pode ser observado na FIGURA 11.

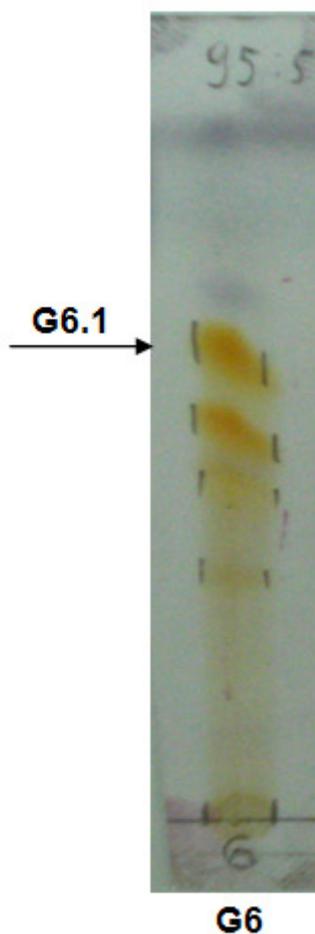


FIGURA 11 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO (G6) DE ACTINOBACTÉRIA (ISOLADO AD 3B 17). FASE MÓVEL  $\text{CHCl}_3$ : $\text{MEOH}$  (95:5 V/V) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA  
Fonte: O autor (2010)

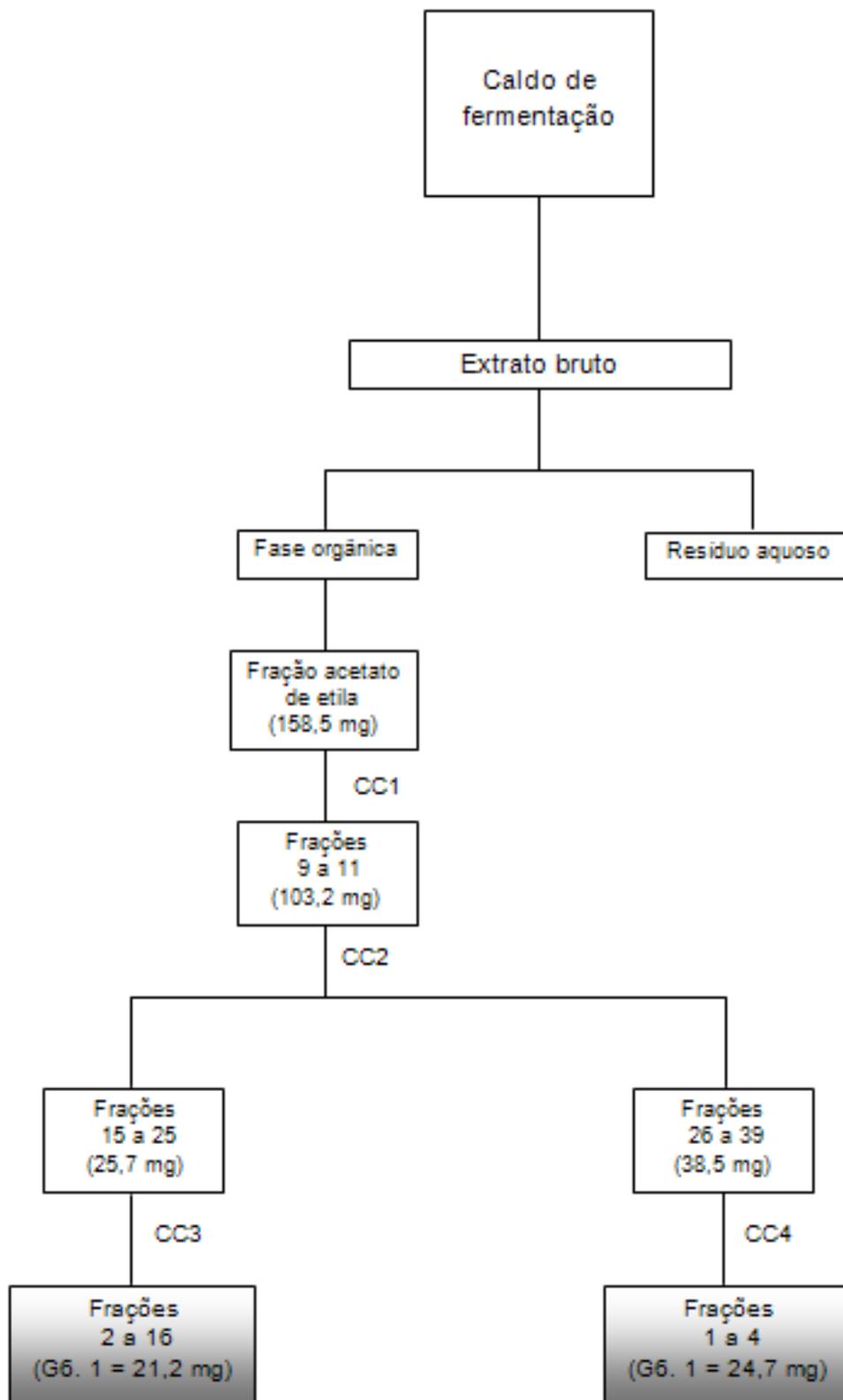


FIGURA 12: ESQUEMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS DE ISOLADO DE ACTINOBACTÉRIA. CC, CROMATOGRAFIA EM COLUNA.  
Fonte: O autor (2010)

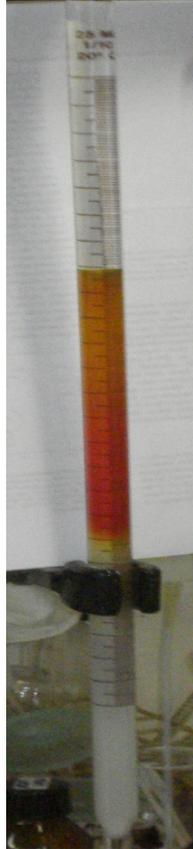


FIGURA 13: CROMATOGRAFIA EM COLUNA – CC1 (15 G DE SÍLICA GEL 60 0,040-0,063 MM), UTILIZANDO-SE COMO FASE MÓVEL CLOROFÓRMIO (CHCl<sub>3</sub>):METANOL (MEOH) (98:2 A 95:5, 90:10 E MEOH)

Fonte: O autor (2010)

#### 4.5.4 Bioautografia

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários obtidos foi utilizada a metodologia de bioautografia em cromatografia de camada delgada. As linhagens patogênicas (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Staphylococcus aureus* Meticilina - resistente (MRSA)) foram inoculadas em 10 mL de caldo Muller-Hinton (ITEM 4.2.2), homogeneizadas com auxílio de um agitador de tubos e incubadas a 35°C por 24 horas. A partir do tubo com o micro-organismo em meio líquido foi preparada uma diluição de 10<sup>6</sup>UFC/mL com base na escala MacFaland nº5. Desta, 100µL foram transferidos para um tubo de ensaio contendo

10mL de caldo Muller-Hinton (ITEM 4.2.2), agitado em agitador de tubos e incubado a 35°C por 48 horas.

Para testar os extratos obtidos a partir do líquido fermentativo extraído com acetato de etila foram utilizadas placas de sílicagel 60F254 (Merck®), conhecidas como placas de CCD (20x20), cortadas em quadrados de 6x6cm. Os extratos solubilizados em metanol foram aplicados em duplicata nos volumes de 5 a 10 µL em cada fileira na placa, reservando a quarta e última fileira da placa CCD para aplicação do controle positivo: gentamicina 200µg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, vancomicina 200µg/mL para MRSA e nistatina (100000UI/mL) no caso de levedura, utilizando-se as fases móveis clorofórmio:metanol (95:5 e 90:10).

Para a realização dos testes uma alíquota de 100µL do inóculo, preparado como descrito anteriormente, foi transferida para um tubo contendo 15mL de Ágar Muller-Hinton (ITEM 4.2.2) fundido, mantido em temperatura próxima aos 45°C, evitando a solidificação momentânea, mas permitindo que o micro-organismo fosse inoculado sem prejuízo. O tubo foi homogeneizado por cerca de 30 segundos com agitador de tubos e em seguida o meio foi vertido sobre a placa de CCD, mantida dentro de uma placa de Petri previamente esterilizada, já impregnada com os extratos. Esperou-se o meio solidificar para que a placa de Petri fosse tampada e incubada a 35°C por 24 horas.

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

#### 4.5.5 Elucidação Estrutural do composto isolado G6.1

O composto isolado G6.1 foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN<sup>13</sup> – C e RMN<sup>1</sup>– H) pelo equipamento Bruker 200/52 DPX – 200 no Departamento de Química da UFPR.

## 4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Após a seleção inicial dos isolados, aqueles que apresentaram potencial para produção de substâncias antimicrobianas foram identificados ao nível de gênero por meio de características macro e micromorfológicas. Ainda, os isolados de actinobactérias cujos extratos apresentaram atividade antimicrobiana foram sequenciados com os oligonucleotídeos específicos para rDNA 16S de actinomicetos para identificação ao nível de espécie.

### 4.6.1 Caracterização morfológica dos isolados

Para a caracterização morfológica foram utilizadas as técnicas de microcultivo (KERN, BLEWINS, 1999), coloração de Gram e microscopia óptica, na qual as lâminas de Gram foram visualizadas em microscópio óptico em aumento de 1000X e fotografadas.

#### 4.6.1.1 Microcultivo

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de meio de cultura de Czapeck Dox (ITEM 4.2.3) foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. Inoculou-se o isolado em todos os lados do cubo, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann (ITEM 4.3.1), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 400X e fotografadas.

#### 4.6.1.2 Coloração de Gram

Foi realizado o esfregaço depositando-se uma gota do isolado de cada actinobactéria ressuspensa sobre a lâmina e feito um esfregaço com auxílio da alça. Esperou-se secar os esfregaços ao ar em uma superfície plana até secar por completo. Passou-se de duas a três vezes pela chama, tomando cuidado para evitar distorções, pelo superaquecimento. Deixou-se esfriar o esfregaço antes de corar. Cobriu-se o esfregaço por 1 minuto com solução fenicada de cristal violeta (ITEM 4.3.2). Escorreu-se o corante e cobriu-se o esfregaço, durante 1 minuto, com solução de lugol (ITEM 4.3.3) fraco. Lavou-se em água corrente. Descorou-se com álcool 95 °GL, até o descorante fluir límpido. Cobriu-se o esfregaço com solução de fucsina (ITEM 4.3.4) básica por 30 segundos.

#### 4.6.2 Caracterização molecular dos isolados

##### 4.6.2.1 Extração de DNA (VICENTE, 2000)

Os isolados foram cultivados em meio Czapeck Dox sólido (ITEM 4.2.3), a 28°C por 72 horas. Em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado cerca de 1 cm<sup>2</sup> de micélio das culturas, evitando trazer o ágar. Em seguida foram vertidos 300µL de tampão CTAB (ITEM 4.3.5) no Eppendorf e macerado o micélio, com maceradores, previamente esterilizados, por 5 minutos. Na sequência foram adicionados mais 200µL de tampão CTAB (ITEM 4.3.5) e misturados bem em um agitador de tubos e incubados em banho-maria por 10 minutos à 65°C. Foram adicionados 500 µL de CIA (ITEM 4.3.6) e centrifugado por 7 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro Eppendorf, adicionados mais 500 µL de CIA (ITEM 4.3.6) e centrifugado por 7 minutos a 1200 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro Eppendorf. Depois desta etapa foram adicionados 2 volumes (800 µL) de etanol 96% e agitado delicadamente. Em seguida, o DNA foi precipitado, colocando o Eppendorf no freezer (-20°C) *overnight*. No dia seguinte a amostra foi

centrifugada por 7 minutos a 1200 rpm e descartado o sobrenadante cuidadosamente (etanol). Em seguida o pellet de DNA foi lavado em 500 µL de etanol 70% e girado com cuidado, misturando levemente, centrifugado mais 7 minutos a 1200 rpm, retirado o sobrenadante (etanol) com auxílio de uma micropipeta e deixado o DNA desidratar por 15 minutos. O pellet foi ressuspensão em 100 µL de água miliQ, e deixado por volta de 2 horas (ou *overnight*) em temperatura ambiente. Finalmente ele foi reservado em freezer -20°C. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (marca: Thermo Fisher Scientific Launches New NanoDrop 2000)

#### 4.6.2.2. Amplificação do rDNA 16S de actinobactérias por PCR

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores Sm6F e Sm5R, específicos para a família *Streptomycetaceae*, 21F e 959R, específicos para família *Streptosporangiaceae*, M2F e A3R, específicos para família *Micromonosporaceae*, AMY2 e ATOP, específicos para gênero *Amycolatopsis spp* que amplificam a região 16S do rDNA, seguindo as condições descritas a seguir (QUADRO 1).

