



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

**Taxonomia e Triagem da Atividade Antimicrobiana
e Antitumoral de Actinomicetos Raros Isolados de
Tocoyena formosa (Cham. et Sch) K. Shun**

Ana Paula Trovatti Uetanabaro, MSc.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos

Co-orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de

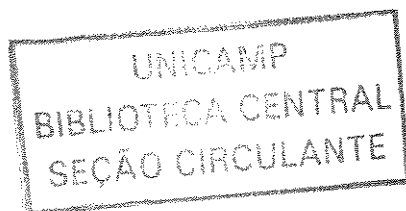
Doutor em Ciência de Alimentos.

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Ana Paula Trovatti Uetanabaro,
aprovada pela Comissão Julgadora
em 16 de fevereiro de 2004.

2004

Campinas, 16 de fevereiro de 2004.



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
Presidente da Banca

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
Ue7t
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 57790
PROC 16-117-04
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 17/04/2004
Nº CPD _____

CMOC196178-9

BIBID 316214

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Uetanabaro, Ana Paula Trovatti
Ue7t Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e
antitumoral e actinomicetos raros isolados de *Tocoyena*
formosa (Cham. et Sch) K. Shun / Ana Paula Trovatti
Uetanabaro. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Vanderlei Perez Canhos
Co-orientador: Gilson Paulo Manfio
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Microbiologia - Classificação. 2.Tumores.
3.Bactérias. 4.Antibióticos. 5.Endofíticos. I.Canhos,
Vanderlei Perez. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora



Dr. Vanderlei Perez Canhos (Orientador)



Dr. João Ernesto de Carvalho (Titular)



Dr. João Lúcio de Azevedo (Titular)



Dra. Lara Durães Sette (Titular)



Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte (Titular)

Dra. Valéria Maia de Oliveira (Suplente)

Dra. Helena Teixeira de Godoy (Suplente)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais:

Vossa força e carinho me inspiram.

E a Antonio, meu grande companheiro.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos pela confiança.

Ao Dr. Gilson Paulo Manfio pela orientação.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas valiosas correções e sugestões.

À Dra. Vanderlan S. Bolzani, Dr. José Alberto Cavalheiro e Lidilhone Hamerski, do Departamento de Química Orgânica da UNESP de Araraquara, pelo trabalho em colaboração e valiosas sugestões.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo e à Rosely dos Santos, do Centro Nacional de Pesquisas do Meio Ambiente da EMBRAPA, pela colaboração e fotos de microscopia eletrônica.

Ao Dr. João Ernesto de Carvalho e Luciana Kohn pela colaboração com os estudos de atividade antitumoral.

À Dra. Marta C. Teixeira Duarte e Dr. Alexandre Nunes Ponezi pela liofilização das amostras.

À Dra. Lúcia Durhan pelo apoio.

Às meninas da CBMAI/UNICAMP que muito me ajudaram: Valéria, Fabiana, Ana Paula e Patrícia.

Aos meus valiosos amigos conhecidos nesta etapa: Hélio, Maria Gabriela e Flávio, Ana Maria e Ezequias, Manuela, Fernanda, Aline, Cléber, Daniel, Lara, por tornarem estes últimos anos muito mais alegres.

Um agradecimento especial aos meus grandes amigos Ani e Takeshi pelo companheirismo e ensinamentos.

Aos meus primos queridos: Marcos, Cris e Felipe, Fernando, Débora e Vinícius, Lu e Kim, pela afetuosa companhia nas horas de lazer.

Ao tio Massao e tia Néia pelo incentivo.

Aos meus pais Issao e Mariza e aos meus sogros Jarbas e Inez, à “conhadi” Dahir, aos meus irmãos Biba, Deco e Gu, por todo o carinho e apoio.

Ao meu esposo Antonio.

ÍNDICE ANALÍTICO

ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Tocoyena formosa</i>	3
2.2. Biologia dos actinomicetos	3
2.2.1. Metabolismo secundário de actinomicetos	6
2.2.2. Compostos bioativos produzidos por actinomicetos	7
2.3. Microrganismos endofíticos	9
2.3.1. Importância ambiental e aplicação biotecnológica de microrganismos endofíticos.....	11
2.3.2. Actinomicetos endofíticos.....	13
2.4. Taxonomia e identificação de actinomicetos	15
2.4.1. Sistemática molecular de <i>Actinomycetes</i>	17
2.4.2. Sistemática do gênero <i>Microbispora</i>	17
OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO I – Isolamento e taxonomia polifásica de actinomicetos raros isolados de <i>Tocoyena formosa</i> (Cham. et Sch) K. Shun	25
Resumo	25
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Materiais e Métodos	28
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões	59

CAPÍTULO II – Atividade antimicrobiana de actinomicetos raros cultivados em diferentes meios	61
Resumo	61
Abstract.....	62
Introdução.....	62
Materiais e Métodos.....	63
Resultados e Discussão.....	64
Conclusões	73
CAPÍTULO III – Detecção da atividade antitumoral de actinomicetos endofíticos isolados de <i>Tocoyena formosa</i>.....	75
Resumo	75
Abstract.....	76
Introdução.....	76
Materiais e Métodos.....	77
Resultados e Discussão.....	79
Conclusões	87
CONCLUSÕES GERAIS.....	89
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO. Ensaio de inibição de células tumorais humanas	109

ÍNDICE DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Substâncias produzidas por <i>Microbispora</i> com atividade antitumoral descritas na literatura	8
Tabela 2. Espécies do gênero <i>Microbispora</i>	21
Tabela 3. Compilação da porcentagem da média de hibridação DNA-DNA e similaridade das seqüências de 16S DNAr de algumas espécies de <i>Microbispora</i>	22

CAPÍTULO I – Isolamento e taxonomia polifásica de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun

Tabela 1. Identificação das plantas e número de microrganismos isolados.....	33
Tabela 2. Características bioquímicas diferenciais de espécies do gênero <i>Microbispora</i> (Holt <i>et al.</i> , 1994) e dos microrganismos isolados neste estudo	37
Tabela 3. Classificação dos microrganismos isolados quando aos perfis de ARDRA gerados.....	45
Tabela 4. Compilação dos resultados das análises filogenéticas mostrando a presença e a robustez dos grupos que ocorreram em pelo menos duas análises distintas (evidenciados em cinza) e respectivos valores de <i>bootstrap</i> (1000 replicações)	57

CAPÍTULO III – Detecção da atividade antitumoral de actinomicetos endofíticos isolados de *Tocoyena formosa*

Tabela 1. Ensaio de inibição dos produtos metabólicos de isolados de <i>Microbispora</i> sp. contra diferentes linhagens de células tumorais	81
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Fotos ilustrativas de <i>Tocoyena formosa</i>	5
---	---

CAPÍTULO I – Isolamento e taxonomia polifásica de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun

Figura 01. Micromorfologia dos isolados APU-27 (a; 400 X) e APU-30 (b; MEV) em meio ISP-2.	35
Figura 02. Ensaio de hidrólise de amido de alguns isolados selecionados	35
Figura 03. Aspecto do crescimento dos isolados APU-04 e APU-57 em meio ISP-2 nas temperaturas de (a) 25 e (b) 35 °C.....	35
Figura 04. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima <i>Hae</i> III.....	39
Figura 05. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima <i>Msp</i> I.....	41
Figura 06. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima <i>Rsa</i> I.....	41
Figura 07. Perfil de ARDRA do DNAr 16S e região espaçadora DNAr 16S-23S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima <i>Alu</i> I.....	43
Figura 08. Árvore resultante da análise de distância (<i>Neighbour Joining</i>).....	49
Figura 09. Árvore resultante da análise de verossimilhança máxima.....	51
Figura 10. Árvore de consenso estrito resultante da análise de parcimônia.....	53
Figura 11. Árvore de consenso estrito resultante da análise bayesiana.....	55

CAPÍTULO II – Atividade antimicrobiana de actinomicetos raros cultivados em diferentes meios

Figura 1. Atividade antimicrobiana de 47 isolados de microbisporas cultivados em diferentes meios de cultura sólidos sobre bactérias e fungos.....	67
Figura 2. Ensaio de atividade antimicrobiana de isolados de <i>Microbispora</i> sp. cultivados em meio AP contra <i>Bacillus subtilis</i> CCT 0089 (a), <i>Escherichia coli</i> CCT 1457 (b) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCT 1476 (c).	67
Figura 3. Análise cromatográfica dos produtos metabólicos do isolado APU-30 em diferentes meios de culturas	71

CAPÍTULO III – Detecção da atividade antitumoral de actinomicetos endofíticos isolados de *Tocoyena formosa*

Figura 1. Porcentagem de isolados microbianos que apresentaram atividade citostática mínima de 50% em pelo menos uma das diluições testadas sobre diferentes linhagens tumorais humanas 85

RESUMO

Quarenta e cinco linhagens de actinomicetos foram isoladas de folhas de 10 indivíduos de "olho-de-boi" (*Tocoyena formosa*, Rubiaceae), coletadas em uma área de cerrado-de-transição no Horto Florestal de Araraquara (SP), utilizando-se um protocolo adaptado para o isolamento de microrganismos endofíticos. Foram realizados estudos taxonômicos polifásicos (taxonomia clássica e molecular), ensaios de atividade antimicrobiana e testes de ação antitumoral, juntamente com a análise do perfil cromatográfico do extrato do meio de cultura onde o microrganismo foi cultivado. O exame micromorfológico mostrou que os isolados produzem esporos longitudinalmente pareados no ápice de esporóforos localizados no micélio aéreo, como a maioria dos membros do gênero *Microbispora* e *Thermobispora bispora* (antigo *M. bispora*). As análises filogenéticas das seqüências do DNAr 16S indicaram que as 47 linhagens isoladas de *Tocoyena formosa* pertencem ao gênero *Microbispora* Nonomura e Ohara 1957. A maioria dos isolados se agrupou com *Microbispora rosea* subsp. *rosea*. Um único isolado se diferenciou dos demais e não pode ser classificado junto às espécies conhecidas. A análise do perfil de restrição do DNAr 16S (ARDRA) com as enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I, e do fragmento de DNAr 16S mais região espaçadora DNAr 16S-23S com a enzima *Alu* I, sugerem a ocorrência de populações heterogêneas dentro das plantas. Alguns isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Uma linhagem apresentou atividade contra *Aspergillus niger*. Os testes de atividade antimicrobiana e a análise do perfil cromatográfico dos extratos mostraram que a composição do meio de cultura interfere na produção de metabólitos secundários. Algumas linhagens exibiram atividade antitumoral citostática, porém nenhuma delas apresentou atividade citotóxica.

Palavras-chave: *Microbispora*, taxonomia polifásica, atividade antimicrobiana, atividade antitumoral

ABSTRACT

Forty-five actinomycete strains were isolated from 10 plants of *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) from a transition *cerrado* area (Horto Florestal de Araraquara, SP, Brazil), using a protocol adapted for the isolation of endophytic microorganisms. Polyphasic taxonomic, phylogenetic, antimicrobial and antitumoral assays and chromatographic characterization of culture broths were performed. Micromorphological examination showed that all isolates produced longitudinally paired spores at the end of aerial mycelium sporophores, characteristic of *Microbispora* and *Thermobispora bispora* (ex *M. bispora*). Phylogenetical analyses of 16S rDNA indicated that the 47 strains isolated from *Tocoyena formosa* belonged to the genus *Microbispora* Nonomura and Ohara 1957. The majority of isolates were grouped with *Microbispora rosea* subsp. *rosea*. One single isolate could not be classified into the known species. Data from 16S rDNA restriction analyses (ARDRA) using the enzymes *Hae* III, *Msp* I and *Rsa* I, and RFLP analysis of the 16S-23S rDNA spacer using *Alu* I, suggested the occurrence of heterogeneous populations inside the plants studied. Some isolates showed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. One strain showed activity against *Aspergillus niger*. Antimicrobial and chromatographic characterization of extracts showed that the composition of culture media influenced the production of secondary metabolites. Some strains showed cytostatic antitumoral activity, though none were cytotoxic.

Key words:: *Microbispora*, poliphasic taxonomy, antimicrobial activity, antitumoral activity

1. INTRODUÇÃO

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, filogeneticamente alocadas na Classe *Actinobacteria*. Pertencem a este grupo microrganismos de grande importância ecológica e industrial. Alguns deles são capazes de decompor compostos de difícil biodegradação, como fenóis, húmus e parafinas; enquanto outros são fixadores de nitrogênio. Na indústria, muitos compostos bioativos, tais como antibióticos, enzimas, agentes antitumorais, inibidores enzimáticos, imunomoduladores e agentes cardiovasculares são produzidos por actinomicetos.

Alguns estudos têm revelado a participação de actinomicetos na proteção de plantas contra patógenos e a influência dos produtos metabólicos destes microrganismos no crescimento e fisiologia da planta. No caso de actinomicetos endofíticos, os dados ainda são escassos e, por isso, seu potencial ecológico e industrial é ainda desconhecido.

Os actinomicetos raros compreendem as espécies e gêneros cuja frequência de isolamento pelos métodos convencionais é mais baixa do que para linhagens de *Streptomyces*, facilmente encontradas em solos e amostras ambientais. A capacidade dos actinomicetos raros de produzir diferentes antibióticos é comparável à de *Streptomyces*, concluindo-se que o isolamento e triagem destes actinomicetos podem levar à descoberta de novos antibióticos e compostos bioativos.

O presente trabalho propõe o isolamento e o estudo taxonômico polifásico de actinomicetos associados a *Tocoyena formosa*, planta nativa brasileira de ocorrência em região de Cerrado-de-transição, bem como o estudo da atividade antimicrobiana e antitumoral dos isolados, e a caracterização inicial da composição química de extratos produzidos por alguns isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Tocoyena formosa*

Tocoyena formosa (Cham. et Schlecht.) K. Schum (Rubiaceae), popularmente conhecida como “olho-de-boi” ou “marmelo preto” (Figura 1), é uma planta de ocorrência em quase todo o Brasil, podendo ser encontrada no Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo. Em outros países, podemos citar a Bolívia, Guiana Francesa, Paraguai, Suriname e Venezuela. É uma espécie que ocorre em cerrado e que se concentra, principalmente, nas regiões centro-oeste e sudeste, podendo ser encontrada na região norte, nordeste e, para o sul, chega até o Paraná (Prado, 1987). Em um levantamento das espécies de plantas do cerrado, localizado em Rio Claro, estado de São Paulo, Thomazini (1974) e Carneiro *et al.* (1998) verificaram a colonização micorrízica em várias espécies de plantas, dentre elas *Tocoyena formosa*, indicando a associação de microrganismos endofíticos com plantas desta espécie.

Tocoyena formosa é uma das quase 800 espécies de plantas que estão sendo estudadas no programa Biota/FAPESP, envolvendo pesquisadores da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, da Universidade de São Paulo (USP) e do Instituto de Botânica de São Paulo. A pesquisa consiste na triagem de plantas do Cerrado e da Mata Atlântica, com o objetivo de encontrar substâncias com atividades antifúngica (Bolzani *et al.*, 1996 e 1997), antitumoral e antioxidante.

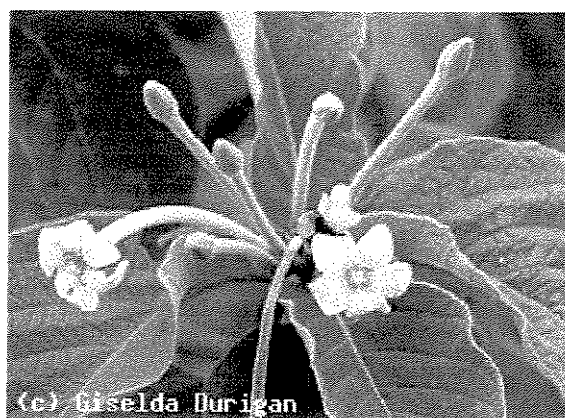


Figura 1. Fotos ilustrativas de *Tocoyena formosa*.

2.2. Biologia dos Actinomicetos

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas que possuem DNA rico em guanina e citosina (Goodfellow, 1989), filogeneticamente alocadas na Classe *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). As células dos actinomicetos têm uma organização típica de procariotos, consistindo de uma região nuclear fibrilar e um citoplasma granular com ribossomos. O citoplasma, envolvido por uma membrana típica de 7,5 a 10 nm de espessura, pode conter uma variedade de outras inclusões, geralmente grânulos de polifosfato e glóbulos de lipídeos, dependendo da espécie, da idade e do meio de cultivo utilizado. Um significativo acúmulo de poli- β -hidroxibutirato tem sido demonstrado em várias espécies de *Streptomyces*, podendo também estar presentes grãos de polissacarídeos. A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica. Entre os lipídeos mais estudados estão as menaquinonas e ubiquinonas, além da prodiginona (Minnikin e O'Donnell, 1984). O valor taxonômico das menaquinonas está relacionado com a variação do comprimento e do grau de insaturação do C3 da cadeia lateral isoprenil. A parede celular apresenta, em geral, espessura de cerca de 10 a 20 nm, variando, entretanto, consideravelmente e freqüentemente com a idade da cultura. A parede celular consiste de peptideoglicano associada a um ou mais polímeros, tais como ácidos teicóicos aniônicos e polissacarídeos neutros (Goodfellow, 1989).

Os esporos de actinomicetos podem apresentar colorações diversas, produzidos de várias formas, individualmente ou em cadeias, livres ou em estruturas especializadas ou como fragmentação de hifas. Podem, ainda, ser móveis (planósporos ou zoósporos) ou imóveis (aplanósporos ou conídios), podendo apresentar ornamentações diversas e, por isso, são considerados importantes na taxonomia dos actinomicetos (Williams e Cross, 1974; Goodfellow, 1989; Logan, 1994).

Actinomicetos são constituintes da microbiota da rizosfera (Benson e Silvester, 1993), sendo capazes de decompor a matéria orgânica em temperaturas mais elevadas, como na adubação verde, compostagem e esterqueira, e sua presença no solo pode ser detectada pela produção de odor característico de compostos terpenóides voláteis, chamados geosmina, em solos recém-arados e após chuva (Killham, 1994).

2.2.1. Metabolismo secundário de actinomicetos

Os metabólitos secundários freqüentemente apresentam estrutura química diferente dos metabólitos primários dos quais eles foram originados, tais como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Estes compostos estão envolvidos no crescimento da cultura e contrastam com a natureza dos metabólitos primários, pois são produzidos somente por algumas espécies de um gênero e somente por algumas linhagens de uma espécie. As principais vias biossintéticas envolvidas são aquelas que formam peptídeos, policetídeos, oligossacarídeos, compostos aromáticos e anéis β -lactâmicos. Sua produção ocorre melhor em taxa de crescimento sub-ótima (Demain e Fang, 1995).

O metabolismo secundário de actinomicetos pode estar associado a alterações em nutrientes e/ou diminuição da taxa de crescimento. Isto leva à geração de sinais químicos celulares que afetam a cascata dos eventos regulatórios, resultando em diferenciação morfológica (morfogênese). Em geral, o sinal é um indutor de baixo peso molecular, como a butirolactona (fator autorregulador), que age por controle negativo, isto é, ela se liga à uma proteína regulatória (proteína repressora/receptora) que impede o metabolismo secundário e morfogênese durante o rápido crescimento e presença de nutrientes (Demain e Fang, 1995).

Em geral, a glicose, uma excelente fonte de carbono para o crescimento, interfere na formação de muitos metabólitos secundários. O mesmo acontece com algumas fontes de nitrogênio favoráveis ao crescimento como, por exemplo, os sais de amônio. Fontes inorgânicas de fosfato, alguns metais e elevados níveis de oxigênio dissolvido também parecem afetar negativamente a produção de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos (Demain e Fang, 1995).

O estudo de Pfefferle *et al.* (2000) demonstrou que, para uma linhagem de *Streptosporangium* sp., o oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi um fator importante na otimização da produção de metabólitos secundários em culturas submersas. Segundo esses autores, variações extremas na aeração, no sistema de agitação e na velocidade de rotação apresentaram impacto negativo na produtividade.

2.2.2. Compostos bioativos produzidos por Actinomicetos

Os actinomicetos têm sido especialmente utilizados pela indústria farmacêutica por sua capacidade de produção de metabólitos secundários com estrutura química diversa e atividade biológica, sendo muitos deles utilizados para tratamento de doenças humanas (Franco e Coutinho, 1991; Bull *et al.*, 1992, Sanglier *et al.*, 1993).

Tem sido demonstrado que cerca de dois terços dos antibióticos descobertos são produzidos por actinomicetos, incluindo aqueles de importância médica como aminoglicosídeos, antraciclinas, cloranfenicol, β -lactâmicos, macrolídeos e tetraciclinas (Okami e Hotta, 1988).

O gênero *Microbispora* também tem sido reconhecido como fonte de antibióticos como o antifúngico Sch 31828 (Patel *et al.*, 1988). Miyadoh *et al.* (1990) observaram a atividade antimicrobiana de *Microbispora karnatakensis* e *Microbispora indica*. Outros antibióticos produzidos por *Microbispora* spp. são as colchimicinas (Lam *et al.*, 1992) e as angelmicinas (Uehara *et al.*, 1993), fenazinas e fenoxazinonas (Gerber e Lechevalier, 1964; Tanabe *et al.*, 1995). Kimura *et al.* (1997) relataram a produção da propeptina, um antibiótico peptídico cíclico atípico, por linhagens de *Microbispora* sp. Segundo esses autores, os resultados sugerem uma relação entre produção do metabólito secundário e taxonomia dos isolados estudados. Kajiura *et al.* (1998) relataram atividade antimicrobiana de *Microbispora rosea*.

Quase todos os inibidores enzimáticos de origem animal ou vegetal são macromoléculas de peptídeos que freqüentemente coexistem com as enzimas as quais eles inibem. Em contraste, inibidores enzimáticos produzidos por microrganismos são compostos de baixo peso molecular e, por isso, liberados extracelularmente (Umezawa, 1988). Kim *et al.* (1998) relataram a atividade antiviral inibitória de uma proteína quinase isolada de *Nocardiopsis dassonvillei* contra a replicação do vírus da estomatite vesicular. A maioria dos inibidores foi descoberta em filtrados de cultura de actinomicetos, sendo pequeno o número de inibidores derivados de outras bactérias e fungos (Manfio, 1996).

Imunomoduladores são compostos capazes de aumentar (imunoestimulador) ou suprimir (imunossupresor) a resposta imune em animais. A utilização destes compostos se concentra principalmente na área de transplantes (minimizar rejeição de órgãos transplantados), tratamento de doenças auto-imunes, tratamento de tumores/câncer e prevenção de infecções bacterianas. Com exceção da ciclosporina, imunossupressor produzido por fungo, a grande maioria dos compostos com atividade imunomoduladora é produzida por actinomicetos, com destaque para *Streptomyces* (Manfio, 1996). Segundo

estudos de Umezawa (1990), as funções dos produtos de oncogenes foram inibidas por metabólitos produzidos por *Nocardiosis* sp. e *Streptomyces* sp. Zheng *et al.* (2000) também detectaram atividade antitumoral de actinomicetos (*Streptomyces* e *Micromonospora*) associados a organismos marinhos. A Tabela 1 mostra as substâncias produzidas por *Microbispora* com atividade antitumoral descritas na literatura. Pode ser observado que a grande maioria das substâncias apresentam atividade antitumoral para as linhagens tumorais humanas de leucemia.

Tabela 1. Substâncias produzidas por *Microbispora* com atividade antitumoral descritas na literatura

Substância	Gênero	Espécie	Linhagem	Linhagem tumoral*	Referência
Angelmicina A	<i>Microbispora</i>	sp.	AA9966	NIH/3T3	Uehara <i>et al.</i> , 1993
Angelmicina B	<i>Microbispora</i>	sp.	AA9966	NIH/3T3	Uehara <i>et al.</i> , 1993
Hibarimicina A	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina B	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina C	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina D	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina G	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina A	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina B	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina C	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina D	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Hibarimicina G	<i>Microbispora</i>	<i>rosea</i>	subsp. <i>hibaria</i> TP-A0121	HL-60	Kajiura <i>et al.</i> , 1998
Questiomicina, glicosil-	<i>Microbispora</i>	sp.	TP-A0184	U937	Igarashi <i>et al.</i> , 1998

* Linhagens de células tumorais humanas: U937 - leucemia; NIH/3T3 – fibroblasto;
HL-60 – leucemia mielóide

Kajiura *et al.* (1998) relataram atividade antimicrobiana e antitumoral por *Microbispora rosea*, cujas estruturas foram, mais tarde, descritas por Lee *et al.* (2002). Li *et al.* (2001) estudaram duas linhagens de *Microbispora rosea* produtoras de imunossupressores.

Outros metabólitos importantes produzidos pelos actinomicetos incluem enzimas capazes de digerir queratina, quitina, lignina, celulose e amido (McCarthy e Williams, 1992; Holmalahti *et al.*, 1994, Nawani *et al.*, 2002, Howard *et al.*, 2003), inseticidas, acaricidas, anti-helmíntico (Nolan e Cross, 1988) e antifúngicos (Ouhdouch *et al.*, 1996). Estudos mostram que microbisporas desempenha importante papel na degradação de polímeros orgânicos recalcitrantes, tais como a celulose e a xilana (Waldron *et al.*, 1986; Ball e McCarthy, 1988). Algumas das novas linhas de seleção e triagem de produtos microbianos estão direcionadas à descoberta de metabólitos com atividade neurológica, no sistema digestivo e cardiovascular (Manfio, 1996). Para Wang *et al.* (1999), a procura por novos actinomicetos constitui um componente essencial na descoberta de drogas baseadas em produtos naturais.

2.3. Microrganismos endofíticos

Unger em 1832 (*apud* Petrini e Müller, 1986), foi o primeiro a citar o termo endofítico. Entretanto, considerou ser uma expressão teratológica da própria planta e não o reconheceu como uma entidade separada. Esta definição levou os fitopatologistas a considerarem endofíticos (ou endófitos) como patógenos de plantas. Em 1866, Bary (*apud* Stone, 1986) definiu o termo endofítico como fungo no interior dos tecidos vegetais, em situações de infecções sintomáticas ou não, e também nos casos de interações de antagonismo ou simbióticas.

Os trabalhos sobre bactérias isoladas do interior de plantas saudáveis iniciaram-se aproximadamente em 1876 com Pasteur (*apud* Holis, 1951). Em seu trabalho, Holis (1951) faz uma descrição sobre o isolamento de bactérias de sementes, tecidos saudáveis do tubérculo e da planta da batata (*Solanum tuberosum*) e cita o isolamento de *Aerobacter cloacae* e *Bacillus* spp. Neste período ainda não se utilizava o termo "endofítico" ou "endófita" para as bactérias.

Em 1986, Carroll utilizou o termo endofítico para se referir somente aos organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo desse conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos, tais como os fungos micorrízicos. Em 1988, Carroll

publicou outro trabalho em que, de modo mais abrangente, se referia aos fungos endofíticos como os que são encontrados mais no interior das plantas que os epifíticos.

Com o aumento das pesquisas sobre os endofíticos, de modo geral, e conseqüentemente a descoberta de novas nuances sobre a interação dos fungos com os seus hospedeiros, Petrini (1991) sugeriu que a definição criada por Carroll (1986) fosse ampliada e que incluísse todos os organismos que, habitando a parte aérea dos órgãos das plantas, fossem capazes de colonizar, em algum tempo de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente.

Wilson (1995), para esclarecer que o termo endofítico ou endófito não deveria se restringir única e exclusivamente aos fungos, como vinha acontecendo, propôs uma redefinição destes termos como sendo "fungos ou bactérias que, por todo ou parte do seu ciclo de vida, invadem o tecido de plantas vivas e causam infecção não aparente ou assintomática dentro de tecidos de plantas, mas não causem sintomas de doenças". Bacon e Hinton (1997), citam-os como microrganismos simbióticos que vivem dentro da planta em associações não-patogênicas, ainda que um grau moderado de patogenicidade possa ser expressa. De Boer e Copeman (1974) foram um dos primeiros a utilizar o termo "bactérias endofíticas" em seus trabalhos. Neste experimento os autores descrevem a população de bactérias aeróbias endofíticas em plantas saudáveis de batata (*Solanum tuberosum*) e citam o isolamento de espécies dos gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Xantomonas*, e outras formas Gram-negativas. Posteriormente, vários trabalhos relatam a ocorrência de bactérias endofíticas em diversas plantas.

Atualmente, segundo Azevedo *et al.* (2000), pode ser considerado um endofítico todos os microrganismos que habitam o interior de uma planta pelo menos por um período de seu ciclo de vida. A distinção entre endofíticos, epifíticos (que vivem na superfície da planta) e fitopatógenos (que causam doenças às plantas) possui um significado puramente didático. Existe um gradiente que os separam, o que dificulta o estabelecimento de limites para discriminar cada categoria.

Segundo uma revisão de McInroy e Kloepper (1995), bactérias endofíticas têm sido relatadas em vários tecidos de plantas incluindo tubérculos, frutos, caules, sementes e óvulos. Um estudo da colonização endofítica dos tecidos de raiz de milho e algodão, realizado por eles, sugere que nichos internos da planta são explorados por uma ampla variedade de bactérias. Segundo estes autores, diferentes espécies bacterianas têm sido isoladas de uma mesma planta.

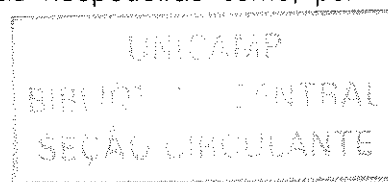
Os endofíticos entram nos tecidos das plantas principalmente pela raiz, entretanto, partes aéreas das plantas, tais como flores e cotilédones podem servir para sua entrada (Kobayashi e Palumbo, 2000). As bactérias endofíticas residem nos espaços intercelulares e raramente nos intracelulares e tecidos vasculares sem causar sintomas de doenças. Em geral, acredita-se que os endofíticos se originem da rizosfera ou da microbiota do filoplano (Hallmann *et al.*, 1997), embora endofíticos de cana-de-açúcar tenham sido demonstrados existir predominantemente no interior do tecido da planta, mas não no solo (Döbereiner, 1993).

Uma comparação entre a comunidade endofítica e da rizosfera foi realizada por Sessitsch *et al.* (2002). Nesse trabalho os autores observaram que, como em outros trabalhos na literatura (McInroy e Kloepper, 1995; Lilley *et al.*, 1996; Germida *et al.*, 1998), as populações de endofíticos representam um subgrupo de bactérias da rizosfera. Entretanto, bactérias que não foram encontradas na rizosfera foram encontradas habitando a planta. Segundo os autores, esses microrganismos provavelmente já estavam presentes como infecções latentes dentro de tecidos das plantas. A infecção via semente tem sido sugerida como sendo uma rota comum de transmissão da bactéria endofítica (McInroy e Kloepper, 1995). Outros mecanismos propostos para a entrada de endofíticos na planta incluem degradação local da celulose (Quadt-Hallmann *et al.*, 1997) e entrada via machucaduras nas junções laterais da raiz (Gough *et al.*, 1997).

O isolamento de microrganismos endofíticos é realizado, geralmente, por métodos de esterilização de superfície que estão baseados na imersão dos órgãos da planta em substâncias desinfetantes (Matsuura, 1998). Apesar do conhecimento sobre a ocorrência de bactérias endofíticas em diferentes vegetais, ainda pouco se conhece sobre a identidade, diversidade e níveis populacionais nos diferentes tecidos das plantas (Azevedo *et al.*, 2000).

2.3.1. Importância ambiental e aplicação biotecnológica de microrganismos endofíticos

A associação entre microrganismo endofítico e planta hospedeira pode propiciar benefícios recíprocos (Bacon e Hinton, 1997). Segundo McInroy e Kloepper (1995), uma vez dentro da planta, a bactéria escapa da competição com outros microrganismos que comumente ocorre no filoplano e rizosfera, podendo adaptar-se à utilização dos metabólitos da planta para sua sobrevivência. Por outro lado, os microrganismos endofíticos podem conferir algumas características às plantas hospedeiras como, por



exemplo, aumento da resistência da planta hospedeira em condições de estresse hídrico; aumento da eficiência de fixação de nitrogênio; produção de fito-hormônios e outros compostos de interesse biotecnológico (enzimas, antibióticos e drogas antitumorais), além de proteger plantas contra insetos, patógenos e mesmo herbívoros domésticos como ovelha e gado.

Os actinomicetos também desempenham um papel importante na degradação de material orgânico que, normalmente, não são decompostos por fungos e bactérias, como fenóis, húmus e parafinas (Killham, 1994). Além disso, o estudo de microrganismos endofíticos possui forte interesse acadêmico no que se refere à descoberta de novas espécies microbianas, principalmente quando os hospedeiros dos trópicos são estudados (Azevedo *et al.*, 2000).

