

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Bioprospecção de uma substância antifúngica potencialmente nova
produzida por actinomicetos isolados no RS.**

CRISTINA DE CASTRO SPADARI
Bacharel em Ciências Biológicas

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Bioprospecção de uma substância antifúngica potencialmente nova
produzida por actinomicetos isolados no RS.**

CRISTINA DE CASTRO SPADARI
Bacharel em Ciências Biológicas

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente
como um dos requisitos para a
obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2013

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas a quem agradeço pela realização deste trabalho.

Primeiramente, à minha orientadora Dra Sueli Van Der Sand pela orientação e oportunidade para realizar este projeto de mestrado.

Ao professor Dr. Alexandre Fuentefria por ceder os isolados clínicos de fungos utilizados.

Aos colegas dos laboratórios 209, 164 e 208 por tornarem os dias mais divertidos com conversas dos mais variados assuntos e muito chimarrão, pelos momentos de desabafo e incentivos, e pelas dicas sempre úteis para os experimentos.

À Franciele pela ajuda com a estatística e à Elisandra por ter tido um papel muito importante no trabalho sempre ajudando quando precisei, desde a estatística até momentos de desespero quando o meio de cultivo não funcionava.

Ao meu “diplococcus” Themis por tornar os finais de semana no laboratório mais agradáveis, as horas de estudo mais divertidas e pelo incentivo sempre que preciso.

A minha família, principalmente minha mãe e meu pai pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim.

Aos amigos pelo companheirismo e momentos de descontração durante esse período. Especialmente à Magali que sempre esteve presente ajudando a tornar momentos difíceis em muita risada e histórias pra contar. E ao Andrei por tantas horas dedicadas em tentar tirar um boa foto do meu isolado.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos.

BIOPROSPECÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA ANTIFÚNGICA POTENCIALMENTE NOVA PRODUZIDA POR ACTINOMICETOS ISOLADOS NO RS.¹

Autor: Cristina Spadari

Orientador: Dr. Sueli Van Der Sand

RESUMO

Os fungos dermatófitos e as leveduras do gênero *Candida* são alguns dos microrganismos responsáveis por micoses em humanos. O tratamento dessas doenças acaba se tornando difícil pelo baixo número de antifúngicos existentes no mercado e pelo surgimento de resistência destes às drogas utilizadas. Já as actinobactérias são conhecidas por produzirem uma grande variedade de metabólitos secundários. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos metabólitos secundários produzidos por isolados de actinomicetos contra fungos dermatófitos e espécies de *Candida* sp. de origem clínica. Para a seleção dos isolados de actinomicetos com o melhor potencial de inibição foi realizado o ensaio de dupla camada em meio ágar amido caseína (ACA). Os isolados que mostraram atividade foram submetidos aos ensaios para a otimização da produção do composto ativo em sistema de cultura submersa. Para isso, foram avaliados diferentes meios de cultura, diferentes temperaturas e diferentes faixas de pH. A atividade antifúngica foi avaliada a cada 24h durante oito dias e observada através do ensaio de difusão em poço, onde foi calculado o índice de antibiose (IA). Nenhum dos isolados de fungos dermatófitos foi inibido no ensaio de dupla camada e os isolados 1S, R18(6) e 6(2) demonstraram atividade frente todas as espécies de *Candida* testadas. O isolado R18(6) mostrou melhor atividade em cultura líquida, sendo que as melhores condições de cultivo para a produção do antifúngico foi meio AC sem controle de pH, temperatura de 30°C e crescimento por 72h. Foram realizados ensaios como a concentração inibitória mínima, teste de termoestabilidade e avaliação do efeito de enzimas na atividade antifúngica do extrato bruto. O extrato bruto padronizado foi submetido à cromatografia de camada delgada (CCD) com diferentes solventes e o ensaio de autobiografia foi realizado para verificar a banda com atividade antifúngica. O composto ativo foi observado em um Rf de 0,35 quando utilizado como solvente a mistura de butanol/ ácido acético/ água. Após identificar a banda com atividade antifúngica foram realizados testes de coloração da CCD com cloreto férrico, ninhidrina e anisaldeído para identificação parcial do composto ativo. O resultado sugere que o composto não possui hidroxilas ligadas a anel aromático, não apresenta grupo amino livre e possivelmente alguma parte da molécula tenha um anel heterocíclico com nitrogênio ligado. Também, foi realizada a caracterização morfológica do isolado R18(6) através de microcultivo e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foram observadas estruturas características do gênero *Streptomyces*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2013.

BIOPROSPECTION OF A POTENTIALLY NEW ANTIFUNGAL SUBSTANCE PRODUCED BY ACTINOMYCETES ISOLATED ON RS.¹

Author: Cristina Spadari

Supervisor: Dr. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

The dermatophytes fungi and *Candida* species are some of the microorganisms responsible for mycoses in humans. The treatment of these diseases eventually becomes difficult by the low number of antifungal agents in the market and by the emergence of resistance to the drugs available today. The actinobacteria are known by producing different secondary metabolites. This study aimed to evaluate the antifungal activity of secondary metabolites produced by actinomycetes isolates against fungal pathogens of clinical origin. For the selection of actinomycetes isolates with the best potential inhibition the assay of double layer was performed on starch casein agar (SCA). The isolates that showed activity were submitted to an optimization of the active compound production in submerged culture system. In order to do so, different culture media, temperatures and pH ranges were assessed. The antifungal activity was evaluated every 24 hours for eight days and activity was observed by well diffusion assay, where the antibiosis index was calculated. None of the dermatophyte isolates were inhibited in the double layer assay. Isolates 1S, R18(6) and 6(2) of the actinobacteria demonstrated activity against all the tested *Candida* species. Isolate R18(6) showed the highest activity in liquid culture and the best growing conditions for producing the antifungal compound was media starch casein broth, without pH control, temperature of 30°C with 72h of cell growth. Assays were performed as the minimum inhibitory concentration, thermal stability test and the effect of different enzymes on antifungal activity of the crude extract. The crude extract was subjected to standardized thin layer chromatography (TLC) with different solvents and an autobiography assay was conducted to verify band with antifungal activity. The active compound was observed at an R_f of 0.35 when the solvent mixture of butanol/ acetic acid/ water was used. After identifying the band with antifungal activity CCD coloring tests were performed with ferric chloride, anisaldehyde and ninhydrin for partial identification of the active compound; it has been observed that the compound does not have hydroxyl groups attached to the aromatic ring, it has no free amino group and possibly some part of the molecule has a linked nitrogen heterocyclic ring. Also, we performed a morphological characterization of the isolate R18 (6) through microculture and scanning electron microscopy and structures have been observed characteristics of the genus *Streptomyces*.

¹Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. March, 2013.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo geral.....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Actinomicetos.....	3
2.2 Gênero <i>Streptomyces</i>	5
2.3 Metabólitos secundários.....	6
2.4 Drogas Antifúngicas.....	8
2.5 Resistência.....	13
2.6 Fungos patogênicos.....	15
2.6.1 Fungos dermatófitos.....	16
2.6.2 Gênero <i>Candida</i>	17
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Amostras.....	20
3.2. Manutenção das amostras.....	20
3.3. Ensaio de dupla camada.....	20
3.4 Produção de extrato bruto.....	24
3.5 Otimização da produção de extrato bruto.....	24
3.5.1 Meios de cultivo.....	24
3.5.2 Diferentes temperaturas.....	25
3.5.3 Diferentes faixas de pH.....	25
3.6 Ensaio de difusão em poço.....	25
3.7 Análise estatística.....	26
3.8 Ensaio de termoestabilidade do composto bioativo.....	26
3.9 Efeito de enzimas na atividade do composto bioativo.....	27
3.10 Fungigrama.....	27
3.11 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM).....	27
3.12 Curva de crescimento do actinomiceto.....	28
3.13 Curva de variação do pH no meio de cultivo.....	28
3.14 Microcultivo do actinomiceto.....	29
3.15 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	29
3.16 Cromatografia.....	30
3.17 Autobiografia.....	31
3.18 Identificação parcial do composto bioativo.....	31
3.18.1 Coloração de CCD.....	31
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34

4.1 Ensaio de dupla camada.....	34
4.2 Otimização da produção de extrato bruto.....	37
4.2.1 Meios de cultivo.....	37
4.2.2 Diferentes temperaturas.....	39
4.2.3 Diferentes faixas de pH.....	43
4.3 Ensaio de termoestabilidade do composto bioativo.....	47
4.4 Efeito de enzimas na atividade do composto bioativo.....	49
4.5 Fungigrama.....	51
4.6 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM).....	53
4.7 Curva de crescimento do actinomiceto.....	54
4.8 Curva de variação do pH no meio de cultivo.....	55
4.9 Microcultivo do actinomiceto.....	57
4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
4.11 Cromatografia.....	59
4.12 Autobiografia.....	59
4.13 Identificação parcial do composto bioativo.....	59
5- CONCLUSÕES.....	65
6- PERSPECTIVAS.....	66
7- REFERÊNCIAS.....	67
8- APÊNDICES.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Origem dos isolados de actinomicetos utilizados no estudo.....	21
TABELA 2 - Identificação das espécies dos isolados fúngicos utilizados no presente estudo.....	23
TABELA 3 - Valores do índice de antibiose obtidos no ensaio de dupla camada dos isolados de actinomicetos frente às seis espécies de <i>Candida</i>	36
TABELA 4 - Resultados obtidos no ensaio de difusão em poço utilizando diferentes meios de cultivo para produção de compostos antifúngicos dos isolados R18(6), 1S e 6(2).....	37
TABELA 5 - Valores dos índices de antibiose obtidos na otimização da produção de compostos antifúngicos pelo isolado R18(6) em caldo AC submetido a diferentes temperaturas de incubação	40
TABELA 6 - Valores dos índices de antibiose obtidos na otimização da produção de compostos antifúngicos pelo isolado R18(6) em caldo AC submetido a diferentes faixas de pH.....	45
TABELA 7 - Comparação dos valores do Índice de Antibiose dos extratos produzidos no caldo AC com pH 5.0 a 96h, no caldo AC com pH 7.0 a 120h e no caldo AC não tamponado a 72h, utilizando o teste de Tukey ($p \geq 0,05$).....	47
TABELA 8 - Resultados obtidos no fungigrama dos isolados clínicos de <i>Candida</i>	52
TABELA 9 - Resultados do CIM para amostras clínicas de <i>Candida</i> com 24h de crescimento.....	54
TABELA 10 - Resultados obtidos através da coloração de CCD	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Mecanismos e lugares de ação de agentes antifúngicos.....	10
FIGURA 2 - Estrutura molecular de antifúngicos azóis. Uma molécula de imidazol (cetoconazol) e uma molécula de triazol (fluconazol).....	11
FIGURA 3 - Halo de inibição formado pelo isolado R18(6) no ensaio de dupla camada frente ao isolado de <i>Candida krusei</i> (CK03).....	35
FIGURA 4 - Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 25°C, frente isolados de <i>Candida</i> sp.	41
FIGURA 5 - Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 30°C, frente isolados de <i>Candida</i> sp.	42
FIGURA 6 - Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 35°C, frente isolados de <i>Candida</i> sp.	42
FIGURA 7 - Gráfico dos índices de antibiose do extrato padronizado (caldo AC, 30°C e 72h de cultivo) frente aos isolados clínicos de <i>Candida</i>	47
FIGURA 8 – Valores da atividade residual (A.R.) obtidos no ensaio de termoestabilidade do extrato bruto do isolado R18(6) nas temperaturas de 30°C até 90°C	48
FIGURA 9 – da atividade residual (A.R.) obtidos no ensaio de termoestabilidade do extrato bruto do isolado R18(6) na temperatura de 100°C.....	49
FIGURA 10 – Dados da curva de crescimento do isolado de actinomiceto R18(6) durante 192h de cultivo celular em caldo AC a 30°C e agitação de 100r.p.m.....	55
FIGURA 11 – Valores do índice de antibiose ao longo de 192 horas de cultivo do isolado R18(6) em caldo AC a 30°C e valores da variação do pH para o isolado R18(6) durante 192h de crescimento em meio AC a 30°C.....	57
FIGURA 12 - Visualização do microcultivo do isolado R18(6) em microscópio óptico (40X).....	58
FIGURA 13 - Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado R18(6).....	58
FIGURA 14 - Resultado da autobiografia com o sistema de solvente butanol/ácido acético/ água (4:1:5) (BAW) frente ao isolado CAL17.....	60
FIGURA 15 - Resultado da coloração da CCD com cloreto férrico.....	62
FIGURA 16 - Resultado da coloração da CCD com ninhidrina.....	62
FIGURA 17 - Resultado da coloração da CCD com anisaldeído.....	63

1- INTRODUÇÃO

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente disseminado de organismos e alguns destes podem ser patogênicos aos seres humanos, causando diferentes tipos de micoses. Os fungos dermatófitos e as leveduras do gênero *Candida* são alguns dos microrganismos responsáveis por micoses em humanos.

O tratamento das infecções causadas por fungos patogênicos é realizado utilizando-se drogas antifúngicas. No entanto, existe um número limitado de agentes antifúngicos atualmente disponíveis para o tratamento dessas infecções. Outro fator importante é a toxicidade dessas drogas, sendo muito mais difícil de encontrar medicamentos com toxicidade seletiva para os fungos do que para bactérias. Isso é devido ao fato dos fungos serem eucariotos e possuírem vias metabólicas parecidas com as dos humanos. Além disso, nas últimas décadas tem sido observado um aumento de infecções oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos e, também, o aparecimento de isolados fúngicos resistentes aos medicamentos hoje disponíveis no mercado. Dessa forma, se torna necessária a descoberta de compostos antifúngicos novos, seguros e mais eficazes.

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas e apresentam alto teor de G+C no seu DNA. São encontradas em diversos habitats, podendo ser isoladas de animais, plantas, águas residuais, produtos alimentícios, pedras entre outros, porém são encontradas principalmente no solo. Essas bactérias

são conhecidas por produzirem diversos metabólitos secundários com diferentes estruturas químicas e atividades biológicas. Muitos compostos já foram isolados e caracterizados e são utilizados para o tratamento de doenças em humanos, na clínica veterinária e na agricultura. Esses compostos tem atividade como agentes imunossupressores, agentes antitumorais, enzimas, antibacterianos e antifúngicos.

1.1 Objetivo geral

Pesquisar e avaliar a atividade antifúngica dos metabólitos secundários produzidos por isolados de actinomicetos contra fungos patogênicos de importância clínica.

1.2 Objetivos específicos

- Selecionar um actinomiceto com potencial para produção de composto bioativo contra fungos de importância clínica;
- Otimizar a produção do composto antifúngico utilizando diferentes meios de cultura, temperatura e faixas de pH;
- Caracterizar morfológicamente o actinomiceto;
- Caracterizar parcialmente o composto bioativo

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Actinomicetos

Os actinomicetos, inicialmente, foram incluídos no grupo dos fungos devido a grande similaridade de seu desenvolvimento e sua morfologia com a presença de micélio verdadeiro (Koneman, 2001). Atualmente, é classificado como bactéria e essa classificação se dá baseada em algumas evidências como: parede celular composta por peptidoglicano, ausência de organelas, diâmetro das hifas inferior ao dos fungos, (Bervanakis, 2008). Segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2012), os actinomicetos estão classificados dentro do Filo e da classe Actinobacteria, compreendendo 16 ordens, 43 famílias, 201 gêneros e centenas de espécies. Os actinomicetos, também chamados de actinobactérias, são bactérias Gram-positivas e apresentam alto teor de G+C (guanina + citosina) no seu DNA (Monciardini et al., 2002), podendo chegar a mais de 70% nos gêneros *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção a isto é o genoma do patógeno obrigatório *Tropheryma whipplei*, com menos de 50% de GC (Ventura et al., 2007).

Essas bactérias podem ser encontradas em uma grande diversidade de habitats, podendo ser isoladas de animais, plantas, águas residuais, produtos alimentícios, pedras entre outros, porém seu habitat principal é o solo (Groth et al., 1999).

Estes microrganismos são metabolicamente diversos e são capazes de utilizar fontes variadas de carbono e energia. Desta maneira, eles podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy,1999). A maioria desse grupo é aeróbia, mas existem alguns actinomicetos anaeróbios ou anaeróbios facultativos. Crescem, preferencialmente, em solos de pH neutro a alcalino, embora muitos actinomicetos cresçam em solos ácidos (Araujo, 1998). As actinobactérias apresentam uma grande variedade morfológica, desde cocóides (*Micrococcus*) ou cocobacilos (por exemplo, *Arthrobacter*), com fragmentação de hifas (*Nocardia* sp.) e podendo ser altamente diferenciadas em micélio ramificado (*Streptomyces* sp.).Esses microrganismos, também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a produção de uma grande variedade de metabólitos secundários (Ventura et al., 2007).

Os actinomicetos têm sido especialmente úteis para a indústria farmacêutica pela sua capacidade, aparentemente ilimitada, de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas. Milhares desses compostos foram isolados e caracterizados, muitos sendo utilizados em medicamentos para o tratamento de doenças nas áreas humanas, veterinárias e agrícola (Arasu et al., 2008). Eles são responsáveis pela produção de mais da metade dos compostos bioativos encontrados na literatura, incluindo antibióticos, agentes imunossupressores, agentes antitumorais e enzimas (Qin et al., 2009).

2.2 Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* foi proposto por Waksman & Henrici (1943) com base nas características morfológicas e quimiotaxonômicas desses microrganismos. Taxonomicamente eles pertencem à família Streptomycetaceae, são membros da ordem Actinomycetales, dentro da classe Actinobacteria.

Streptomyces apresentam um complexo ciclo de vida, com diferenciação morfológica e fisiologia complexa. A diferenciação destes microrganismos envolve o crescimento e a ramificação das hifas vegetativas sobre o substrato e sua diferenciação morfológica ocorre a partir do crescimento das hifas aéreas, as quais se desenvolvem através de enrolamento seguido por septação, que gera cadeias de esporos unigenômicos (Claessen et al., 2006).

