
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
FORMIGAS ATTINI (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

THAIS DEMARCHI MENDES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Julho - 2010

THAIS DEMARCHI MENDES

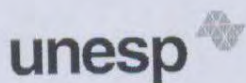
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE
FORMIGAS ATTINI (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Área: Microbiologia Aplicada)

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Co-orientadora: Profa. Dr. Marta Cristina Teixeira Duarte

Rio Claro
2010



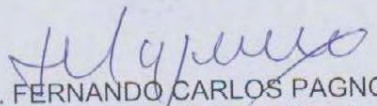
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO

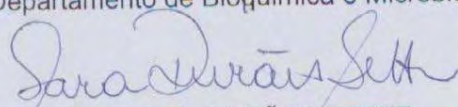
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

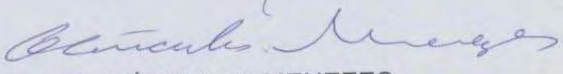
TÍTULO: Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini
(Hymenoptera:formicidae)

AUTORA: THAIS DEMARCHI MENDES
ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrárias-CPQBA / Universidade Estadual de Campinas


Prof. Dr. HÉRCULES MENEZES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 04 de maio de 2010.

*Aos meus pais, Otacilio e Magali,
pelo apoio incondicional ...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais, Otacilio e Magali, por serem responsáveis por aquilo que sou hoje e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela orientação e amizade durante esses anos. Pela confiança em mim depositada e pelos muitos incentivos à minha formação científica e acadêmica.

À Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, pela orientação e amizade. Por me receber tão bem no CPQBA/UNICAMP e por todo apoio concedido.

Ao Prof. Dr. Andre Rodrigues por toda orientação, ajuda e interesse por este trabalho. Agradeço por todos os conselhos, amizade e pelo exemplo de dedicação e competência.

Agradeço ao pós-doutorando Warley de Souza Borges pelos valiosos auxílios nas análises químicas e aos seus orientadores Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Prof. Dr. João Batista Fernandes, e Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva.

Ao Dr. Scott Solomon por ceder os ninhos de formigas Attini para os isolamentos dos micro-organismos estudados neste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais Mara, Tatiana, Paula, Aline, Derlene, Fábio, Ana Paula, Noemy, Lucas, Ife, Virgínia, Liu, Sandra, Dirce, Weilan e Silvio. A todos, por toda ajuda, amizade, risadas e por tornarem tão agradável o ambiente de trabalho.

A todos da Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP, Dr. Alexandre, Dr. Edilberto, Camila, Márcio, Renata, Alessandra, Vivian, Vanessa, Tuanny, Tatiana e Bruna por terem me recebido tão bem, pelas risadas, pelos “cafés”. Especialmente à Éricka, pela amizade e por toda a ajuda nos ensaios de MIC...rs.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área Microbiologia Aplicada) da UNESP – Rio Claro, na pessoa da coordenadora Profa. Dr. Sandra Mara Franchetti, pela oportunidade concedida. Agradeço também aos colegas da pós-graduação, pela companhia durante as aulas e na organização do Simpósio de Microbiologia Aplicada.

A CAPES pela concessão da bolsa e à FAPESP e INCT/CNPQ pelo financiamento parcial deste trabalho.

Aos grandes amigos Rodrigo, Aline, Joyce, Carolina, Tais e Marina, por continuarem, apesar da distância, sempre presentes em minha vida. Por todos os momentos de diversão e principalmente pela atenção nos momentos de desabafo... rs.

*A todos vocês que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, **Muito Obrigada!!!***

“Oh, você pode ter certeza que vai chegar, disse o Gato,

Se você caminhar bastante.”

Alice no país das maravilhas,

Lewis Carroll

RESUMO

As formigas da tribo Attini apresentam como hábito comum o cultivo de fungos Basidiomicetos, com os quais mantêm uma associação simbiótica permanente e obrigatória. Para proteger o ninho da infecção pelo parasita *Escovopsis* spp. as formigas adotaram diversos mecanismos, entre eles a associação com a actinobactéria simbiote, *Pseudonocardia* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas da cutícula de formigas Attini. Na primeira parte do trabalho foi avaliada a atividade antagonista de actinobactérias isoladas de *Trachymyrmex* spp. sobre o parasita *Escovopsis* sp. e outros microfungos isolados de jardim de fungo. Admite-se que a bactéria simbiote pertença ao gênero *Pseudonocardia*, porém, mostramos neste trabalho que outras actinobactérias não-*Pseudonocardia* também estão presentes na cutícula destas formigas. Foram isoladas 38 estirpes de actinobactérias e todas apresentaram atividade inibitória sobre pelo menos uma das estirpes de *Escovopsis* sp. Os resultados mostraram ainda que actinobactérias não-*Pseudonocardia* apresentaram maior nível de inibição sobre o parasita. Contrariando a hipótese de que *Pseudonocardia* spp. produzem antifúngicos que atuam especificamente sobre *Escovopsis* spp., duas estirpes identificadas como do gênero *Pseudonocardia*, também apresentaram atividade sobre os microfungos. Num segundo momento, extratos das actinobactérias foram avaliados quanto à atividade antibacteriana e anti-*Candida*. Dentre os que apresentaram melhores resultados, o extrato do cultivo da estirpe ARTD080903-03A foi selecionado para estudos de isolamento e identificação do composto ativo. Esta estirpe foi identificada, por seqüenciamento da região 16S do rDNA, como uma possível nova espécie do gênero *Streptomyces*. Do extrato do meio de cultivo desta estirpe, foi isolada a antimicina rara Urauchimicina A. O extrato apresenta também inúmeros compostos desta mesma classe, mas que, devido à baixa massa recuperada, não foi possível identificá-los. Urauchimicina A apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans* (CIM = 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. dubliniensis* (CIM = 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. glabrata* (CIM = 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *C. krusei* (CIM = 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Podemos concluir que actinobactérias associadas a formigas Attini, por serem pouco exploradas, podem ser fontes de compostos bioativos raros e até mesmo inéditos.

Palavras chave: Formigas Attini; actinobactérias; atividade antimicrobiana, Urauchimicina A.

ABSTRACT

Attini ants have a common habit of cultivating Basidiomycetes, with which they maintain a permanent and obligatory symbiotic association. To prevent nest infection by the parasite *Escovopsis* spp. ants have adopted several mechanisms, including the association with the symbiont actinobacteria *Pseudonocardia* spp. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of actinobacteria isolated from the cuticle of attini ants. Firstly, to evaluate the antagonistic activity of actinobacteria isolated from *Trachymyrmex* spp. on the parasite *Escovopsis* sp. and other microfungi isolated from fungus garden. It is assumed that the actinobacteria symbiont belongs to the genus *Pseudonocardia*, however, the results showed that a range of non-*Pseudonocardia* actinobacteria are also associated with the cuticle of these ants. All isolates showed inhibitory activity on at least one of the strains of *Escovopsis* sp. The results also revealed that non-*Pseudonocardia* had a higher level of inhibition on the parasite. Two strains of the genus *Pseudonocardia*, showed activity against the microfungi, contrary to the hypothesis that *Pseudonocardia* spp. produce antifungal metabolites that act specifically on *Escovopsis* sp. Secondly, extracts of the actinobacteria were screened for antibacterial and anti-*Candida* properties. Among those showing the best results ARTD080903-03A strain was selected for isolation and identification of active compound. This strain was identified by sequencing of 16S rDNA, as possible new specie from genus *Streptomyces*. From the extract of the culture medium of this strain a rare antimycin Urauchimycin A was isolated. The extract also has several compounds in this same class, but due to low mass recovered, we could not identify them. Urauchimycin A showed antifungal activity against *C. albicans* (MIC = 1 µg.mL⁻¹), *C. dubliniensis* (MIC = 800 µg.mL⁻¹), *C. glabrata* (MIC = 2 µg.mL⁻¹) and *C. krusei* (MIC = 15.6 µg.mL⁻¹). It was concluded that actinobacteria associated with Attini ants can be a source of rare or even unknown bioactive compounds, although they are still not exploited.

Key words: Attini ants; actinobacteria; *Pseudonocardia* sp.; antagonistic activity, Urauchimycin A.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. A tribo Attini.....	12
1.2. Associação com micro-organismos.....	13
1.3. Associação entre formigas Attini e actinobactérias	14
1.4. Doenças infecciosas	20
1.5. Agentes antimicrobianos	22
1.6. A busca por novos agentes antimicrobianos.....	23
1.7. Actinobactérias como fonte de antibióticos.....	24
1.8. Actinobactérias em associação com outros organismos como fonte de novas moléculas .	26
2. CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE <i>Trachymyrmex</i> spp. SOBRE O PARASITA <i>Escovopsis</i> sp. E OUTROS MICROFUNGOS	28
2.1. RESUMO.....	29
2.2. INTRODUÇÃO	30
2.3. OBJETIVOS	32
2.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.4.1. Isolamento das estirpes	33
2.4.1.1. Isolamento seletivo de <i>Pseudonocardia</i> spp.	33
2.4.1.2. Isolamento de outras actinobactérias	33
2.4.1.3. Isolamento do fungo mutualista, do parasita <i>Escovopsis</i> e de outros microfungos presentes no jardim de fungo.....	34
2.4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
2.4.2.1. Ensaio de antagonismo	35
2.4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	36
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.6. CONCLUSÃO	50
3. CAPÍTULO 2. ACTINOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTI- <i>Candida</i> EM FORMIGAS ATTINI.....	51
3.1. RESUMO.....	52
3.2. INTRODUÇÃO	53
3.3. OBJETIVOS	55
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.4.1. Actinobactérias.....	56
3.4.2. Cultivo para a avaliação da produção de compostos com atividade antimicrobiana.....	56
3.4.3. Obtenção dos extratos.....	58
3.4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	58
3.4.5. Aumento da escala de cultivo.....	61

3.4.6. Análise cromatográfica do extrato obtido do cultivo em escala aumentada para o isolado ARTD080903-03A	62
3.4.7. Identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	63
3.4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima da molécula isolada.....	64
3.4.9. Caracterização por métodos moleculares da bactéria ARTD 030908-03A	64
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.6. CONCLUSÕES.....	80
4. REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. A tribo Attini

As formigas Attini são agrupadas nesta tribo, pois são cultivadoras de fungos Basidiomicetos, os quais são a principal fonte de alimento destes insetos. (HÖLLDOBLER; WILSON, 1994). As Attini são encontradas apenas na região Neotropical, distribuindo-se desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da América do Sul (MARICONI, 1970).

Estudos evolutivos mostraram que a tribo Attini é um grupo monofilético que divergiu em duas clades: Paleoattini, que compreende os gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma* e; Neopalioattini, que é dividida em dois subgrupos: (i) um grupo basal, composto pelos gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetagroicus* e *Cyphomyrmex* (ii) um grupo superior, subdividido em (iia) superiores não cortadoras de folhas, composto pelos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* e (iib) superiores cortadoras de folhas, gêneros *Acromyrmex*, *Pseudoatta* e *Atta* (SCHULTZ; BRADY, 2008). Além destes 13 gêneros, dois novos gêneros, *Paramycetophylax* e *Kalathomyrmex*, foram recentemente incluídos (KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009).

Trachymyrmex (Figura 1) foi o principal gênero estudado neste trabalho. Este gênero apresenta operárias monomórficas ou com leve polimorfismo e colônias de tamanho médio, podendo chegar a alguns milhares de operárias (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007). A divisão de castas é caracterizada pelo polietismo etário, as funções exercidas são determinadas pela idade das operárias (BESHERS; TRANIELLO, 1996).



Figura 1: Operária de *Trachymyrmex carinatus* (Fonte: www.antweb.org)

O substrato coletado para o cultivo do fungo mutualista inclui matéria orgânica vegetal em decomposição, restos de insetos e pode ocasionalmente incluir folhas e pétalas frescas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

O gênero *Trachymyrmex* compreende cerca de 50 espécies distribuídas dos Estados Unidos até a região central da Argentina. O gênero é dividido em seis grupos: Opulentus,

Iheringi, Jamaicensis, Urichi, Septentrionalis e Cornetzi (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

Filogeneticamente, o gênero *Trachymyrmex* é o mais próximo das formigas superiores cortadoras de folhas (*Atta* e *Acromyrmex*) e é considerado o grupo de transição na evolução da tribo Attini (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007).

1.2. Associação com micro-organismos

Como já exposto anteriormente, a tribo Attini mantém uma associação mutualística com fungos basideomicetos. O fungo mutualista é cultivado sobre o material carregado pelas operárias para o interior do ninho, formando o chamado jardim de fungo. O fungo mutualista é responsável pela degradação do substrato do ninho e pela conseqüente geração de nutrientes assimiláveis para as formigas (SILVA et al., 2003). Uma das vantagens para o fungo nessa interação é a sua disseminação na natureza. Um inóculo do fungo é levado na cavidade infrabucal da rainha que sai do ninho para o vôo nupcial. Após a fecundação, a rainha funda um novo ninho, que deverá resultar num novo formigueiro (QUINLAN; CHERRETT, 1978).

As formigas dependem diretamente do fungo para sua alimentação, por isso, são de fundamental importância a manutenção e a predominância do fungo mutualista no ninho, mantendo-o livre de micro-organismos competidores.

Outros micro-organismos são freqüentemente encontrados associados aos jardins de fungo (mesmo que de forma latente ou sem que se possa vislumbrar um papel biológico específico na simbiose). Estão presentes bactérias (BACCI et al., 1995; RIBEIRO, 2000), leveduras (ANGELIS, C.; SERZEDELLO; ANGELIS, D., 1983; CARREIRO et al., 1997; CRAVEN; DIX; MICHAELIS, 1970; PAGNOCCA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009) e fungos filamentosos (FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008a).

Dentre os fungos filamentosos, o mais ameaçador para a simbiose pertence ao gênero *Escovopsis*, que é apenas encontrado em jardins de fungo de Attini e se trata de um parasita específico (CURRIE; MUELLER, MALLOCH, 1999). Apenas duas espécies do gênero estão descritas até o momento: *E. weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990) e *E. aspergilloides* (SEIFERT; SAMSON; CHAPELA, 1995), porém devido a grande diversidade morfológica apresentada por isolados deste gênero (CURRIE, 2001a; GERARDO et al., 2006), novas espécies devem ser descritas.

Escovopsis weberi parasita o fungo cultivado, além de competir pelo substrato presente no jardim de fungo (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Os ninhos infectados por *Escovopsis* spp. apresentam menor acúmulo de jardim de fungo e há uma diminuição na produção de operárias, mostrando que o parasita tem impacto negativo sobre a simbiose (CURRIE, 2001a).

Para a conservação da saúde do jardim de fungo, as formigas possuem vários mecanismos. O primeiro deles envolve a manutenção das condições ótimas de crescimento do fungo mutualista, como temperatura e umidade, dando, assim, condições para que este leve vantagem na competição com outros micro-organismos (WEBER, 1972). Outro comportamento é a remoção mecânica de esporos dos contaminantes que chegam aos ninhos junto com o material coletado (CURRIE; STUART, 2001).

Além destes comportamentos, as formigas também possuem mecanismos químicos para evitar a contaminação de seus jardins de fungo por outros micro-organismos. Vários autores têm relatado a capacidade de secreção de substâncias com caráter antibiótico pelas glândulas metapleurais (BEATTIE, et al., 1986 ; NASCIMENTO, et al., 1996; ; POULSEN ; HUGHES ; BOOSMA, 2006) e mandibulares das formigas (MARSARO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008b).

Substâncias com atividade antimicrobiana também são produzidas por um terceiro simbionte na associação das formigas Attini: a bactéria filamentosa (actinobactéria), do gênero *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 1999; CURRIE et al., 2003) e esta associação foi o objeto do presente estudo.

1.3. Associação entre formigas Attini e actinobactérias

Com exceção do gênero *Atta*, as operárias dos demais gêneros da tribo Attini apresentam uma camada esbranquiçada sobre a cutícula, que, originalmente era interpretada como uma camada de cera (WEBER, 1972). Currie e colaboradores (1999) mostraram que esta camada se tratava de acúmulo de bactérias filamentosas (Figura 2), inicialmente identificadas por esses autores como sendo do gênero *Streptomyces*. Alguns anos mais tarde, os mesmos autores publicaram uma errata em que, após seqüenciamento da região 16S do DNAr, identificaram a bactéria como *Pseudonocardia* sp. (CURRIE et al., 2003). Currie et al. (1999b) sugeriram que esta bactéria seria um terceiro simbionte devido às seguintes observações: (i) presença em todas as 22 espécies (distribuídas em 8 gêneros) de Attini amostradas; (ii) são carregadas em diferentes regiões da cutícula, de acordo com o gênero da

formiga; (iii) são transmitidas verticalmente; (iv) produzem antibióticos específicos que suprimem o crescimento do parasita *Escovopsis* e; (v) promovem o crescimento do fungo mutualista.



Figura 2: Actinobactéria presente na propleura de operária de *Trachymyrmex* sp.

Nessa associação, a bactéria seria beneficiada nos seguintes aspectos: (i) a dispersão pelas rainhas; (ii) ocupação de um nicho não comum para actinobactérias (associação com insetos) e (iii) consumo de nutrientes secretados pelas formigas (CURRIE, 2001b). Estes nutrientes são fornecidos por glândulas que se abrem em cavidades que parecem ser modificadas para o abrigo da actinobactéria (CURRIE et al., 2006).

A manutenção desses micro-organismos na cutícula das formigas é custosa para estas, pois as taxas de respiração aumentaram de 10 a 20% quando a bactéria está presente na cutícula. Além disso, formigas que mantêm a bactéria simbiote tendem a consumir mais do jardim de fungo que aquelas que não apresentam a bactéria em sua cutícula (POULSEN et al., 2003).

Actinobactérias não estão somente presentes na cutícula das operárias. Alguns trabalhos mostram a presença destas bactérias em jardins de fungo (POULSEN et al., 2003, MUELLER et al., 2008), *pellet* da cavidade infrabucal de rainhas (MUELLER et al., 2008) e de operárias (LITTLE et al., 2006).

Na fase inicial de suas vidas a cutícula das operárias não apresenta a actinobactéria, sendo esta transmitida das operárias mais velhas para as recém-eclodidas. Também pode

ocorrer a transmissão da *Pseudonocardia* presente no jardim de fungo para a cutícula das operárias recém-eclodidas (POULSEN et al., 2003).

A presença da *Pseudonocardia* na cutícula das operárias diminui a prevalência de *Escovopsis* sp. no jardim de fungo e aumenta a sobrevivência de ninhos infectados experimentalmente (CURRIE; BOT; BOOSMA, 2003).

Currie (2001b) sugere que representantes do gênero *Pseudonocardia* foram domesticados pelas formigas Attini pouco depois da evolução destas como cultivadoras de fungos, e devem ter co-evoluído com as formigas e também com variedades de *Escovopsis* spp., sendo que a co-evolução entre o *Escovopsis* e *Pseudonocardia* parece seguir a hipótese evolutiva da Rainha de Copas (*arm-race*).

As operárias são capazes de diferenciar a linhagem de *Pseudonocardia* presente em sua colônia de linhagens presentes em outras colônias. A capacidade de diferenciação é bastante sensível, são capazes de diferenciar entre actinobactérias muito próximas filogeneticamente (ZHANG; POULSEN; CURRIE, 2007), porém ainda não é sabido como se dá essa diferenciação.

O primeiro estudo filogenético das actinobactérias associadas às Attini foi publicado por Cafaro e Currie (2005). No referido estudo, foram isoladas bactérias da cutícula de operárias de 126 ninhos de 3 gêneros de formigas Attini (*Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Apterostigma*). As bactérias foram agrupadas em 3 morfotipos, sendo que em cada um deles há prevalência de actinobactérias com características típicas referentes a um dos 3 gêneros de formigas, sugerindo uma especificidade na simbiose. Para a análise filogenética foram escolhidos apenas 8 isolados (representando os 3 morfotipos; *Acromyrmex* (n=3), *Trachymyrmex* (n=3) e *Apterostigma* (n=2)). Estes isolados tiveram a região 16S do DNAr seqüenciadas e foram identificadas como pertencente ao gênero *Pseudonocardia*. A análise filogenética indicou que *Pseudonocardia* spp. associadas a formigas não formam um grupo monofilético. Os 3 isolados de *Trachymyrmex* formaram um grupo monofilético, o mesmo resultado foi obtido para os 2 isolados de *Apterostigma*, porém, o “grupo irmão” deste grupo é formado por dois isolados de *Pseudonocardia* spp. de vida-livre. Os isolados de *Acromyrmex* não formaram um grupo monofilético. Baseados nestas análises, os autores sugerem que as formigas devem ter adquirido a actinobactéria diversas vezes em sua história evolutiva.