Em 1995, Rowinsky e Donehower, citam a utilização do taxol, um derivado diterpenóide produzido por um fungo endofítico, como agente antitumoral em câncer de ovário e de mama. O taxol foi inicialmente isolado de uma planta rara e de crescimento lento, *Taxus brevifolia* e de algumas espécies relacionadas, em quantidades extremamente baixas (<0,02% do peso seco) (Wani *et al.*, 1971, citados por Stierle *et al.*, 1995). Em 1999, Bashyal *et al.* observaram a produção de taxol pelos fungos *Seimatoantlerium nepalense* e *Seimatoantlerium tepuiense*, isolados dos tecidos de *Taxus* sp.

Os endofíticos, de um modo geral, constituem-se em um ótimo sistema para estudo da função dos microrganismos na biologia das plantas superiores (Turner *et al.*, 1993). Eles também podem desempenhar um importante papel no ecossistema de florestas, aumentando a plasticidade fenotípica de espécies arbóreas hospedeiras sob condições ambientais deletérias ou variáveis (Chanway, 1998).

Atualmente, microrganismos endofíticos têm sido usados para expressar e secretar produtos úteis à planta hospedeira sem a necessidade de integração de DNA estranho no genoma da planta. Com isso, as bactérias endofíticas apresentam múltiplas aplicações no melhoramento da produção na agricultura (Zinniel *et al.*, 2002). Ambientalmente, o uso de endofíticos específicos pode ser preferível ao uso de fertilizantes químicos não-específicos e herbicidas por causa do custo, tempo de efetividade e contribuições para sistemas agrícolas sustentáveis (Fahey, 1988; Zinniel *et al.*, 2002). A realização destes estudos requer o isolamento, cultivo e caracterização da diversidade taxonômica, genética e metabólica dos microrganismos, conhecimento sem o

qual o potencial para o desenvolvimento de associações efetivas entre microrganismos endofíticos e plantas fica bastante limitado (Fahey, 1988).

2.3.2. Actinomicetos endofíticos

Actinomicetos são também encontrados em associação com a superfície de plantas e como endofíticos (Azevedo *et al.*, 2000). Interações entre plantas e endofíticos têm sido mais extensivamente estudadas para bactérias do gênero *Frankia*, fixadoras de nitrogênio em plantas não-leguminosas. Algumas espécies de *Frankia* são capazes de induzir a nodulação em raízes de diversas plantas não-leguminosas (actinorrízicas) importantes em sucessões ecológicas e biorremediação (Benson e Silvester, 1993).

O isolamento de actinomicetos endofíticos parece começar com Mundt e Hinkle (1976), que descreveram o isolamento de 19 gêneros de bactérias do interior de sementes e óvulos de diversas plantas, inclusive de actinomicetos, tais como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Streptomyces*. Dentre os actinomicetos, o gênero mais encontrado foi *Corynebacterium* com 35 isolados, seguido de *Nocardia* e *Streptomyces*, ambos com apenas um isolado.

Sardi *et al.* (1992) publicaram o primeiro trabalho que tratava exclusivamente de actinomicetos endofíticos. Foram isolados 499 actinomicetos endofíticos de raízes de 28 diferentes espécies de plantas. Entre os isolados podemos citar: *Streptomyces* (482 isolados), *Streptoverticillum* (2 isolados), *Nocardia* (4 isolados), *Micromonospora* (1 isolado) e *Streptosporangium* (1 isolado). Nove isolados não puderam ser classificados. Esses autores sugeriram que a presença de estreptomicetos no interior das raízes teria papel importante no desenvolvimento saudável da planta. Matsukuma *et al.* (1995) também relatam o isolamento de actinomicetos endofíticos de *Camellia japonica*, *Camellia sinensis* e *Citrus ushui*.

Takahashi *et al.* (1995) observaram que os isolados do gênero *Microbispora* eram freqüentemente isolados de folhas frescas de plantas monocotiledôneas. Segundo Okazaki *et al.* (1995), este mesmo gênero possui indivíduos amplamente distribuídos em folhas frescas e caídas de várias plantas. Kolomiets *et al.* (1997) demonstraram que o efeito antagonista de *Streptomyces flavescens* contra fungos patogênicos estava associado principalmente com a capacidade da linhagem em colonizar a rizosfera de plântulas, penetrando no tecido e produzindo compostos antibióticos. Sturz *et al.* (1999) também demonstraram o aumento de resistência a patógenos na presença de comunidades de bactérias endofíticas na periderme de tubérculos de batatas.

Stamford (1997) isolou actinomicetos endofíticos de raízes de jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) os gêneros *Streptomyces*, *Streptosporangium* e

Nocardiopsis, dentre outros endofíticos, e observou uma produção satisfatória de α -amilase e aminoglicosidase por *Streptosporangium* e *Nocardiopsis*. Matsuura (1998) isolou 31 actinomicetos endofíticos de feijão caupi (*Vigna unguiculata*). Os gêneros encontrados foram *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Streptosporangium*, *Actinomadura* e *Nocardia*. Cerca de 20% dos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra outras bactérias. Britto e Araújo (1998) descreveram o isolamento dos gêneros *Microbispora*, *Streptomyces* e *Streptosporangium* em folhas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).

Kizuka *et al.* (1998) isolaram actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces* e actinomicetos raros de folhas de diversas plantas. Em particular, os isolados do gênero *Microbispora* representaram mais de 50% dos actinomicetos raros isolados e, segundo esses autores, *Microbispora* parece ser um gênero dominante em folhas frescas saudáveis. Além disso, foi observado que a linhagem *Microbispora* sp. SKANK 62597 foi capaz de produzir γ -glutamilmietionina sulfoximina, um composto muito semelhante a metionina sulfoximina, um herbicida produzido por plantas. Matsumoto *et al.* (1998) isolaram um grande número de actinomicetos raros endofíticos, porém de folhas caídas. O gênero *Microbispora* foi o mais freqüente nas amostras de bambu e *loosestrife*.

Araújo *et al.* (2000) isolaram actinomicetos endofíticos pertencentes aos gêneros *Microbispora*, *Streptomyces* e *Streptosporangium* de raízes e folhas de milho (*Zea mays*). Neste trabalho os autores analisaram características de cultivo e micromorfológicas dos isolados, além da composição química da parede celular para a identificação. Foi observado que de um total de 53 isolados, a maioria deles pertenciam ao gênero *Microbispora* (33 isolados), seguido por *Streptomyces* (6 isolados), *Streptosporangium* (4 isolados). Os demais não puderam ser identificados. Estes mesmo autores verificaram que mais de 43% dos isolados mostravam atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Sarcina lutea* e *Staphylococcus aureus*. Esses autores acreditam que plantas de área tropical apresentem uma grande diversidade de microrganismos endofíticos.

Stamford *et al.* (2001) estudaram a produção e caracterização de uma α -amilase termoestável produzida por *Nocardiopsis* sp. isolada de jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). Outro estudo de produção de enzima por actinomiceto endofítico foi realizado por Stamford *et al.* (2002). Esses autores analisaram a produção de uma glicoamilase produzida por *Streptosporangium* sp., um actinomiceto endofítico de milho, também termoestável e com grande potencial para aplicação industrial.

Embora Actinobacteria compreenda muitos gêneros (Stackebrandt *et al.*, 1997), a maioria das moléculas bioativas tem sido isolada de espécies de *Streptomyces*. Apesar disso outros microrganismos pertencentes a outros grupos desta ordem também têm demonstrado capacidade de produção de compostos bioativos. Atualmente, ainda não se sabe se o elevado número de metabólitos produzidos pelo grupo dos estreptomicetos realmente reflete um aumento na sua capacidade de produção de metabólitos secundários, ou se está associado a uma maior diversidade de suas linhagens, ou ainda se isso se deve simplesmente ao fato de um maior número de linhagens deste grupo ser avaliado quanto à produção de metabólitos bioativos. Esta última possibilidade pode estar relacionada com a facilidade de isolamento de estreptomicetos em comparação a muitos outros gêneros de actinomicetos (Monciardini *et al.*, 2003). Lazzarini *et al.* (2001) utilizaram meios seletivos para isolar actinomicetos raros da família *Streptosporangiaceae*, dada sua promissora diversidade química.

2.4. Taxonomia e identificação de actinomicetos

Até alguns anos atrás, a classificação dos actinomicetos era derivada de um número relativamente pequeno de características fenotípicas e algumas características quimiotaxonômicas. As linhagens eram agrupadas com base nas propriedades da morfologia de colônia, micromorfologia e coloração, presença ou ausência de esporos, capacidade de produzir ácido a partir de açúcares, utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, presença de aminoácidos específicos e açúcares na parede celular, padrão de lipídeos e quinonas isoprenóides (Goodfellow e O'Donnel, 1994). Apesar da eficiência de aplicação para a caracterização de organismos de diversos grupos de bactérias, os métodos tradicionais e morfologia muitas vezes são insuficientes para a caracterização de actinomicetos, sendo necessária a aplicação de métodos quimiotaxonômicos e moleculares (Goodfellow, 1989).

A quimiotaxonomia (quimiosistemática) é o estudo da distribuição e composição de componentes químicos, como aminoácidos, lipídeos, proteínas, quinonas isoprenóides, e açúcares da parede celular, dentre os membros de taxa microbianas e a utilização destas informações para classificação e identificação (Goodfellow e O'Donnell, 1994). Os dados químicos derivados de análises dos componentes celulares podem ser utilizados para classificar as bactérias em diferentes graus taxonômicos de acordo com os padrões de distribuição dos vários marcadores químicos dentro e entre os membros de diferentes taxa (Chun, 1995).

O uso de seqüências de RNAr para análise da filogenia e identificação têm sido genericamente aceitas (Barry *et al.* 1990; Klijn *et al.*, 1991). A análise da seqüência dos genes do RNA ribossomal tem se tornado comum na sistemática molecular, pois estão presentes em todos os organismos, possuem baixa taxa de mutação e são suficientemente longos para permitirem comparações interespecíficas apuradas (Martinez-Murcia, 1993; Olsen e Woese 1993; Pace, 1996). A análise filogenética de seqüências de DNAr 16S pode ser empregada para identificação de actinomicetos em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie (Goodfellow e O'Donnel, 1994). Em 1997, Stackebrandt *et al.* propuseram uma nova estrutura de classificação para os actinomicetos, baseando-se na análise do DNAr 16S, com a proposta da Classe Actinobacteria.

Segundo Vandamme *et al.* (1996), a integração de diferentes informações (fenotípica, genotípica e filogenética), conhecida como classificação polifásica, permite uma definição mais coerente dos grupos taxonômicos. A aplicação da taxonomia polifásica tem gerado profundas modificações na sistemática bacteriana, especialmente no que diz respeito a grupos de importância industrial como os actinomicetos, para os quais a taxonomia tradicional baseada na forma e função dos microrganismos torna impossível uma balanceada seleção de linhagens para triagem industrial (Goodfellow *et al.*, 1998; Goodfellow *et al.*, 1999).

A taxonomia polifásica já está bem estabelecida, embora poucos esforços venham sendo realizados para recomendar os métodos mais apropriados para gerar classificações de consenso. Atualmente, segundo Bull *et al.*, (2000), os estudos taxonômicos polifásicos tendem a refletir o interesse individual de grupos de pesquisas, dos equipamentos e dos procedimentos disponíveis. Não é possível ser muito prescritivo sobre os métodos que devam ser usados. Entretanto, está claro que a subunidade menor do RNAr ribossômico é uma poderosa ferramenta para realçar novos centros de variação taxonômica, apesar desta técnica nem sempre permitir a separação dos membros de espécies intimamente relacionadas (Bruun, 1957; Coombs *et al.*, 1998; Hamamoto e Nakase, 2000). A técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) também vem sendo muito utilizada para estudos em filogenia e taxonomia de actinomicetos (Liu *et al.*, 1992; Vaneechoutte *et al.*, 1995; Heyndrickx *et al.*, 1996; Conville *et al.*, 2000).

2.4.1. Sistemática molecular de actinomicetos

Kluyver e Van Niel (1936) e Stanier e Van Niel (1941) foram alguns dos primeiros pesquisadores a propor as primeiras árvores filogenéticas de bactérias as quais incluíam os actinomicetos. Esse esquema e outros que o seguiram utilizaram características morfológicas para a classificação destes microrganismos. Com os resultados das análises da composição da parede celular, os pesquisadores começaram a questionar a classificação tradicional dos actinomicetos (Lechevalier e Lechevalier, 1970; Schleifer e Kandler, 1972; Goodfellow e Minnikin, 1985). Outras características foram estudadas (açúcares e aminoácidos de parede e lipídeos) e, com exceção de ácidos micólicos em *Mycobacterium* e microrganismos relacionados, a distribuição de caracteres individuais foi claramente polifilética e, então, elas não poderiam ser utilizadas para construir filogenias. Atualmente, os actinomicetos são membros do domínio *Bacteria*, onde eles formam uma das principais linhas de descendência (Stackebrandt *et al.*, 1997). Segundo Embley e Stackebrandt (1994), todos os actinomicetos por eles investigados contêm uma inserção homóloga de cerca de 100 nucleotídeos entre as hélices 54 e 55 do gene RNAr 23S (Roller *et al.*, 1992), o que fortemente demonstra que eles compreendem um grupo.

2.4.2. Sistemática do gênero *Microbispora*

O gênero *Microbispora* foi proposto em 1957 por Nonomura e Ohara para linhagens de actinomicetos que produziam esporos pareados no micélio aéreo. Este gênero está alocado na família *Streptosporangiaceae* juntamente com os gêneros: *Acrocarpospora*, *Herbidospira*, *Microtetraspore*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomospore*, *Planopolyspora*, *Planotetraspore* e *Streptosporangium* (Garrity *et al.*, 2001). Inicialmente, Goodfellow (1992) propôs a família *Streptosporangiaceae* para agrupar os gêneros quimicamente homogêneos: *Microbispora*, *Microtetraspore*, *Streptosporangium*, *Planobispora*, *Planoplanospore* e *Spirillospore*. Estes gêneros foram primariamente diferenciados com base nas características morfológicas. Por exemplo, os gêneros *Microbispora* e *Microtetraspore* eram somente distinguidos baseando-se no número de esporos da cadeia de esporos. Os padrões quimiotaxonômicos praticamente idênticos entre as linhagens de *Microbispora*, *Microtetraspore* e *Streptosporangium* têm limitado os estudos de relações intra- e inter-genéricas. A proteína ribossomal AT-L30 foi analisada para o grupo microbisporas e revelou que os membros do gênero *Microbispora* são filogeneticamente homogêneos e o estudo de seqüências parciais dos aminoácidos

da AT-L30 corroborou a separação de gênero *Microbispora* de outros relacionados (Ochi *et al.*, 1993).

Na lista de nomes bacterianos aprovados (Skerman *et al.*, 1980), 10 espécies foram citadas como membros do gênero *Microbispora*: *M. aerata* (Gerber e Lechevalier 1964), *M. amethystogenes* (Nonomura e Ohara 1960), *M. bispota* (Henssen 1957), *M. chromogenes* (Nonomura e Ohara 1960), *M. diastatica* (Nonomura e Ohara 1960), *M. mesophila* (Nonomura e Ohara 1971), *M. parva* (Nonomura e Ohara 1960), *M. thermodiastatica* (Nonomura e Ohara 1969), *M. thermorosea* (Nonomura e Ohara 1969a, b), *M. rosea* subsp. *rosea* (espécie tipo) (Nonomura e Ohara 1957) e *Microbispora rosea* subsp. *aerata* (Gerber e Lechevalier, 1964).

Mais tarde, Miyadoh *et al.* (1985), baseando-se em características morfológicas, fisiológicas e na composição da parede celular, descreveram uma nova espécie *Microbispora viridis*. Rao *et al.* (1987), baseando-se nas mesmas características descreveram *Microbispora karnatakensis* e *Microbispora indica*, essas três últimas foram validadas como novas espécies.

Em 1990, Kroppenstedt *et al.* (1990), analisaram ácidos graxos, quinonas isoprenóides, lipídeos polares, açúcares totais e a seqüenciamento do DNAr 16S. No mesmo ano, Miyadoh *et al.* (1990), analisaram características morfológicas, fisiológicas; ácidos graxos, açúcares totais e da parede celular, menaquinonas, %mol C+G e hibridação DNA:DNA, e sugeriram a transferência de *M. echinospora* e *M. viridis* para o gênero *Actinomadura* como *Actinomadura echinospora* e *Actinomadura rugatobispota*, respectivamente. Neste mesmo trabalho, Miyadoh *et al.* (1990) combinaram 10 espécies de *Microbispora* em uma única espécie, *Microbispora rosea*, baseando-se em valores médios de hibridação DNA-DNA (Tabela 2) de 56% e em duas subespécies, *M. rosea* subsp. *rosea* (incluindo *M. chromogenes*, *M. amethystogenes*, *M. parva* e *M. diastatica*) e *M. rosea* subsp. *aerata* (incluindo *M. aerata*, *M. thermodiastatica* e *M. thermorosea*), baseando-se nas temperaturas de crescimento.

Wang *et al.* (1996a) utilizaram o DNAr 16S para o estudo filogenético para a maioria das espécies dos gêneros *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium* e *Actinomadura*. Os valores de similaridade das seqüências intra e intergenéricas mostraram que espécies pertencentes a diferentes gêneros freqüentemente exibem níveis de similaridade de seqüências maiores do que em espécies que pertencem ao mesmo gênero, no caso de *Microbispora*, *Microtetraspora* e *Streptosporangium*. Neste mesmo trabalho foram analisadas sete espécies de *Microbispora* (*M. aerata*, *M. amethystogenes*,

M. chromogenes, *M. diastatica*, *M. parva*, *M. thermodiastatica* e *M. thermorosea*). Segundo esses autores, de acordo com a definição de espécie bacteriana proposta por Stackebrandt e Goebel (1994), organismos que exibem similaridade da sequência de DNAr 16S menor que 97% e valores de reassociação de DNA-DNA inferiores a 60% devem ser alocadas em espécies distintas; o trabalho de Miyadoh *et al.* (1990) deve ser revisto. No trabalho de Wang *et al.* (1996a), o total 9 de 21 valores de similaridade das sequências do DNAr 16S obtidos das sete espécies estudadas foram inferiores a 97%, resultado que não corrobora a proposta de combinação das 10 espécies em uma única.

Ochi *et al.* (1993) também encontraram diferenças significativas na mobilidade eletroforética da proteína ribossomal AT-L30 entre as diferentes espécies de *Microbispora*. Análises das sequências do DNAr 16S por Wang *et al.* (1996b) indicaram que *M. bispora* estava filogeneticamente distante de *M. rosea* e outros membros da família *Streptosporangiaceae*. Essa espécie foi, então, transferida para um novo gênero *Thermobispora* (como *Thermobispora bispora*).

Zhang *et al.* (1998), baseando-se em características fenotípicas, quimiotaxonômicas e filogenéticas, reclassificaram o gênero *Thermomonospora* e propuseram a transferência de *Thermomonospora mesophila*, que produz esporos únicos a partir da hifa aérea, para o gênero *Microbispora*, como *Microbispora mesophila*.

Em 1997, Junying *et al.*, propuseram uma nova espécie, *Microbispora bannaensis* sp. nov., porém utilizaram apenas características morfológicas e fisiológicas. Nakajima *et al.* (1999) isolaram uma nova espécie de solo de floresta da Tailândia, *Microbispora corallina* e apóiam a idéia de que a definição de espécie dentro do gênero *Microbispora* deva ser baseada nos resultados de reassociação DNA:DNA de acordo com a definição de espécie proposta por Stackebrandt e Goebel (1994). Li *et al.* (2001), baseando-se em características morfológicas, análises químicas e homologia de DNA por ribotipagem e na sequência do RNAr 16S, propuseram duas novas subespécies dentro do gênero *Microbispora rosea*, designadas como *Microbispora rosea* subsp. *wuxiensis* e *Microbispora rosea* subsp. *yuantouzhuensis*. Zhang *et al.* (2001) compararam árvores filogenéticas geradas por sequências de DNAr 16S e 23S para membros da família *Thermomonosporaceae* e alguns grupos relacionados, sendo um deles o gênero *Microbispora*. Esses autores não concluem a respeito deste último grupo, mas o que pode ser observado são pequenas diferenças entre algumas posições de membros do grupo *Microbispora* quando as duas árvores são comparadas.

A Tabela 1 mostra a atualização da nomenclatura acima descrita e a Tabela 2 mostra a porcentagem da média de hibridação DNA-DNA (Miyadoh *et al.*, 1990) e similaridade das seqüências de 16S DNAr de algumas espécies de *Microbispora* (NCBI, 2003).

Tabela 2. Espécies do gênero *Microbispora*.

Nomenclatura antiga	Referência	Nomenclatura atual, segundo DSMZ	Referência	Linhagens tipo*
<i>M. areata</i>	(Gerber e Lechevalier 1964) Cross 1974	<i>M. rosea</i> subsp. <i>aerata</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 15448, DSM 43176, JCM 3076; IMET 9503, IFO 12581
<i>M. thermodiastatica</i>	Nonomura e Ohara 1969	<i>M. rosea</i> subsp. <i>aerata</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 27098, JCM 3110; CBS 799.70, DSM 43166; IFOM14046
<i>M. thermorosea</i>	Nonomura e Ohara 1969	<i>M. rosea</i> subsp. <i>aerata</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 27099; JCM 3111; CBS 836.70; DSM 43840; IFO 1274
<i>M. amethystogenes</i>	Nonomura e Ohara 1960	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	CBS 303.61, DSM 43164, IMET 9533, NRRL B-2637, JCM 3021; RIA 760
<i>M. chromogenes</i>	Nonomura e Ohara 1960	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	DSM 43165, IFO 14876; JCM 3022; NRRL B-2634
<i>M. diastatica</i>	Nonomura e Ohara 1960	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 33325; DSM43837; JCM 3023; IFO 14041; KCC A-0023
<i>M. indica</i>	Rao et al. 1987	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 35926, SKF-I-101055
<i>M. karnatakensis</i>	Rao et al. 1987	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 35927, SKF-I-58261; JCM 8972; IFO 14875
<i>M. parva</i>	Nonomura e Ohara 1960	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	Miyadoh et al. 1990	ATCC 33326; DSM 43838; JCM 3024; IFO 14043; KCC A-0024
<i>M. rosea</i>	Nonomura e Ohara 1957	<i>M. rosea</i> subsp. <i>rosea</i> espécie tipo	Miyadoh et al. 1990	ATCC 12950, DSM 43839; JCM 3006; IMET 9534, IFO14044
<i>M. corallina</i>	-	-	Nakajima et al. 1999	DF-32, JCM 10267
<i>M. mesophila</i>	Nonomura e Ohara 1971	<i>Thermomonospora mesophila</i>	Zhang et al. 1998	ATCC 27303, DSM 43048
<i>M. bispora</i>	(Henssen 1957) Lechevalier 1965	<i>Thermobispora bispora</i>	Wang et al. 1996.	ATCC 19993, DSM 43833
<i>M. echinospora</i>	Nonomura e Ohara 1971	<i>Actinomadura echinospora</i>	Kroppenstedt et al. 1990 e Miyadoh et al. 1990	ATCC 27300, DSM 43163, DSM 43175
<i>M. viridis</i>	Miyadoh et al. 1985	<i>Actinomadura rugatobispora</i>	Miyadoh et al. 1990	IFO 14382, SKF-2240, DSM 44130

*ATCC: American Type Culture Collection; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; IFO: Institute for Fermentation, Osaka (coleção transferida para Biological Resource Center - NBRC); IMET: Institute for Microbiology and Experimental Therapy; JCM: Japan Collection of Microorganisms; KCC: Culture Collection of Actinomycetes (coleção transferida para JMC); NRRL: Northern Regional Research Center; RIA: Culture Collection of the Institute for New Antibiotics; SKF: Smith Kline & French Laboratories.

Tabela 3. Compilação da porcentagem da média de hibridação DNA-DNA e similaridade das seqüências de 16S DNAr de algumas espécies de *Microbispora*.

Espécies	<i>M. rosea</i>	<i>M. amethystogen</i> es	<i>M. chromogenes</i>	<i>M. diastatica</i>	<i>M. indica</i>	<i>M. kamatakensis</i>	<i>M. parva</i>	<i>M. aerata</i>	<i>M. thermodiastatica</i>	<i>M. thermorosea</i>
<i>M. rosea</i>		52,5	64,5	59,5	85,5	60,5	70	41,5	44	46,5
<i>M. amethystogenes</i>	97%		59,5	61	54	55	55	45,5	45,5	48
<i>M. chromogenes</i>	96%	98%		83,5	74,5	66	67	48,5	44	46
<i>M. diastatica</i>	96%	98%	99%		68	84,5	64	47	47	48,5
<i>M. indica</i>	ND	ND	ND	ND		57,5	63	45,5	39	40
<i>M. kamatakensis</i>	ND	ND	ND	ND	ND		54,5	45	43	44,5
<i>M. parva</i>	98%	98%	98%	98%	ND	ND		53,5	53	49,5
<i>M. aerata</i>	97%	98%	97%	97%	ND	ND	98%		81	63,5
<i>M. thermodiastatica</i>	97%	99%	97%	97%	ND	ND	98%	99%		72
<i>M. thermorosea</i>	97%	98%	97%	97%	ND	ND	98%	99%	99%	
<i>M. corallina</i>	97%	97%	98%	98%	ND	ND	98%	98%	97%	97%
<i>M. mesophila</i>	96%	96%	98%	98%	ND	ND	95%	96%	96%	97%

ND: Não determinado. Dados de homologia DNA-DNA obtidos de Miyadoh *et al.* (1990). Dados de similaridade de seqüências de DNAr 16S obtidos a partir da análise de seqüências das linhagens-tipo disponíveis no Genbank (NCBI, 2003).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe o isolamento e estudo taxonômico de actinomicetos associados a uma espécie de planta nativa brasileira, *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun, bem como a triagem para detecção de produtos metabólicos com atividade antimicrobiana e antitumoral.

Como objetivos específicos do projeto, temos:

- Isolamento de actinomicetos endofíticos ou associados a uma planta nativa de ocorrência em Cerrado de transição, *Tocoyena formosa*;
- Caracterização taxonômica clássica através de microscopia ótica, eletrônica de varredura e testes fisiológicos;
- Caracterização taxonômica molecular, incluindo análise de sequência de rDNA por ARDRA de região espaçadora DNAr 16S-23S e análise filogenética de rDNA 16S, visando a comparação infra-específica e a avaliação da diversidade dos isolados;
- Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos metabólicos obtidos em cultivos em meio sólido e meio líquido contra bactérias, fungo filamentos e levedura;
- Avaliação da atividade antitumoral de produtos metabólicos dos isolados contra linhagens de células tumorais humanas e;
- Caracterização preliminar da composição química dos metabólitos produzidos por microrganismos selecionados.

CAPÍTULO I. Isolamento e taxonomia polifásica de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun

Uetanabaro, A.P.T.^{1,2}, Góes Neto, A.², Hamerski, L.³, Canhos, V.P.^{1,4}, Maia, V.M.⁵, Cavalheiro, A.J.³, Bolzani, V.S.³ e Manfio, G.P.⁵

¹ Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/DCA/FEA - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP); ² Laboratório de Pesquisa em Microbiologia/DCBIO - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana (BA); ³ Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara (SP); ⁴ Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA), Campinas (SP); ⁵ Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústrias (CBMAI)/CPQBA - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP).

Resumo

Quarenta e sete linhagens de actinomicetos raros foram isoladas de folhas de 10 indivíduos de *Tocoyena formosa*, Rubiaceae, popularmente conhecida como “olho-de-boi” ou “genipapo-do-campo”, utilizando um protocolo adaptado para o isolamento de microrganismos endofíticos. Foram realizados estudos de caracterização taxonômica clássica e molecular, sendo que o exame micromorfológico mostrou que os isolados produzem esporos longitudinalmente pareados no ápice de esporóforos no micélio aéreo como a maioria dos membros do gênero *Microbispora*. Foram realizados alguns testes bioquímicos (hidrólise do amido, redução de nitrato, crescimento em diferentes temperaturas) para a caracterização dos isolados e, com exceção de um isolado que apresentou características bioquímicas semelhantes à espécie *Microbispora indica*, os demais apresentaram características semelhantes à *Microbispora chromogenes*. As análises filogenéticas das seqüências do DNAr 16S também indicaram que as linhagens isoladas pertencem ao gênero *Microbispora* Nonomura e Ohara, 1957. A maioria dos isolados agrupou com *Microbispora rosea* subsp. *rosea* nas árvores filogenéticas. Nas análises do perfil de restrição do DNAr 16S (ARDRA) utilizando as enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I, e do fragmento de DNAr 16S mais região espaçadora DNAr 16S-23S utilizando a enzima *Alu* I; foi possível verificar diferentes perfis para os isolados que ficaram agrupados em um mesmo *cluster* na árvore filogenética, sugerindo a ocorrência de populações heterogêneas dentro das plantas.

Palavras-chave: actinomicetos, taxonomia polifásica, endofíticos, *Microbispora*, *Tocoyena formosa*.

Abstract

Forty-seven actinomycete strains were isolated from leaves of 10 individuals of *Tocoyena formosa*, Rubiaceae, popularly known as "olho-de-boi" or "genipapo-do-campo" in Brazil, using an adapted protocol for the isolation of endophytic microorganisms. Conventional taxonomic and phylogenetic studies were carried out. The micromorphological analyses revealed that the isolates produce longitudinally paired spores in the apex of sporophores in the aerial mycelium as most of the members of the genus *Microbispora*. Some biochemical assays (starch hydrolysis, nitrite reduction, growth at different temperatures) were performed for characterizing the isolates, and, except for only one isolate that showed biochemical characteristics similar to *Microbispora indica*, the others exhibited biochemical characteristics similar to *Microbispora chromogenes*. The 16S rDNA phylogenetic analyses also indicated that the isolated lineages belong to *Microbispora* Nonomura and Ohara 1957. In this case, most of the isolates grouped with *Microbispora rosea* subsp. *rosea* in phylogenetic trees. Two restriction analyses were done, using either the 16S rDNA fragments (ARDRA) and *Hae* III, *Msp* I and *Rsa* I, or the 16S-23S rDNA spacer fragment and *Alu* I. It was possible to verify distinct restriction patterns for the isolates grouped together in a same cluster in phylogenetic trees, suggesting the occurrence of heterogenous populations inside the *Tocoyena formosa* individuals.

Key words: Actinomycetes, poliphasic taxonomy, endophytic, *Microbispora*, *Tocoyena formosa*

1. Introdução

Os actinomicetos raros compreendem as espécies e gêneros cuja frequência de isolamento pelos métodos convencionais é muito mais baixa do que para linhagens de *Streptomyces*, facilmente isoladas. Considerando que a capacidade dos actinomicetos raros de produzir diferentes antibióticos é comparável à de *Streptomyces*, conclui-se que o isolamento e triagem destes actinomicetos podem levar a descoberta de novos antibióticos e outros compostos bioativos. Dentre os actinomicetos raros, o gênero *Microbispora* parecer ser um dos mais freqüentes (Takahashi *et al.*, 1995). Takahashi *et al.* (1995) e Kizuka *et al.* (1998) observaram que os isolados do gênero *Microbispora* eram freqüentemente isolados de folhas frescas. Segundo Okazaki *et al.* (1995), este mesmo gênero possui indivíduos amplamente distribuídos em folhas frescas e caídas de várias plantas.

O gênero *Microbispora* foi proposto em 1957 por Nonomura & Ohara para linhagens de actinomicetos que produziam esporos pareados no micélio aéreo. Este gênero está alocado na família *Streptosporangiaceae* juntamente com os gêneros: *Acrocarpospora*, *Herbidospora*, *Microtetraspota*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomospora*, *Planopolyspora*, *Planotetraspota* e *Streptosporangium* (Garrrity *et al.*, 2001). Inicialmente, Goodfellow (1992) propôs a família *Streptosporangiaceae* para agrupar os gêneros quimicamente homogêneos: *Microbispora*, *Microtetraspota*, *Streptosporangium*, *Planobispora*, *Planoplanospora* e *Spirillospora*. Estes gêneros foram primariamente diferenciados com base nas características morfológicas. Por exemplo, os gêneros *Microbispora* e *Microtetraspota* eram somente distinguidos baseando-se no número de esporos da cadeia de esporos. Além disso, a maioria dos membros do gênero *Microbispora* produz esporos longitudinalmente pareados no ápice de esporóforos no micélio aéreo, porém *Microbispora mesophila* que produz apenas um esporo. A espécie *Thermomonospora bispota* (antigo *Micobispora bispota*) também produz dois esporos.

Os padrões quimiotaxonômicos praticamente idênticos entre as linhagens de *Microbispora*, *Microtetraspota* e *Streptosporangium* têm limitado os estudos de relações intra e intergêneros. Wang *et al.* (1996a) utilizaram o DNAr 16S para o estudo filogenético para a maioria das espécies dos gêneros *Microbispora*, *Microtetraspota*, *Streptosporangium* e *Actinomadura*. No caso de *Microbispora*, *Microtetraspota* e *Streptosporangium* os valores de similaridade das seqüências intra- e intergenéricas mostraram que espécies pertencentes a diferentes gêneros freqüentemente exibem níveis

de similaridade de seqüências maiores do que em espécies que pertencem ao mesmo gênero.