QUADRO 1. OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MEMBROS DA CLASSE ACTINOBACTERIA

| Target taxa                 | Primer                                     | Seqüência 5'-3'                                    | Temperatura de anelamento | Fragmento amplificado (pb) | Referência                       |
|-----------------------------|--|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| <i>Actinobacteria</i>       | S-C-Act-0235-a-S-20<br>S-C-Act-0878-a-A-19 | CGCGGCCTATCAGCTTGTG<br>CCGTACTCCCCAGGCGGGG         | 60°C                      | 640                        | N/A                              |
| <i>Amycolatopsis</i> spp.   | AMY2<br>ATOP <sup>b</sup>                  | GGTGTGGGCGACATCCACGTTGT<br>GCTGGTACAGAGGGCTGCGATAC | 55°C                      | 450                        | Tan (2006)                       |
| <i>Micromonosporaceae</i>   | M2F<br>A3R                                 | SAGAAGAAGCGCCGCC<br>CCAGCCCCACCTTCGAC              | 65°C                      | 1000                       | Pisano <i>et al.</i> (2002)      |
| <i>Pseudonocardia</i> spp.  | AMP2<br>AMP3                               | GTGGAAAGTTTTTCGGCTGGGG<br>GCGGCACAGAGACCGTGAAT     | 60°C                      | 640                        | Desconhecido                     |
| <i>Streptomycetaceae</i>    | Sm6F<br>Sm5R                               | GGTGGCGAAGGCGGA<br>GAACTGAGACCGCTTTTTGA            | 65°                       | 600                        | Monciardini <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Streptosporangiaceae</i> | 21F<br>959R                                | GACGAARNTGACGTGTA<br>CGTTGCGTCTAATTAAGCAA          | 58°C                      | 500                        | Hayakawa and Nonomura 1987       |
| <i>Thermomonosporaceae</i>  | T3F<br>T8R                                 | GGGAGAATGGAATTCCC<br>CCCCACCTTCGACC                | 59°C                      | 800                        | Athalye <i>et al.</i> (1985)     |
| Universal <sup>a</sup>      | 27f<br>152Sr <sup>b</sup>                  | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG<br>AAGGAGCTCWTCCARCC          | 55°C                      | 1500                       | N/A                              |

N/A, Não aplicável.

<sup>a</sup>Estes oligonucleotídeos são universais e não são específicos para ordem *Actinomycetales*.

<sup>b</sup>Seqüências complementares estão mostradas pelo oligonucleotídeo reverso

Fonte: MALDONADO *et al.*, 2005

A amplificação para a amostra de actinobactérias seguiu as condições descritas por Monciardini *et al.* (2002) contendo: 50ng de DNA extraído, tampão da reação 1X, 1,5U de *Taq* polimerase, 0,5µM de *primers* (25pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> em um volume final de 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 65°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C para os oligonucleotídeos iniciadores Sm6F e Sm5R. Para os oligonucleotídeos iniciadores 21F e 959R as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 1 minuto a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C. Para os oligonucleotídeos iniciadores M2F e A3R as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 2 minutos a 68°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C. Para os oligonucleotídeos iniciadores AMY2 e ATOP as condições foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 25 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 65°C e 60 segundos a 72°C, e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v em TBE1x utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (100pb *Ludwing Biotec*).

Para a purificação dos produtos de PCR foram acrescentados 50µL de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Após este período os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13800g. Então, o sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125µL de etanol 80% gelado permanecendo em contato por 1 minuto antes de nova centrifugação a 13800g por 2 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e ao restante adicionado 125µL de etanol absoluto pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado resultando em um *pellet*, que foi ressuscitado em 15µL de água ultrapura permanecendo em repouso a temperatura ambiente por pelo menos 53 horas. Após a purificação, os produtos foram quantificados em gel de agarose 1% (p/v em TBE 1x) utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (100pb *Ludwing Biotec*).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 COLETA E ISOLAMENTO

No presente trabalho foram realizadas as coletas em dois dias, 01 e 02 de fevereiro de 2007, entre as 7 e 11 horas (entre o final da vazante e o início de enchente de sizígia). Foi coletado sedimento superficial (2-3 cm de profundidade) das regiões entre-marés em quinze estações distribuídas em torno de toda a extensão da Ilha do Mel (FIGURAS 2 e 3). As amostras foram coletadas em dois pontos diferentes (um próximo da linha d'água, ponto A, e outro mais distante, ponto B). Como pode ser observado na Figura 14 a maior quantidade de actinobactérias (86 colônias =  $1,46 \times 10^3$  UFC/mL) foram isoladas na estação 3, seguidas das estações 1 (10 UFC/mL), 2 (9 UFC/mL) e 4 (8 UFC/mL), todas pertencentes principalmente ao gênero *Streptomyces* e *Nocardia*. O resultado encontrado justifica-se por serem estações localizadas próximo ao Canal Sueste que drena principalmente águas oriundas do setor norte do estuário (Baías das Laranjeiras e Guaraqueçaba e enseada do Benito). No setor norte encontra-se todas as áreas protegidas (Parque Nacional do Superagüi, Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba) do complexo estuarino. Esta área apresenta deposição de matéria orgânica no sedimento, proporcionando às actinobactérias um ambiente propício, pois as mesmas apresentam um papel importante na degradação da celulose e na decomposição do ácido úrico. Rheinheimer (1987) observou que na decomposição de sedimentos destaca-se o gênero *Streptomyces* e na oxidação de hidrocarbonetos alifáticos, principalmente o gênero *Nocardia*. Os pontos 2, 3 e 4 também estão localizados na Estação Ecológica da Ilha do Mel. Além disto, Miquelante (2007), que fez coletas simultâneas nas regiões entre-marés da ilha, encontrou baixíssimas quantidades de *E. coli* no sedimento destas estações. Resultados semelhantes aos das actinobactérias foram observados para os fungos (PORSANI, 2007). Ainda vale ressaltar que, em estudos realizados pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e publicados em 2007, a região da Ilha do Mel em que se encontram as estações 3 e 4, é considerada de excelente qualidade.

Segundo KOLM<sup>1</sup> (2007) observações anteriores não publicadas foram encontradas, na região do Complexo Estuarino de Paranaguá e regiões adjacentes, actinobactérias em sedimentos da região das dunas eólicas de uma praia em Pontal do Sul e em águas superficiais na região oligohalina do interior da Baía de Paranaguá, e que, portanto há indícios de que estas deveriam ter sido de origem terrestre.

Os únicos locais onde não foram encontradas actinobactérias foram nas estações 10 e 15 (FIGURA 14). Junto a estas estações localizam-se dois povoados (Nova Brasília e Encantadas) com restaurantes e pousadas construídos próximo à linha da praia. Em Encantadas ainda existe um trapiche para barcos, localizado junto a um canal artificial que recentemente foi dragado e cujos sedimentos foram depositados nas laterais onde formaram bancos de areia. Estes locais ainda caracterizam-se por serem muito frequentados, principalmente no verão, por turistas e por ter sido retirada todas as vegetações típicas desta região. A ausência de actinobactérias nestas estações pode ser um indicativo da presença de poluentes, devido à grande influência antrópica, inibindo seu crescimento e desenvolvimento.

---

<sup>1</sup> KOLM, H. E. Universidade Federal do Paraná (UFPR) / Centro de Estudos do Mar. Comunicação pessoal, 2007.

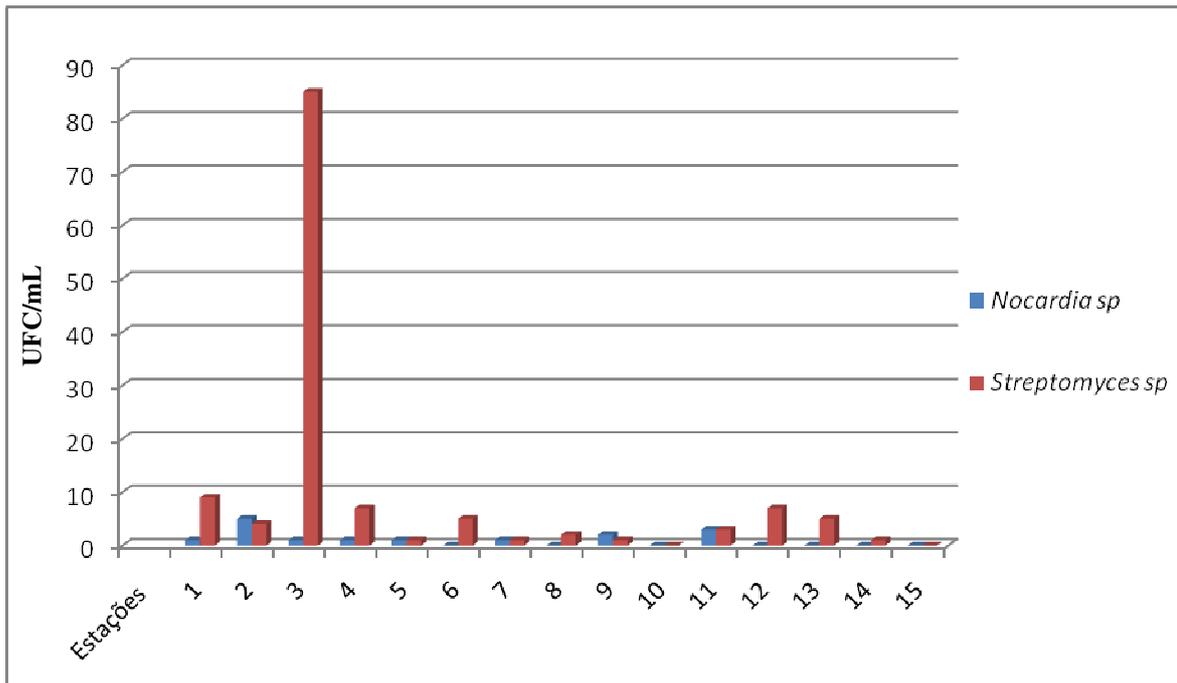


FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEDIMENTO SUPERFICIAL DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NAS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NA ILHA DO MEL, PARANÁ-BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 7 A 14 DIAS A 28°C. FONTE: O autor (2010)

As comunidades de micro-organismos que estão presentes em regiões entremares de ambientes marinhos realizam processos essenciais que contribuem para o funcionamento das zonas costeiras, como por exemplo, a ciclagem do carbono e também a transferência de metal e remoção de poluentes orgânicos para níveis tróficos superiores. Portanto, estes micro-organismos podem servir como bioindicadores do ecossistema. As condições da região entre-marés são extremas, devido aos ciclos de maré, resultando em gradientes de umidade, temperatura, a ação das ondas, a radiação UV, nutrientes e salinidade. Tais condições favorecem o desenvolvimento e a disseminação de determinados micro-organismos com processos fisiológicos e metabólitos particulares. Estes organismos têm demonstrado um grande potencial para a inovação em diversos setores biotecnológicos, através da produção de metabólitos secundários, biopolímeros, lipídios e enzimas. No entanto, há ainda um número limitado de micro-organismos da região entre-marés sendo avaliados em termos biotecnológicos, quando comparado com o número de micro-organismos estudados que se originam de outras habitats extremos (ORTEGA-MORALES, 2010).

Em estudo realizado por JIANG *et al.*(2007), foram isoladas um total de 54 actinobactérias marinhas a partir de esponjas marinhas coletadas em águas rasas do Mar da China Meridional. Já em estudo realizado por TADDEI *et al.* (2006), o gênero *Streptomyces* sp. representou a maioria dos 71 isolados a partir de amostras de solo coletadas em diferentes localidades do norte e centro-norte da Venezuela. Enquanto que UJIKAWA (2003), isolou 41 cepas de actinobactérias produtoras de metabólitos bioativos de várias amostras de solo coletadas em matas fechadas e semi-úmidas da região de Araraquara, SP, Brasil.

No presente trabalho, dos 116 isolados de actinobactérias, 54 cresceram em meio de cultura preparado com água doce (TABELA 2). Isto sugere que, apesar de serem originários de ambiente terrestre, eles são halotolerantes e têm a capacidade de sobreviver em água salgada.

Em estudos realizados por LU (2009), a linhagem GB-2 foi identificada como uma actinobactéria isolada a partir de uma amostra de sedimento do litoral de Lianyungang na China. Esta linhagem apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro e produziu Sisomicina, pela primeira vez identificada em actinobactérias, indicando que, através da evolução e mutação, o ambiente marinho apresenta grande biodiversidade. Assim, a linhagem GB-2 foi considerada uma variedade que sofreu adaptação ao ambiente marinho e apresentou alta tolerância à concentração de NaCl.