Outro estudo filogenético foi realizado por Poulsen e colaboradores (2005). Neste estudo foram isoladas actinobactérias da cutícula de operárias de 16 ninhos de *Acromyrmex echinator* e de 18 ninhos de *A. octospinosus*. As actinobactérias tiveram uma parte do fator de alongação TU (EF-Tu) seqüenciada e também foram identificadas como pertencentes ao

gênero *Pseudonocardia*. A análise filogenética dos isolados resultou no agrupamento em duas clades, sendo que em ambas estavam actinobactérias associadas a ambas as espécies de formigas. Os autores sugerem que poderia ocorrer a transferência horizontal (troca entre ninhos) durante a evolução de *Pseudonocardia* e as formigas Attini. A comparação das seqüências das bactérias isoladas de diferentes operárias dentro de um mesmo ninho mostrou que apenas uma variedade da actinobactéria é mantida no ninho.

Entretanto, contrariamente aos estudos anteriores, uma não especificidade entre a actinobactéria e as formigas Attini é sugerida por Kost e colaboradores (2007). As fontes de isolamento das bactérias foram colônias de duas populações de *A. octospinosus*. Para os isolamentos utilizou-se um meio de cultura (ágar-soja) diferente do utilizado nos trabalhos anteriores (ágar-quitina). Foram isoladas 63 actinobactérias e apenas duas foram randomicamente selecionadas para a identificação por seqüenciamento da região 16S do DNAr cujo resultado mostrou que ambas pertencem ao gênero *Streptomyces*. Foi determinada a diversidade genética entre os 63 isolados. A técnica empregada foi a análise dos perfis de fragmentos de restrição por eletroforese de campo pulsado (RFLP-PFGE) e os resultados indicaram uma alta especificidade entre os ninhos e as actinobactérias (85% dos isolados estavam associados a apenas um ninho específico). Os resultados obtidos contrariaram a expectativa de ser encontrada uma reduzida diversidade, que seria ocasionada em caso de ocorrer apenas transmissão vertical das bactérias pelas rainhas. Os autores sugeriram então, que as actinobactérias também podem ser adquiridas dinamicamente do ambiente próximo, ou seja, do solo e/ou de outros ninhos de Attini (transmissão horizontal).

A mesma teoria de recrutamento de actinobactérias a partir do ambiente é defendida por Mueller e colaboradores (2008). Neste estudo, foram isoladas actinobactérias do jardim de fungo e de inóculos do fungo mutualista carregados pelas jovens rainhas quando da fundação de um novo ninho de representantes dos gêneros *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Sericomyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. Os meios utilizados para os isolamentos foram o LB ágar (meio rico em nutrientes) e o meio quitina-ágar. Foi isolada uma grande diversidade de actinobactérias, sendo os gêneros *Mycobacterium* e *Microbacterium* os mais freqüentes, com 8% dos isolados para cada um dos gêneros, seguidos pelo gênero *Pseudonocardia*, com 5% dos isolados. A análise filogenética dos isolados, juntamente com todas as seqüências depositadas no Genbank de *Pseudonocardia* spp. isoladas de formigas Attini e algumas *Pseudonocardia* de vida livre, mostrou uma grande proximidade entre estirpes de *Pseudonocardia* isoladas de formigas e de vida-livre, muitas vezes apresentando seqüências

idênticas. Este resultado reforçou a idéia de que a actinobactéria deve ser frequentemente recrutada a partir de fontes ambientais, como na hipótese feita por Kost et al. (2007).

Além de enfatizarem a possibilidade de recrutamento das actinobactérias a partir de fontes ambientais, os trabalhos de Kost et al. (2007) e Mueller et al. (2008) mostraram também a presença de actinobactérias não-*Pseudonocardia* associadas às formigas. A presença de actinobactérias não-*Pseudonocardia* também é relatada por outros autores. Zabotto (2003) isolou actinobactérias de operárias dos gêneros *Cyphomyrmex*, *Myrmicocrypta*, *Mycocephalus*, *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*. Essas bactérias foram identificadas como sendo do gênero *Streptomyces*, porém, a atividade sobre *Escovopsis* spp. não foi avaliada. Favarin (2005) isolou actinobactérias de operárias do gênero *Cyphomyrmex*, *Mycocephalus*, *Mycetarotis*, *Apterostigma*, *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*. Dos isolados, 9 foram selecionados e identificados como *Streptomyces* spp. Estes isolados apresentaram atividade antifúngica sobre *Escovopsis* sp.

Zucchi e colaboradores (2010) utilizaram diferentes meios de isolamento para obter actinobactérias de operárias da espécie *Acromyrmex subterraneus brunneus*. Dos 20 isolados encontrados, 17 foram identificadas como do gênero *Streptomyces* e uma estirpe de cada um dos gêneros *Pseudonocardia*, *Kitassatospora* e *Propionicimonas*. Os isolados foram avaliados quanto a atividade inibitória sobre *Escovopsis* sp. Apenas duas estirpes do gênero *Streptomyces* e o isolado do gênero *Pseudonocardia* não inibiram o crescimento de *Escovopsis* sp.; os demais isolados tiveram algum efeito inibitório sobre o crescimento do fungo.

O trabalho de Sen e colaboradores (2009) contraria a maioria das hipóteses levantadas por trabalhos anteriores que sustentariam a teoria de que a actinobactéria é um terceiro simbiote das Attini. (i) Utilizando métodos independentes de cultivo, identificaram diversas espécies de *Pseudonocardia* e outras Pseudonocardiaceae (*Amycolatopsis* spp.), bem como uma grande diversidade de outras actinobactérias (*Gordonia* spp., *Microlunatus* spp., *Mycobacterium*) presentes na cutícula de operárias. Além disso, também encontraram mais de uma estirpe do gênero *Pseudonocardia* em operárias de um mesmo ninho; (ii) Isolaram *Pseudonocardia* sp. de machos; (iii) Isolados de *Pseudonocardia* spp. e *Amycolatopsis* spp. não tiveram ação inibitória específica sobre *Escovopsis* sp. e apresentaram também atividade antifúngica contra fungos entomopatogênicos, endofíticos e saprófitos; (iv) na maioria dos ensaios, as actinobactérias inibiram o crescimento do fungo mutualista. Os autores sugerem interpretações alternativas para a associação com actinobactérias, como comensais, patogênicas ou alguma função desconhecida.

Estudos recentes identificaram uma das substâncias produzida por actinobactérias associadas a formigas e com atividade antimicrobiana sobre o *Escovopsis*. A dentegerumicina, um dipeptídeo cíclico inédito, foi isolado de *Pseudonocardia* sp. obtida da cutícula de *Apterostigma dentigerum*. Além da atividade inibitória sobre o *Escovopsis* sp., a nova molécula também apresenta atividade sobre *Candida albicans* (OH et al., 2009); o que contradiz a idéia de que *Pseudonocardia* produz compostos específicos contra *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999).

Outra substância, candicidina, foi isolada de uma estirpe de *Streptomyces* isolada de uma operária do gênero *Acromyrmex*. A candicidina inibiu o crescimento do *Escovopsis weberi* e *E. aspergilloides*, mas não inibiu os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Lecanicillium lecanii* (HAEDER et al., 2009).

Além da associação com o fungo mutualista, com o parasita *Escovopsis* spp., e com as actinobactérias, as formigas Attini possuem associação com um quinto simbionte, leveduras negras relacionadas ao gênero *Phialophora*. Assim como as actinobactérias, estas leveduras são encontradas associadas ao corpo das operárias (LITTLE; CURRIE, 2007). As leveduras negras atuam como parasita na simbiose. Elas adquirem os nutrientes necessários para seu desenvolvimento a partir das actinobactérias, suprimindo o crescimento destas. Conseqüentemente, na presença de leveduras negras, a eficiência no controle do parasita *Escovopsis* é diminuída (LITTLE; CURRIE, 2008).

Estudos sobre a associação entre as formigas Attini e actinobactérias estão sendo desenvolvidos atualmente em laboratórios de diversos países, pois vários aspectos desta simbiose ainda precisam ser avaliados. Ainda permanecem algumas perguntas como: (i) Apenas as actinobactérias pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* participam da simbiose? (ii) Os antibióticos produzidos pela bactéria simbionte são mesmo específicos para *Escovopsis*? (iii) Qual é a concentração necessária para que estes compostos sejam eficazes? Devido a estas lacunas, a primeira parte deste trabalho visa tentar responder algumas destas questões.

Actinobactérias são amplamente conhecidas por seu potencial na produção de moléculas biotivas, fruto de seu metabolismo secundário. Assim como as formigas, que se associam com actinobactérias para que estas produzam metabólitos que controlem o parasita específico *Escovopsis* spp., este grupo de bactérias é a fonte da maioria das drogas que utilizamos no controle dos micro-organismos patogênicos.

A segunda parte do presente trabalho visou avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas de formigas Attini na produção de compostos com atividade

antimicrobiana que possam servir para o controle de micro-organismos patogênicos para humanos.

1.4. Doenças infecciosas

As doenças infecciosas, apesar dos tratamentos a base de antimicrobianos, continuam sendo um dos principais problemas de saúde pública. Isto se deve a inúmeras razões: às doenças do sistema imunológico, aos tratamentos imunossupressores e principalmente à resistência dos patógenos aos antibióticos (TRAVIS, 1994).

O uso irracional de antimicrobianos nas últimas décadas determinou o surgimento de estirpes de micro-organismos multiresistentes, resultando em uma ineficiência dos fármacos disponíveis comercialmente para o controle de infecções microbianas (BHAVANANI; BALLOW, 2000).

O uso de antibióticos por humanos e animais é um experimento de evolução de enorme magnitude, um experimento de seleção artificial em tempo real (ANDERSSON; LEWIL, 1999), cujo impacto pode ser devastador. Larson (2007) alerta para a possibilidade de voltarmos à era pré-antibióticos.

A resistência aos antibióticos originalmente surge em hospitais, mas estirpes resistentes às drogas estão se tornando mais comum nas comunidades, resultado de um comportamento de uso indiscriminado de antibióticos pela população, agravado, ainda, pelo uso contínuo de antibióticos na agricultura (LARSON, 2007).

Nos últimos anos, infecções fúngicas tem se tornado cada vez mais comum. A situação é preocupante, já que, se comparado com infecções bacterianas, infecções por fungos são bem menos estudadas e conhecidas. Esta situação ainda é agravada pela pequena quantidade de antifúngicos disponíveis comercialmente. Os principais agentes das infecções fúngicas são leveduras dos gêneros *Cryptococcus* (agente das criptococoses) e *Candida* (agente das candidiases), principalmente a espécie *C. albicans* (BRASIL, 2006).

Entre as infecções mais graves estão aquelas de origem hospitalar. Em unidades de tratamento intensivo dos Estados Unidos, no período entre 1995 e 2002, espécies do gênero *Candida* foram a terceira causa de infecções de ordem sistêmica e apresentaram taxa de mortalidade de 47% dos infectados, a maior taxa de mortalidade registrada no período (WISPLINGHOFF et al., 2004). A fonte de leveduras causadoras de infecções em hospitais é, quase sempre, a própria microbiota normal endógena dos pacientes (BONASSOLI;

BERTOLI; SVIDZINSKI, 2005), sendo o trato gastrointestinal o maior reservatório (ODDS, 1987).

Dentre as espécies do gênero *Candida*, a espécie *C. albicans* é a mais comum e reconhecida como a mais patogênica. É também a mais prevalente em infecções fúngicas de mucosas e sistêmicas (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; EDMOND et al., 1999; TRICK et al., 2002). Porém, a proporção de outras espécies de *Candida* como agentes de candidiases está aumentando nas últimas décadas e espécies emergentes como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* estão se tornando comuns em certos grupos de pacientes (PFALLER, 1995). Esta emergência de espécies não-*albicans* é considerada consequência do constante uso de antifúngicos do tipo azóis (BASSETTI et al., 2006; PERSONS et al., 1991; MILLON et al., 1994).

Levantamentos da frequência de *Candida* spp. em infecções hospitalares nos Estados Unidos mostraram a prevalência de *C. albicans*, seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (EDMOND et al., 1999; TRICK, 2002). Apesar de serem menos comuns as espécies emergentes apresentam altas taxas de mortalidade, sendo as maiores observadas em pacientes infectados por *C. krusei* (58,7%) e *C. glabrata* (50,1%) (EDMOND et al., 1999). As altas taxas de mortalidade devem estar relacionadas com a resistência destas espécies aos antifúngicos azóis (DRONDA et al., 1996). *C. krusei* é resistente ao fluconazol e *C. glabrata* é menos suscetível ou apresenta uma concentração inibitória mínima mais alta que das outras espécies de *Candida* (YANG et al., 2004).

Na América Latina e no Brasil, os dados sobre infecções fúngicas são bastante limitados. Alguns estudos têm mostrado que a frequência das *Candida* spp. é diferente daquela apresentada nos Estados Unidos. No Brasil, *C. albicans* é a mais comumente encontrada, seguida por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010).

C. dubliniensis, a mais nova espécie patogênica do gênero descrita, foi primeiramente isolada de lesão orofaríngea de paciente com AIDS (SULIVAN et al., 1995) e apesar de não aparecer nos dados das espécies mais prevalentes, têm sido isolada em diversas infecções (COLEMAN et al., 1997; MEIS et al., 1999).

1.5. Agentes antimicrobianos

A descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928 foi o marco que deu início à era do tratamento a base de antibióticos. O advento da antibioticoterapia contribuiu com o aumento da expectativa de vida e possibilitou que doenças infecciosas que antes eram de difícil tratamento e causa de mortalidade fossem tratadas (RANG; DALE; RITTER, 2001). Desde então outros agentes antibacterianos foram isolados de fontes naturais ou produzidos artificialmente e apresentam diversos mecanismos de ação: (i) alguns interferem na síntese ou ação do folato (sulfonamidas e trimetropina); (ii) antibióticos β -lactâmicos, que interferem na parede celular de bactérias (penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, carbapenens e monobactâmicos); (iii) afetam a síntese de proteínas bacterianas (tetraciclina, gentamicina, estreptomicina, amicacina, tobramicina, netilmicina, neomicina e frameticina, cloranfenicol, eritromicina, claritromicina, azitromicina, clindamicina e ácido fusídico); (iv) afetam a topoisomerase II (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, acrosoxacina e perfloxacina); (v) agentes antibacterianos diversos (vancomicina, polimixina B, colistina, metronidazol e nitrofurantoína) (JAWETZ et al., 1984; RANG; DALE; RITTER, 2001).

Para o tratamento das infecções fúngicas, apenas sete classes de antifúngicos estão disponíveis no mercado: polienos, análogos da pirimidina, azóis, candinas, alilaminas, tiocarbamatos e morfolinas (SANGLARD; COSTE; FERRARI, 2009). Porém, em casos de micoses sistêmicas o número de fármacos disponíveis para o tratamento é ainda mais limitado. Nestes casos, anfotericina B e os azóis têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004). Apesar de ser amplamente usada, anfotericina B pode resultar em diversas reações adversas como: significativa nefrotoxicidade, redução do fluxo sanguíneo renal, náuseas, vômitos e anorexia. Os azóis causam menos efeitos colaterais que a anfotericina B, mas são menos potentes que a mesma, pois geralmente apresentam ação fungistática e o uso indiscriminado desta classe de antifúngicos leva ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis (GUPTE; KULKARNI; GANGULI, 2002).

O desenvolvimento de drogas antifúngicas tem um vagaroso progresso se comparado com o desenvolvimento de drogas bacterianas. A principal razão está na dificuldade de se encontrar uma molécula que tenha ação seletiva, pois como os mamíferos, fungos são eucariotos. Devido a isto, muitos sítios atacados por drogas antibacterianas não podem ser alvos para antifúngicos, por exemplo, agentes que inibem a biossíntese de proteínas, RNA ou DNA, atuam também nas células do hospedeiro, resultando, então, em alta toxicidade (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994).

A maioria dos antifúngicos disponíveis clinicamente tem como alvo o ergosterol da membrana plasmática. O ergosterol presente nas células dos fungos é estruturalmente diferente dos esteróis homólogos das células de mamíferos, tornando-se assim, um alvo seletivo para as drogas antifúngicas e tem sido extensivamente estudados na tentativa de obter novos antifúngicos (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994).

1.6. A busca por novos agentes antimicrobianos

Como já exposto anteriormente, as doenças infecciosas são um grande problema da saúde pública, situação agravada pela inevitável seleção de agentes infecciosos resistentes aos antimicrobianos (LARSON, 2007) e desta maneira a busca por novos agentes é imprescindível e urgente.

Atualmente duas linhas de pesquisa paralelas na busca de novos agentes antimicrobianos são seguidas: o isolamento de produtos naturais com atividade antimicrobiana e a produção de antimicrobianos sintéticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006)

A busca de novos antibióticos por meio de fabricação sintética é baseada no fato de que pequenas mudanças estruturais em antibióticos de uma classe já conhecida podem resultar em diferenças na ação, como por exemplo, facilitar a permeabilidade do agente na membrana celular (UJIKAWA, 2003).

Produtos naturais são a maior fonte para o descobrimento de novas e potenciais moléculas bioativas. Um grande número de plantas, micro-organismos e organismos marinhos têm sido avaliados quanto à produção de compostos com atividade biológica (FIRÁKOVÁ; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007).

É bem estabelecido que micro-organismos são uma fonte ilimitada de produtos naturais. Metabólitos secundários de micro-organismos são importantes fontes de compostos com potencial terapêutico (WU et al., 2007). Entre estes metabólitos secundários estão os compostos com atividade antimicrobiana. O significado biológico da produção de antibióticos pela estirpe produtora ainda não é muito conhecido, embora seja claro o que isso representa para a sobrevivência do micro-organismo na natureza, oferecendo uma vantagem para o organismo produtor sobre o seu vizinho competidor (WAUGH; LONG, 2002). A pesquisa sobre estes micro-organismos produtores possibilita o desenvolvimento biotecnológico destes compostos para uso terapêutico. Dentre os micro-organismos produtores de moléculas

bioativas, as actinobactérias merecem destaque, principalmente como produtoras de antibióticos. Numerosos antibióticos foram obtidos a partir de micro-organismos, principalmente de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, as quais são a maior fonte de antibióticos (HOPWOOD et al., 1980).

1.7. Actinobactérias como fonte de antibióticos

Actinobactérias são caracterizadas principalmente por sua morfologia filamentosa. São Gram-positivas, aeróbias e formadoras de esporos. Este grupo de bactérias constitui uma proporção considerável dos micro-organismos do solo ($10^4 - 10^6$ esporos de actinomicetos por grama de solo), onde desempenham um papel fundamental na mineralização da matéria orgânica (CLAESSEN et al., 2006). Taxonomicamente estão classificadas no domínio Bacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997). O principal integrante desta classe é o gênero *Streptomyces*, família Streptomycetacea, o qual contém o maior número de espécies descritas.

O ciclo de vida do gênero *Streptomyces* se inicia com a germinação do esporo, originando filamentos ramificados que penetram no solo em busca de nutrientes, metabolizando a matéria orgânica pela ação de enzimas extracelulares (PADILLA, 1998). As hifas primárias que formam o micélio vegetativo dão origem às hifas aéreas, que formam o micélio aéreo, o qual passa por uma diferenciação, incluindo septação e formação de esporos (CHATER, 2006). É nesta fase que o metabolismo secundário é ativado, produzindo principalmente pigmentos e antibióticos (DEMAIN, 1999). Os antibióticos são secretados neste momento, protegendo o material vegetal degradado contra outros micro-organismos que podem competir por esses nutrientes (CHATER, 2006).

O gênero *Streptomyces* possui grande importância econômica e industrial. É responsável pela produção tanto de metabólitos primários como de secundários que são explorados na biotecnologia. Entre eles destacam-se a produção de enzimas de uso industrial, sendo as principais: oxidoredutases, transferases, hidrolases, isomerases e sintetases (PADILLA, 1998). Apesar de sua aplicação em diversos setores, é na produção de compostos com atividade antimicrobiana que o gênero se destaca.

Em 2001, Watve e colaboradores estimaram que desde o descobrimento da estreptotricina em 1942 e da estreptomina dois anos depois, a ordem Actinomycetales tem aproximadamente 3000 antibióticos conhecidos (90% destes provenientes do gênero

Streptomyces). Dois terços dos antibióticos disponíveis comercialmente (MIYADOH, 1993) e aproximadamente 60% dos antibióticos utilizados na agricultura foram originalmente isolados de espécies de *Streptomyces* (TANAKA; OMURA, 1993).