Pelo exposto, pode-se notar que a sistemática do grupo microbisorae ainda necessita de maiores estudos. O presente trabalho descreve o isolamento e a utilização de várias ferramentas (características morfológicas, testes bioquímicos, seqüenciamento de DNA r 16S e análise filogenética) para o estudo taxonômico polifásico dos actinomicetos raros isolados, pertencentes ao gênero *Microbispora*, de *Tocoyena formosa* (Cham. et Schlecht.) K. Schum (Rubiaceae).

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta das amostras. Foram coletadas folhas sadias de 10 indivíduos de *Tocoyena formosa* (Cham. et Schlecht.) K. Schum (Rubiaceae) (Tabela 1), localizados no Horto Florestal de Araraquara, região de cerrado de transição, município de Araraquara, São Paulo. As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro e abril de 2001. As folhas coletadas foram colocadas em sacos plásticos para transporte até o local de processamento das amostras.

2.2. Isolamento dos microrganismos. A desinfecção das folhas foi realizada segundo Maitan (1998) com pequenas modificações, onde a etapa de desinfecção com hipoclorito a 2% durou 15 minutos ao invés de 5 minutos, seguido de maceração com 3,0-5,0 mL de tampão fosfato 0,5 M e plaqueamento em diferentes meios de cultura suplementados com 100 µg/mL de nistatina e 100 µg/mL de ciclohexamida (Sardi *et al.*, 1992). O controle da desinfecção foi realizado inoculando 1 mL da água da última lavagem das folhas em 1 mL de caldo nutriente 2X. Os meios de cultura utilizados para o isolamento foram: ágar amido-caseína-KNO₃ (AAC) (Küster e Williams, 1964); ágar extrato de levedura–extrato de malte (ISP-2), ágar aveia (ISP-3) (Shirling e Gottlieb, 1966) e ágar ácido húmico-vitaminas (AHV) (Goodfellow, 1992). O material foi incubado a 30°C por 30-40 dias. Os microrganismos foram repicados e purificados no mesmo meio que foram isolados. Todos os isolados deste trabalho estão depositados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/UNICAMP, Campinas, São Paulo) e na Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB/UEFS, Feira de Santana, Bahia).

2.3. Condições de cultivo. Os isolados foram repicados para os meios ISP-2 e ISP-3 suplementado com 1% de solução traço de sais e cultivados durante 15 a 21 dias a 30 °C para as análises de microscopia e para preservação a -80°C, utilizando-se o meio Bennett (Jones, 1949) com 20% de glicerol (Wellington e Williams, 1978). Para os testes fisiológicos e extração de DNA, os microrganismos foram cultivados em caldo ISP-2 por 15 dias a 30 °C.

2.4. Micromorfologia. Os isolados foram inicialmente observados usando um microscópio óptico de luz (Carl Zeiss, Germany), sob aumento de 400X. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada no microscópio modelo LEO 982 (Carl Zeiss/Leica, Germany). Os espécimes foram preparados para serem visualizados por campo de emissão de acordo com protocolos padrões utilizados na EMBRAPA-CNPMA (Jaguariúna, SP). Pedacos do meio sólido contendo micélio aéreo (21 dias) foram cortados em pedaços (4,0 x 0,5 cm) e submetidos à fixação inicial com tampão fosfato 0,1M contendo 2% de glutaraldeído por 1 hora a 16° C. As amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) com tampão fosfato 0,1M e submetidos a uma segunda fixação utilizando a solução a 1% de tetróxido de ósmio em tampão fosfato 0,1 M por 1 hora a 16°C. As amostras foram novamente lavadas, como descrito previamente, e submetidas à desidratação em soluções seriadas de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 95% e 100%; 20 minutos cada) a 16°C. As amostras foram mantidas em etanol absoluto à temperatura ambiente e, em seguida, secas no equipamento Critical Point Drier K850 (Emitech Ltda., Ashford, England). Após a secagem, as amostras foram colocadas sobre *stubs* e cobertas com ouro (150 nm espessura) em equipamento Sputter Coater K550 (Emitech Ltda., Ashford, England), utilizando 20 mA por 2 minutos.

2.5. Testes fisiológicos. Foram realizados os seguintes testes: hidrólise do amido revelado com lugol, segundo Gordon *et al.* (1973); redução de nitrato em nitrito, segundo Gottlieb (1961); crescimento em diferentes temperaturas de 25°C, 35°C, 50°C e 55°C, em meio ISP-2, durante 7, 14 e 21 dias.

2.6. Extração de DNA. A biomassa foi obtida por centrifugação e, em seguida, lavada com NaCl 0,1 M e M EDTA 0,1, pH 8,0 e estocada a -20°C. O DNA total foi obtido como descrito por Picher *et al.* (1989), com pequenas modificações. Aliquotas de culturas

líquidas (1,5 mL) foram centrifugadas (12.000 rpm por 3 minutos) e lavadas duas vezes com 1,0 mL de água ultrapura (Milli-Q). O sedimento foi macerado contra a parede do tubo adicionando-se pérolas de vidro. As células foram, então, ressuspensas em 100 mL de tampão TE pH 8,0 (Sambrook *et al.*, 1989) contendo lisozima (2,0 mg/mL) e incubadas por 1 hora a 37°C.

2.7. Amplificação de 16S DNAr e 16S DNAr/região espaçadora DNAr 16S-23S.

Fragmentos do DNAr 16S foram amplificados a partir do DNA genômico, utilizando os *primers* p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; Lane, 1991) e p1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAAGG-3'; Heuer *et al.*, 1997). Reações de PCR (50 mL) continham 100 ng de DNA genômico, 2 U *Taq* polimerase (Amersham Biosciences), 0,2 mM dNTPs e 0,2 mM de cada *primer* em tampão de *Taq* polimerase 1X (Amersham Pharmacia Biotech). As condições de amplificação consistiram de 1 ciclo a 95°C (2 minutos), seguido por 30 ciclos a 94°C (1 minuto), 55° C (1 minuto) e 72°C (3 minutos) e um ciclo final de extensão a 72°C (5 minutos). A amplificação de 16S DNAr/região espaçadora DNAr 16S-23S foi feita utilizando as mesmas condições de reação descritas acima e os *primers* p27f (Lane, 1991) e 23Suni322-anti (Honeycutt *et al.*, 1995). As condições de amplificação consistiram de um PCR *Touch Down* inicial de um ciclo a 95°C (3 minutos), seguido por 10 ciclos a 94°C (2 minutos), 55° C (1 minuto) com diminuição de 0,5° C a cada ciclo e 72°C (3 minutos); ao final destes 10 ciclos iniciava-se outro programa de 30 ciclos de 94°C (2 minuto), 50° C (1 minuto) e 72°C (3 minutos) e um ciclo final de extensão a 72°C (3 minutos). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 2400. Os produtos de PCR foram checados por gel de eletroforese em 1% gel de agarose corando com brometo de etídio (0,1 µg/mL), visualizado sob luz violeta (Sambrook *et al.*, 1989) e armazenados a -20°C até a etapa de seqüenciamento.

2.8. Seqüenciamento direto de produtos do PCR de 16S DNAr. Os fragmentos de DNAr 16S foram seqüenciados pelo sistema automatizado ALF Express II (Amersham Biosciences), utilizando o Kit de seqüenciamento *Thermo Sequenase* com *primer* marcado com fluorescência Cy-5 (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com instruções do fabricante. Os *primers* utilizados no seqüenciamento eram internos ao gene DNAr 16S: p10f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Lane *et al.*, 1985); p1100r (5'-

AGGGTTGCGCTCGTTG-3'; Lane, 1991), e p782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3'; Lane, 1991).

2.9. ARDRA. Os fragmentos de 16S DNAr foram clivados com as enzimas *Hae* III (Amersham Biosciences), *Msp* I (Amersham Biosciences) e *Rsa* I (Promega), e os fragmentos de DNAr 16S/região espaçadora DNAr 16S-23S foram clivados com *Alu* I (Amersham Biosciences), segundo protocolos dos fabricantes. A eletroforese dos produtos de restrição do DNAr 16S foi realizada em gel de agarose 3% (1,5% agarose LMP e 1,5% agarose NA), a 80 V por duas horas e meia. Os produtos de restrição de DNAr 16S/região espaçadora foram separados em gel de agarose 1%, a 100 V por 3 horas. Foi utilizado 1% de brometo de etídio nos géis. A comparação dos perfis de ARDRA foi realizada manualmente e com auxílio do programa *Free Tree* (Pavlicek *et al.*, 1999), versão 0.9.1.50.

2.10. Análise filogenética das seqüências obtidas. Todas as seqüências obtidas, aproximadamente 1100 pb, foram inicialmente comparadas com seqüências de DNAr 16S de microrganismos presentes em base de dados públicas como RDP (Ribosomal Database Project, Wiscosin, USA, <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Em seguida, as seqüências foram alinhadas com aquelas dos bancos de dados que apresentaram maiores valores de similaridade e seqüências de microrganismos relacionados como *outgroup* utilizando o programa Clustal X. Mais de um *outgroup* foi utilizado nas análises filogenéticas. As seqüências foram editadas utilizando o programa BioEdit versão v5.0.9 (Hall, 2001) e as análises filogenéticas foram efetuadas com o programa PAUP versão 4.0b10 (Swofford, 1998), onde foram utilizados três diferentes métodos: (a) distância, utilizando o algoritmo NJ (*Neighbour-Joining*), (b) parcimônia máxima, utilizando um algoritmo de busca heurística e (c) verossimilhança máxima, também utilizando um algoritmo de busca heurística. Efetuou-se, ainda, análise filogenética de inferência bayesiana, baseada em simulações de monte carlo para cadeias de markov (100.000 replicações), utilizando o programa *MrBayes* versão 3.0 (Hulsenback e Ronquist, 2003). Todas as análises foram realizadas mantendo cinco parâmetros constantes: (1) a não-ordenação de todos os caracteres, já que não há, *a priori*, nenhuma base para codificar qualquer série de transformação (Hauser e Presch, 1991), (2) o tratamento de *indels* como um quinto estado de caráter, (3) a igualdade de pesos para todos os caracteres, (4) a utilização de apenas caracteres

variáveis, (5) enraizamento das árvores resultantes das análises com os seguintes grupos externos: *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium fragilis*, *Nonomurea salmonea* e *Nonomurea pusilla*, uma vez que são grupos relacionados ao gênero *Microbispora* (Wang *et al.*, 1996a).

A robustez dos grupos foi avaliada por meio de *bootstrap* (Felsenstein, 1989) (1.000 repetições) com o programa *PAUP* versão 4.0b10. As árvores foram editadas utilizando-se os programas *TREEVIEW* versão 1.6.6 (Page, 1996) e *WINCLADA* versão 0.9.99m24 (Beta) (Nixon, 1999).

3. Resultados e Discussão

Todos os 47 actinomicetos isolados neste trabalho pertencem ao gênero *Microbispora* sp. Estes resultados corroboram com trabalhos da literatura (Takahashi *et al.*, 1995; Okazaki *et al.*, 1995; Kizuka *et al.*, 1998; Araújo *et al.*, 2000), quanto ao isolamento de actinomicetos raros do grupo microbisporae de folhas de plantas. O isolamento preferencial do gênero *Microbispora* sp. pode ter ocorrido pelo possível fato de seus esporos serem mais resistentes ao tratamento utilizado neste trabalho para a desinfecção das folhas. Segundo Labeda (1990), os gêneros *Microbispora*, *Micromonospora* e *Streptosporangium* estão entre os actinomicetos que apresentam os esporos mais resistentes a regimes de aquecimento (120° C, calor seco, por 1 hora). O tempo de desinfecção de 15 minutos em 2% hipoclorito de sódio pode ter contribuído para a seleção de esporos de *Microbispora*. Este tempo de desinfecção das folhas teve que ser mais demorado do que o descrito na literatura (cinco minutos por Maitan, 1998 e Matsuura, 1998), pois as folhas de *Tocoyena formosa* apresentam tricomas em sua superfície, o que contribuía com a elevada contaminação de fungos filamentosos nos tubos controle (caldo nutriente). Na literatura, Hayakawa *et al.* (1997) utilizaram cloramina-T, um antifúngico, a 1% para isolamento seletivo de *Streptosporangiaceae* do solo e obtiveram elevada frequência de isolamento (75% do total) de *Herbidospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora* e *Streptosporangium*.

A Tabela 1 mostra a frequência de isolados por planta estudada. Aproximadamente 55% dos isolados foram obtidos de um mesmo indivíduo de *Tocoyena formosa*, T03; 15% dos isolados da planta T07; 8% da planta T10; 6% de cada indivíduo T-01 e T22; 4% da planta T02, 2% de cada uma das plantas T04 e T05. Nenhum microrganismo pertencente ao gênero *Microbispora* foi isolado das plantas T06 e T08

(Tabela 1). Os meios de cultura que apresentaram maior número de isolados foram o AAC (74% dos isolados) e AHV (21% dos isolados), o meio TSA foi responsável pelo isolamento de 5% de microbisporeae. Diferentemente do que é descrito na literatura (Goodfellow, 1992), a vitamina B não foi essencial para o crescimento dos isolados.

Tabela 1. Identificação das plantas e número de microrganismos isolados

Identificação da planta	Número e porcentagem de isolados
T03	26 (55,3%)
T07	7 (14,9%)
T10	4 (8,5%)
T01	3 (6,4%)
T22	3 (6,4%)
T02	2 (4,3%)
T04	1 (2,1%)
T05	1 (2,1%)
T06	0
T08	0
Total	47 (100%)

A observação micromorfológica em microscópio de luz mostrou que todos os isolados produziram esporos pareados no ápice dos esporóforos na hifa aérea. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura corroboraram com os da microscopia de luz (Figura 1a e 1b). Apesar desta característica ser apresentada pela maioria dos membros do gênero *Microbispora*, a espécie *Microbispora mesophila* produz apenas um esporo, enquanto que uma espécie de outro gênero, *Thermomonospora bispore* (antigo *Micobispora bispore*), também produz dois esporos.

Com exceção de APU-27, todos os isolados foram capazes de hidrolisar o amido (Figura 2). Todos os isolados foram capazes de reduzir de nitrato em nitrito e de crescer nas temperaturas 25°C e 35°C, sendo o crescimento visivelmente maior na temperatura de 35°C (Figura 3). Somente o isolado APU-27 foi capaz de crescer, além das temperaturas de 25 e 35°C, a 50°C; porém nenhum deles cresceu a 55°C. Comparando-se os resultados dos testes fisiológicos obtidos dos isolados com a literatura (Tabela 2), foi observado que o isolado APU-27 apresentou características fisiológicas mais parecidas com a espécie *M. indica* e que os demais isolados apresentaram características fisiológicas semelhantes à espécie *M. chromogenes*, dentre os testes bioquímicos realizados.

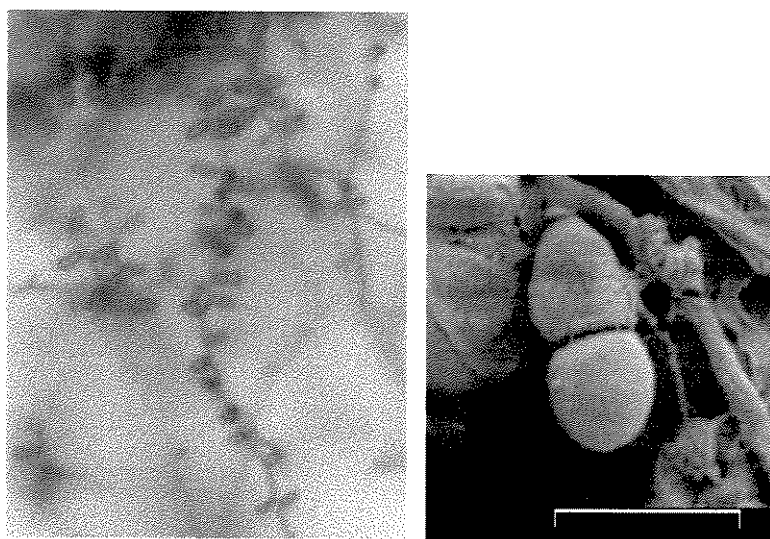


Figura 01. Micromorfologia dos isolados APU-27 (a; 400 X) e APU-30 (b; MEV) em meio ISP-2.

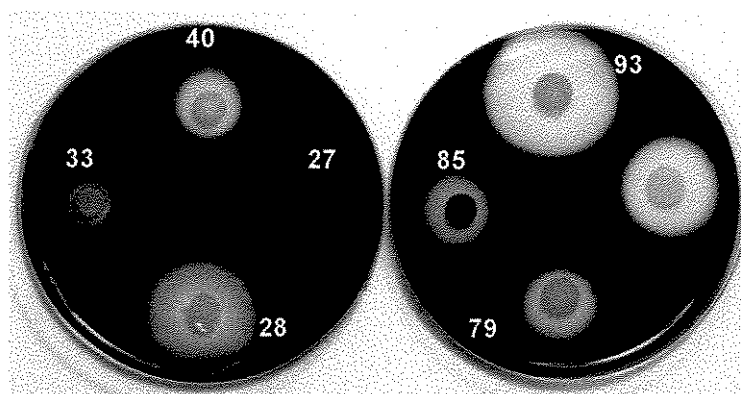


Figura 02. Ensaio de hidrólise de amido de alguns isolados selecionados.

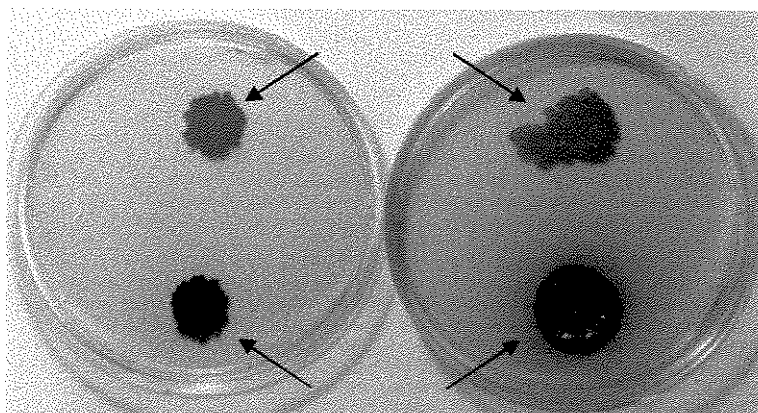


Figura 03. Aspecto do crescimento dos isolados APU-04 e APU-57 em meio ISP-2 nas temperaturas de (a) 25 e (b) 35 °C.

Tabela 2 - Características bioquímicas diferenciais de espécies do gênero *Microbispora* (Holt *et al.*, 1994) e dos microrganismos isolados neste estudo

	<i>M.</i> <i>aerata</i>	<i>M.</i> <i>amethystogenes</i>	<i>M.</i> <i>chromogenes</i> e isolados do grupo I*	<i>M. diastatica</i>	<i>M. indica</i> e isolados do grupo II**	<i>M.</i> <i>kamatakensis</i>	<i>M.</i> <i>parva</i>	<i>M.</i> <i>rosea</i>	<i>M.</i> <i>thermodiastatica</i>	<i>M.</i> <i>thermorosea</i>
Crescimento a:	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25 °C										
35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 °C	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
55 °C	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Redução de nitrato	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Hidrólise de amido	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-

*Grupo I: Todos os isolados, exceto APU-27. **Grupo II: APU-27

Os resultados de ARDRA dos fragmentos de rDNA 16S utilizando as enzimas *Hae* III (Figura 4), *Msp* I (Figura 5) e *Rsa* I (Figura 6), quando analisados conjuntamente, revelaram pelo menos 17 diferentes perfis de restrição dentre os 47 isolados de microbisporeae. O ARDRA do DNAr 16S/região espaçadora DNAr 16S-23S com a enzima *Alu* I foi realizado para diferenciar os isolados que apresentaram o mesmo perfil de restrição para as três enzimas acima citadas (Figura 7) e demonstrou a presença de pelo menos 21 diferentes perfis de restrição. A Tabela 3 mostra a compilação dos resultados gerados pelos diferentes perfis de ARDRA com as enzimas *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I conjuntamente e com a enzima *Alu* I.

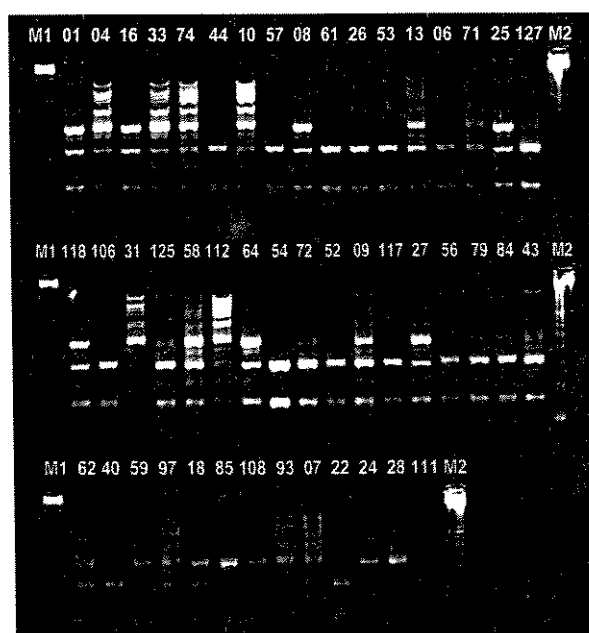


Figura 04. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima *Hae* III.

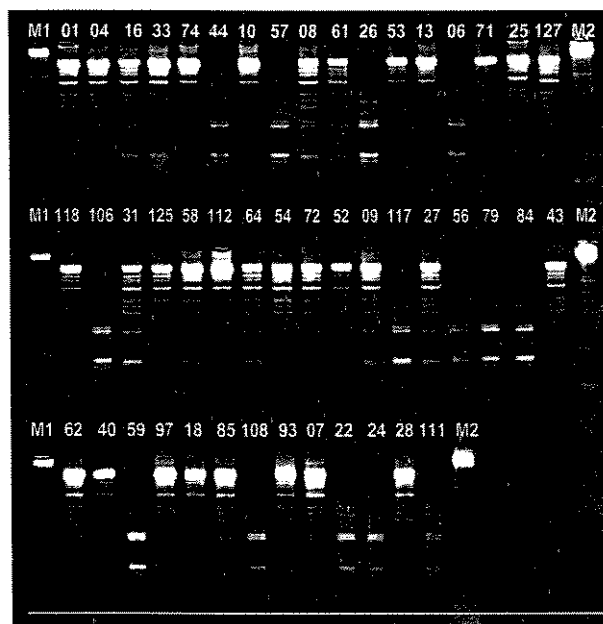


Figura 05. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima *Msp* I.

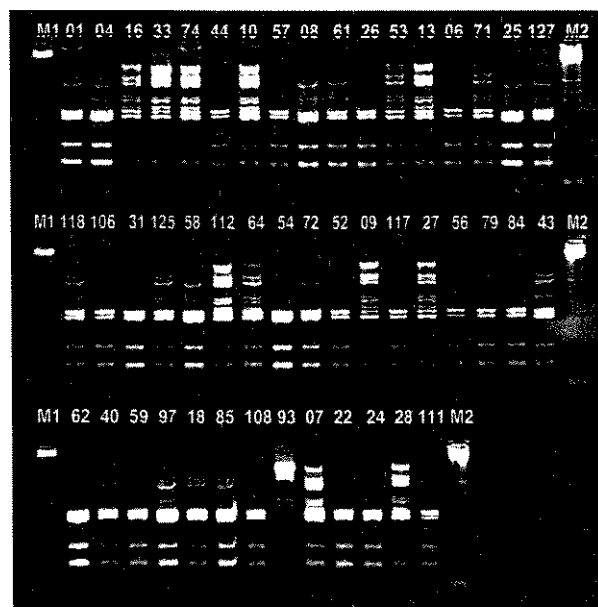


Figura 06. Perfil de ARDRA do DNAr 16S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima *Rsa* I.

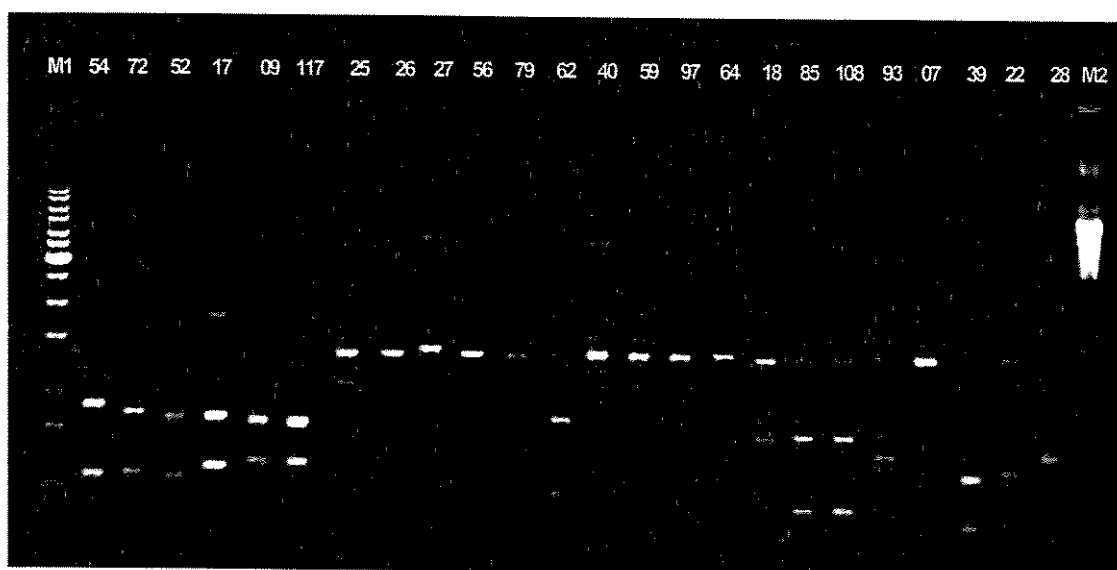
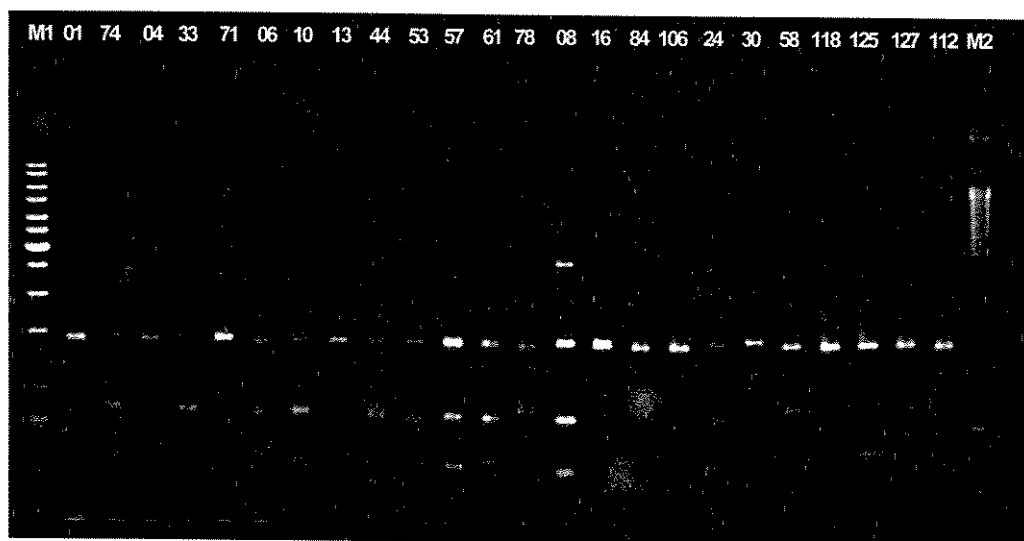


Figura 07. Perfil de ARDRA do DNAr 16S e região espaçadora DNAr 16S-23S dos 47 microrganismos isolados obtidos com a enzima *A/u* I.

Tabela 3. Classificação dos microrganismos isolados quando aos perfis de ARDRA gerados

Número do isolado (APU)	Perfil ARDRA: 16S/Msp I, Rsa I e Hae III	Perfil ARDRA: 16S + espaçadora DNAr/Alu I	Código da planta
44	333	3	T03
57	333	3	T01
06	333	3	T10
56	333	15	T03
79	333	15	T07
22	333	20	T22
26	333	1	T03
01	111	1	T01
04	111	1	T01
25	111	1	T03
62	111	20	T03
85	111	17	T03
09	221	12	T03
16	221	4	T03
27	221	13	T03
33	221	2	T22
64	221	14	T03
106	334	5	T10
84	334	5	T07
24	334	3	T03
59	334	14	T03
108	334	17	T03
10	122	3	T03
13	122	3	T02
71	122	3	T03
74	122	2	T04
52	133	12	T05
54	133	10	T03
43	133	11	T03
72	133	11	T03
111	133	-	T03
125	121	8	T03
127	121	8	T03
07	121	19	T03
28	121	21	T07
18	124	16	T07
118	124	4	T02
40	113	14	T10
61	113	4	T03
08	211	-	T22
31	231	-	T07
58	112	-	T03
97	212	-	T03
112	222	-	T03
117	433	-	T10
53	123	-	T07
93	141	-	T07

(-) Não foi realizada a reação de restrição

Na Tabela 3, podemos observar que os isolados APU-01 e APU-04 são possivelmente um mesmo isolado, pois apresentam o mesmo perfil de restrição para as quatro enzimas testadas e foram provenientes da mesma planta (T01). O mesmo aconteceu com os isolados APU-10 e APU-71, oriundos do indivíduo T03; com os isolados APU-125 e APU-127, provenientes do indivíduo T03 e com os isolados APU-43 e APU-72, isolados da planta T03, que é corroborado pelos resultados da análise filogenética, onde estes dois isolados aparecem sempre agrupados em todas as árvores obtidas (Tabela 4). Pela análise do perfil do ARDRA também é possível notar que a mesma linhagem parece estar presente em diferentes indivíduos de *Tocoyena formosa* estudados, como é o caso de: APU-06, APU-44 e APU-57 que apresentam o mesmo perfil de restrição para as quatro enzimas testadas e que foram isolados das plantas: T10, T03 e T01, respectivamente. O mesmo acontece para os isolados APU-56 e APU-79, provenientes das plantas T03 e T07; com os isolados APU-01 (e APU-04) e APU-25, provenientes dos indivíduos T01 e T03; com os isolados APU-84 e APU-106, provenientes dos indivíduos T07 e T10 e com os isolados APU-10 (e APU-71) e APU-13, provenientes dos indivíduos T03 e T02 (Tabela 3).

Foram analisadas as seqüências correspondentes às posições de 20 a 1128 do DNAr 16S para isolados representativos dos perfis de ARDRA obtidos. Na árvore resultante do método de distância (NJ) todo o grupo interno (isolados deste estudo e espécies de *Microbispora* cujas seqüências foram obtidas no GenBank) formou um único grupo com valor de *bootstrap* de 98% (grupo A) (Figura 08). O valor mínimo de *bootstrap* considerado para a comparação das árvores foi de 50%. Este agrupamento é formado por dois grupos menos inclusivos, um deles composto por todas as *Microbispora* com exceção da *M. amethystogenes* e *M. rosea* e o outro constituído por todos os isolados com *M. amethystogenes* e *M. rosea* (grupo B), ambos com valores de *bootstrap* inferiores a 50%. Oito isolados e *M. rosea* subsp. *rosea* formam um grupo bem delimitado na análise, sustentado por um índice de *bootstrap* de 90% (grupo H). Dentro deste, um grupo formado pelos isolados APU 33, APU 08 e APU 31 tiveram um suporte de *bootstrap* de 50% enquanto que o outro grupo formado por APU 53, APU, 26, APU 61, APU 10, APU 13 e *M. rosea* foi o que apresentou o maior suporte, com um valor de *bootstrap* de 96% (grupo I) (Figura 08).

Todo o grupo interno (grupo A) também aparece formando um agrupamento único na árvore resultante da análise de verossimilhança máxima (*bootstrap* de 98%) (Figura 09), sendo composto por três grupos menos inclusivos, um formado por todas as

Microbispora, com exceção da *M. rosea*, um outro formado por 11 isolados (grupo C) e um com *M. rosea*, juntamente com mais 21 isolados (grupo E).