TABELA 2 - ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DO SEDIMENTO SUPERFICIAL DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NAS QUINZE ESTAÇÕES DE COLETA DA REGIÃO ENTRE-MARÉS NA ILHA DO MEL, PARANÁ-BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 7 A 14 DIAS A 28°C

| Estação           | Local: A         |                  | Local: B         |                  |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                   | nº indivíduos AS | nº indivíduos AD | nº indivíduos AS | nº indivíduos AD |
| 1                 | 2                | 1                | 0                | 0                |
| 2                 | 2                | 0                | 1                | 1                |
| 3                 | 36               | 23               | 15               | 3                |
| 4                 | 2                | 2                | 1                | 0                |
| 5                 | 1                | 0                | 0                | 1                |
| 6                 | 0                | 2                | 0                | 3                |
| 7                 | 0                | 2                | 0                | 0                |
| 8                 | 0                | 1                | 0                | 0                |
| 9                 | 0                | 1                | 0                | 0                |
| 10                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| 11                | 0                | 3                | 0                | 4                |
| 12                | 2                | 2                | 0                | 3                |
| 13                | 0                | 2                | 0                | 0                |
| 14                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| 15                | 0                | 0                | 0                | 0                |
| <b>Subtotal</b>   | 45               | 39               | 17               | 15               |
| <b>TOTAL: 116</b> |                  |                  |                  |                  |

Legenda: As amostras foram coletadas em dois pontos diferentes, um próximo da linha d'água, Local A, e outro mais distante, Local B. AS: água salgada , AD: água doce  
 FONTE: O autor (2010)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL

### 5.2.1 Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2003)

A escolha dos micro-organismos para a avaliação da atividade antimicrobiana foi efetuada levando em consideração a presença de ao menos um representante dos seguintes grupos de importância clínica: Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras. Dentre os Gram-positivos foi escolhido *Staphylococcus aureus*, pois esta é uma das bactérias com forte tendência a adquirir resistência aos antibióticos, tanto que há isolados clínicos multiresistentes. Entre os Gram-negativos foram selecionadas as espécies *Pseudomonas aeruginosa*, por ser um patógeno com mecanismos de resistência intrínsecos, de difícil tratamento, que causa infecções fatais como em casos de feridas, queimaduras, infecções crônicas, além de infecções fatais nos pulmões em pacientes com fibrose cística; e *Escherichia coli*, que apresenta importância clínica e possui a característica de adquirir resistência antimicrobiana (FUCHS, WANNMACHER, 1998). A espécie *Candida albicans* foi escolhida por ser uma levedura frequentemente isolada na clínica como patógeno oportunista. As infecções fúngicas também ocorrem com frequência em pulmão, rim, coração e em transplantados de pulmão, geralmente tendo como agente causador *Candida* e *Aspergillus* spp (DEMAIN, 2006).

O antibiótico gentamicina foi empregado como controle positivo para as bactérias devido ao seu mecanismo de ação de inibição da síntese de proteínas bacterianas, pela ação em seus ribossomos, o que lhe confere uma característica de amplo espectro; a nistatina, antifúngico que altera a permeabilidade da membrana de fungos patogênicos e saprofíticos causando a morte celular, foi selecionada como controle positivo contra *C. albicans*, por ser o fármaco de escolha contra esta levedura em infecções cutâneas e de mucosa superficial (FUCHS, WANNMACHER, 1998).

Diversos meios de cultivo e tempos de incubação são utilizados para o desenvolvimento de actinobactérias, entretanto, a escolha de um meio de cultivo é

essencial para o sucesso do processo de crescimento e metabolismo do micro-organismo. O meio escolhido deve fornecer nutrientes necessários para a síntese de material celular, em especial merecem destaque as fontes de nitrogênio, carbono e energia. A maioria das actinobactérias é capaz de crescer em meios bacteriológicos (RANDALL *et al.*, 2009).

Para a comparação entre os meios de cultivos, os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio Czapeck Dox, Czapeck Dox salino e Saboraud (FIGURA 15). Os compostos ativos foram produzidos tanto no meio Czapeck Dox, Czapeck Dox salino como em meio Saboraud, demonstrando que estes meios podem ser utilizados para a obtenção de componentes provenientes do metabolismo secundário. Contudo, pode-se observar que ocorreu maior número de isolados de actinobactérias, cultivadas em meio Saboraud, com atividade contra as cepas patogênicas de *S. aureus* (56 isolados de actinobactérias) e *C. albicans* (63 isolados de actinobactérias), quando comparadas com os isolados de actinobactérias cultivadas em meio Czapeck Dox (11 e 20 isolados de actinobactérias, respectivamente).

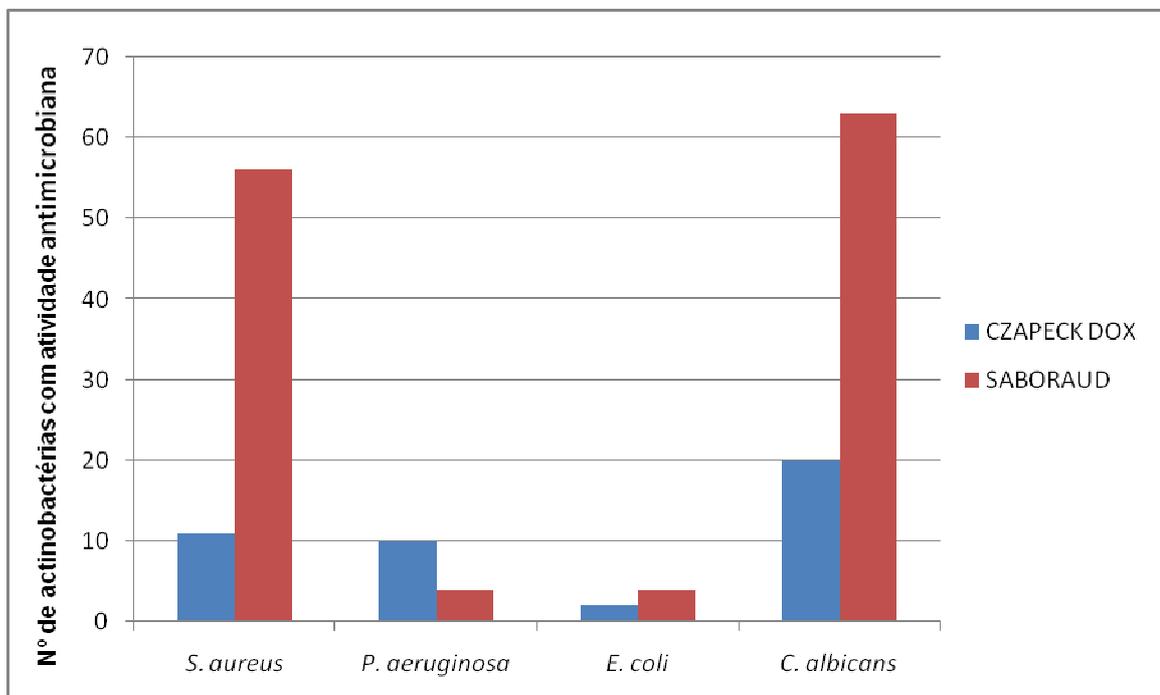
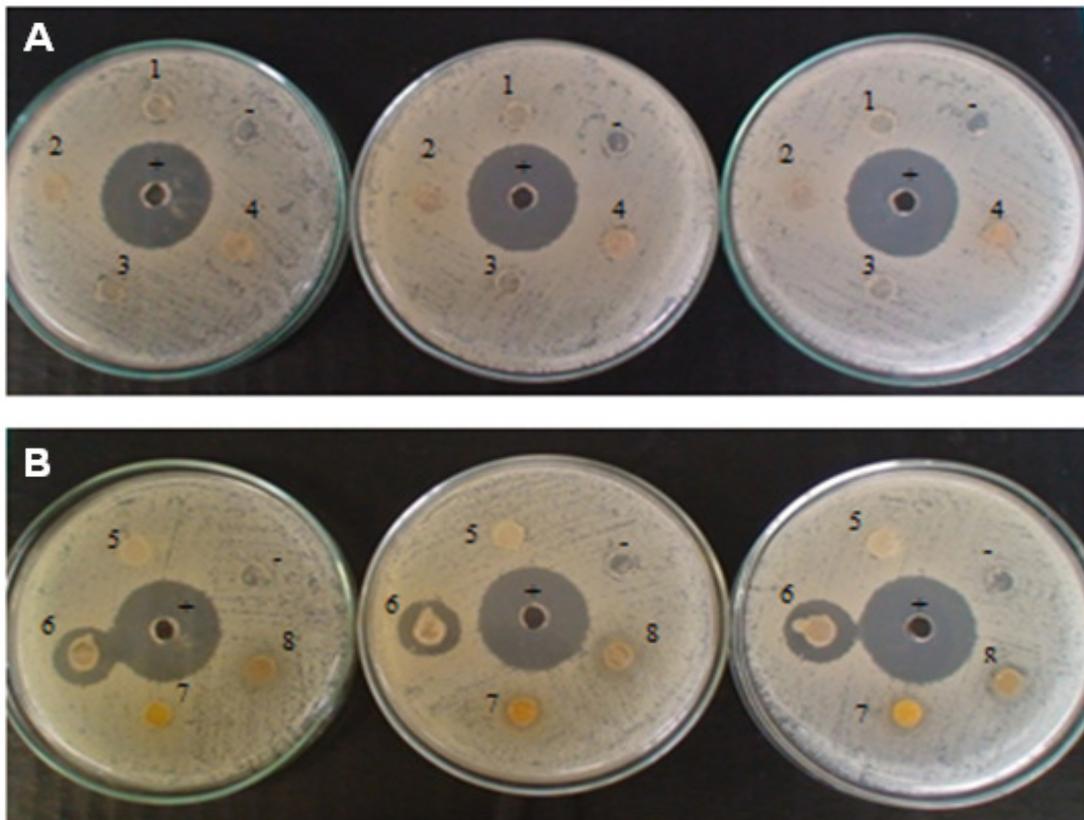


FIGURA 15: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 7 A 14 DIAS A 28°C.  
 FONTE: O autor (2010)

O trabalho realizado por LIN (2010) demonstrou que a produção de micélio e a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25925 foi realizada em diferentes meios. Os três meios de cultura utilizados foram: GPDA (batata 200,0 g, 10,0 g de glicose, peptona 4,0 g, água destilada esterilizada 1000 mL), GYP (10,0 g de glicose, peptona 4,0 g, de extrato de levedura 1,0 g, água destilada esterilizada 1000 mL) e GS (20,0 g de amido, 1,0 g de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  0,001 g, água destilada estéril 1000 mL). Assim, o meio que mostrou ser mais adequado para a formação dos compostos antimicrobianos foi o meio GPDA. Desta forma, ao comparar a composição do meio GPDA ao meio Sabouraud utilizado nota-se que são semelhantes em relação à fonte de carbono e nitrogênio, assim como o meio GS e Czapeck Dox em relação à presença sais, portanto, estes dados corroboram o presente trabalho.

É importante ressaltar que a metodologia dos poços utilizada neste trabalho auxiliou na determinação preliminar de actinobactérias com atividade antimicrobiana (FIGURA 16). Os resultados descritos abaixo foram utilizados para indicar presença ou ausência de atividade dos isolados de actinobactérias, pois como os compostos ativos para cada grupo de micro-organismos não são conhecidos, eles podem diferir entre si. Desta forma, não há como prever a capacidade dos mesmos em se difundir no ágar (TONIAL, 2010).



Legenda: Exemplo do método dos poços, com ou sem atividade antimicrobiana. A. A cepa patogênica testada foi *S. aureus* (ATCC 25923); os isolados testados foram: AS G34 3A 81 cultivado em meio Saboraud (1), AS G34 3A 81 cultivado em meio Czapeck Dox (2), AS G34 3A 81' cultivado em meio Saboraud (3), AS G34 81' cultivado em meio Czapeck Dox (4), controle positivo (+), controle negativo (-). B. A cepa patogênica testada foi *S. aureus* (ATCC 25923); os isolados testados foram: AS G34 3B 18 cultivado em meio Saboraud (5), AS G34 3B 18 cultivado em meio Czapeck Dox (6), AS G34 12B 82 cultivado em meio Saboraud (7), AD G34 12B 82 cultivado em meio Czapeck Dox (8), controle positivo (+),

FIGURA 16: A E B. TESTE DE SENSIBILIDADE PELO MÉTODO DOS POÇOS.

Fonte: O autor (2010)

Das 116 actinobactérias testadas, 79 apresentaram atividade antimicrobiana e encontram-se relacionadas na TABELA 3. A intensidade de inibição (+) foi medida pela distância, em milímetros, entre a inibição do crescimento da cepa patogênica alvo pela actinobactéria. A maioria dos isolados de actinobactérias apresentou atividade contra bactérias patogênicas Gram positivas. Destas, destaca-se o isolado AD 3B 17, que apresentou atividade contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), com halo de inibição de 30 mm. Também destaca-se o isolado AD G34 12B 82, que apresentou atividade contra todos os micro-organismos patogênicos testados, indicando que este isolado possui atividade antimicrobiana de amplo espectro.