Os antibióticos produzidos por actinobactérias apresentam grande variedade de estruturas químicas, incluindo aminoglicosídicos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, polienos e poliésteres. Estes compostos são produtos de caminhos de biossíntese, em que genes organizados em clusters, codificam enzimas policetídeo sintase (PKSs) que realizam passos da síntese. Esta grande variedade de estruturas químicas não reflete uma multiplicidade de percursos, mas sim uma série de reações bioquímicas, tais como condensação, metilação, oxidação, polimerização e redução. Um número relativamente reduzido de metabólitos primários serve como precursor para a biossíntese de antibióticos, como aminoácidos, acetil-CoA e propinil-CoA (OKAMI; HOTTA, 1988).

Após décadas de intensiva busca de novos compostos antibióticos a partir de linhagens de *Streptomyces*, tem aumentado a dificuldade de isolamento de novos micro-organismos e novos metabólitos bioativos encontrados em solo normal. Entretanto, segundo Watve e colaboradores (2001), apenas 3% dos antibióticos provenientes do gênero *Streptomyces* foram isolados. Esta pequena porcentagem se deve, principalmente, ao fato de que apenas 1% dos micro-organismos de uma mostra ambiental são isolados, não sendo possível, assim, o estudo dos metabólitos secundários eventualmente produzidos por estes (Watve et al., 2001). Assim, apesar da crescente dificuldade, devem-se combinar métodos que facilitem o cultivo de actinobactérias de difícil crescimento com técnicas modernas de isolamento produtos naturais para que se tenha sucesso em relação ao percentual ainda não estudado.

Uma das estratégias para se expandir o conhecimento sobre os metabólitos secundários de micro-organismos é o uso de modernas técnicas de biologia molecular, entre elas, a metagenômica. Esta técnica permite que o DNA de toda a comunidade microbiana presente em um ambiente seja extraída, incluindo então, os micro-organismos não cultiváveis em laboratório. Os fragmentos de DNA extraídos podem ser expressos em hospedeiros cultiváveis, como *Escherichia coli*, por exemplo. Desta maneira os metabólitos codificados pelos fragmentos do metagenoma podem ser produzidos, avaliados quanto à atividade antimicrobiana e identificados (PUPO; GALLO, 2007). A partir da expressão de genes de vias de biossíntese de metagenoma de solo foram descobertos os antibióticos turbomycina A e B (GILLESPIE et al., 2002) e um antibiótico da classe das indirubinas (OSBURNE et al., 2002).

Apesar da crescente dificuldade em isolar um composto com atividade antimicrobiana ainda desconhecido, a pesquisa por novos antibióticos continua, e antibióticos inéditos têm

sido isolados a partir da fermentação de várias espécies de *Streptomyces* (BORUWA et al., 2004; HAYAKAWA et al., 2007; KUROSAWA et al., 2006; SHIOMI et al., 2005).

1.8. Actinobactérias em associação com outros organismos como fonte de novas moléculas

Outra estratégia apontada para se buscar compostos ainda desconhecidos é isolar micro-organismos a partir de nichos pouco explorados, como fontes hidrotermais ou regiões possuidoras de *hotspots* de diversidade, como as florestas tropicais, por exemplo (WAUGH; LONG, 2002). Uma opção destes nichos pouco explorados são as actinobactérias associadas a outros organismos. E esta fonte tem sido apontada como alternativa para o isolamento de moléculas bioativas inéditas.

A associação mais explorada é a interação planta-micro-organismo e diversas moléculas inéditas têm sido isoladas de actinobactérias endofíticas. Kakadumicinas, um antibiótico de amplo espectro e com ação também sobre *Plasmodium falciparum*, agente da malária, foram isoladas de *Streptomyces* sp. (NRRL 30566) endofítico de *Grevillea pteridifolia* (BIEBER et al., 1998). Ezra e colaboradores (2004), isolaram de *Streptomyces* sp. endofítico de *Monstera* sp. a Coronamicina, um antibiótico peptídico com ação antifúngica.

Outra associação bastante explorada é a interação entre esponjas e actinobactérias. As esponjas têm sido apontadas com grande entusiasmo para o isolamento de actinobactérias produtoras de compostos bioativos e moléculas inéditas com atividade antimicrobiana têm sido isoladas. Duas novas fenazinas com atividade contra *Enterococcus hirae* e *Micrococcus luteus* foram isoladas de *Brevibacterium* sp. KMD 003 isolada da esponja *Callyspongia* sp. (CHOI et al., 2009).

Alguns estudos têm mostrado a associação entre actinobactérias e insetos. A vespa solitária da espécie *Philanthus triangulum* cultiva uma nova espécie de *Streptomyces* em glândulas da antena e aplicam a bactéria sobre a célula de cria antes da ovoposição e bioensaios indicam que a actinobactéria protege as crias de infestações por fungos (KALTENPOTH et al., 2005).

O coleóptera *Dendroctonus frontalis* cultiva o fungo *Entomocorticium* sp., o qual serve de alimento para as larvas do inseto. O coleóptera cultiva o fungo simbiote em galerias no interior do caule de pinheiros. A simbiose entre o fungo e o inseto é ameaçada pelo fungo antagonista *Ophiostoma minus*. Para o controle do parasita o coleóptera inocula juntamente com o fungo a actinobactéria *Streptomyces thermosacchari*, que inibe o crescimento do fungo

parasita. A molécula responsável por esta inibição teve a estrutura elucidada e se trata de uma molécula inédita, denominada pelos autores de micangimicina (SCOTT et al., 2008). Os autores não avaliaram o espectro de ação da molécula, porém, como esta é ativa sobre o fungo parasita, pode também ser ativa sobre outros fungos de interesse clínico.

O caso mais estudado de associação entre insetos e actinobactérias é a simbiose entre actinobactérias e formigas cultivadoras de fungo, e aspectos desta associação já foram relatados na presente revisão. Bactérias associadas a formigas podem ser fontes de moléculas bioativas que apresentem outras atividades além da inibição do fungo parasita *Escovopsis* spp. Esta associação ainda não foi estudada com o enfoque de prospecção de actinobactérias com potencial para o isolamento de compostos com atividade antimicrobiana e este foi um dos objetivos do presente estudo.

2.

CAPÍTULO 1

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DE
ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE *Trachymyrmex*
spp. SOBRE O PARASITA *Escovopsis* sp. E OUTROS
MICROFUNGOS**

2.1. RESUMO

Para proteger o jardim de fungo da infecção pelo parasita *Escovopsis* spp. as formigas Attini adotaram diversos mecanismos, entre eles a associação com a actinobactéria simbiote, *Pseudonocardia* sp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antagonista de actinobactérias isoladas de *Trachymyrmex* spp. sobre o parasita *Escovopsis* sp. e outros microfungos isolados de jardins de fungo deste gênero de Attini. Um total de 38 actinobactérias foram isoladas, entre elas actinobactérias *Pseudonocardia* spp. e actinobactérias não pertencentes a este gênero. Admite-se que a actinobactéria simbiote pertença ao gênero *Pseudonocardia*, porém, mostramos neste trabalho que actinobactérias não-*Pseudonocardia* também estão presentes na cutícula destas formigas. Todos os isolados apresentaram atividade inibitória sobre pelo menos uma das estirpes de *Escovopsis* sp. e os resultados mostraram ainda que actinobactérias não-*Pseudonocardia* apresentam maior potencialidade no controle do parasita. Utilizando o método da microdiluição, verificamos que dois isolados do gênero *Pseudonocardia* inibiram o crescimento de outros microfungos associados ao ninho, contrariando a hipótese de que os compostos antimicrobianos produzidos por essas actinobactérias são específicos para o controle de *Escovopsis* spp. Podemos concluir que, utilizando diferentes métodos de isolamento, além da actinobactéria simbiote do gênero *Pseudonocardia*, são encontradas outras actinobactérias presentes na cutícula das operárias e estas também podem ter algum papel na interação formigas Attini-Actinobactéria

Palavras chave: Formigas Attini; Actinobactérias; *Pseudonocardia* sp.; *Escovopsis* spp.; atividade antagonista.

2.2. INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini apresentam como hábito comum o cultivo de fungos Basidiomicetos, os quais são responsáveis pela degradação do substrato do ninho e pela conseqüente geração de nutrientes assimiláveis para as formigas (SILVA et al., 2003). Por isso, são de fundamental importância a manutenção e a predominância do fungo mutualista no ninho, mantendo-o livre de micro-organismos competidores. Porém, ocorrem associados aos ninhos, bactérias (BACCI et al., 1995; RIBEIRO, 2000), leveduras (ANGELIS, C.; SERZEDELLO; ANGELIS, D., 1983; CARREIRO et al., 1997; CRAVEN; DIX; MICHAELIS, 1970; RODRIGUES et al., 2009) e outros fungos filamentosos (FISHER et al., 1996; PAGNOCCA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008a). Dentre os fungos filamentosos, o mais prevalente pertence ao gênero *Escovopsis*, que é apenas encontrado em jardins de fungo de Attini e se trata de um parasita específico (CURRIE; MUELLER, MALLOCH, 1999).

Para manter o jardim de fungo livre de contaminações, as formigas possuem vários mecanismos e entre eles está a associação com bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia*. Segundo Currie et al. (1999), estas bactérias são um terceiro simbionte na associação formiga-fungo, inibem especificamente o parasita *Escovopsis* spp., promovem o crescimento do fungo mutualista e são transmitidas verticalmente. Currie (2001b) sugere que *Pseudonocardia* spp. coevoluíram com as Attini e com *Escovopsis* spp.

Se de fato ocorre a transferência vertical da bactéria filamentosa quando da fundação de um novo ninho, espera-se, então, que associadas às formigas Attini se encontre uma baixa diversidade de actinobactérias. A especificidade na associação *Pseudonocardia* spp.-formigas Attini é defendida por alguns autores (CAFARO; CURRIE, 2005; CURRIE et al., 1999, CURRIE et al., 2001b; POULSEN et al., 2005).

Entretanto, contrariamente a estes autores, uma não especificidade entre a actinobactéria e as formigas Attini foi sugerida primeiramente por Kost e colaboradores (2007), que encontraram grande diversidade de actinobactérias associadas à *Acromyrmex octospinosus*. Os autores sugeriram então, que as actinobactérias também podem ser adquiridas dinamicamente do ambiente próximo, ou seja, do solo e/ou de outros ninhos de Attini (transmissão horizontal). A mesma teoria de recrutamento de actinobactérias a partir do ambiente é defendida por Mueller e colaboradores (2008), que mostraram uma grande proximidade entre estirpes de *Pseudonocardia* isoladas de formigas e de vida-livre, muitas vezes apresentando seqüências idênticas.

Além de enfatizarem a possibilidade de recrutamento das actinobactérias a partir de fontes ambientais, os trabalhos de Kost et al. (2007) e Mueller et al. (2008) mostraram também a presença de actinobactérias não-*Pseudonocardia* associadas às formigas. Outros autores também relatam a presença de bactérias não-*Pseudonocardia*, principalmente *Streptomyces* spp. associadas às Attini e estas bactérias também apresentam atividade inibitória sobre *Escovopsis* sp. (FAVARIN, 2005; ZABOTTO, 2003; ZUCCHI; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2010).

Diversos estudos a respeito da associação Attini-actinobactérias vêm sendo publicados nos últimos anos. Porém diversos aspectos desta associação ainda não conhecidos ou necessitam ser reavaliados. O objetivo do presente capítulo foi tentar contribuir para o melhor entendimento desta associação.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de actinobactérias, (*Pseudonocardia* e não-*Pseudonocardia*), isoladas do corpo de formigas *Trachymyrmex* spp. sobre o parasita *Escovopsis* sp. e outros fungos filamentosos isolados de jardim de fungo do mesmo gênero de Attini.

2.3.2. Objetivos específicos

- 1- Isolar actinobactérias associadas à cutícula de operárias de *Trachymyrmex* spp.
- 2- Avaliar a atividade inibitória das actinobactérias contra três estirpes do gênero *Escovopsis*.
- 3- Avaliar a atividade inibitórias das actinobactérias contra fungos filamentosos isolados de jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp.
- 4- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de actinobactérias cultivadas em meio líquido sobre *Escovopsis* sp. e outros microfungos, como forma de quantificar a potencialidade dos compostos com atividade antimicrobiana produzidos pelos isolados do gênero *Pseudonocardia* e por alguns representantes dos isolados não-*Pseudonocardia*.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1. Isolamento das estirpes

2.4.1.1. Isolamento seletivo de *Pseudonocardia* spp.

A fonte de isolamento das actinobactérias simbiotes foi a cutícula de operárias de oito ninhos de *Trachymyrmex* sp. (Tabela 1, ninhos apresentados em negrito).

Os ninhos foram cuidadosamente escavados e o jardim de fungo, juntamente com algumas operárias, foram armazenados em recipientes plásticos estéreis e mantidos a 25°C. Para o isolamento das actinobactérias foram utilizadas 4 operárias de cada um dos ninhos. Com o auxílio de estereomicroscópio, foi raspado com uma agulha a região onde havia o crescimento aparente da actinobactéria sobre a cutícula da operária (Figura 1). Esse material foi semeado em placas contendo ágar-quitina (3g de quitina, 0,575 g de K₂HPO₄, 0,375 g de MgSO₄, 0,275 g de KH₂PO₄, 0,0075 g de FeSO₄, 0,00075 g de MnCl₂.4H₂O, 0,00075 g de ZnSO₄, 0,032 g de nistatina, 0,05 g de cicloheximida, 15 g de ágar em 750 mL de água destilada) (CAFARO; CURRIE, 2005), as quais foram monitoradas por até 30 dias a 25°C. As estirpes isoladas foram mantidas em tubos de YMA (3g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona, 10 g de glicose, 18 g de ágar) (YARROW, 1998) sob refrigeração a 4°C e em criotubos (glicerol 15%) em ultrafreezer a -80°C.

Para a confirmação do isolamento de *Pseudonocardia* spp. os isolados foram submetidos à caracterização morfológica. Para a observação da morfologia do micélio os isolados foram inoculados em meio YMA e com o auxílio de uma pinça foram inseridas 4 lamínulas estéreis no ágar, com um ângulo de aproximadamente 45°. As placas foram incubadas a 25° C por 14 dias. As lamínulas com o micélio aderido foram submetidas à coloração de Gram e examinadas em microscopia óptica com aumento de 1000 vezes.

2.4.1.2. Isolamento de outras actinobactérias

Nestes isolamentos esperava-se encontrar actinobactérias de crescimento rápido, do tipo não-*Pseudonocardia*, pois o meio de cultura utilizado no isolamento favorece actinobactérias de crescimento rápido, principalmente *Streptomyces* spp. Para os isolamentos foram utilizadas 4 operárias de 12 ninhos de *Trachymyrmex* spp. (ninhos não apresentados em negrito, Tabela 1). Foram utilizados dois métodos de isolamento; no primeiro deles, com o auxílio de estereomicroscópio, foi raspada com uma agulha a região onde havia o crescimento aparente da actinobactéria sobre a cutícula da operária (Figura 1) e estrias foram feitas em

placas contendo ágar SCN (10,0 g de amido, 0,3 g de caseína, 2,0 g de KNO₃, 2,0 g de NaCl, 2,0 g de K₂HPO₄, 0,05g de MgSO₄.7H₂O, 0,02 g de CaCO₃, 0,01 g de FeSO₄.7H₂O e 18,0 g de ágar) (KÜSTER; WILLIAMS, 1964). Adicionalmente, fragmentos da cutícula foram depositadas sobre a superfície do ágar SCN. As placas foram incubadas por até 30 dias a 25°C. As estirpes isoladas foram mantidas em tubos de YMA sob refrigeração a 4°C e em criotubos (glicerol 10%) em ultrafreezer a -80°C.



Figura 1: Actinobactéria presente na propleura de operária de *Trachymyrmex* sp.

2.4.1.3. Isolamento do fungo mutualista, do parasita *Escovopsis* e de outros microfungos presentes no jardim de fungo

Um ninho de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi) (código ARTD 120609-01) localizado na UNESP – Rio Claro – SP foi cuidadosamente escavado evitando a contaminação do jardim de fungo por outros micro-organismos. Uma porção deste foi retirada da câmara e armazenada em recipiente plástico estéril. Pequenos fragmentos do jardim de fungo foram inoculados em 10 placas (4 fragmentos por placa) de PDA (Fisher Scientific) e 10 placas de ágar malte 2%. As placas foram incubadas por 7 dias no escuro. Os micro-organismos que cresceram foram transferidos para outras placas até a pureza da cultura. Com exceção do fungo mutualista, os demais fungos isolados foram mantidos em tubos sob refrigeração a 10°C e em criotubos (glicerol 10%) em ultrafreezer a -80°C. Especificamente, o fungo mutualista foi mantido a 25°C em tubos contendo meio A (PAGNOCCA et al., 1990) adicionado de extrato aquoso de aveia em flocos (5% m/v).

Tabela 1: Ninhos utilizados no isolamento de actinobactérias presentes no exoesqueleto de operárias

Identificação do ninho	Espécie	Local da coleta	GPS
SES080402-05	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-02	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-03	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-04	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-04	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-05	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-06	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-07	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
CTL080820-02	<i>Trachymyrmex</i> sp.1 (grupo Iheringi)	Estação Ecológica do Panga - MG	S 19° 17.291' O 48° 39.670'
ARTD080903-01	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-03	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-04	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro, SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES 080909-08	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 50.146' O 57° 01.016'
SES080911-04	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 57.612' O 56° 99.019'
SES080911-06	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 49.474' O 56° 01.079'
SES080921-03	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19° 17.291' O 48° 39.670'
SES080922-03	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19° 17.291' O 48° 39.670'
SES080924-01	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19° 17.291' O 48° 39.670'
SES080924-02	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19° 17.291' O 48° 39.670'

Os ninhos com códigos apresentados em negrito foram utilizados na etapa 2.4.1.1

Os demais ninhos foram utilizados na etapa 2.4.1.2

2.4.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.4.2.1. Ensaios de antagonismo

As bactérias foram confrontadas com os seguintes fungos isolados de jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (código ARTD 120609-01) no experimento do item 2.4.1.3: *Escovopsis* sp. TD065, *Fusarium solani* TD064, *Mucor* sp. TD061, *Trichoderma spirale* TD063, as estirpes foram identificadas por métodos tradicionais e moleculares por André Rodrigues. Além destas estirpes foram incluídas nos ensaios mais duas estirpes: *Escovopsis* sp. SES 001

e *Escovopsis* SES005, previamente isoladas, por André Rodrigues, de jardins de fungo de *Trachymyrmex* sp., códigos SES080402-03 e SES080922-03, respectivamente, e que estavam estocadas no banco de micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP.

Para avaliar a atividade inibitória das actinobactérias sobre os fungos filamentosos foi utilizada a metodologia adaptada de Rodrigues et al. (2009) e Gerardo et al. (2006). Placas de YMA foram divididas em forma de cruz e 3 diferentes estirpes foram inoculadas próximas à borda sendo a quarta extremidade deixada como controle. As placas foram incubadas a 25°C por 21 dias para o desenvolvimento das actinobactérias e, então, um bloco de 10mm de diâmetro dos fungos cultivados em ágar malte 2% foi inoculado no centro das placas e estas foram incubadas por mais 7 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram monitoradas diariamente e ao fim do período de incubação foi medida a distância do crescimento micelial dos fungos a partir da borda do bloco central. Para determinar a porcentagem de inibição, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de inibição} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{distância do crescimento do micélio na presença da actinobactéria}}{\text{distância do crescimento do micélio na ausência da actinobactéria}} \right)$$

Devido à forte inibição das actinobactérias sobre as estirpes de *Escovopsis*, neste caso, o ensaio foi realizado confrontando o fungo com apenas uma bactéria por placa, sem a divisão do ágar, mantendo-se as demais condições dos ensaios. O efeito inibitório de cada estirpe foi categorizado como 0 = sem efeito inibitório (crescimento do *Escovopsis* sobre a actinobactéria); 1 = efeito inibitório moderado (inibição < 2,0 cm); 2 = forte efeito inibitório (inibição > 2,0 cm); 3 = inibição total (sem crescimento do fungo).

2.4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para se quantificar a atividade antimicrobiana das actinobactérias foi determinada a CIM de extratos dos cultivos das actinobactérias frente às estirpes de *Escovopsis* sp. (SES001, SES005 e TD065) e aos outros fungos filamentosos isolados do jardim de fungo: *Fusarium solani* TD064, *Mucor* sp. TD061, *Trichoderma spirale* TD063.