O resultado final da análise de parcimônia máxima correspondeu a quatro árvores não-enraizadas igualmente mais parcimoniosas com 275 passos evolutivos, com um índice de consistência (CI) = 0,629, um índice de retenção (RI) = 0,742 e um índice de consistência reescalado (RC) = 0,467. As quatro árvores igualmente mais parcimoniosas exibem as seguintes relações filogenéticas em comum: (i) o monofiletismo do grupo interno (*Microbispora*) com valor de *bootstrap* de 100% (grupo A), (ii) o clado formado por *M. amethystogenes*, todos os isolados, incluindo *M. rosea* (grupo B), com os respectivos clados menos inclusivos, um deles formado exclusivamente por 11 isolados (grupo C) e o outro compreendo 22 isolados + *M. rosea* (grupo E). Este último grupo apresenta dois grupos menos inclusivos, os grupos H e I, ambos com um suporte de *bootstrap* de 97%, como se pode visualizar na árvore de consenso estrito (Figura 10). A inferência bayesiana, baseada em simulações de monte carlo para cadeias de markov apresentou seis grupos com probabilidades posteriores superiores a 50%. O grupo A que corresponde ao grupo interno (*Microbispora* spp. + isolados) com 63% de probabilidade posterior (p.p.), um grupo (alfa) menos inclusivo com 58% de p.p. constituído por *M. parva*, *M. amethystogenes*, *M. thermodiastatica* e *M. aerata*, todos os isolados, além de *M. rosea* subsp. *rosea*. Dentro do grupo alfa, a análise evidenciou ainda os grupos II, G e D com p.p. de 95%, 93% e 59%, respectivamente (Figura 11).

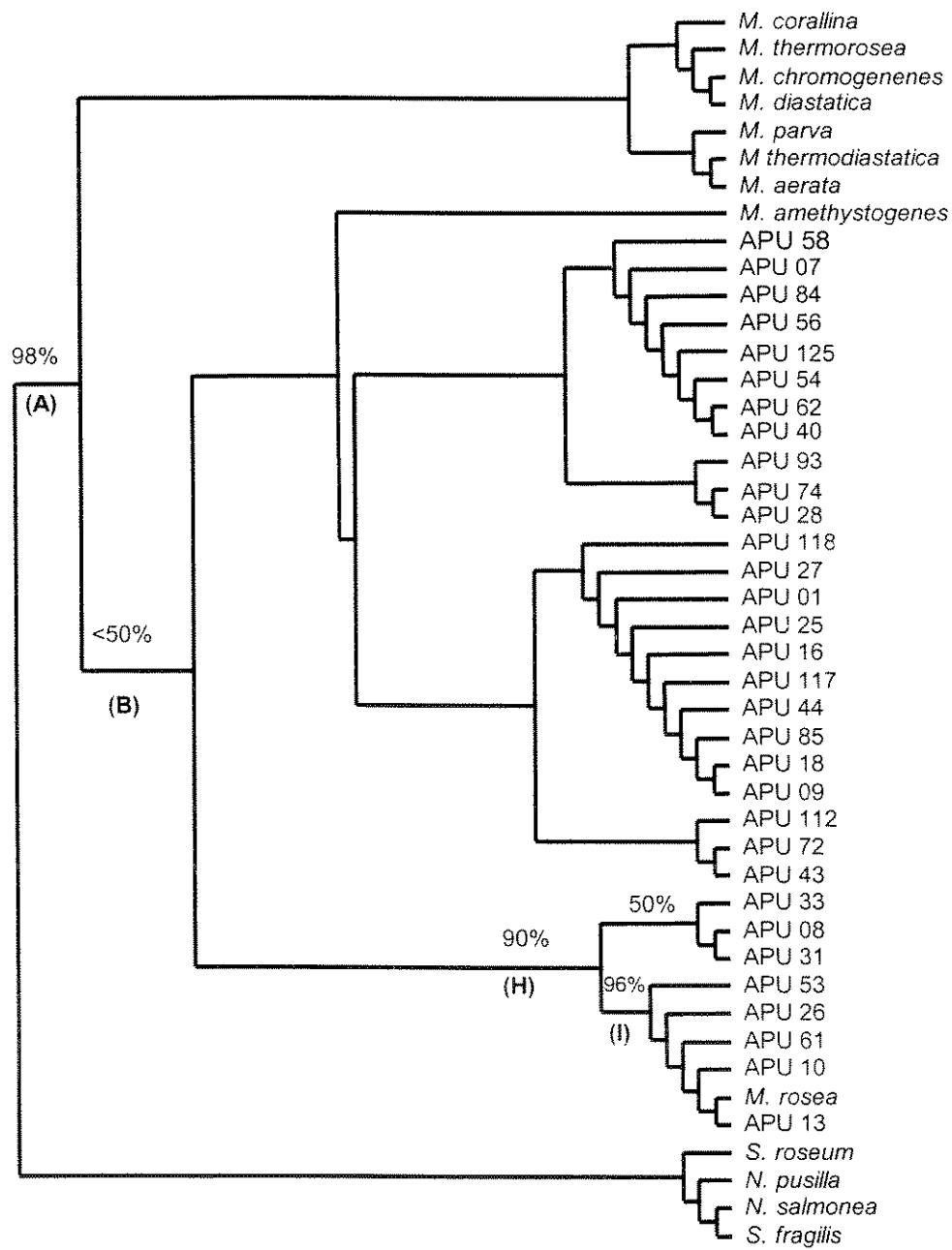


Figura 08. Árvore resultante da análise de distância (*Neighbour Joining*).

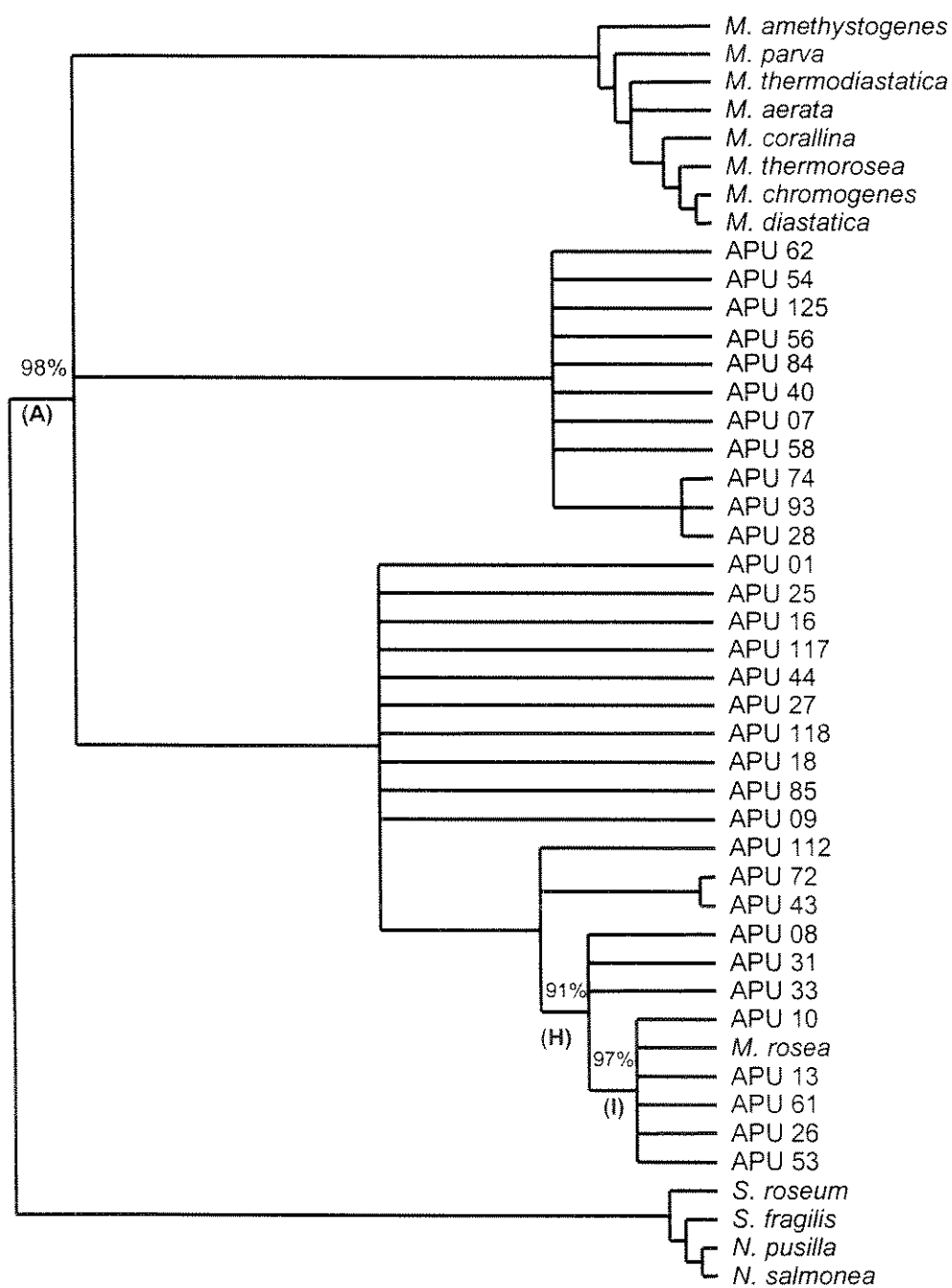


Figura 09. Árvore resultante da análise de verossimilhança máxima.

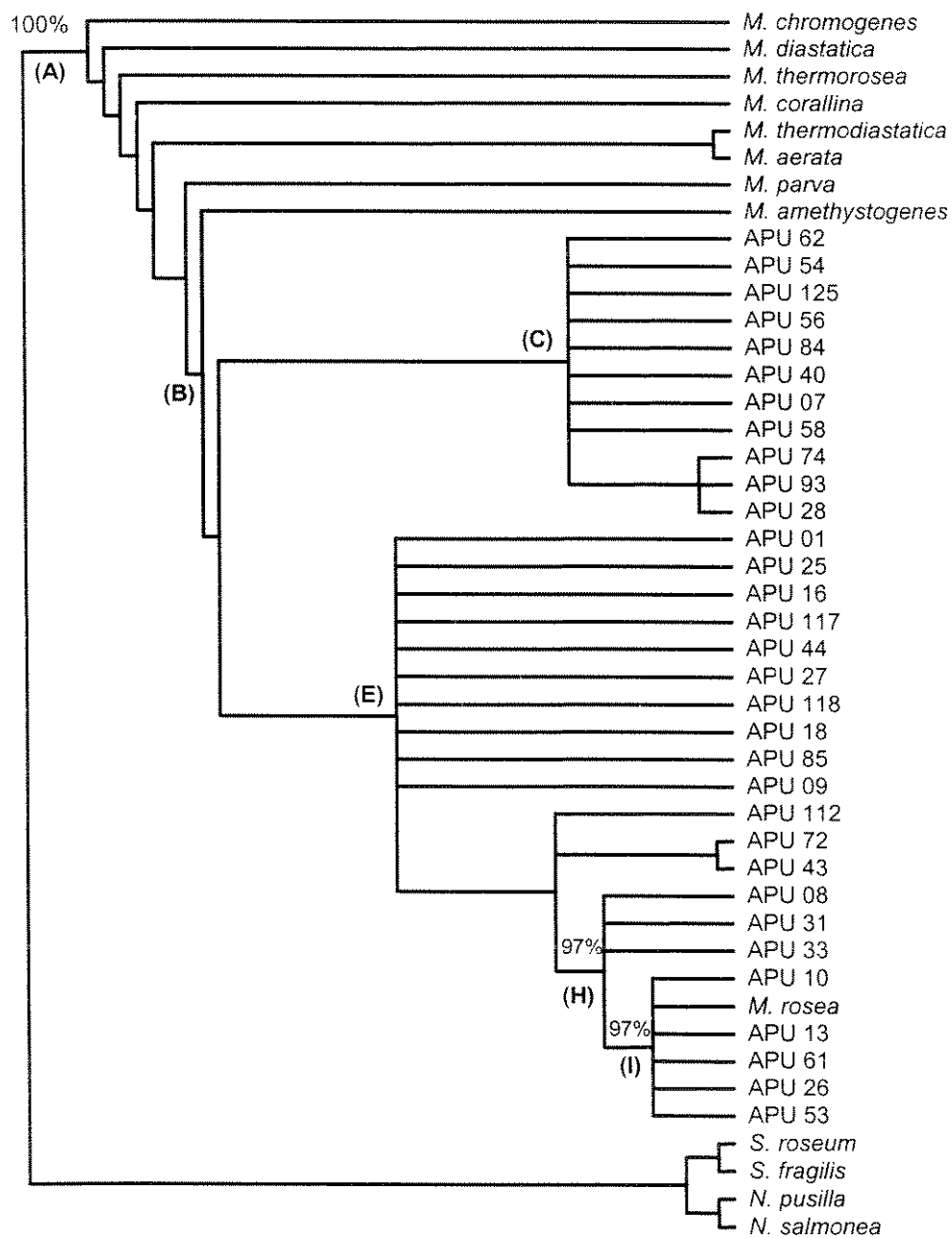


Figura 10. Árvore de consenso estrito resultante da análise de parcimônia.

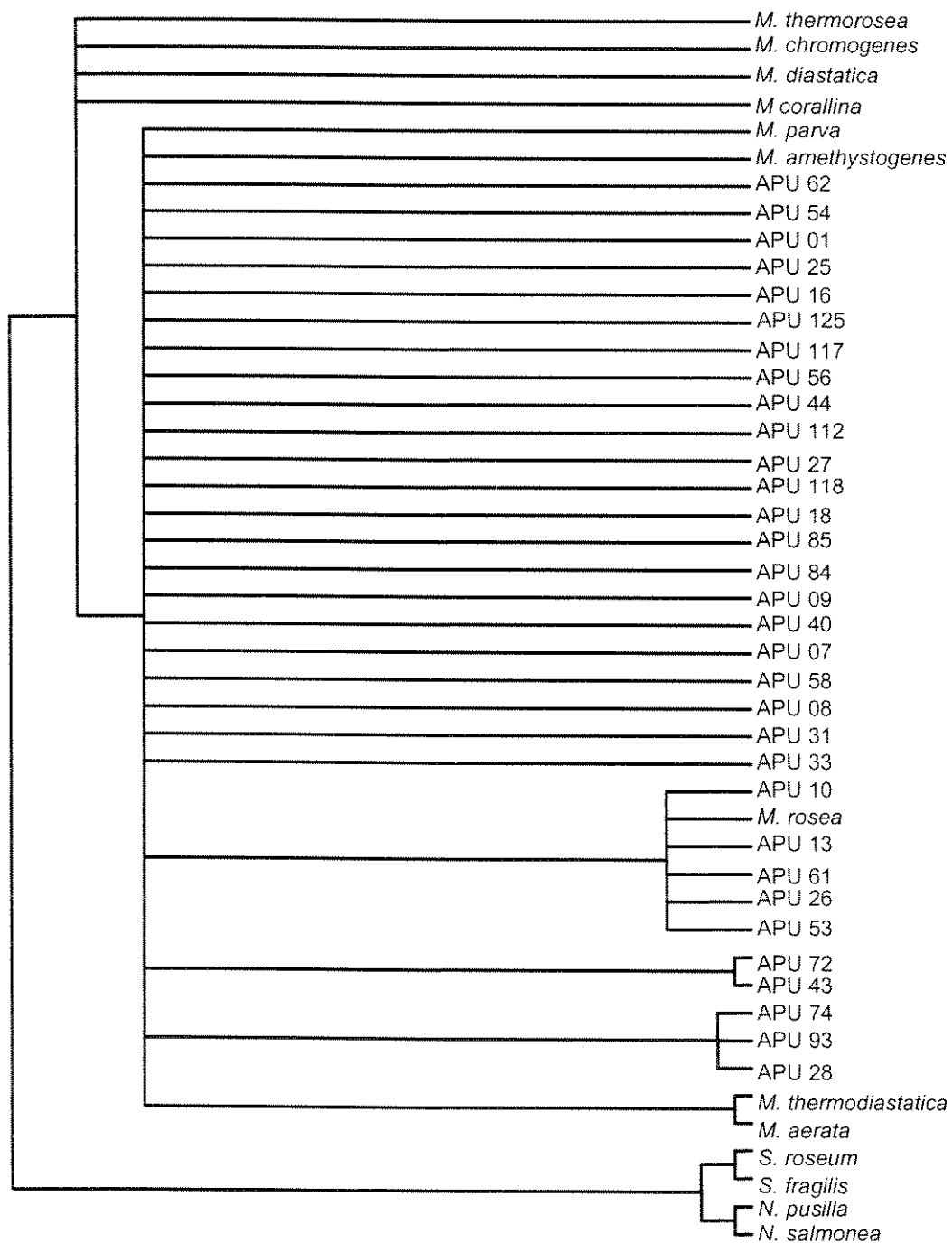


Figura 11. Árvore de consenso estrito resultante da análise de inferência bayesiana.

Apesar da divergência na topologia e na interrelação entre alguns dos grupos resultantes das distintas análises, os grupos A, C, D, G, H e I são resgatados nas quatro análises, enquanto que os grupos B, E e F ocorreram em pelo menos duas, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Compilação dos resultados das análises filogenéticas mostrando a presença e a robustez dos grupos que ocorreram em pelo menos duas análises distintas (evidenciados em cinza) e respectivos valores de *bootstrap* (1000 replicações)

Grupos filogenéticos	Análises*			
	NJ	PM	VM	IB
(A) <i>Microbispora</i> spp. + todos os isolados	98%	100%	98%	63%
(B) <i>M. amethystogenes</i> + isolados e <i>M. rosea</i>	32%	32%		
(C) Isolados: APU 62, APU 54, APU 125, APU 56, APU 84, APU 07, APU 58, APU 40, APU 93, APU 74, APU 28	40%	< 10%	37%	
(D) Isolados: APU 93, APU 74, APU 28	36%	43%	34%	59%
(E) Isolados: APU 01, APU 25, APU 16, APU 117, APU 44, APU 27, APU 118, APU 18, APU 85, APU 09, APU 112, APU 72, APU 43, APU 08, APU 31, APU 33, APU 10, <i>M. rosea</i> , APU 13, APU 61, APU 26, APU 53		18%	18%	
(F) Isolados: APU 112, APU 72, APU 43, APU 08, APU 31, APU 33, APU 10, <i>M. rosea</i> , APU 13, APU 61, APU 26, APU 53		19%	15%	
(G) Isolados: APU 72, APU 43	44%	50%	38%	93%
(H) Isolados: APU 08, APU 31, APU 33, APU 10, <i>M. rosea</i> , APU 13, APU 61, APU 26, APU 53	90%	97%	91%	
(I) Isolados: APU 10, <i>M. rosea</i> , APU 13, APU 61, APU 26, APU 53	96%	97%	97%	95%

*NJ = distância; PM = parcimônia máxima; VM = verossimilhança máxima; IB = inferência bayesiana.

Conclusões

O protocolo de isolamento seletivo utilizado permitiu o isolamento de 47 actinomicetos, todos pertencentes ao gênero *Microbispora* sp. Resultados de caracterização molecular dos isolados através de RFLP de DNAr 16S (ARDRA) com as enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I, e de fragmentos da região DNAr 16S-23S com a enzima *Alu* I, mostraram uma elevada variabilidade para o grupo de microbisporas isoladas. Estes dados indicaram a presença de linhagens distintas dentro de uma mesma planta, bem como a ocorrência do mesmo ribotipo em diferentes plantas de *Tocoyena formosa* analisadas. A maioria dos isolados foi identificada como *M. rosea*, com base nas análises de sequências de rDNA 16S. Alguns isolados (APU 93, APU 74 e APU 28) foram recuperados como grupos distintos com base nos dados de ARDRA, RFLP de fragmentos de região espaçadora e análises filogenéticas, indicando que estes podem vir a representar uma nova espécie dentro do gênero *Microbispora*.

Agradecimentos: CNPq, FAPESP, Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo Mitsui.

CAPÍTULO II. Atividade antimicrobiana de actinomicetos raros cultivados em diferentes meios

^{1,6}Uetanabaro, A.P.T., ²Matsuura, T., ³Hamerski, L., ³Cavalheiro, A.J., ³Bolzani, V.S., ^{4,6}Canhos, V.P., ⁵Manfio, G.P.

¹ Universidade Estadual de Feira de Santana – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Feira de Santana/BA

² Universidade Federal do Amazonas – Laboratório de Microbiologia, Manaus/AM

³ Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química, Araraquara/SP

⁴ Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA, Campinas/SP

⁵ Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, Campinas/SP

⁶ Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/DCA/FEA - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP);

Resumo

Devido à potencial capacidade de produzir diferentes antibióticos, o isolamento e triagem de actinomicetos raros podem levar à descoberta de novos antibióticos e compostos bioativos. O presente trabalho descreve o efeito de diferentes meios de cultura (AP caldo, AP sólido, APH sólido; MPA sólido, MMG sólido) sobre a produção de compostos antimicrobianos por 47 actinomicetos pertencentes ao gênero *Microbispora*, e seu potencial de inibição contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*. A composição química do meio influenciou a resposta dos organismos testados, sendo entre 15 a 17% dos isolados exibiram atividade em meio AP, APH e MPA sólidos. Os meios AP caldo e MMG sólido não estimularam a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana para a maioria dos isolados nas condições utilizadas. Em contraste, alguns dos isolados produziram compostos capazes de estimular o crescimento dos microrganismos-teste ao redor dos plugs de ensaio. Os produtos metabólicos de diferentes caldos de cultivo foram caracterizados quimicamente, demonstrando a produção de diferentes compostos nas diferentes condições de cultivo empregadas.

Palavras-chave: actinomicetos, atividade antimicrobiana, *Microbispora*, metabólitos secundários.

Abstract

Due to the known potencial to produce different antibiotics, the isolation and screening of rare actinomycetes may lead to the discovery of new antibiotics and bioactive compounds. Chemical composition of the culture medium and cultivation conditions are critical for metabolite production. Thus, we investigated the effect of different culture media on the capacity of 47 actinomycetes belonging to the genus *Microbispora* to produce antimicrobial activity against the bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and the fungi *Aspergillus niger* and *Candida albicans*. The culture media strongly influenced antimicrobial activity: from 15 to 17% of the isolates were active when grown on solid AP, APH and MPA. Most isolates were inactive on AP broth and solid MMG. In contrast, some strains were able to induce growth of the test microorganisms around assay plugs. Chemical analyses demonstrated the production of different metabolites under the different growth conditions tested.

Key words: Actinomycetes, antimicrobial activity, *Microbispora*, secondary metabolites.

1. Introdução

A seleção de compostos produzidos por actinomicetos representa um caminho importante para a descoberta de compostos biotecnologicamente ativos (Hiyashide, 1995, Osada, 1998 e Woodruff, 1999). Com este intuito, muita atenção tem sido dada aos actinomicetos considerados raros (Takahashi *et al.*, 1996). Devido à sua capacidade de produzir diferentes antibióticos, o isolamento e triagem destes organismos podem levar à descoberta de novos antibióticos e compostos bioativos (Okami e Hotta, 1988; Takahashi *et al.*, 1996). O grupo das microbisporas tem sido reconhecido como fonte dessas moléculas, como, por exemplo, as fenazinas (Gerber e Lechevalier, 1964; Tanabe *et al.*, 1995), o antifúngico Sch 31828 (Patel *et al.*, 1988), colchinmicinas (Lam *et al.*, 1992) e algemicinas (Uehara *et al.*, 1993) e outros antibióticos (Kimura *et al.*, 1997; Igarashi *et al.*, 1998). Kimura *et al.* (1997) relataram a produção da propeptina, um antibiótico peptídico cíclico atípico, por linhagens de *Microbispora* sp. A composição do meio de cultivo também pode afetar a produção de metabólitos secundários em microrganismos. Em geral, a glicose, uma excelente fonte de carbono para o crescimento, interfere na formação de muitos metabólitos secundários. O mesmo acontece com algumas fontes de nitrogênio favoráveis ao crescimento como, por exemplo, os sais de amônio. Fontes inorgânicas de fosfato, alguns metais e elevados níveis de oxigênio dissolvido podem

afetar negativamente a produção de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos (Demain e Fang, 1995). Na literatura, estudos de antimicrobianos dentro do grupo *Microbispora* ainda são escassos. O presente trabalho descreve o efeito da atividade antimicrobiana de actinomicetos, pertencentes ao gênero *Microbispora* isolados de folhas de *Tocoyena formosa* cultivados em cinco diferentes meios de cultura, sobre as bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, e os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos e meios de cultivo. Foram testadas 47 linhagens de actinomicetos, todas pertencentes ao gênero *Microbispora*, isoladas e caracterizadas no Capítulo I deste trabalho. Os microrganismos-teste utilizados, meio de cultura e suas respectivas condições de crescimento durante o teste foram as bactérias *Bacillus subtilis* CCT 0089 (meio ágar nutriente a 30°C por 24 horas), *Escherichia coli* CCT 1457, *Pseudomonas aeruginosa* CCT 1476 e *Staphylococcus aureus* CCT 0070 (meio ágar nutriente a 37°C por 24 horas), e os fungos *Aspergillus niger* CCT 1435 (meio ágar extrato de malte a 28°C por 72 horas) e *Candida albicans* CCT 2546 (meio ágar malte extrato de levedura - YMA, a 28°C por 48 horas). Os microrganismos-teste foram gentilmente cedidos pela Coleção de Culturas Tropical (CCT, Fundação André Tosello, Campinas, SP).

2.2. Atividade antimicrobiana. A caracterização da atividade antimicrobiana foi realizada segundo metodologia proposta por Ichikawa *et al.* (1971), sendo substituída a técnica de plaqueamento “pour plate” pela “spread-plate”. Os meios de cultura sólidos utilizados foram: AP e meio AP enriquecido com ácido húmico (APH) (Hayakawa e Nonomura, 1987; Hayakawa *et al.*, 1996), MPA modificado (2% peptona de soja, 2% glicose, 0,5% NaCl e 0,2% CaCO₃, pH = 6,6-6,8; autoclavado duas vezes) e Meio Mínimo com Glutamina – MMG [0,7% (NH₄)H₂PO₄, 0,15% (NH₄)₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,03% CaCl₂, 0,25% solução de sais, 0,1% glutamina, 1,5% ágar, 3% glicose, pH 7,0]. O controle dos meios de cultura testados foi realizado inoculando-se somente os blocos de ágar dos meios de cultura sobre os microrganismos-teste. A caracterização da atividade antimicrobiana também foi realizada em meio líquido, conforme protocolo de Waksman e Woodruff (1941), porém foi utilizado somente um meio de cultura (AP) para o cultivo dos microrganismos isolados. O tempo de incubação foi de 21 dias no meio AP sólido e de 15 dias no meio AP líquido. Foram utilizados discos de papel de filtro de 6,0 mm de diâmetro

para o teste do meio líquido. O diâmetro dos blocos de ágar para o teste na qual os isolados foram crescidos em meios sólidos foi de 7,0 mm. Após o período de incubação dos microrganismos-teste com os discos de papel e blocos de ágar, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição de cada grupo de triplicata e efetuou-se a média.

2.3. Composição química dos extratos produzidos. Os extratos do meio de cultura líquidos: MMG, AP, APH e MPA após 15 dias de crescimento do isolado APU-30 foram obtidos por meio de partição líquido-líquido com acetato de etila. As frações orgânicas resultantes foram concentradas, pesadas e posteriormente ressolubilizadas em solução metanol/água (8:2; v:v) na concentração de 1,0 mg/mL. Esta solução foi submetida ao processo de "clean-up" em cartucho de C-18, previamente condicionado com metanol/água (8:2; v:v). Os extratos foram finalmente filtrados em filtro HV Millex, membrana Durapore®, com poro de 0,45 µm (Millipore®). Foram injetados 10 µL dos extratos em cromatógrafo líquido ProStar 240 equipado com injetor Auto Sampler 410 e com detector PAD ProStar 330 (Varian®). Para separação dos compostos foi usada uma coluna C-18 Phenomenex (5 µm, 250 X 4,6 mm d.i., Luna®). A eluição foi feita em gradiente linear exploratório, variando de 5 a 100% de acetonitrila em 20 minutos e com fluxo de 1,0 mL/min. Os cromatogramas foram desenvolvidos em comprimento de onda fixo em 254 nm.

3. Resultados e Discussão

Foram testados diferentes meios de cultura (AP caldo, AP sólido, APH sólido; MPA sólido, MMG sólido) para o estudo da atividade antimicrobiana dos 47 isolados. Dentre os meios de cultivo sólidos o que apresentou maior atividade foi o AP (17%), seguido de APH e MPA (15% cada). Os meios AP caldo e MMG sólido não estimularam a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana para a maioria dos isolados nas condições utilizadas (2% cada).

Em nosso trabalho houve diferença na atividade antimicrobiana quando o mesmo meio AP foi testado na forma de caldo (2%) e sólido (17%). Foi também observado que somente dois isolados (APU-7 e APU-84) produziram esporos quando inoculados em meio AP sólido, mesmo após 30 dias de incubação. Somente o isolado APU-79 foi capaz de inibir o crescimento de *B. subtilis* CCT 0089 e *S. aureus* CCT 0070, quando cultivado em meio AP líquido e somente o isolado APU-44 foi capaz de inibir o crescimento de *A. niger*, quando cultivado em MMG sólido (dado não mostrado).

Araújo *et al.* (2000) testaram a atividade antimicrobiana de 33 isolados de microbisporas, desses aproximadamente 39% apresentaram atividade contra pelo menos um dos microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*. Utilizando o meio APH líquido, Hayakawa *et al.* (1995) observaram que 92 (23%) dos 439 isolados de microbisporas de solo apresentaram atividade antimicrobiana. Desses, 20% inibiram *S. aureus* IFO3061 e 3% apresentaram atividade contra *Aspergillus niger*. Estes mesmos autores observaram diferenças na atividade antimicrobiana quando os isolados foram crescidos nos meios AP e APH líquidos. A presença de ácido húmico no meio de cultivo pareceu melhorar a produção de substâncias antibióticas (Hayakawa *et al.*, 1995). Entretanto, os isolados do presente trabalho não mostraram diferenças significativas quanto à atividade antimicrobiana na presença/ausência de ácido húmico, tendo como base o meio de cultura AP (Figura 1).

Praticamente os mesmo isolados que apresentaram atividade contra *B. subtilis*, APU-4, APU-18 (Figura 2a), APU-1, APU-59, APU-85 e APU-108, também apresentaram atividade contra *S. aureus* nos meio testados; o isolado APU-118 foi capaz de inibir apenas *B. subtilis*. Para *P. aeruginosa*, os isolados APU-1, APU-7 e APU-44, apresentaram atividade no meio MPA e somente o isolado APU-44 apresentou atividade em meio AP. *E. coli* foi fracamente inibida pelos isolados APU-26 e APU-28, quando cultivados em meio AP. *A. niger* sofreu inibição pelo isolado APU-44 quando este foi crescido em MMG. Embora apenas esse isolado tenha aparentemente exercido inibição sobre o fungo filamentoso testado, foi observado que não ocorreu esporulação de *A. niger* ao redor dos discos quando foram testados os isolados APU-84 crescidos em MMG; os isolados APU-8, APU-9, APU-58, APU-59, APU-112 e APU-117 crescidos em MPA e os isolados APU-54, APU-56, APU-57, APU-93, APU-97 e APU-106, crescidos em APH.

Alguns dos isolados estimularam o crescimento dos microrganismos-teste, como é o caso do isolado APU-27 cultivado em meio AP sólido que pareceu estimular o crescimento de *E. coli* (Figura 2b), *P. aeruginosa* (Figura 2c) e *S. aureus* (dado não mostrado). O isolado APU-44 pareceu estimular o crescimento de *E. coli*; o isolado APU-54 pareceu estimular o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. No meio AP líquido, o isolado APU-4 pareceu estimular o crescimento de *S. aureus*. Segundo Santos *et al.* (1976), os actinomicetos podem produzir substâncias que podem tanto inibir como estimular o crescimento de outros microrganismos, tais como as vitaminas tiamina e riboflavina, flavoproteínas, vitamina B₁₂, várias porfirinas-like, compostos contendo ferro e coenzima A.

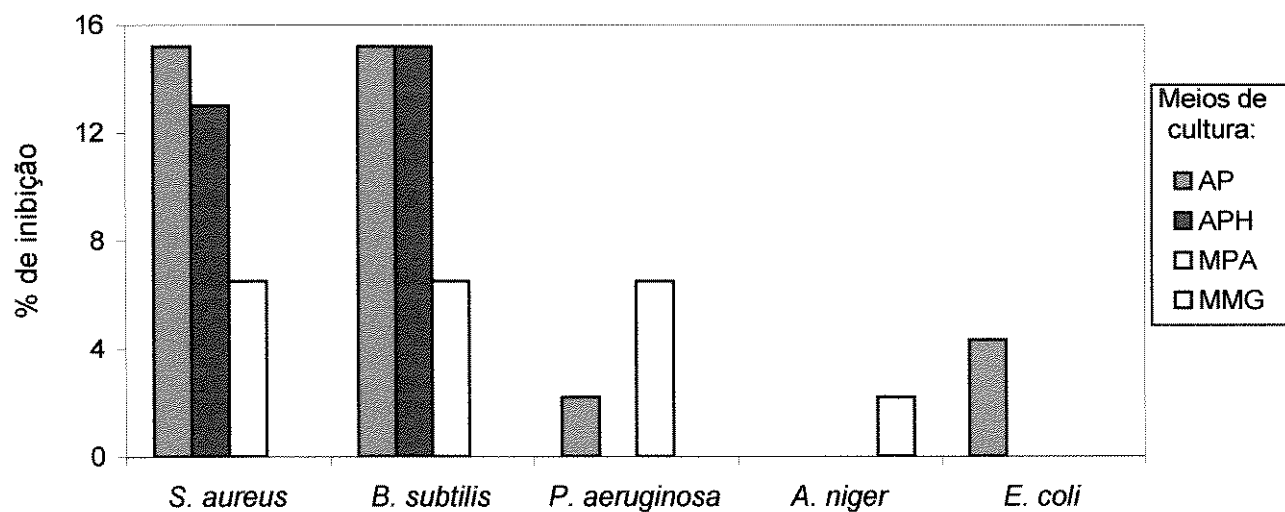


Figura 1. Atividade antimicrobiana de 47 isolados de microbisporas cultivados em diferentes meios de cultura sólidos sobre bactérias e fungos.

