



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ-UFOPA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA- ISCO
BACHARELADO INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE**

GERALDO WALTER DE ALMEIDA NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS DE *Sorghum* sp. CONTRA
MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO**

Santarém-PA
2018

GERALDO WALTER DE ALMEIDA NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS DE *Sorghum* sp. CONTRA
MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO**

Trabalho Acadêmico Orientado apresentado a
Universidade Federal do Oeste do Pará, como
requisito para obtenção do Grau de Bacharel
Interdisciplinar em saúde.

Orientadora: Dra. Silvia Katrine Silva Escher

Co-orientador: José Jeosafa Vieira de Sousa Jr

Santarém-PA
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- A447a Almeida Neto, Geraldo Walter de
Atividade antimicrobiana de actinobactérias endofíticas de *Sorghum s.p.*-
contra microrganismos de interesse clínico./ Geraldo Walter de Almeida
Neto. – Santarém, 2018.
24 p.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Silvia Katrine Silva Escher
Coorientador: José Josafá Vieira de Sousa Jr.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde Coletiva, Curso Bacharelado Interdisciplinar em Saúde.
1. Actinobactérias. 2. Metabolitos secundários. 3. Compostos bioativos.
I. Escher, Silvia Katrine Silva, *orient.* II. Sousa Jr., José Josafá Vieira de, *co-orient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 660.63

GERALDO WALTER DE ALMEIDA NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ACTINOBACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS DE *Sorghum* sp. CONTRA
MICROORGANISMOS DE INTERESSE CLÍNICO**

Trabalho Acadêmico Orientado apresentado a
Universidade Federal do Oeste do Pará, como
requisito para obtenção do Grau de Bacharel
Interdisciplinar em saúde.

Conceito:

Data de Aprovação ____/____/____

Doutora em Ciências farmacêuticas – Katrine Escher – Orientadora
Universidade Federal do Oeste do Pará

Especialista em Análises clínica – Andresson Pontes
Universidade Federal do Oeste do Pará

Mestre em Biociências – Barbara Viana
Universidade Federal do Oeste do Pará

RESUMO

As actinobactérias endofíticas compõem um amplo e diverso filo de bactérias Gram-positivas, filamentosas, que se destacam pela produção de metabólitos secundários com ampla atividade antimicrobiana. Considerando as aplicações na indústria farmacêutica o presente estudo tem como objetivo selecionar actinobactérias endofíticas de *Sorghum* sp. (sorgo) com potencial ação antimicrobiana frente a microrganismos de interesse clínico. O estudo foi de base descritivo, experimental e quanti-qualitativo, sendo analisadas 41 actinobactérias procedentes do acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, as quais foram reativadas pelo cultivo em meio International *Streptomyces* Project 2 - ISP2 durante 7 dias a 30°C para o desenvolvimento do micélio aéreo sobre toda superfície do meio de cultura. A avaliação da atividade antimicrobiana das actinobactérias foi realizada pela técnica de Bloco de Gelose, transferindo-se blocos circulares contendo as colônias de actinobactérias para o meio de cultura previamente inoculado com os microrganismos teste *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Após incubação durante 48h a 30°C (levedura) e 24h a 37°C (bactéria) foram registrados os halos de inibição de crescimento ao redor dos blocos. Foi utilizado a escala de Matsuura (2004) para determinação da intensidade da atividade antimicrobiana. Das 41 actinobactérias endofíticas avaliadas, 17(41,4%) foram ativas contra pelo menos um dos microrganismos patogênicos testados. Um total de 4(9,8%) apresentaram atividade antimicrobiana contra um único patógeno, enquanto que 14(36,8%) apresentaram atividade antimicrobiana contra dois ou três patógenos, sendo eles *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhuma actinobactérias endofítica de *Sorghum* sp. foi ativa contra *E. coli*. A média dos halos de inibição variou entre 8,8 e 22mm, sendo que os maiores halos de inibição foram encontrados frente a *P. aeruginosa*, com halos de inibição entre 11 e 22mm de diâmetro e contra *C. krusei* com halos de inibição entre 9 e 19mm. As actinobactérias que apresentaram maior grau de atividade antimicrobiana foram SIL 4B (21,6mm), SIL 8A (21,3mm), frente a *P. aeruginosa* e SIL 27 (19mm) SIL 40 (16mm) frente a *C.krusei*. Diante dos dados obtidos, comprovamos o potencial do bioma Amazônia, ambiente pouco conhecido quanto a sua microbiota, detentor de substâncias bioativas com atividade antimicrobiana promissora. Os resultados confirmam que actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. endofíticas de *Sorghum* sp. apresentam-se como uma fonte potencial na produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas e fungos leveduriformes.

Palavras-chave: Actinobactérias, metabólitos secundários, Compostos bioativos.