2.4.2.2.1. Cultivo para a produção de compostos com atividade antimicrobiana

As actinobactérias identificadas morfológicamente como *Pseudonocardia* spp. e nove representantes das actinobactérias do grupo não-*Pseudonocardia* (SES080420-07B,

ARTD090308-01B, ARTD090308-02A, ARTD090308-02C2, ARTD090308-03A, ARTD090308-03D, SES080911-04A, SES080921-03A, SES080924-02B) foram semeadas em placas de Petri contendo YMA e incubadas por 7 dias a 25° C. Destas placas foram retirados 5 blocos de 10 mm de diâmetro e transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YMB (3g de extrato de levedura, 3 g de extrato de malte, 5 g de peptona, 10 g de glicose, 1000 mL água destilada) e incubados a 28 °C por 14 dias sob agitação de 150 rpm.

2.4.2.2.2. Obtenção dos extratos

Após a incubação, as culturas foram centrifugadas para a retirada da massa celular. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila (1:1), repetindo-se o processo duas vezes. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro para a retirada da água remanescente. A fase orgânica foi filtrada em algodão e o solvente evaporado à secura por meio de rotaevaporador. Os resíduos foram diluídos em meio PDB (Potato Dextrose Broth)(Difco) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

2.4.2.2.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição

As estirpes de *Escovopsis* sp. foram inoculadas em PDA, as demais estirpes foram inoculadas em MA 2% e as placas incubadas por 7 dias a 25 °C. Estas placas foram fontes dos conídios para a preparação do inóculo. Os conídios foram suspensos em solução salina (NaCl 0,85%) e padronizados, utilizando câmara de Neubauer, em 2×10^6 conídios.mL⁻¹. Esta suspensão serviu de inóculo nos ensaios de determinação da CIM.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme a técnica da microdiluição em microplaca com 96 poços. Foi utilizado o meio de cultura PDB.

Para os ensaios, os resíduos provenientes da extração foram diluídos a uma concentração de 4 mg.mL⁻¹. A solução foi preparada em PDB contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Com exceção da coluna 12, cada coluna recebeu um extrato diferente. Os poços da linha A (controle da amostra) foram utilizados para a verificação da esterilidade da solução inicial dos extratos. Aos poços foram adicionados 100 µL de meio de cultura e 50 µL da solução inicial dos extratos.

Para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos, aos poços das linhas B a H foram adicionados 100 μ L de PDB. A seguir, aos poços da linha B foram adicionados 100 μ L da solução-inicial dos extratos. Após a homogeneização, 100 μ L da mistura contida no poço B foram transferidos para o orifício da linha C e assim sucessivamente até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 μ L finais (retirados da linha H) foram desprezados. Em seguida, foram adicionados 100 μ L da suspensão do inóculo padronizado.

Nas linhas A a D da coluna 12, foram adicionados apenas meio de cultura, a fim de verificar a esterilidade do meio (controle do meio). Nas linhas E à H da mesma coluna, foram adicionados 100 μ L de meio de cultura e 100 μ L do inóculo padronizado, para a verificação do crescimento do inóculo (controle do inóculo). As placas foram incubadas por 72 h a 25 °C e os resultados analisados. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o desenvolvimento dos conídios.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 ninhos amostrados para isolamento das actinobactérias foram isoladas 38 estirpes (Tabela 2). Cada estirpe recebeu um código do tipo SES080402-05A , onde:

SES – Iniciais do nome do coletor

080402-05 – Data da coleta seguida do número do ninho coletado

A – Operária da qual a actinobactéria foi isolada

Admite-se que a actinobactéria que forma um crescimento sobre a cutícula de operárias da tribo Attini, seja do gênero *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 2003; CAFARO; CURRIE, 2005; POULSEN et al., 2005). Para isolar actinobactérias deste gênero foi utilizado o meio quitina-ágar, o mesmo utilizado nos trabalhos em que foi relatado o isolamento de *Pseudonocardia*. Este meio favorece o isolamento de *Pseudonocardia* spp. (MUELLER et al., 2008).

Dos oito ninhos amostrados utilizando o meio ágar-quitina foram isoladas 12 estirpes, 11 delas morfologicamente identificadas como do gênero *Pseudonocardia* e apenas uma estirpe não-*Pseudonocardia* (SES080420-07B) (Tabela 2, as estirpes identificadas morfologicamente como *Pseudonocardia* spp. estão apresentadas em negrito). As primeiras visualizações de crescimento ocorreram após duas semanas de incubação e o crescimento de outros micro-organismos foi bastante raro, sugerindo que este meio favorece o crescimento de actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*. De quatro ninhos obtivemos apenas uma actinobactéria cada e dos 4 ninhos restantes foram isoladas duas actinobactérias por ninho, sempre de operárias diferentes. Com exceção do ninho SES080420-07, de onde foram isoladas uma *Pseudonocardia* e uma não-*Pseudonocardia*, as duas estirpes isoladas dos demais ninhos apresentam o mesmo morfotipo, corroborando com a hipótese de que apenas uma variedade de *Pseudonocardia* é mantida no ninho (POULSEN et al., 2005). Porém, utilizando métodos independentes de cultivo, Sen et al., 2009 encontraram várias *Pseudonocardia* sp. no mesmo ninho.

Tabela 2: Actinobactérias isoladas da cutícula de formigas Attini

Código do ninho	Isolado	Formiga
SES080402-05	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080402-05	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080419-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080419-04	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080419-04	D	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080419-03	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080419-03	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080420-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080420-05	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080420-06	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080420-07	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080420-07	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
CTL080820-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. 1 (grupo Iheringi)
CTL080820-02	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. 1 (grupo Iheringi)
ARTD080903-01	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-02	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-02	C1	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-02	C2	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-02	C3	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-03	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-03	D	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-04	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
ARTD080903-04	C	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)
SES080909-08	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080911-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080911-04	A1	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080911-06	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080921-03	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080921-03	B	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080922-03	C1	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080922-03	D	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080924-01	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080924-01	A1	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080924-01	A2	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080924-01	B	<i>Trachymyrmex</i> sp.
SES080924-02	B	<i>Trachymyrmex</i> sp.

Estão em negrito as estirpes identificadas morfologicamente como sendo do gênero *Pseudonocardia*

Os isolados que apresentavam colônias em forma de “botão” e bem aderidas ao ágar (Figura 2) foram submetidas à observação do micélio para analisar as estruturas morfológicas específicas do gênero. O gênero é caracterizado por apresentar: (i) hifas segmentadas, muitas vezes em forma de zig-zag; (ii) hifa com formação de inchaço apical ou intercalar; (iii) alongamento das hifas por brotamento; (iv) cadeias de esporos ramificadas (KRIEG.; HOLTZ, 1984). Todos os 12 isolados que foram presuntivamente identificados como *Pseudonocardia* spp. apresentaram a morfologia de acordo com o gênero (Figura 3).

Além disso, seqüenciamentos preliminares da região 16S do rDNA confirmaram que as estirpes pertencem ao gênero *Pseudonocardia* (dados não apresentados).

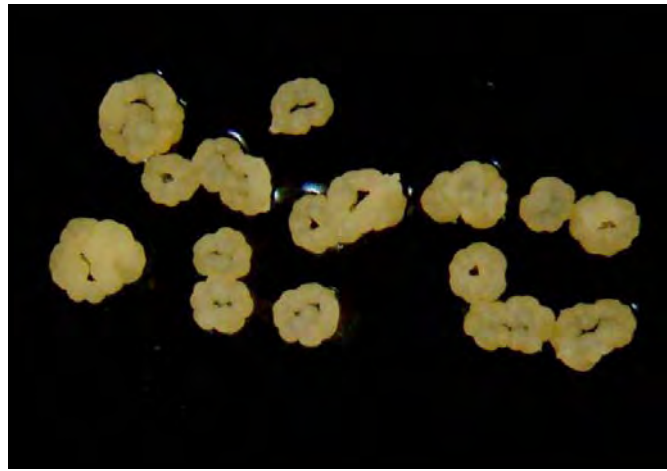


Figura 2: Colônias de *Pseudonocardia* sp.

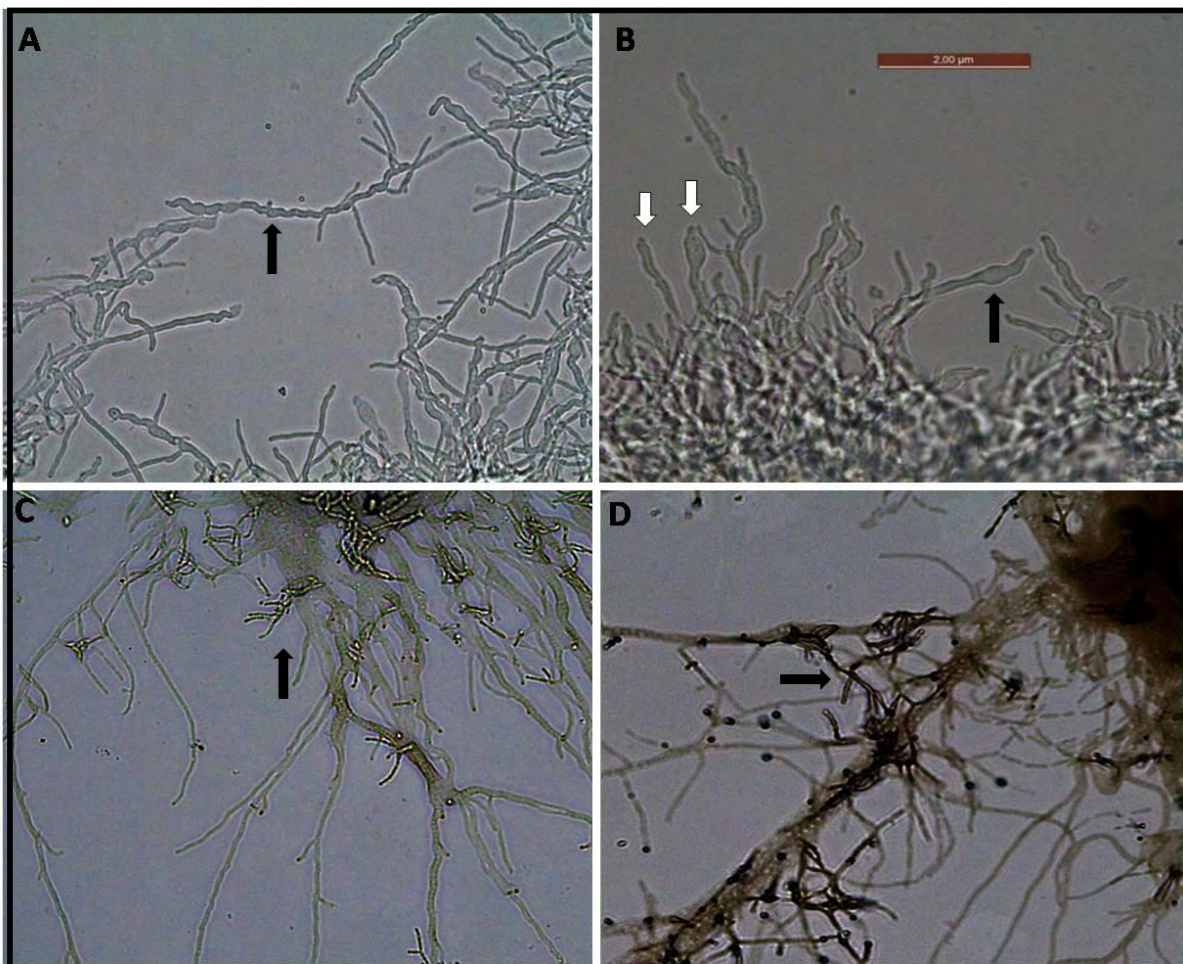


Figura 3: Morfologia do micélio de estirpes de *Pseudonocardia* spp.

A- Hifas segmentadas, algumas vezes em forma de zig-zag; B - Hifa com formação de inchaço intercalar (seta preta) e alongamento das hifas por brotamento (seta branca); C e D- cadeias de esporos ramificadas.

Vários autores têm relatado o isolamento de actinobactérias não pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* a partir de formigas Attini (HAEDER et al., 2009; KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2008; ZUCCHI; GUIDOLIN; CÔNSOLI, 2010). Para isolarmos estas bactérias, utilizamos o meio ágar SCN que favorece o crescimento de actinobactérias de crescimento rápido. Dos 12 ninhos amostrados foram isoladas um total de 27 estirpes, sendo 26 não-*Pseudonocardia* e uma estirpe identificada morfológicamente como *Pseudonocardia* sp.

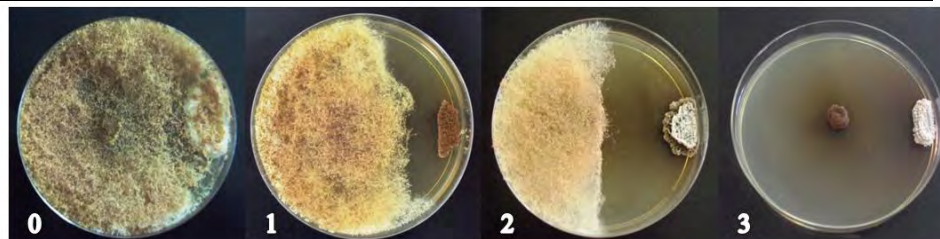
Dentre os 12 ninhos, em 8 foram isoladas mais de uma estirpe. Com exceção do ninho CTL080820-02 e dos isolados ARTD080903-03A E D, em que as duas estirpes isoladas de diferentes operárias possuem o mesmo morfotipo, dos demais ninhos foram isolados estirpes com diferentes morfotipos, até mesmo estirpes diferentes isoladas de uma mesma operária (ninho SES080911-04). Isto mostra a diversidade de actinobactérias presentes na cutícula destas formigas. Quando se utilizam meios de isolamento diferentes do meio quitina-ágar, comumente utilizado no isolamento das bactérias simbiotes, uma grande diversidade de outras actinobactérias é encontrado, corroborando com o trabalho de Zucchi e colaboradores (2010).

Os efeitos inibitórios das actinobactérias sobre as 3 estirpes do parasita *Escovopsis* sp. foram categorizados em 4 níveis e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Das actinobactérias isoladas, 35 (92,1%) apresentaram algum nível de inibição (níveis de 1 – 3) sobre as 3 estirpes de *Escovopsis*. A estirpe *Escovopsis* sp. TD065 foi inibida por todas as actinobactérias. O isolado ARTD080903-04A não inibiu o crescimento de *Escovopsis* sp. SES001 e de *Escovopsis* sp. SES005 e as estirpes CTL080820-02A e CTL080820-02A não inibiram o crescimento de *Escovopsis* sp. SES001. As três estirpes que não apresentaram atividade pertencem ao grupo não-*Pseudonocardia*.

A inibição apresentada pelas estirpes pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* foram categorizadas nos níveis 1 e 2, sendo que a inibição moderada foi a mais prevalente. As actinobactérias pertencentes ao grupo não-*Pseudonocardia* apresentaram níveis de inibição de 0 a 3, sendo mais prevalente a inibição total. Das 26 estirpes de actinobactérias não-*Pseudonocardia*, 23, 24 e 22 inibiram totalmente os parasitas *Escovopsis* sp. SES001, *Escovopsis* sp. SES005 e *Escovopsis* sp. TD065, respectivamente (Figura 4).

Tabela 3: Atividade inibitória de actinobactérias isoladas da cutícula de *Trachymyrmex* spp. sobre *Escovopsis* sp.

Código do isolado	<i>Escovopsis</i> sp. SES 001	<i>Escovopsis</i> sp. SES 005	<i>Escovopsis</i> sp. TD065
SES080402-05A	1	1	1
SES080402-05B	1	1	1
SES080419-02A	1	1	1
SES080419-04D	1	1	1
SES080419-04B	1	1	1
SES080419-03A	1	1	1
SES080419-03B	1	1	1
SES080420-04A	2	1	1
SES080420-05A	1	2	2
SES080420-06A	2	2	2
SES080420-07A	1	1	2
SES080420-07B	3	3	3
CTL080820-02A	0	3	1
CTL080820-02B	0	3	1
ARTD080903-01B	3	3	3
ARTD080903-02A	3	3	3
ARTD080903-02B	3	3	3
ARTD080903-02C1	3	3	3
ARTD080903-02C2	3	3	3
ARTD080903-02C3	3	3	3
ARTD080903-03A	3	3	3
ARTD080903-03D	3	3	3
ARTD080903-04A	0	0	1
ARTD080903-04B	3	3	3
ARTD080903-04C	1	1	1
SES080909-08A	3	3	3
SES080911-04A	3	3	3
SES080911-04A1	3	3	3
SES080911-06A	3	3	3
SES080921-03A	3	3	3
SES080921-03B	3	2	2
SES080922-03C1	3	3	3
SES080922-03D	3	3	3
SES080924-01 A	3	3	3
SES080924-01A1	3	3	3
SES080924-01A2	3	3	3
SES080924-01B	3	3	3
SES080924-02B	3	3	3



1 = sem efeito inibitório (crescimento do *Escovopsis* sobre a actinobactéria); 1 = efeito inibitório moderado (inibição < 2,0 cm); 2 = forte efeito inibitório (inibição > 2,0 cm); 3 = inibição total (sem crescimento do fungo).

* Estão em negrito as estirpes identificadas morfológicamente como sendo do gênero *Pseudonocardia*

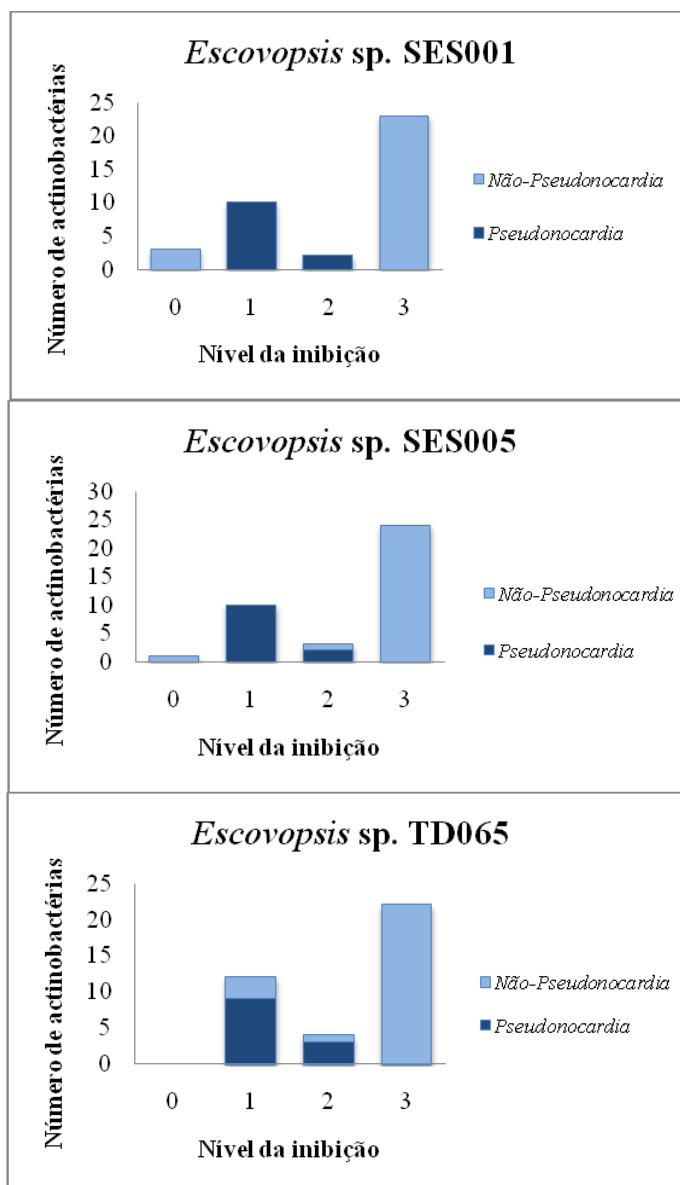


Figura 4: Níveis de inibição de actinobactérias sobre *Escovopsis* sp. SES001, *Escovopsis* sp. SES005 e *Escovopsis* sp. TD065

A análise desses dados indica que tanto as actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* como as não-*Pseudonocardia* podem inibir diferentes estirpes de *Escovopsis*. Também ficou evidente que o nível de inibição produzido pelas estirpes não-*Pseudonocardia* foi superior aos de *Pseudonocardia*.