Bactérias desse gênero possuem cromossomo linear, sendo esta uma característica não peculiar a este grupo de microrganismos, estando também presente em *Borrelia*, *Agrobacterium* e outros actinomicetales. Os cromossomos de *Streptomyces* contêm ~72% de CG e possuem um tamanho de aproximadamente 9 Mb. Esse tamanho reflete seu complexo ciclo de vida e o grande repertório de metabólitos secundários dessas bactérias (Chen et al., 2002). A instabilidade genética desses microrganismos é bastante conhecida e afeta diferentes propriedades fenotípicas, incluindo a diferenciação morfológica, a produção de metabólitos secundários, como pigmentos e antibióticos, a resistência aos antibióticos, a secreção de enzimas extracelulares e, por vezes, os genes para o metabolismo primário, em particular um ou mais passos da via biossintética da arginina (Volf & Altenbuchner, 1998). A linearidade cromossomal não é a maior causa da instabilidade, mas sim a presença

abundante de elementos transponíveis, principalmente nas regiões terminais do cromossomo (Chen et al., 2002).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Streptomyces* constituem 50% da população total de actinomicetos do solo e 75- 80% dos antibióticos comercializados e utilizados na medicina foram obtidos deste gênero (Mellouli et al., 2003). Essas moléculas bioativas são enquadradas em uma diversidade de classes, como: aminoglicosídios, macrolídios, ansamacrolídios, betalactâmicos, peptídios, glicopeptídios, antraciclinas, tetraciclinas, nucleosídios, polienos e quinonas (Oliveira et al., 2008).

2.3 Metabólitos secundários

O metabolismo secundário de microrganismos pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função essencial para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Em contraste com os metabólitos primários, eles são produzidos por espécies individuais ou gêneros específicos para razões fisiológicas (ex. alteração da fisiologia), sociais (comunicação celular) ou predadoras. Estes compostos, portanto, estão intimamente ligados com a ecologia dos organismos produtores (O'Brien & Wright, 2011).

O metabolismo secundário é regulado por diferentes fatores físico-químicos, como a disponibilidade de nutrientes, de oxigênio, de temperatura, taxa de crescimento, controle por *feedback*, inativação ou indução. Produtos do metabolismo primário podem fornecer precursores, como moléculas intermediárias das vias sintéticas ou enzimas (Demain, 1998, Martin et al., 2005). Portanto, quando há interesse em produzir algum metabólito secundário,

é necessário estudar cada espécie em particular, pois uma mudança nas condições de cultivo pode inibir a produção ou ainda levar à produção de outros compostos que não o esperado.

Cerca de 200.000 a 250.000 metabólitos mostram sinais de bioatividade, desses mais de 22.000 são produzidos por microrganismos. Dentro desses 22.000 cerca de 17% são metabólitos de bactérias (especialmente *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp.), 45% são produtos do metabolismo de actinomicetos e cerca de 38% são de origem fúngica (Demain & Sanchez, 2009, Bérdy, 2005). Entre os metabólitos de actinomicetos, cerca de 75% são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (Bérdy, 2005, Solecka et al., 2012).

Os metabólitos secundários microbianos representam uma grande fonte de compostos com estruturas engenhosas e potente atividade biológica (Arasu et al., 2009). Esses incluem peptídeos, policetídeos, carboidratos, lipídios, terpenóides, esteróides e alcalóides que são produzidos a partir de metabólitos primários (O'Brien & Wright, 2011). Nessas moléculas podem ser observadas atividades antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antivirais, antiprotozoárias e outras (Solecka et al., 2012).

Os antibióticos representam algumas das aplicações mais bem sucedidas de produtos naturais microbianos na saúde humana. As observações de pioneiros como Fleming, Dubos e Waksman, que demonstraram que as bactérias e fungos ambientais produzem metabólitos secundários antimicrobianos altamente específicos, inaugurou a "Idade de Ouro" dos antibióticos. Durante este período, aproximadamente entre 1940

e1960, a maior parte dos antibióticos atualmente em uso clínico foi descoberta (Demain & Sanchez, 2009, O'Brien & Wright, 2011).

O início da era dos antibióticos foi marcado pela descoberta da penicilina pelo professor Selman Waksman da Universidade Rutgers. Este microbiologista e seus alunos conseguiram isolar muitos antibióticos novos a partir de bactérias filamentosas do solo, ou seja, os actinomicetos. O mais conhecido deles foi a estreptomicina. Entretanto, mesmo antes da estreptomicina, Waksman e Woodruff (1940) publicaram a descoberta de um cromooligopeptídeo que foi denominado de actinomicina. Um membro deste grupo, actinomicina D, foi utilizado para combater o tumor de Wilms em crianças e tornou-se uma ferramenta base extremamente importante no desenvolvimento da biologia molecular. Em 1945, Waksman, Schatz e Bugie publicaram seu trabalho sobre a estreptomicina, o primeiro antibiótico ativo contra a bactéria da tuberculose e também importante na luta contra a meningite bacteriana. Em 1948, Lechevalier e Waksman relataram a descoberta da neomicina, um aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces fradiae*, em 1953, foi descoberta a candidicina, um polieno produzido por *Streptomyces griseus* (Demain, 2006). Desde então vem sendo estudado o potencial antibiótico das biomoléculas.

2.4 Drogas Antifúngicas

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (Guimarães et al., 2010).

Entre os diferentes tipos de fármacos antimicrobianos existentes no mercado, os antifúngicos são um grupo muito pequeno, mas significativo de medicamentos e têm um papel importante no controle de doenças micóticas (Thakur et al., 2007). Quando comparados às substâncias antibacterianas, o número de drogas antifúngicas adequadas é muito limitado. É muito mais difícil de alcançar a toxicidade seletiva nas células fúngicas do que nas células bacterianas, isso devido ao fato de que os fungos pertencem ao domínio *Eukarya* e a sua maquinaria celular é idêntica à dos animais. Dessa forma, os agentes antifúngicos que afetam as vias metabólicas dos fungos frequentemente afetam as vias correspondentes das células hospedeiras, tornando-os tóxicos. Como resultado, muitos fármacos antifúngicos podem ser utilizados apenas em aplicações tópicas ou de uso em laboratório de pesquisa. Entretanto, alguns medicamentos têm toxicidade seletiva para fungos, uma vez que são dirigidos contra estruturas ou processos metabólicos específicos dos fungos (Espinel-Ingroff, 2009).

Até os anos de 1970 as infecções fúngicas foram consideradas, em grande parte, tratáveis e a procura de novos medicamentos foi mínima. Antes deste período a quimioterapia antifúngica possuía só dois tipos de compostos: iodeto de potássio, efetivo no tratamento da esporotricose, e dois polienos úteis, nistatina e anfotericina B, que foram introduzidas na década de 1950. Exceto pelo desenvolvimento da flucitosina (1964), verificou-se pouco progresso até o desenvolvimento das drogas azóis no início de 1970, da descoberta da primeira equinocandina em 1972 e do desenvolvimento da primeira alilamina em 1974. Portanto, apenas um número limitado de agentes antifúngicos encontra-se atualmente disponível para o tratamento de infecções

causadas por fungos (Vicente et al., 2003, Butts & Krysan, 2012, Ryder & Mieth, 1992). A necessidade de compostos antifúngicos novos, seguros e mais eficazes é um grande desafio para a indústria farmacêutica de hoje, especialmente com o aumento de infecções oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos e pela crescente resistência aos medicamentos (Dhanasekaran et al., 2008).

Da mesma forma que os antibacterianos, os antimicóticos podem ser classificados com base no sítio-alvo e na estrutura química. Existem seis classes de antibióticos antifúngicos que podem ser divididos em três mecanismos de ação (Figura 1).

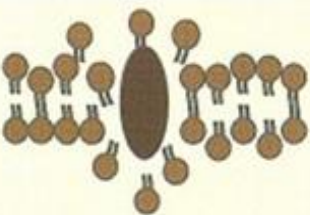

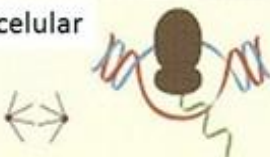
Mecanismo	Classe da droga	Drogas
Membrana celular 	Azóis (inibidor da lanosterol 14 α -desmetilase)	Imidazóis (cetoconazol, miconazol) Triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol)
	Polienos (ligação ao ergosterol)	Anfotericina B
	Alilaminas (inibidor da esqualeno epoxidase)	Terbinafina
Parede celular 	Equinocandinas (inibidor da 1,3 β -D glicano sintase)	Caspofungina, micafungina, anidulafungina
Intracelular 	Fluoropirimidinas (antimetabólito)	Flucitosina
	Inibidor mitótico	Griseofulvina

Figura 1- Mecanismos e lugares de ação de agentes antifúngicos.

- *Antifúngicos com atividade na membrana celular:*

- **Azóis:** Os antifúngicos azóis se dividem em dois grupos: os imidazóis (duas moléculas de nitrogênio no anel azol) e os triazóis (três moléculas de nitrogênio no anel azol) (Figura 2). Esses antifúngicos atuam inibindo a enzima lanosterol 14 α -desmetilase do citocromo P450 dos fungos. Esta enzima participa da biossíntese dos esteróis, está envolvida na conversão de lanosterol em ergosterol e sua inibição altera a síntese da membrana celular dos fungos (Demain & Sanchez, 2009). Como alguns exemplos deste grupo podem ser citados o fluconazol, itraconazol e cetoconazol.

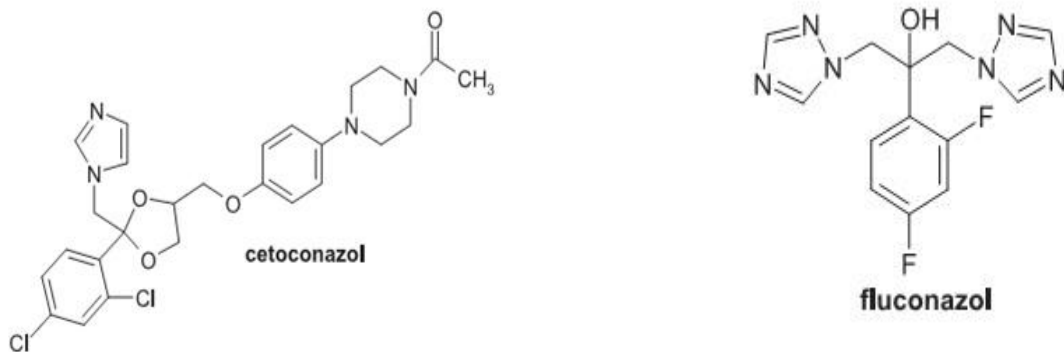


Figura 2 – Estrutura molecular de antifúngicos azóis. Uma molécula de imidazol (cetoconazol) e uma molécula de triazol (fluconazol) (Pereira, 2007).

- **Alilaminas:** Estes fármacos atuam inibindo a enzima esqualeno epoxidase, envolvida na síntese do ergosterol a partir do esqualeno. Isso origina uma diminuição da concentração de ergosterol e um aumento de esqualeno na membrana celular. O acúmulo de esqualeno no interior da célula é tóxico para os fungos (Demain & Sanchez, 2009). Neste grupo estão presentes a terbinafina e butenafina.

- Polienos: Estes compostos atuam ligando-se ao ergosterol da membrana das células fúngicas e, com isso, alteram as atividades da membrana, pois ocorre a formação de oligômeros, que agem como poros transmembrana, através dos quais o potássio e outras moléculas intracelulares são perdidos. Eles promovem, desta forma, a permeabilização da membrana e a morte celular (Ben-Ami et al., 2008, Demain & Sanchez, 2009). Neste grupo estão presentes a anfotericina B e a nistatina.

- *Antifúngicos com atividade na parede celular:*

- Equinocandinas: As equinocandinas são lipopeptídeos cíclicos. Esses compostos atuam inibindo a 1,3 β -D glicano sintase, a enzima que forma os polímeros de glicano da parede celular fúngica, um componente importante nas paredes celulares de *Candida*, *Aspergillus* e outros fungos oportunistas. A resultante interrupção da integridade da parede celular fúngica leva à morte desigual das hifas, provavelmente as células que estão crescendo ativamente e remodelando suas paredes celulares são mais afetadas no caso de fungos filamentosos, ou à ruptura das células e lise osmótica, no caso das espécies do gênero *Candida*. Uma vez que as células de mamíferos não apresentam parede celular, a ação desses agentes é específica, resultando na morte seletiva das células fúngicas (Denning, 2003, Ben-Ami et al., 2008). Neste grupo encontram-se a caspofungina, micafungina e anidulafungina.

- *Antifúngicos com atividade intracelular:*

- Fluoropirimidinas: A flucitosina (5-fluorocitosina) atua como um antimetabólito. Ela é um análogo fluorado de pirimidina e interfere na síntese

dos ácidos nucleicos. Este fármaco penetra na célula através da citosina permease e é desaminado a 5-fluorouracil no citoplasma. Esta molécula então se converte em ácido 5-fluorouridílico, que compete com a uracila na síntese de RNA e gera erros na codificação do RNA e inibição da síntese de DNA e proteínas (Demain & Sanchez, 2009, Lewis, 2011).

- Griseofulvina: Este medicamento age inibindo a mitose dos fungos. Ele se liga à tubulina e a uma proteína associada aos microtúbulos, rompendo assim, a organização do fuso mitótico (Lewis, 2011).

2.5 Resistência

De modo previsível, o uso de fármacos antifúngicos resultou no surgimento de populações de fungos resistentes. Segundo Rex et al. (1995) existem três vias possíveis em que um paciente pode adquirir um organismo resistente: (i) uma colonização ou infecção na qual o organismo é inicialmente sensível, mas sofre mutação e torna-se resistente, (ii) o paciente é colonizado ou infectado com múltiplas cepas ou espécies e uma delas é resistente e acaba sendo selecionada, ou (iii) o paciente é inicialmente colonizado ou infectado com uma espécie intrinsecamente resistente.

A aquisição de resistência às drogas é um processo evolutivo que ocorre devido ao fato de raramente os antimicrobianos conseguirem matar toda a população presente. Os microrganismos sobreviventes estão sujeitos a forte seleção natural para fenótipos resistentes na presença de fármacos. Com o uso crescente e tratamentos prolongados vem aumentando a incidência de fungos resistentes às drogas antifúngicas utilizadas (Selmecki et al., 2009).

Os fungos podem tornar-se resistentes a cada uma das drogas antifúngicas por mecanismos específicos. As mutações que causam defeitos na captação de flucitosina ou na sua conversão intracelular são uma causa frequente de resistência a esta droga (Dodgson et al., 2004, Papon et al., 2007). Uma diminuição do teor de ergosterol na membrana pode conduzir a susceptibilidade reduzida aos polienos. Isso pode ocorrer devido a mutações no gene *erg6*, gene envolvido na biossíntese de ergosterol, ou ao decréscimo de sua expressão (Vandeputte et al., 2006, Young et al., 2003). Já, a resistência ao fluconazol pode ser causada por mutações no gene *erg11*, envolvido na biossíntese do ergosterol, que codifica a esterol 14 α -desmetilase; essas mutações podem diminuir a afinidade da enzima esterol 14 α -desmetilase às drogas azólicas resultando em uma resistência aumentada das células (Rodloff et al., 2011, Lamb et al., 2000). Também, a superexpressão de outros genes *erg* e do gene *erg11* em *C. albicans* pode ser causada por uma mutação de ativação no seu regulador Upc2 (Dunkel et al., 2008), aumentando a resistência das células a diferentes azóis e também a medicamentos que agem sobre outras etapas na via da biossíntese de ergosterol, como a terbinafina (uma alilamina) inibidora da enzima esqualeno epoxidase (Morschhäuser, 2009). Já mutações no gene *fks1*, que codifica uma subunidade do complexo 1,3 β -D glicano sintase, resultam em resistência às drogas equinocandinas (Rodloff et al., 2011).

No entanto, os fungos podem tornar-se resistentes a múltiplos fármacos, drogas estruturalmente não relacionadas e com diferentes modos de ação. Essas drogas são transportadas ativamente para fora da célula, o que resulta na redução das concentrações das mesmas no interior da célula e, portanto

acabam sendo insuficientes para a inibição dos alvos desses medicamentos. Essa resistência é mediada por dois tipos de bombas de efluxo que são localizadas na membrana citoplasmática e transportam drogas antifúngicas e outras substâncias tóxicas para fora da célula: os transportadores ABC, que utilizam ATP como fonte de energia para impulsionar o transporte e os transportadores da Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS), que são energizados pelo gradiente de prótons através da membrana celular (Rodloff et al., 2011, Morschhäuser, 2009). Devido a esses diversos mecanismos de resistências às drogas utilizadas atualmente se torna importante a procura de novos medicamentos com atividade antifúngica.

2.6 Fungos patogênicos

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente disseminado de organismos. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram descritas, estimando-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhões de espécies. Os fungos patogênicos podem se apresentar como formas filamentosas ramificadas ou como leveduras; alguns mostram ambas as formas em seu ciclo e são conhecidos como dimórficos.

As doenças fúngicas são geralmente divididas em categorias de acordo com o local em que a colonização se inicia. Há quatro categorias: i) as micoses superficiais, que são restritas à camada mais externa da epiderme e não causam qualquer inflamação; ii) as micoses cutâneas, que envolvem o sistema tegumentário, incluindo unhas e cabelos e, geralmente, provocam inflamações na pele; iii) as micoses subcutâneas, quando ocorre infecção das camadas mais profundas do tecido, com os fungos sendo geralmente implantados no

local diretamente após algum trauma mínimo e podendo infectar além da área inicial colonizada. E, por fim, iv) as infecções sistêmicas, que têm o trato respiratório e gastrointestinal como a principal porta de entrada; essas micoses podem ser classificadas em micoses primárias e oportunistas com base no fato de o fungo em questão ser capaz de causar uma infecção em um hospedeiro normal ou imunologicamente comprometido, respectivamente (Hsu et al., 2012, Domer, 1997).

2.6.1 Fungos dermatófitos

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que, em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses (Siqueira et al., 2006). Os dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos, que utilizam a queratina como nutriente durante a infecção de pele, cabelos e unhas. Esses fungos estão classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, de acordo com a formação e morfologia de seus conídios (estruturas de reprodução assexuada). Além disso, as espécies de dermatófitos são divididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, dependendo de seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente) (Peres et al., 2010, Criado et al., 2011).

Os sintomas das dermatofitoses podem ser brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, e geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo resultado da ação direta do fungo ou de reações de hipersensibilidade ao

microrganismo e/ou a seus produtos metabólicos. Nas infecções de unha (onicomicoses) pode ocorrer descolamento das bordas, espessamento, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas. Embora as infecções causadas por dermatófitos sejam geralmente restritas às regiões superficiais da epiderme, esses fungos podem comportar-se de maneira invasiva, ocasionando infecção profunda e disseminada em pacientes imunocomprometidos, até mesmo com surgimento de granulomas dermatofíticos (Peres et al., 2010).

2.6.2 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes e ordem Saccharomycetales (NCBI Taxonomy, 2011). As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (Giolo & Svidzinsk, 2010). Este gênero contém mais de 150 espécies, mas apenas uma minoria é causadora de micoses em humanos (Silva et al., 2011).