ABSTRACT

Endophytic actinobacteria make up a broad and diverse range of Gram-positive, filamentous bacteria, which are distinguished by the production of secondary metabolites with ample antimicrobial activity. Considering the applications in the pharmaceutical industry the present study aims to select endophytic actinobacteria from *Sorghum* sp. (sorghum) with potential antimicrobial action against microorganisms of clinical interest. The study was based on descriptive, experimental and quantitative-qualitative analysis. 41 actinobacteria from the Microbiology Laboratory of the Federal University of Pará were analyzed and reactivated by culture in International Streptomyces Project 2 - ISP2 medium for 7 days at 30°C for the development of the aerial mycelium on the entire surface of the culture medium. The evaluation of the antimicrobial activity of actinobacteria was performed by the Gelose Block technique, transferring circular blocks containing the colonies of actinobacteria to the culture medium previously inoculated with the test microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. After incubation for 48 h at 30°C (yeast) and 24 h at 37°C (bacteria), the growth inhibition halos around the blocks were recorded. The Matsuura (2004) scale was used to determine the intensity of the antimicrobial activity. Of the 41 endophytic actinobacteria evaluated, 17(41.4%) were active against at least one of the pathogenic microorganisms tested. A total of 4(9.8%) presented antimicrobial activity against a single pathogen, while 14(36.8%) presented antimicrobial activity against two or three pathogens, being *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* and *Pseudomonas aeruginosa*. No endophytic actinobacteria from *Sorghum* sp. was active against *E. coli*. The mean inhibition halos varied between 8.8 and 22 mm, with the highest inhibition halos being found against *P. aeruginosa*, with inhibition halos between 11 and 22 mm of diameter and against *C. krusei* with inhibition halos between 9 and 19mm. The actinobacteria that presented the highest degree of antimicrobial activity were SIL 4B (21.6mm), SIL 8A (21.3mm), against *P. aeruginosa* and SIL 27 (19mm) SIL 40 (16mm) against *C.krusei*. In view of the data obtained, we verified the potential of the Amazon biome, an environment little known for its microbiota, which holds bioactive substances with promising antimicrobial activity. The results confirm that endophytic actinobacteria of the genus *Streptomyces* sp. of *Sorghum* sp. are presented as a potential source in the production of antimicrobial substances against Gram-negative bacteria and yeast fungi.

Key words: Actinobacteria, Secondary metabolites, Bioactive compounds.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	4
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1.	<i>Sorghum</i> sp. (sorgo).....	6
2.2.	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	6
2.3.	ACTINOBACTÉRIAS	7
2.3.1.	Aspectos gerais	7
2.3.2.	Metabolitos secundários	8
3.	METODOLOGIA	11
3.1.	TIPO DE ESTUDO	11
3.2.	MICROORGANISMOS	11
3.3.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA.....	11
3.3.1.	Microrganismos teste	11
3.3.2.	Método de difusão em Ágar - Bloco de gelose	12
3.3.3.	Análise dos dados	13
4.	RESULTADOS	14
	REFERÊNCIAS	17

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos compreendem bactérias e fungos que passam toda ou parte de sua vida colonizando tecidos vegetais inter ou intracelularmente de forma harmônica, sem causar prejuízos à planta (KADIRI *et al.*, 2014; GOLINSKA *et al.*, 2015; SAVI *et al.*, 2015). As actinobactérias, grupo extremamente diversificado de bactérias filamentosas, produtoras de compostos bioativos de variada estrutura química e ação biológica estabelecem associação com vegetais, interagindo com seus metabólitos secundários, levando inclusive a produção de substâncias microbianas semelhantes, ou estabelecendo uma relação de indução para a produção destes compostos (SAVI *et al.*, 2015).

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, filamentosas e com alto teor de citosina e guanina em seu DNA (OLIVEIRA, 2003). Estão classificadas na ordem Actinomycetales e morfologicamente possuem células filamentosas curtas, ao molde das observadas nas famílias Actinomicetaceae e Mycobacteriaceae. Em outros membros da ordem, os filamentos se fragmentam e, por conseguinte só podem ser observados em um determinado estágio do ciclo de crescimento. Estes microrganismos são cosmopolitas, encontrados principalmente no solo, no entanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (SILVA-VINHOTE *et al.*, 2011; GONZALES *et al.*, 2005).

Estas bactérias são responsáveis por produzir uma diversificada gama de metabólitos secundários de ação terapêutica, incluindo, antibióticos, antitumorais, agentes imunossupressores além de vitaminas e hormônios indutores do crescimento (FIEDLER *et al.*, 2005; STROBEL *et al.*, 2004). Devido sua grande diversidade metabólica, as actinobactérias particularmente o gênero *Streptomyces*, o mais comumente isolado e amplamente estudado, são considerados importantes microrganismos do ponto de vista industrial e tem sido descrito como os principais produtores de antibióticos encontrados no solo (COELHO *et al.*, 2008).

Segundo Solecka *et al.*(2012), dos 200.000 a 250.000 metabólitos que apresentam alguma atividade biológica, mais de 22.000 são derivados de microrganismos. Destes metabólitos microbianos cerca de 17% (3.800) são produzidos por bactérias unicelulares, especialmente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* spp., 45% (10.100) são produzidos por actinobactérias e cerca de

38% (8.600) são de origem fúngica. No que concerne as actinobactérias, cerca de 75% (7.600) dos metabólitos são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces*.

Estudos recentes foram realizados no bioma Amazônia, visando identificar actinobactérias com ação antimicrobiana frente a microrganismos de interesse clínico, alguns deste são os realizados por Freitas *et al.* (2016), Souza (2016) e Lima *et al.* (2013). No entanto foram poucos estudos quando considerado a imensa biodiversidade apresentada por este bioma.