O isolamento de uma grande diversidade de actinobactérias da cutícula de operárias e a uniformidade da atividade sobre o parasita *Escovopsis* sp. corroboram a hipótese de que a comunidade de micro-organismos presentes no exoesqueleto de formigas Attini sofre uma freqüente mudança, sendo um sistema aberto ou semi-aberto que permite o recrutamento de

novas estirpes a partir de populações de vida livre, como ocorre em outras simbioses, como bactérias intestinais em mamíferos, algas e corais, rizóbia, etc. (KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2008).

O experimento para a avaliação da atividade antagonista das actinobactérias sobre os fungos filamentosos isolados do jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi) está exemplificado na Figura 5. Das 38 actinobactérias isoladas, apenas 9 (23,68%) apresentaram inibição do crescimento de pelo menos um dos fungos filamentosos isolados do jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi) (*Fusarium solani*, *Mucor* sp. e *Trichoderma spirale*) e os resultados estão apresentados na Tabela 4. As actinobactérias que apresentaram algum nível de inibição pertencem ao grupo não-*Pseudonocardia*. As demais actinobactérias não inibiram o crescimento de nenhum dos fungos.

Fusarium solani teve seu crescimento inibido por apenas 3 bactérias (ARTD080903-02C2; SES080921-03A; SES080924-02B) com nível de inibição variando entre 64,3 e 14,7%; *Mucor* sp. foi o mais sensível às actinobactérias, inibido por 8 isolados (SES080420-07B; ARTD080903-01B; ARTD080903-02A; ARTD080903-02C2; ARTD080903-03A; ARTD080903-03D; SES080911-04A; SES 081007-01B), com porcentagem de inibição variando entre 47,3 e 67,7; *Trichoderma spirale* foi inibido por 6 actinobactérias (ARTD080903-02A; ARTD080903-02C2; ARTD080903-03A; ARTD080903-03D; SES080911-04A; SES080924-02B), com níveis de inibição entre 20 e 84,7%. Apenas dois isolados, ARTD080903-02C2 e SES080924-02B inibiram o crescimento dos três fungos.

Uma das hipóteses que sustentam a teoria de que a *Pseudonocardia* seria um terceiro simbionte das formigas Attini é que essas bactérias produzem compostos com atividade antimicrobiana ativos apenas contra *Escovopsis*, não inibindo outros fungos filamentosos (CURRIE et al., 1999), o quê, de certo modo (pela metodologia aplicada) foi confirmada por esta etapa do presente trabalho. Esta ressalva se deve à observação de uma aparente inibição das estirpes de *Pseudonocardia* sobre o crescimento (menor densidade micelial) dos fungos testados, embora tal inibição não pudesse ser quantitativamente estimada (Figura 6).

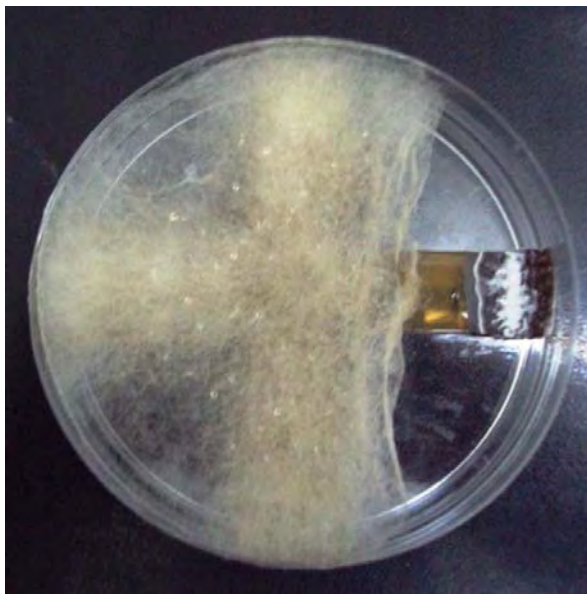


Figura 5: Atividade antagonista de ARTD080903-03A sobre *Mucor* sp.

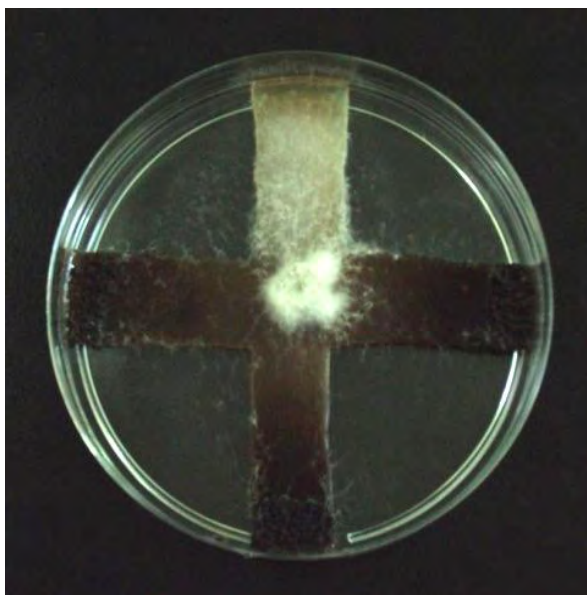


Figura 6: Aparente diminuição da densidade micelial de *Trichoderma spirale* na presença de estirpes de *Pseudonocardia* spp.

Tabela 4: Atividade inibitória de actinobactérias sobre fungos filamentosos isolados de jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi)

Código do isolado	Porcentagem de inibição		
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Mucor</i> sp.	<i>Trichoderma spirale</i>
SES080420-07B	-	59 ± 12,5	-
ARTD080903-01B	-	60 ± 9,5	-
ARTD080903-02A	-	47,3 ± 11,1	71,7 ± 5,1
ARTD080903-02C2	64,3 ± 9,7	63,3 ± 4,5	51,3 ± 9,7
ARTD080903-03A	-	54,3 ± 9,3	43 ± 0
ARTD080903-03D	-	62,3 ± 8,4	84,7 ± 4,5
SES080911-04A	-	67,7 ± 4,5	67,7 ± 6,7
SES080921-03A	64,3 ± 8,1	-	-
SES080924-02B	14,7 ± 4,5	52,3 ± 9,5	20 ± 5

Para se melhor avaliar a potencialidade da atividade antimicrobiana das actinobactérias sobre o parasita *Escovopsis* sp. e sobre os microfungos isolados do jardim de fungo e também para avaliar a aparente inibição produzida por estirpes de *Pseudonocardia* sp. sobre estes microfungos (Figura 6), utilizamos um estudo quantitativo mais refinado, que possibilita a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos das actinobactérias sobre os fungos avaliados.

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição estão apresentados na Tabela 5. Como na metodologia anterior, todos os isolados apresentaram atividade sobre as 3 estirpes de *Escovopsis* sp. O maior valor de CIM dos extratos das actinobactérias apresentado foi de 500 µg.mL⁻¹ e o menor de 7,812 µg.mL⁻¹. Actinobactérias do grupo não-*Pseudonocardia*, em geral, apresentaram menores valores de CIM, corroborando com os resultados apresentados na Figura 4 de que actinobactérias não-*Pseudonocardia* exercem maior efeito inibitório sobre as estirpes de *Escovopsis* sp.

Tabela 5: CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos de actinobactérias sobre *Escovopsis* sp.

	<i>Escovopsis</i> sp. TD065	<i>Escovopsis</i> sp. SES001	<i>Escovopsis</i> sp. SES005	<i>Fusarium solani</i> TD064	<i>Mucor</i> sp. TD061	<i>Trichoderma spirale</i> TD063
SES080402-05A	31,25	31,25	31,25	250	500	500
SES080402-05B	15,625	15,625	31,25	250	250	500
SES080419-02A	500	500	500	*	*	*
SES080419-04D	250	500	250	*	*	*
SES080419-04B	250	500	250	*	*	*
SES080419-03A	500	250	62,25	*	*	*
SES080419-03B	500	250	250	*	*	*
SES080420-04A	500	500	500	*	*	*
SES080420-05A	250	125	250	*	*	*
SES080420-06A	250	250	250	*	*	*
SES080420-07A	125	125	250	*	*	*
ARTD080903-04C	125	125	250	*	*	*
SES080420-07B	62,5	62,25	62,5	*	*	*
ARTD080903-01B	500	500	500	*	*	*
ARTD080903-02A	250	250	125	*	*	*
ARTD080903-02C2	62,5	500	31,25	*	*	*
ARTD080903-03A	7,812	31,25	7,812	*	*	*
ARTD080903-03D	15,625	500	15,625	*	*	*
SES080911-04A	125	250	62,5	*	*	*
SES080921-03A	62,5	31,25	31,25	*	*	*
SES080924-02B	125	125	62,5	*	*	*

* CIM > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Estão em negrito as estirpes identificadas morfológicamente como *Pseudonocardia* spp.

A quantificação da atividade antifúngica da *Pseudonocardia* sp. sobre *Escovopsis* sp. só foi efetuada no trabalho em que houve o isolamento da molécula bioativa dentegerumicina, que apresentou CIM de 2.8 mM. Os demais trabalhos sobre a associação actinobactéria-Attini apenas avaliam a inibição por métodos qualitativos. No presente trabalho, os resultados obtidos pela técnica da microdiluição permitiu melhor avaliar a potencialidade destas actinobactérias no controle do parasita *Escovopsis* sp. Por se tratarem de extratos e não de antifúngicos puros, os resultados de CIM apresentados pelos extratos de estirpes *Pseudonocardia* spp., entre 15,625 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ podem ser considerados de forte atividade (ALIGIANNIS et al., 2001; DUARTE et al., 2005).

Quanto à inibição dos microfungos isolados do jardim de fungo, os resultados foram contrários aos resultados apresentados pela metodologia anterior. Nenhum dos extratos das actinobactérias não-*Pseudonocardia* apresentou atividade sobre nenhum dos microfungos. Esta ausência de atividade pode ser devido a inúmeras razões. (i) as actinobactérias foram cultivadas em diferentes condições nos dois experimentos, meio sólido e meio líquido, por exemplo, e estas diferenças podem ter acarretado em uma não-produção dos compostos que anteriormente estariam exercendo atividade antimicrobiana; (ii) os compostos podem ter sido

produzidos mas não extraídos do meio de cultivo pela técnica de extração empregada; (iii) a atividade observada nas placas do primeiro experimento podem ser resultante de uma competição por nutrientes e não por uma inibição decorrente da produção de compostos com atividade antifúngica.

Dois extratos de isolados do gênero *Pseudonocardia* (SES080402-05A e B) além da atividade sobre as estirpes de *Escovopsis* sp., também inibiram os microfungos associados ao jardim de fungo. Estes isolados são aqueles que exerceram uma aparente inibição sobre o crescimento dos microfungos (Figura 6), mas que, pela metodologia aplicada anteriormente, não pôde ser quantificada. Estes resultados corroboram com os resultados apresentado no trabalho de Sen e colaboradores, mostrando que *Pseudonocardia* spp. não inibem especificamente o parasita *Escovopsis* spp. e podem inibir outros microfungos e também o fungo mutualista.

Diversos autores têm relado a presença de actinobactérias não pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* associadas a formigas Attini (KOST et al.,2007; MUELLER et al., 2008; HAEDER et al., 2009; ZUCCHI, et al., 2010). Estas actinobactérias podem não fazer parte da simbiose e sim serem apenas transitórias ou frutos de contaminação. Porém, nossos resultados mostram que actinobactérias não-*Pseudonocardia* isoladas do exoesqueleto de operárias apresentaram forte atividade sobre o crescimento de *Escovopsis*, maior atividade se comparada com as estirpes de *Pseudonocardia* spp. e também inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium solani*, *Mucor* sp. e *Trichoderma spirale*, sugerindo que estas bactérias, além de controlarem o crescimento do *Escovopsis* também podem atuar na defesa do ninho contra outros microfungos. Aparentemente, muitas actinobactérias contribuem para a não-contaminação dos ninhos de Attini produzindo compostos antimicrobianos.

As estirpes isoladas deverão ser identificadas a nível de espécie para que a diversidade de actinobactérias, *Pseudonocardia* e não-*Pseudonocardia*, presentes na cutícula de operárias de *Trachymyrmex* spp. seja avaliada. Este trabalho mostrou que actinobactérias não-*Pseudonocardia* também podem contribuir na defesa do ninho. A presença e o possível papel destas actinobactérias devem ser melhor estudados, incluindo também outras espécies de Attini, a fim de avaliar se estas bactérias podem também agir na defesa do ninho contra o fungo *Escovopsis* spp. e eventualmente também contra outros micro-organismos.

2.6. CONCLUSÃO

- O isolamento seletivo foi realizado com sucesso, visto que, foram isoladas 11 estirpes do gênero *Pseudonocardia* a partir dos ninhos amostrados;
- Além de actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, uma diversidade de outras actinobactérias está associada à cutícula de operárias do gênero *Trachymyrmex*;
- A cutícula das operárias pode conter diferentes estirpes de actinobactérias com ação inibitória sobre *Escovopsis* sp.;
- Com exceção dos isolados CTL080820-02A e ARTD080903-04A, os demais inibiram o crescimento das três estirpes do parasita *Escovopsis* sp., indicando que a produção de compostos com atividade antimicrobiana que controle o crescimento deste parasita deve ser determinante no recrutamento de actinobactérias pelas formigas Attini;
- *Pseudonocardia* spp. associadas a formigas Attini produzem compostos com forte atividade antifúngica sobre o parasita *Escovopsis* sp.
- Actinobactérias não-*Pseudonocardia* apresentam maior potencialidade no controle de *Escovopsis* sp. do que a bactéria simbiote *Pseudonocardia*.

3.
CAPÍTULO 2

**ACTINOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE
COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
E ANTI-*Candida* EM FORMIGAS ATTINI**

3.1. RESUMO

Após décadas de intensiva busca de novos compostos antibióticos a partir de actinobactérias, tem aumentado a dificuldade de isolamento de metabólitos bioativos inéditos ou raros em micro-organismos do solo. Uma das estratégias apontadas para se buscar compostos ainda desconhecidos é isolar micro-organismos a partir de nichos pouco explorados. Uma dessas opções são as actinobactérias associadas a outros organismos, como é o caso da interação entre actinobactérias e formigas Attini. Esta associação ainda não foi estudada com enfoque de prospecção de actinobactérias com potencial para o isolamento de compostos com atividade antimicrobiana e este foi o objetivo do presente capítulo. Foram avaliadas, quanto à produção de compostos com atividade antimicrobiana, 44 actinobactérias isoladas da cutícula de operárias dos gêneros *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*. Dentre as que apresentaram melhores resultados a estirpe ARTD080903-03A foi selecionada para estudos de identificação com composto ativo. A estirpe teve a região 16S do rDNA seqüenciada e foi identificada como uma possível espécie ainda não descrita do gênero *Streptomyces*. Do extrato do meio de cultivo desta estirpe, foi isolada a antimicina rara Urauchimicina A. O extrato apresenta também inúmeros compostos desta mesma classe, mas que, devido à baixa massa recuperada, não foi possível identificá-los. Urauchimicina não apresentou atividade antibacteriana e apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans* (CIM = 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. dubliniensis* (CIM = 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *C. glabrata* (CIM = 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *C. krusei* (CIM = 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo que para as duas últimas apresentou atividade fungicida com CFM igual a 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Podemos concluir que actinobactérias associadas a formigas Attini, por serem pouco exploradas, podem ser fontes de compostos bioativos raros e até mesmo inéditos.

Palavras chave: Actinobactérias; atividade antimicrobiana, antimicinas, Urauchimicina A, formigas Attini.

3.2. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas são um grande problema de saúde pública, situação agravada pela inevitável seleção de agentes infecciosos resistentes aos antibióticos (LARSON, 2007), sendo imprescindível e urgente a busca por novos agentes antimicrobianos. Atualmente, duas linhas de pesquisa paralelas na busca de novos agentes antimicrobianos são seguidas: o isolamento de produtos naturais com atividade antimicrobiana e a produção de antimicrobianos sintéticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006).

Produtos naturais são a maior fonte para o descobrimento de novas e potenciais moléculas bioativas. Metabólitos secundários de micro-organismos são importantes fontes de compostos com potencial terapêutico (WU et al., 2007). Dentre os micro-organismos produtores de moléculas bioativas, as actinobactérias merecem destaque, principalmente como produtoras de antibióticos. Numerosos antibióticos foram obtidos a partir destes micro-organismos, principalmente de bactérias do gênero *Streptomyces*, as quais são a fonte de dois terços dos antibióticos disponíveis comercialmente (MIYADOH, 1993) e aproximadamente 60% dos antibióticos utilizados na agricultura foram originalmente isolados de espécies de *Streptomyces* (TANAKA; OMURA, 1993).

Após décadas de intensiva busca de novos compostos antibióticos a partir de linhagens de *Streptomyces*, tem aumentado a dificuldade de isolamento, a partir de solo, de novos micro-organismos e metabólitos bioativos inéditos. Entretanto, estas buscas devem continuar, segundo Watve et al. (2001), apenas 3% dos antibióticos provenientes do gênero *Streptomyces* foram isolados.

Uma das estratégias apontadas para se buscar compostos ainda desconhecidos é isolar micro-organismos a partir de nichos pouco explorados, como fontes hidrotermais ou regiões com *hotspots* de diversidade, como as florestas tropicais, por exemplo. Outra opção de nichos pouco explorados são as actinobactérias associadas a outros organismos. Esta fonte tem sido apontada como alternativa para o isolamento de moléculas bioativas inéditas.

A associação mais explorada é a interação planta-micro-organismo e diversas moléculas inéditas têm sido isoladas de actinobactérias endofíticas (BIEBER et al., 1998; CASTILLO et al., 2002; EZRA et al., 2004). Outra associação bastante explorada é a interação entre esponjas e actinobactérias. As esponjas têm sido apontadas com grande entusiasmo para o isolamento de actinobactérias produtoras de compostos bioativos e moléculas inéditas com atividade antimicrobiana têm sido isoladas (CHOI et al., 2009; IMAMURA et al., 1993).

Alguns estudos têm mostrado a associação entre actinobactérias e insetos, porém estas associações têm sido estudadas apenas do ponto de vista ecológico. O caso mais estudado de associação entre insetos e actinobactérias é a simbiose entre *Pseudonocardia* spp. e formigas cultivadoras de fungo (Tribo Attini). No jardim de fungo destas formigas, frequentemente se encontra associado o fungo *Escovopsis* spp., um parasita específico das Attini. *Pseudonocardia* spp. inibem o crescimento do parasita específico. Bactérias associadas a formigas podem ser fontes de moléculas bioativas que apresentem outras atividades, além da inibição do fungo parasita *Escovopsis* spp. Esta associação ainda não foi estudada com o enfoque de prospecção de actinobactérias produtoras de compostos com atividade sobre patógenos humanos este foi o objetivo do presente capítulo.

3.3. OBJETIVOS

3.3.1. Objetivo geral

Avaliar a produção de compostos com atividade antimicrobiana por actinobactérias isolados da cutícula de formigas dos gêneros *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*.

3.3.2. Objetivos específicos

- 1- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos das actinobactérias isoladas de formigas Attini contra onze espécies de bactérias e seis estirpes de *Candida* spp.
- 2- Selecionar o extrato de melhor atividade para estudos posteriores
- 3- Realizar fracionamentos visando a purificação do composto ativo
- 4- Elucidar a estrutura da molécula biativa

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Actinobactérias

As actinobactérias utilizadas neste trabalho (n=44) foram isoladas da cutícula de operárias de *Trachymyrmex* spp. (Capítulo 1) e de operárias de *Acromyrmex* spp. sob as mesmas condições de isolamento apresentadas no Capítulo 1 deste trabalho. As estirpes isoladas estão mantidas em tubos (slant) contendo YMA sob refrigeração a 4°C e em criotubos (glicerol 10%) em ultrafreezer a -80°C. O código de cada estirpe é formado pelo código do ninho e pelo código da operária da qual foi obtido o isolado, por exemplo, SES080402-05A (Tabela 1).

3.4.2. Cultivo para a avaliação da produção de compostos com atividade antimicrobiana

3.4.2.1. Pré-inóculo

Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo YMA e incubados por 7 dias a 28 °C. Destas placas foram retirados 5 blocos de 10 mm de diâmetro e transferidos para frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MPE modificado (5g de farinha de soja, 20g de glicose, 5 g de NaCl, 4 g de CaCO₃, 1000 mL de água destilada) (BOMFIM, 2008) e incubados a 28 °C por 48 horas sob agitação de 150 rpm.

3.4.2.2. Cultivo para a produção de compostos com atividade antimicrobiana

Para verificar a produção de compostos com atividade antimicrobiana foram retirados 10 mL do pré-inóculo e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MPE modificado, incubando-se a 28 °C por 120 horas sob agitação de 150 rpm.