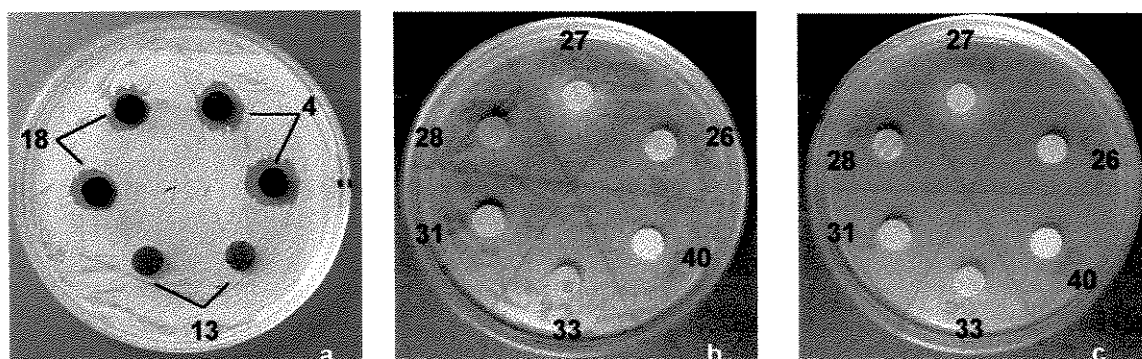


Figura 2. Ensaio de atividade antimicrobiana de isolados de *Microbispora* sp. cultivados em meio AP contra *Bacillus subtilis* CCT 0089 (a), *Escherichia coli* CCT 1457 (b) e *Pseudomonas aeruginosa* CCT 1476 (c).

A análise cromatográfica dos extratos dos diferentes meios de cultura mostrou a produção de compostos distintos dos meios AP, APH e MPA por um mesmo isolado (APU-30). Aparentemente não houve crescimento de APU-30 em meio MMG, e também não foi verificado nenhum composto produzido no meio MMG sob as condições utilizadas (Figura 3).

Os resultados obtidos corroboram com trabalhos na literatura que mostram o efeito da composição do meio de cultura sobre a produção de metabólitos secundários por actinomicetos (Demain, 1989; Demain e Fang, 1995, Josbu *et al.*, 2002). Segundo Demain (1989), alguns metabólitos secundários podem ser reprimidos pela presença de glicose durante sua produção. Jonsbu *et al* (2002) observaram que a utilização da glicose tem um efeito negativo na produção de nistatina. Outros carboidratos tais como glicerol, maltose, manose, sacarose e xilose também têm sido citados como interferentes na produção de metabólitos secundários (Demain e Fang, 1995).

Dentre os meios sólidos testados, os isolados apresentaram maior atividade antimicrobiana quando cultivados em meio AP (17%), seguido de APH e MPA (15% cada), e MMG (2%). Cabe lembrar que o único isolado (APU-44) que apresentou atividade contra *A. niger* foi cultivado em MMG. Os isolados testados demonstram maior atividade antimicrobiana pelo método do bloco de ágar (17% dos isolados) do que pelo método do filtro de papel (2% dos isolados), quando testado o mesmo meio de cultivo AP. Também foi observada a capacidade de alguns isolados em estimular o crescimento dos microrganismos-teste, como foi o caso dos isolados APU-27 (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*), APU-54 (*S. aureus* e *E. coli*) e APU-44 (*E. coli*) pelo método de blocos de ágar e o isolado APU-4 (*S. aureus*) pelo método do filtro de papel.

O fato da maioria dos isolados não apresentar atividade antimicrobiana detectável, não significa que estes não sejam capazes de produzirem antibióticos, outros métodos de triagem de atividade antimicrobiana podem ser utilizados (Matsuura, 1998). Uma vez que esses isolados estavam associados a uma planta, outros ensaios utilizando bactérias e fungos fitopatogênicos devem ser realizados posteriormente, visando ampliar o estudo do espectro de ação de possíveis antibióticos produzidos por esses microrganismos (Matsuura, 1998). Sugerimos também o estudo das substâncias que poderiam estar estimulando o crescimento dos microrganismos testados.

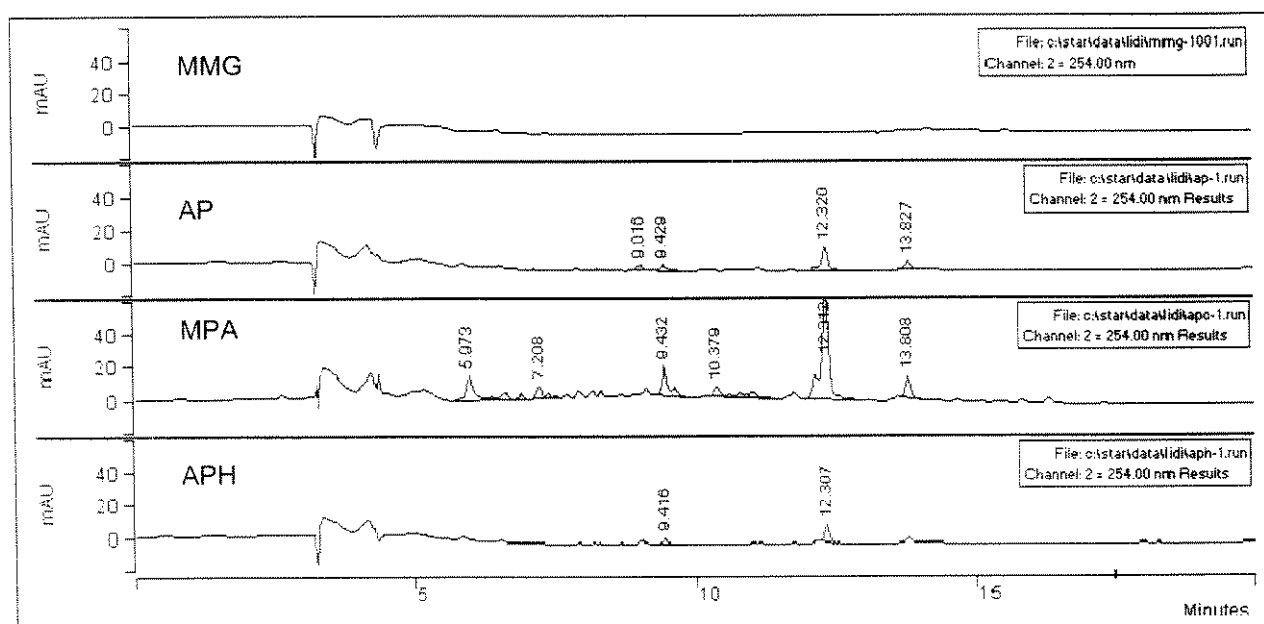


Figura 3. Análise cromatográfica dos produtos metabólicos do isolado APU-30 em diferentes meios de culturas.

Conclusões

Dentre os 47 isolados analisados, apenas entre 15 a 17% demonstraram atividade antimicrobiana relativamente contra bactérias e fungos nas condições testadas. Foi possível verificar um forte efeito da composição do meio de cultura sobre o perfil de produção de metabólitos, corroborando os resultados verificados nos ensaios de atividade antimicrobiana. Além disso, alguns isolados produziram compostos capazes de estimular o crescimento de alguns microrganismos-teste.

Agradecimentos: CNPq, FAPESP, Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo Mitsui.

CAPÍTULO III. Detecção da atividade antitumoral de actinomicetos endofíticos isolados de *Tocoyena formosa*

^{1,6*}Uetanabaro, A.P.T., ²Kohn, L., ³Hamerski, L., ²Carvalho, J.E., ³Cavalheiro, A.J., ³Bolzani, V.S., ⁴Azeredo, A., ^{5,6}Canhos, V.P., ²Manfio, G.P.

¹Universidade Estadual de Faria de Santana, Feira de Santana, BA; ²Universidade Estadual de Campinas, Campinas; ³Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP; ⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ; ⁵Centro de Referência em Informação Ambiental, Campinas, SP; ⁶Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/DCA/FEA - Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP).

*E-mail: apaula@uefs.br

Resumo

Produtos metabólicos de fermentação de 45 linhagens de *Microbispora* sp., isoladas de *Tocoyena formosa* (Rubiaceae) foram testadas quanto à atividade antitumoral contra linhagens de células tumorais humanas K562 (leucemia); MCF7 (mama); NCIADR (mama expressando fenótipo de resistência à múltiplas drogas); NCI460 (pulmão); 786-0 (rim); OVICAR-3 (ovário) e UACC62 (melanoma). Alguns isolados apresentaram atividade citotóxica nas condições testadas (frações polares dissolvidas em DMSO), sendo a maioria contra linhagens tumorais de melanoma e leucemia, em diluições entre 0,25 a 250 µg/mL. Este é o primeiro trabalho envolvendo a triagem inicial de atividade antitumoral de actinomicetos endofíticos isolados de uma planta nativa brasileira, *Tocoyena formosa*.

Palavras-chave: actinomicetos, atividade antitumoral, metabólitos secundários; *Microbispora*

Abstract

Liofilized medium extracts of 45 strains of *Microbispora*, isolated from *Tocoyena formosa*, (Rubiaceae) were tested for their antitumoral activity against the human cells lineages K562 (leukemia); MCF7 (breast); NCIADR (breast expressing multi-drug resistance phenotype); NCI460 (lung); 786-0 (kidney); OVICAR-3 (ovarium) and UACC62 (melanoma). Some of the isolates exhibited citotoxic activity under the assay conditions used (polar fractions soluble in DMSO), particularly against the leukemia and melanoma cells, at dilutions ranging from 0.25 to 250 µg/mL. This is the first work involving the initial screening of antitumoral activity of endophytic actinomycetes isolated from a Brazilian plant, *Tocoyena formosa*.

Key words: Actinomycetes, antitumoral activity, *Microbispora*, secondary metabolites.

1. Introdução

Os actinomicetos têm sido especialmente procurados pela indústria farmacêutica por sua capacidade de produção de metabólitos secundários com estrutura química e atividade biológica diversa. Entre as moléculas de interesse estão as que apresentam atividade antitumoral. O estudo de Umezawa (1990) demonstrou a inibição de produtos de oncogenes por metabólitos produzidos por *Nocardiosis* sp. e *Streptomyces* sp. Kajiura *et al.* (1998) relataram atividade antimicrobiana e antitumoral por *Microbispora rosea* cujas estruturas foram descritas por Lee *et al.* (2002). Zheng *et al.* (2000) também detectaram atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos (*Streptomyces* e *Micromonospora*) associados a organismos marinhos. A procura por actinomicetos ainda não estudados constitui um componente essencial na descoberta de drogas baseadas em produtos naturais, além disso, os actinomicetos endofíticos ainda têm sido pouco explorados quanto à sua atividade antitumoral. Este trabalho apresenta o estudo de triagem inicial da atividade antitumoral de actinomiceto raro, pertencente ao gênero *Microbispora*, isolado de *Tocoyena formosa* contra algumas linhagens de células tumorais: K562 (leucemia), MCF7 (mama), NCIADR (mama com fenótipo multi-droga resistente), NCI460 (pulmão), 786-0 (rim), OVCAR (ovário) e UACC62 (melanoma), bem como os perfis cromatográficos dos meios de cultivos onde dois dos microrganismos isolados foram cultivados.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos. Foram testados os extratos filtrados e liofilizados de 22 linhagens de *Microbispora* sp. (Tabela 1) isoladas de folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun (Rubiaceae), popularmente conhecida como “olho-de-boi” ou “genipapo do campo” (Goodland *et al.*, 1979), coletadas em uma área de Cerrado de transição no Horto Florestal de Araraquara (SP). Para detalhes de isolamento e caracterização taxonômica, vide Capítulo I do presente trabalho.

2.2. Fermentação. Cada linhagem foi cultivada em 20 mL de caldo AP (Hayakama *et al.*, 1995; constituído de 1% glicose, 1% amido, 0,5% extrato de levedura, 0,3% peptona, 1% Soytone, 2% NaCl, 0,3% CaCO₃; pH 7,0), sob agitação constante de 180 rpm a 30°C durante 15 dias. Em seguida, a suspensão foi filtrada em filtro Millipore 0,22 µm e mantidos a - 80°C para posterior liofilização. Após a liofilização, os extratos foram mantidos a - 70°C até serem diluídos para os ensaios em cultura de células. Para a análise química do extrato foi utilizado um litro de caldo AP distribuído em cinco frascos contendo 200 mL para cada um dos isolados testado (APU-30 e APU-33), que foram mantidos nas mesmas condições acima citadas.

2.3. Cultura de células. Os experimentos foram realizados utilizando-se as seguintes linhagens de células humanas tumorais: K562 (leucemia), MCF7 (mama), NCIADR (mama expressando o fenótipo de multi-resistência a drogas), NCI460 (pulmão), 786-0 (rim), OVCAR (ovário) e UACC62 (melanoma). Estas linhagens foram gentilmente doadas pelo The National Cancer Institute, Frederick MA/USA (NCI) e as culturas estoques foram mantidas em nitrogênio líquido. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² (Nunc Brand Products), contendo 5 mL de RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) com 5% soro fetal bovino (Gibco BRL, Life Technologies), a 37°C em ambiente úmido. As células foram utilizadas por no máximo 20 passagens seriadas, em seguida foram descartadas e novos frascos foram descongelados para uso.

2.4. Ensaios Biológicos. Todas as linhagens de células aderentes foram desprendidas dos frascos de cultura por adição de 0,5 mL de tripsina (Nutricell Nutrientes Celulares). Em seguida, a tripsina foi inativada pela adição de 5,0 mL de soro a 5% em meio RPMI 1640. As células foram separadas em suspensões de uma única célula através de pipetagem suave. Depois da contagem, as células foram diluídas em densidades de sedimentação

apropriadas e inoculadas em placas de 96 poços (Nunc Brand Products). O volume da suspensão de células inoculado foi de 100 μ L por poço. A densidade de inoculação variou entre as linhagens de células utilizadas: $6,5 \times 10^4$ (K562); $6,5 \times 10^4$ (MCF7); $5,0 \times 10^4$ (NCIADR); $4,0 \times 10^4$ (NCI460); $3,0 \times 10^4$ (UACC62); 5×10^4 (786-0) e 7×10^4 (OVICAR-3) células por mL. As placas contendo as células foram pré-incubadas por 24 horas a 37°C para permitir a estabilização antes da adição dos extratos microbianos (100 μ L). Após adição dos extratos, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, CO₂ a 5% em ambiente úmido. O controle positivo deste experimento foi a doxorrubicina (SIGMA Chemical Co.).

2.5. Solubilização e diluição da substância teste. Vinte e dois extratos foram testados em triplicata e em quatro concentrações (31.25, 62.25, 125 e 250 μ g/mL). Todas as concentrações foram realizadas em triplicata e foram inicialmente solubilizadas em dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA Chemical Co.) a 400 vezes na concentração teste final máxima desejada. Os extratos foram estocados a -70°C. Os concentrados foram, então, diluídos com meio completo contendo 50 μ g/mL gentamicina (Schering-Plough).

2.6. Ensaio Antiproliferativo - Ensaio Sulforhodamine B (SRB). O ensaio da SRB foi realizado segundo o método de Skehan *et al.* (1990). Resumidamente, as células foram fixadas por precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 50% (SIGMA Chemical Co.) a 4°C (50 μ L/poço, concentração final 10%), por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas cinco vezes com água. As células foram coradas por 30 minutos com SRB 0,4% (SIGMA Chemical Co.) dissolvido em 1% ácido acético (50 μ L/poço) (SIGMA Chemical Co.) e, em seguida, lavadas quatro vezes com 1% de ácido acético para remover o corante que não se ligou. As placas foram secas na temperatura ambiente e o corante para as proteínas ligadas foi solubilizado em 150 μ L de 10 mM Trizma buffer (SIGMA Chemical Co.). A densidade óptica foi lida em espectrofotômetro de placas automatizado a 540 nm. Para a linhagem de leucemia (células que crescem em suspensão), o mesmo método foi aplicado, porém a fixação das células foi realizada com 80% de TCA.

Os dados de densidade óptica foram calculados com o programa Excel® (Microsoft Office Package) e foram determinados os valores das médias $\pm$ erro padrão das triplicatas dos dados. Desta média, os *backgrounds* foram subtraídos dos controles apropriados. As respostas celulares foram calculadas para estímulo de crescimento, efeito da substância

teste e inibição do crescimento. Foram realizadas três medidas: tempo zero (T0), ou seja, valores de absorbância no início da incubação da substância teste; valor controle (C), determinado ao final da incubação dos extratos e um grupo de valores dos extratos testados (T), determinado ao final da incubação dos extratos. Caso T fosse maior ou igual a T0 (efeito citostático), o cálculo foi $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. Caso T fosse menor que T0, ou seja, morte celular (efeito citocida), o cálculo era $100 \times [(T-T_0)/T_0]$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade antitumoral das linhagens

Alguns dos isolados não exibiram atividade citostática contra as linhagens tumorais em nenhuma das diluições testadas (APU-54, APU-56, APU-72 e APU-74). Outros apresentaram efeito citostático em diferentes diluições (Tabela 1). Porém, nenhum isolado apresentou efeito citocida nas condições estudadas. Detalhes dos ensaios e cálculo da taxa de inibição das 22 amostras analisadas são apresentados no Anexo. Os resultados apresentados neste trabalho referem-se a um experimento representativo, pois todos os ensaios foram realizados em triplicatas e o erro padrão da média foi sempre menor que 5%.

Os isolados APU-45, APU-61 e APU-64 mostraram atividade citostática contra a linhagem UACC-62 em todas as diluições testadas. Assim como APU-08 e APU-85 contra NCI-460. Os maiores efeitos citostáticos foram observados para os isolados APU-30 contra K-562 (91,7%, na diluição de 250 µg/mL); APU-45 contra UACC-62 (90,9%, na diluição de 2,5 µg/mL); APU-64 contra UACC-62 (95,1%, na diluição de 25 µg/mL); APU-85 contra NCI-460 (96,4% na diluição de 250 µg/mL e 93,9% na diluição de 0,25 µg/mL) e APU-111 contra OVICAR-3 (91% na diluição de 250 µg/mL).

Tabela 1. Ensaio de inibição dos produtos metabólicos de isolados de *Microbispora* sp. contra diferentes linhagens de células tumorais

		Diluição - µg de filtrado seco do meio/mL			
Isolado	Cultura de célula	250	25	2,5	0,25
APU-08	786-0	55,0	-	-	-
	NCI-460	58,4	51,8	50,9	53,6
	K-562	58,0	-	-	50,1
APU-28	K-562	53,5	-	-	-
APU-30	UACC-62	51,5	-	-	-
	K-562	91,7	-	-	-
	OVICAR-3	52,4	-	53,5	-
APU-40	UACC-62	63,4	-	-	-
	NCI-460	52,8	-	-	-
APU-44	UACC-62	53,2	-	-	-
	OVICAR-3	67,1	-	-	-
APU-45	UACC-62	85,2	79,2	90,9	86,0
	NCI-ADR	-	-	58,2	55,1
APU-57	K-562	61,0	-	-	-
APU-59	UACC-62	-	61,4	-	62,7
APU-61	UACC-62	86,3	56,6	73,5	50,1
	NCI-460	51,8	-	-	-
APU-62	UACC-62	-	-	55,8	59,2
APU-64	UACC-62	73,6	95,1	68,8	69,7
APU-71	NCI-460	68,3	-	-	-
	OVICAR-3	50,7	-	-	-
APU-77	NCI-ADR	51,4	-	-	-
	K-562	79,4	-	-	-
APU-79	MCF-7	-	-	83,5	89,1
	OVICAR-3	57,2	74,9	-	-
APU-84	K-562	83,6	-	-	-
APU-85	MCF-7	-	51,1	-	-
	NCI-460	96,4	58,5	78,0	93,9
	OVICAR-3	52,4	-	-	-
APU-93	K-562	79,3	-	-	-
APU-111	K-562	-	61,7	-	62,9
	OVICAR-3	91,0	-	-	-

(-) Atividade antitumoral menor que 50% de inibição (valores não considerados para cálculo).
Linhagens microbianas APU-54, APU-56, APU-72 e APU-74 apresentaram inibição menor que 50% em todas as diluições testadas.

A porcentagem de isolados testados nas quatro diluições ($n = 22$) que apresentaram efeito citostático de no mínimo de 50% de inibição é mostrada na Figura 1. Dos 22 isolados estudados, 18 deles apresentaram efeito citostático contra pelo menos uma das linhagens tumorais. Destes isolados foi possível observar que 44,4% deles exerceram atividade citostática sobre a linhagem K-562. A atividade antitumoral de produtos metabólicos contra linhagens células tumorais de leucemia é a mais conhecida para o gênero *Microbispora* (Kajiura *et al.*, 1998; Igarashi *et al.*, 1998). A linhagem tumoral UACC-62 também foi inibida por 44,4% dos isolados. Foi constatada atividade inibitória contra NCI-460 em 38,9% dos isolados; 33,3% dos isolados foram ativos contra OVICAR-3; 11,1% dos isolados foram capazes de inibir MCF-7 e 5,6% deles mostraram atividade contra 786-0 (Figura 1).

Sabe-se que diferentes condições de cultivo podem alterar a produção de metabólitos secundários (Dekleva *et al.*, 1985; Vilches *et al.*, 1990 e Kojima *et al.*, 1995). Assim, frente ao perfil de atividade citostático observado, sugere-se que sejam realizados experimentos adicionais utilizando meios de cultura e condições de cultivo diferentes das testadas neste experimento (glicose e amido). Além disso, estudos com solventes menos polares que o DMSO devem ser realizados para avaliação de atividade de outras substâncias menos polares.

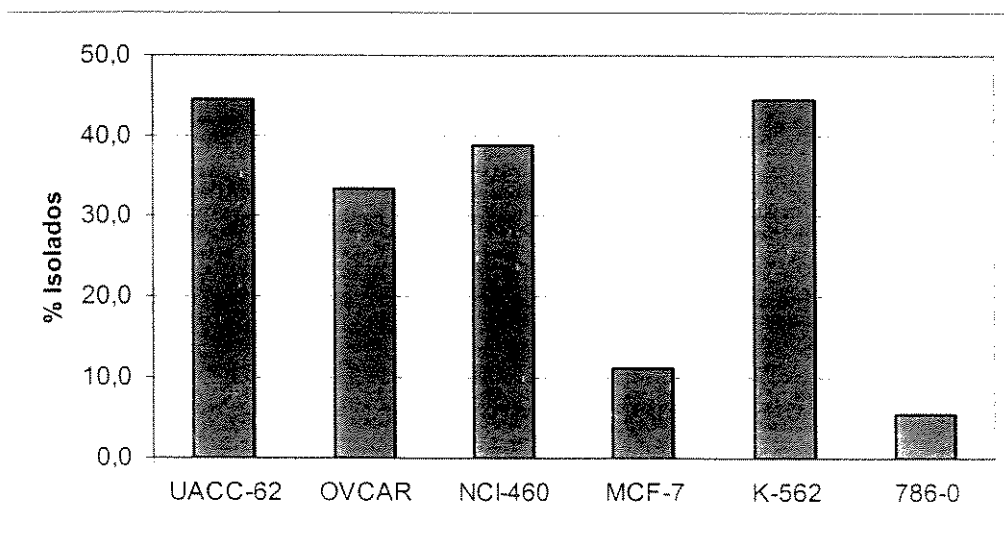


Figura 1. Porcentagem de isolados microbianos que apresentaram atividade citostática mínima de 50% em pelo menos uma das diluições testadas sobre diferentes linhagens tumorais humanas.

4. Conclusões

Produtos metabólicos produzidos por alguns isolados de *Microbispora* sp. exibiram atividade citostática contra linhagens tumorais humanas, principalmente contra linhagens tumorais de melanoma e leucemia.

Agradecimentos: CNPq, FAPESP, Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo Mitsui, Marta C. Teixeira Duarte e Alexandre Nunes Ponezi (Microbiologia - CPQBA).

CONCLUSÕES GERAIS

- Utilizando protocolos de isolamento seletivo de microrganismos endofíticos, foi possível isolar 47 linhagens de actinomicetos de dez indivíduos de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch) K. Shun coletadas em áreas de Cerrado de transição na região de Araraquara (SP).
- Todos os isolados analisados foram identificados como pertencentes ao gênero *Microbispora* Nonomura & Ohara (1957) com base em dados de micromorfologia e análise de seqüências de DNAr 16S.
- Análises de restrição de fragmentos de DNAr 16S (ARDRA) com as enzimas *Alu* I, *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I resultaram em 21 diferentes grupos de RFLP. Nestas análises, foi possível notar que linhagens de um mesmo perfil de ARDRA foram isoladas de diferentes indivíduos de *Tocoyena formosa*, sugerindo a colonização de diferentes plantas por um mesmo genótipo bacteriano. Também foram observados isolados com diferentes perfis de restrição em uma mesma planta, sugerindo colonização por diferentes linhagens.
- Dados de caracterização bioquímica indicaram que a grande maioria dos isolados pertencia à espécie *M. chromogenes*; com exceção do isolados APU-27, que foi semelhante a *M. indica*.
- As análises de seqüências de DNAr 16S não forneceram dados conclusivos para a identificação dos isolados em nível de espécie, porém permitiram a diferenciação destes em grupos filogenéticos distintos.
- Isolados APU-93 e APU-28, classificados no grupo filogenético D, apresentaram atividade antitumoral contra a linhagem de células de leucemia K562.
- Os isolados apresentaram baixa atividade antimicrobiana nas condições testadas. Foi verificado um efeito nítido das condições de cultivo no perfil de atividade antimicrobiano das linhagens analisadas.
- Alguns isolados exibiram atividade citostática contra linhagens tumorais humanas, porém nenhuma delas apresentou efeito citocida nas condições estudadas. Os extratos dos isolados testados nas quatro diluições mostraram atividade citostática principalmente contra as linhagens tumorais de melanoma e leucemia. Não houve relação evidente entre os resultados de atividade citostática e antimicrobiana.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente estudo é a etapa inicial de estudos com microrganismos pertencentes ao gênero *Microbispora*, associados à planta *Tocoyena formosa* e abre caminhos para estudos futuros em diversas áreas: sistemática microbiana, atividade antimicrobiana e antitumoral, aplicação industrial de seus metabólitos secundários e enzimas. Assim, sugerimos que alguns estudos complementares possam ser feitos, incluindo:

- utilização de outros agentes para a desinfecção das folhas de *Tocoyena formosa*, visando o isolamento de outras espécies de actinomicetos;
- confirmação da natureza endofítica dos isolados;
- hibridação DNA:DNA de alguns isolados com linhagens tipo de *Microbispora*, visando a definição da espécie;
- triagem de atividade antimicrobiana utilizando bactérias e fungos fitopatogênicos como microrganismos-teste;
- estudo e identificação do(s) composto(s) envolvido(s) na atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.M., SILVA, A.C., AZEVEDO, J.L. 2000. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays*). **Brazilian Archives in Biology and Tecnology**, 43: 447-451.
- AZEVEDO, J.L., MACCHERONI, JR., W., PEREIRA, J.O., ARAÚJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, 3: 40-65.
- BACON, C. W., HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst, C. J.; Knudsen, G. R.; Mcinerney, M. J.; Stetzenbach, L. D. and Walter, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: American Society of Microbiology, 1997.
- BALL, A.S., E. MACCARTHY. 1988. Saccharification of straw by actinomycete enzymes. **Journal of General Microbiology**, 134: 2139-2134.
- BARRY, T., POWELL, R., GANNON, F. 1990. A general method to generate DNA probes for microorganisms. **Biotechnology**, 8: 233-236.
- BASHYAL, B., LI, J. Y., STROBEL, G. HESS, W. M., SIDHU, R. 1999. *Seimatoantlerium nepalense*, na endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallachiana*). **Mycotaxon**, 72: 33-42.
- BENSON, D.R., SILVESTER, W.B. 1993. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, 57:293-319.
- BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C., FURLAN, M., CAVALHEIRO, A.J., ARAÚJO, A.R., SILVA, D.H., LOPES. M.N. 1996. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of Cerrado and Atlantic Forest. *Anais da Academia de Brasileira de Ciência*, 71: 181-187.
- BOLZANI, V.S., TREVISAN, L.M.V., IZUMISAWA, C.M., YOUNG, M.C.M. 1997. Antifungal iridoids from stems of *Tocoyena formosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 7: 157.
- BRITO, K. C., ARAÚJO, J. M. Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofítico do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Monografia de Graduação. Recife, 1998. 40 p.

- BRUUN, A. F. 1957. Deep sea and abyssal depths. **Geological Society of America**, 67: 641-672.
- BULL, A. T. Isolation and screening of industrially important organisms. 1992. *In*: SUKAN, S. S. **Recent Advances in Industrial Applications of Biotechnology**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.1-17.
- BULL, A.T., WARD, A.C., GOODFELLOW, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64: 573-606.
- CARNEIRO, M.A.C., SIQUEIRA, J.O., MOREIRA, F.M.S, CARVALHO, D., BOTELHO, S.A., JUNIOR, O.J.S. 1998. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no sudeste do Brasil. **CERNE**, 4: 129-145,
- CARROLL, G. C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. *In*: Fokkema, N. J., Heuvel, J. V. den (Editors). **Microbiology of phyllosphere**. London: Cambridge University, pp. 205-222.
- CARROLL, G. C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, 69: 2-9.
- CHANWAY, C. P. 1998. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. **Sydowia**, 50: 149-170.
- CHUN J. 1995. Computer Assisted Classification and Identification of Actinomycetes. PhD (Thesis), Department of Microbiology, The Medical School, Newcastle, England.
- CONVILLE, P., FISCHER, S.H., CARTWRIGHT, C. P., WITEBSKY, F.G. 2000. Identification of *Nocardia* Species by Restriction Endonuclease Analysis of an Amplified Portion of the 16S RNAr Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 38: 158-164.
- COOMBS, G. H., K. VICKERMAN, M. A., SLEIGH, AND A. WARREN (eds.). 1998. Evolutionary relationships among protozoa. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- CROSS, R. 1974. Genus V. *Microbispora* Nonomura and Ohara 1957, 307, 859-861. *In*: R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (eds.), **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

- DE BOER, S. H., COPEMAN, R. J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. **Canadian Journal of Plant Science**, 54: 115-122.
- DEKLEVA, M.L., TITUS, J.A., STROHL, W.R. 1985. Nutrient effects on antracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. **Canadian Journal of Microbiology**, 31:287-294.
- DEMAIN, A.L. 1989. Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Shapiro, S. (ed.), Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes. CRC Press, Boca Raton, pp.135-211.
- DEMAIN, A.L., FANG, A. 1995. Emerging concepts of secondary metabolism in actinomycetes. **Actinomycetology**, 9: 98-117.
- DÖBEREINER, J. 1993. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, 44: 310-313.
- EMBLEY, T.M.; STACKEBRANDT, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, 48: 257-289.
- FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. 1988. In: Cutler, H. O. (ed.). Biologically active natural products. Potential use in agriculture. Washington: American chemical Society Symposium Ser. 380.
- FELSENTEIN J. 1989. Phylip-phylogeny inference package. **Cladistics**. 5, 164-166.
- FRANCO, C.M.M., COUTINHO, L.E.L. 1991. Detection of novel secondary metabolites. **Critical Review of Biotechnology**, 11: 193-276.
- GARRITY, G.M., WINTERS, M., SEARLES, D.B. 2001. Taxonomic outline of the prokaryotic genera. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.
- GERBER, N.N., LECHEVALIER, M.P. 1964. Phenazones and phenoxazinones from *Waksmania aerata* sp. nov. and *Pseudomonas iodina*. **Biochemistry**, 3: 598-602.
- GERMIDA, J.J., SICILIANO, S.D., DE FREITAS, J.R., SEIB, A.M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, 26: 43-50.
- GOODFELLOW M., MINNIKIN, D.E (Eds.). 1985. Chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Academic.