A resistência bacteriana aos antibióticos trata-se de um grave problema a saúde pública. A substituição de cepas bacterianas sensíveis por cepas resistentes, na gênese de muitas infecções bacterianas, tem sido um fator constante de diminuição do valor terapêutico de muitos antimicrobianos. A capacidade de aquisição de resistência, bem como o grau de resistência adquirida, são propriedades bastante variáveis entre bactérias. Para tanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana são essenciais para combater os patógenos resistentes (DEMAIN, 2006).

Nesta perspectiva, considerando o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos existentes no mercado, observa-se uma necessidade de identificar novos agentes com potencial atividade antimicrobiana. Para tanto, a realização de pesquisas buscando novos compostos aparece como uma alternativa para este fim. Neste sentido, sabendo que o bioma Amazônia possui uma microbiota variada por apresentar características únicas e que as actinobactérias apresentam grande potencial biotecnológico, torna-se interessante estudar o potencial antimicrobiano de actinobactérias isoladas desse ambiente.

Considerando as aplicações na bioindústria o presente trabalho teve como objetivo analisar o potencial antimicrobiano de actinobactérias isoladas de *Sorghum* sp. frente a microrganismos de interesse clínico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Sorghum* sp. (sorgo)

O sorgo é uma planta de origem africana, e, embora seja uma cultura muito antiga, seu desenvolvimento se deu em diversas regiões no mundo somente no final do século XIX. Esta planta é uma opção de cultivo, devido à sua grande resistência a períodos de estiagem, e tem sido muito utilizada na produção de silagem. Nos países em desenvolvimento, o sorgo é muito usado na alimentação humana, enquanto que, em países desenvolvidos, é empregado basicamente na alimentação animal (ROSA, 2012).

Com relação as espécies forrageiras que podem ser ensiladas, o sorgo se destaca, em razão, de ser um alimento de alto valor nutritivo, que possui elevada concentração de carboidratos solúveis essenciais para adequada fermentação láctica, além de altos rendimentos de matéria seca por unidade de área (SILVA; RESTLE, 1993). É portanto, uma excelente fonte de energia para os animais, podendo ser utilizado como planta *in natura*, como silagem, como feno, na produção de grãos (BUSO *et al.*, 2011).

O sorgo possui grande importância do ponto de vista econômico e fitotécnico, devido, apresentar baixos custos por hectare cultivado, o que representa menores riscos ao produtor rural. Com relação ao manejo, é adaptável aos diferentes agroecossistemas, em função de apresentar tolerância a condições climáticas adversas (RODRIGUES *et al.*, 2014). Ele apresenta, também, tolerância moderada a altas concentrações salinas provenientes do solo ou da água, por possuir capacidade adaptativa diferenciada. Esta capacidade possui varias utilidades e permite a utilização dessa espécie de forma a obter bons rendimentos (AQUINO *et al.*, 2007).

2.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, de forma harmônica, onde recebem alimento e promovem sua proteção. Evolutivamente, as plantas tem desenvolvido mecanismos adaptativos e muitos destes apenas são possíveis graças às interações com os microrganismos (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). Estes microrganismos podem ser

definidos também como, aqueles que colonizam o interior dos tecidos de plantas terrestres e aquáticas, não causando, aparentemente, sintomas de doenças (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002)

Nesta relação simbiótica a planta proporciona nutrientes, proteção e substrato. Os microrganismos, por sua vez, apresentam um metabolismo secundário diverso, que podem conferir proteção contra patógenos e seres herbívoros, e até mesmo influenciar no desenvolvimento, crescimento e produtividade de seu hospedeiro, aumentando, assim, sua adaptabilidade e competitividade no meio ambiente (GUNATILAKA, 2006; GUO *et al.*, 2008).

Segundo Stierle *et al.*(1993), os microrganismos endofíticos são produtores de substâncias bioativas que podem estar relacionadas a afinidade endófito - hospedeiro, como a exemplo do taxol, produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* e pela planta hospedeira *Taxus brevifolia*. Desta forma, os metabólitos apresentam grande aplicabilidade em vários setores como na medicina, agricultura e indústria.

2.3. ACTINOBACTÉRIAS

2.3.1. Aspectos gerais

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas, sendo em sua maioria filamentosas e com alto teor de citosina e guanina em seu DNA (OLIVEIRA, 2003). Estas estão classificadas na ordem Actinomycetales e morfologicamente possuem células filamentosas curtas, ao molde das observadas nas famílias Actinomycetaceae e Mycobacteriaceae. Em outros membros da ordem, os filamentos se fragmentam e, por conseguinte só podem ser observados em um determinado estágio do ciclo de crescimento. São bactérias cosmopolitas, encontradas principalmente no solo, no entanto, podem também estar presentes em ambientes aquáticos e em associação com líquens e plantas (SILVA-VINHOTE *et al.*, 2011; GONZALES *et al.*, 2005). Estas bactérias são afetadas pela localização geográfica, temperatura, tipo de solo, pH, teor de matéria orgânica, tipo de cultivo, aeração e umidade (ARIFUZZAMAN *et al.* 2010).

O filo Actinobactéria inclui várias espécies que, por sua vez, adotam diferentes estilos de vida: patógenos (*Corynebacterium* spp, *Mycobacterium* spp, *Nocardia* spp, *Propionibacterium*s spp e *Tropheryma* spp), saprófitos

(*Micromonospora* spp e *Streptomyces* spp), comensais vegetais (*Frankia* spp) e comensais gastrointestinais (*Bifidobacterium* spp) (BARKA *et al.*, 2016).