Tabela 1: Origem das Actinobactérias

Código do ninho	Isolado	Formiga	Local da coleta	GPS
SES080402-05	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080402-05	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-04	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-04	D	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-03	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080419-03	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-05	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-06	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-07	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080420-07	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
CTL080820-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. 1 (grupo Iheringi)	Estação Ecológica do Panga - MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
CTL080820-02	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. 1 (grupo Iheringi)	Estação Ecológica do Panga - MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
ARTD080903-01	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	C1	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	C2	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-02	C3	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-03	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-03	D	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-04	B	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
ARTD080903-04	C	<i>Trachymyrmex</i> sp. (grupo Iheringi)	UNESP - Rio Claro - SP	S 10° 23.766' O 48° 21.700'
SES080909-08	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 50.146' O 57° 01.016'
SES080911-04	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 57.612' O 56° 99.019'
SES080911-04	A1	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 57.612' O 56° 99.019'
SES080911-06	A	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Fazenda São Bento, MS	S 19° 49.474' O 56° 01.079'
SES080911-08	A	<i>Acromyrmex</i> cf. <i>balzani</i>	Base de Estudos do Pantanal, MS	S 19°34.616' O 57°0.700'
SES080911-09	A	<i>Acromyrmex</i> cf. <i>balzani</i>	Base de Estudos do Pantanal, MS	S 19°34.616' O 57°0.700'

Código do ninho	Isolado	Formiga	Local da coleta	GPS
SES080911-10	A	<i>Acromyrmex cf. balzani</i>	Base de Estudos do Pantanal, MS	S 19°34.616' O 57°0.700'
SES080911-10	B	<i>Acromyrmex cf. balzani</i>	Base de Estudos do Pantanal, MS	S 19°34.616' O 57°0.700'
SES080912-02	A	<i>Acromyrmex sp.</i>	Fazenda São Bento, MS	S 19° 53.404' O 56° 11.659'
SES080912-02	B	<i>Acromyrmex sp.</i>	Fazenda São Bento, MS	S 19° 53.404' O 56° 11.659'
SES080921-03	A	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080921-03	B	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080922-03	C1	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080922-03	D	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080924-01	A	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080924-01	A1	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080924-01	A2	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080924-01	B	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'
SES080924-02	B	<i>Trachymyrmex sp.</i>	Estação Ecológica do Panga, MG	S 19°17.291' O 48°39.670'

Os isolados em negrito foram caracterizados como *Pseudonocardia* spp.

3.4.3. Obtenção dos extratos

A obtenção dos extratos e os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas (CPQBA) – UNICAMP sob a orientação da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Após o crescimento, o meio foi centrifugado para a retirada da massa celular. O sobrenadante foi submetido à extração líquido-líquido, utilizando como solvente imiscível o acetato de etila (1:1), repetindo-se o processo duas vezes. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro para a retirada da água remanescente. A fase orgânica foi filtrada em algodão e o solvente evaporado à secura por meio de rotaevaporador. Os resíduos foram diluídos em meio de cultura contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

3.4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da sensibilidade aos extratos microbianos foi realizada de acordo com a norma M7-A6 (para bactérias) (CLSI, 2005) e M27-A2 (para leveduras) (CLSI, 2002).

3.4.4.1. Micro-organismos padrões

A atividade antimicrobiana foi avaliada frente aos seguintes micro-organismos:

Bacillus subtilis ATCC 6051

Enterococcus faecium CCT 5079

Enterococcus hirae ATCC 10541

Escherichia coli ATCC 11775

Pseudomonas aeruginosa ATCC 13388

Rhodococcus equi ATCC 6939

Salmonella choleraesuis ATCC 10708

Salmonella tiphymurium ATCC14028

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

Streptococcus pneumoniae ATCC 11733

Candida albicans CBS 562

Candida dubliniensis CBS 7987

Candida glabrata CBS 138

Candida krusei CBS 573

Candida parapsilosis CBS 604

Candida tropicalis CBS 94

3.4.4.2. Preparo do inóculo

Duas a três colônias do micro-organismo com desenvolvimento de 24 horas, em tubo de ágar Nutriente para bactérias e em tubo de ágar Sabouraud dextrose para leveduras, foram suspensas em solução salina (NaCl 0,9%). Os inóculos foram padronizados por espectrofotometria, com leituras em 625 nm para bactérias e 530 nm para leveduras, ajustando a densidade óptica entre 0,08 e 0,1, pois desta forma a suspensão de bactérias contém aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro e a suspensão de leveduras contém aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹. As suspensões padronizadas foram diluídas a fim de obter densidade celular de 10^5 UFC.mL⁻¹ para bactérias e 10^4 UFC.mL⁻¹ para leveduras. Estas suspensões serviram de inóculo para os ensaios de atividade antimicrobiana.

3.4.4.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da microdiluição (CLSI, 2002; 2005)

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme a técnica da microdiluição em microplaca com 96 poços. Foi utilizado o caldo Mueller-Hinton para os ensaios com bactérias e o meio RPMI-1640 para os ensaios com leveduras.

Para os ensaios, os resíduos provenientes da extração foram diluídos a uma concentração de 4 mg.mL^{-1} . A solução foi preparada em meio de cultura (caldo Mueller-Hinton e RPMI-1640) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

O ensaio foi montado de maneira semelhante à Figura 1. Com exceção da coluna 12, cada coluna recebeu um extrato diferente. Os poços da linha A (controle da amostra) foram utilizados para a verificação da esterilidade da solução-inicial dos extratos. Aos poços foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura e $50 \mu\text{L}$ da solução inicial dos extratos.

Para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos, aos poços das linhas B a H foram adicionados $100 \mu\text{L}$ do meio de cultura. A seguir, aos orifícios da linha B foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da solução-inicial dos extratos. Após a homogeneização, $100 \mu\text{L}$ da mistura contida no poço B foram transferidos para o orifício da linha C e assim sucessivamente até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os $100 \mu\text{L}$ finais (retirados da linha H) foram desprezados. Em seguida, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo padronizado.

Nas linhas A a D da coluna 12, foram adicionados apenas meio de cultura, a fim de verificar a esterilidade do meio (controle do meio). Nas linhas E à H da mesma coluna, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura e $100 \mu\text{L}$ do inóculo padronizado, para a verificação do crescimento do inóculo (controle do inóculo). As placas foram incubadas por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

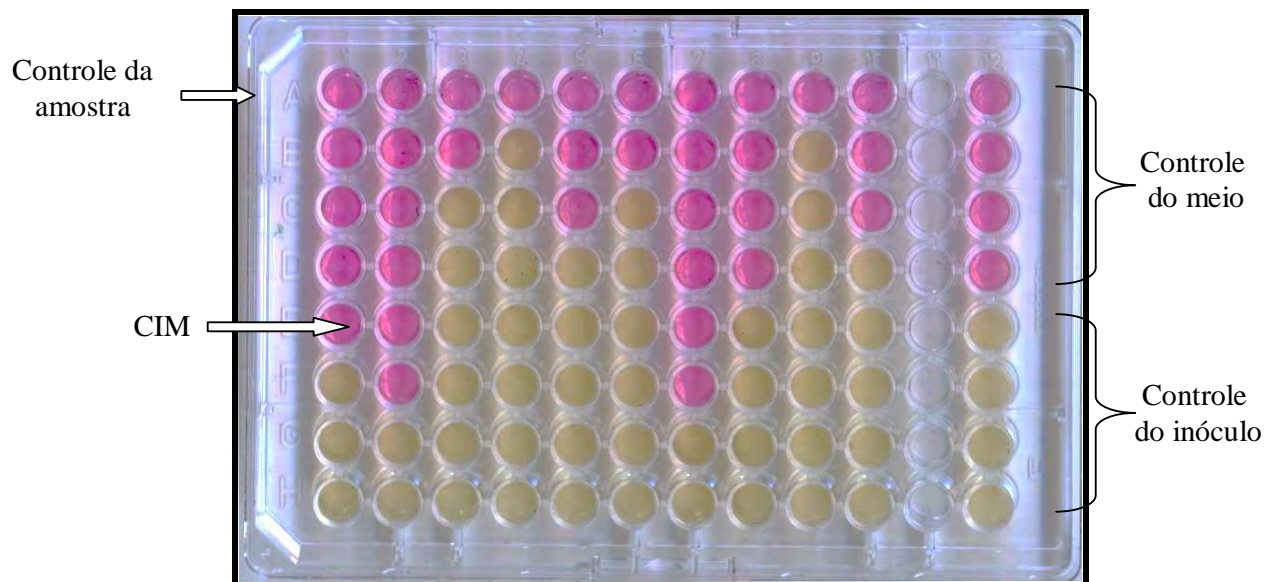


Figura 1: Determinação da concentração inibitória mínima extratos de actinobactérias sobre *Candida* spp. pelo método da microdiluição

3.4.4.4. Leitura dos resultados

Após o período de incubação, nos ensaios contra bactérias, aos poços foram adicionados 25 μL do revelador cloreto de trifetil tetrazolium 0,1% e as placas incubadas por mais 3 horas.

Para os ensaios contra bactérias, com a adição do revelador, os poços onde os micro-organismos se desenvolveram apresentam coloração vermelha. A CIM é definida como a menor concentração do extrato capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Nos ensaios contra *Candida* spp. o meio RPMI contém um indicador, os poços em que houve o desenvolvimento dos micro-organismos apresentam coloração amarela. Em ambos os ensaios, valores $\geq 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram considerados como negativos.

3.4.5. Aumento da escala de cultivo

Após a triagem inicial, foi necessária a ampliação da escala de cultivo, para que fosse obtida uma maior quantidade de extrato, para proceder à identificação do composto bioativo. O isolado ARTD080903-03A foi selecionado para prosseguimento dos estudos e foi cultivado, em maior escala, da mesma maneira que os cultivos da etapa de bioprospecção como explicado no item 3.4.2. O cultivo foi desenvolvido em 50 frascos de Erlenmeyer

contendo 100 mL de meio de cultura. O processo de obtenção dos extratos também foi o mesmo das etapas iniciais, como explicado no item 3.4.3.

3.4.6. Análise cromatográfica do extrato obtido do cultivo em escala aumentada para o isolado ARTD080903-03A

3.4.6.1. Fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel

As etapas de purificação e identificação da molécula biotiva foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) com o auxílio do pós-doutorando Dr. Warley de Souza Borges, sob orientação dos professores Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr. João Batista Fernandes e Dra. Maria de Fátima das Graças Fernandes da Silva.

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro preenchida com sílica gel 60 H, de modo que as dimensões da fase estacionária foram 3 x 16 cm. O extrato com massa de aproximadamente 1,4 g foi incorporada em quantidade suficiente de sílica e a mistura aplicada ao topo da coluna empacotada. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na Figura 2.

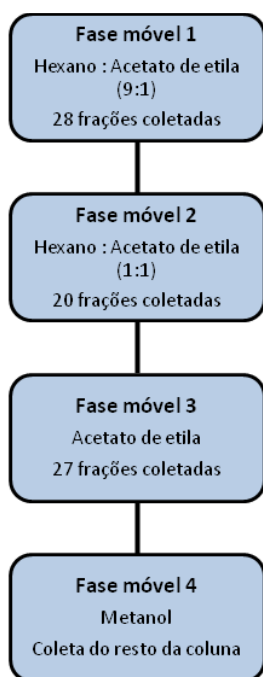


Figura 2: Fracionamento do extrato ARTD080903-03A em coluna de sílica gel 60-H

Foram coletadas frações de aproximadamente 10 mL e estas submetidas à cromatografia comparativa em camada delgada (CCD) (sílica gel 60-H). As bandas foram analisadas previamente por exposição à luz ultravioleta 254 nm e posteriormente reveladas com solução vanila/ácido sulfúrico e agrupadas de acordo com o padrão de bandas.

As frações agrupadas foram submetidas ao ensaio de atividade antimicrobiana, a fim de detectar quais apresentam o(s) composto(s) ativo(s). Nesta etapa, a atividade antimicrobiana foi avaliada frente aos micro-organismos *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

3.4.6.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Foi utilizada uma placa de CCDP de sílica 60-H. Sobre esta foi aplicada toda a massa da fração 5 do extrato de ARTD080903-03A. Para a eluição, foi utilizada a fase móvel Hexano:Acetato (7:3). A placa passou pelo processo de eluição por duas vezes, para possibilitar melhor separação entre as bandas.

3.4.6.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A mancha de interesse isolada no item 3.4.6.2. foi submetida à CLAE para isolamento da molécula bioativa. Para isso utilizou-se o cromatógrafo SHIMADZU® SHIM-PAK, o equipamento é composto por bombas LC-6 AD SHIMADZU®, sistema de controle SCL-10AVP SHIMADZU®, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10AVP SHIMADZU®, coletor de fração FCR-10^a SHIMADZU®, injetor automático SIL-10AF SHIMADZU®, software Class VP.

Foi empregada a coluna cromatográfica analítica Coluna VP250/10 nucleosil C-18 e o sistema foi eluído em acetonitrila:água:ácido acético (50:50:0,01) com vazão de 3 mL/min e detecção UV (225 nm).

3.4.7. Identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A elucidação da estrutura química do composto isolado foi feita por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio utilizando-se o aparelho Bruker DRX 400

MHz, operando a 400 MHz na frequência do ^1H . Os espectros de RMN foram obtidos em clorofórmio deuterado.

3.4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima da molécula isolada

Após o isolamento e elucidação estrutural da substância de interesse, esta foi avaliada quanto à atividade antimicrobiana seguindo a metodologia do item 3.4.4. Além da determinação da CIM, nesta etapa também foi avaliada a concentração fungicida mínima (CFM) em casos de presença de atividade antifúngica. A CFM foi determinada plaqueando-se, em meio Sabouraud dextrose, 10 μL do conteúdo de cada um dos poços em que houve inibição do crescimento das leveduras, a CFM foi definida como a menor concentração da substância capaz de impedir o aparecimento de unidades formadoras de colônia.

3.4.9. Caracterização por métodos moleculares da bactéria ARTD 030908-03A

3.4.9.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído seguindo a metodologia de Sampaio et al. (2001). Para a confirmação da presença de DNA, os produtos da extração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Promega Corporation, USA) em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA). O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave TM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID[®].

3.4.9.2. Amplificação – PCR

A região 16S do rDNA foi amplificada a partir do DNA genômico pela reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se o par de primers universais F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e R1492 (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). As reações de PCR continham 1 μL de DNA diluído (1:10), 2,0 μL de cada um dos primers (10 μM), 2,5 μL de Buffer 10X, 1,0 μL de MgCl_2 (50mM), 4,0 μL de dNTPs (1,25 mM de cada base), 0,2 μL de Taq-polimerase (5 U/ μL) e 12,3 μL de água mili-q estéril, totalizando um volume de 25,0 μL . A PCR foi realizada em termociclador (GenePro- Bioer),

no qual as condições de amplificação se iniciaram com a etapa de desnaturação com um ciclo a 95°C por 3 minutos, seguido de uma etapa de anelamento e extensão com 35 ciclos a 95° C durante 1 minuto, 60° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72° C durante 15 minutos, e finalizado a 10° C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X . O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave™ Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

3.4.9.3. Purificação dos produtos de amplificação

O resultado da amplificação foi purificado com o kit GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare). O DNA purificado foi quantificado em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para confirmar a qualidade da purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado através do transiluminador Eletronic Multiwave™ Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID®.

3.4.9.4. Amplificação e Purificação da reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento da região 16S do rDNA foram utilizados os mesmos iniciadores F27 e R1492 e o primer interno U519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'). As reações continham 2,0 µL de Save Money, 0,5 µL de primer (10 µM) 2,0 µL de DYEnamic, cerca de 100 ng de DNA purificado e água Mili-Q estéril até completar o volume de 10 µL. Utilizou-se o termociclador no programa: 25 ciclos 95 °C por 20s, seguido de 50 °C por 15s e 60°C por 60s, sendo finalizado e mantido a 10 °C. A reação de seqüenciamento foi purificada de acordo com as instruções do manual do DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare).

3.4.9.5. Seqüenciamento da região 16S do rDNA

O seqüenciamento foi realizado em equipamento ABI Prism® 377 DNA (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.). O DNA purificado proveniente da reação de seqüenciamento foi ressuspendido em 3,0 µl de formamida e as amostras aplicadas no gel de poliacrilamida. As seqüências obtidas foram corrigidas manualmente e editadas através do software Bioedit versão 7.0.9.0.

3.4.9.6. Análise filogenética

A seqüência (1329 pb) do isolado ARTD080903-03A foi comparada com seqüências de estirpes tipo depositadas na base de dados do Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>) e com seqüências depositadas no banco de dados do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências mais similares foram utilizadas na análise filogenética. As seqüências foram alinhadas usando o software Bioedit versão 7.0.9.0 e a análise filogenética efetuada utilizando-se o software PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002). A análise filogenética foi inferida utilizando o algoritmo Neighbor-joining com modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (KIMURA,1980) e com suporte de valores de bootstrap de 1000 pseudo-réplicas.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da triagem dos extratos com atividade antimicrobiana para bactérias e *Candida* spp. estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Dos 44 extratos avaliados, 16 (36,36%) apresentaram atividade inibitória sobre pelo menos uma das estirpes avaliadas. Os isolados identificados como *Pseudonocardia* spp. não apresentaram atividade sobre nenhum dos micro-organismos estudados, na faixa de concentração investigada (até 1000 µg.mL⁻¹). No entanto, 16 extratos (36,36%) apresentaram atividade para pelo menos uma das bactérias Gram-positivas (Tabela 2) e 8 extratos (18,18%) foram ativos contra leveduras do gênero *Candida* (Tabela 3). Nenhum dos extratos apresentou atividade, nas concentrações testadas, contra bactérias Gram-negativas.

Bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos agentes com atividade antibacteriana, devido à composição de sua parede celular, a qual é menos permeável a essas moléculas. Conseqüentemente, triagens de compostos com atividade antibacteriana geralmente resultam em maior índice de inibição sobre bactérias Gram-positivas. Outros trabalhos de avaliação de atividade antimicrobiana de actinobactérias chegaram à semelhante resultado (SAADOUN;GHARAIBEH, 2003; GONZÁLEZ et al., 2005). É sabido que mais de 60% dos antibióticos conhecidos são ativos apenas contra bactérias Gram-positivas (BALTZ, 2007).

A não-inibição do crescimento de nenhuma das bactérias Gram-negativas estudadas não garante que as actinobactérias avaliadas neste trabalho não produzam compostos com atividade antimicrobiana sobre este grupo de bactérias, uma vez que, sendo extratos brutos,

compostos ativos podem estar em pequena quantidade no extrato e talvez estes extratos sejam ativos em concentrações maiores ou se mostrem ativos quando fracionados e quando o composto for purificado.

Tabela 2: CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos de actinobactérias sobre diferentes espécies de bactérias

Código do isolado	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	<i>E. faecium</i> CCT 5079	<i>E. hirae</i> ATCC 10541	<i>R. equi</i> ATCC 6939	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 11733
SES080402-05A	*	*	*	*	*	*	*
SES080402-05B	*	*	*	*	*	*	*
SES080419-02A	*	*	*	*	*	*	*
SES080419-04B	*	*	*	*	*	*	*
SES080419-04D	*	*	*	*	*	*	*
SES080419-03A	*	*	*	*	*	*	*
SES080419-03B	*	*	*	*	*	*	*
SES080420-04A	*	*	*	*	*	*	*
SES080420-05A	*	*	*	*	*	*	*
SES080420-06A	*	*	*	*	*	*	*
SES080420-07A	*	*	*	*	*	*	*
SES080420-07B	800	*	*	*	*	*	*
CTL080820-02A	*	*	*	*	*	*	*
CTL080820-02B	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-01B	*	*	*	*	*	*	15
ARTD080903-02A	30	150	100	*	*	50	80
ARTD080903-02B	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-02C1	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-02C2	900	*	*	900	1000	800	700
ARTD080903-02C3	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-03A	15	150	60	*	40	30	50
ARTD080903-03D	20	200	50	*	20	40	100
ARTD080903-04A	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-04B	*	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-04C	*	*	*	*	*	*	*
SES080909-08A	*	*	*	*	*	*	900
SES080911-04A	30	150	100	*	60	150	100
SES080911-04A1	*	500	500	*	*	*	*
SES080911-06A	*	*	*	*	*	*	*
SES080911-08A	*	*	*	*	*	*	*
SES080911-09A	*	*	*	*	*	*	*
SES080911-10A	200	*	*	*	*	700	*
SES080911-10B	*	*	*	*	*	*	*
SES080912-02A	*	*	*	*	*	*	*
SES080912-02B	*	*	*	*	*	*	*
SES080921-03 A	*	*	*	*	*	*	*
SES080921-03B	200	50	80	*	60	100	30
SES080922-03C1	*	*	*	*	*	*	*
SES080922-03D	1000	*	*	*	*	*	*
SES080924-01 A	800	*	*	*	*	*	*
SES080924-01A1	900	*	*	*	500	*	800
SES080924-01A2	900	*	*	*	*	*	*
SES080924-01B	300	*	*	*	600	*	*
SES080924-02B	*	*	*	*	*	*	*

* CIM > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabela 3: CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de extratos de actinobactérias sobre diferentes *Candida* spp.