- GOODFELLOW, M. 1989. The Actinomycetes I. Supragenetic classification of actinomycetes. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.), 4: 2333-2339.
- GOODFELLOW, M. 1992. The family Streptosporangiaceae. *In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. & Scheifer, K. M. The Prokaryotes*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 47: 1115-1138.
- GOODFELLOW, M., O'DONNELL, A.G. 1994. Chemosystematics: current state and future prospects. *In: Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. (M. Goodfellow & A.G. O'Donnell, John Wiley & Sons, Chichester, Eds.), pp. 1-20.
- GOODFELLOW M., ALDERSON, G., CHUN, J. 1998. Rhodococcal systematics: problems and developments. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, 74: 3-20.
- GOODFELLOW M., ISIK, K., YATES, E. 1999. *Actinomycetes systematics: an unfinished synthesis*. Academic Press, Orlando, Fla.
- GOODLAND, R. 1975. **Glossário de ecologia brasileira**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p.42.
- GORDON, R.E., HAYNES, W.C., PANG, C.H-N. 1973. The genus *Bacillus*. **Agriculture Handbook**, n. 427. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- GOTTLIEB, D. 1961. An evaluation of criteria and procedures used in the description and characterization of the *Streptomyces*. **Applied Microbiology**, 9: 55-65.
- GOUGH, C. GALERA, C. VASSE, J. WEBSTER, G., COCKING, E.C., DÉNARIÉ, J. 1997. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 10: 560-570.
- HALL, T. 2001. BioEdit v5.0.9, Copyright (c) 1997-2001, North Carolina State University.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914.
- HAMAMOTO, M., T. NAKASE. 2000. Phylogenetic relationships among fungi inferred from small subunit ribosomal RNA gene sequences, pp. 57-71. *In: F. G. Priest and M. Goodfellow (eds.)*, Applied microbial systematics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- HAUSER, D.L., PRESCH, W. 1991. The effect of ordered characters on phylogenetic reconstruction. *Cladistics*, 7: 243- 265.
- HAYAKAWA, M., NONOMURA, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, 65: 501-509.
- HAYAKAWA, M., ISHIZAWA, K., YAMAZAKY, T., NONOMURA H. 1995. Distribution of antibiotic-producing *Microbispora* strains in soils with different pHs. **Actinomycetes**, 6: parte 3.
- HAYAKAWA, M., MOMOSE, Y., YAMAZAKI, T., NONOMURA, H. 1996. A method for the selective isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. **Journal of Applied Microbiology**, 80: 375-386.
- HAYAKAWA, M., HIROMITSU, I., TAKEUCHI, S., YAMAZAKI, T. 1997. Application of a method incorporating treatment with chloramines-T for the selective isolation of *Streptosporangiaceae* from soil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 84: 599-602.
- HENSSEN, A. 1957. Beitrage zur morphologie und systematic der thermophilen Actinomyceten. **Archiv fur Mikrobiologie**, 26: 373-414.
- HEUER H., KRSEK M., BAKER P., SMALLA K., WELLINGTON E.M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 3233-3241.
- HEYNDRIX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., SCHELDAMAN, P., KERSTERS, K., DE VOS, P., LOGAN, N.A., AZIZ, A.M., ALI, N., BERKELEY, R.C. 1996. A polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura, 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco *et al.*, 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46: 988-1003.
- HIYASHIDE, E. 1995. Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. **Actinomycetologica**, 9: 75-82.
- HOLIS, J. P. Bacteria in healthy potato tissue. 1951. **Phytopathology**, 41: 350-366.

- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. (Eds.). 1994. Maduromycetes. In: **Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology**. 9th Edition. Willimas & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- HONEYCUT, R.J., SOBRAL, B.W.S., McCLELLAND, M. 1995. tRNA intergenic spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, 141: 3229-3239.
- HOWARD, R.L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E.L., HOWARD, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of conversion and anzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2: 602-619.
- HULSENBACK, J.; RONQUIST, F. 2003. MrBayes ver. 3.0B4, Serial Version. Adquirido do site: <http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/info.php>; novembro de 2003.
- ICHIKAWA, T., ISHIKURA, T., OZAKI, A. 1971. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, 16: 218-224.
- IGARASHI, Y., TAKAGI, K., KAJIURA, T., FURUMAI, T., OKI, T. 1998. Glucosylquestiomycin, a novel antibiotic from *Microbispora* sp. TP-A0184: fermentation, isolation, structure determination, syntheis and biotechnological activities. **Journal of Antibiotics**, 51: 915-920.
- JONES, K.L. 1949. Fresh isolates os actinomycetes in wich the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. **Journal of Bacteriology**, 57: 141-145.
- JONSBU, E., MCINTYRE, M., NIELSEN, J. 2002. The influence of carbon sources and morfology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. **Journal of Biotechnology**, 95:133-144.
- JUNYING, L., LIANJUN, M., RUNMAO, H. 1997. A new specie of *Microbispora*: *Microbispora bannaensis* sp. nov. **Actinomycetes**, 8: 10-13.
- KAJIURA, T., FURUMAI, T., IGARASHI, Y., HROI, H., HIGASHI, K., ISHIYAMA, T., URAMOTO, M., UEHARA, Y, OKI, T. 1998. Signal transduction inhibitors, hibarimicinas, A, B, C, D e G produced by *Microbispora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties. **Journal of Antibiotics**, 51: 394-401.
- KILLHAM, K. 1994. The soil biota. In: **Soil ecology**. Cambridge University Press.

- KIM Y.S., KAWAI A. 1998. Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 21: 498-505.
- KIMURA, K., KANOU, F., YOSHIHAMA, M. 1997. A prolyl endopeptidase inhibitor, propeptin production in the various *Microbispora* sp. **Actinomicetology**, 11: 64-68.
- KIZUKA, M., ENOKITA, R., TAKAHASHI, K., OKAMOTO, Y., OTSUKA, T., SHIGEMATSU, T., INOUE, Y.; OKAZAKI, T. 1998. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. **Actinomicetologica**, 12: 89-91.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A.H., VOS, W.M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 3390-3393.
- KLUYVER, A.J., VAN NIEL, C.B. 1936. Prospects For A Natural System Of Classification Of Bacteria. **Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektions-Krankheiten und Hygiene Erste Abteilung Originale Reihe A-Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie**, 94: 396-403.
- KOBAYASHI, D.Y., PALUMBO, J.D. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agruculture. In: C. W. Bacon and J.F. White (ed.), **Microbial endophytes**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 659-674.
- KOJIMA, I., CHENG, Y.R., MOHAN, V., DEMAIS, A.L. 1995. Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hydroscopicus*. **Journal of Industrial Microbiology**, 14:346-439.
- KOLOMIETS, E.I., ZDOR, N.A., ROMANOVSKAYA, T.V. 1997. Certain aspects of the phytoprotective activity of *Streptomyces flavescens*, an antagonist of phytopathogenic fungi. **Applied Biochemistry Microbiology**, 33: 451-454.
- KROPPESTEDT, R.M., STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW, M. 1990. Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. **Systematic and Applied Microbiology**, 13: 148-160.
- KÜSTER, E. e WILLIAMS, S. T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, 202: 928-929.
- LABEDA, D. P. 1990. Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. New York: McGraw-Hill.

- LAM, Y.K.T., WILLIAMS, Jr, D.L., SIGMUND, J.M., SANCHEZ, M., GENILLOUD, O., KONG, Y.L., STEVES-MILES, S., HUANG, L., GARRITY, G.M. 1992. Cochimicins, novel and potent cyclodepsipeptide endothelin antagonists from a *Microbispora* sp. I. Production, isolation, and characterization. **Journal of Antibiotics** 45: 1709-1716.
- LANE D.J, PACE B., OLSEN G.J., STAHL D.A., SOGIN M.L., PACE N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, 82: 6955-6959.
- LANE, D. J. 1991. 16S/23S RNAr sequencing. *In*: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics** (Stackebrandt, E. & Goodfellow, M., Eds.) John Wiley & Sons, New York, pp. 115-175.
- LAZZARINI A, CVALETTI L, TOPPO G, MARINELLI F. 2001. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, 79: 399-405.
- LECHEVALIER, M. P., LECHEVALIER, H. A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 20: 435-443.
- LEE, C.S, AUDELO, M.Q., REIBENPIES, J., SULIKOWSKI, G.A. 2002. Studies toward the total synthesis of hibarimicinone. Progress on the assembly of the AB- and GH-rings systems. **Tetrahedron**, 58: 4403-4409.
- LI X., ZHU B., GONG B. 2001. Classification for two isolates of *Microbispora* producing immunosuppressants. **Wei Sheng Wu Xue Bao**: 41: 94-100.
- LILLEY, A.K., FRY, J.C., BAILEY, M.J., DAY, M.J. 1996. Comparison of aerobic heterothrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). **FEMS Microbiology Ecology**, 21: 231-242.
- LIU, Z., RUAN, ZAKRZEWSKA-CZERWINWKA, J., MORDARSKI, M. 1992. Analyses of DNA homology and DNAr restriction patterns of some species in the genus *Nocardiopsis*. **Actinomycetes**, 3: 51-54.
- LOGAN, N. A. 1994. The actinomycetes, *In*: Bacterial systematics. Blackwell Sci. Publications, pp. 211-31.

- MCCARTHY, A.J., & WILLIMAS, S.T. 1992. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review. **Gene**, 115: 189-192.
- MAITAN, V.R., 1998. Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 122 pp.
- MANFIO, G. P. <http://www.bdt.org.br/bdt>.
- MARTINEZ-MURCIA, A. J., HARLAND, N. M. E COLLINS, M. D. 1993. Phylogenetic analysis of some leuconostocs and related organisms as determined from large-subunit RNAr gene sequences: assesment of congruence of small- and large-subunit RNAr derived trees. **Journal of Applied Bacteriology**, 74: 532-54.
- MATSUKUMA, S., OKUDA, T., WATANABE, S. 1995. Isolation of actinomycetes from pine litter layers. **Actinomicetology**, 8: 57-65.
- MATSUMOTO, A. TAKAHASHI, Y., MOCHIZUMI, M., IWAI, Y., OMURA, S. 1998. Characterization of actinomycetes isolated from fallen leaves. **Actinomyetology**, 12: 46-48.
- MATSUURA, T. 1998. Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil. 69 pp.
- MCINROY, J. C., KLOPPER, J. W. 1995. Survey of indigeous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and soil**, 173: 337-342.
- MINNIKIN, D. E.; O'DONNELL, A. G. 1984. Actinomycete envelope lipid and peptideoglycan composition. In: **The Biology of the Actinomycetes**. M. Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams (eds.). Academic Press: London. p.337-388.
- MIYADOH, S., TOHYAMA, H., AMANO, S., SHOMURA, T., NIIDA, T. 1985. *Microbispora viridis*, a new specie of *Actinomycetales*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 35: 281-284.
- MIYADOH, S., AMANO, S., TOHYAMA, H., SHOMURA, T. 1990. A taxonomic review of the genus *Microbispora* and a proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea*. **Journal of General Microbiology**, 136: 1905-1913.

- MONCIARDINI, P., CVALETTI, L., SCHUMANN, P., ROHDE, M., DONADIO, S. 2003. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class *Actinobacteria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53: 569-576.
- MUNDT, J. O., HINKLE, N. F. 1976. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, 32: 694-698.
- NAKAJIMA, Y., KITPREECHAVANICH, V. SUZUKI, K.-I., KUDO, T. 1999. *Microbispora corallina* sp. nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 49: 1761-1767.
- NAWANI, N.N., KAPADNIS, B.P., DAS, A.D., RAO, A.S., MAHAJAN, S.K. 2002. Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. **Journal of Applied Microbiology**, 93: 965-75.
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- NIXON, K.C. 1999. WINCLADA versão 0.9.99m24 (Beta), Copyright 1986-1988.
- NOLAN, R.D., CROSS, R. 1988. Isolation and screening of actinomycetes. In : Goodfellow, M. Williams, S.T., Mordarski, M. (Eds.). *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 1-32.
- NONOMURA, H., OHARA, Y. 1957. Distribution of actinomycetes in soil. II. *Microbispora*, a new genus of the Streptomycetaceae. **Journal of Fermentation Technology**, 35: 307-311.
- NONOMURA, H., OHARA, Y. 1960. Distribution of actinomycetes in soil IV. The isolation and classification of the genus *Microbispora*. **Journal of Fermentation Tecnology**, 38: 401-405.
- NONOMURA, H., OHARA, Y. 1969a. Distribution of actinomycetes in soil VI. A culture method effective for both preferential isolation of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (part 1). **Journal of Fermentation Technology**, 47: 463-469.
- NONOMURA, H., OHARA, Y. 1969b. Distribution of actinomycetes in soil VII. A culture method effective for both preferential isolation of *Microbispora* and *Streptosporangium* strais in soil (part 2). **Journal of Fermentation Technology**, 47: 701-709.

- NONOMURA, H., OHARA, Y. 1971. Distribution of actinomycetes in soil IX. New species of genera *Microbispora* and *Microtetraspora*, and their isolation method. **Journal of Fermentation Technology**, 49: 887-894.
- OCHI, K., HARAGUCHI, K., MIYADOH, S. 1993. A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein-AT-L30. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 43: 58-62.
- OKAMI, Y., HOTTA, K. 1988. Search and discovery of new antibiotics. *In*: Goodfellow, M., Williams, S. T. and Mordanski, M. **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic.
- OKAMI, Y.; HOTTA, K. 1988. Search and Discovery of new antibiotics. *In*: M. Goodfellow, S.T. Williams & M. Mordarski (eds.) **Actinomycetes in Biotechnology**. Academic Press, New York, pp. 33-67.
- OKAZAKY, K., TAKAHASHI, K., KIZUKA, M., ENOKIDA, R., ENOKIDA, R. 1995. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. **Annual Report of Sankyo Research Laboratories**, 47: 97-106.
- OLSEN, G. J., WOESE, C. R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB Journal**, 7: 113-123.
- OSADA, H. 1998. Actinomycetes, how fascinating microorganisms. **Actinomycetologica**, 12: 85-88.
- OUHDOUCH, Y., JANA, M., IMZILN, B., BOUSSAID, A., FINANCE, C. 1996. Antifungal activities of actinomycetes isolated from Moroccan habitats. **Actinomycetes**, 7: 12-22.
- PACE, R. N. 1996. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, 62: 463-470.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, 12: 357-358.
- PATEL, M., CONOVER, M., HORAN, A., LOEBENBERG, D., MARQUEZ, J., MIERZWA, R., PURA, M.S., YARBOROUGH, R., WAITZ, J.A. 1988. Sch 31828, a novel antibiotic from a *Microbispora* sp.: taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, 41: 794-797.

- PAVLICEK A., HRDA S, FLEGR .: 1999. FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biológica**, 45: 97-99.
- PETRINI, L. E., E. MÜLLER. 1986. Haupt-und Nebendfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze. **Mycologia Helvetica**, 1: 501-627.
- PETRINI, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: Andrews, J. H. & Hirano, S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer Verlag.
- PFEFFERLE, C., THEOBALD, U., GÜRTLER, H., FIEDLER, H.P. 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **Journal of Biotechnology**, 80: 135-142.
- PICHER, D.G., SAUNDERS, N.A., OWEN, R.J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, 8: 151-156.
- PRADO, A. L. 1987. Revisão taxonômica do gênero *Tocoyena* Aubl. (Rubiaceae) no Brasil. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 193p.
- QUADT-HALLMANN, A., HALLMANN, J., KLOPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, 42: 1144-1154.
- RAO, V.A., PRABHU, K.K., SRIDHAR, B.P., VENKATESWARLU, A., ACTOR, P. 1987. Two new species of *Microbispora* from Indian soils: *Microbispora karnatakensis* sp. nov. and *Microbispora indica*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 37: 181-185.
- ROLLER, C., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. 1992. Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. **Journal of General Microbiology**, 138: 1167-1175.
- ROWINSKY, E. K., DONEHOWER, R. C. 1995. Drug therapy: paclitaxel (Taxol®). **New England Journal of Medicine**, 332: 1004-1014.

- SAMBROOK J., FRITSCH E.F.; MANIATS T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- SANGLIER, J.J., HAAG, H., HUCK, T.A., FEHR, T. 1993. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, 144: 633-642.
- SANTOS, P.S., ABAD, E.J., PAGUIA, A.G., LAT, B.S. 1976. Vitamin B₁₂ and antibiotic activities of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. **Phillip Journal of Science**, 103: 208-220.
- SARDI, P., SARACCHI, M., QUARONI, S., PETROLINI, B., BORGONOV, G. E., MERLI, S. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, 58: 2691-2693.
- SCHLEIFER, K.H., KANDLER, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. **Bacteriological Review**, 36: 407-477.
- SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., WILHELM, E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S RNAr genes. **FEMS Microbiology Ecology**, 39: 23-32.
- SHIRLING, E. B., GOTTLIEB, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16: 313-340.
- SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D .1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, 82: 1107-1118.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V., SNEATH, P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 30: 225-420.
- STACKEBRANDT, E., GOEBEL., B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S RNAr sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 44: 846-849.
- STACKEBRANDT E., RAINEY, F.A. AND WARD-RAINEY, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47: 479-491.
- STAMFORD, T. L. M. Actinomicetos endofíticos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) produtores de enzimas amilolíticas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1997.

- STAMFORD, T.L.M., STAMFORD, N.P., COELHO, L.C.B.B., Araújo, J.M. 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, 76: 137-141.
- STAMFORD, T.L.M., STAMFORD, N.P., COELHO, L.C.B.B., ARAÚJO, J.M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, 83: 105-109.
- STANIER, R.Y., VAN NIEL, C.B. 1941. The main outlines of bacterial classification. **Journal of Bacteriology**, 42: 437-466.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P., BIGNAMI, G. 1995. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, 58: 1315-24.
- STONE, J. K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesli* (Mirb.) Franco. 1986. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. Tese de Doutorado. University of Oregon. Eugene, 124 p.
- STURZ, A. V., CHRISTIE, B. R., MATHESON, B. G., ARSENAULT, W. J., BUCHANAN, N. A. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potencial to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, 48: 360-369.
- SWOFFORD, D. L. 1998. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)* Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- TAKAHASHI, Y., KIZUKA, M., NAKAZAWA, N., ENOKIDA, R., OKAZAKI, T. 1995. Studies on actinomycetes in plant leaves II. The taxonomical and physiological features of isolate. Abstracts of the 1995 **Annual Meeting of The Society for Actinomycetes Japan**, Tokyo.
- TAKAHASHI, Y., MATSUMOTO, A., SEINO, A., IWAI, E., OMURA, S. 1996. Rare actinomycetes isolated from desert soils. **Actinomycetologica**, 10: 91-97.
- TANABE, I., KURIYAMA, M. E NONOMURA, H. 1995. Production of C2-symmetrical phenazines by some actinomycetes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 79: 384-386.

- THOMAZINI, L.I. 1974. Mycorrhiza in plants of the cerrado. **Plant and Soil**, Netherlands, 41: 707-711.
- TURNER, J. T., KELLY, J. L., CARLSON, P. S. 1993. Endophytes: an alternative genome for crop improvement. Madison: printed in International Crop Science.
- UEHARA, Y., LI, P.-M., FUKAZAWA, H., MIZUNO, S., NIHEI, Y., NISHIO, M., HANDA, M., YAMAMOTO, C., FURUMAI, T., OKI, T. 1993. Algemicins, new inhibitors of oncogenic src signal transduction. **Journal of Antibiotics**, 46: 1306-1308.
- UMEZAWA, H. 1988. Low-molecular-weight enzyme inhibitors and immunomodifiers. *In*: Goodfellow, M.; Williams, S. T. & Mordarski, M. (eds.). **Actinomycetes in biotechnology**. Academic Press, London. pp. 285-325.
- UMEZAWA, K. 1990. Inhibitors of oncogene product functions. **Gan To Kagaku Ryoho**, 17: 315-21.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, 60: 407-438.
- VANEECHOUTTE, M., RIEGEL, P., DE BRIEL, D., MONTEIL, H., VERSCHAEGEN, G., DE ROUCK, A., CLAYES. 1995. Evaluation of the applicability of amplified DNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology**, 146: 633-641.
- VILCHES, C. MÉNDEZ, C. HARDISSON, C., SALAS, J.A. 1990. Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. **Journal of General Microbiology**, 136:1447-1454.
- WAKSMAN, S. A., WOODDRUFF, H. B. 1941. *Actinomyces antibioticus*: a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Journal of Bacteriology**, 42: 231-249.
- WANG, Y., ZHANG, Z., RUAN, J. 1996a. Phylogenetic analysis reveals new relationships among members of the genera *Microtetraspora* and *Microbispora*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46: 658-663.
- WANG, Y., ZHANG, Z., RUAN, J. 1996b. A proposal to transfer *Microbispora bispora* (Lechevalier 1965) to a new genus, *Thermobispora* gen. nov., as *Thermobispora bispora* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46: 993-938.

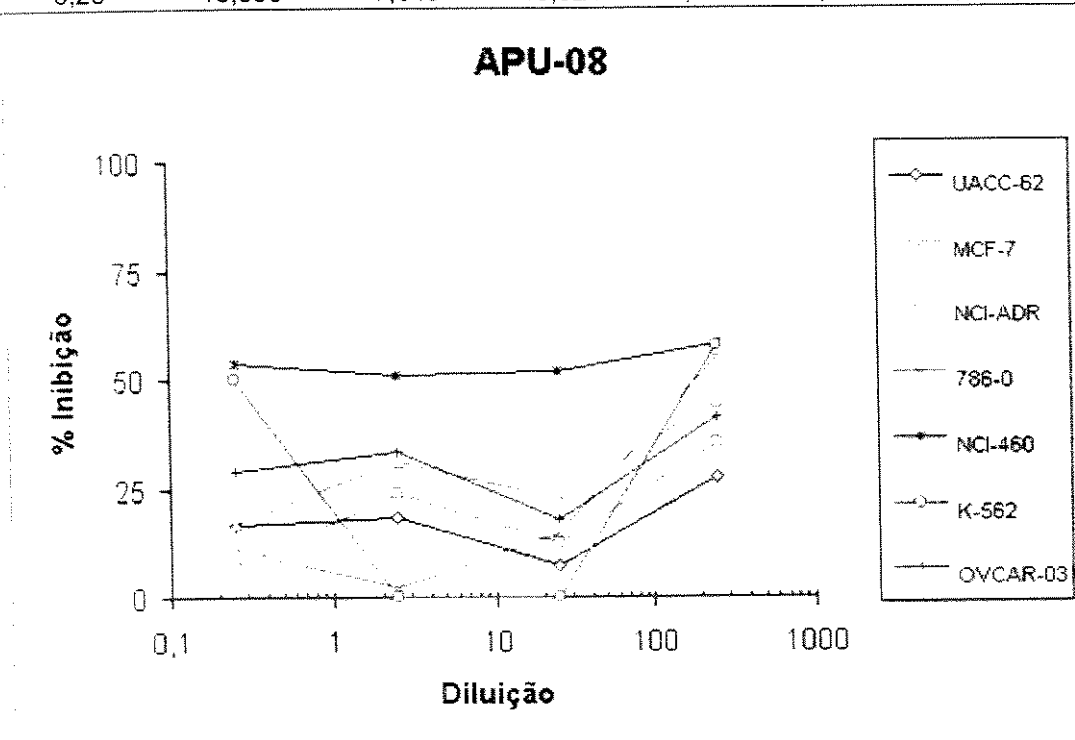
- WANG, Y., ZHANG, Z.S., RUAN, J.S., WANG, Y.M., ALI, S.M. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforest of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 23: 178-187.
- WELLINGTON, E.M.H., WILLIAMS, S.T. 1978. Preservation of actinomycetes inoculums in frozen glycerol. **Microbios Letters**, 6: 151-159.
- WILLIAMS, S. T., CROSS, R. 1974. Actinomycetes. **Methods in Microbiology**, 6: 295-334,
- WILSON, D. 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, 73: 274-276.
- WOODRUFF, H.B. 1999. Natural products from microorganisms: an odyssey revisited. **Actinomycetologica**, 13: 58-67.
- ZHANG, Z., WANG, Y., RUAN, J. 1998. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 48: 411-422.
- ZHANG, Z., KUDO, T., NAKAJIMA, Y., WANG, Y. 2001. Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on basis of 16S DNAr, 16S-23S RNAr internal transcribed spacer and 23S DNAr sequences and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 373-383.
- ZHENG, Z., ZENG, W., HUANG, Y., YANG, Z., LI, J. CAI, H., SU, W. 2000. Detection of antitumoral and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. **FEMS Microbiology Letters**, 188: 87-91.
- ZINNIEL, D.K., LAMBRECHT, P., HARRIS, N.B., FENG, Z., KUCZMARSKI, D., HIGLEY, P., ISHIMARU, C.A., ARUNAKUMARI, A., BARLETTA, VIDAVER, A.K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 2198-2208.

ANEXO . Ensaios de inibição de células tumorais humanas

1. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-08 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	27,668	35,357	44,811	55,013	58,359	58,025	41,462
25	7,351	12,448	22,562	14,633	51,756	0	17,894
2,5	18,412	23,835	31,251	2,426	50,89	0	33,381
0,25	16,395	7,049	16,821	10,924	53,557	50,076	28,803



UACC-62 $y = 0,9884\ln(x) + 15,413$

$R^2 = 0,1242$

MCF-7 $y = 3,1937\ln(x) + 13,069$

$R^2 = 0,5694$

NCI-ADR $y = 3,2694\ln(x) + 22,101$

$R^2 = 0,6371$

786-0 $y = 6,2744\ln(x) + 7,7761$

$R^2 = 0,6349$

NCI-460 $y = 0,6633\ln(x) + 52,269$

$R^2 = 0,3493$

K-562 $y = 1,0357\ln(x) + 24,884$

$R^2 = 0,0096$

OVCAR-03 $y = 0,9767\ln(x) + 28,366$

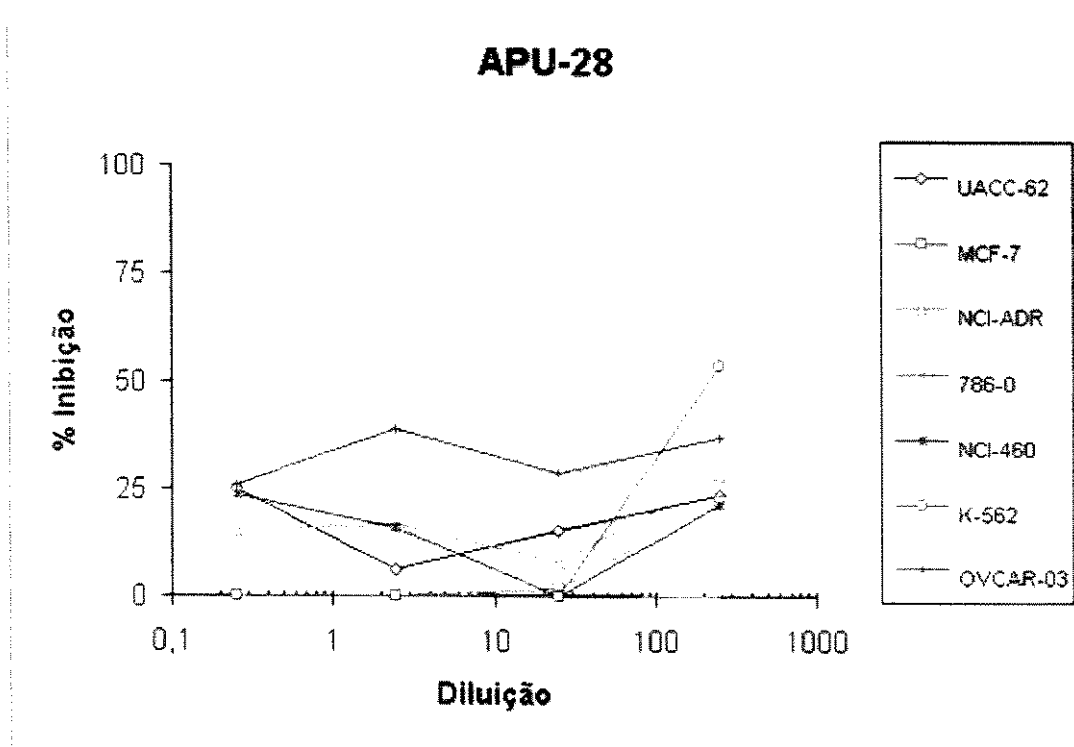
$R^2 = 0,0871$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

2. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-28 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	23,526	22,005	28,457	0	21,249	53,477	37,182
25	15,175	1,638	7,879	0,39	0	0	28,821
2,5	6,15	0	16,779	0	15,534	0	38,882
0,25	25,076	0	15,33	0	23,491	0	25,706



UACC-62 $y = 0,19\ln(x) + 17,089$

$R^2 = 0,0042$

MCF-7 $y = 2,9381\ln(x) - 0,1641$

$R^2 = 0,6592$

NCI-ADR $y = 1,3238\ln(x) + 14,374$

$R^2 = 0,2138$

786-0 $y = 0,0169\ln(x) + 0,0625$

$R^2 = 0,0667$

NCI-460 $y = -0,9667\ln(x) + 17,067$

$R^2 = 0,0736$

K-562 $y = 6,9674\ln(x) - 1,0365$

$R^2 = 0,6$

OVCAR-03 $y = 1,0582\ln(x) + 30,46$

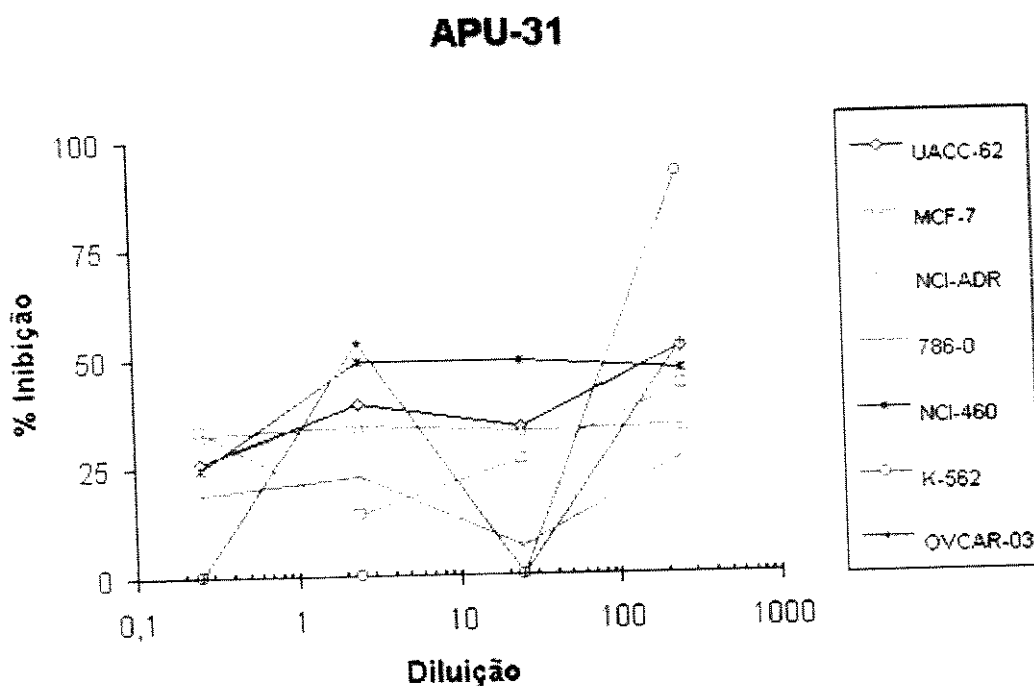
$R^2 = 0,2428$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

3. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-30 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	51,545	43,127	33,95	27,086	46,638	91,695	52,389
25	33,787	26,392	32,719	6,62	48,898	0	0
2,5	39,487	14,22	34,213	22,95	48,905	0	53,546
0,25	25,842	33,311	32,38	18,515	24,875	0	0