As leveduras do gênero *Candida* ocorrem em todo o mundo podendo ser encontradas em variados ecossistemas, como solo, alimentos, água, e convivendo normalmente com animais e seres humanos saudáveis colonizando mucosas do trato gastrointestinal (50 a 70%), da boca (30 a 50%), da região vaginal (5 a 30%) e da pele (4 a 7%) (Silva et al., 2012, Silva et al., 2002). São leveduras dimórficas e são consideradas patógenos oportunistas, os quais dependem de fatores próprios de virulência e fatores predisponentes do hospedeiro para causar a infecção (Camargo et al., 2008).

A patogênese da candidíase é facilitada por vários fatores de virulência envolvidos em funções, tais como: aderência às células do hospedeiro pelas adesinas; formação de hifas e pseudohifas, as quais representam um obstáculo para a fagocitose e permitem a fixação da levedura nos epitélios; sobrevivência dentro de fagócitos; modulação do sistema imune, mananas e manoproteínas capazes de regular (ativar e desativar) a ação das defesas do hospedeiro; toxinas; capacidade de crescer a 37°C, a qual permite um bom desenvolvimento no corpo humano; e enzimas hidrolíticas. As principais enzimas produzidas são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos, auxiliando, assim, na aderência da levedura à mucosa do hospedeiro e também facilitando a invasão fúngica (Barbedo & Sgarbi, 2010, Penha et al., 2000).

A *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada e a principal envolvida na etiologia das infecções invasivas e superficiais e, também, a mais prevalente em ambas as condições, saudável e de doença em humanos. Entretanto, tem sido verificada uma crescente participação de espécies não-*albicans* nas infecções hospitalares em vários países (Pfaller et al., 2001, Odds et al., 2007, Lagrou et al., 2007, Jordá et al., 2007, Horn et al., 2007, Bougnoux et al., 2008, Hazen et al., 2003, Ferreira et al., 2009). No Brasil, em um estudo realizado no Complexo Hospitalar Santa Casa, foi verificado que espécies de *Candida* não-*albicans* corresponderam a 51,6% dos episódios de candidemia na Instituição; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e outras espécies foram responsáveis por 25,8%, 13,3%, 3,3%, 1,7% e 7,5% dos casos, respectivamente (Antunes et al., 2004). O aparente aumento do envolvimento de espécies não-*albicans* em candidíases

humanas pode, em parte, estar relacionado com a melhoria nos métodos de diagnóstico, tais como a utilização de meios cromogênicos com a capacidade de diferenciar as espécies de *Candida*, bem como a introdução de técnicas moleculares para o diagnóstico de rotina da fungemia (Liguori et al., 2009). No entanto, a alta prevalência de espécies não-*albicans* em doenças também pode ser um reflexo do seu nível inerentemente mais elevado de resistência a certos medicamentos antifúngicos em comparação com *C. albicans*, pois isso iria promover a sua persistência, possivelmente em detrimento de *C. albicans* em infecções mistas de espécies tratadas com antifúngicos tradicionais (Silva et al., 2011).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Os 40 isolados de actinomicetos utilizados no presente trabalho foram obtidos da coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS (Tabela 1). Os isolados fúngicos são de origem clínica e foram cedidos pelo professor Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria e pertencem à micoteca da Faculdade de Farmácia da UFRGS (Tabela 2).

3.2. Manutenção das amostras

As amostras dos fungos filamentosos e leveduras foram mantidas em tubos com ágar Sabouraud inclinado a 4°C e os isolados de actinomicetos em tubos com meio ágar amido caseína (ACA) inclinado e mantidos a 4°C.

3.3. Ensaio de dupla camada

A atividade antifúngica dos isolados de actinomicetos foi determinada através do método de dupla camada. Os isolados foram inoculados por picada em placas de Petri contendo meio de cultura ACA e incubados por 10 dias a 30°C. Os isolados dos fungos dermatófitos foram inoculados em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose e incubados por sete dias a 30°C. Os isolados de leveduras foram inoculados em tubos contendo meio Sabouraud dextrose e

incubados por 48 horas a 30°C. Sempre foi observado que os períodos de incubação dos fungos e dos actinomicetos terminassem concomitantemente.

Tabela 1 – Origem dos isolados de actinomicetos utilizados no estudo.

Actinomicetos	Origem	Utilizado frente aos isolados
1s	Compostagem	Candida e Dermatófitos
2(4)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
23	Compostagem	Candida e Dermatófitos
24(3)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
27(3)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
28	Compostagem	Candida e Dermatófitos
29	Compostagem	Candida e Dermatófitos
2s	Compostagem	Candida e Dermatófitos
37	Compostagem	Candida e Dermatófitos
43	Compostagem	Candida e Dermatófitos
5(3)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
50	Compostagem	Candida e Dermatófitos
6(2)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
6(4)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
6s	Compostagem	Candida e Dermatófitos
8(4)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
8e	Compostagem	Candida e Dermatófitos
8s	Compostagem	Candida e Dermatófitos
95	Compostagem	Candida e Dermatófitos
AP	Compostagem	Candida e Dermatófitos
Bio3	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
iso5(5)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
R(11)6	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
R(18)6	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
R19(6)	Raiz de tomateiro	Candida e Dermatófitos
A316	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A317	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A319	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A320	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A321	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A322	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A323	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos

A326	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A329	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A33	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A34	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A36	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
A37	Solo de São Sebastião do Caí, RS	Dermatófitos
D1	Solo contaminado com diesel	Dermatófitos
M53	Landfarming	Dermatófitos

Os fungos crescidos foram utilizados para preparar a suspensão de esporos. Para os isolados filamentosos foram colocados 3 mL de solução salina 0,85% estéril sobre as colônias e com o auxílio de uma alça de Drigalski os esporos foram removidos e a mistura transferida para tubos de vidro estéreis. A concentração final de esporos foi ajustada para 5×10^4 esporos/mL, através da contagem de conídios em câmara de Neubauer. Com os isolados de leveduras, o inóculo foi padronizado utilizado a escala 0,5 de McFarland. Dessas suspensões, 1 mL foi homogeneizada com 9 mL de ágar Sabouraud liquefeito e a mistura vertida sobre as placas contendo os actinomicetos crescidos. As placas foram incubadas a uma temperatura de 30°C por sete dias para os isolados dos fungos filamentosos e por 48 horas para as leveduras. Após o período de incubação observou-se a presença ou ausência de halos de inibição. O Índice de Antibiose (IA) foi calculado utilizando a fórmula (Rosato et al., 1981):

$$IA = \frac{\text{média do diâmetro do halo}}{\text{média do diâmetro da colônia}}$$

Tabela 2 – Identificação das espécies dos isolados fúngicos utilizados no presente estudo.

Amostras	Espécies
24A	<i>Candida dubliniensis</i>
24P*	<i>Candida dubliniensis</i>
CP04	<i>Candida parapsilosis</i>
CP07	<i>Candida parapsilosis</i>
CP08	<i>Candida parapsilosis</i>
CP06*	<i>Candida parapsilosis</i>
RL7	<i>Candida parapsilosis</i>
CK05	<i>Candida krusei</i>
CKR07	<i>Candida krusei</i>
CK06	<i>Candida krusei</i>
CK03*	<i>Candida krusei</i>
CK02	<i>Candida krusei</i>
CT09	<i>Candida tropicalis</i>
CT03	<i>Candida tropicalis</i>
CT08*	<i>Candida tropicalis</i>
CT56	<i>Candida tropicalis</i>
CT06	<i>Candida tropicalis</i>
CG10	<i>Candida glabrata</i>
CG03	<i>Candida glabrata</i>
CG05	<i>Candida glabrata</i>
CG01*	<i>Candida glabrata</i>
RL12	<i>Candida glabrata</i>
ATCC10231*	<i>Candida albicans</i>
CAL15	<i>Candida albicans</i>
CAL05	<i>Candida albicans</i>
CAL17	<i>Candida albicans</i>
CAL02	<i>Candida albicans</i>
EF31*	<i>Epidermophyton floccosum</i>
MGY45*	<i>Microsporum gypseum</i>
MCW3*	<i>Microsporum canis</i>
TMW1*	<i>Trichophyton metagrophytes</i>
TRW2*	<i>Trichophyton rubrum</i>

* isolados utilizados nos ensaios de dupla camada e de padronização do extrato, os demais foram utilizados com extrato nas condições ideais.

3.4 Produção de extrato bruto

Os actinomicetos que demonstraram potencial antifúngico frente aos seis isolados de *Candida* testados, no ensaio de dupla camada, foram selecionados para produção e otimização da produção do composto ativo em cultura submersa. Os extratos foram preparados em duas etapas: o pré-inóculo, no qual o isolado antagonista foi inoculado em 50 mL de meio de cultura amido caseína (AC) e incubado por 48 horas a uma temperatura de 30°C sob agitação constante de 100 r.p.m.. Posteriormente, uma alíquota de 5 mL do pré-inóculo foi transferida para frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL do meio. As condições do pré-inóculo e do inóculo foram sempre iguais. As culturas foram crescidas por oito dias e a cada 24 horas foram retiradas alíquotas da amostra para avaliação. Para remoção das células as alíquotas foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. e, dessa forma, obteve-se o extrato bruto livre de células.

3.5 Otimização da produção de extrato bruto

3.5.1 Meios de cultivo

Foram utilizados para a produção de extrato bruto três meios de cultura diferentes. O caldo AC (10g amido, 0,3g caseína, 2g KNO₃, 2g NaCl, 2g K₂HPO₄, 0,05g MgSO₄, 0,02g CaCO₃, 0,01g FeSO₄, água destilada para 1L), o caldo ISP2 (4g extrato de levedura, 10g extrato de malte, 4g dextrose, água destilada para 1L), e o caldo Bennet's (1g extrato de carne, 10g glicose, 2g peptona, 1g extrato de levedura, água destilada para 1L). As condições de cultivo foram às mesmas descritas no item 3.4.

3.5.2 Diferentes temperaturas

Após avaliar o melhor meio de cultivo foi realizado um ensaio para avaliar a influência da temperatura na produção do composto bioativo. As temperaturas de 25°, 30°, 35°, 40° e 45°C foram testadas.

3.5.3 Diferentes faixas de pH

Definidos a temperatura e o melhor meio de cultivo, foi avaliado a influência de diferentes pHs na produção do metabólito bioativo. Para tanto, foram produzidos extratos com meio de cultivo tamponado em pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 e 10.0 (Apêndice 1) utilizando a temperatura de 30°C para todos.

3.6 Ensaio de difusão em poço

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada através do método de difusão em poço. Para isso foram utilizadas placas de Petri contendo 20 mL de ágar Sabouraud, onde foi semeada uma suspensão de células dos isolados de *Candida* na concentração de 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foram realizados poços de 7 mm de diâmetro no meio de cultura e em cada um deles foi pipetado 100 µL de cada extrato. As placas foram incubadas sob refrigeração (4°C) por aproximadamente 16 horas para permitir a difusão dos metabólitos no meio de cultura. Após esse período, as placas foram incubadas a 30° C por 48 horas. A análise do resultado foi realizada através da medida dos halos de inibição e o Índice de Antibiose (IA) foi calculado utilizando a fórmula $IA = \text{medida do halo} / \text{medida do poço}$.

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos no ensaio de difusão em poço foi realizada através da análise de variância utilizando o teste de comparação múltipla de médias (Tukey) com valor de $P \geq 0,05$, no programa Statistica 7.

3.8 Ensaio de termoestabilidade do composto bioativo

Para analisar a termoestabilidade do composto bioativo, o extrato bruto foi submetido à incubação em diferentes temperaturas. Microtubos contendo 500 μL do extrato bruto foram colocados em banho de água a 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°C, por períodos de 15 e 30 minutos. Para avaliar a estabilidade a 100°C (através de fervura) foram utilizados períodos de 3, 5, 10, 15 e 30 minutos. Em seguida, a atividade antifúngica dos extratos foi analisada através do ensaio de difusão em poço frente ao isolado de *Candida albicans* CAL17, tendo como controle o extrato bruto sem tratamento. Após a medição dos halos de inibição, a atividade residual (A.R.) foi calculada através da fórmula (Cladera-Oliveira, 2004):

$$\text{A.R.(\%)} = \frac{\text{Ht} - 7}{\text{Hc} - 7} \times 100$$

Sendo:

Ht = halo do extrato bruto após tratamento (mm)

Hc = halo do controle (mm)

7 = diâmetro do poço

3.9 Efeito de enzimas na atividade do composto bioativo

Para avaliar a resistência do composto antifúngico frente a enzimas proteolíticas, 500 µL do extrato bruto foram incubados durante uma hora a 37°C, utilizando uma concentração final de 2mg/mL das enzimas proteinase K, tripsina e papaina. As amostras foram fervidas por 3 minutos para inativar as enzimas e, em seguida, foi realizado o ensaio de difusão em poço para a amostra de *Candida albicans* CAL17. Os halos foram medidos e a atividade residual calculada.

3.10 Fungigrama

Para avaliar a suscetibilidade dos isolados de *Candida* a agentes antifúngicos, foi realizado o ensaio de disco-difusão em ágar. Foram utilizados discos antifúngicos de fluconazol e de nistatina da marca BIO-RAD. O ensaio foi realizado seguindo as normas da CLSI M44-A com modificações. Foram utilizadas placas de ágar Mueller-Hinton com 2% de glicose, onde foi inoculada uma suspensão de células na concentração de 0,5 na escala de McFarland. Os discos de antifúngicos foram colocados sobre o ágar e as placas incubadas a 30°C, sendo analisadas após 24 e 48 horas de incubação.

3.11 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada seguindo a norma M27-A2 da CLSI (2002), com modificações. Foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços com fundo em “U” e com tampa. Nas placas foi distribuído inicialmente 100 µL de meio RPMI-1640 com o inóculo das leveduras testadas. Em seguida

foi pipetado 100 μL do extrato bruto e feita a diluição seriada ao longo dos poços.

O inóculo dos isolados foi preparado utilizando colônias crescidas em ágar Sabouraud por 24 horas. Uma suspensão em água estéril, equivalente a 0,5 da escala de McFarland, foi preparada e a concentração obtida foi de 1×10^6 a 5×10^6 cel/mL. As suspensões foram diluídas com meio RPMI-1640 resultando em uma concentração de $2,5 \times 10^3$ cel/mL.

As placas foram incubadas a 35°C e foram utilizados como controle o extrato puro e o meio de cultivo com o inóculo das leveduras. A leitura das placas foi realizada em 24 e 48 horas.

3.12 Curva de crescimento do actinomiceto

Para determinar o tempo de geração do isolado com potencial antifúngico, foi realizada uma curva de crescimento padrão. Para tanto, 5 mL do pré-inóculo, crescido por 48 horas em caldo AC a 30°C , foi adicionado a 8 frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo AC. Os frascos foram incubados à temperatura de 30°C durante 192 horas sob agitação constante de 100 r.p.m. Em intervalos de 24 horas foi determinada a massa celular através do peso seco.

3.13 Curva de variação do pH no meio de cultivo

Para verificar a capacidade do isolado de modificar as condições de pH do meio de cultivo ao longo do período de 192 horas de crescimento celular, foi realizada uma curva para determinação da variação do pH do meio de cultivo. O pré-inóculo foi preparado em caldo AC a 30°C pelo período de 48 horas.

Deste cultivo, alíquotas de 5 mL foram transferidas para cada um dos 8 frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de caldo AC. Estes foram incubados a 30°C com agitação constante de 100 r.p.m.. Em intervalos de 24 horas um frasco era retirado e avaliava-se com auxílio do pHmetro as variações de pH do meio de cultivo.

3.14 Microcultivo do actinomiceto

O microcultivo foi utilizado para observar as características morfológicas do isolado de actinomiceto. A técnica foi realizada conforme Williams et al. (1989). Essa técnica possibilita a observação do micélio aéreo e do micélio sobre o substrato e avaliação das estruturas reprodutivas, quando presentes.

3.15 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica foi utilizada para verificar as características dos esporos e hifas do actinomiceto. Inicialmente, foi realizada a técnica do microcultivo, após o tempo de incubação adequado a amostra foi preparada para a visualização através de microscopia eletrônica de varredura utilizando o protocolo descrito por Ciftcioglu & Kajander (1998), com modificações. A amostra foi coberta com glutaraldeído 2% por 18 horas, posteriormente foi submetida a lavagens com diferentes concentrações de álcool (50 e 100%) e posteriormente com acetona 100%. Em seguida, a amostra foi enviada para o Laboratório de Design e Seleção de Materiais no Departamento de Engenharia da UFRGS. Para visualização das lâminas foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de bancada da marca Hitachi, modelo TM3000, que possibilita análises microscópicas com aumento de até 30.000 vezes, com feixes de 5 e 15 keV.

3.16 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação de compostos. Neste trabalho foram utilizadas placas de alumínio e sílica gel 60F₂₅₄ da Merck, nas quais se aplicou aproximadamente 40 µL do extrato bruto. As placas foram incubadas em estufa a 30°C para secagem e, em seguida, colocadas em diferentes cubas de vidro, nas quais diferentes solventes e sistemas de solventes foram testados conforme literatura (Badji et al., 2005; Boudjella et al., 2006; Carvalho, 2007):

- Clorofórmio
- Diclorometano
- Etanol
- Acetato de etila
- Hexano
- Butanol
- Água
- Ácido acético
- Acetato de etila/ etanol (1:1)
- Clorofórmio/ Etanol/ água (16: 8: 1)
- Acetato de etila/ Metanol/ água (100: 13,5: 10)
- BAW: Butanol/ Ácido acético/ água (4: 1: 5)

A leitura das placas foi realizada com luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e os R_f (Fator de Retenção) das bandas visualizadas foram calculados.

3.17 Autobiografia

Autobiografia é uma técnica utilizada para identificar banda(s) da CCD com atividade antimicrobiana. Para isto a placa da CCD é colocada em meio de cultura junto com a levedura alvo e verifica-se onde ocorre a inibição de crescimento.

Sendo assim, após visualização das placas na UV, essas foram colocadas em placas de Petri onde foi vertida uma camada fina de ágar Sabouraud. Sobre o ágar foi inoculada a levedura alvo, CAL17, na diluição de 0,5 da escala de McFarland.

As placas foram incubadas a 4°C por aproximadamente 16 horas para ocorrer à difusão do composto ativo da sílica para o ágar e, em seguida, as placas foram transferidas para estufa a 30°C por 24 horas, quando foi realizada a leitura do resultado. Na banda com a presença do composto bioativo, há inibição do crescimento da levedura.