Código do isolado	<i>C. albicans</i> CBS 562	<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	<i>C. glabrata</i> CBS 138	<i>C. krusei</i> CBS 573	<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	<i>C. tropicalis</i> CBS 94
SES080402-05A	*	*	*	*	*	*
SES080402-05B	*	*	*	*	*	*
SES080419-02A	*	*	*	*	*	*
SES080419-04B	*	*	*	*	*	*
SES080419-04D	*	*	*	*	*	*
SES080419-03A	*	*	*	*	*	*
SES080419-03B	*	*	*	*	*	*
SES080420-04A	*	*	*	*	*	*
SES080420-05A	*	*	*	*	*	*
SES080420-06A	*	*	*	*	*	*
SES080420-07A	*	*	*	*	*	*
SES080420-07B	*	*	*	*	*	*
CTL080820-02A	*	*	*	*	*	*
CTL080820-02B	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-01B	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-02A	60	900	*	40	80	1000
ARTD080903-02B	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-02C1	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-02C2	800	*	1000	*	*	*
ARTD080903-02C3	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-03A	40	700	*	15	125	*
ARTD080903-03D	60	1000	*	15	200	*
ARTD080903-04A	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-04B	*	*	*	*	*	*
ARTD080903-04C	*	*	*	*	*	*
SES080909-08A	1000	*	*	*	*	*
SES080911-04A	10	800	*	125	200	*
SES080911-04A1	500	*	*	*	*	*
SES080911-06A	*	*	*	*	*	*
SES080911-08A	*	*	*	*	*	*
SES080911-09A	*	*	*	*	*	*
SES080911-10A	800	*	*	*	*	*
SES080911-10B	*	*	*	*	*	*
SES080912-02A	*	*	*	*	*	*
SES080912-02B	*	*	*	*	*	*
SES080921-03A	*	*	*	*	*	*
SES080921-03B	*	*	*	*	*	*
SES080922-03C1	*	*	*	*	*	*
SES080922-03D	*	*	*	*	*	*
SES080924-01A	*	*	*	*	*	*
SES080924-01A1	*	*	*	*	*	*
SES080924-01B	*	*	*	*	*	*
SES080924-01B	*	*	*	*	*	*
SES080924-02B	*	*	*	*	*	*

* CIM > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

A bactéria *B. subtilis* foi o micro-organismo mais sensível, sendo inibida por 13 extratos, com CIM entre 15 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entre as leveduras, *Candida albicans* foi a mais sensível, com CIM variando entre 15 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As mais resistentes foram *C. glabrata* e *C. tropicalis*, inibidas por apenas um dos extratos, com CIM de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos os extratos.

Dos extratos ativos, 6 apresentaram maior espectro de ação, inibindo pelo menos 6 dos micro-organismos estudados. Dentre esses extratos, cinco apresentaram baixos valores de CIM e podem ser destacados: ARTD080903-02A, ARTD080903-03A, ARTD080903-03D, SES080911-04A e SES080921-03B (espectro de ação restrito às bactérias Gram-positivas).

Tabela 4: CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de antibióticos de referência (claranfencol¹/nistatina²) sobre os micro-organismos padrões

Micro-organismo padrão	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	0,5
<i>Enterococcus faecium</i> CCT 5079	1,0
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	1,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	4,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388	125,0
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939	4,0
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	5,0
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC14028	5,0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	2,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 11733	1,0
<i>Candida albicans</i> CBS 562	1,0
<i>Candida dubliniensis</i> CBS 7987	1,0
<i>Candida glabrata</i> CBS 138	1,0
<i>Candida krusei</i> CBS 573	2,0
<i>Candida parapsilosis</i> CBS 604	1,0
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	4,0

1. Referência para bactérias

2.Referência para *Candida* spp.

Os isolados ARTD080903-02A, ARTD080903-03A e ARTD080903-03D, apresentam o mesmo morfotipo, podendo ser pertencentes à mesma espécie e por esta razão, apenas um desses representantes foram selecionados para prosseguimento dos estudos. Dentre estes três isolados, o que apresentou maior atividade antimicrobiana foi a estirpe ARTD080903-03A,

sendo selecionada para o estudo químico do composto com atividade antimicrobiana presente no extrato.

O extrato bruto do cultivo em escala aumentada resultou em uma massa igual a 1,4 g. Para a purificação parcial do composto com atividade antimicrobiana, o extrato bruto foi submetido a fracionamento em coluna de sílica. As frações coletadas foram agrupadas, de acordo com o padrão de bandas apresentados na CCD comparativa, em 8 frações (Tabela 5).

A fração 1 compreende grande parte da massa do extrato bruto. Esta fração é composta por material graxo provavelmente proveniente do meio de cultura rico em soja.

As frações foram submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana e os resultados estão apresentados na Tabela 6. A atividade antimicrobiana foi avaliada somente contra 5 micro-organismos, a saber: *E. coli* e *P. aeruginosa*, representando os Gram-negativos; *B. subtilis* e *S. aureus*, representando as Gram-positivas e *C. albicans*, representando as leveduras. Além da menor quantidade de micro-organismos utilizados na triagem, os valores de CIM foram obtidos como intervalos entre concentrações. Desta forma, o objetivo de determinar quais frações eram responsáveis pela atividade antimicrobiana foi alcançado utilizando-se menor massa das frações.

Tabela 5: Frações obtidas do extrato ARTD080903-03A

Fração	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 a 10	957,7
2	11 a 23	29
3	24 a 33	24,2
4	34 a 39	170,6
5	40 a 46	67,5
6	47 a 54	16,9
7	55 a 69	33,4
8	70 a 76	20,6

Tabela 6: CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato bruto e frações de ARTD080903-03A

Fração	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13388	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. albicans</i> CBS 562
1	*	*	*	*	*
2	*	*	*	*	*
3	250,0 < CIM < 500,0	250 < CIM < 500	*	31,25 < CIM < 62,5	250 < CIM < 500
4	31,25 < CIM < 62,5	31,25 < CIM < 62,5	*	7,81 < CIM < 15,625	31,25 < CIM < 62,5
5	CIM < 7,81	15,625 < CIM < 31,25	*	CIM < 7,81	CIM < 7,81
6	125,0 < CIM < 250,0	250 < CIM < 500	*	125 < CIM < 250	15,625 < CIM < 31,25
7	CIM < 7,81	15,625 < CIM < 31,25	*	CIM < 7,81	CIM < 7,81
8	125,0 < CIM < 250,0	31,25 < CIM < 62,5	*	31,25 < CIM < 62,5	31,25 < CIM < 62,5
E.B.	CIM = 30,0	*	*	CIM = 40	CIM = 40

*CIM > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

E.B. = Extrato Bruto

As frações 1 e 2 não foram ativas. As demais frações inibiram o crescimento de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* e não apresentaram efeito sobre a bactéria *P. aeruginosa*, a qual é o micro-organismo mais resistente aos antibacterianos, é naturalmente resistente aos β -lactâmicos e as tetraciclinas, cloranfenicol, clotrimazol e outros (RANG; DALE; RITTER, 2001).

É interessante notar que o extrato bruto de ARTD080903-03A não inibiu o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli*, porém as frações 3 a 8 deste extrato foram ativas sobre a bactéria, indicando que a concentração dos compostos ativos presentes no extrato bruto não foi o suficiente para promover a inibição. Quando os compostos foram parcialmente purificados pelo fracionamento, as frações contendo estes compostos ativos apresentaram atividade sobre a *E. coli*.

As frações 5 e 7 apresentaram a menor CIM sobre os micro-organismos. A reduzida massa da fração 7 não permitiu que fossem separadas manchas de massa significativa na CCDP. Assim foi dada seqüência nos processos de purificação apenas para a fração 5.

A CCD da fração 5 está apresentada na Figura 3. Pode-se observar a presença de 3 bandas ($Rf_1=0,2$; $Rf_2=0,33$; $Rf_3=0,62$). Como a CCD apresentou boa resolução na separação das bandas, a técnica cromatográfica escolhida para a separação dos compostos foi a CCD preparativa. As bandas com Rf_1 e Rf_2 são UV ativas, possibilitando que sejam demarcadas para posterior isolamento. A sílica acima da banda Rf_2 foi coletada para o isolamento da banda Rf_3 .

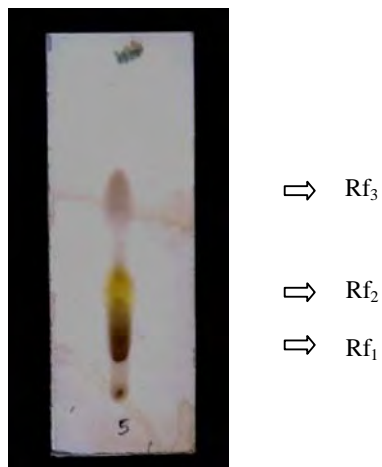


Figura 3: CCD da fração 5 do extrato bruto de ARTD080903-03A, eluição com hexano: acetato (3:7) e revelada com solução vanila/ácido sulfúrico

A técnica de CCDP permitiu boa separação das bandas, sendo que 3 diferentes bandas foram isoladas. Nesta técnica, devido a mudança das condições da fase estacionária, se comparada com a CCD da Figura 3, os Rf das bandas 1 e 2, foram $Rf_1=0,1$ e $Rf_2=0,23$.

O conteúdo da fração e das manchas foram submetidos a RMN. Os espectros da fração e da mancha de $Rf=0,23$ (Figura 3) foram similares, indicando que o conteúdo relativo à mancha é majoritário.

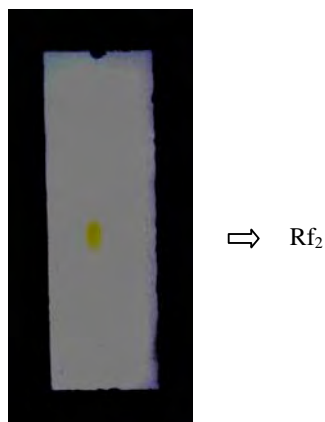


Figura 3: CCD da substância presente na fração5 (Rf_2) do extrato bruto de ARTD080903-03A. Eluição com hexano: acetato (3:7) e revelada com solução vanila/ácido sulfúrico

Subseqüentemente, a mancha de $Rf=0,23$ foi submetida à CLAE. O cromatograma indicou que esta mancha é composta por uma mistura de substâncias (Figura 4). Os maiores picos foram coletados e analisados sob espectrofotometria de Ultra-violeta (UV). Todos os picos analisados apresentaram o mesmo padrão de curva, indicando que os compostos

pertencem a uma mesma classe química (Figura 5). Uma vez que a massa da maioria dos picos não foi suficiente para a continuidade dos experimentos visando à determinação da estrutura química e de atividade antimicrobiana, apenas o pico relativo ao tempo de retenção de 94,06 minutos foi utilizado nos testes.

A massa obtida com a coleta do pico relativo ao tempo de retenção de 94,06 minutos foi submetida à RMN e com os dados apresentados no espectro (Figura 6), a elucidação estrutural foi feita com base em comparação dos espectros disponíveis na literatura.

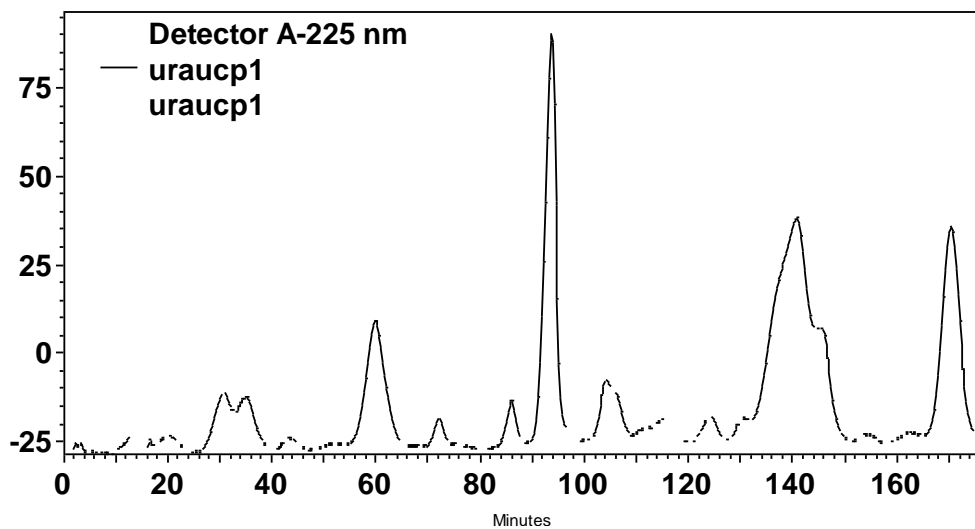


Figura 4: Cromatograma de CLAE da mancha de $R_f=0,23$ obtida da fração 5.

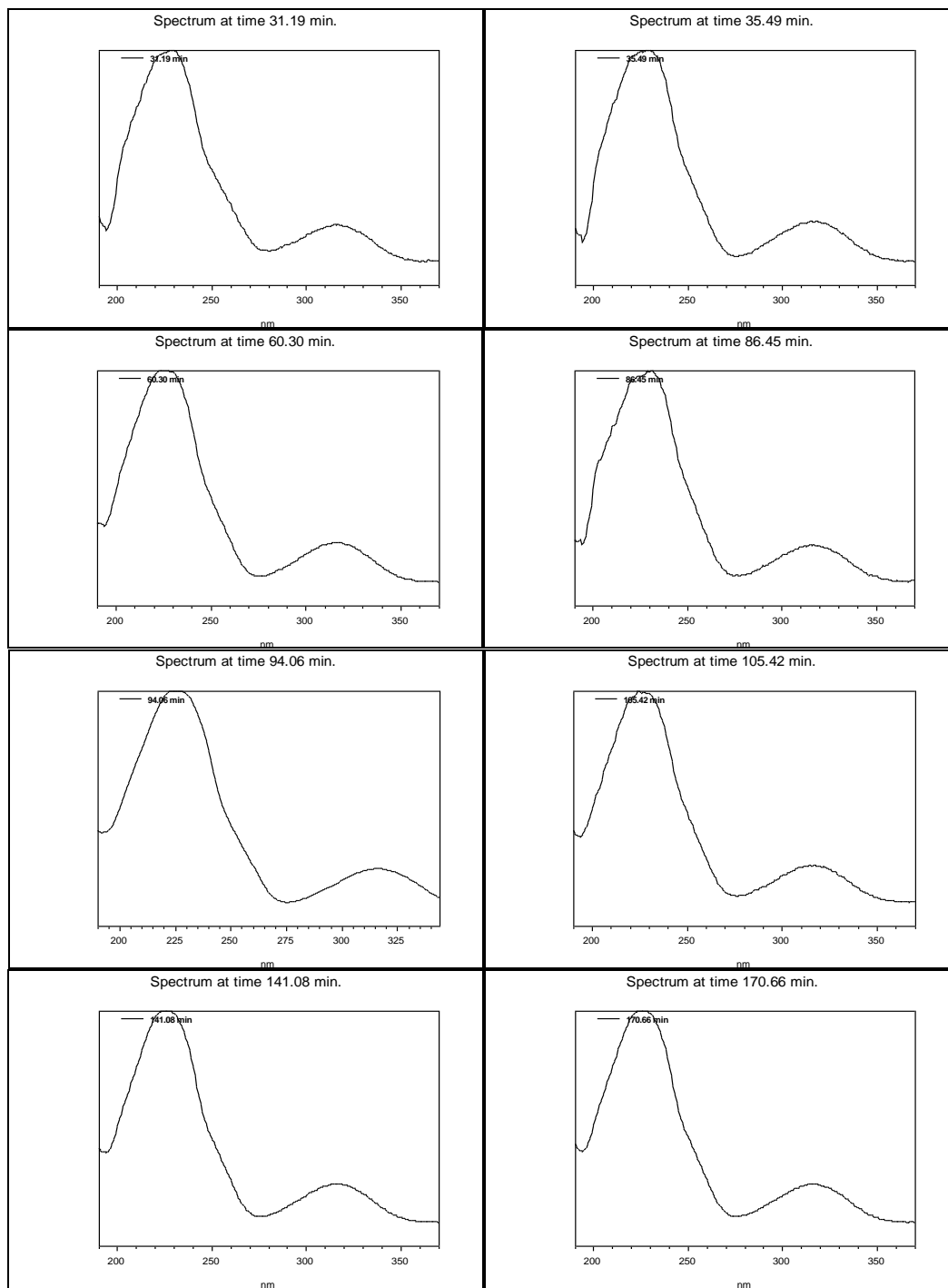


Figura 5: Espectro de UV dos picos isolados em CLAE

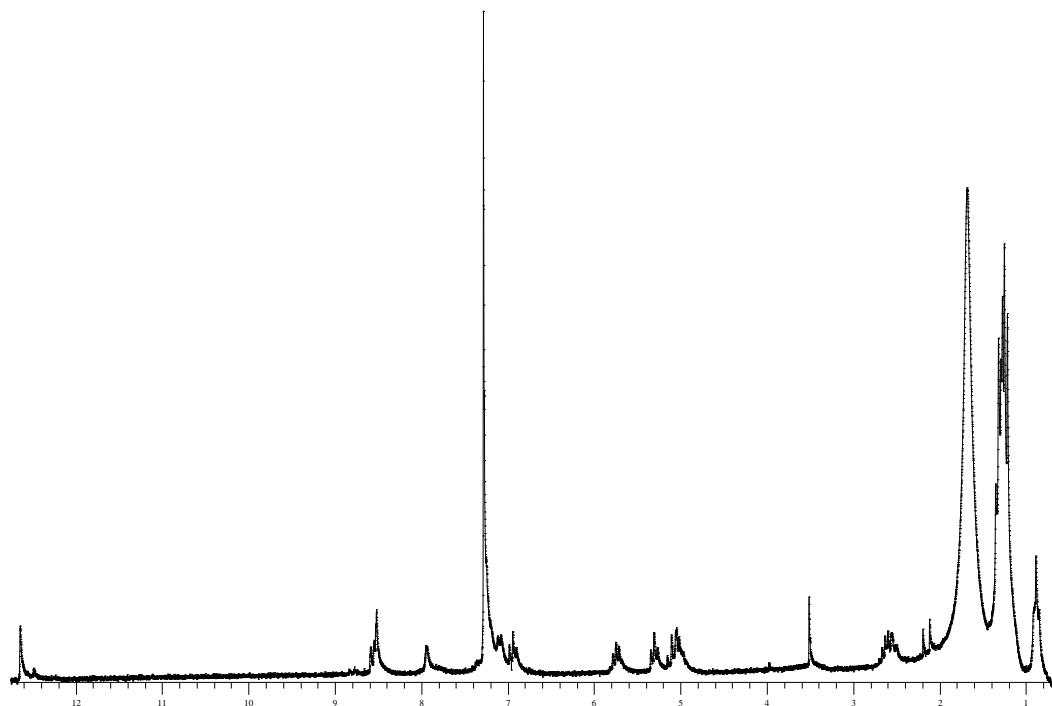


Figura 6: Espectro de RMN apresentado pelo pico 94,06 min

A substância foi identificada como sendo uma Urauchimicina A, anteriormente isolada de *Streptomyces* sp. por Imamura e colaboradores (1993). A estirpe *Streptomyces* sp. Ni-80 foi isolada de esponja marinha em Urauchicove, Irimore, Japão. Do meio de cultivo foram isoladas as urauchimicinas A e B, sendo estas as primeiras antimicinas que possuem número ímpar de carbonos e uma ramificação da cadeia lateral. Os autores sugerem que a diferença apresentada nas estruturas é fruto de uma evolução da estirpe em ambiente marinho, o que poderia ter resultado em uma modificação em seu metabolismo secundário e por isso resultou nesta antimicina incomum.