UACC-62 $y = 3,1013\ln(x) + 31,253$
 $R^2 = 0,7268$

MCF-7 $y = 1,8075\ln(x) + 25,525$
 $R^2 = 0,1955$

NCI-ADR $y = 0,1397\ln(x) + 33,027$
 $R^2 = 0,212$

786-0 $y = 0,4075\ln(x) + 17,95$
 $R^2 = 0,0188$

NCI-460 $y = 2,8352\ln(x) + 36,467$
 $R^2 = 0,5202$

K-562 $y = 11,947\ln(x) - 1,7772$
 $R^2 = 0,6$

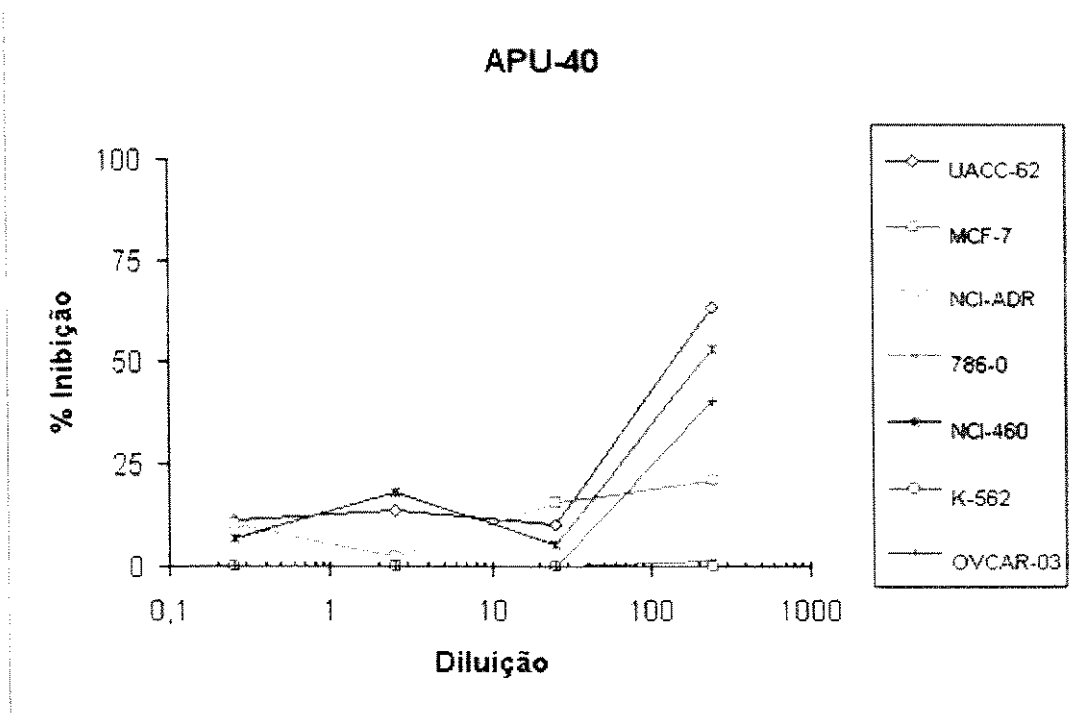
OVCAR-03 $y = 4,5002\ln(x) + 17,179$
 $R^2 = 0,1913$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

4. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-40 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	63,406	21,202	0	1,63	52,817	0	40,314
25	10,159	15,92	0	0	5,258	0	0
2,5	13,485	2,575	0	0	17,964	0	0
0,25	11,038	10,261	0	0	6,697	0	0



UACC-62 $y = 6,6785\ln(x) + 10,714$
 $R^2 = 0,5848$

MCF-7 $y = 2,0051\ln(x) + 8,3439$
 $R^2 = 0,5582$

NCI-ADR SEM INIBIÇÃO

786-0 $y = 0,2124\ln(x) - 0,0316$
 $R^2 = 0,6$

NCI-460 $y = 5,4571\ln(x) + 9,401$
 $R^2 = 0,5358$

K-562 SEM INIBIÇÃO

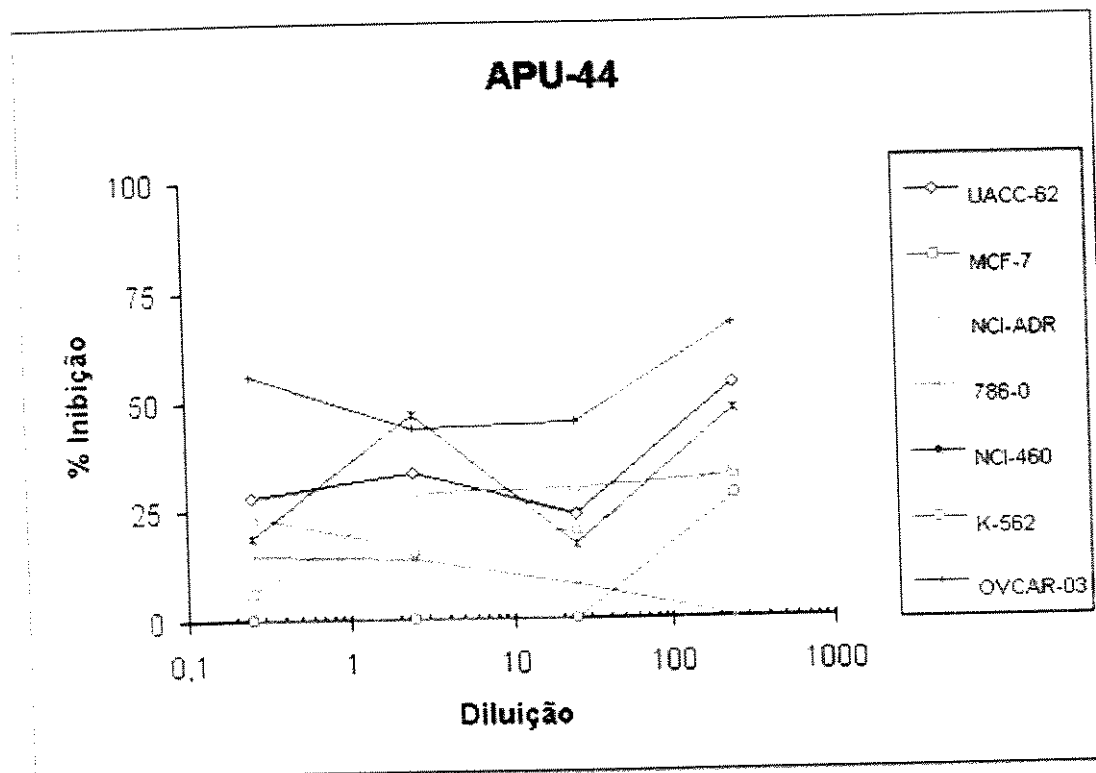
OVCAR-03 $y = 5,2524\ln(x) - 0,7814$
 $R^2 = 0,6$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

5. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-44 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	53,205	32,233	34,179	0	47,435	27,626	67,088
25	23,543	29,727	20,687	7,984	17,017	0	44,584
2,5	33,468	28,555	15,827	13,878	46,556	0	43,513
0,25	28,053	6,055	23,537	14,709	18,939	0	55,612



UACC-62 $y = 2,846\ln(x) + 28,683$

$R^2 = 0,4189$

MCF-7 $y = 3,4616\ln(x) + 16,985$

$R^2 = 0,7166$

NCI-ADR $y = 1,5976\ln(x) + 20,254$

$R^2 = 0,3742$

786-0 $y = -2,1724\ln(x) + 13,634$

$R^2 = 0,9043$

NCI-460 $y = 2,4298\ln(x) + 27,463$

$R^2 = 0,1854$

K-562 $y = 3,5993\ln(x) - 0,5354$

$R^2 = 0,6$

OVCAR-03 $y = 1,5417\ln(x) + 49,512$

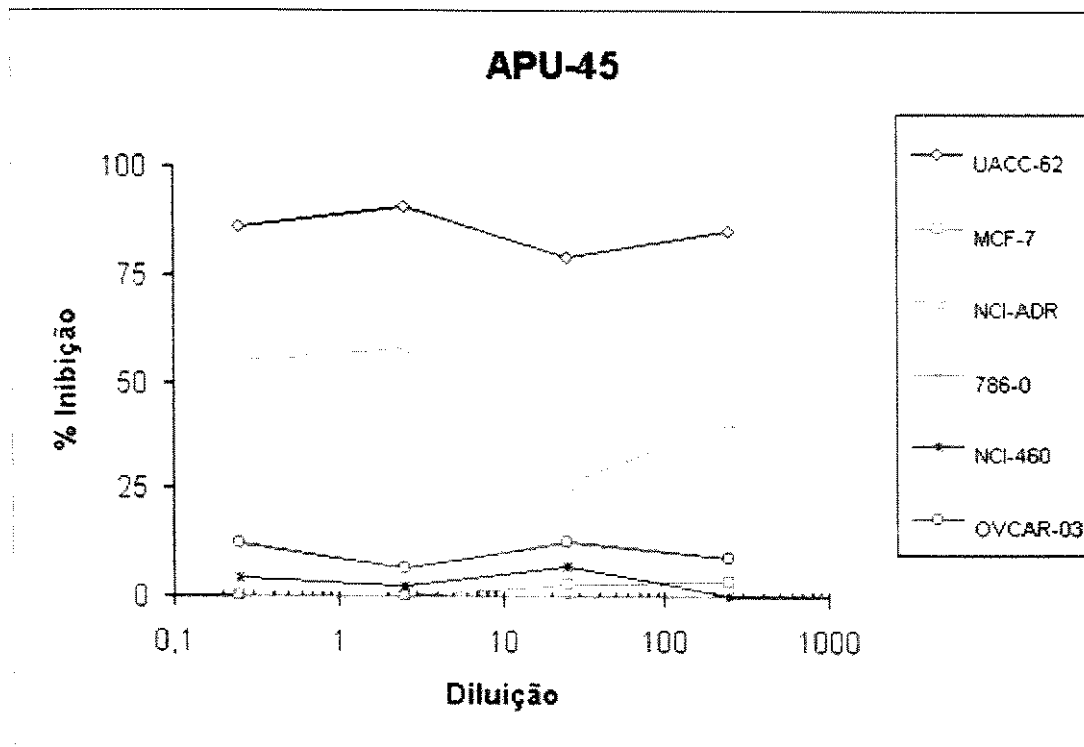
$R^2 = 0,1723$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

6. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-45 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	OVCAR-03
250	85,187	3,152	40,972	0	0	8,899
25	79,156	2,909	26,115	0	6,767	12,423
2,5	90,901	0	58,172	0	2,422	6,413
0,25	85,957	0	55,1	0	4,332	11,896



UACC-62 $y = -0,6104\ln(x) + 86,562$

$R^2 = 0,142$

MCF-7 $y = 0,537\ln(x) + 0,4049$

$R^2 = 0,8297$

NCI-ADR $y = -3,2329\ln(x) + 51,774$

$R^2 = 0,4274$

786-0 SEM INIBIÇÃO

NCI-460 $y = -0,3757\ln(x) + 4,1571$

$R^2 = 0,1514$

OVCAR-03 $y = -0,1295\ln(x) + 10,175$

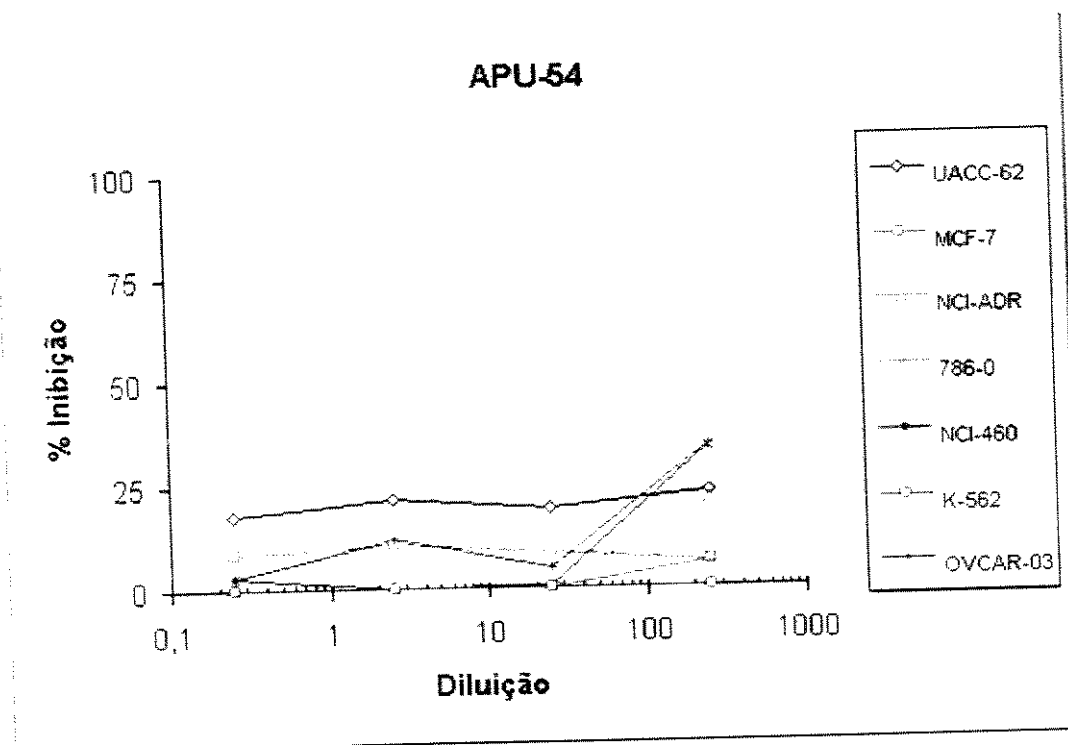
$R^2 = 0,0189$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

7. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-54 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	22,962	6,46	21,368	6,142	33,805	0	34,329
25	19,212	8,57	0	0	0,319	0	4,663
2,5	21,648	10,496	0	0	0	0	12,208
0,25	17,771	8,747	0	0	3,001	0	3,037



UACC-62 $y = 0,5705\ln(x) + 19,219$
 $R^2 = 0,5247$

MCF-7 $y = -0,3816\ln(x) + 9,3573$
 $R^2 = 0,4712$

NCI-ADR $y = 2,784\ln(x) - 0,4142$
 $R^2 = 0,6$

786-0 $y = 0,8002\ln(x) - 0,119$
 $R^2 = 0,6$

NCI-460 $y = 4,0273\ln(x) + 0,9546$
 $R^2 = 0,5326$

K-562 SEM INIBIÇÃO

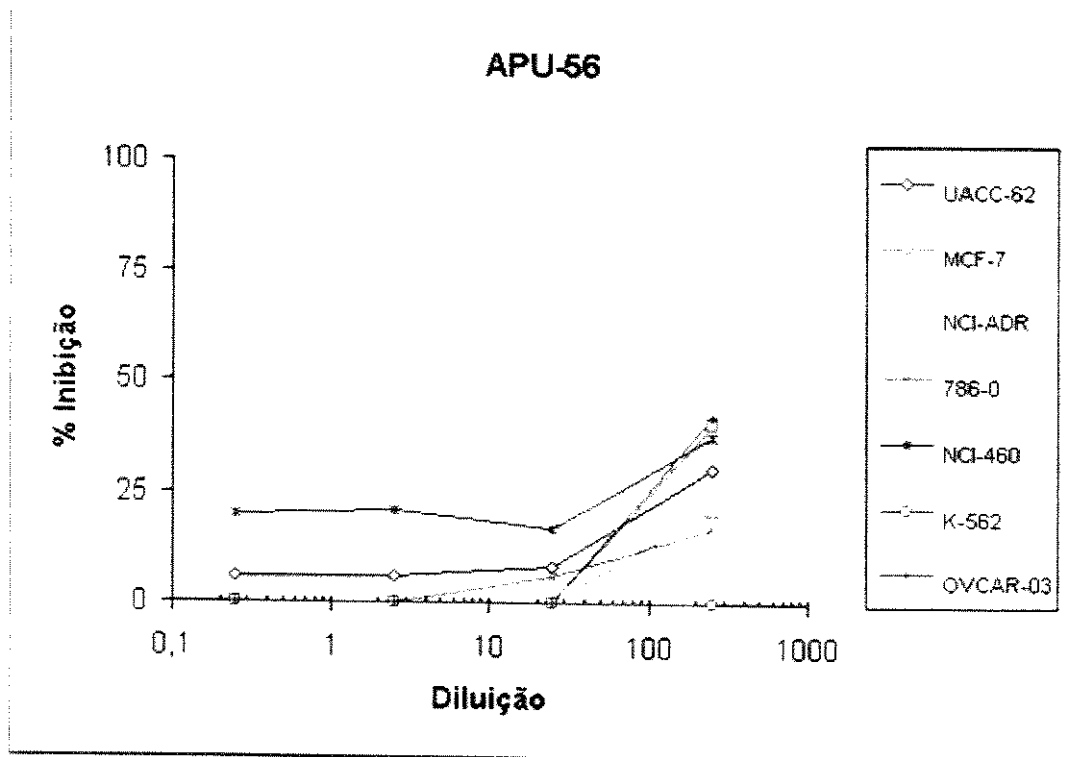
OVCAR-03 $y = 3,7493\ln(x) + 5,8072$
 $R^2 = 0,5981$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

8. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-56 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	30,15	40,146	21,368	16,906	37,293	0	42,045
25	7,982	0	0	5,901	16,71	0	0
2,5	5,697	0	0	0	20,863	0	0
0,25	5,985	0	0	0	20,012	0	0



UACC-62 $y = 3,2477\ln(x) + 5,7387$
 $R^2 = 0,6647$

MCF-7 $y = 5,2306\ln(x) - 0,7781$
 $R^2 = 0,6$

NCI-ADR $y = 2,784\ln(x) - 0,4142$
 $R^2 = 0,6$

786-0 $y = 2,4589\ln(x) + 0,6177$
 $R^2 = 0,841$

NCI-460 $y = 2,0712\ln(x) + 19,437$
 $R^2 = 0,4455$

K-562 SEM INIBIÇÃO

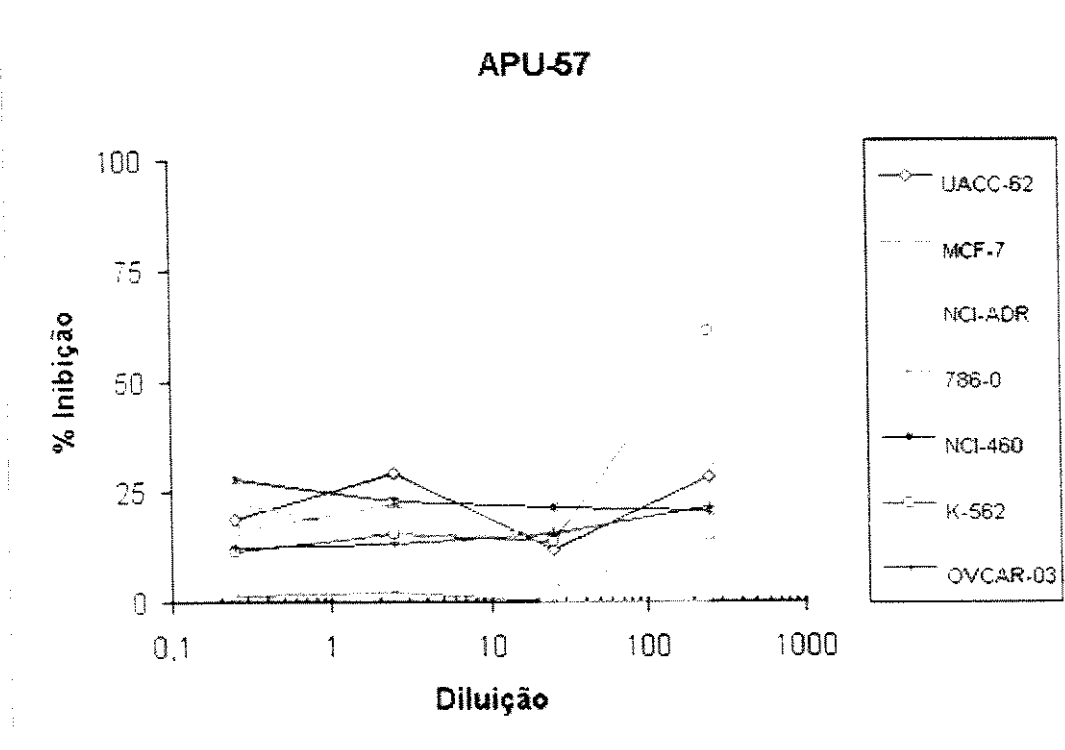
OVCAR-03 $y = 5,478\ln(x) - 0,8149$
 $R^2 = 0,6$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

9. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-57 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	28,017	14,845	32,335	0	20,293	60,95	21,14
25	11,841	2,675	16,472	0	21,355	13,701	15,38
2,5	29,109	22,179	14,311	2,147	22,802	15,477	12,914
0,25	18,712	15,961	22,831	1,419	27,616	11,535	12,359



UACC-62 $y = 0,4624\ln(x) + 20,964$

$R^2 = 0,0282$

MCF-7 $y = -0,9924\ln(x) + 15,967$

$R^2 = 0,1308$

NCI-ADR $y = 1,3321\ln(x) + 18,733$

$R^2 = 0,2398$

786-0 $y = -0,2781\ln(x) + 1,4665$

$R^2 = 0,5954$

NCI-460 $y = -1,0169\ln(x) + 25,119$

$R^2 = 0,8737$

K-562 $y = 6,3611\ln(x) + 12,264$

$R^2 = 0,6342$

OVCAR-03 $y = 1,2512\ln(x) + 12,861$

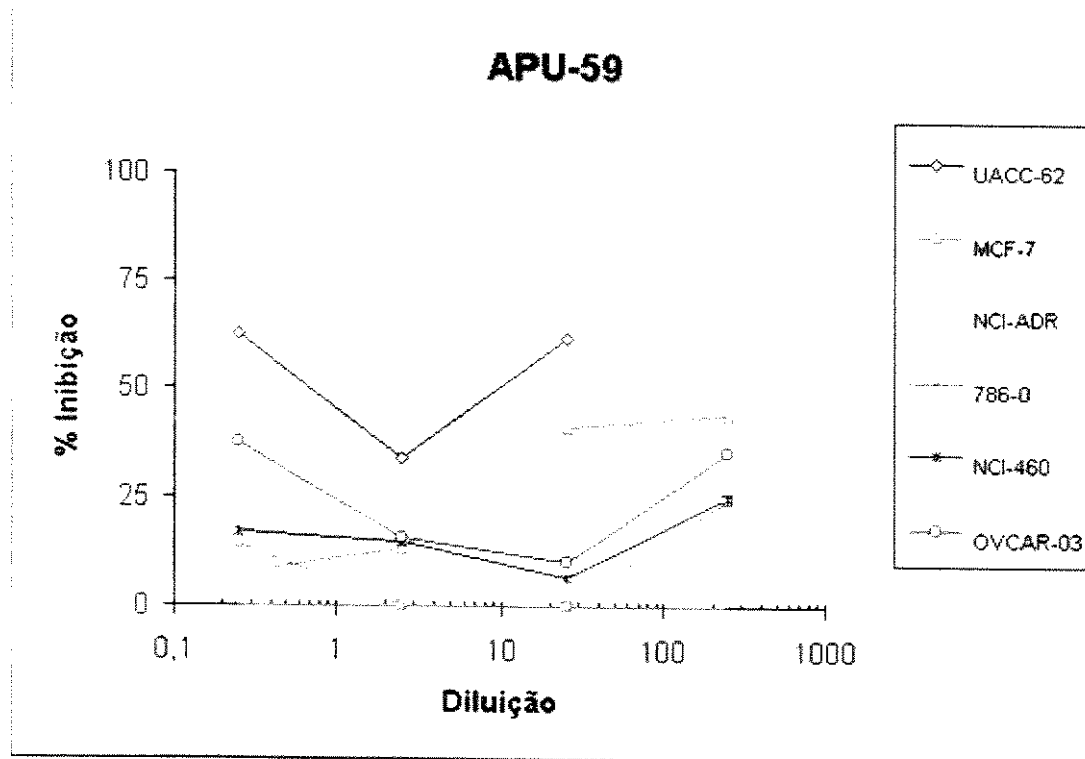
$R^2 = 0,858$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

10. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-59 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	OVCAR-03
250		24,497	43,965	0	25,213	35,021
25	61,43	0,08	41,109	0	6,685	10,268
2,5	33,782	0	13,564	0	14,771	15,92
0,25	62,667	14,245	7,585	0	17,07	37,522



UACC-62 $y = -0,2686\ln(x) + 52,872$
 $R^2 = 0,0014$

MCF-7 $y = 1,3392\ln(x) + 6,9366$
 $R^2 = 0,1115$

NCI-ADR $y = 5,9362\ln(x) + 14,282$
 $R^2 = 0,8952$

786-0 SEM INIBIÇÃO

NCI-460 $y = 0,7098\ln(x) + 14,467$
 $R^2 = 0,0766$

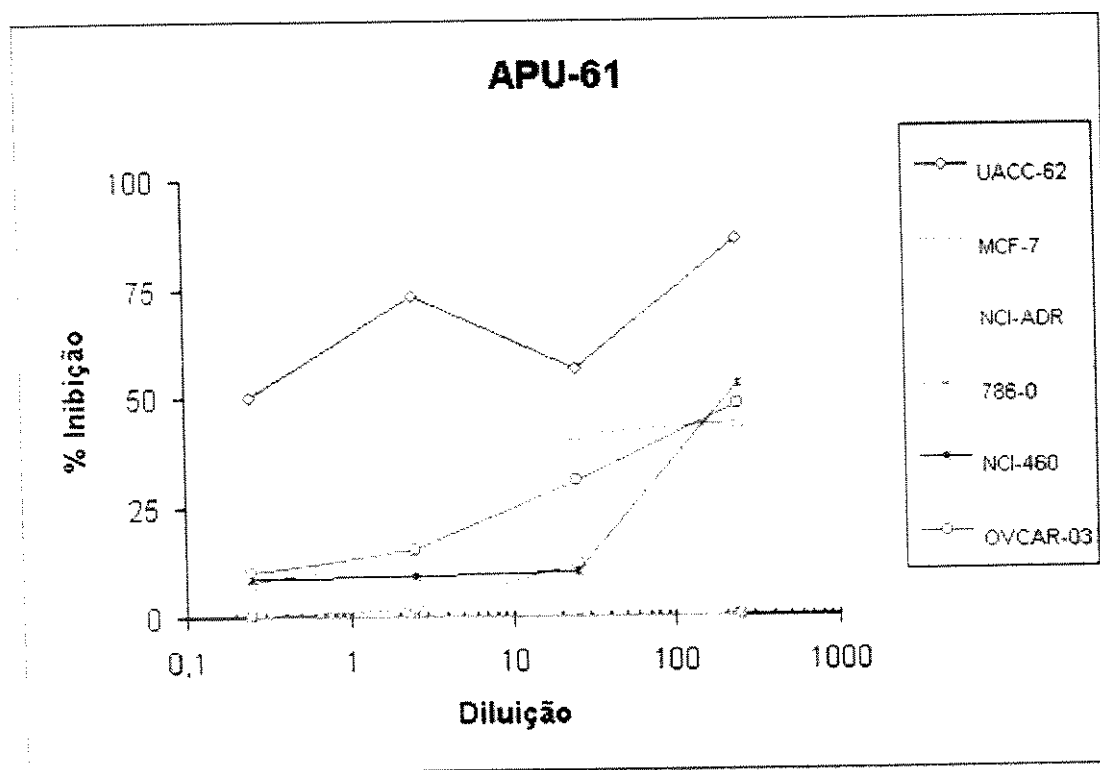
OVCAR-03 $y = -0,5713\ln(x) + 25,864$
 $R^2 = 0,0156$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

11. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-61 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	OVCAR-03
250	86,334	0,213	43,965	0	52,842	47,957
25	56,553	11,946	41,109	0	9,932	30,766
2,5	73,453	2,03	13,564	0	9,029	14,997
0,25	50,065	0	7,585	0	8,56	10,126



UACC-62 $y = 3,9915\ln(x) + 58,349$

$R^2 = 0,5209$

MCF-7 $y = 0,4584\ln(x) + 2,5995$

$R^2 = 0,0577$

NCI-ADR $y = 5,9362\ln(x) + 14,282$

$R^2 = 0,8952$

786-0 SEM INIBIÇÃO

NCI-460 $y = 5,8086\ln(x) + 8,0809$

$R^2 = 0,625$

OVCAR-03 $y = 5,6138\ln(x) + 14,355$

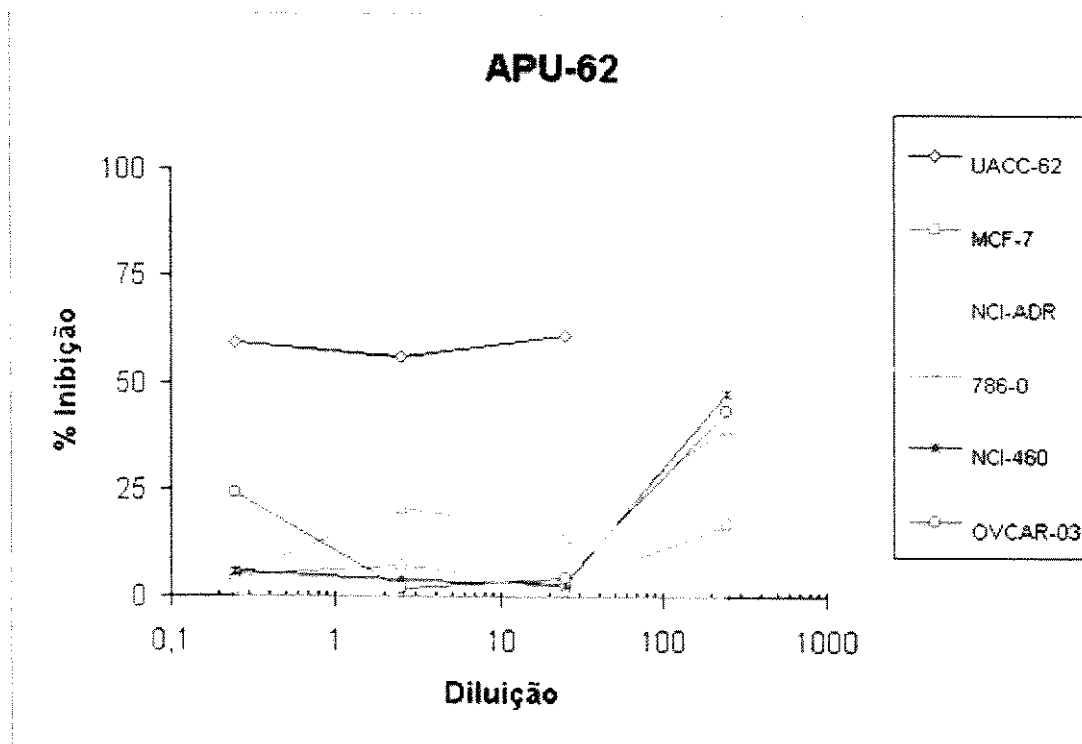
$R^2 = 0,9517$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão

12. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-62 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	OVCAR-03
250		16,877	39,302	0	47,618	43,318
25	61,05	2,493	14,187	0	3,012	4,31
2,5	55,773	6,826	20,574	0	3,856	1,743
0,25	59,221	4,767	4,516	0	5,582	23,83



UACC-62 $y = 8,6947\ln(x) + 57,083$
 $R^2 = 0,6198$

MCF-7 $y = 1,3896\ln(x) + 4,8676$
 $R^2 = 0,4241$

NCI-ADR $y = 4,2548\ln(x) + 10,848$
 $R^2 = 0,743$

786-0 SEM INIBIÇÃO

NCI-460 $y = 5,4401\ln(x) + 3,769$
 $R^2 = 0,5523$

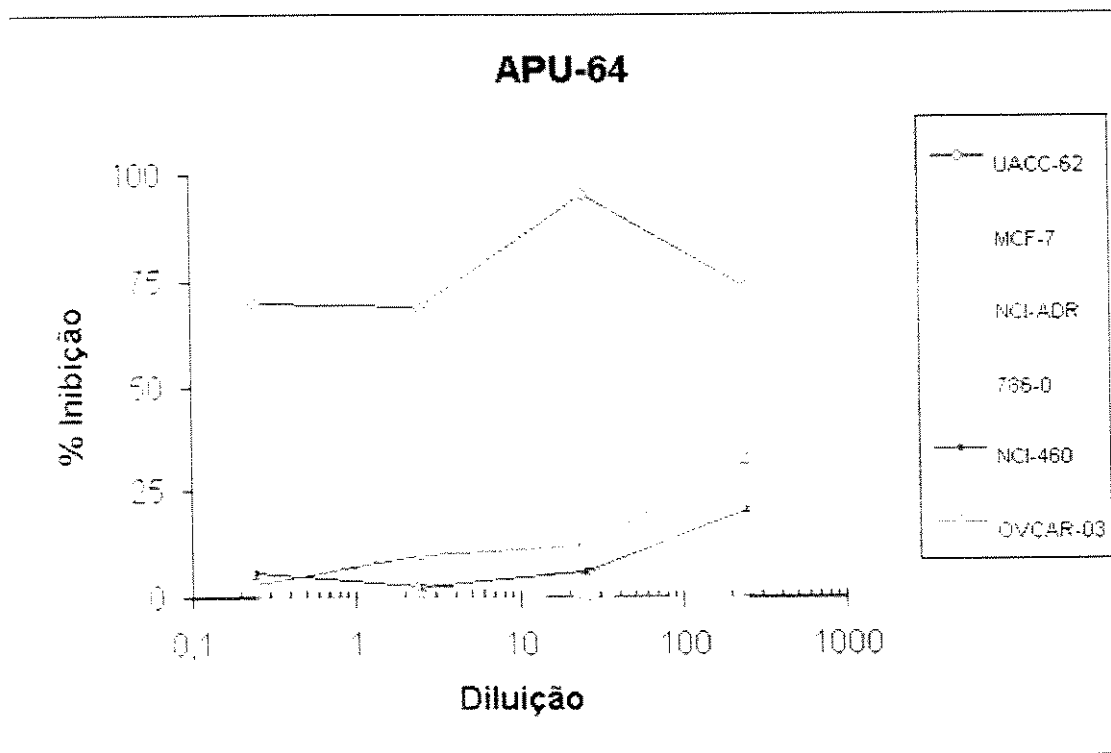
OVCAR-03 $y = 2,6505\ln(x) + 12,82$
 $R^2 = 0,1653$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

13. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-64 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	OVCAR-03
250	73,608	1,561	16,605	0	20,257	32,259
25	95,147	0	5,712	0	6,344	12,449
2,5	68,835	2,842	6,55	0	2,327	9,751
0,25	69,739	11,899	13,37	0	5,838	2,998



UACC-62 $y = 1,6468\ln(x) + 73,427$

$R^2 = 0,1563$

MCF-7 $y = -1,4703\ln(x) + 7,1156$

$R^2 = 0,669$

NCI-ADR $y = 0,3851\ln(x) + 9,763$

$R^2 = 0,0468$

786-0 SEM INIBIÇÃO

NCI-460 $y = 2,0531\ln(x) + 4,4466$

$R^2 = 0,5946$

OVCAR-03 $y = 3,9295\ln(x) + 6,2396$

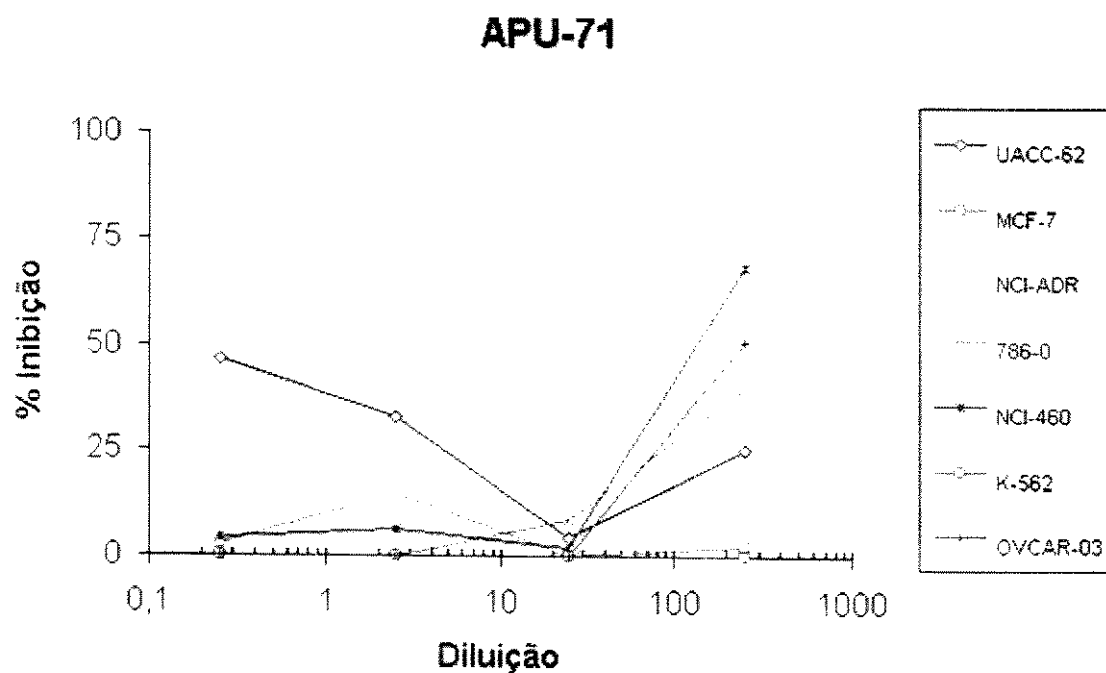
$R^2 = 0,8629$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

14. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-71 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	24,885	2,169	18,19	39,612	68,316	0	50,687
25	4,39	0	0	8,669	1,886	0	0
2,5	32,903	14,495	0	0	6,189	0	0
0,25	46,351	2,89	0	0	4,168	0	0



UACC-62 $y = -4,0351\ln(x) + 35,475$
 $R^2 = 0,4667$

MCF-7 $y = -0,7234\ln(x) + 6,3843$
 $R^2 = 0,1088$

NCI-ADR $y = 2,3699\ln(x) - 0,3526$
 $R^2 = 0,6$

786-0 $y = 5,5375\ln(x) + 0,6211$
 $R^2 = 0,7658$

NCI-460 $y = 8,1709\ln(x) + 3,2458$
 $R^2 = 0,5702$

K-562 SEM INIBIÇÃO

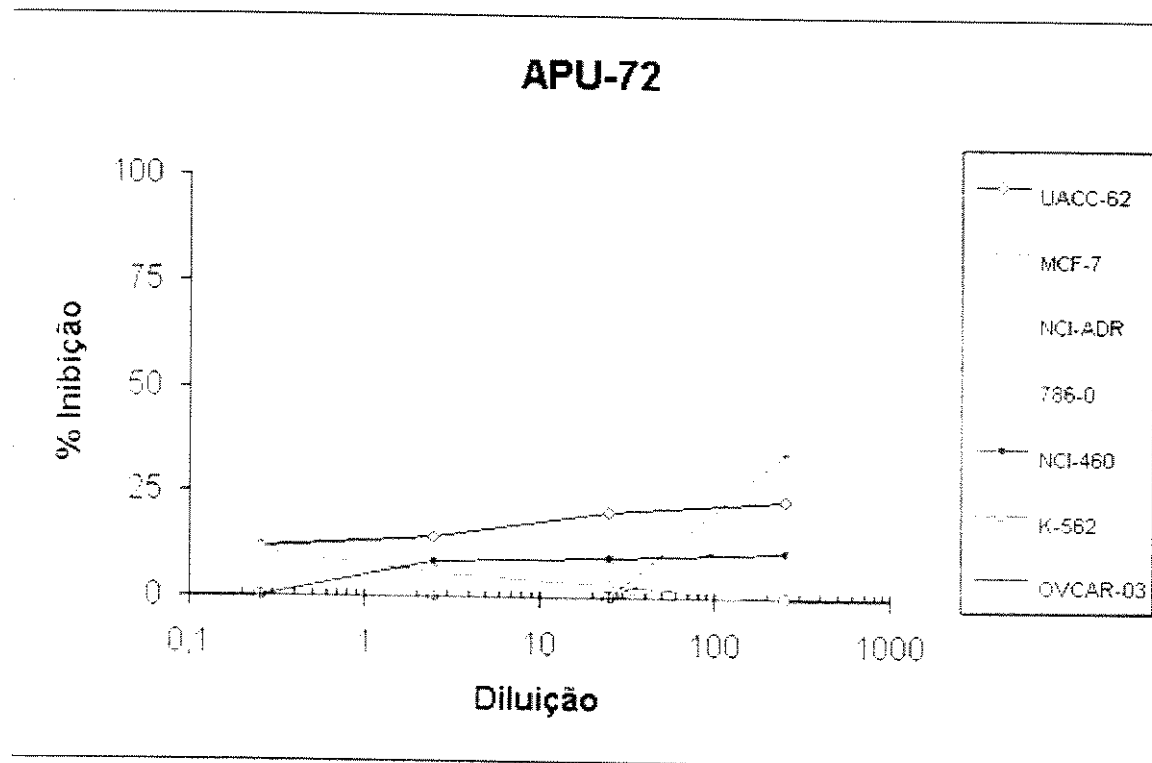
OVCAR-03 $y = 6,6039\ln(x) - 0,9824$
 $R^2 = 0,6$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

15. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-72 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	23,442	0	7,21	18,87	10,765	0	34,407
25	20,191	2,958	0	0	9,54	0	0
2,5	14,026	5,763	0	0	8,357	0	0
0,25	11,982	10,999	0	0	0	0	0



UACC-62 $y = 1,7608\ln(x) + 13,77$
 $R^2 = 0,9666$

MCF-7 $y = -1,5549\ln(x) + 8,1448$
 $R^2 = 0,9752$

NCI-ADR $y = 0,9394\ln(x) - 0,1397$
 $R^2 = 0,6$

786-0 $y = 2,4585\ln(x) - 0,3657$
 $R^2 = 0,6$

NCI-460 $y = 1,4539\ln(x) + 4,1594$
 $R^2 = 0,7853$

K-562 SEM INIBIÇÃO

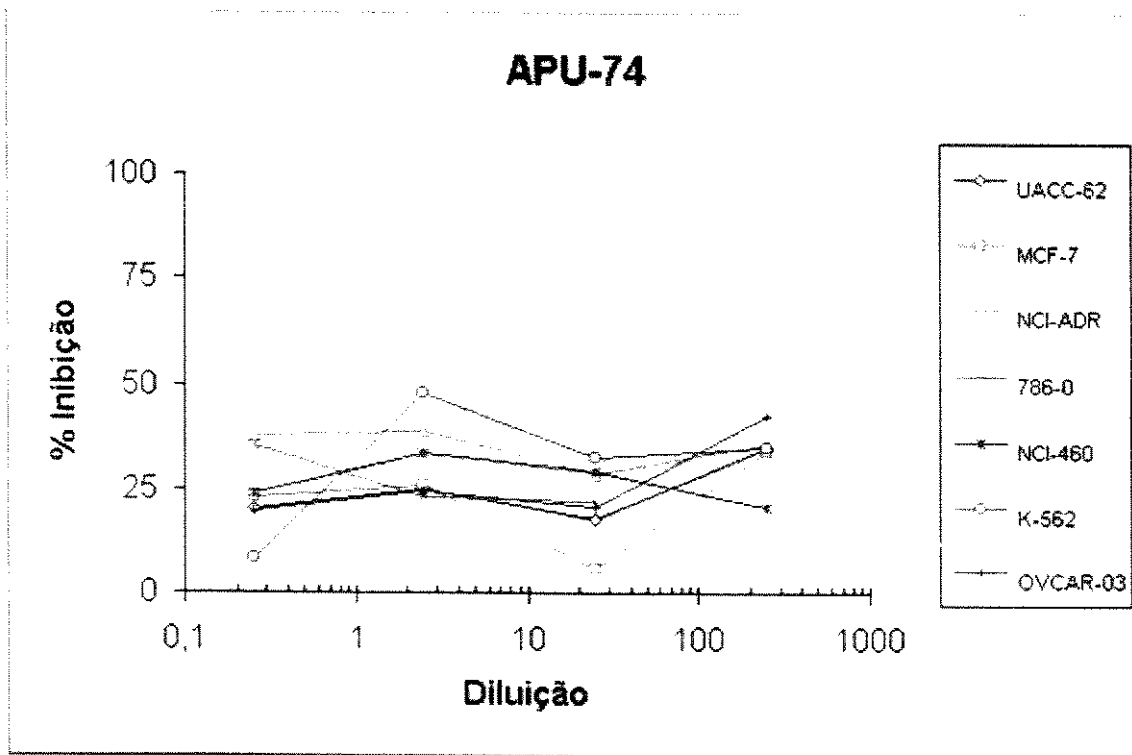
OVCAR-03 $y = 4,4828\ln(x) - 0,6669$
 $R^2 = 0,6$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

16. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-74 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	34,896	34,093	36,059		20,424	34,882	42,589
25	17,708	5,774	28,79	21,99	29,151	32,623	20,372
2,5	25,042	25,818	38,732	23,203	33,499	47,65	24,583
0,25	20,031	23,135	38,027	35,171	23,841	8,259	19,396



UACC-62 $y = 1,6182\ln(x) + 21,073$

$R^2 = 0,3979$

MCF-7 $y = 0,5572\ln(x) + 21,053$

$R^2 = 0,0194$

NCI-ADR $y = -0,6882\ln(x) + 36,825$

$R^2 = 0,2021$

786-0 $y = -2,8622\ln(x) + 29,411$

$R^2 = 0,8184$

NCI-460 $y = -0,634\ln(x) + 28,04$

$R^2 = 0,1068$

K-562 $y = 2,8161\ln(x) + 25,031$

$R^2 = 0,2589$

OVCAR-03 $y = 2,8389\ln(x) + 20,865$

$R^2 = 0,6099$

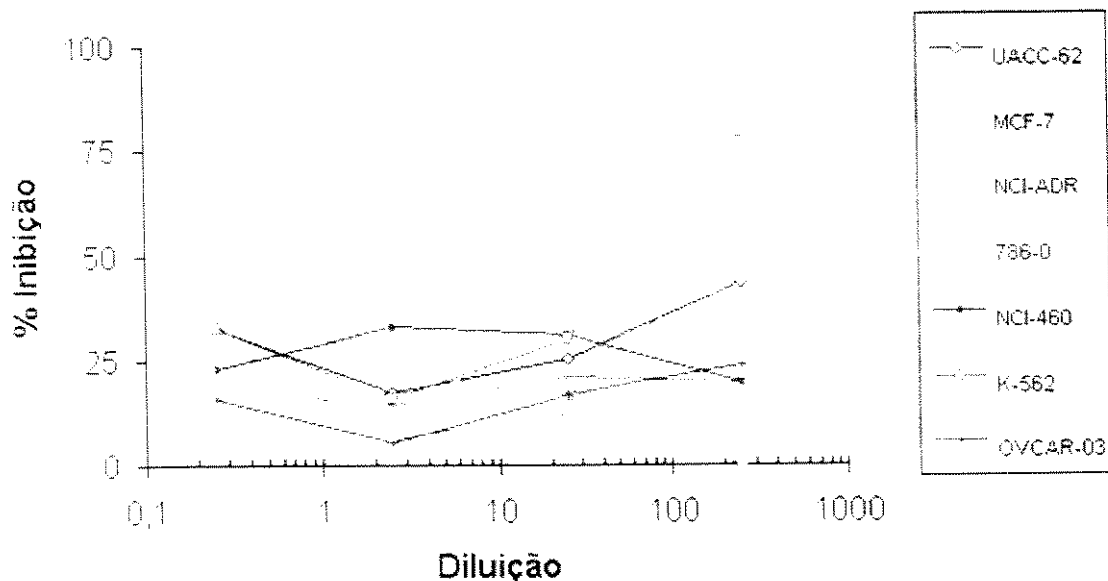
(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

17. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-77 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	43,539	0	51,424	19,622	19,541	79,385	23,979
25	25,259	12,482	16,807	20,89	31,007	30,343	16,695
2,5	17,329	6,036	22,034	14,587	33,072	15,988	5,217
0,25	32,487	30,192	43,768	17,484	22,928	32,603	16,019

APU-77



UACC-62 $y = 1,7843\ln(x) + 25,964$

$R^2 = 0,2269$

MCF-7 $y = -3,6537\ln(x) + 19,732$

$R^2 = 0,6931$

NCI-ADR $y = 0,7705\ln(x) + 31,915$

$R^2 = 0,0188$

786-0 $y = 0,5523\ln(x) + 17,004$

$R^2 = 0,3545$

NCI-460 $y = -0,531\ln(x) + 27,735$

$R^2 = 0,06$

K-562 $y = 6,7186\ln(x) + 25,689$

$R^2 = 0,526$

OVCAR-03 $y = 1,5356\ln(x) + 12,303$

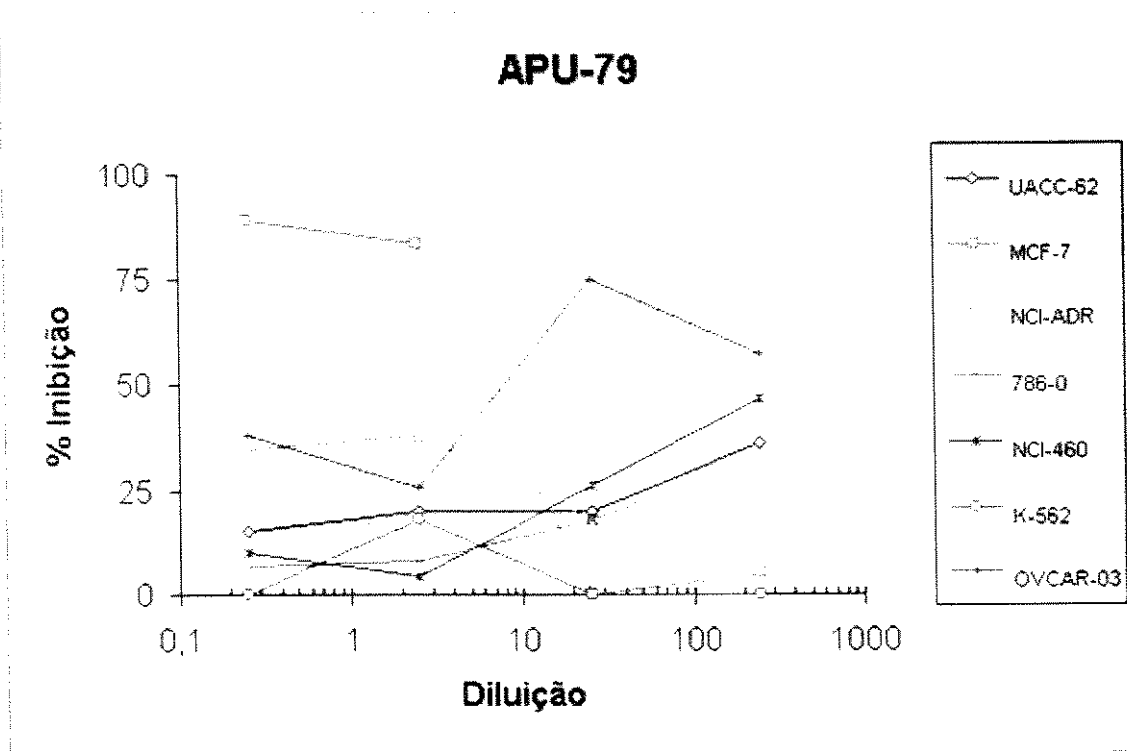
$R^2 = 0,3486$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

18. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-79 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	36,42	5,412	32,549		46,723	0	57,228
25	19,944	0	17,963	17,943	25,991	0	74,891
2,5	20,183	83,46	38,18	8,2	4,072	18,075	25,904
0,25	15,354	89,101	34,545	6,467	10,006	0	38,132



UACC-62 $y = 2,7343\ln(x) + 17,322$
 $R^2 = 0,7747$

MCF-7 $y = -14,528\ln(x) + 74,532$
 $R^2 = 0,7976$

NCI-ADR $y = -1,1381\ln(x) + 33,162$
 $R^2 = 0,1453$

786-0 $y = 2,492\ln(x) + 8,5866$
 $R^2 = 0,8603$

NCI-460 $y = 5,7357\ln(x) + 9,8389$
 $R^2 = 0,7986$

K-562 $y = -0,785\ln(x) + 6,1418$
 $R^2 = 0,0667$

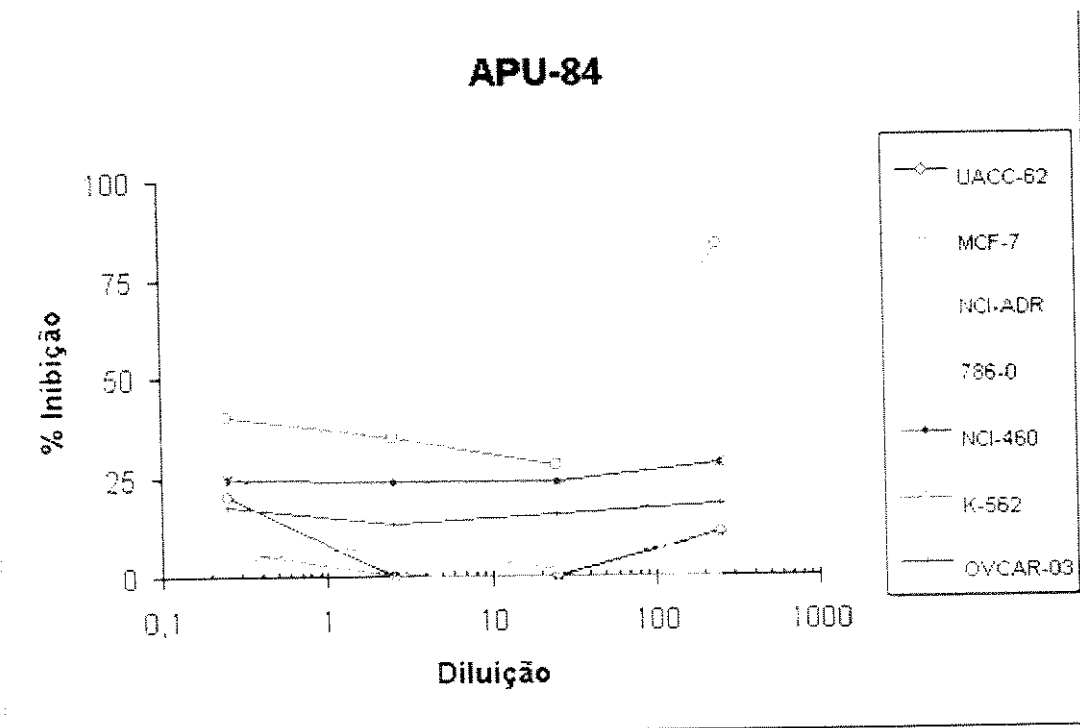
OVCAR-03 $y = 4,6155\ln(x) + 39,496$
 $R^2 = 0,4064$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

19. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-84 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	11,076	30,626	9,321	0	28,385	83,556	18,116
25	0	1,266	3,954	0	23,738	27,933	15,476
2,5	0	7,854	0	0	23,839	34,861	12,977
0,25	20,397	4,022	26,577	7,089	24,031	39,752	17,927



UACC-62 $y = -1,2144\ln(x) + 10,379$
 $R^2 = 0,1343$

MCF-7 $y = 3,1801\ln(x) + 4,3669$
 $R^2 = 0,4978$

NCI-ADR $y = -2,0765\ln(x) + 14,256$
 $R^2 = 0,2776$

786-0 $y = -0,9236\ln(x) + 3,6819$
 $R^2 = 0,6$

NCI-460 $y = 0,5629\ln(x) + 23,834$
 $R^2 = 0,5476$

K-562 $y = 5,4063\ln(x) + 35,348$
 $R^2 = 0,408$

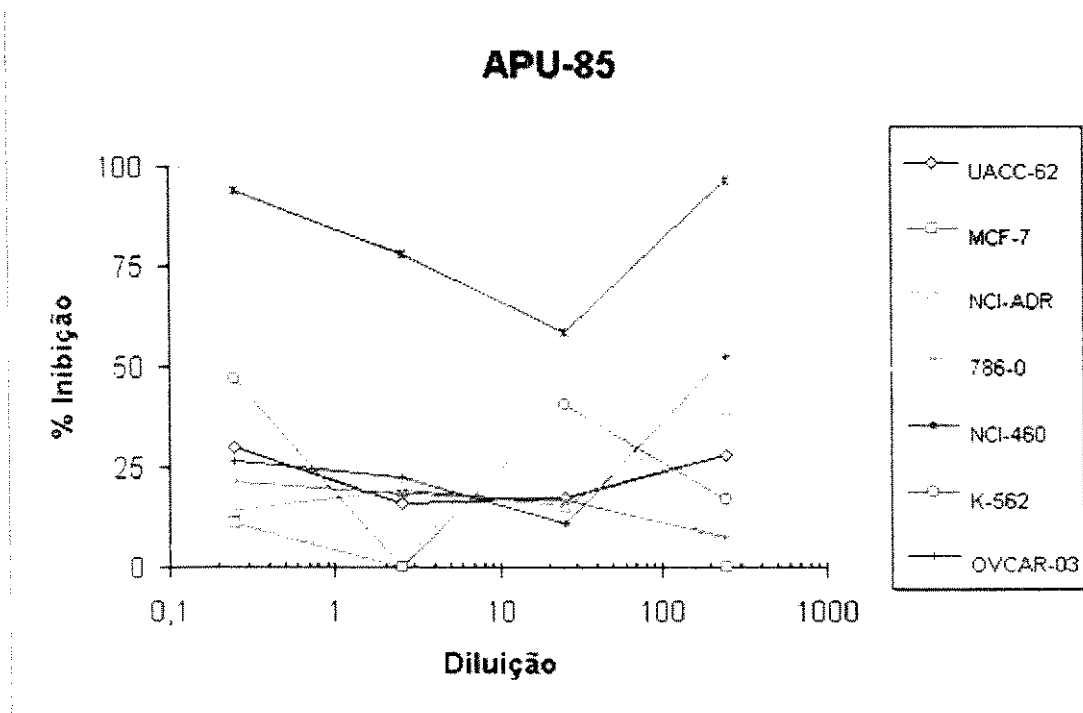
OVCAR-03 $y = 0,1332\ln(x) + 15,849$
 $R^2 = 0,0268$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

20. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-85 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	28,11	0	39,251	7,301	96,383	16,854	52,439
25	17,502	51,807	15,402	17,055	58,455	40,509	10,786
2,5	16,057	0	19,573	18,69	78,049	0	22,522
0,25	30,107	10,892	14,393	21,562	93,921	46,921	26,744



UACC-62 $y = -0,1974\ln(x) + 23,352$
 $R^2 = 0,0067$

MCF-7 $y = 0,8308\ln(x) + 13,957$
 $R^2 = 0,0101$

NCI-ADR $y = 3,0576\ln(x) + 15,833$
 $R^2 = 0,6122$

786-0 $y = -1,929\ln(x) + 20,14$
 $R^2 = 0,8588$

NCI-460 $y = -0,5302\ln(x) + 82,798$
 $R^2 = 0,0081$

K-562 $y = -2,1581\ln(x) + 30,533$
 $R^2 = 0,0877$

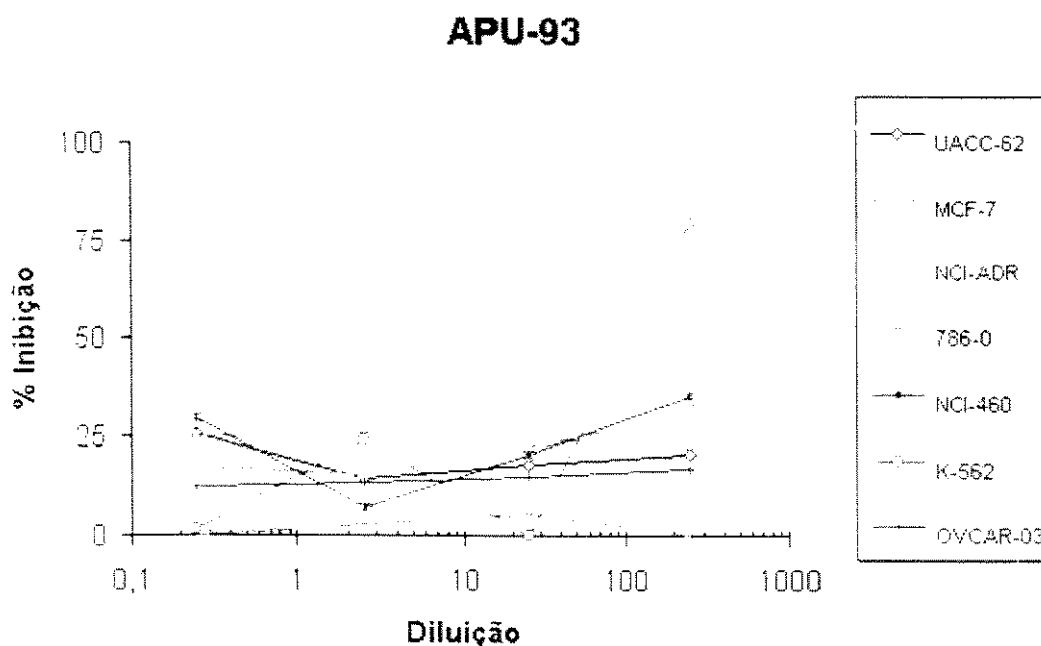
OVCAR-03 $y = 2,8381\ln(x) + 22,255$
 $R^2 = 0,2308$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.

21. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-93 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	20,304	31,698	23,417	0	35,453	79,328	16,682
25	17,961	21,822	24,349	5,766	20,298	0	14,627
2,5	14,471	15,188	25,854	3,15	7,128	24,233	13,445
0,25	25,339	17,341	24,967	0	29,384	1,621	12,323



UACC-62 $y = -0,5044\ln(x) + 20,562$

$R^2 = 0,1081$

MCF-7 $y = 2,1587\ln(x) + 17,049$

$R^2 = 0,7661$

NCI-ADR $y = -0,2673\ln(x) + 25,199$

$R^2 = 0,5993$

786-0 $y = 0,1136\ln(x) + 1,9941$

$R^2 = 0,0147$

NCI-460 $y = 1,3627\ln(x) + 20,248$

$R^2 = 0,1082$

K-562 $y = 9,0719\ln(x) + 7,5386$

$R^2 = 0,5299$

OVCAR-03 $y = 0,6193\ln(x) + 12,989$

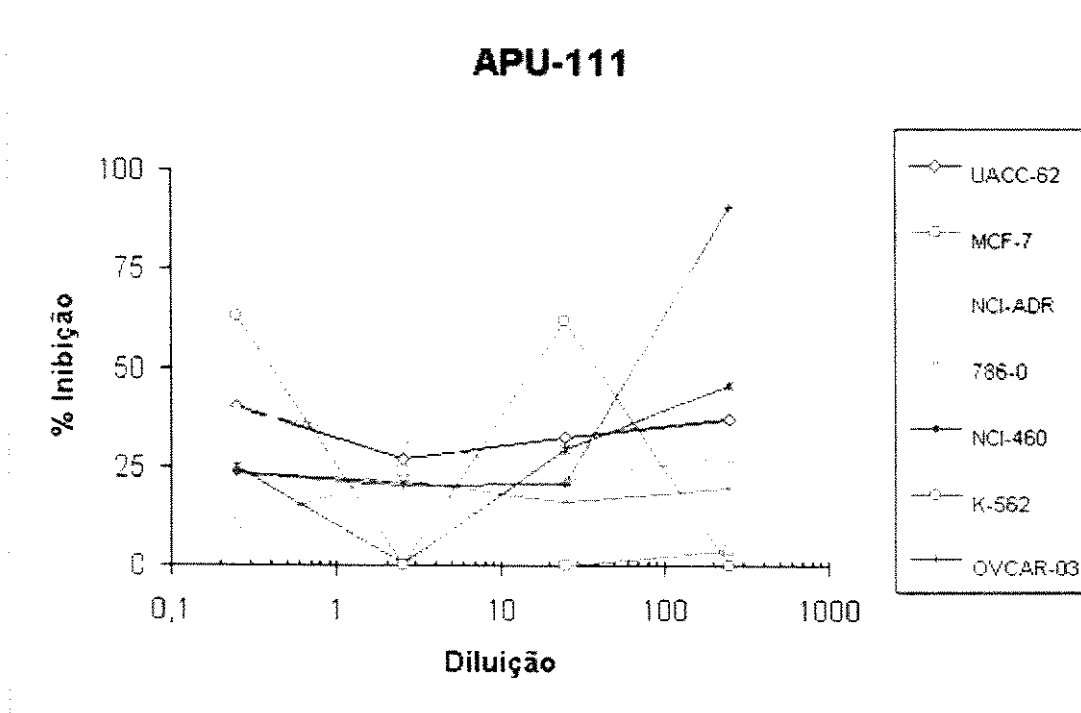
$R^2 = 0,9759$

(y) equação da reta . (R^2) coeficiente de regressão.

22. Curva de inibição dos produtos metabólicos do isolado APU-111 em diferentes diluições (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL) sobre culturas de células tumorais humanas.

DILUIÇÃO X % DE INIBIÇÃO

DILUIÇÃO	UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	K-562	OVCAR-03
250	37,176	4,091	28,032	19,797	45,85	0	90,956
25	32,324	0	21,62	16,116	29,583	61,731	21,062
2,5	26,698	23,715	32,281	21,301	0,473	0	20,126
0,25	39,905	9,974	38,467	23,453	24,625	62,903	23,53



UACC-62 $y = -0,1112\ln(x) + 34,256$
 $R^2 = 0,0032$

MCF-7 $y = -1,7964\ln(x) + 13,159$
 $R^2 = 0,2659$

NCI-ADR $y = -1,8226\ln(x) + 33,868$
 $R^2 = 0,5834$

786-0 $y = -0,7015\ln(x) + 21,617$
 $R^2 = 0,4557$

NCI-460 $y = 4,0296\ln(x) + 16,801$
 $R^2 = 0,4071$

K-562 $y = -5,5146\ln(x) + 42,56$
 $R^2 = 0,2076$

OVCAR-03 $y = 8,8255\ln(x) + 20,671$
 $R^2 = 0,5709$

(y) equação da reta. (R^2) coeficiente de regressão.