Estudos demonstram que isolados de actinobactérias apresentam maior atividade contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas. Um desses estudos é o de González *et al.*, (2005), os quais trabalharam com 337 isolados de actinobactérias e encontraram atividade antimicrobiana somente em 27% deles, sendo que a atividade mais frequentemente encontrada foi contra bactérias Gram positivas (23%), contra *Candida albicans* (10,7%) e a menor atividade foi contra bactérias Gram negativas (6,5%). Em outro estudo com 86 isolados de actinobactérias (ZITOUNI *et al.*, 2005) todas apresentaram forte atividade contra bactérias Gram positivas, moderada contra leveduras e a atividade observada contra bactérias Gram negativas foi fraca a moderada e pouco frequente. Ainda, em outro estudo feito por León *et al.* (2010), durante a seleção preliminar realizada através do antibiograma frente a Gram positivos e patógenos Gram negativos (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Micrococcus* sp.) os resultados também demonstraram diferenças no espectro inibitório, em que dos 102 isolados de bactérias da região entre-marés da praia de São Francisco no Perú apenas 10 isolados de bactérias apresentaram halos de inibição, que foi marcado pela inibição de Gram positivos pela maioria dos isolados.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA AS SEGUINTEs CEPAS PATOGÊNICAS: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) E *Candida albicans* (ATCC 10231)

| nº | Isolados      | <i>S. aureus</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> |
|----|---------------|------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| 1  | AD G25 7A 40  | ++               | -                   | -              | -                  |
| 2  | AS G25 3A 49  | +                | -                   | -              | +                  |
| 3  | AD G27 13A 68 | ++               | -                   | -              | -                  |
| 4  | AD G27 12B 83 | +                | -                   | -              | +                  |
| 5  | AD G28 6B 47  | +                | -                   | -              | +                  |
| 6  | AD G31 3A 13  | +                | -                   | -              | +++                |
| 7  | AD G31 3A 18  | -                | -                   | -              | ++                 |
| 8  | AD G31 3A 19  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 9  | AD G31 6A 34  | -                | +                   | -              | ++                 |
| 10 | AS G31 5A 43  | +++              | -                   | -              | ++                 |
| 11 | AS G31 3A 72  | -                | -                   | -              | ++                 |
| 12 | AS G31 3B 16  | -                | +                   | -              | ++                 |
| 13 | AD G32 4A 29  | +                | -                   | -              | -                  |
| 14 | AD G32 11A 60 | -                | -                   | -              | ++                 |
| 15 | AS G32 3A 74  | +                | -                   | -              | +++                |
| 16 | AD G33 3A 16  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 17 | AD G34 11B 78 | ++               | -                   | -              | -                  |
| 18 | AD G34 12B 82 | +                | +                   | +              | +++                |
| 19 | AS G34 3B 18  | ++               | -                   | -              | +++                |
| 20 | AD G35 3A 15  | +                | +                   | -              | ++                 |
| 21 | AD G35 3A 20  | +                | +                   | -              | ++                 |
| 22 | AD G35 3A 22  | -                | +                   | -              | -                  |
| 23 | AD G35 3A 23  | +                | -                   | -              | +++                |
| 24 | AD G35 3A 25  | +                | -                   | -              | +++                |
| 25 | AD G35 3A 28  | +                | +                   | -              | ++                 |
| 26 | AD G35 3A 30  | -                | +                   | -              | -                  |
| 27 | AD G35 3A 31  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 28 | AD G35 3A 33  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 29 | AD G35 4A 30  | +                | -                   | -              | +++                |
| 30 | AD G35 6B 46  | +++              | -                   | -              | -                  |
| 31 | AD G35 8A 45  | +                | +                   | -              | ++                 |
| 32 | AD G35 12A 65 | +                | -                   | -              | +++                |
| 33 | AD G35 13B 84 | +                | +                   | -              | +                  |
| 34 | AS G35 3A 11  | +                | -                   | -              | +++                |
| 35 | AS G35 3A 27  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 36 | AS G35 3A 28  | -                | -                   | -              | +                  |
| 37 | AS G35 3A 30  | +                | -                   | -              | +++                |
| 38 | AS G35 3A 32  | -                | -                   | -              | +                  |
| 39 | AS G35 3A 33  | +                | -                   | -              | ++                 |
| 40 | AS G35 3A 37  | +                | -                   | -              | +++                |

Continuação Tabela 3

| nº | Isolados        | <i>S. aureus</i> | <i>P.aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> |
|----|-----------------|------------------|---------------------|----------------|--------------------|
| 41 | AS G35 3A 42    | +                | -                   | -              | +++                |
| 42 | AS G35 3A 43    | +                | ++                  | -              | ++                 |
| 43 | AS G35 3A 47    | +                | -                   | -              | +++                |
| 44 | AS G35 3A 57    | +                | -                   | -              | +++                |
| 45 | AD ----- 3B 17  | +++              | +                   | -              | -                  |
| 46 | AD ----- 7A 41  | +++              | +                   | +              | +++                |
| 47 | AD ----- 11B 76 | ++               | +                   | +              | -                  |
| 48 | AS G35 3A 34    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 49 | AS G35 3A 38    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 50 | AS G35 3A 41    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 51 | AS G35 3A 40    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 52 | AD G35 3B 14    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 53 | AS G35 3A 46    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 54 | AS G35 3A 49    | +                | -                   | -              | +++                |
| 55 | AD G35 3A 38    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 56 | AD G35 3A 29    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 57 | AD G35 3A 34    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 58 | AD G35 3A 40    | +                | -                   | -              | +++                |
| 59 | AS G35 3A 36    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 60 | AD G35 3A 37    | +                | -                   | -              | +++                |
| 61 | AS G35 12B 99   | +                | -                   | -              | +++                |
| 62 | AD G35 3A 41    | +                | -                   | -              | +++                |
| 63 | AS G35 3A 73    | +                | -                   | -              | +++                |
| 64 | AD G35 3A 24    | -                | -                   | -              | +++                |
| 65 | AS G35 3A 67    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 66 | AS G35 3A 77    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 67 | AS ----- 3A 26  | +                | -                   | -              | +++                |
| 68 | AS ----- 3A 31  | -                | -                   | -              | +                  |
| 69 | AS G35 3A 66    | -                | -                   | -              | ++                 |
| 70 | AD ----- 3A 26  | -                | -                   | -              | +++                |
| 71 | AS ----- 3A 56  | +                | -                   | -              | +++                |
| 72 | AS G35 3A 71    | -                | -                   | -              | +                  |
| 73 | AS ----- 3A 71' | ++               | -                   | -              | -                  |
| 74 | AD G31 13A 69   | +                | -                   | -              | -                  |
| 75 | AS ----- 3A 42  | -                | -                   | -              | ++                 |
| 76 | AS G35 3A 80    | -                | -                   | -              | ++                 |
| 77 | AS G35 3A 60    | -                | -                   | -              | +                  |
| 78 | AS G35 3A 41    | +                | -                   | -              | ++                 |
| 79 | AS ----- 3A 34  | +                | -                   | -              | +                  |

Legenda: AD: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox realizado com água destilada. AS: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox salino. G25 à G35: morfotipos dos isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Nocardia*. Pontos 1A à 15A e 1B à 15B pontos de coleta nas quinze estações de coleta da região entre-marés da Ilha do Mel.

FONTE: O autor (2010)

NOTA: +: formação de halo de inibição <15mm de diâmetro; ++: formação de halo de inibição >ou = 15 mm de diâmetro; +++: formação de halo de inibição >ou = 20 mm de diâmetro.

Neste trabalho observou-se que, dos 116 isolados de actinobactérias, 79 (68%) apresentaram atividade contra os micro-organismos patogênicos testados (TABELA 3). Este número pode ser considerado alto em relação ao estudo realizado por Penesyán *et al.*, 2009 na Austrália, em que 325 isolados de actinobactérias foram obtidos a partir da superfície das algas marinhas e apenas 39 (12%) de todos os isolados obtidos apresentaram atividade antimicrobiana contra, pelo menos, uma cepa patogênica utilizada.

Os resultados obtidos evidenciaram que, dos 116 isolados avaliados, 87% inibiram *C. albicans*, 77% *S. aureus*, 18% *P. aeruginosa* e 4% *E. coli*. Aproximadamente 72% das amostras testadas apresentaram atividade contra duas ou mais cepas padrão (FIGURA 17).

No trabalho realizado por MELO (2009), os resultados obtidos foram que, dos 41 isolados de actinobactérias isoladas do solo que apresentaram atividade antimicrobiana, 56% inibiram bactérias Gram positivas, 49% inibiram bactérias Gram negativas e 71% apresentaram halos de inibição contra fungos. Este fato corrobora o presente trabalho, pois, a maioria dos isolados desta pesquisa foi capaz de inibir bactérias Gram positivas (77%) e o fungo leveduriforme testado (87%).

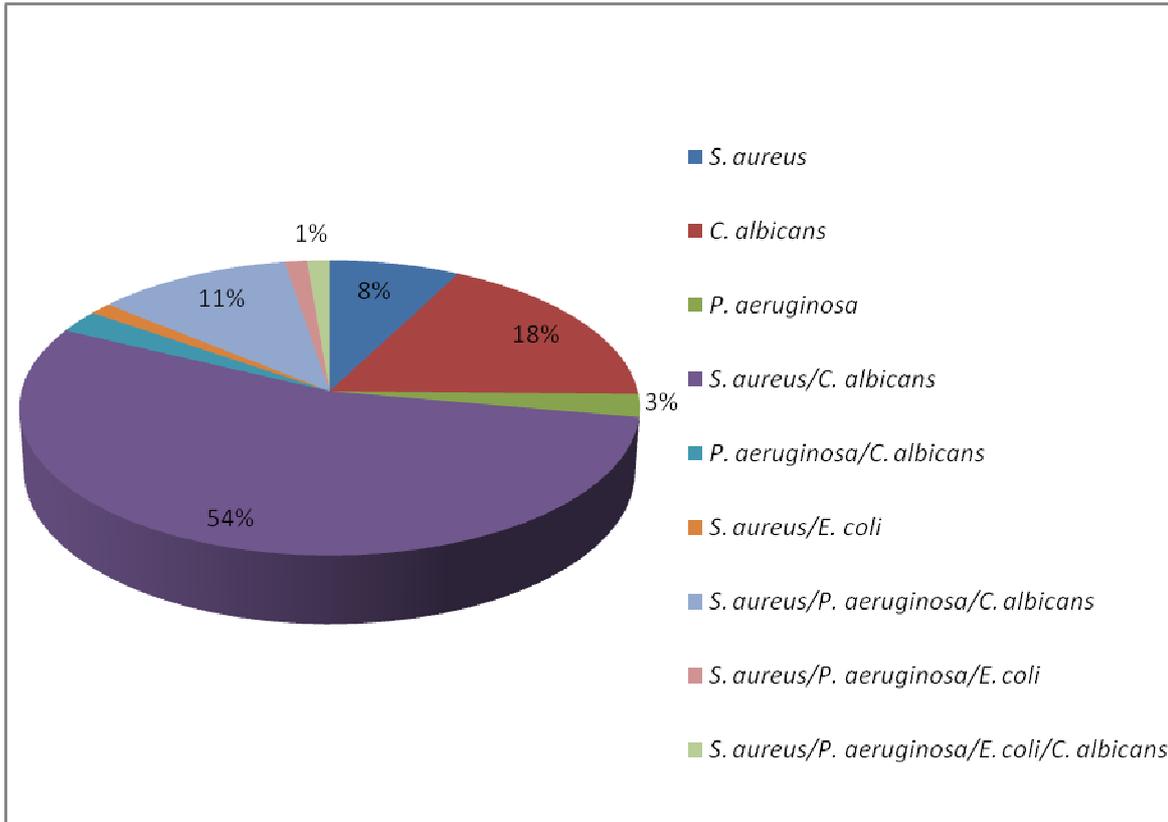


FIGURA 17: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PORCENTAGEM DOS ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. AS ACTINOBACTÉRIAS FORAM CULTIVADAS EM MEIO CZAPECK DOX E SABORAUD POR 7 A 14 DIAS A 28°C. FONTE: O autor (2010)

### 5.2.2. Bioautografia

A partir das análises realizadas através da metodologia dos poços, foram selecionados diferentes isolados de actinobactérias para a realização da bioautografia (TABELA 4). Para a realização desta metodologia foi necessária a obtenção do extrato de cada isolado selecionado. Dentre os extratos, os que apresentaram maior rendimento no preparo em escala analítica foram os extratos G6 e G9, com valores de 0,016 g para ambos os extratos, sendo que os rendimentos dos demais não foram superiores a 0,007g.

TABELA 4: ISOLADOS DE ACTINOBACTÉRIAS SELECIONADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS EM ESCALA ANALÍTICA E PARA O TESTE DE BIOAUTOGRAFIA.

| Cepas Patogênicas                                   | Extratos | Isolados de actinobactérias | Tamanho do halo de Inibição (mm) |      |
|---|----------|-----------------------------|----------------------------------|------|
|   |          |                             | <i>S. aureus</i>                 | MRSA |
| <i>C. albicans</i>                                  | G2       | AD G32 11A 60               | 3                                | 5    |
| <i>S. aureus/C. albicans</i>                        | G4       | AD G27 12B 83               | 4                                | 5    |
|   |          | AS 3A 26                    | 4                                | 5    |
| <i>S. aureus/E. coli</i>                            | G6       | AD 3B 17                    | 15                               | 15   |
| <i>S. aureus/P. aeruginosa/C. albicans</i>          | G8       | AD 11B 76                   | -                                | -    |
| <i>S. aureus/P. aeruginosa/C. albicans /E. coli</i> | G9       | AD G34 12B 82               | 8                                | 9    |
| Controle positivo                                   |          | gentamicina                 | 5                                |      |
| Controle positivo                                   |          | vancomicina                 |                                  | 10   |

Legenda: G2 à G9: Extratos obtidos dos isolados de actinobactérias. AD: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox realizado com água destilada. AS: Isolado cultivado em meio Czapeck Dox salino realizado com água marinha. G27 à G34: morfotipos dos isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Nocardia*. Pontos 11A e 3B à 12B pontos de coleta nas quinze estações de coleta da região entre-marés da Ilha do Mel.