3.18 Identificação parcial do composto bioativo

3.18.1 Coloração de CCD

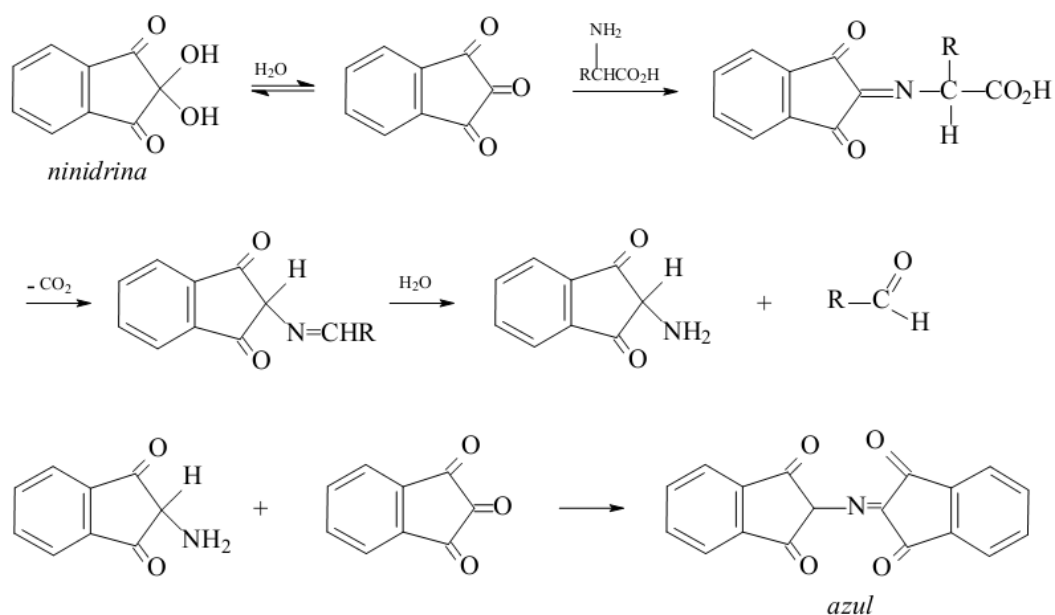
Diferentes agentes reativos foram utilizados para visualizar, na CCD, a presença de diferentes estruturas químicas. No presente estudo foram usados: cloreto férrico, ninhidrina e anisaldeído.

Em todas as colorações foram utilizados como padrões os antibióticos ciprofloxacina, eritromicina, penicilina G, rifampicina, estreptomicina, tetraciclina e cloridrato de vancomicina (Apêndice 2). Estes foram dissolvidos em água (10 mg/mL de cada) e aplicados na mesma placa de sílica onde foi aplicado o

extrato bruto contendo o composto antifúngico em estudo. Em seguida, foram submetidos à CCD com o mesmo sistema escolhido para a separação do composto produzido pelo actinomiceto em estudo: Butanol/ Ácido acético/ Água.

A solução reativa de cloreto férrico foi utilizada para verificar a presença de hidroxilas fenólicas, ou seja, grupos OH ligados a um anel aromático. Essa solução foi preparada dissolvendo 3 – 5 g de FeCl₃ em 100 mL de clorofórmio 1% e deixado em repouso por 1 hora. Em seguida, foi retirada a parte decantada e adicionado 3 gotas de piridina. A solução foi borrifada sobre a placa de sílica e as cores visualizadas.

O teste com a ninhidrina foi realizado para observar a presença de grupos amino livres. A solução de ninhidrina (0,4g em 100 mL de água) foi borrifada sobre a placa de sílica e colocada na luz UV. Em seguida, a placa foi colocada a 100°C por alguns minutos e as cores visualizadas.



A solução para coloração com anisaldeído foi preparada através da combinação de 9 mL de etanol 95% com 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e duas gotas de ácido acético glacial. Lentamente, foi adicionado 0,5 mL de anisaldeído. A mistura foi borrifada sobre a placa de sílica e colocada na estufa a 100°C por alguns minutos para secar e ocorrer a formação de manchas coloridas (Shiner et al. 2004). Esse reagente é utilizado para identificar alguns compostos naturais como alcalóides ou flavonóides.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de dupla camada

O ensaio de dupla camada foi utilizado para verificar quais dos isolados de actinomicetos utilizados no estudo possuíam potencial de atividade antifúngica frente aos isolados fúngicos de origem clínica.

O ensaio de dupla camada com os fungos dermatófitos foi inicialmente realizado utilizando 25 isolados de actinomicetos. Como não foi obtido nenhum resultado positivo, mais 15 isolados de actinomiceto foram testados. Ainda assim nenhum dos microrganismos testados mostrou atividade de inibição frente a esses fungos filamentosos. A busca de substâncias com atividade antifúngica contra os fungos dermatófitos têm sido bastante difícil. No estudo realizado por Augustine et al (2005), 218 isolados de actinomicetos foram testados e apenas um (0,45%) isolado mostrou atividade contra fungos desse grupo. Dos 100 isolados testados por Lakshmipathy & Kannabiran (2009), apenas 3% mostraram atividade frente espécies de dermatófitos. Já Deepa et al. (2011) isolaram 30 actinomicetos do solo e obtiveram atividade antifúngica frente a *Microsporium* spp de 5 (16%) isolados, porém os autores observaram através da separação desses compostos bioativos por CCD que os valores de Rf obtidos foram semelhantes aos compostos antifúngicos utilizados comercialmente, podendo significar que os mesmos compostos são responsáveis pela atividade antimicótica desses isolados.

Já no ensaio de dupla camada realizado com as leveduras, foram utilizados os 25 isolados de actinomicetos e onze destes (44%) foram capaz de produzir halos de inibição (Figura 3) em pelo menos uma das espécies de *Candida* testadas (Tabela 3). Este número é relativamente alto quando comparado com outros estudos, como o de Bachiega et al. (2005) que encontraram 20,3% de atividade contra *C. albicans*. Gandotra et al. (2012) observaram que, dos *Streptomyces* sp. analisados, 33,3% mostraram alguma atividade antifúngica frente isolados de *Candida* spp. Outros autores também encontraram actinomicetos com atividade para isolados de *C. albicans* com porcentagem de 11,1% (Aly et al., 2011), 5% (Hong et al., 2009) e 12,5% (Susithra et al., 2009).

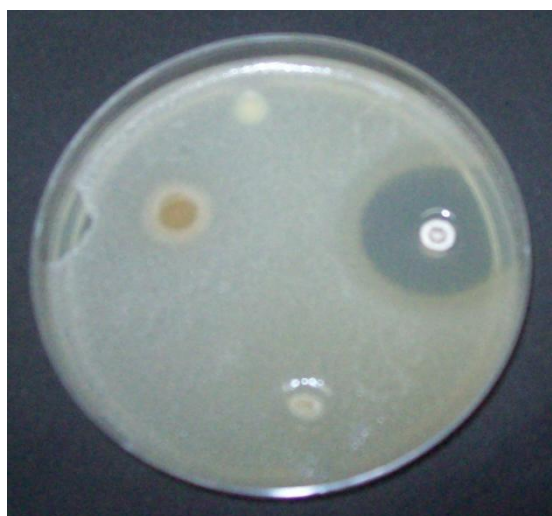


Figura 3 - Halo de inibição formado pelo isolado R18(6) no ensaio de dupla camada frente ao isolado de *Candida krusei* (CK03).

Os isolados de actinomicetos 1S, R18(6) e 6(2) mostraram atividade antifúngica contra as seis espécies de *Candida* avaliadas e foram selecionados para a etapa de otimização da produção do metabólito em meio líquido.

Tabela 3 - Valores do índice de antibiose obtidos no ensaio de dupla camada dos isolados de actinomicetos frente às seis espécies de *Candida*.

Actinobactérias	<i>C. dubliniensis</i> (24P)	<i>C. albicans</i> (ATCC)	<i>C. parapsilosis</i> (CP06)	<i>C. krusei</i> (CK03)	<i>C. glabrata</i> (CG01)	<i>C. tropicalis</i> (CT08)
1s	0,33	0,31	0,81	1,83	0,42	1,00
2s	0	0	0	0	0	0
6s	0	0	0	0	0	0
8s	0	0	0	0	0	0
8e	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0
AP	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0
R18(6)	1,28	0,58	1,50	1,27	0,93	1,15
Bio 3	0	0	0	0	0	0
6(4)	0	0,44	0,11	0,33	0,36	0,37
R(11)6	0,78	0,75	0,23	0,36	0	1,87
24(3)	0	0,33	0	0,10	0,55	0,15
R19(6)	0	0	0	0	0	0
2(4)	0	0,27	0	0	0,33	0,13
6(2)	0,90	0,80	1,00	0,50	1,25	0,53
8(4)	0	0,33	0	0	0	0
27(3)	0	0,29	0	0,16	0	0,22
5(3)	0	0,30	0	0	0,50	0,07
iso5(5)	1,30	0,27	0	0,50	1,00	0
23	0	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0

4.2 Otimização da produção de extrato bruto

4.2.1 Meios de cultivo

Os actinomicetos 1S, R18(6) e 6(2) foram inoculados em caldo AC, ISP2 e Bennet's para a produção dos extratos brutos e através do ensaio de difusão em poço foi possível observar a presença ou ausência da atividade antifúngica para os isolados de *Candida* spp. (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados obtidos no ensaio de difusão em poço utilizando diferentes meios de cultivo para produção de compostos antifúngicos dos isolados R18(6), 1S e 6(2).

Meios \ Isolados	R18(6)	1S	6(2)
AC	+	-	-
ISP2	-	-	+
Bennet's	-	-	+

O isolado 1S não manteve sua atividade antifúngica quando cultivado em meio líquido. Estudos têm mostrado que a produção de antibióticos ocorre melhor em meios de cultura sólidos do que em culturas submersas, onde a atividade pode diminuir ou deixar de ser exibida. Thakur et al. (2007) observaram que dos 65 isolados com atividade antibacteriana em meio sólido, 15 não exibiram atividade em meio líquido. Resultados semelhantes foram descritos por outros autores (Salamoni et al. 2010, Anibou et al. 2008, Maruyama et al. 1975). A produção de antibióticos em culturas líquidas é geralmente baixa e a detecção de compostos bioativos requer níveis de

concentração elevados (Oliveira et al. 2010). Outro fator que pode causar essa perda de atividade em meio líquido é a necessidade de contato entre as células dos microrganismos antagônicos para induzir a produção do composto antifúngico.

O isolado 6(2) quando cultivado em caldo ISP2 e no Bennet's mostrou atividade antifúngica frente a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. No meio AC não mostrou atividade antifúngica. Já o isolado R18(6) mostrou atividade frente às seis espécies de *Candida* testadas quando crescido em meio AC, no entanto, nos demais meios utilizados para cultivo não ocorreu formação de halos de inibição.

A produção de metabólitos bioativos por diferentes microrganismos é influenciada pela concentração e tipo de fonte de carbono, de nitrogênio e sais minerais contidos no meio de cultivo. Os resultados da atividade antimicrobiana obtidos no presente estudo demonstram isso e estão de acordo com dados obtidos por outros pesquisadores que observaram que a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. pode aumentar ou ser completamente inibida de acordo com a composição dos meios de cultivo utilizados para a produção de compostos bioativos (Prema et al., 2009, Shahat et al., 2011).

Um fator importante observado nos resultados do isolado R18(6) é a falta de atividade quando cultivado em meio contendo glicose. Mellouli et al. (2003), em seu estudo, testaram como fonte de carbono o amido, a glicose, a frutose, o glicerol e a sacarose e obtiveram atividade antimicrobiana apenas quando amido foi a fonte de carbono, esses dados corroboram com os observados neste estudo. A glicose diminui a formação de muitos antibióticos

produzidos por actinomicetos (a estreptomicina, a canamicina, a istamicina, a neomicina, a actinomicina) através da repressão de enzimas biossintéticas (Sanchez & Demain 2002). Desta forma, é possível explicar a falta de atividade antifúngica observada quando o isolado R18(6) foi cultivado nos meios ISP2 e Bennet's, que contêm glicose na sua formulação. Por outro lado, o isolado 6(2) mostrou um comportamento inverso ao isolado R18(6), sendo observada atividade inibitória quando cultivado nos meios contendo glicose (ISP2 e Bennet's) e falta de atividade quando no meio sem presença da glicose (AC). Esse fato demonstra a grande diversidade fisiológica presente entre as bactérias do grupo dos actinomicetos.

Como o isolado R18(6) foi o único que inibiu as seis espécies de *Candida* quando cultivado em cultura submersa, este foi o isolado selecionado para prosseguir os ensaios de otimização da produção de composto bioativo utilizando caldo AC.

4.2.2 Diferentes temperaturas

O isolado R18(6) foi inoculado em caldo AC e incubado nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C. Alíquotas dos extratos foram retiradas desde o pré-inóculo até o oitavo dia de crescimento. Para verificar a presença de atividade antifúngica nos extratos, foi realizado o ensaio de difusão em poço e o índice de antibiose foi calculado (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores dos índices de antibiose obtidos na otimização da produção de compostos antifúngicos pelo isolado R18(6) em caldo AC submetido a diferentes temperaturas de incubação. PI (pré-inóculo).

	Tempo	<i>C. dubliniensis</i> (24P)	<i>C. parapsilosis</i> (CP06)	<i>C. krusei</i> (CK03)	<i>C. glabrata</i> (CG01)	<i>C. tropicalis</i> (CT08)	<i>C. albicans</i> (ATCC)
25°C	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	1,61	1,93	1,75	0,00	1,75	0,00
	72h	1,86	2,14	1,79	0,00	2,00	0,00
	96h	1,68	1,79	0,00	0,00	0,00	0,00
	120h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	144h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	168h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	192h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30°C	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	1,54	1,64	1,50	0,00	1,50	0,00
	48h	2,04	2,32	1,86	0,00	1,75	0,00
	72h	2,07	2,29	1,96	1,61	1,96	1,43
	96h	1,61	1,68	1,61	0,00	1,61	0,00
	120h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	144h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	168h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	192h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
35°C	PI	1,68	1,89	1,43	0,00	1,46	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	1,79	1,79	0,00	0,00	1,68	0,00
	72h	1,75	1,82	1,46	0,00	1,79	0,00
	96h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	120h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	144h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	168h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	192h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

O extrato produzido a 25°C mostrou atividade antifúngica, porém não para todos os isolados analisados (Figura 4), as amostras de *Candida albicans* e *C. glabrata* não tiveram seu crescimento inibido. Nesta temperatura foi possível observar que a partir de 48 horas de crescimento até 96 horas o composto bioativo estava presente. Entretanto em 96 horas o produto apresentou atividade apenas contra *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*.

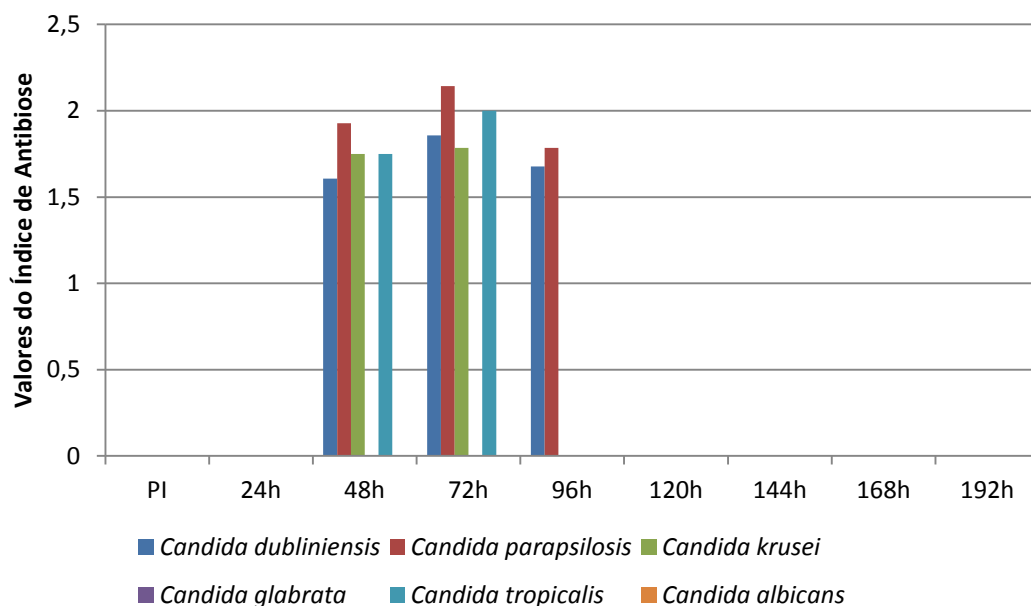


Figura 4 – Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 25°C, frente isolados de *Candida* sp.

O extrato produzido na temperatura de 30°C mostrou atividade antifúngica frente às seis espécies de *Candida* (Figura 5). A partir de 24 horas até 96 horas de cultivo, o produto produzido pelo isolado R18(6) inibiu as amostras de *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Em 72 horas, também, foi possível observar a inibição do crescimento dos isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Quando testado o extrato a 35°C, não se obteve resultados positivos para as amostras de *C. albicans* e *C. glabrata*. Para as demais espécies foi observada atividade antifúngica no pré-inóculo, 48 e 72 horas de crescimento (Figura 6), com exceção do isolado de *C. krusei*, que não foi inibido pelo extrato produzido em 48 horas. A presença de atividade antifúngica no extrato do pré-inóculo foi observada apenas no crescimento a 35°C. Uma hipótese para essa observação é que o actinomiceto crescendo a essa temperatura tenha

produzido algum metabólito durante o cultivo do pré-inóculo em uma concentração que inibiu o crescimento das leveduras. No entanto, esse composto não é uma molécula estável, pois a cada 24h era possível observar variações na atividade.

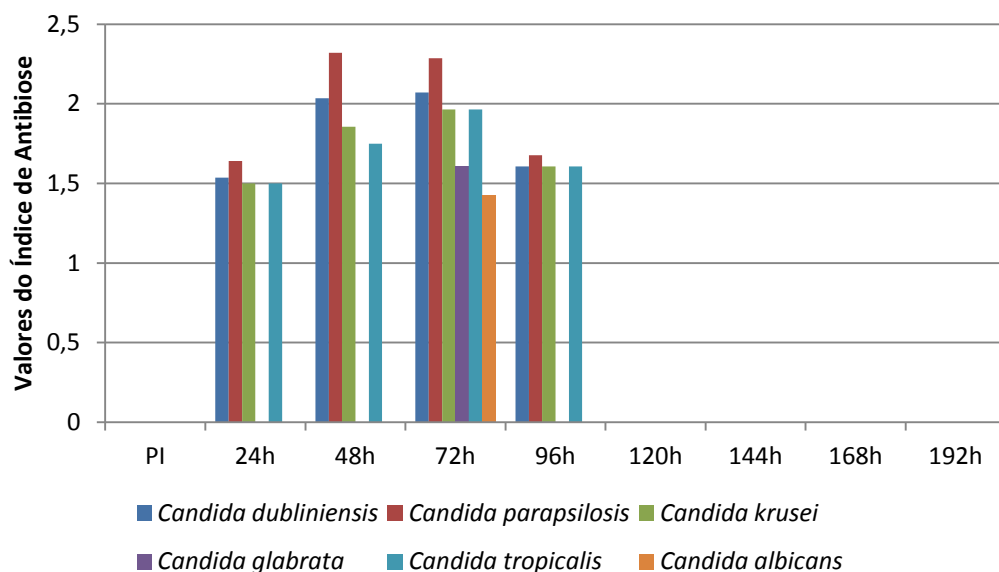


Figura 5 – Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 30°C, frente isolados de *Candida* sp.