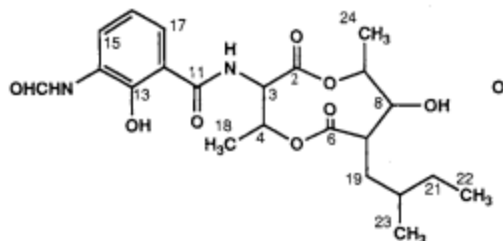


Figura 7: Urauchimicina A

Em 2006, duas novas urauchimicinas foram isoladas e descritas. Urauchimicina C, isolada de *Streptomyces* sp. B1751, de origem marinha, e Urauchimicina D, isolada de *Streptomyces* sp. AdM21, de origem terrestre (YAO et al., 2006).

Os compostos dos demais picos apresentados no cromatograma (Figura 4), devido à similaridade de espectro de UV (Figura 5), são também pertencentes à classe das antimicinas, podendo, ainda, serem novos integrantes do grupo das Urauchimicinas.

No trabalho de Imamura e colaboradores (1993), as Urauchimicinas A e B apresentaram inibição da diferenciação morfológica de *C. albicans* em concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já as Urauchimicinas C e D não apresentaram atividade contra *C. albicans*, *Mucor miehei* e bactérias (YAO et al., 2006).

Estas moléculas parecem ser raramente isoladas, já que na literatura só constam os trabalhos de descrição das mesmas. Elas possuem configuração estrutural não apresentada comumente por antimicinas, como número ímpar de carbonos e ramificação da cadeia lateral.

O estudo de atividade antimicrobiana da Urauchimicina A foi restrita a *C. albicans* no trabalho de Imamura e colaboradores (1993). O re-isolamento desta molécula neste trabalho possibilita que seu espectro de ação seja mais bem avaliado.

No presente trabalho, a Urauchimicina A não apresentou atividade inibitória sobre as bactérias avaliadas. Esperava-se que a molécula majoritária isolada apresentasse atividade sobre bactérias, já que tanto o extrato bruto, quanto a fração isolada, apresentou forte atividade inibitória sobre bactérias, principalmente Gram-positivas. Pode se concluir, então, que a fração 5 possui outras moléculas, em baixa quantidade, que possuem atividade antibacteriana ou que o sinergismo entre as antimicinas, ou mesmo destas com outras moléculas, resultem em atividade antibacteriana.

Os resultados da atividade anti-*Candida* da molécula estão apresentadas na Tabela 7. A Urauchimicina A apresentou valores de CIM equivalentes ao antifúngico de referência, a nistatina (Tabela 4) para as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Além disso, atuou como fungicida sobre as espécies *C. glabrata* e *C. krusei*.

Antimicinas agem inibindo o fluxo de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, e, portanto, não são eficazes contra as bactérias. Como agem na mitocôndria, são bastante tóxicos para os hospedeiros, mas Antimicinas já foram utilizados comercialmente como fungicidas (COLIN et al., 1997).

É interessante e necessário determinar a toxicidade apresentada pela Urauchimicina A, para avaliar se esta pode ser usada como agente antifúngico de medicamentos para humanos e animais. Além disso, a avaliação da atividade da Urauchimicina A sobre *Candida*

spp. resistentes aos antifúngicos disponíveis comercialmente deve ser feita para avaliar a potencialidade deste antifúngico pouco conhecido.

Tabela 7: Atividade anti-*Candida* da substância isolada Urauchimicina

Micro-organismo	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CFM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>C. albicans</i>	1	*
<i>C. dubliniensis</i>	800	*
<i>C. glabrata</i>	2	15,6
<i>C. krusei</i>	15,6	15,6
<i>C. parapsilosis</i>	*	*
<i>C. tropicalis</i>	*	*

* > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Como já exposto anteriormente, as estirpes ARTD080903-02A, ARTD080903-03A e ARTD080903-03D apresentam a mesma morfologia e semelhante espectro de ação. Foi suposto, então, que se tratavam da mesma espécie. Os três isolados tiveram a região 16S do rDNA seqüenciada e foi confirmada a igualdade entre os isolados.

A seqüência da estirpe ARTD080903-03A apresentou 99% de similaridade com as seqüências das estirpes apresentadas na árvore filogenética (Figura 8). A estirpe em estudo aparece isolada em uma clade, o que indica que esta pode se tratar de uma espécie ainda não descrita do gênero *Streptomyces*. A possível espécie nova, *Streptomyces* sp. ARTD030809-03A, seria filogeneticamente próxima às espécies *S. spororaveus*, *S. nojiriensis*, e *S. spiroverticillatus*. Porém, análises moleculares, morfológicas e fisiológicas ainda devem ser realizadas a fim de confirmar esta identificação.

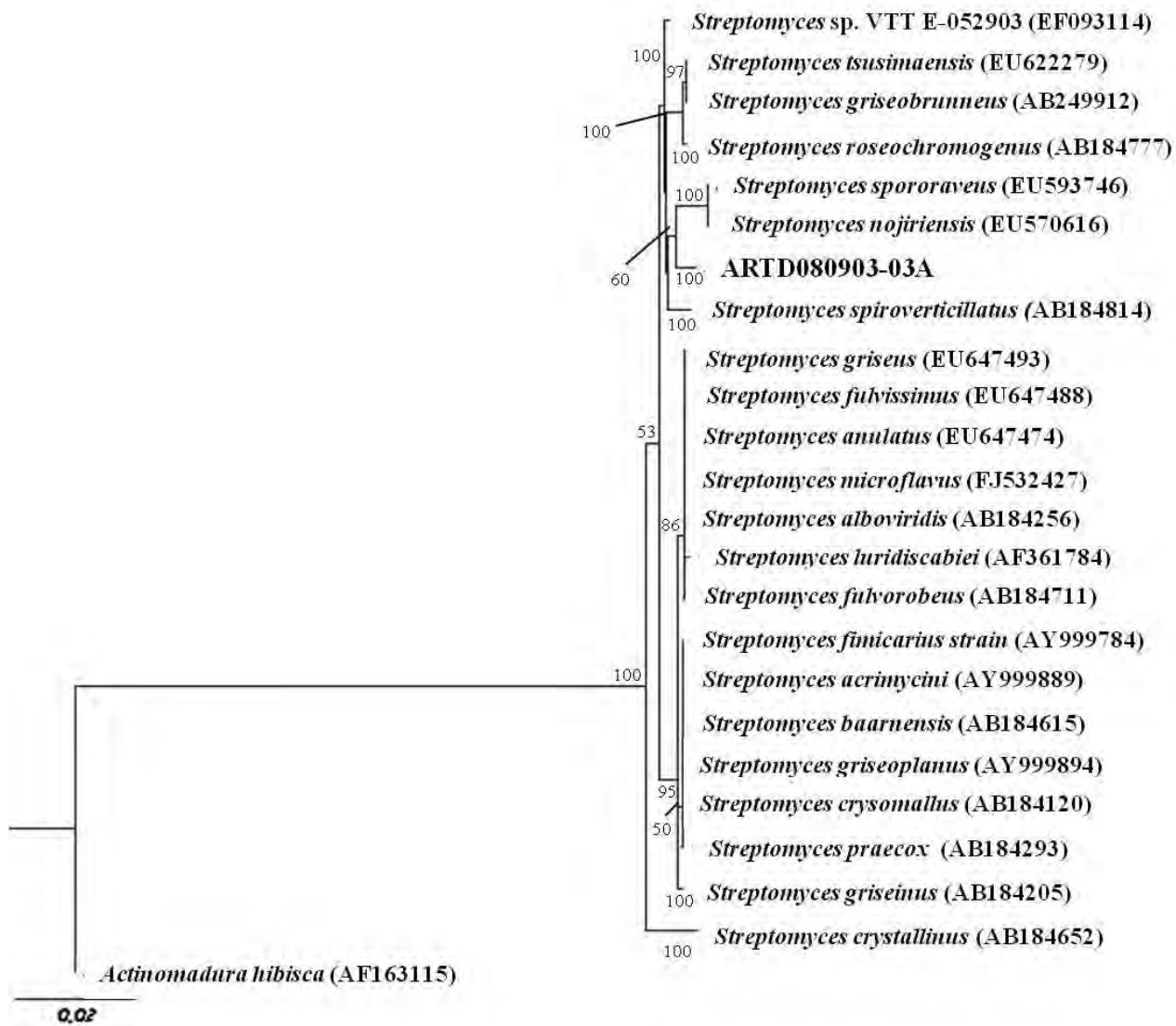


Figura 8: Relação filogenética do isolados ARTD080903-03A baseada na análise de seqüências da região 16S do rDNA (método de distância, Neighbour-Joining)

As estirpes isoladas neste trabalho deverão ser caracterizadas taxonomicamente e estão devidamente preservadas no Banco de Micro-organismos do CEIS para que estas estejam disponíveis para estudos posteriores.

A estirpe ARTD080903-A, possivelmente pertencente a uma espécie ainda não conhecida do gênero *Streptomyces*, deve ser mais bem estudada, tanto em relação à identificação taxonômica, quanto em relação à produção de metabólitos secundários. Além de produzir a antimicina rara Urauchimicina A, a estirpe produz ainda, em pequena quantidade, diversas outras moléculas da classe das antimicinas. A otimização da produção desses

compostos deve resultar no isolamento de maior massa dessas moléculas, possibilitando assim a elucidação estrutural destas.

Os extratos das estirpes SES080911-04A, SES080921-03B, ARTD080903-01B apresentaram atividade antimicrobiana sobre pelo menos 6 dos micro-organismos avaliados. Estas actinobactérias devem ser melhor estudadas quanto a produção de metabólitos secundários, pois podem ser fontes de compostos potentes ou até mesmo inéditos. Os metabólitos destas estirpes devem ser, então, purificados, identificados e avaliados quanto à atividade biológica.

Foi mostrado neste trabalho que actinobactérias isoladas de formigas Attini podem ser fontes de compostos com atividade antimicrobiana contra patógenos humanos. Micro-organismos isolados de formigas Attini são pouco explorados com enfoque de prospecção de propriedades para aplicação biotecnológica. Estes micro-organismos podem ser aproveitados em novos estudos visando à aplicação biotecnológica, como emprego em controle biológico e produção de enzimas, por exemplo.

3.6. CONCLUSÕES

- Actinobactérias presentes na cutícula de formigas Attini são fontes de compostos com atividade antimicrobiana.
- Cinco isolados apresentaram largo espectro de ação e baixos valores de CIM sobre bactérias Gram-positivas e *Candida* spp., podendo ser fontes de potentes antimicrobianos.
- Da estirpe ARTD080903-03A foi isolada a antimicina rara Urauchimicina A, que apresentou atividade antifúngica sobre *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, atuando como fungicida sobre as duas últimas.
- Actinobactérias associadas a formigas Attini podem ser fontes de compostos raros e até mesmo inéditos.

4. REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ANDERSSON, D. I.; LEWIL, B. The biological cost of antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 5, p. 489-493, 1999.

ANGELIS, C.; SERZEDELLO, A.; DE ANGELIS, D. F. Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, São Paulo, v. 8, p. 149-151, 1983.

BACCI, M. Jr. et al. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p.79-82, 1995.

BALTZ, R. H. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. **Microbe - American Society for Microbiology**, Washington, v. 2, n. 3, p. 125-131, 2007.

BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 6, n. 21, p. 1-6, 2006.

BEATTIE, A. J. et al. Antibiotic production: A possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera:Formicidae). **Annals of the entomological Society of America**, Lanham, v. 79, n. 3, p. 448-450, 1986.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. New antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.

BESHERS, S. N.; TRANIELLO, J. F. A. Polyethism and the adaptiveness of worker size variation in the attine ant *Trachymyrmex septentrionalis*. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 9, n. 1, p. 61-83, 1996.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 528-534, 2000.

BIEBER, B. et al. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 51, n. 3, p. 381-382, 1998.

BOMFIM, S. M. **Isolamento de metabolites antifúngicos de *Streptomyces* sp., UFPEDA 3347, endófito de *Momordica charantia* L. (Curcubitaceae)**, 2008, 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 59, n. 2, p. 159-162, 2005.

BORUWA, J. et al. Synthesis, absolute stereochemistry and molecular design of the new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 14, n. 13, p. 3571-3574, 2004.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A phylogenetic hypothesis for the *Trachymyrmex* species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. In SNELLING, R. R.; FISHER, B. L.; WARD, P. S. (eds). **Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson – 50 years of contributions**. Gainesville: American Entomological Institute, 2007. p. 72-88.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 6. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 320 p.

BRUDER-NASCIMENTO, A. et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, London, v. 3, n. 1, 2010.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

CARREIRO, S. C. et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n.3, p. 243-248, 1997.

CASTILLO, U. V. et al. Munumbicis, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 9, p. 2675-2685, 2002.

CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 361, n. 1469, p. 761-768, 2006.

CHOI, E. J. et al. 6-Hydroxymethyl-1-phenazine-carboxamide and 1,6-phenazinedimethanol from a marine bacterium, *Brevibacterium* sp. KMD 003, associated with marine purple vase sponge. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.62, n. 11, p.621-624, 2009.

CLAESSEN, D. et al. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 7, p. 313-319, 2006.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature biotechnology**, London, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**. Norma Aprovada M27-a2, 2002.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**. Norma Aprovada M7-A6, 2005.

COLEMAN, D. C. et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS**, London, v. 11, n. 5, p. 557-568, 1997.

COLIN et al. Antimycins, Inhibitors of ATP-Citrate Lyase, from a *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 50, n. 9, p. 729-733, 1997.

CRAVEN S. E.; DIX, M. W.; MICHAELIS, G. E. Attini fungus garden contain yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184-189, 1970.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: a multilateral approach to study symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001b.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p.91-102, 2003.

CURRIE, C. R. et al. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 311, n. 81, p. 81-83, 2006.

CURRIE, C. R. et al. Corrigendum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 423, n. 6938, p. 461, 2003.

CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p.701-704, 1999.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001a.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Biological Sciences**, London, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 4, p. 455-463, 1999.

DRONDA, F. et al. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV- infected patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 15, n. 6, p. 446-452, 1996.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

EDMOND, M. B. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: A Three-Year Analysis. **Clinical Infectious Disiases**, v. 29, n. 2, p. 239-244, 1999.

EZRA, D. et al. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, Reading, v. 150, n. 4, p. 785-793, 2004.

FAVARIN, E. C. *Streptomyces* associados a formigas da Tribo Attini e seus efeitos sobre os fungos contaminantes *Escovopsis weberi* e outros micro-organismos. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia Bratislava**, Bratislava, v. 62, n. 3, p. 251-257, 2007.

FISHER, P. J. et al. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, Washington, v. 264, n. 5157, p. 371-373, 1994.

GERARDO, N. M. et al. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **Plos Biology**, California, v. 4, n. 8, p.1358-1363, 2006.

GILLESPIE, D. E.; et al. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002.

GONZÁLEZ, I. et al. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 401-415, 2005.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B. N. Antifungal antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n.1, p. 46-57, 2002.

HAEDER, S. et al. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

HAYAKAWA, Y. et al. Piericidins C7 and C8, New Cytotoxic Antibiotics Produced by a Marine *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 60, n. 3, p. 196-200, 2007.

HÖLLDOBLER, E.; WILSON, E. O. **Journey to the ants: a story of scientific exploration**. 3.ed. Cambridge:Harvard University Press, 1994, p.1-13.

HOPWOOD, D.A. et al. Fresh Approaches to Antibiotic Production. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 290, p. 1040, p. 313-328, 1980.

IMAMURA, N. et al. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins a and b, produced by marine actinomycete. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 241-246, 1993.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 15.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 568p.

KALTENPOTH, M. et al. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. **Current Biology**, London, v. 15, n. 5, p. 475-479, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n.2, p. 111-120, 1980.

KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, R. F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, Auckland, v. 2052, p. 1-31, 2009.

KOST, C. et al. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 94, n. 10, p. 821-828, 2007.

KRIEG, N. R.; HOLTZ, J. G. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 721p.

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

KUROSAWA, K. et al. Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X2-producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 72, p. 145-154, 2006.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-175.

LARSON, E. Community Factors in the Development of Antibiotic Resistance. **Annual Review of Public Health**, Palo Alto, v. 28, p. 435-447, 2007.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.

LITTLE, A. E. F. et al. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters**, London, v. 2, n. 1, p.12-16, 2006.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167p.

MARSARO, A. L. et al. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pres. Fr. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001.

MEIS, J. F. G. M. et al. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-Induced neutropenia and bone marrow transplantation. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 1, 1999.

MILLON, L. et al. Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 1115- 1118, 1994.

MIYADOH, S. Research on Antibiotic Screening in Japan over the Last Decade: A Producing Microorganism Approach. **Actinomycetologica**, Tokyo, v. 7, n. 2, p. 100-106, 1993.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Lawrence, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

NASCIMENTO, R. R. et al. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, p. 987-1000, 1996.

ODDS, F. C. *Candida* infections: an overview. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 15, n.1, p. 1-5, 1987.

OH, D. C. et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, London, v. 5, n. 6, p. 391-393, 2009.

OKAMI, Y.; HOTTA, H. Search and discovery of new antibiotics. In: W. GOODFELLOW, MORDARSKI, M. (ed). **Actinomycetes in Biotechnology**. San Diego: Academic Press. 1988. p.33-67.

OSBURNE, M. S. et al. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. **American Society for Microbiology News**, Ann Arbor, v. 66, n. 7, p. 411-417, 2002.

PADILLA, G. Biologia Molecular de *Streptomyces* e Aplicações Industriais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. São Paulo: EMBRAPA. 1998.

PAGNOCCA, F. C. et al. Toxicity of sesame extracts to the leaf-cutting ants symbiotic fungus. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 80, n. 3, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of Trichosporon chiarellii sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 60, p. 1454-1459, 2010.

PERSONS, D. et al. Fluconazole and *Candida krusei* fungemia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 325, n. 18, p. 1274-1277, 1991.

PFALLER, M. A. Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 20, n.6, p. 1535-1539, 1995.

POULSEN, M.; HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinatior* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 53, n.3, p.349-355, 2006.

POULSEN, M. et al. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n.11, p. 3597-3604, 2005.

POULSEN, M. et al. Within-colony transmission and the cost of mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 161-170, 1977.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. 2001. 703p.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RIBEIRO, S. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da tribo Attini**. 2000. 132 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

RODRIGUES, A. et al. Antagonistic interactions between gardens yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p.64-67, 2008b.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008a.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic fungi associates with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

SAADOUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, London, v. 53, n. 3, p. 365-371, 2003.

SAMPAIO, J. P., et al. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospidium*: *Rhodospidium kratochvilovae* and related anamorphic species.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v.51, p.687-697, 2001.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, p. 1029-1050, 2009.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5441, 2008.

SCOTT, J. J. et al. Bacterial protection of Beetle-Fungus Mutualism. **Science**, Washington, v. 332, n. 5898, p. 63, 2008.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Lawrence, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SEN, R. et al. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.

SHIOMI, K. et al. A New Antibiotic, Antimycin A9, Produced by *Streptomyces* sp. K01-0031. **The journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 74-78, 2005.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

SULIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterisation of a novel species associated with oral candidosis in HIV infected individuals. **Microbiology**, Reading, v. 141, n. 7, p.1507-1521, 1995.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* : Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)**. Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TANAKA, Y.; OMURA, S. Agroactive Compounds of microbial origin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 47, p. 57-87, 1993.

TRAVIS, J. Reviving the antibiotic miracle? **Nature**, London, v. 264, n. 51571, p. 360-362, 1994.

TRICK, W. E. et al. Secular Trend of Hospital-Acquired Candidemia among Intensive Care Unit Patients in the United States during 1989–1999. **Clinical Infect Disease**, v. 35, n. 5, p. 627-630, 2002.

UJIKAWA, K. Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 149-158, 2003.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001.

WAUGH, A. C. W.; LONG, P. F. Prospects for generating new antibiotics. **Science Progress**, London, v. 85, n. 1, p.73-88, 2002.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972, 146 p.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004.

WU, X. C. et al. Isolation and Identification of Newly Isolated Antagonistic *Streptomyces* sp. Strain AP19-2 Producing Chromomycins. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, n. 6, p. 499-504, 2007.

YANG, Y. L. et al. Susceptibilities of *Candida* Species to Amphotericin B and Fluconazole: The Emergence of Fluconazole Resistance in *Candida tropicalis*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 25, n.1, p. 60-64, 2004.

YAO, C. B. F. et al. Prefluostatin and new Urauchimycin derivatives produced by Streptomyces isolates. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v.61b, p.320-325, 2006.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.77-100.

ZABOTTO, E. C. **Isolamento e identificação de Streptomyces spp associados a ninhos de formigas do grupo Attini**. 2003. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

ZHANG, M. M.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, Seattle, v.1, n. 14, p. 313-320, 2007.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Isolation and characterization of actinobactéria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiological Research**, Jena, 2010. In Press.