FONTE: O autor (2010)

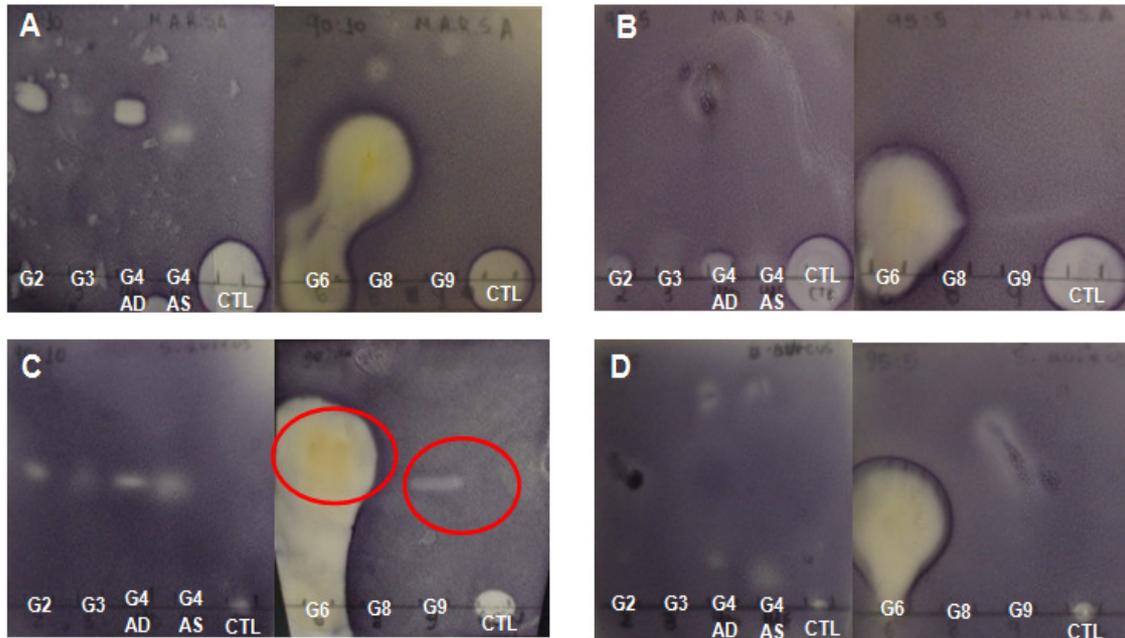
NOTA: Os destaques em amarelo indicam os extratos (G6 e G9) que tiveram maior rendimento e maior halo de inibição em relação aos demais. Os controles positivos utilizados foram gentamicina (0,2 mg/mL) e vancomicina (0,2mg/mL).

O método de bioautografia foi utilizado como uma forma para indicar o grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presentes nos extratos dos isolados AD 3B 17 (extrato G6) e AD G34 12B 82 (extrato G9). O objetivo desta técnica foi identificar a fração responsável pela ação antimicrobiana. Com a utilização da bioautografia, observou-se que os extratos G6 e G9 apresentaram resultados positivos a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e MRSA, e se confirmou este ser um ensaio simples, confiável e sensível, pois menos de 0,05 mg de substância bioativa formam áreas de inibição.

Neste ensaio, o isolado de *Streptomyces* sp (AD 3B 17 - extrato G6) destacou-se por apresentar halo de inibição (15 mm) contra as cepas patogênicas bastante superior (3X maior) ao controle (5 mm). Os resultados dos isolados de actinobactérias que apresentaram halo de inibição para os micro-organismos testados podem ser visualizados na FIGURA 18. Os demais extratos testados (G2, G4 AD, G4 AS, G8) não tiveram halos de inibição notáveis (valores que variaram entre 4 a 5 mm).

Os dados apresentados não estabelecem a natureza dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana, porém, em estudo realizado com

actinobactérias, demonstra-se que estas são ricas em compostos fenólicos e óleos fixos, substâncias que podem ser responsáveis pela ação verificada (MELO, 2009).



Legenda: A. Placa CCD (6X6 cm). Cepa patogênica testada MRSA Fase móvel: 90:10 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos testados (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, G6, G8, G9, controle vancomicina (CTL) (0,2 mg/mL). B. Placa CCD (6X6 cm). Cepa patogênica testada MRSA Fase móvel: 95:5 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos testados (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, G6, G8, G9, controle vancomicina (CTL) (0,2 mg/mL). C. Placa CCD (6X6 cm). Cepa patogênica testada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Fase móvel: 90:10 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos testados (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, G6, G8, G9, controle gentamicina (CTL) (0,2 mg/mL). D. Placa CCD (6X6 cm). Cepa patogênica testada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Fase móvel: 95:5 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos testados (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, G6, G8, G9, controle gentamicina (CTL) (0,2 mg/mL).

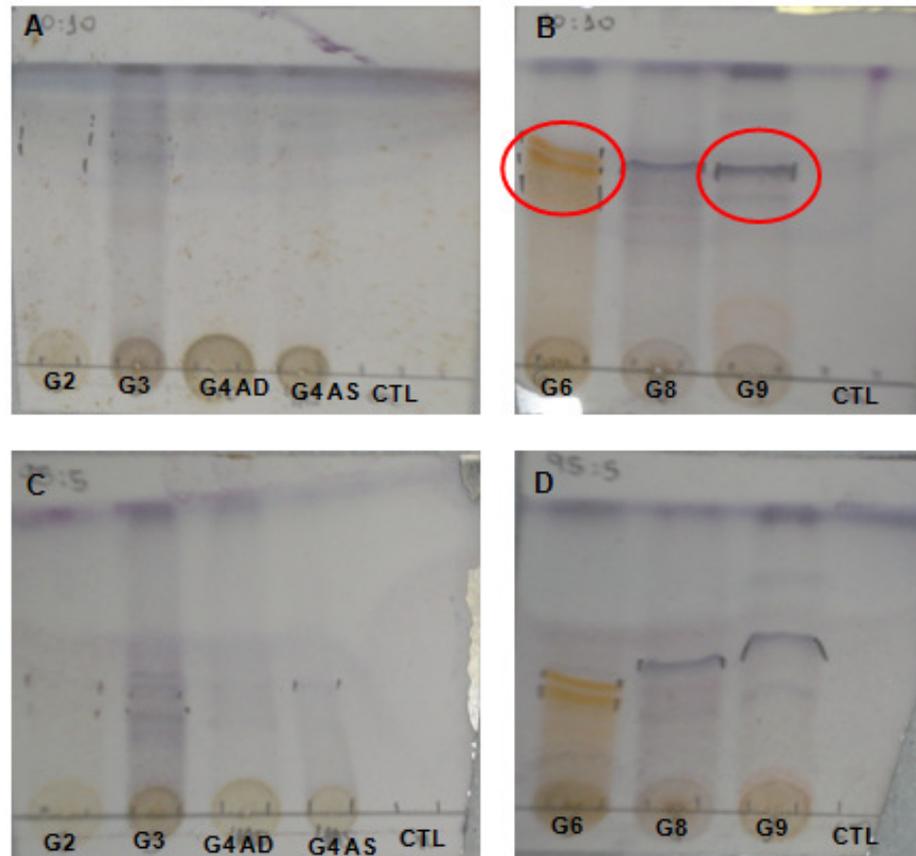
FIGURA 18: TESTE DE BIOAUTOGRAFIA DOS EXTRATOS BRUTO DE ACTINOBACTÉRIAS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. CULTIVO EM MEIO ÁGAR MÜLLER HINTON. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 36 A 48H A 37°C.  
FONTE: O autor (2010)

NOTA: Os destaques em vermelho indicam o grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presente nos extratos dos isolados de actinobactérias.

Os extratos presentes na TABELA 4 foram submetidos a um minucioso estudo por cromatografia em camada delgada (CCD), com diferentes sistemas de solventes, na tentativa de otimização da separação dos compostos presentes. Em função de todas estas interações entre amostra/fase móvel/fase estacionária, o

sistema foi otimizado para as amostras. Dos ensaios realizados em CCD, o solvente que apresentou melhor resolução foi a mistura de eluentes diclorometano/ metanol (90:10 e 95:5) (FIGURA 19). O eluente usado para o desenvolvimento dos cromatogramas foi escolhido de acordo com as propriedades dos compostos químicos dos extratos. As manchas foram visualizadas sob luz ultravioleta (365 nm) e pela aplicação de revelador químico (vanilina sulfúrica).

O destaque dado tanto na FIGURA 18, como na FIGURA 19, correspondem ao grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presente nos extratos G6 e G9 dos isolados de actinobactérias.



Legenda: A. Placa CCD (6X6 cm). Fase móvel: 90:10 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, controle vancomicina (CTL) (0,2 mg/mL). B. Placa CCD (6X6 cm). Fase móvel: 90:10 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos (10 mg/mL): G6, G8, G9, controle vancomicina (CTL) (0,2 mg/mL). C. Placa CCD (6X6 cm). Fase móvel: 95:5 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos (10 mg/mL): G2, G4 AD, G4 AS, controle gentamicina (CTL) (0,2 mg/mL). D. Placa CCD (6X6 cm). Fase móvel: 95:5 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH). Extratos (10 mg/mL): G6, G8, G9, controle gentamicina (CTL) (0,2 mg/mL).

FIGURA 19: PLACAS DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).  
Fonte: O autor (2010).

NOTA: Os destaques em vermelho indicam o grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presente nos extratos dos isolados de actinobactérias.

### 5.2.3 Elucidação estrutural do composto G6.1

O composto isolado do extrato bruto G6 (isolado de actinobactéria AD 3B 17), o qual foi codificado como G6.1, apresenta coloração alaranjada, é amorfo e solúvel em clorofórmio (FIGURA 20) . No trabalho realizado por LIN *et al.* (2010), um novo estreptomiceto, a cepa designada de L0804, isolada de lodo marinho na China,

produziu dois compostos ativos a partir de seu metabolismo secundário, os quais apresentam atividade antimicrobiana e anti-tumoral, sendo que um deles, o composto A é um alcalóide de aparência laranja avermelhado e facilmente solúvel em clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol, metanol e dimetilsulfóxido, mas insolúvel em ciclohexano, em éter de petróleo, éter etílico e água. Nota-se que tais características do composto A, citadas acima, assemelham-se às características da substância isolada (G6.1) no presente trabalho. Ainda, o composto A, referente ao estudo realizado por LIN *et al.* (2010), é uma mistura de, pelo menos, 3 substâncias e a sua purificação ainda está sendo realizada em laboratório.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) baseia-se nas propriedades físicas e químicas da matéria, interpretando-se como um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos. Em química, a espectroscopia de RMN é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos, usando técnicas uni ou bidimensionais simples. Trata-se de uma técnica não destrutiva que permite a análise de compostos orgânicos e inorgânicos (CORREIA, 2002). A ressonância magnética baseia-se na observação de que núcleos magnéticos tais como hidrogênio, carbono, fósforo e nitrogênio podem absorver energia em frequências características quando colocados em um campo magnético (CORRADI *et al.*, 2006). A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação ao nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular, é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido (BUGNI, 2006). No momento estão sendo realizados os ensaios de espectroscopia para a elucidação estrutural.



FIGURA 20: PERFIL CROMATOGRÁFICO DO COMPOSTO ISOLADO G6.1. EXTRAÍDO DO EXTRATO BRUTO G6 DO ISOLADO DE ACTINOBACTÉRIA AD 3B 17. FASE MÓVEL  $\text{CHCl}_3$ :MEOH (95:5 V/V CLOROFÓRMIO: METANOL) REVELAÇÃO: VANILINA SULFÚRICA  
 FONTE: O autor (2010)

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POTENCIALMENTE PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

#### 5.3.1 Caracterização morfológica dos isolados

A partir das análises macroscópicas e microscópicas foram identificados os gêneros de actinobactérias *Streptomyces* e *Nocardia*. Dentre estes, se destaca a presença de um grande número de isolados do gênero *Streptomyces*. As FIGURAS 21, 22, 23 e 24 ilustram estruturas que auxiliaram na identificação destes gêneros. As actinobactérias isoladas no presente trabalho são Gram positivas e também é possível observar a formação de longas cadeias de esporos, que se fragmentam em formas bacilares e esféricas, formando um emaranhado de finos filamentos ramificados com aspecto granular. Estas descrições, segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2004), estão de acordo com aquelas descritas para os gêneros encontrados. Algumas espécies reproduzem-se pela formação de esporos, os quais constituem a principal forma de multiplicação, e são produzidos em grande número, cada esporo com potencial de germinação e crescimento, levando ao surgimento de um novo organismo. Em outras espécies, como *Nocardia*, a

reprodução ocorre por meio da fragmentação, em que as hifas fragmentam-se em muitas células baciliformes e cocóides, cada uma capaz de formar um novo micélio (VENTURA *et.al.*, 2007).

No gênero *Nocardia* sp. (FIGURA 21-A), em relação à macro morfologia, a colônia apresenta-se irregular, com aparência granular, a superfície pode apresentar-se levemente dobrada, com coloração que varia entre branca, creme, laranja ou cinza claro e o reverso é não pigmentado. A taxa de crescimento é moderadamente rápida, variando entre 7 a 9 dias e a temperatura de cultivo para o desenvolvimento colonial pode variar entre 25 à 30°C. A micro morfologia apresenta emaranhado de finos filamentos que se fragmentam em formas bacilares e esféricas, que são capazes de formar um novo organismo.