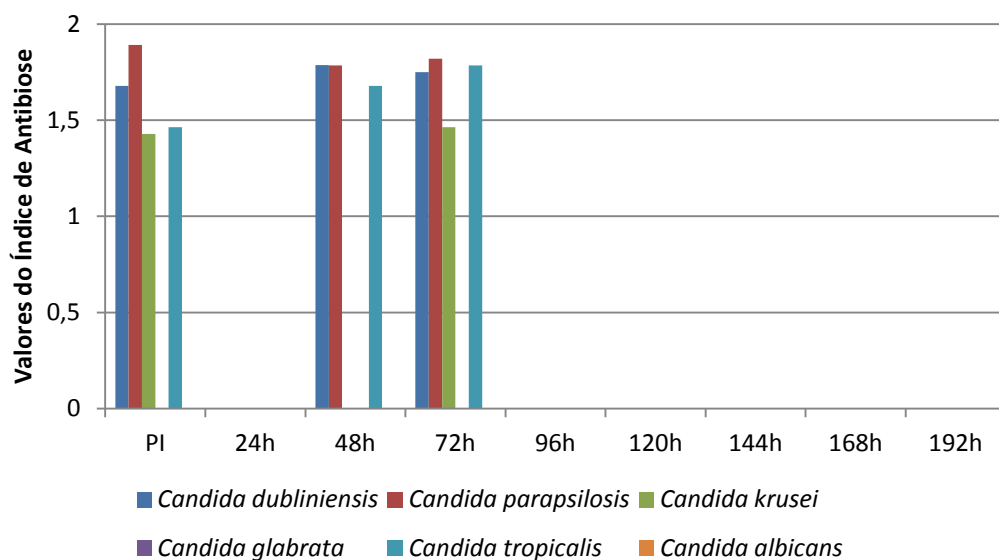


Figura 6 – Valores do índice de antibiose obtidos na produção de extrato do isolado R18(6) em caldo AC a 35°C, frente isolados de *Candida* sp.

Na temperatura de 40°C o extrato não mostrou nenhuma atividade antifúngica e na temperatura de 45°C o isolado R18(6) não mostrou crescimento celular.

Com base nesses dados observou-se que a temperatura de 30°C para o crescimento do isolado R18(6) é a melhor condição para ocorrer a produção de metabólitos ativos contra todas as espécies de *Candida* analisadas. Gupte & Kulkarni (2002) avaliaram diferentes condições para o cultivo de um isolado de *Streptomyces chattanoogensis* a fim de otimizar a produção de antifúngico com atividade contra *Candida albicans*. Os autores também observaram que a 30°C o isolado de *S. chattanoogensis* apresentou melhor atividade. Da mesma forma, outros trabalhos testaram a influência de diferentes temperaturas para a produção de compostos antimicrobianos e obtiveram melhor produção destes compostos quando cultivando seus isolados a 30°C (Selvin et al., 2009, Sujatha et al., 2005, Hassan et al., 2001).

4.2.3 Diferentes faixas de pH

Para avaliar a influência do pH na produção do composto bioativo, o isolado R18(6) foi inoculado em caldo AC tamponado com diferentes faixas de pH e incubado a 30°C por oito dias. O actinomiceto mostrou crescimento celular nos meios de cultura com pH 5,0 até o pH 10,0. Quanto à atividade antifúngica, observou-se que nos pHs mais elevados (pH 9,0 e pH 10,0) os extratos não formaram halos de inibição no ensaio de difusão em poço. Nos demais pHs analisados, houve a formação de halos e o índice de antibiose foi calculado (Tabela 6). Os valores dos índices de antibiose foram analisados estatisticamente através do teste de Tukey.

O extrato produzido no meio AC com pH 5,0 mostrou atividade antifúngica para as seis espécies de *Candida* sp. a partir de 96h de cultivo. Quando analisado o extrato bruto produzido no meio com pH 6,0, também foi observada atividade para todos os isolados a partir das 96h de cultivo, porém para a amostra de *C. albicans* não se obteve inibição do crescimento. Avaliando o extrato do pH 7,0, observou-se atividade antifúngica a partir das 120h de crescimento celular para as seis espécies de *Candida* testadas. Já no extrato produzido no meio com pH 8,0, foi verificada atividade antifúngica a partir das 72h de cultivo para todas as espécies de *Candida* analisadas, com exceção da *C. albicans* que foi inibida apenas com o extrato de 144 e 168h de cultivo.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com os dados que têm sido relatados na literatura, que afirmam que os fatores ambientais como nutrientes, temperatura, pH e tempo incubação têm profunda influência na produção de antibióticos. Susithra et al. (2009), estudando um composto anti-*candida* observaram melhor atividade em pH 8,0 e com 144 horas de cultivo. Já, Dasari et al. (2011) observaram melhor produção de antimicrobiano em pH 6,0 com tempo de incubação de 96 horas. Arasu et al. (2009) observaram a melhor produção de antimicrobiano por um *Streptomyces* spp. com 96h de crescimento em pH 7,0. Outros estudos também demonstram a presença de diferenças na otimização da produção de compostos antimicrobianos, modificando temperatura, tempo de cultivo e faixa de pH ótimos (Selvin et al. 2009, Sujatha et al. 2005, Sajid et al. 2011, Thumar et al. 2010, Gandhimathi et al. 2009, Ripa et al. 2009, Oskay 2009).

Tabela 6- Valores dos índices de antibiose obtidos na otimização da produção de compostos antifúngicos pelo isolado R18(6) em caldo AC submetido a diferentes faixas de pH. PI (pré-inóculo).

	Tempos	C. <i>dublinsiensis</i> (24P)	C. <i>parapsilosis</i> (CP06)	C. <i>krusei</i> (CK03)	C. <i>glabrata</i> (CG01)	C. <i>tropicalis</i> (CT08)	C. <i>albicans</i> (ATCC)
pH 5,0	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	72h	1,96	2,18*	2,00*	1,61*	1,79	1,46*
	96h	2,14*	2,43*	2,11*	1,71*	2,04*	1,68*
	120h	2,21*	2,57*	2,11*	1,82*	2,14*	1,71*
	144h	2,04*	2,54*	2,07*	1,57*	2,15*	1,46*
	168h	2,00*	2,50*	1,93*	1,64*	2,04*	0,00
	192h	2,54*	2,61*	2,43*	1,86*	2,50*	0,00
pH 6,0	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	1,43	1,96	1,43	0,00	1,50	0,00
	72h	2,04*	2,32*	2,04*	0,00	2,11*	0,00
	96h	2,00*	2,32*	2,04*	1,43*	1,86*	0,00
	120h	2,14*	2,54*	2,04*	1,54*	1,93*	0,00
	144h	2,18*	2,57*	2,14*	1,54*	2,11*	0,00
	168h	2,32*	2,61*	2,39*	1,68*	2,29*	0,00
	192h	2,18*	2,54*	1,86	1,46*	2,00*	0,00
pH 7,0	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	72h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	96h	1,36	1,50	1,43	0,00	1,46	0,00
	120h	2,39*	2,89*	2,32*	1,86*	2,36*	1,57*
	144h	2,57*	3,07*	2,71*	2,14*	2,64*	1,89*
	168h	2,50*	2,75*	2,68*	1,96*	2,32*	1,82*
	192h	2,39*	2,14*	1,86	0,00	2,11*	0,00
pH 8,0	PI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	24h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	48h	1,43*	1,93*	1,43	0,00	1,50*	0,00
	72h	1,93*	2,07*	1,71*	1,46*	1,79*	0,00
	96h	2,00*	2,18*	2,00*	1,43*	2,07*	0,00
	120h	2,07*	2,43*	2,21*	1,50*	2,11*	0,00
	144h	2,00*	2,32*	2,14*	1,50*	2,14*	1,36*
	168h	2,07*	2,18*	2,25*	1,50*	2,07*	1,50*
	192h	1,46*	1,75	1,68*	0,00	1,57*	0,00

Médias seguidas de *, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Temperaturas e faixas de pH extremas não são favoráveis para a produção de antibióticos, o que se observa é que as melhores condições de produção ficam em torno do pH 7,0 (Narayana & Vijayalakshmi 2008). O trabalho realizado por Oliveira et al. (2010), utilizando o mesmo isolado R18(6), mostrou que este possui um potencial como agente de biocontrole de fitopatógenos de tomateiro e encontrou a melhor atividade em caldo AC, na temperatura de 30°C e pH 7,0, que estão de acordo com os dados apresentados neste estudo.

Com o intuito de obter um extrato com atividade para inibir as seis espécies de *Candida* utilizadas nesse trabalho e, também, conseguir isso em um menor período de tempo, foi realizada uma comparação entre os melhores resultados obtidos. Comparando os índices de antibiose do extrato produzido em 96h no pH 5,0, do extrato com 120h de cultivo no pH 7,0 e do extrato em 72h em caldo AC sem tamponamento do pH, observou-se que os valores do índice de antibiose não foram significativamente diferentes ($p \geq 0,05$) (Tabela 7). Desta forma, escolheu-se trabalhar com o isolado R18(6) em caldo AC não tamponado, a uma temperatura de 30°C e com tempo de cultivo de 72h.

Depois de realizada a padronização da produção de extrato bruto, foi realizado o ensaio de difusão em poço para todos os isolados clínicos de *Candida* e o índice de antibiose foi calculado (Figura 7). Pode-se observar que os índices de antibiose variaram de 1,5 até 2,7 dependendo do isolado de *Candida* analisado.

Tabela 7 - Comparação dos valores do Índice de Antibiose dos extratos produzidos no caldo AC com pH 5,0 a 96h, no caldo AC com pH 7,0 a 120h e no caldo AC não tamponado a 72h, utilizando o teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Tempos		C. <i>dubliniensis</i>	C. <i>parapsilosis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>glabrata</i>	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>albicans</i>
pH 5,0	96h	2,14*	2,43*	2,11*	1,71*	2,04*	1,68*
pH 7,0	120h	2,39*	2,89*	2,32*	1,86*	2,36*	1,57*
AC	72h	2,07*	2,29*	1,96*	1,61*	1,96*	1,43*

Médias seguidas de *, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

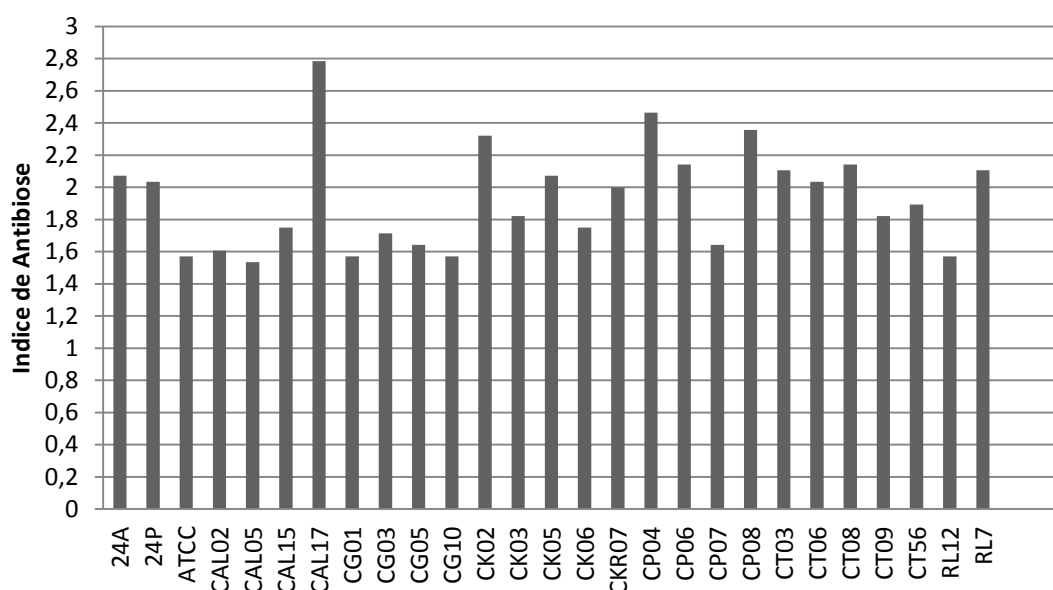


Figura 7 – Gráfico dos índices de antibiose do extrato padronizado (caldo AC, 30°C e 72h de cultivo) frente aos isolados clínicos de *Candida*.

4.3 Ensaio de termoestabilidade do composto bioativo

O composto antifúngico presente no extrato bruto produzido pelo isolado R18(6) foi submetido ao ensaio de termoestabilidade para verificar sua capacidade de tolerar temperaturas de 30°C até 100°C sem perder a atividade. Os valores da Atividade Residual (A.R.) foram calculados e analisados estatisticamente pelo teste de Tukey.

Quando avaliada a termoestabilidade nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C, foram utilizados períodos de 15 e 30 minutos de incubação. Os valores da A.R. variaram entre 81% e 100% desde o período de incubação de 15 minutos a 30°C até o de 15 minutos a 80°C. As alíquotas incubadas por 30 minutos a 80°C e 15 minutos a 90°C tiveram perda significativa de atividade com o valor de A.R. de 55% e 60%, respectivamente. Quando avaliado por 30 minutos a 90°C o extrato perdeu totalmente a atividade antifúngica (Figura 8).

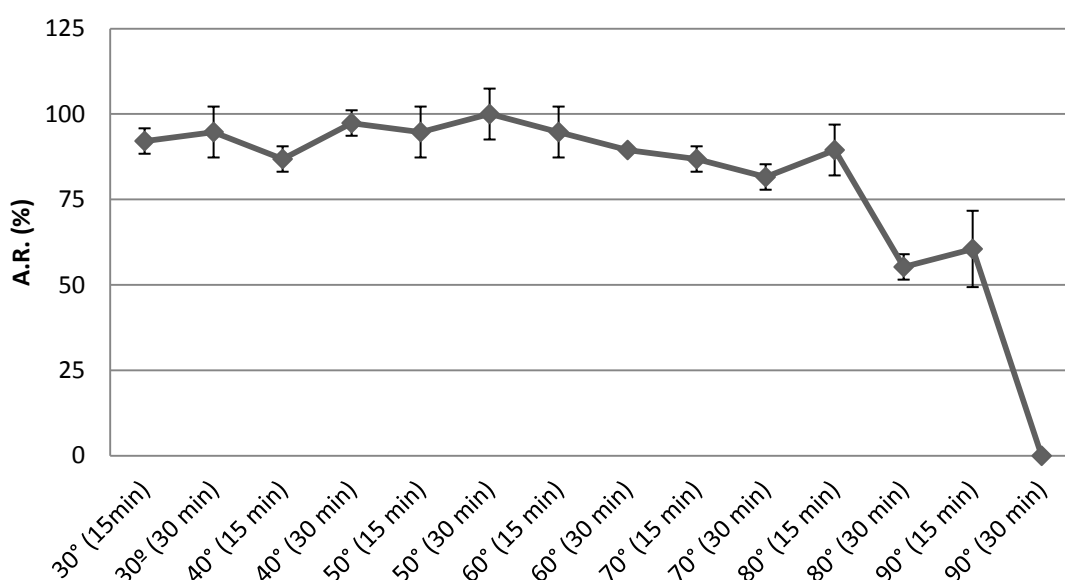


Figura 8 – Valores da atividade residual (A.R.) obtidos no ensaio de termoestabilidade do extrato bruto do isolado R18(6) nas temperaturas de 30°C até 90°C.

Quando avaliada a estabilidade do composto a 100°C, foram utilizados períodos de incubação menores com o intuito de verificar por quantos minutos a atividade antifúngica não seria afetada por esta temperatura. O extrato

manteve sua atividade nos primeiros 3 minutos, com o valor de A.R. de 86%. No período de 5 minutos a atividade residual diminuiu para 76% e a 10, 15 e 30 minutos de incubação não foi observada nenhuma atividade antifúngica (Figura 9).

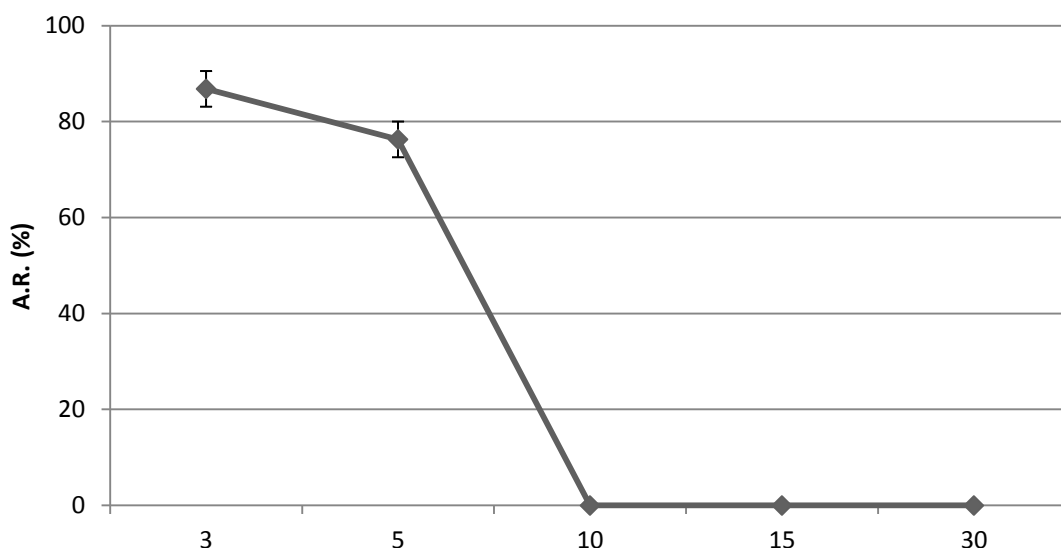


Figura 9 – Valores da atividade residual (A.R.) obtidos no ensaio de termoestabilidade do extrato bruto do isolado R18(6) na temperatura de 100°C.

Piuri et al. (1998) observaram que a polimixina produzida por um isolado de *Paenibacillus polymyxa* se mantinha estável até 10 minutos a 90°C. Os dados obtidos no ensaio de termoestabilidade mostram que o composto bioativo produzido pelo actinomiceto R18(6) possui uma estrutura química que não é facilmente degradada em contato com o calor.