A morfologia dos microrganismos desse imenso filo é muito variável. Podem-se notar formas como a cocóide (*Micrococcus*), cocobacilar (*Arthrobacter*), aquelas em que ocorre fragmentação da hifa (*Nocardia* spp.), e outras que podem ser altamente diferenciadas em um micélio ramificado (*Streptomyces*), contudo que podem não formar uma porção aérea (*Actinoplanes*) (VENTURA *et al.*, 2007).

No que concerne ao micélio destas bactérias, estes consistem de células procarióticas longas com vários nucleóides (EMBLEY; STACKEBRABDT, 1994). O micélio é uma vantagem para o microrganismo, pois ele tem a capacidade de aderir ou penetrar em tecidos e ajudam a secretar enzimas e outros metabólitos. Com a aproximação do micélio aos substratos, o microrganismo precisa secretar apenas uma quantidade pequena de enzima para atingir níveis efetivos (CHATER, 2006).

A grande importância das actinobactérias no ambiente está relacionado ao seu papel na degradação de matéria orgânica. Apresentam atividade proteolítica, e importante função na decomposição de queratinas, quitinas, celulosas, amido e, também, no ciclo de aminoácidos e nitrogênio (CHATER, 2006; KENNEDY, 1999). Estas bactérias são responsáveis por produzir uma diversificada gama de metabólitos secundários com propriedades medicinais, incluindo, antibióticos, antitumorais, agentes imunossupressores e hormônios de crescimento (FIEDLER *et al.*, 2005; STROBEL *et al.*, 2004).

2.3.2. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são compostos não essenciais para o crescimento e reprodução dos diferentes organismos vivos, sendo derivados dos metabólitos primários. Entre estes compostos encontram-se antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes antitumorais, ferormônios e promotores de crescimento de animais e plantas (DEMAIN, 1992).

O metabolismo secundário microbiano tem propiciado intensas pesquisas com substâncias bioativas que podem ser usadas em medicina. Muitas destas substâncias são antibióticos que possuem inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e na agricultura. As riquezas de recursos químicos naturais disponíveis

como resultado das atividades metabólicas secundárias dos organismos são enormes (WOODRUFF, 1980).

As actinobactérias, por sua vez, produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, provavelmente refletindo as diferenças de habitats e estratégias de sobrevivência dos mesmos (HARVEY, 2000). Estas bactérias constituem um dos mais prolíficos quanto à produção de metabólitos secundários, compostos gerados no decorrer do desenvolvimento que, tornam esses organismos especialmente aplicáveis do ponto de vista biotecnológico. Na maior parte das vezes, essas biomoléculas exibem interessantes atividades biológicas, sendo a antibiótica a mais explorada e conhecida, proporcionando um versátil emprego das mesmas na medicina, indústria e agricultura (GROTH *et al.* 1999; WOHLLEBEN *et al.* 2012).

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O marco da quimioterapia microbiana ocorreu com o descobrimento da penicilina, substância produzida por um fungo do gênero *Penicillium*, cuja capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming, no ano de 1928. Porém, seu emprego em larga escala só teve início na década de 1940. O grande impacto do uso penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala. Assim, iniciou-se a exploração dos microrganismos como fonte de substâncias biologicamente ativas, principalmente na busca de novas substâncias com atividade antibiótica (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Pesquisas recentes apontam que os antibióticos partilham um mecanismo comum para acarretar a morte celular, o que estaria relacionado à elevação da concentração de radicais hidroxilas reativos resultantes de alterações no metabolismo central e de ferro, de modo bem similar à apoptose eucariótica (DWYER *et al.* 2012). Entre todas fontes de produtos naturais, os microrganismos possuem destaque, sendo que, dentre todos os agentes antibacterianos que foram aprovados pelo *Food and Drug Administration (FDA)* entre 1981-2014, 73% são derivaram de microrganismos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

As actinobactérias produzem vários tipos de moléculas antibióticas, as quais possuem aplicações industriais, na agricultura, medicina e veterinária, como estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, novobiocina, vancomicina, nistatina e anfotericina B (SILVA-LACERDA *et al.*, 2016). Neste contexto, Barka *et al.* (2016), acrescentam que o gênero *Streptomyces* possui grande importância do ponto de vista biotecnológico, devido englobar produtores de enzimas de aplicação industrial e antibióticos comerciais, como a estreptomicina. Além disso, é o gênero mais conhecido dentre as actinobactérias, incluindo mais de 3.000 espécies identificadas.

A resistência microbiana é uma realidade cada vez mais preocupante, e várias estratégias têm sido desenvolvidas para diminuir o aparecimento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos disponíveis atualmente.

De acordo com Wannmacher (2004), um microrganismo resistente é aquele capaz de se multiplicar em presença de concentrações de antimicrobianos superiores as doses terapêuticas. A resistência bacteriana é uma grave problema, devido aos antibióticos constituírem medicamentos que influenciam não apenas o paciente em tratamento, afetando também todo o ambiente em que ele está inserido, com repercussões profundas, inclusive na comunidade (AVORN; SOLOMON, 2000). A descoberta não só de novos fármacos antimicrobianos, mas de novos mecanismos de ação deverão apresentar vantagens no combate a microrganismos resistentes, além da emergência de novos patógenos (GUIMARÃES *et.al.*, 2010).