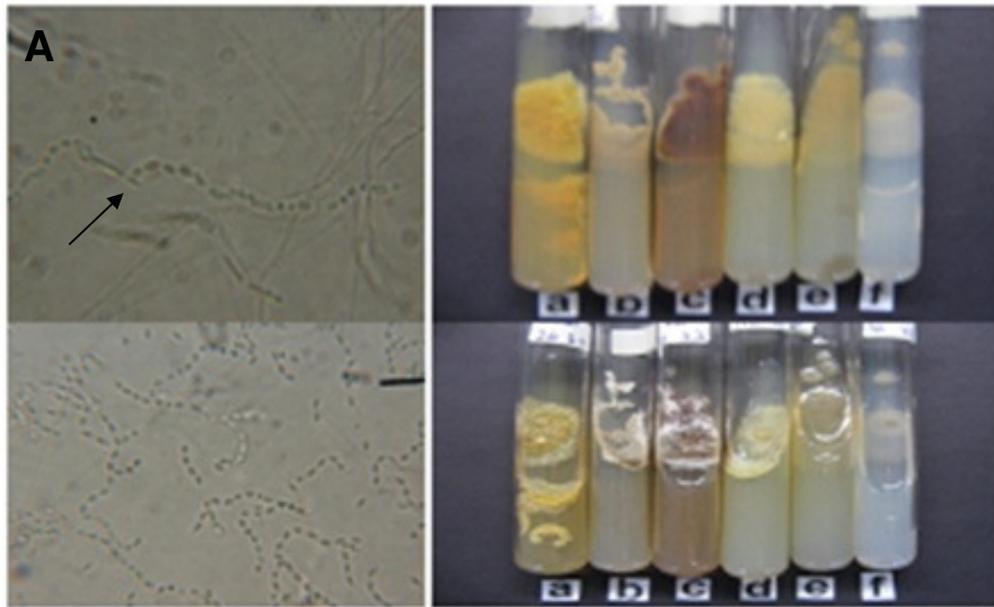
No gênero *Streptomyces* sp. (FIGURA 21-B), as colônias se desenvolvem morfologicamente em forma de giz (em pó), apresentam micélio aéreo, possuem pigmentos que variam entre as cores cinza, laranja, rosa e verde, a cultura produz odor característico de solo recém-preparado. Em relação à micro morfologia, pode-se observar longas hifas ramificadas com filamentos que podem ser retos a ondulados, os filamentos podem sofrer ramificação e a taxa de crescimento é considerada rápida a moderada, variando entre 4 a 10 dias.

Segundo o banco de dados *National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2010)*, o gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae, à subordem Streptomycineae, à ordem Actinomicetales, à subclasse Actinobacteridae e à classe Actinobacteria. O gênero *Nocardia* pertence à família Nocardiaceae, à subordem Corynebacterineae, à ordem Actinomicetales, à subclasse Actinobacteridae e à classe Actinobacteria.

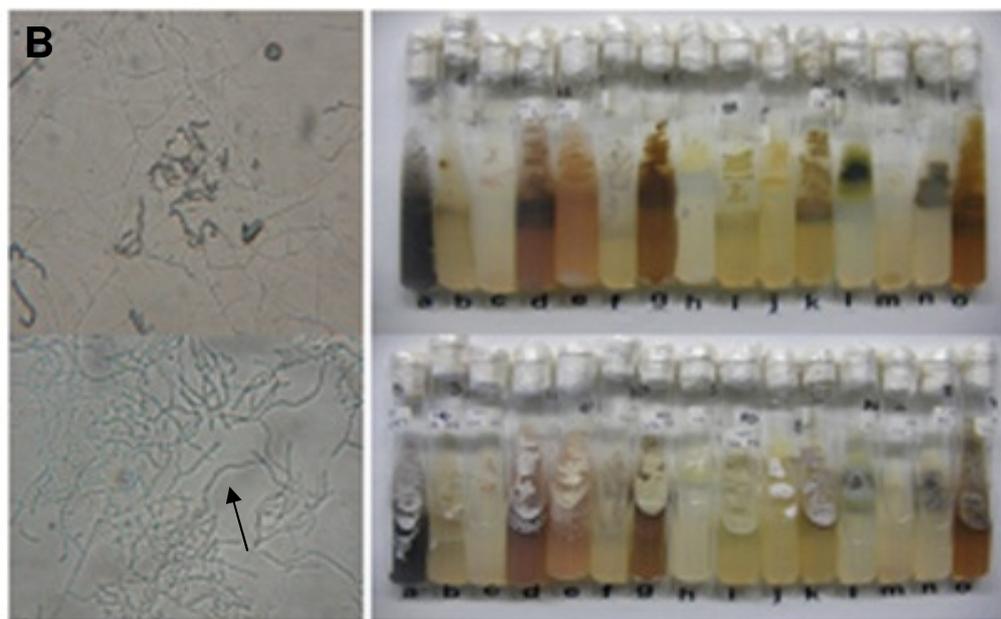
Assim como neste estudo, realizado em sedimentos da região entre-marés na Ilha do Mel, YU (2009), estudando a diversidade de bactérias cultiváveis associadas com sedimentos arenosos das regiões entre-marés da Estação chinesa Zhongshan na Antártica, encontrou um total de 65 cepas de bactérias heterotróficas aeróbias que foram analisadas morfologicamente e molecularmente, através do gene 16S rRNA. As análises indicaram que a maioria dos isolados eram bactérias Gram-negativas, enquanto 16 foram Gram-positivas. As bactérias isoladas pertencem a grupos filogenéticos variados, dentre esses: Alpha e Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes. Estes resultados indicam uma alta

diversidade cultivável de bactérias em sedimentos arenosos das regiões entremarés.

Em estudos realizados por LU (2009), a linhagem GB-2 foi identificada como uma actinobactéria isolada a partir de uma amostra de sedimento do litoral Lianyungang, na China, com atividade antimicrobiana de amplo espectro. De acordo com suas características morfológicas e análise da sequência do gene 16S rRNA ficou claro que esta linhagem é pertencente ao gênero *Streptomyces*, com uma similaridade de 98% com a espécie *Streptomyces fradiae*, conhecida como responsável por produzir alguns antibióticos, tais como a tilosina, neomicina, e outros. Contudo, este estudo foi o primeiro a apresentar a produção de sisomicina indicando que, através da evolução e mutação, o ambiente marinho apresenta grande biodiversidade.



***Nocardia* spp**



***Streptomyces* spp**

Legenda: As seta indicam as seguintes estruturas. Figura A. Gênero *Nocardia* : longa cadeia de esporos. Figura B: Gênero *Streptomyces*: filamentos que podem ser retos a ondulados.

FIGURA 21: MICRO E MACRO MORFOLOGIA (A E B) DE *Nocardia* spp. e *Streptomyces* spp. ISOLADOS DE SEDIMENTO SUPERFICIAL DE REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR – BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO, O TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 7 A 14 DIAS A 28°C. MICROMORFOLOGIA VISUALIZADA NO AUMENTO DE 1000X. FONTE: O autor (2010)

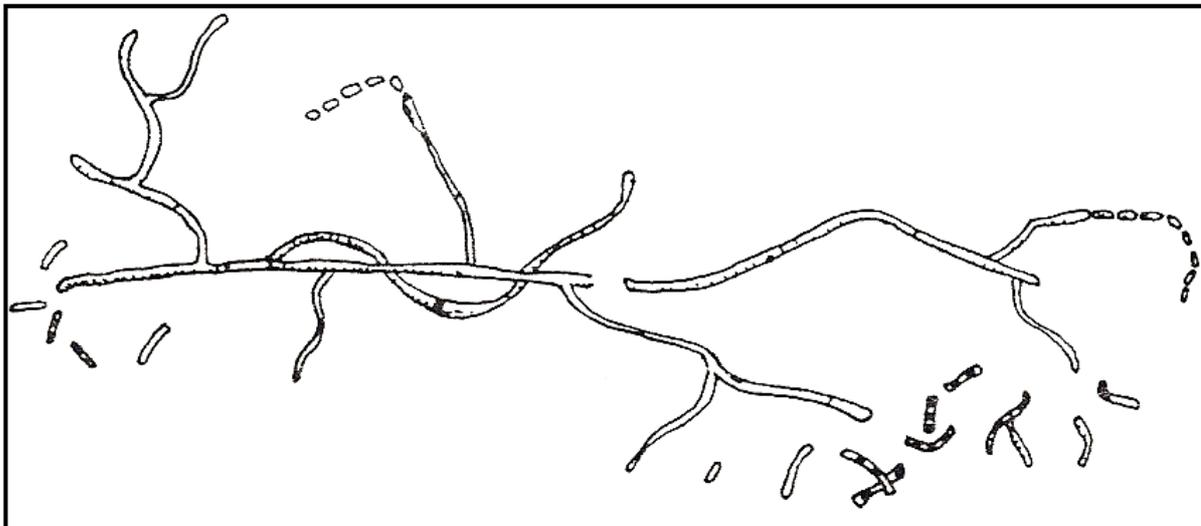


FIGURA 22: MICRO MORFOLOGIA DE *Nocardia* spp. EMARANHADO DE FINOS FILAMENTOS QUE SE FRAGMENTAM EM FORMAS BACILARES E ESFÉRICAS.  
FONTE: Larone (1993)

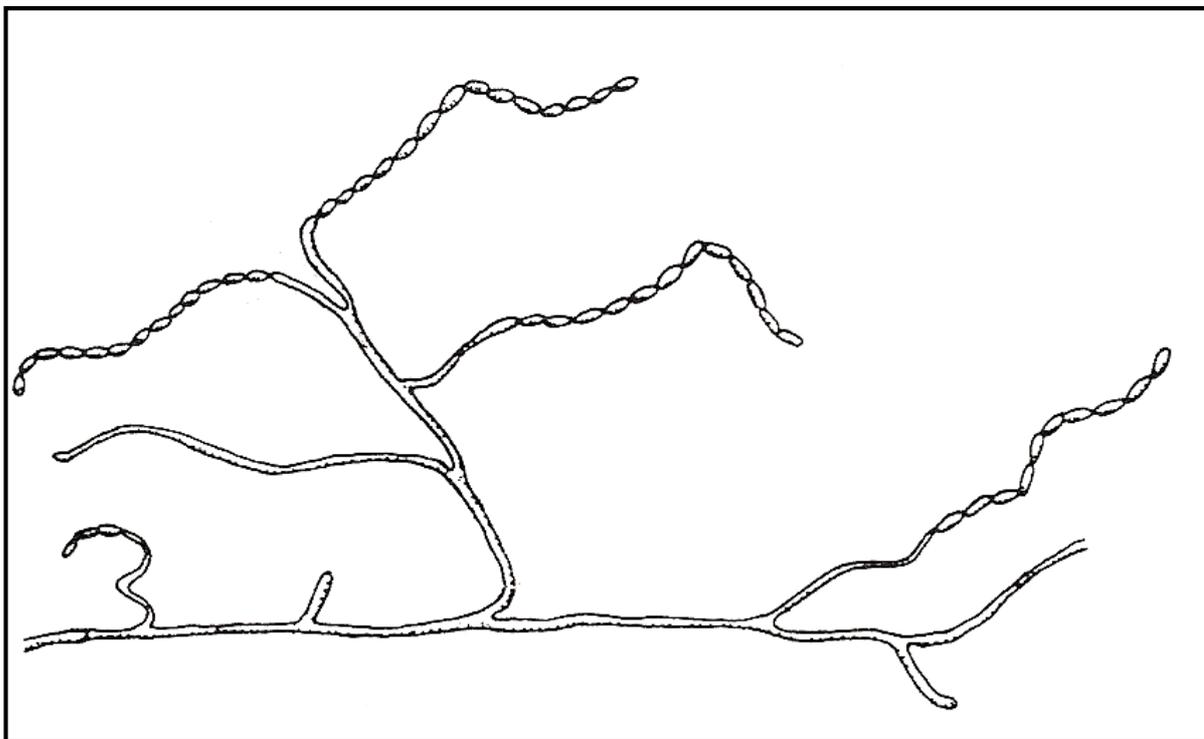
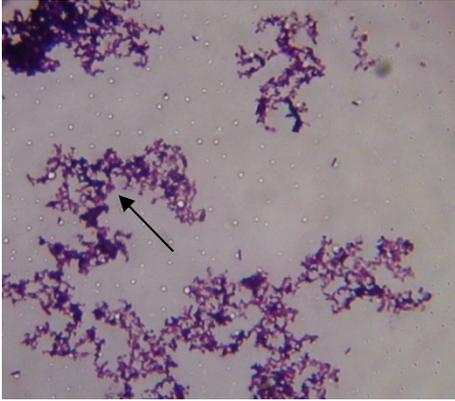
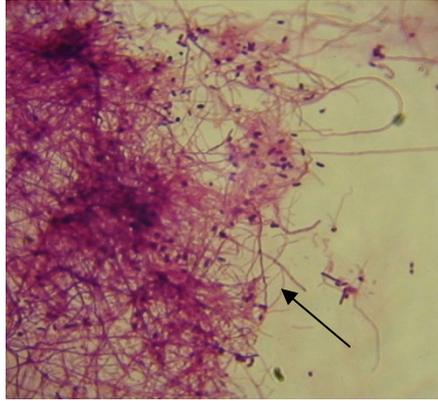