4.4 Efeito de enzimas na atividade do composto bioativo

O extrato bruto foi tratado com as enzimas papaína, tripsina e proteinase K com o objetivo de avaliar o efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade antimicrobiana. O extrato manteve sua atividade ao ser tratado com 2 mg/mL

de todas as enzimas testadas, mantendo a atividade residual em 100%.

Os dados obtidos sugerem que o composto antifúngico em questão pode não ser uma molécula proteica, pois essas enzimas agem quebrando as ligações peptídicas. A tripsina age ligando-se no lado C-terminal de resíduos de lisina e arginina. A papaína age clivando ligações peptídicas de aminoácidos básicos, leucina ou glicina, e, também, hidrolisa os ésteres e amidas (Kamphuis et al. 1985). A proteinase k tem como sítio predominante de clivagem a ligação peptídica adjacente ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos e aromáticos (Ebeling et al. 1974).

Em contraponto, Fontoura et al. (2009) avaliaram a sensibilidade de um peptídeo com atividade antimicrobiana isolado de uma *Pseudomonas* sp., onde alíquotas da substância foram tratadas com tripsina, papaína, pronase E e proteinase K. A atividade antimicrobiana se manteve após os tratamentos, sendo parcialmente perdida apenas quando utilizada a pronase E. Já Xie et al. (2009) testaram o efeito das enzimas pronase E, proteinase K, catalase, pepsina, tripsina, papaina, lisozima, α -amilase e lipase sobre a atividade antimicrobiana de uma bacteriocina e observaram que quando a amostra foi tratada com pepsina, lipase, tripsina, proteinase K e pronase E, a atividade antimicrobiana diminuiu (8,7%, 11,5%, 15%, 55% e 100%, respectivamente). No entanto, nenhuma alteração no tamanho da zona de inibição foi observada quando utilizadas as demais enzimas. Isso demonstra que existe a possibilidade do composto bioativo produzido pelo isolado R18(6) possuir uma estrutura peptídica que não foi afetada pelas proteinases testadas neste trabalho e que outras enzimas podem afetar sua atividade antifúngica.

4.5 Fungigrama

O ensaio de fungigrama foi realizado para avaliar a suscetibilidade dos isolados de *Candida* sp. frente aos antifúngicos fluconazol e nistatina através da técnica de disco-difusão em ágar.

Os resultados obtidos no fungigrama mostram que dos 27 isolados de *Candida* sp., 70,3% são resistentes a fluconazol. Quanto à nistatina, 18,6% apresentaram resistência e 66,6% mostraram sensibilidade intermediária à droga (Tabela 8).

Fluconazol é um antifúngico triazol bem tolerado e um agente seguro que tem boa atividade clínica contra a maioria das cepas de *Candida* sp. isoladas. O uso aumentado desta droga deu origem ao desenvolvimento de resistência em *Candida* sp. (Santos Jr et al., 2005) e ,também, é observado espécies que são intrinsecamente menos sensíveis ao fluconazol, tais como *C. glabrata* e *C. krusei* (Dovigo et al., 2009). No presente estudo, todos os isolados de *C. glabrata* foram resistentes e apenas um isolado (20%) de *C. krusei* mostrou suscetibilidade ao fluconazol.

Marr et al. (2000) avaliaram 585 espécies de *Candida* spp. isoladas de pacientes pós-transplantados de medula óssea e observaram que todas as amostras foram resistentes ao fluconazol. Já Wingeter et al. (2007) observaram 10% de resistência a fluconazol e 2% de resistência a nistatina em isolados de *Candida* de pacientes HIV positivos. No estudo realizado por Ferrazza et al. (2005) foi observado que espécies de *Candida* sp. isoladas de vagina tem menor sensibilidade a nistatina.

Tabela 8 – Resultados obtidos no fungigrama dos isolados clínicos de *Candida*.
R: resistente, I: intermediário e S: sensível.

Amostras	Fluconazol	Nistatina
24A	R	I
24P	R	I
ATCC	R	I
CAL02	S	I
CAL05	R	I
CAL15	S	I
CAL17	S	I
CG01	R	S
CG03	R	S
CG05	R	R
CG10	R	S
CK02	S	R
CK03	R	I
CK05	R	I
CK06	R	I
CKR07	R	I
CP04	S	R
CP06	S	I
CP07	R	R
CP08	S	R
CT03	R	I
CT06	R	I
CT08	R	I
CT09	R	I
CT56	R	I
RL12	R	S
RL7	S	I

A perda da sensibilidade aos medicamentos comercialmente utilizados para o tratamento de infecções causadas por isolados de *Candida* sp. vem sendo observado em diferentes estudos (Colombo et al. 2006, Mujica et al. 2004, Favalessa et al. 2010) e os resultados obtidos neste trabalho corroboram com essa informação.

Quando o extrato bruto produzido pelo actinomiceto R18(6) foi testado frente a essas 27 amostras clínicas, mostrou atividade inibitória em 100% dos isolados (Figura 7). Com isso podemos inferir que o composto bioativo produzido pelo isolado R18(6) não é semelhante a essas duas drogas e que possui potencial para ser utilizado nos tratamentos de candidíases.

4.6 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM)

Com o ensaio da concentração inibitória mínima do extrato bruto foi possível observar que os valores do CIM variam para cada isolado, ocorrendo atividade desde a diluição 1/8 até a diluição 1/128 em 24 horas (Tabela 9).

Quando analisado o CIM em 48 horas, todas as amostras mostraram crescimento celular em todas as diluições. Com esses resultados pode-se dizer que o composto antifúngico produzido pelo actinomiceto R18(6) tem ação fungistática e não fungicida.

Com os valores do CIM obtidos pode-se sugerir que esse composto antifúngico tem grande potencial para inibir espécies de *Candida* de origem clínica, uma vez que esses valores foram obtidos a partir do extrato bruto e é possível que essa atividade seja potencializada após purificação do composto bioativo.

Tabela 9 – Resultados do CIM para amostras clínicas de *Candida* com 24 horas de crescimento.

	EXTRATO	1\2	1\4	1\8	1\16	1\32	1\64	1\128	1\256	1\512	1\1024
24A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
24P	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
ATCC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CAL02	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CAL05	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CAL15	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CAL17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CG01	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CG03	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CG05	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CG10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CK02	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CK03	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CK05	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CK06	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CKR07	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CP04	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CP06	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CP07	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CP08	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CT03	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CT06	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CT08	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CT09	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CT56	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
RL12	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
RL7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+ crescimento celular, - sem crescimento celular.

4.7 Curva de crescimento do actinomiceto

A curva de crescimento foi realizada com objetivo de se conhecer o tempo de geração do isolado e correlacionar com a fase de produção do composto bioativo. Observou-se que depois de 24 horas o isolado R18(6) entra na fase estacionária de crescimento (Figura 10). Desta forma, pode-se inferir

que o composto com atividade antifúngica é um metabólito secundário, pois é produzido na fase estacionária.

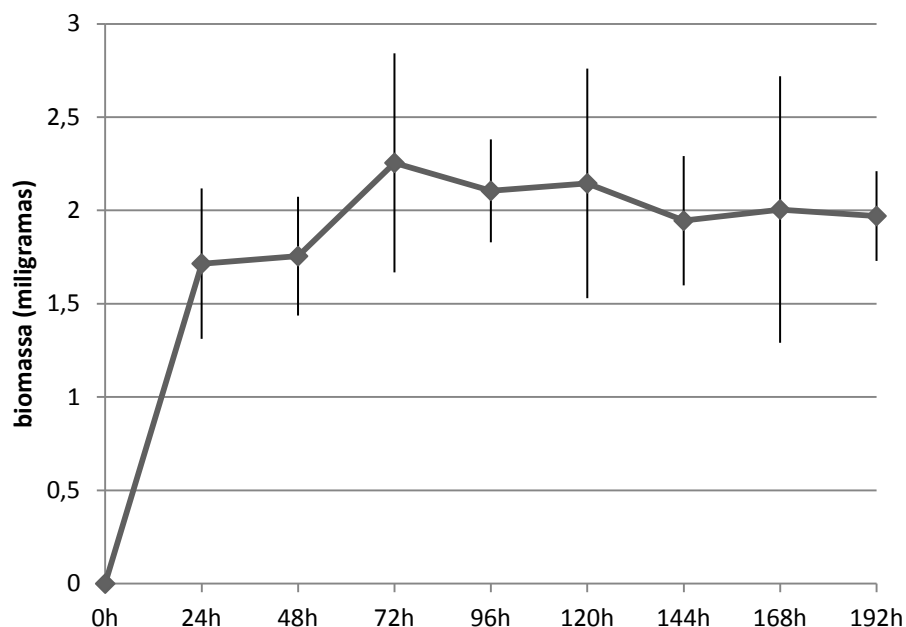


Figura 10 – Dados da curva de crescimento do isolado de actinomiceto R18(6) durante 192h de cultivo celular em caldo AC a 30°C e agitação de 100 r.p.m.

4.8 Curva de variação do pH no meio de cultivo

Com o objetivo de verificar a capacidade do isolado de actinomiceto de modificar ou não o pH do meio de cultivo, foi realizada uma curva de variação de pH do caldo AC. Os dados obtidos demonstram que o microrganismo modifica o pH ao longo do seu crescimento (Figura 11). Durante a fase log de crescimento do isolado R18(6), observou-se um aumento no valor do pH de 6,01 para 7,12. Durante a fase estacionária de crescimento o pH do meio diminuiu para 6,19 e, ao longo dos dias de incubação, o pH subiu até 7,56.

O trabalho realizado por Raytapadar & Paul (2001) avaliou a atividade antifúngica do isolado IDA-28 de *Streptomyces* sp. e os autores observaram que concomitante com o crescimento do isolado, ocorreu mudança no pH do meio de cultivo. Ao longo do crescimento celular, os microrganismos consomem e excretam diferentes substâncias. Esses compostos excretados podem possuir caráter básico, aumentando o valor do pH, ou ácido, diminuindo esse valor. Bactérias e leveduras normalmente mantêm o pH do meio em torno da neutralidade, que é essencial para atividade ótima de muitos processos celulares importantes, incluindo a atividade de enzimas, taxas de síntese de DNA e RNA parecem aumentar e, além disso, alterações no pH também parecem ter importância no controle do ciclo celular dos microrganismos (Beales, 2004).

Analisando os dados obtidos neste trabalho, observou-se que a melhor produção do composto bioativo foi em 72 horas de cultivo em meio AC sem o controle do pH. Adicionando essa informação com os dados da variação do pH do meio de cultivo pelo isolado R18(6) (Figura 11), pode-se inferir que em uma faixa de pH no valor de 6,5 ocorre a produção do composto antifúngico ativo para as seis espécies de *Candida* no menor período de tempo. Esses dados corroboram com os encontrados Trenochnikova et al. (2012), que observaram a produção ótima de antibiótico produzido por um isolado de *Streptomyces* sp em meio com pH 6,5.

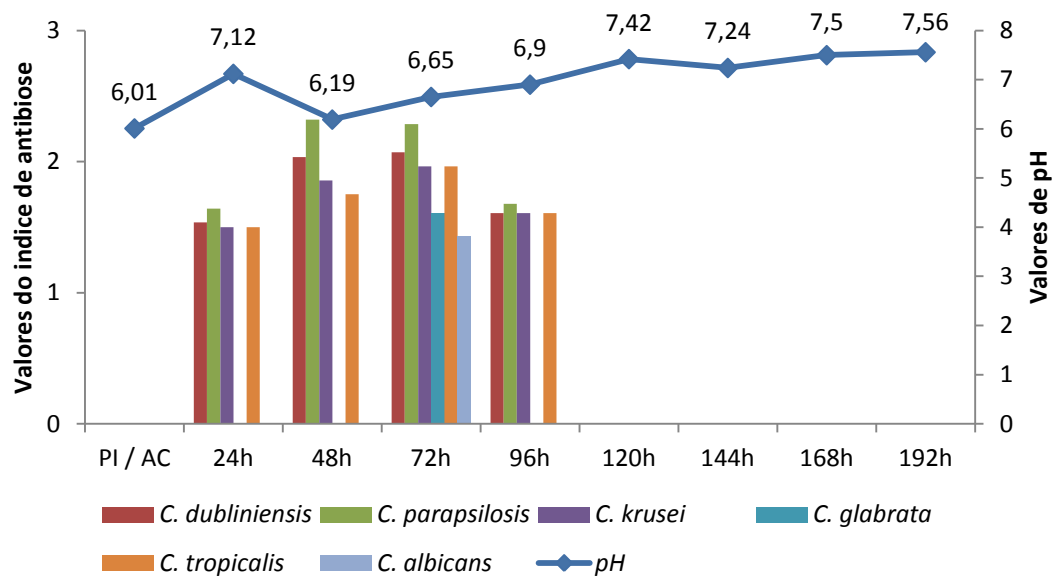


Figura 11 - Valores do índice de antibiose ao longo de 192 horas de cultivo do isolado R18(6) em caldo AC a 30°C e valores da variação do pH para o isolado R18(6) durante 192h de crescimento em meio AC a 30°C.

4.9 Microcultivo do actinomiceto

No microcultivo do isolado R18(6), observou-se que este isolado apresenta morfologia característica do gênero *Streptomyces*, com micélio aéreo espiral e longas cadeias de esporos (Figura 12).

4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através da microscopia eletrônica de varredura pode-se visualizar o micélio modificado para a formação dos esporos do isolado. Pode-se observar as cadeias de esporos em forma de espiral, o que caracteriza o gênero *Streptomyces*, com superfície lisa (Figura 13).



Figura 12 – Visualização do microcultivo do isolado R18(6) em microscópio óptico. (40X)

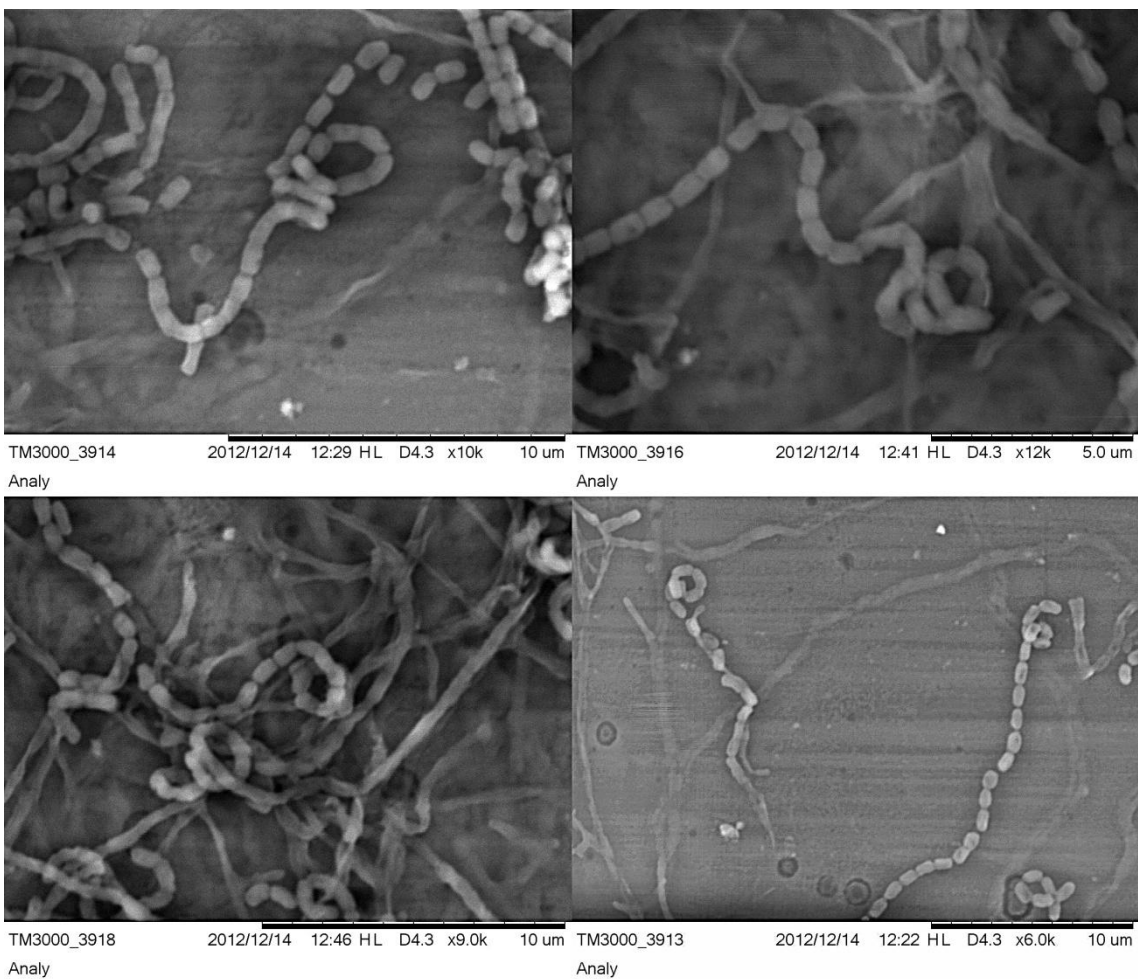


Figura 13 – Microscopia Eletrônica de Varredura do isolado R18(6).

4.11 Cromatografia

A Cromatografia em Camada Delgada foi utilizada para separar o composto bioativo dos demais compostos presentes no extrato bruto. Para isso foi pipetado 40 μ L do extrato bruto na placa de sílica e testado diferentes solventes. Todos os solventes utilizados apresentaram no mínimo uma banda visível nos dois comprimentos de onda de luz UV (254 nm e 365 nm). A banda que apareceu nas placas de sílica de todos os solventes testados estava sempre presente com Rf variando de 0,85 a 1. Quando utilizado como solvente o BAW (Butanol/ Ácido acético/ Água), foi possível visualizar duas bandas, uma com Rf de 0,91 e outra com o Rf de 0,35.

4.12 Autobiografia

Todas as placas de sílica foram submetidas à autobiografia frente ao isolado CAL17. A autobiografia nos permite identificar se alguma das bandas visualizadas na CCD tem o composto antifúngico presente. A banda que foi capaz de inibir o crescimento da levedura CAL17 foi visualizada apenas quando utilizado como solvente o BAW. O local com o composto ativo ficou em um Rf de 0,35 (Figura 14), porém pode-se observar que o halo de inibição não ficou presente somente sobre a altura da banda visível.

4.13 Identificação parcial do composto bioativo

Para identificar parcialmente o composto bioativo, foram realizadas colorações com cloreto férrico, ninhidrina e anisaldeído. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 10.