Assim, a busca de microrganismos potencialmente produtores de substâncias antimicrobianas em ambientes pouco explorados, baseado no conhecimento sobre as relações simbióticas realizadas por microrganismos endofíticos que resulta na produção de metabólitos bioativos, conferindo proteção à planta, se apresenta como uma estratégia importante de bioprospecção.

3. METODOLOGIA

3.1. TIPO DE ESTUDO

A pesquisa foi de base descritiva, experimental e quanti-qualitativa. A parte experimental do presente trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará.

3.2. MICRORGANISMOS

Foram analisadas 41 actinobactérias procedentes do acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, as quais foram isoladas do silo de *Sorghum* sp. (sorgo). Estas bactérias estão atualmente preservadas em óleo mineral e foram reativadas pelo cultivo em meio International *Streptomyces* Project nº2- ISP2 durante 7 dias a 30°C para ativação metabólica.

Posteriormente foi realizado o cultivo em placas de Petri contendo o meio ISP2, nas mesmas condições apresentadas anteriormente, até a completa colonização da superfície do meio de cultura.

3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGÔNICA

3.3.1. Microrganismos teste

Para os testes de atividade antagônica, foram utilizadas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, todos microrganismos de referência (ATCC), pertencentes ao acervo da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará, e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Microrganismos teste utilizados no ensaio de antagonismo.

BACTÉRIAS	
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458)
Gram negativas	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC19429)

FUNGOS

Leveduriforme

Candida krusei (ATCC6258)

Os microrganismos teste encontram-se conservados em óleo mineral e foram reativados após cultivo nos meios apropriados. Posteriormente, foi preparada a suspensão microbiana em solução salina, padronizando o inóculo com a escala de 0,5 MacFarland, correspondendo a 10^4 esporos/mL (fungo) e 10^8 UFC/mL (bactérias).

3.3.2. Método de difusão em Ágar - Bloco de gelose

A atividade antagônica foi realizada através do método de difusão em ágar (ICHIKAWA *et al.*, 1971) (Figura 1). Foram recortados blocos circulares de 8 mm de diâmetro do meio de cultura ISP2 contendo as colônias de actinobactérias e transferidos para placas contendo os meios Ágar Müeller-Hinton (MHA) e Ágar Sabouraud (SDA), previamente inoculados com 100 µL da suspensão de bactérias e fungos, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C, quando bactérias, e a 30°C, quando leveduras, por 24 e 48 horas, respectivamente. O aparecimento de uma zona clara em volta dos blocos contendo as colônias de actinobactérias, indicaram a produção de substâncias antimicrobianas e, portanto, proporcionarão o aparecimento de um halo de inibição de crescimento do microrganismo patogênico. Foi avaliado o diâmetro do halo de inibição, em milímetros, e a intensidade da atividade antimicrobiana foi classificada segundo a escala de Matsuura (2004) (Tabela 2).

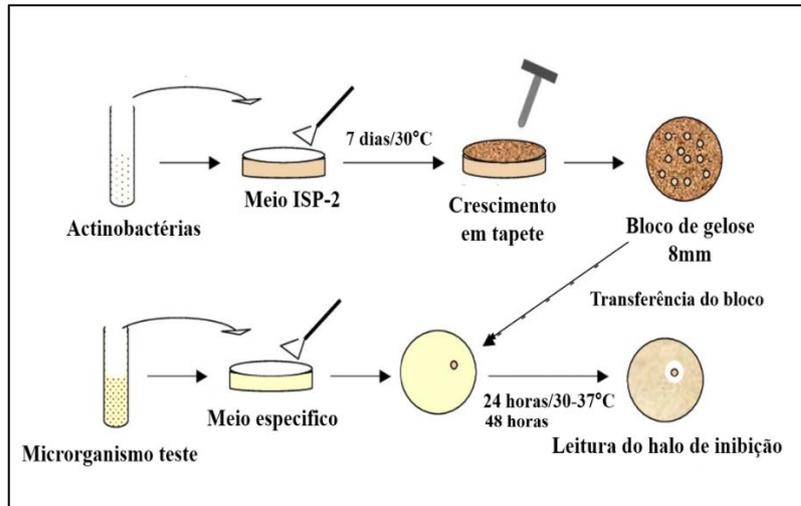


Figura 01. Técnica de bloco de gelose.

Fonte: (Adaptado de SILVA, 2006).

Tabela 2: Classificação do grau de atividade antimicrobiana em função do diâmetro dos halos de inibição (adaptado de MATSUURA, 2004).

Grau de atividade antimicrobiana	Diâmetro dos halos de inibição (em mm)
Ausente	-
Baixa	9 – 10
Moderada	11 -14
Alta	>14

3.3.3. Análise dos dados

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram analisados quanto à presença ou ausência de halo de inibição (análise qualitativa). Para a análise quantitativa realizou-se análise estatística descritiva (média e desvio padrão).