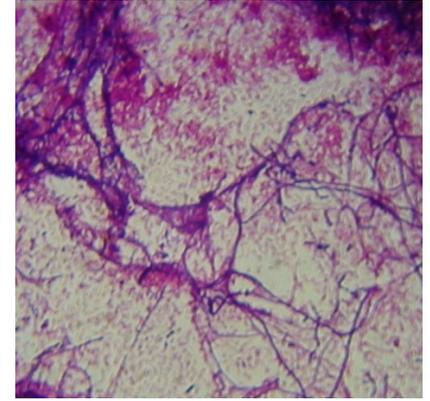
FIGURA 23: MICRO MORFOLOGIA DE *Streptomyces* spp. LONGAS HIFAS RAMIFICADAS COM FILAMENTOS QUE PODEM SER RETOS A ONDULADOS COM A PRESENÇA DE FILAMENTOS RAMIFICADOS.  
FONTE: Larone (1993)



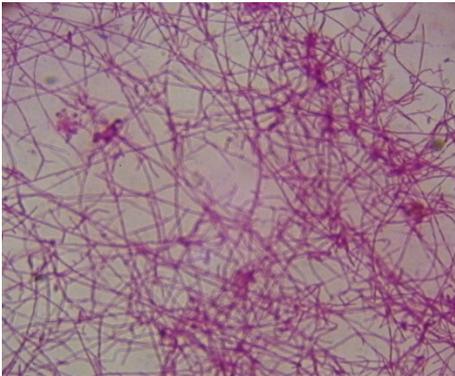
G 25: *Nocardia* sp1.  
Aumento 1000x



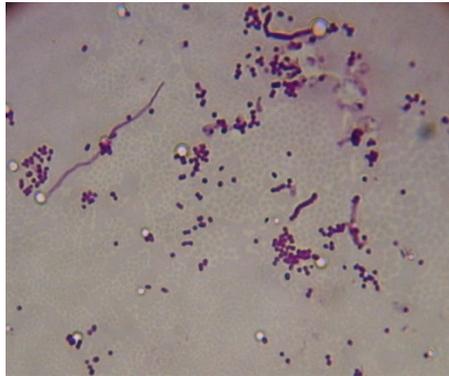
G26: *Streptomyces* sp1. Aumento 1000x



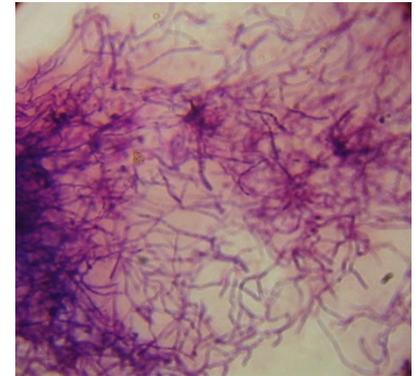
G 28: *Streptomyces* sp3.  
Aumento 1000x



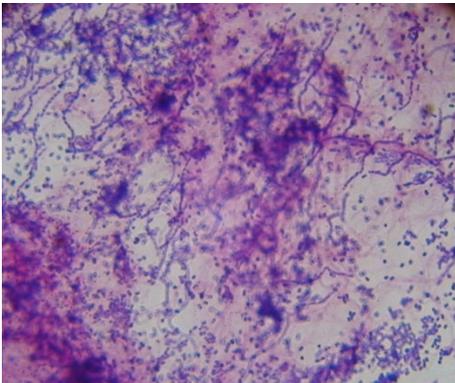
G 29: *Streptomyces* sp4. Aumento 1000x



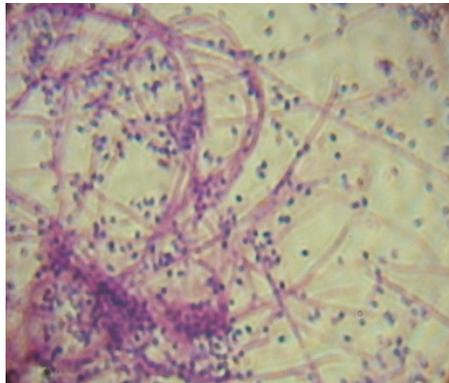
G 31: *Streptomyces* sp5. Aumento 1000x



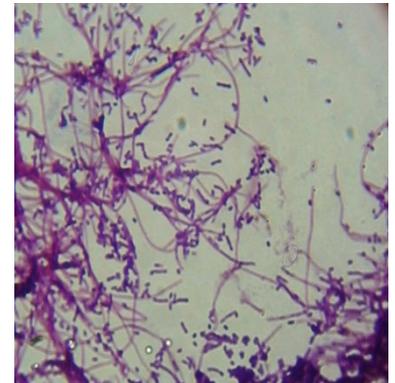
G 32: *Streptomyces* sp6.  
Aumento 1000x



G 33: *Streptomyces* sp7. Aumento 1000x



G34: *Streptomyces* sp8. Aumento 1000x



G35: *Streptomyces* sp9. Aumento 1000x

Legenda: As setas indicam as seguintes estruturas. Gênero *Nocardia*: filamentos que se fragmentam em formas bacilares e esféricas. Gênero *Streptomyces*: longas hifas ramificadas.

FIGURA 24: COLORAÇÃO DE GRAM DAS ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE SEDIMENTO SUPERFICIAL DE REGIÃO ENTRE-MARÉS DA ILHA DO MEL, PR – BRASIL. CULTIVO EM MEIO CZAPECK DOX E CZAPECK DOX SALINO. O TEMPO DE INCUBAÇÃO FOI DE 7 A 14 DIAS A 28 °C. MICROMORFOLOGIA VISUALIZADA NO AUMENTO DE 1000X  
FONTE: O autor (2010)

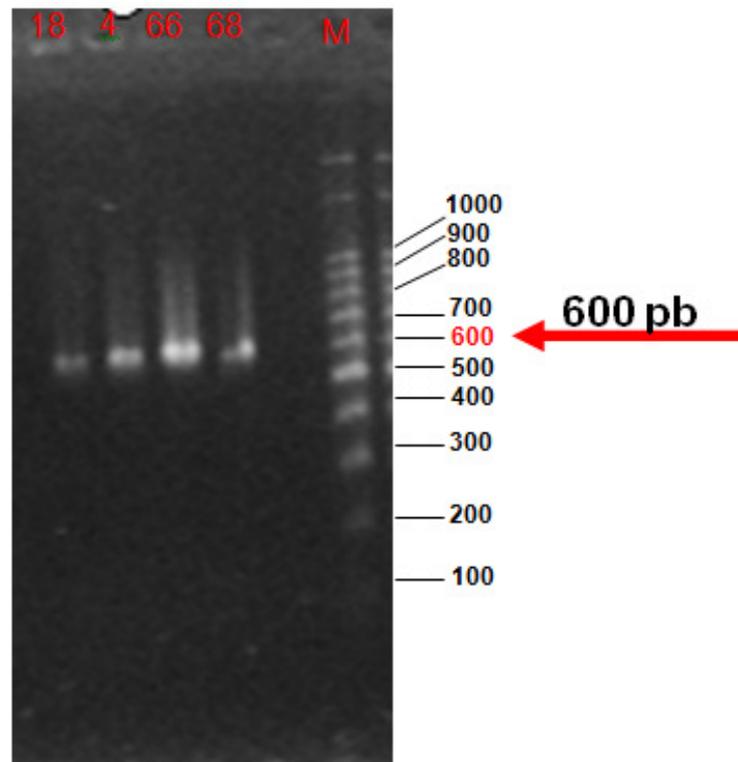
### 5.3.2 Caracterização molecular dos isolados

A extração de DNA genômico das culturas puras das actinobactérias foi realizada com êxito. A boa qualidade de DNA extraída foi comprovada pelos eficientes resultados alcançados com a amplificação por PCR (FIGURA 25). O DNA é necessário para a reação de amplificação com a adição da DNA polimerase. A PCR é uma ferramenta composta basicamente de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. Possui grande sensibilidade devido à possibilidade de se amplificar quantidades mínimas de ácido nucléico. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primer's*) auxiliam a iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo (BITTENCOURT, 2008).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão presentes no QUADRO 1 e aquele par (oligonucleotídeos SM6F e SM5R específicos para a família Streptomycetaceae) que amplificou o DNA das amostras: DNA 4 = ISOLADO AD G27 12B 83, DNA 18 = ISOLADO AD G34 12B 82, DNA 66 = ISOLADO AD 3B 17, DNA 68 = ISOLADO AS 3A 26, está representado na FIGURA 25. Os demais oligonucleotídeos iniciadores não amplificaram o DNA dos isolados acima, confirmando a análise morfológica que tais isolados de actinobactéria fazem parte da família Streptomycetaceae. A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores baseou-se na ampla diversidade de actinobactérias, já que, segundo Mincer *et al.*, (2002), os sedimentos marinhos são uma rica fonte de actinobactérias taxonomicamente diversas. Além disso, os micro-organismos pertencentes às famílias Micromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Streptosporangiaceae, Thermomonosporaceae são conhecidos por produzirem compostos antibióticos, incluindo eritromicina, gentamicina, valinomicina, rifamicina, teicoplanina e vancomicina (MONCIARDINI *et al.* 2002).

No estudo realizado por Maldonado *et al.* (2009), sobre diversidade de actinobactérias isoladas a partir de sedimento marinho, a maioria das actinobactérias isoladas foram atribuídas ao gênero *Streptomyces*. Estes isolados foram de particular interesse pelo fato de serem conhecidos como fontes de metabólitos secundários com grande capacidade para produção compostos bioativos. Ainda, todos os isolados de *Streptomyces* referidos pelos autores acima

citados apresentaram atividade antimicrobiana contra micro-organismos Gram positivos e Gram negativos.



Legenda: 18 = isolado AD G34 12B 82, 4 = isolado AD G27 12B 83, 66 = isolado AD 3B 17, 68 = isolado AS 3A 26, M = marcador molecular 1000PB

FIGURA 25: GEL DE AGAROSE 1% MOSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DO DNA DOS ISOLADOS UTILIZANDO O PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES SM6F E SM5R PARA A FAMÍLIA Streptomycetaceae.

FONTE: O autor (2010)

No momento está sendo realizado o sequenciamento do DNA ribossomal 16S destas amostras para que se possa realizar a identificação ao nível de espécie.

A utilização do sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes rDNA da subunidade menor dos ribossomos (rRNA 16S) de todas as bactérias, e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas, que são espécie-específicas. A molécula de rRNA 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação (NEIVA, 2007). O sequenciamento do gene 16S

rDNA é um poderoso método para elucidação das relações genéticas entre organismos procariotos. Embora, a região 16S do rDNA seja altamente conservada entre os procariotos, estas sequências contêm regiões variáveis adequadas para distinguir taxas (STACH, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

- Foram isoladas 116 amostras de actinobactérias que cresceram em meios de cultura preparados tanto com água doce, quanto com água salgada, destas 79 tiveram atividade contra pelo menos uma cepa patogênica testada.
- Os resultados obtidos evidenciaram que, dos 116 isolados avaliados, 87% inibiram *C. albicans*, 77% *S. aureus*, 18% *P. aeruginosa* e 4% *E. coli*. Aproximadamente 72% das amostras testadas apresentaram atividade contra duas ou mais cepas padrão.
- Dentre os isolados, os que apresentaram maior rendimento de extrato bruto foram os extratos G6 (AD 3B 17) e G9 (AD G34 12B 82), os quais apresentaram resultados positivos contra *Staphylococcus aureus* e MRSA.
- Com o método de bioautografia foi possível indicar o grupo de substâncias com atividade antimicrobiana presentes nos extratos dos isolados AD 3B 17 (extrato G6) e AD G34 12B 82 (extrato G9).
- Foi isolado o composto de coloração alaranjada amorfo solúvel em clorofórmio, o qual foi codificado como G6.1.
- A partir das análises macroscópicas e microscópicas foram identificados os gêneros de actinobactérias *Streptomyces* e *Nocardia*.
- Os oligonucleotídeos iniciadores SM6F e SM5R específicos para a família Streptomycetaceae amplificou o DNA das amostras: DNA 4 = ISOLADO AD G27 12B 83, DNA 18 = ISOLADO AD G34 12B 82, DNA 66 = ISOLADO AD 3B 17, DNA 68 = ISOLADO AS 3A 26, confirmando a análise morfológica que tais isolados de actinobactéria pertencem à família Streptomycetaceae.

## TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o potencial dos isolados de actinobactérias em produzir novas substâncias antimicrobianas contra diferentes grupos de micro-organismos patogênicos como o fungo *Malassezia* spp., e bactérias *Propionibacterium acnes* e *Streptococcus* sp.
- Selecionar os isolados potencialmente mais eficientes para produção de antimicrobianos e caracterizar os compostos químicos presentes nos metabólitos secundários ativos extraídos dos microrganismos.
- Identificar, ao nível de gênero e espécie, as actinobactérias que apresentaram potencial antimicrobiano e tiveram seus metabólitos secundários caracterizados quimicamente, seqüenciar o DNA ribossomal 16S e analisar as características macro e micro morfológicas.