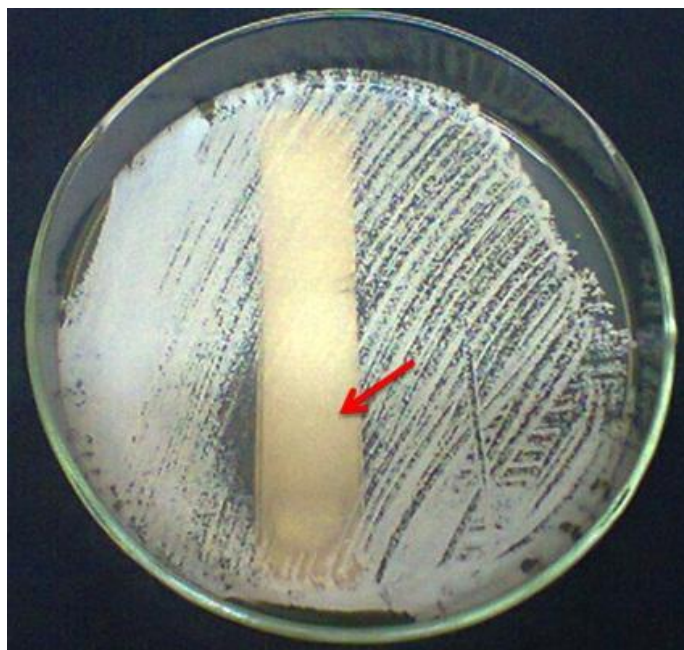


Figura 14 - Resultado da autobiografia com o sistema de solvente butanol/ácido acético/ água (4:1:5) (BAW) frente ao isolado CAL17. →: altura da banda visível apenas na luz UV.

Tabela 10 – Resultados obtidos através da coloração de CCD

Antimicrobianos	Reativos		
	FeCl ₃	Ninhidrina	Anisaldeido
Ciprofloxacina	-	+	+
Eritromicina	-	-	-
Penicilina G	-	+	+
Rifampicina	+	-	+
Estreptomicina	-	+	+
Tetraciclina	+	-	+
Vancomicina	-	+	-
Composto desconhecido	-	-	+

+ positivo para o reagente testado; - negativo para o reagente testado.

A solução reativa de cloreto férrico foi utilizada para verificar a presença de hidroxilas fenólicas, ou seja, grupos OH ligados a um anel aromático. O tratamento com a solução de cloreto férrico produz complexos característicos

de cor azul, violeta, púrpura, verde ou vermelho-castanho. Quando o resultado é negativo, como presença de álcoois, éteres, aldeídos, ácidos, cetonas, hidrocarbonetos e os seus derivados halogenados, ocorre falta de cor, amarelo pálido ou castanho (Shiner et al. 2004)

O teste com a ninhidrina foi realizado para observar a presença de grupos amino livres. Esse teste é bastante usado na identificação de aminoácidos. Todos os aminoácidos que contêm o grupo α -amino livre reagem com ninhidrina produzindo uma substância de coloração azul-violácea. Algumas exceções, como a prolina e a hidroxiprolina, que possuem o grupo α -amino substituído fornecem derivados com a cor amarelo característica. A formação das cores laranja e vermelho é considerada resultado negativo.

Com os dados obtidos nessas colorações, pode-se inferir que o composto antifúngico produzido pelo actinomiceto R18(6) não possui hidroxilas ligadas a anel aromático (Figura 15), pois não foi corado com cloreto férrico. E não possui grupo amino livre, pois não foi visualizada nenhuma coloração no composto bioativo quando corado com ninhidrina (Figura 16).

O reagente anisaldeído é utilizado para identificar alguns compostos naturais como alcalóides ou flavonóides, mas não há um mecanismo de reação estabelecido para as reações que ele desencadeia. Sabe-se apenas que alguns compostos desenvolvem cores quando revelados com anisaldeído. Quando realizada a coloração com este reagente, foi possível observar que a banda com atividade antifúngica apresentou coloração marrom e, comparando com os antibióticos padrões utilizados, a banda ficou bastante semelhante com a formada pela estreptomicina (Figura 17).

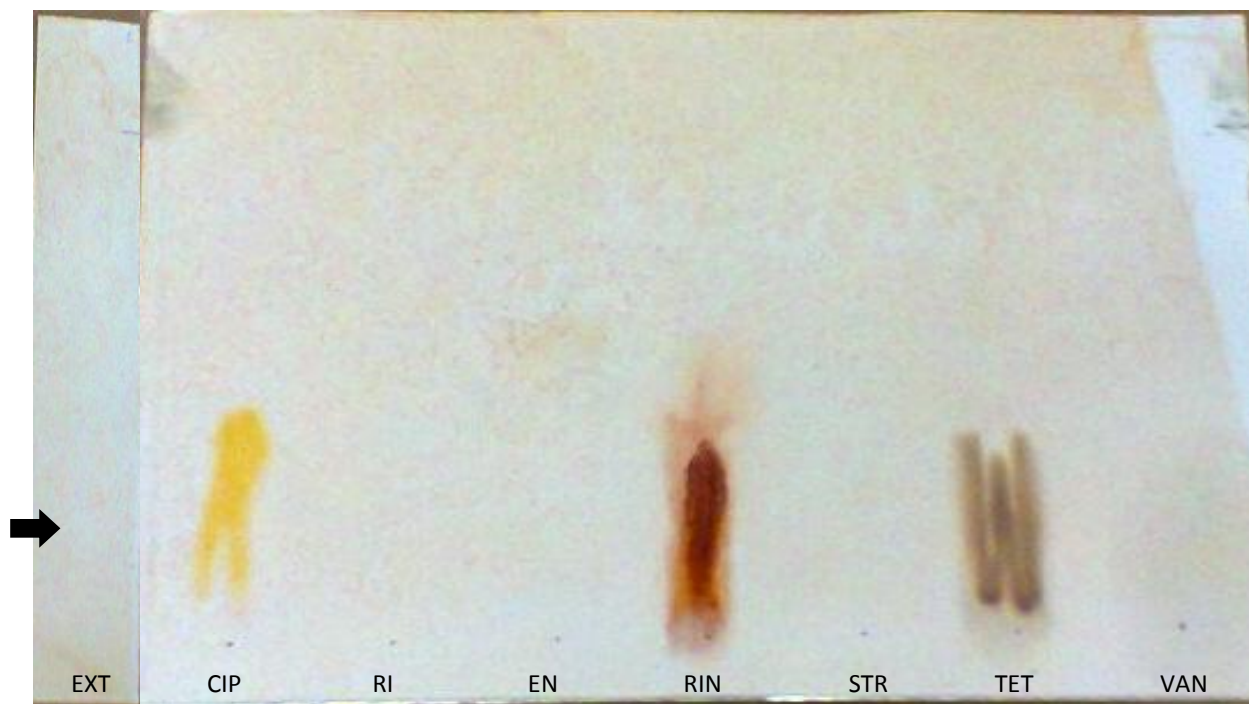


Figura 15 - Resultado da coloração da CCD com cloreto férrico. EXT – extrato bruto produzido pelo actinomiceto R18(6); CIP – ciprofloxacina; ERI – eritromicina; PEN – penicilina G; RIN – rifampicina; STR – estreptomicina; TET – tetraciclina; VAN – cloridrato de vancomicina. → Rf de 0,35.

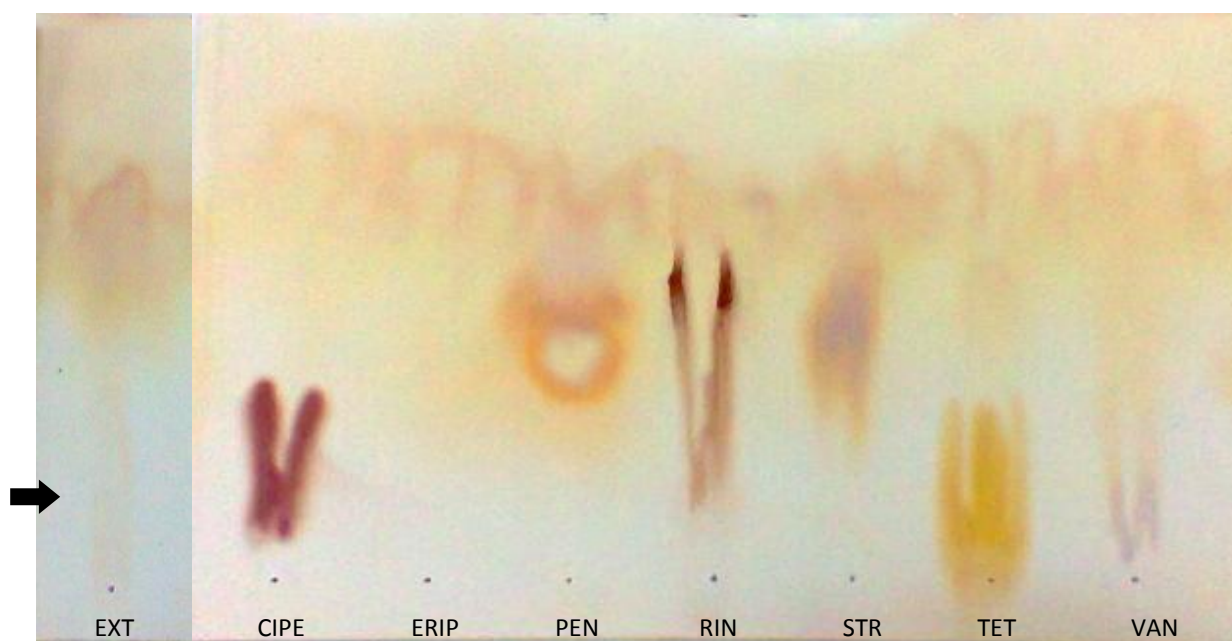


Figura 16 - Resultado da coloração da CCD com ninhidrina. EXT – extrato bruto produzido pelo actinomiceto R18(6); CIP – ciprofloxacina; ERI – eritromicina; PEN – penicilina G; RIN – rifampicina; STR – estreptomicina; TET – tetraciclina; VAN – cloridrato de vancomicina. → Rf de 0,35.

A coloração com anisaldeído mostra a presença de compostos como flavonoides e alcaloides. Os alcaloides são compostos que contem nitrogênio ligado em um anel heterocíclico e são geralmente de caráter básico (Junior et al. 2010). Analisando a estrutura da estreptomicina (Apêndice 2), pode-se observar a presença de anel heterocíclico com nitrogênio ligado, podendo ser esta parte da molécula a responsável pela coloração com o anisaldeído. Desta forma, é possível que o composto antifúngico produzido pelo actinomiceto R18(6) também apresente na sua estrutura algo semelhante.

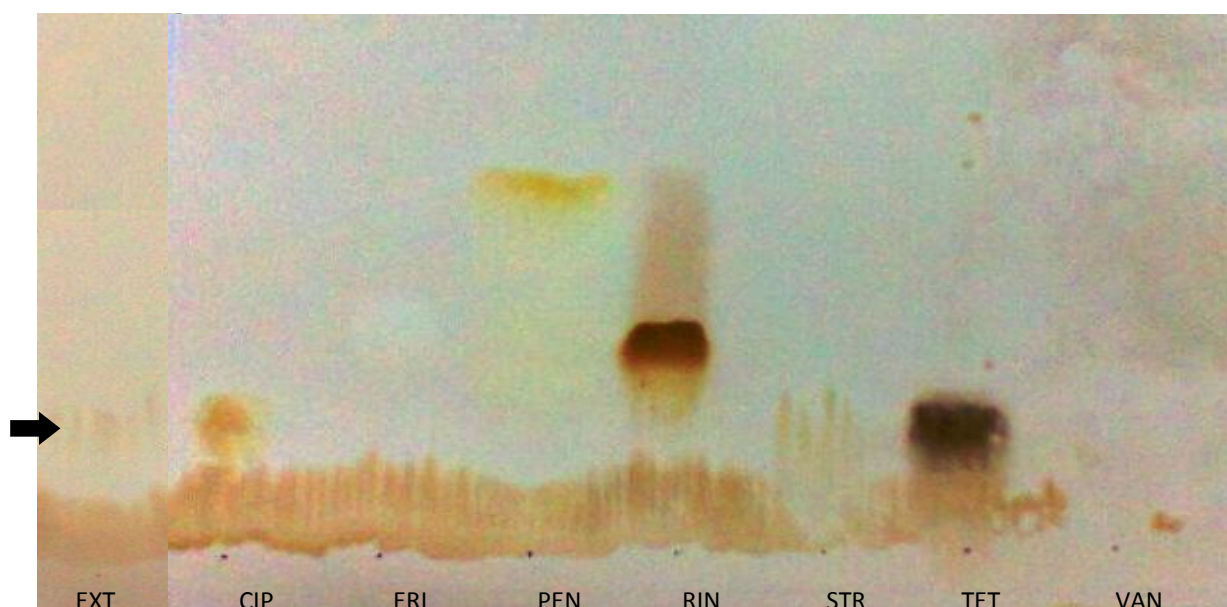


Figura 17 – Resultado da coloração da CCD com anisaldeído. EXT – extrato bruto produzido pelo actinomiceto R18(6); CIP – ciprofloxacina; ERI – eritromicina; PEN – penicilina G; RIN – rifampicina; STR – estreptomicina; TET – tetraciclina; VAN – cloridrato de vancomicina. → Rf de 0,35.

Diferentes estudos utilizaram reagentes para coloração de CCD com o objetivo de identificar parcialmente o composto ativo. Porém, os dados obtidos com a CCD não foram suficientes para identificar a molécula com atividade

antimicrobiana (Badji et al. 2006, Merlat et al. 2012, Boubetra et al. 2013, Boudjelal et al. 2011). Da mesma forma, neste trabalho a CCD nos permitiu levantar algumas hipóteses sobre a estrutura da molécula sem, contudo, elucidar a sua estrutura química.

5- CONCLUSÕES

Dos vinte e cinco isolados de actinomicetos testados frente a *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, onze inibiram no mínimo uma das espécies. Os isolados 1S, R18(6) e 6(2) inibiram as seis espécies de *Candida*. Nenhum dos isolados de actinomicetos mostrou atividade antifúngica frente aos isolados de fungos dermatófitos.

R18(6) foi o actinomiceto que inibiu todas as espécies de *Candida* testadas quando cultivado em cultura líquida e as melhores condições de cultivo para a produção do composto antifúngico foram utilizando caldo amido caseína sem pH controlado, com 72 horas de cultivo na temperatura de 30°C.

O actinomiceto R18(6) pertence ao gênero *Streptomyces*.

Foi possível observar algumas características do composto antifúngico produzido. Este composto possui atividade fungistática e uma estrutura química que não é facilmente degradada em contato com o calor. Estruturalmente, não possui hidroxilas ligadas a anel aromático, não apresenta grupo amino livre e possivelmente alguma parte da molécula tenha um anel heterocíclico com nitrogênio ligado.

6- PESPECTIVAS

- Realizar o sequenciamento do isolado R18(6)
- Purificar o composto antifúngico através de cromatografia de gel filtração e troca-iônica.
- Identificar a molécula ativa através de HPLC e espectrometria de massas.

7- REFERÊNCIAS

ALY, M.; AL-AIDROOS, B.; ALFASSI, F. Production of non polyenic antifungal agent from *Streptomyces* sp. BM54, isolated from marine shrimps. **Crown Journal of Medicine**. v. 1, n. 1, p. 01-08. 2011.

ANIBOU, M.; CHAIT, A.; ZYAD, A.; TAOURIRT, M.; OUHDOUCH, Y.; BENSHERREF, A. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 24, p. 2019-2025. 2008.

ANTUNES, A.; PASQUALOTTO, A.; DIAZ, M.; AZEVEDO, A.; SEVERO, L. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v. 46, n. 5, p. 239-241. 2004.

ARASU, M.; DURAI PANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 18, p. 147-153. 2008.

ARASU, M.; DURAI PANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**. v. 19, p. 22-28. 2009.

ARAUJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa, p.351-367. 1998.

AUGUSTINE, S. K.; BHAVSAR, S. P.; KAPADNIS, B. P. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. **Indian Journal of Medical Research**. v. 121, p. 164-170. 2005.

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

BADJI, B.; RIBA, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Antifungal activity of a saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 15, p. 211–219. 2005.

BADJI, B.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 52, p. 373-382. 2006.

BARBEDO, L.; SGARBI, D. Candidiasis. *Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis*. v. 22, n. 1, p. 22-38. 2010.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. Immunopharmacology of Modern Antifungals. **Clinical Infectious Diseases**. v. 47, p. 226–35. 2008.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites A Personal View. **Journal of Antibiotics**. v. 58, n. 1, p. 1-26. 2005.

BERVANAKIS, G. Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria: 2008. A thesis submitted for the degree of Masters of Science: 209f. Faculty of Health Science, Flinders University, Adelaide, Australia.

BOUBETRA, D.; SABAOU, N.; ZITOUNI, A.; BIJANI, C.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F. Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix SA198* isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**. v. 168, p. 223-230. 2013.

BOUDJELAL, F.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRILHI, A.; SABAOU, N. Taxonomic study and parcial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 835-845. 2011.

BOUDJELLA, H.; BOUTI, K.; ZITOUNI, A.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. **Microbiological Research**. v. 161, p. 288-298. 2006.

BOUGNOUX, M.; KAC, G.; AEGERTER, P.; D'ENFERT, C.; FAGON, J. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. **Intensive Care Medicine**. v. 34, p. 292–299. 2008.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. **PLOS Pathogens**. v. 8, n. 9, p. 1-3. 2012.

CAMARGO, F.; ALVES, I.; PARLOW, M.; GOULART, L. Isolamento de *Candida* sp. da Mucosa Vaginal de Mulheres Atendidas em um Serviço de Ginecologia do Município de Santo Ângelo – RS. **NewsLab**. v. 87, p. 96-104. 2008.

CARVALHO, M. P. Produção de Metabólitos Secundários de Basidiomicetos com Atividade Antimicrobiana. 2007. 70 f.. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

CHEN, C.W.;HUANG, C.; LEE, H.; TSAI, H.; KIRBY, R. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. **TRENDS in Genetics**. v. 18, n. 10, p. 522-529. 2002.

CIFTCIOGLU, N.; KAJANDER, E. O. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. *Pathophysiology*, Baltimore, v.4, p.259-270, 1998.

CLADERA-OLIVEIRA, F. Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antibacteriano produzido por *Bacillus licheniformis* P40. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2004.

CLAESSEN, D.; JONG, W.; DIJKHUIZEN, L.; WÖSTEN, H. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! **TRENDS in Microbiology**. v.14, n.7, p. 313-319. 2006.

CLSI 2004. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline, M44-A. 2004.

COLOMBO, A.; NUCCI, M.; PARK, B.; NOUÉR, S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 8, p. 2816-2823. 2006.