4 RESULTADOS

Do total de actinobactérias endofíticas avaliadas quanto a atividade antimicrobiana, 17(41,4%) foram ativas contra pelo menos um dos microrganismos patogênicos avaliados. Um total de 4(9,8%) apresentaram atividade antimicrobiana contra um único patógeno, enquanto que 14(36,8%) apresentaram atividade antimicrobiana contra dois ou três patógenos, sendo eles *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* e *Pseudomonas aeruginosa*. As actinobactérias que apresentaram atividade contra mais de um microrganismo patogênico, 4(9,8%) foram ativas contra *Staphylococcus aureus* e *Candida krusei*, 4(9,8%) contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e 6(14,6%) foram ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Candida krusei* e *Pseudomonas aeruginosa*, simultaneamente (Tabela 3).

No geral, 10(24,4%) actinobactérias foram ativas contra *S. aureus*, 12(29,3%) contra *C. krusei* e 16(39%) inibiram *P. aeruginosa*. Dentre os microrganismos teste, apenas *E.coli* foi resistente aos metabólitos produzidos por todos os isolados. A análise antimicrobiana foi realizada em triplicata e a média dos halos de inibição variaram de 8,8 a 22mm (Tabela 3).

Os maiores halos de inibição foram encontrados frente a *P. aeruginosa*, com halos de inibição entre 11 e 22mm de diâmetro e contra *C. krusei* com halos de inibição entre 9 e 19mm (Tabela 4). Os halos de inibição para os demais microrganismos teste foram entre 8,8mm e 12mm de diâmetro para *Staphylococcus aureus*, e nenhuma actinobactéria foi ativa contra *E.coli*. Os maiores halos de inibição foram obtidos das cepas Sil 4B (21,6mm), Sil 8A (21,3mm), frente a *P. aeruginosa* e Sil 27 (19mm) Sil 40 (16mm) frente a *C.krusei* (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de actinobactérias endofíticas de *Sorghum* sp. (sorgo) avaliada pela técnica de bloco de gelose (ICHIKAWA *et al.*, 1971).

Código	Gênero	Halos de inibição (mm)*		
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. krusei</i>
Sil 1 A	<i>Streptomyces</i> sp.	-	13,3±1,15	-
Sil 4B	<i>Streptomyces</i> sp.	-	22±0,76	13,7±0,29
Sil 6	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	10,3±1,53
Sil 8 A	<i>Streptomyces</i> sp.	-	21±2,02	14,5±3,91
Sil 8B	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	9
Sil 21B	<i>Streptomyces</i> sp.	10±0,50	12±0,50	15,2±1,26
Sil 21C	<i>Streptomyces</i> sp.	10±0,58	13±0,58	-

Sil 25	<i>Streptomyces</i> sp.	-	13	-
Sil 26H	<i>Streptomyces</i> sp.	9,3±0,29	13,7±1,15	13,5±2,18
Sil 27	<i>Streptomyces</i> sp.	9,6±0,58	15±1,00	18,7±1,61
Sil 29	<i>Streptomyces</i> sp.	8,8±0,29	19±1,04	-
Sil 31	<i>Streptomyces</i> sp.	9,3±1,04	14±0,76	13,5±1,73
Sil 32 A	<i>Streptomyces</i> sp.	8,8±0,58	12±0,50	14,5±1,00
Sil 35	<i>Streptomyces</i> sp.	12±1,15	15±0,58	-
Sil 37	<i>Streptomyces</i> sp.	8,8±0,29	12±0,50	14±0,58
Sil 39	<i>Streptomyces</i> sp.	-	18±2,25	12,3±2,75
Sil 40	<i>Streptomyces</i> sp.	-	11±1,0	16

*Valores de média e Desvio Padrão.

No que concerne a intensidade da atividade antimicrobiana, foram classificados como alto grau de atividade 19,5% dos halos de *P. aeruginosa* e 9,8% dos halos de *C. krusei* e como grau moderado 4,9% dos halos de *S. aureus*, 19,5% de *P. aeruginosa* e 14,7% dos halos de *C. krusei* (tabela4).

Tabela 4: Classificação do grau de atividade antimicrobiana de actinobactérias endofíticas de *Sorghum* sp. (sorgo) segundo a Classificação de Matsuura (2004).

Grau de atividade antimicrobiana	Diâmetro dos halos de inibição (em mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. krusei</i>
	N (%)	N (%)	N (%)
Ausente	31(75,6)	25 (61)	29 (70,7)
Baixa	8(19,5)	0 (0)	2 (4,9)
Moderada	2 (4,9)	8 (19,5)	6 (14,7)
Alta	0 (0)	8 (19,5)	4 (9,8)

Discussão

Esse estudo baseou-se na estratégia de bioprospecção preliminar de metabólitos com atividades antimicrobianas, a fim de buscar novos compostos com tal atividade. O grupo selecionado de microrganismos para essa pesquisa foram as actinobactérias.

Segundo Clardy et al (2009), as actinobactérias são as maiores produtoras de antibióticos, como, por exemplo, Streptotricina, Estreptomina e Tetraciclina.

Semêdo e colaboradores (2011) sugerem a existência de uma alta diversidade de actinobactérias em solos tropicais, sendo estes pouco pesquisados sob o aspecto microbiológico. O fato de o bioma Amazônia ser tão pouco estudado quanto à estrutura de suas comunidades bacterianas e a descoberta de isolados de

Actinobacteria não comumente relatados reforça a necessidade de trabalhos centrados nesse sentido. Estes podem sustentar iniciativas novas visando à conservação desse macrobioma e, principalmente, o aproveitamento de uma vasta e inexplorada gama de potencialidades biotecnológicas a partir dos microrganismos que o habitam.

De um modo geral, a varredura por essas bioatividades foi sistematizada em práticos ensaios de triagem, na literatura comumente se observa duas opções metodológicas para essa varredura inicial da ação antagonista: o método de blocos de gelose de ágar ou a técnica de estria cruzada (Arifuzzaman et al. 2010). Foi preferida a primeira em vista da possibilidade de mensurar de modo mais exato os diâmetros dos halos de inibição do crescimento dos microrganismos. Além de uma análise de caráter quantitativo parcial poder ser atribuído ao teste, mediante a comparação das inibições obtidas com os valores definidos do tamanho das mesmas, como estabelecido segundo Matsuura (2004).

Zitouni e colaboradores (2015) sugerem que os actinobactérias possuam uma característica de gradação decrescente de sua atividade inibitória, conforme a seguinte escala: bactérias gram-positivas > fungos > bactérias gram-negativas. Resultado diferente foi observado no presente trabalho, em que foi evidenciado alto potencial para inibição de bactéria Gram negativa (*P. aeruginosa*) sendo este maior do que os encontrados para gram-positiva (*S. aureus*).

5 CONCLUSÃO

Diante dos dados obtidos, comprovamos o potencial do bioma Amazônia, ambiente pouco conhecido quanto a sua microbiota, detentor de substâncias bioativas com atividade antimicrobiana promissora.

Os resultados confirmam que actinobactérias do gênero *Streptomyces* sp. endofíticas de *Sorghum* sp. apresentam-se como uma fonte potencial na produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias Gram-negativas e fungos leveduriformes.

REFERÊNCIAS

AQUINO, A. J. S.; LACERDA, C. F.; GOMES-FILHO, E. Crescimento, partição de matéria seca e retenção de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ em dois genótipos de sorgo irrigados com águas salinas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2007, 31, 961-971.

ARIFUZZAMAN, M; KHATUN, M.R.; RAHMAN, H. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.4615- 4619, 2010. Disponível em: < <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82733> > . Acesso em 2 de ago de 2017

A VORN, J.; SOLOMON,D.H.; **Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use: the non-pharmacologic basis of therapeutics.** Ann. Inten, Med. V. 33, p.128 - 135, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10896639> > . Acesso em 10 de ago de 2017

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAUVAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, G. P. V. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BUSO, W.H.D.; MORGADO, H.S.; SILVA, L.B.; FRANÇA, A.F.S. **Utilização do sorgo forrageiro na alimentação animal.** PUBVET, 5, 23, 1145, 2011.

CHATER, K.F. Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 361, p. 761-798, 2006.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.; CURRIE C. **Current Biology.**, 19(11):437–441. 2009

COELHO, R.R.R; NASCIMENTO, R. P. **Seleção de actinomicetos produtores de interesse biotecnológico.** In: BOM, E.P.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R.R.R(org.). Enzimas em biotecnologia. Produção, aplicações em mercado. Rio de Janeiro: Editora interciencia toda,. P. 71-94, 2008.

DA SILVA, R.E.A. Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticos isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (rabo-de-raposa). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 3, n. 2, p. 181, 2006.

DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. In: DEMAIN, A. **Secondary metabolites: their function and evolution.** Chichester: J. Wiley. 1992. p. 3-23. (Ciba Foundation Symposium, 171).

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, Vol. 33, p. 486-495, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402247> > . Acesso em 5 de ago de 2017

DWYER DJ, CAMACHO DM, KOHANSKI MA, CALLURA JM, COLLINS JJ. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Mol Cell** 46: 561-572, 2012.

EMBLEY, T.M.; STACKEBRABDT, E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 48, p. 257-289, 1994.

FIELDLER, H.P. *et al.* **Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete verrucospora.** *Jantibiotic*. V.61, pág. 158-163, 2005.

FREITAS, A. D. G., SOUZA, A. Q. L., MAKI, C. S., PEREIRA, J. O., & SILVA, N. M. (2016). Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o fungo simbionte *L. gongylophorus*, e dos fungos associados presentes nos ninhos de *Atta sexdens*. *Sci Amazon*, 5, 1-14.

GOLINSKA, PATRYCJA, *et al.* **"Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity."** *Antonie Van Leeuwenhoek* 108.2 (2015): 267-289.

GONZALES, I., AYUSO-SACIDO, A.ANDERSON, A., GENILLOUD, O. **Actinomycetes isolated from lichens:** Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54,401-15,2005 Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.femsec.2005.05.004/abstract> > . Acesso em 3 de set de 2017

GROTH I, VETTERMANN R, SCHUETZE B, SCHUMANN P, SAIZ-JIMENEZ C. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Meth* 36: 155- 122.

GUIMARÃES,D.O; MOMESSO,L.S.; PUPO,M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Revista Química Nova*, V.33, n.03, p. 667-679, 2010.

GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUO, B., *et al.* **Bioactive natural products from endophytes:** a review. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, v. 44, n. 2, p. 153-158, 2008. Disponível em: < <http://mbbsdost.com/Guo-B-et-al/-et-al/18390882>> . Acesso em 5 de ago de 2017

HARBORNE, J. B. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.* Springer Science & Business Media, 1998. ISBN 0412572702.

HARVEY, A. *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products.* **DDT**, Brasília, v. 5, p. 294-300,2000.

ICHIKAWA T, DATE M, ISHIKURA T & OZAKI A Improvement of kasugamycin-producing strain by agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol** 16: 218–224, 1971.

Kadiri, S., N. Yarla, and S. Vidavalur. "Screening and isolation of antagonistic actinobacteria associated with marine sponges from Indian coast." **J Med Biochem Technol** S 8.003 2014.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in **agroecosystems.** **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

KOHANSKI MA, DWYER DJ, HAYETE B, LAWRENCE CA, COLLINS JJ. **A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics.** *Cell* 130: 797-810, 2007. Disponível em: < http://www.mbio.ncsu.edu/MJC/old/20072008/Rebecca_slides.pdf > . Acesso em 21 de ago de 2017

LIMA, S. M. D. A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de Paulinia. cupana Kunth.** (2013).

METZ, H. **Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations.** *Naturwissenschaften*, v. 48, p. 569-570, 1961

NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OLIVEIRA, M. F. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem.** Programa de pós-graduação microbiologia agrícola do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre- SP, 2003

PEIXOTO-NETO,P.A.S; AZEVEDO,J.L.;CA ETANO,L.C. - **Microrganismos endofíticos em plantas: Status atual e Perspectivas** - Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica. V.3 N. 004 Santiago, Chile,p 69 -72, 2004. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/pdf/856/85630404.pdf> > . Acesso em 21 de ago de 2017

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO,J.L.; ARAÚJO,W.L.; **Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico.** *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* V.29, p. 62 -76, 2002. 75

RODRIGUES, F.; MAGALHÃES, J.V. de; GUIMARÃES, C.T.; TARDIN, F.D.; SCHAFFERT, R.E. Seleção de linhagens de sorgo granífero eficientes e responsivas à aplicação de fósforo. **Pesq. agropec. bras.**, v.49, n.8, p.613-621, 2014

ROSA, W.J. **Cultura do sorgo.** Departamento Técnico da Emater–MG, 2012

Savi, D. C., *et al.* **"16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus Microbispora."** *Antonie van Leeuwenhoek* 109.6: 801-815. 2016

SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K. Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **Journal of Chromatography A**, v. 587, n. 2, p. 351-354, 1991. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301745255> > . Acesso em 5 de ago de 2017

SÊMEDO LTAS, LINHARES AA, GOMES RC, MANFIO GP, ALVIANO CS, LINHARES LF, COELHO RRR. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. **Microbiol Res** 155: 291-299, 2011.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M. ; HOFFMEISTER, D. In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234-242, 2008.

SHIRLEY, A. D., DAYANAND, A., SREEDHAR, B., & DASTAGER, S. G. (2010). Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized from novel *Streptomyces* species. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 5(2), 447-451.

SILVA, L.C.R.; RESTLE, J. **Avaliação do milho (*Zea mays* L.) e do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) para produção de silagem.** In: reunião anual da sociedade brasileira

de zootecnia, 30., 1993, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.467

SILVA-LACERDA, G. R.; SANTANA, R. C. F.; VICALVICOSTA, M. C. V.; SOLIDÔNIO, E. G.; SENA, K. X. F. R.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga Biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.

SILVA-VINHOTE, N. M., MARINHO-PEREIRA, T., ASTOLFI-FILHO, S., MATSUURA, T. Taxonomic characterization and antimicrobial activity of actinomycetes associated with foliose lichens from amazonian ecosystems. **Australian J. Basic appl. Sci.** 5, 910-918,2011.

SILVA, F. de A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. Principal components analysis in the *software* Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Orlando. *Proceedings...* Reno, NV: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. 1CD-ROM.

SOLECKA, J.; ZAJKO, J.; POSTEK, M.; RAJNISZ, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Central European Journal of Biology.** 2012;7(3):373-90

SOUZA, I. F. **Prospecção de substâncias com atividade antagonista a *Candida albicans* produzida por bactéria endofítica da região amazônica.** 2016. Disponível em: < <http://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5549> > . Acesso em 10 de set de 2017

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; Science, 260, 214, 1993.

STROBEL, G. *et al.* **Natural products from endophytic microorganisms.** J. Nat. Prod. v.67, pág. 257–268, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, R. X. ; ZOU, W. X. **Endophytes:** a rich source of functional metabolites. Natural Product Reports, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001

VENTURA M, CANCHAYA C, TAUCH A, CHANDRA G, FITZGERALD GF, CHATER KF, VAN SINDEREN D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiol Mol Biol Rev** 71: 495-548, 2007

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science & Business Media, 1996. ISBN 3540586768.

WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, **ASM Press:** Washington, 2003

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana:** uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos- temas selecionados. V. 1 N. 4 Brasília, 2004.

WOHLLEBEN W, MAST Y, MUTH G, ROTTGEN M, STEGMANN E, WEBER T. Synthetic biology of secondary metabolite biosynthesis in actinomycetes: engineering precursor supply as a way to optimize antibiotic production. **FEBS Lett** 586: 2171-2176, 2012.

WOODRUFF, M. B. Productivity and species richness across an environmental gradient dependent ecosystem. **Science** 80, Washington, p. 1225-1229, 1980.

ZITOUNI A, BOUDJELLA H, LAMARI L, BADJI B, MATHIEU F, LEBRIHI A, SABAOU N. Nocardiosis and Saccharothrix genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Res Microbiol** 156: 984-986, 2015.