## REFERÊNCIAS

- ATHALYE, M.; GOODFELLOW, M.; LACEY, J.; WHITE, R. P. **Numerical classification of Actinomadura and Nocardiosis**. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol. 35. p. 86-98, 1985.
- ATHAYDE, S. F.; TOMAZ, L. M. **Áreas Naturais Protegidas e Comunidades Locais da Ilha do Mel, PR – Brasil**. Nerítica. Vol. 9. p. 49-91, 1995.
- ASOLKAR, R. N.; KIRKLAND, T. N.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. **Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola***. Journal Antibiotic (Tokyo). Vol. 63, p. 37–39, 2010.
- BITTENCOURT, J. V. M.; LIMA, M. L. A. **Manual de Biologia Molecular em Plantas Arbóreas**. Curitiba: CBAB, p. 157, 2008.
- BRASILEIRO, A.C.M., e V.T.C. CARNEIRO. **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1998.
- BRENNER D. J.; KRIEG N. R.; STALEY J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol.2. 2 Ed. Editora Springer, 2004.
- BUGNI, T. S.; WOOLERY, M.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. **Bohemamines from a Marine-Derived *Streptomyces* sp.** Journal Natural Products Vol. 69, p. 1626-1628, 2006.
- BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1ª Edição. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004.
- CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Definition of MRSA. Online Source. Site acessado em 03 de março de 2011. <http://www.cdc.gov>.
- COOK, A. E.; MEYERS, P. R. **Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 53, p. 1907–1915, 2003.

CORRADI-SILVA, M. D. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. de S. **Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans**. *Química Nova*. Vol. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

CORREIA, D. P. **Espectroscopia de RMN Análise Estrutural**. Universidade da Madeira Departamento de Química Dissertação. Funchal, 2002.

DEMAIN, A. L. **From natural products discovery to commercialization: a success story**. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, Vol. 33, p. 486-495, 2006.

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

EGUCHI, T.; DEKISHIMA, Y.; HAMANO, Y.; DAIRI, T.; SETO, H.; KAKINUMA, K. **A New Approach for the Investigation of Isoprenoid Biosynthesis Featuring Pathway Switching, Deuterium Hyperlabeling, and <sup>1</sup>HNMR Spectroscopy. The Reaction Mechanism of a Novel *Streptomyces* Diterpene Cyclase**. *Journal Organic Chemical Articles*. Vol. 68, n° 14, p. 5433-5438, 2003.

FENICAL, W. H. **Drug Discovery from the New Marine Actinomycete Genus *Marinomyces***. *California Sea Grant College Program. Research Completion Reports*. Paper NMP07\_01, 2007. Site acessado em 19 de novembro de 2008. [http://repositories.cdlib.org/csgc/rcr/NMP07\\_01](http://repositories.cdlib.org/csgc/rcr/NMP07_01).

FIEDLER, H.; BRUNTNER, C.; PUDER, C. MIHM, G. **Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites**. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 87. p. 37-42. DOI 10.1007/s10482-004-6538-8, 2005.

FUCHS, F.D. e WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2ªed., 1998.

GAVA, C. A. T; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. **Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro**. *Pesquisa agropecuária brasileira* Vol.37 no.10 Brasília Oct. 2002. Site acessado em 20 de março de 2009. <http://www.scielo.br/scielo>.

GONZÁLEZ, I.; AYSO-SACIDO, A.; ANDERSON, A.; GENILLOUD, O.; **Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences.** FEMS Microbiology Ecology, Vol. 54, p. 401–415, 2005.

HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. **A new method for the intensive isolation of Actinomycetes from soil.** Actinomycetologica Vol.3. p. 95-104, 1989.

HOLT, J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Volume 2 : The Proteobacteria. Baltimore: Williams & Wilkins, 2004.

HONG, S. S.; CAI, X. F.; HWANG, B. Y.; LEE, H. S.; SU, B.; HONG, Y.; LEE, D. **New tricyclic geldanamycin analogues from an engineered strain of Streptomyces hygroscopicus JCM4427.** Tetrahedron Letters. Vol. 51, p. 351–353, 2010.

JIANG, S.; SUN, W.; CHEN, M.; DAI, S.; ZHANG, L.; LIU, Y.; LEE, K. J.; LI, X. **Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge Haliclona sp.** Springer Science. Antonie van Leeuwenhoek. Vol 92. p. 405–416, 2007.

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas.** 2 ed, São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KIM, M. K. **Avaliação da sustentabilidade do modelo de desenvolvimento vigente na Ilha do Mel – PR.** 131p. Monografia em Oceanografia. Centro de Estudos do Mar. Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KOLM, H. E. Universidade Federal do Paraná (UFPR) / Centro de Estudos do Mar. Comunicação pessoal, 2007.

KOLM, H. E; SIQUEIRA, A. **Variação de bactérias em decorrência da dragagem do canal de acesso ao Porto de Paranaguá, Paraná.** Pontal do Sul: CEM. In: Relatório final das atividades de pesquisa do laboratório de microbiologia marinha do Centro de Estudo do Mar da UFPR, 1999.

LANE, D.L., B. PACE, G.J. OLSEN, D.A. STAHL, M.L. SOGIN, e N.R. PACE. **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses.** Proceedings of National Academy of Science. Vol. 82. p. 6955-6959, 1985.

LACAZ, C. S. ; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C. ; HEINS-VACCARI, E. M. ; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: A guide to identification**. 2ª Edição. Copyright American Society for Microbiology, Washington, 1993.

LAURENT, F. J.; PROVOST, F.; BOIRON, P. **Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR**. Journal of clinical microbiology, Vol. 37 No. 1. p. 99–102, 1999.

LEÓN, J.; LIZA, L.; SOTO, I.; TORRES, M.; OROSCO, E. **Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales**. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, Vol. 27(2), p. 215-21, 2010.

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

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S. BIE, X. **Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Produced Antibacterial Substance**. Marine Biotechnology. DOI 10.1007/s10126-009-9186-1, 2009.

MALDONADO, L. A.; STACH, J. E. M.; PATHOM, WARD, A. C.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. **Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments**. Antonie van Leeuwenhoek. Vol.87. p.11–18, 2005.

MALDONADO, L.A.; FRAGOSO-YÁÑEZ, D.; PÉREZ-GARCIA, A.; DRUKER, J.; QUINTANA E. T. **Actinobacterial diversity from marine sediments collected in Mexico**. Antonie van Leeuwenhoek. Vol. 95. p. 111–120, 2009.

MANUAL CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI (antigo NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**; Norma Aprovada — Sexta Edição, M7A6. Vol. 23 n2, 2003.

MARQUES, M. C. M.; BRITZ, R. M. **História Natural e conservação da Ilha do Mel**. Curitiba: Editora UFPR, 2005.

MELO, F. M. P. **Bioprospecção de actinobactérias rizoféricas de milho (*Zea mays*) com atividade antifúngica.** Tese para o título de Doutor em Biotecnologia da universidade de São Paulo, 2009.

MINCER, T.J.; JENSEN P.R.; KAUFFMAN C.A.; FENICAL W. **Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments.** Applied Environmental Microbiology. Vol. 68. p. 5005–5011, 2002.

MIQUELANTE, F. A. **Distribuição espaço-temporal de bactérias heterotróficas totais, coliformes totais e *Escherichia coli* em sedimentos superficiais da região entremarés da Ilha do Mel, Paraná (BR).** Monografia de graduação em Oceanografia – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, 2007.

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALLETTI, L.; CHIOCCHINI, C. **New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes.** FEMS Microbiology Ecology. Vol. 42. p. 419-429, 2002.

MULLIS, K.B., e F.A. FALOONA. **Recombinant DNA - Part F.** In: A polymerase catalyzed chain reaction, San Diego: Academic Press p. 335-350, 1987.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information.** Site acessado em 29 de novembro de 2010 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NEIVA, I.F. **Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de *streptococcus mutans* isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie.** Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Curitiba: UFPR, 2007.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T. **Actinomicetos no solo.** Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.

OBIRI-DANSO, K. & JONES, K. **Intertidal sediments as reservoirs for hippurate negative *Campylobacters*, *Salmonellae* and faecal indicators in three EU recognised bathing waters in North West England.** Water Research. Vol. 34(2), p.519-527, 2000.

ORTEGA-MORALES, B. O.; CHAN-BACAB, M. J.; ROSA-GARCIA, S. C.; CAMACHO-CHAB, J. C. **Valuable processes and products from marine intertidal microbial communities.** Current Opinion in Biotechnology, Vol. 21, p. 346–352, 2010.

PARANHOS – FILHO, A. C. **O processo erosivo e as variações morfodinâmicas das praias na Ilha do Mel (Baía de Paranaguá- PR)**. 239f. Dissertação (Mestrado Geologia) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

PENESYAN, A.; MARSHALL-JONES, Z.; HOLMSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. **Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs**. FEMS Microbiology Ecology. Vol.69. p. 113–124, 2009.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas**. Química Nova, São Paulo, Vol. 25, p. 45-61, 2002.

PORSANI, M. V. **Variabilidade Espacial de Fungos da Região Entre-Marés da Ilha do Mel – Paraná**. Monografia de graduação em Ciências Biológicas – Centro de Estudos do Mar. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PRUDHOME, J.; McDANIEL, E.; BERTANI, S.; FENICAL, W. **Marine Actinomycetes: A New Source of Compounds against the Human Malaria Parasite**. PLoS One. Open Access Freely available online. Vol 3. Issue 6, e2335. doi:10.1371/journal.pone.0002335, 2008.

RANDALL, H. T.; CARROLL, K. C.; TANG, Y. W.; WOLK, D. M. **Diagnostic microbiology of the immunocompromised host**. 1ª Edição. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2009.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. **Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, Nocardiopsis sp**. Chemistry European Journal. Vol. 16, p.3194 – 3200, 2010.

RHEINHEIMER, G. **Microbiologia de Las Aguas**. 4. ed. Zaragoza, Espanha: Editorial ACRIBIA S.A., 1987.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. e ERLICH, H.A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science 239. p. 487-491, 1988.

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

SEMA/IAP. **Leis nº 11.352, de 13 de fevereiro de 1996.** Site acessado em março de 2009: [www.legislacao.pr.gov.br](http://www.legislacao.pr.gov.br)

SOLANO, G.; JIMÉNEZ, K.; JASPARS, M.; TAMAYO, G. **Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica.** *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 96. p. 71–78, 2009.

STACH, J. E.; MALDONADO, L. A.; WARD, A. C.; GOODFELOW M.; BULL A. T. **Statistical approaches to estimating bacterial diversity in marine sediments.** *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 69. p. 6189–6200, 2003.

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

TADDEI, A.; RODRIGUEZ, M.; MARQUEZ-VILCHEZ, E.; CASTELLI, C. **Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies.** *Microbiological Research*, Vol. 161, p. 222-231, 2006.

TAN, G. Y. A.; WARD, A. C.; GOODFELOW, M. **Exploration of *Amycolatopsis* diversity in soil using genus-specific primers and novel selective media.** *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 29. p. 557–569, 2006.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA).** Mestrado em Microbiologia. Universidade Federal do Paraná, Brasil. 2010.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. **Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1.** *Tetrahedron*. Vol. 64, p. 7583–7586, 2008.

UDWARY, D. W.; ZEIGLER, L.; ASOLKAR, R. N.; SINGAN, V.; LAPIDUS, A.; FENICAL, W. **Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*.** June 19, 2007. *PNAS* vol. 104 ,no. 25. Site acessado em 29 de março de 2009 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700962104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0700962104).

UJIKAWA, K. **Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos isolados no Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 39, n. 2, 2003.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. **Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum**. Microbiology And Molecular Biology Reviews. Vol. 71, No. 3, p. 495–548, 2007.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Doutorado em Microbiologia Agrícola Bolsa Sanduiche Cbs Holanda. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz USP, ESALQ/USP, Brasil. 2000.

YUAN, G. J.; HONG, K.; LIN, H. P.; LI, J. **Azalomycin F4a 2-ethylpentyl ester, a new macrocyclic lactone, from mangrove actinomycete *Streptomyces* sp. 211726**. Chinese Chemical Letters. Vol. 21, p. 947–950, 2010.

YU, Y.; LI, H.; ZENG, Y.; CHEN, B. **Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic Sandy intertidal sediments**. Polar Biology. Vol. 33, p. 869–875, 2009.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.J.; WANG, Y.; MA, L.F.; ZHU, Y.H. **Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy**. Marine Drugs. Vol.7, p. 97-112, 2009.

ZHAO, X.; JIAO, W.; JIANG, B.; YUAN, W.; YANG, T.; HAO, S. **Screening and identification of actinobacteria from marine sediments: Investigation of potential producers for antimicrobial agents and type I polyketides**. World Journal Microbiology Biotechnology Vol.25. p. 859–866. DOI 10.1007/s11274-009-9964-y. Springer Science+Business Media B.V., 2009.

ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI, B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAU, N. ***Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics**. Research in Microbiology, Paris, Vol. 156, p. 984-993, 2005.