CRIADO, P.; OLIVEIRA, C.; DANTAS, K.; TAKIGUTI, F.; BENINI, L.; VASCONCELLOS, C. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 86, n. 4, p. 726-31. 2011.

DASARI, V.; NIKKU, M.; DONTIREDDY, S. Screening of Antagonistic Marine Actinomycetes: Optimization of Process Parameters for the Production of Novel Antibiotic by *Amycolatopsis Alba* var. nov. DVR D4. **Microbial Biochemical Technology**. v. 3, n. 5, p. 092-098. 2011.

DEEPA, L.; GOWTHAMI, K.; KUMAR, K. In vivo Screening of Antimicrobial Activity of Soil Actinomycetes Against Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**. v.7, n. 5, p. 624-628. 2011.

DEMAIN, A.L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**. v. 1, p. 259-264. 1998.

DEMAIN, A. From natural products discovery to commercialization: a success story. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 33, p. 486-495. 2006.

DEMAIN, A.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics** v. 62, p. 5-16. 2009.

DENNING, D. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**. v. 362, p. 1142-1151. 2003.

DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVUM, A. An antifungal compound: 4' phenyl-1-naphthyl -phenyl acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. **Medicine and Biology**. v. 15, n. 1, p. 7-12. 2008.

DODGSON, A.; DODGSON, K.; PUJOL, C.; PFALLER, M.; SOLL, D. Clade-Specific Flucytosine Resistance Is Due to a Single Nucleotide Change in the *FUR1* Gene of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 6, p. 2223-2227. 2004.

DOMER, J. Fungal Diseases. Principles of Medical Biology, Volume 9A, Microbiology. p 257-286. 1997.

DOVIGO, L.; PAVARINA, A.; MIMA, E.; GIAMPAOLO, E.; VERGANI, C.; BAGNATO, V. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**. v. 50, p. 123 -130. 2009.

DUNKEL, N.; LIU, T.; BARKER, K.; HOMAYOUNI, R.; MORSCHHÄUSER, J.; ROGERS, P. A Gain-of-Function Mutation in the Transcription Factor Upc2p Causes Upregulation of Ergosterol Biosynthesis Genes and Increased Fluconazole Resistance in a Clinical *Candida albicans* Isolate. **Eukaryotic cell**. v. 7, n. 7, p. 1180-1190. 2008.

EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **European Journal of Biochemistry**. v. 47, p. 91-97. 1974.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 26, n. 1, p. 15-22. 2009.

FAVALESSA, O.; MARTINS, M.; HAHN, R. Mycological aspects and susceptibility in vitro the yeast of the genus *Candida* from HIV-positive patients in the State of Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 6, p. 673-677. 2010.

FERRAZZA, M.; MALUF, M.; CONSOLARO, M.; SHINOBU, C.; SVIDZINSKI, T.; BATISTA, M. Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidíasis in two cities of the South of Brazil. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia**. v. 27, n. 2, p. 58-63. 2005.

FERREIRA, T.; SILVA, F.; TEODORO, G.; COSTA, A. C.; MARIA, A.; BELTRAME JUNIOR, M.; KHOURI, S. Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 68, n. 1, p. 118-125. 2009.

FONTOURA, R.; SPADA, J.; SILVEIRA, S.; TSAI, S.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of an antimicrobial peptide produced by *Pseudomonas* sp. strain 4B. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 25, p. 205-213. 2009.

GANDHIMATHI, R.; KIRAN, G.; HEMA, T.; SELVIN, J.; RAVIJI, T.; SHANMUGHAPRIYA. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10. **Bioprocess Biosyst Eng**. v. 32, p. 825-835. 2009.

GANDOTRA, S.; BISHT, G. R.; SAHARAN, B. S. Antifungal activity of endophytic actinomycetes (*Streptomyces*) against *Candida* species. **International Journal of Microbial Resource Technology**. v. 1, n. 4, p. 375-378. 2012.

GIOLO, M.; SVIDZINSK, T. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, p. 225-234. 2010.

GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.; TRUJILLO, M.; SUZUKI, K.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2ª edição. The Actinobacteria, Part A, v. 5, Springer, New York. 2012.

GROTH, I.; VETTERMANN, R.; SCHUETZE, B.; SCHUMANN, P.; SAIZ-JIMNEZ, C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). **Journal of Microbiological Methods**. v. 36, p. 115-122. 1999.

GUIMARÃES, D.; MOMESSO, L.; PUPO, M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679. 2010.

GUPTA, M. D.; KULKARNI, P. R. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35, p. 22-26. 2002.

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

HAZEN, K.; BARON, E.; COLOMBO, A.; GIRMENIA, C.; SANCHEZ-SOUSA, A.; PALACIO, A.; BEDOUT, C.; GIBBS, D. Comparison of the Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole and Voriconazole in a 4-Year Global Evaluation Using Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 12, p. 5623-5632. 2003.

HONG, K.; GAO, A.; XIE, Q.; GAO, H.; ZHUANG, L.; LIN, H.; YU, H.; YAO, X.; GOODFELLOW, M.; RUAN, J. Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. **Marine Drugs**. v. 7, p. 24-44. 2009.

HORN, D.; FISHMAN, J.; STEINBACH, W.; ANAÏSSIE, E.; MARR, K.; OLYACI, A.; PFALLER, M.; WEISS, M.; WEBSTER, K.; NEOFYTOS, D. Presentation of the PATH Alliance® registry for prospective data collection and analysis of the epidemiology, therapy, and outcomes of invasive fungal infections. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 59, p. 407-414. 2007.

HSU, L.; WIJAYA, L.; SHU-TING NG, E.; GOTUZZO, E. Tropical Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, p. 497-512. doi:10.1016/j.idc.2012.02.004. 2012.

JORDÁ-MARCOS, R.; ÁLVAREZ-LERMA, F.; JURADO, M.; PALOMAR, M.; NOLLA-SALAS, J.; LEÓN, M.; LEÓN, C.; EPCAN STUDY GROUP. Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. **Mycoses**. v. 50, p. 302-310. 2007.

JUNIOR, J.; SOARES, P.; MELO, C.; ARRUDA FILHO, A.; SENA FILHO, J.; BARBOSA FILHO, J.; SOUSA, F.; FONTELES, M.; LEAL, L.; QUEIROZ, M.; VASCONCÊLOS, S. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 3, p. 453-458. 2010.

KAMPHUIS, I. G.; DRENTH, J.; BAKER, E. N. Thiol Proteases Comparative Studies Based on the High-resolution Structures of Papain and Actinidin, and on Amino Acid Sequence Information for Cathepsins B and H, and Stem Bromelain. **Journal of Molecular Biology**. v. 182, p. 317-329. 1985.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture ecosystems & environment**. Amsterdam, v.74, p. 65-76. 1999.

KONEMAN, E. W. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas a color. Quinta edición, Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 10-16, 75-82. 2001.

LAGROU, K.; VERHAEGEN, J.; PEETERMANS, W. E.; RIJDT, T.; MAERTENS, J.; VAN WIJINGAERDEN, E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 26, p. 541-547. 2007.

LAKSHMIPATHY, D.; KANNABIRAN, K. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan Environment. **American Journal of Infectious Diseases**. v. 5, n. 3, p. 207-213. 2009.

LAMB, D.; KELLY, D.; WHITE, T.; KELLY, S. The R467K Amino Acid Substitution in *Candida albicans* Sterol 14a-Demethylase Causes Drug Resistance through Reduced Affinity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 44, n. 1, p. 63-67. 2000.

LEWIS, R. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 86, n. 8, p. 805-817. 2011.

LIGUORI, G.; ONOFRIO, D.; LUCARIELLO, A.; GALLÉ, F.; SIGNORIELO, G.; COLELLA, G.; D'AMORA, M.; ROSSANO, F. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. **Oral Microbiology Immunology**. v. 24, p. 76-78. 2009.

MARR, K.; SEIDEL, K.; WHITE, T.; BOWDEN, R. Candidemia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients: Evolution of Risk Factors after the Adoption of Prophylactic Fluconazole. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 181, p. 309-316. 2000.

MARTIN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**. v. 18, p. 282-293. 2005.

MARUYAMA, H.; SUHARA, Y.; SUZUKI-WATANABE, J.; MAESHIMA, Y.; SHIMIZU, N.; OGURA-HAMADA, M.; FUJIMOTO, H.; TAKANO, K. A new antibiotic, fumaramidmycin. **The Journal of Antibiotics**. v. 28, n. 9, p. 636-647. 1975.

MELLOULI, L.; AMEUR-MEHDI, R.; SIOUD, S.; SALEM, M.; BEJAR, S. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 345-352. 2003.

MERLAT, A.; SABAOU, N.; BOURAS, N.; ZITOUNI, A.; SPRÖER, C.; KLENK, H.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A. A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil. **Annals of Microbiology**. v. 62, p. 1049-1057. 2012.

MONCIARDINI, P.; SOSIO, M.; CAVALETTI, L.; CHIOCCHINI, C.; DONADIO, S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS microbiology ecology**. v. 42, p. 419-429, 2002.

MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**. v. 47, p. 94-106. 2009.

MUJICA, M. T.; FINQUELIEVICH, J. L.; JEWTOCHOWICZ, V.; IOVANNITTI, C. A.; Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clínicas. Período 1999 – 2001. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 36, p. 107-112. 2004.

NARAYANA, K.; VIJAYALAKSHMI, M. Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*. **Research Journal of Pharmacology**. v. 2, n. 1, p. 4-7. 2008.

NCCLS 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 2nd ed. CLSI document M27-A2. 2002.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 22, p. 552–558. 2011.

ODDS, F.; HANSON, M.; DAVIDSON, A.; JACOBSEN, M.; WRIGHT, P.; WHYTE, J.; GOW, N.; JONES, B. One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 1066–1075. 2007.

OLIVEIRA, M. F.; SILVA, M.; VAN DER SAND, S. Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. **Research in Microbiology**. v. 20, p. 1-8. 2010.

OLIVEIRA, T.; LIMA, E.; SOUZA, I.; CORNEJO, L. Atividade antifúngica e cinética de morte microbiana de extratos obtidos de *Streptomyces* spp.

isolados de solos paraibanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 1, p. 60-64. 2008.

OSKAY, M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 13, p. 3007-3017. 2009.

PAPON, N.; NOËL, T.; FLORENT, M.; GIBOT-LECLERC, S.; JEAN, D.; CHASTIN, C.; VILLARD, J.; CHAPELAND-LECLERC, F. Molecular Mechanism of Flucytosine Resistance in *Candida lusitanae*: Contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 Genes to 5-Fluorouracil and Fluconazole Cross-Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 1, p. 369-371. 2007.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X. da; PAULA, C. R. de. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v. 14, n. 2, p. 119-122. 2000.

PEREIRA, D. Importância do Metabolismo no planejamento de Fármacos. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p. 171-177. 2007.

PERES, N.; MARANHÃO, F.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 657-667. 2010.

PFALLER, M. ; DIEKEMA, D.; JONES, R.; SADER, H.; FLUIT, A.; HOLLIS, R.; MESSER, S. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 9, p. 3254-3259. 2001.

PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S. M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**. v. 27, p. 9–13. 1998.

PREMA, P.; SUJA, A.; RANJANI, S.; IMMANUEL, G. UV/VIS, FTIR spectrum and Anticandidial activity of *Streptomyces* strains. **The Internet Journal of Microbiology**. v. 7, n. 2. DOI: 10.5580/94b. 2009.

QIN, S.; LI, J.; CHEN, H.; ZHAO, G.; ZHU, W.; JIANG, C.; XU, L.; LI, W. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, n. 19, p. 6176–6186, 2009.

RAYTAPADAR, S.; PAUL, A. K. Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* IDA-28. **Microbiological Research**. v. 155, p. 315-323. 2001.

REX, J.; RINALDI, M.; PFALLER, M. Resistance of *Candida* Species to Fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 39, n. 1, p. 1-8. 1995.

RIPA, F.; NIKKON, F.; ZAMAN, S.; KHONDKAR, P. Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-

08PR Isolated from Bangladeshi Soil. **Mycobiology**. v. 37, n. 3, p. 211-214. 2009.

RODLOFF, A.; KOCH, D.; SCHAUMANN, R. Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. **European Journal of Medical Research**. v. 16, p. 187-195. 2011.

ROSATO, Y. B.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L. Production of extracellular enzymes by isolates of *Metarhizium anisopliae*. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 38, p. 1-3. 1981.

RYDER, N. S.; MIELTH, H. Allylamine Antifungal Drugs. **Current Topics in Medical Mycology**. v. 4, p. 158-188. 1992.

SAJID, I.; SHAABAN, K.; HASNAIN, S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces malachitofuscus* CTF9. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 592-604. 2011.

SALAMONI, S.; MANN, M.; CAMPOS, F.; FRANCO, A.; GERMANI, J.; VAN DER SAND, S. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World Journal Microbiology Biotechnology**. DOI 10.1007/s11274-010-0366-y. 2010.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 895-906. 2002.

SANTOS JR, I.; SOUZA, I.; BORGES, R.; SOUZA, L.; SANTANA, W.; COUTINHO, H. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**. v. 15, n. 3, p. 189-197. 2005.

SELMECKI, A.; DULMAGE, K.; COWEN, L.; ANDERSON, J.; BERMAN, J. Acquisition of Aneuploidy Provides Increased Fitness during the Evolution of Antifungal Drug Resistance. **PLoS Genetic**. v. 5, n. 10. Doi:10.1371/journal.pgen.1000705. 2009.

SELVIN, J.; SHANMUGHAPRIYA, S.; GANDHIMATHI, R.; KIRAN, G.; RAVJI, T.; NATARAJASEENIVASAN, K.; HEMA, T. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardia psidium* MAD08. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 83, p. 435-445. 2009.

SHAHAT, A.; ABOUWARDA, A.; EL-WAFA, W. Production of Anti-*Candida albicans* by Egyptian *Streptomyces* Isolates. **International Journal of Microbiological Research**. v. 2, n. 2, p. 167-171. 2011.

SHINER, R.L.; HERMANN, C.K.F.; MORRI L, T.C.; CURTIN, D.Y.; FUSON, R.C. The Systematic Identification of Organic Compounds. 8.ed. Hoboken: J. Wiley, p. 723. 2004.

SILVA V, V.; DÍAZ, M.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Rev Chil Infect**. v. 19, n. 2, p. 149-156. 2002.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, p. 288-305. 2011.

SILVA, S.; PINHEIRO, S.; QUEIROZ, M.; PRANCHEVICIUS, M.; CASTRO, J.; PERIM, M.; CARREIRO, S. Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 17, n. 6, p.1649-1656. 2012.

SIQUEIRA, E.; FERREIRA, J.; MAFFEI, C.; CANDIDO, R. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 3, p. 269-271. 2006.

SOLECKA, J.; ZAJKO, J.; POSTEK, M.; RAJNISZ, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Central European Journal of Biology**. v. 7, n. 3, p. 373-390. 2012.

SUJATHA, P.; RAJU, K.; RAMANA, T. Studies on a new marine streptomycete BT- 408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological Research**. v. 160, p. 119-126. 2005.

SUSITHRA, M. P.; THENMOZHI, M.; KANNABIRAN, K. Anticandidal activity of *Streptomyces paraguayensis* isolated from marine sediment samples collected at the Puducherry coast, bay of Bengal, India. **Pharmacologyonline**. v.2, p. 527-537. 2009.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B. K.; BORA, T. C. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 17, p. 242-249. 2007.

THUMAR, J.; DHULIA, K.; SINGH, S. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 26, p. 2081-2087. 2010.

TRENOZHNIKOVA, L.; KHASENOVA, A.; BALGIMBAEVA, A.; FEDORAVA, G.; KATRUKHA, G.; TOKAREVA, N.; KWA, B.; AZIZAN, A. Characterization of the Antibiotic Compound No. 70 Produced by *Streptomyces* sp. IMV-70. **The Scientific World Journal**. doi:10.1100/2012/594231. 2012.

VANDEPUTTE, P.; TRONCHIN, G.; BERGÈS, T.; HENNEQUIN, C.; CHABASSE, D.; BOUCHARA, J. Reduced Susceptibility to Polyenes Associated with a Missense Mutation in the ERG6 Gene in a Clinical Isolate of *Candida glabrata* with Pseudohyphal Growth. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 51, n. 3, p. 982–990. 2006.

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**. v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VICENTE, M.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 9, n. 1. 2003.

VOLFF, J. N.; ALTENBUCHNER, J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. **Molecular Microbiology**. v. 27, n. 2, p. 239-246. 1998.

WAKSMAN, S.; HENRICI, A. The Nomenclature and Classification on the Actinomycetes. **Journal of Bacteriology**. v. 46, n. 4, p. 337-341. 1943.

WILLIAMS, S. T., GOODFELLOW, M. & ALDERSON, G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman & Henrici 1943. In: WILLIAMS, S. T., SHARPE M. E. & HOLT, J. G. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 2452-2492.

WINGETER, M.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 3, p. 272-276. 2007.

XIE, J.; ZHANG, R.; SHANG, C.; GUO, C. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 20, p. 5611-5619. 2009.

YOUNG, L.; HULL, C.; HEITMAN, J. Disruption of Ergosterol Biosynthesis Confers Resistance to Amphotericin B in *Candida lusitanae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 47, n. 9, p. 2717-2724. 2003.

8- APÊNDICES

1- Soluções utilizadas para tamponamento do caldo AC

1.1 Solução de Mcllvaine

1.1.1 Solução tampão pH 5,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 10,3 mL

Ácido cítrico (0,1 M) 9,7 mL

1.1.2 Solução tampão pH 6,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 12,63 mL

Ácido cítrico (0,1 M) 7,37 mL

1.1.3 Solução tampão pH 7,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 16,47 mL

Ácido cítrico (0,1 M) 3,53 mL

1.1.4 Solução tampão pH 8,0

Na₂HPO₄ (0,2 M) 19,45 mL

Ácido cítrico (0,1 M) 0,55 mL

1.2 Solução de ácido bórico – cloreto de potássio

1.2.1 Solução tampão pH 9,0

H₃BO₃ KCl (0,1 M) 50 mL

NaOH (0,1 M) 21,24 mL

1.2.2 Solução tampão pH 10,0

H₃BO₃ KCl (0,1 M)

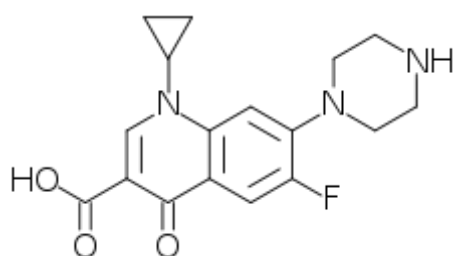
50 mL

NaOH (0,1 M)

43,90 mL

2- Estrutura dos antibióticos utilizados como padrão na CCD

Ciprofloxacina:



Eritromicina:

