



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ-UFOPA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

TALITA CUNHA DE FARIA LIBERAL

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.* DE SOLO AMAZÔNICO**

**Santarém-Pará
Agosto/2018**

TALITA CUNHA DE FARIA LIBERAL

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.* DE SOLO AMAZÔNICO**

Defesa de Dissertação de mestrado apresentado à Universidade Federal do Oeste do Pará UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Kelly Christina Ferreira Castro

Co-orientadora: Dra. Sílvia Katrine Silva Escher

**Santarém-Pará
Agosto/2018**

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

- L695i Liberal, Talita Cunha de Faria
 Isolamento, caracterização e atividade antimicrobiana de metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces sp.* de solo Amazônico / Talita Cunha de Faria Liberal. – Santarém : UFOPA, 2018.
 81 f.: il.
 Inclui bibliografias.
- Orientadora: Kelly Christina Ferreira Castro
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Actinobactérias. 2. Rizosfera. 3. Metabolismo secundário. I. Castro, Kelly Christina Ferreira, *orient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 570

TALITA CUNHA DE FARIA LIBERAL

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces sp.* DE SOLO AMAZÔNICO**

Data de aprovação: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra Kelly Christina Ferreira Castro
Orientadora

Profª. Dra. Silvia Katrine Silva Escher
Co-orientadora

Profª Dra Thalís Ferreira dos Santos
Membro

Prof. Dr. Fábio Rogério Rodrigues dos Santos
Membro

SANTARÉM – PA
Agosto/2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João e Dinauria, ao meu esposo Ronan Liberal Jr pela paciência, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis e principalmente por nunca me deixarem desistir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por me iluminar, dar forças e ser meu guia em todas as decisões e a Nossa Senhora por me cobrir com seu manto sagrado e iluminar meu caminho.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Christina Ferreira Castro por ter aceitado me orientar, pela confiança a mim depositada e por todos os momentos que se dispôs a tirar minhas dúvidas, viajar para realizar experimentos comigo e construção do trabalho.

À Prof. Dra. Silvia Katrine Silva Escher pela oportunidade e por acreditar no meu potencial, desde a iniciação científica no período da graduação, por sua dedicação e orientação contribuíram para a minha formação.

Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA por todo companheirismo, apoio e suporte durante todos esses anos na pesquisa, em especial ao amigo e técnico José Jeosafá Vieira Júnior que foi incansável em sua contribuição na realização dos ensaios.

Ao grupo do Laboratório de Cromatografia Líquida - Labcrol da Universidade Federal do Pará - UFPA por toda colaboração na realização dos experimentos, em especial aos Professores Milton Nascimento da Silva e Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva, que abriram as portas para os estudos e foram de fundamental importância na solução de dúvidas e no seguimento desta pesquisa.

Ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco em especial a Prof. Dra. Janete Magalí de Araújo por ter me acolhido e repassado seu conhecimento durante a pesquisa.

Aos meus pais e minha avó pelo incentivo e todas as palavras de consolo e incentivo, vocês são meu alicerce.

À meu esposo pelo amor, carinho, paciência, conselhos e incentivo para seguir em frente, superar os obstáculos e ter confiança.

A meus sogros, tios, primos e aos demais familiares e amigos de coração por sempre lutarem com todas as forças para que esse sonho pudesse ser concretizado.

A minha amiga Sara Freitas por todo o incentivo e horas dedicadas para me ajudar a finalizar esta pesquisa.

As amigas Amanda Lima e Bárbara Viana pelo companheirismo e momentos de descontração.

A Universidade Federal do Oeste do Pará e ao programa de pós graduação em Biociências.

Aos professores do programa de pós graduação em Biociências, pelos conhecimentos adquiridos nas disciplinas durante o mestrado.

A CAPES e FAPESPA pelo incentivo e apoio financeiro do projeto e da bolsa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Ame a sabedoria, e ela o tornará importante; abraça-a e você será respeitado.”

Provérbios 4.5-9

RESUMO

A Floresta Amazônica é conhecida como um dos principais ambientes ricos em plantas e animais com ampla diversidade genética. No entanto, há pouca referência quanto à diversidade microbiana deste bioma. Portanto, é importante investigar a biodiversidade autóctone e descrever o seu potencial biotecnológico. O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica dentro do grupo das actinobactérias, sendo responsável pela produção de grande parte dos antibióticos já conhecidos e por produzir diversas enzimas de aplicação industrial. Este trabalho buscou avaliar a produção de metabólitos secundários antimicrobianos e enzimas de interesse industrial produzidos por *Streptomyces* sp. isolados de solo rizosférico de uma planta nativa da Amazônia. A linhagem de actinobactérias isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn Fragans (Macacaporanga) foi nomeada MPO11, após identificação através de métodos clássicos e moleculares, apresentando 99,9% de similaridade com *Streptomyces cinereus*. Quanto ao seu potencial antimicrobiano, foi avaliada a atividade contra microrganismos de interesse clínico e fitopatogênicos. A partir de fermentação submersa de MPO11, a espécie apresentou um espectro de ação variado com ação antibacteriana e fitopatogênica, além da produção de diversas enzimas extracelulares de interesse industrial como caseinase, lipase e catalase. O perfil fisiológico e bioquímico médio foi tolerante a salinidade nas concentrações de 3 a 5% em NaCl. O extrato acetato etílico obtido do cultivo submerso, foi submetido a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho em fase reversa, para otimização do método de isolamento dos metabólitos presentes no extrato, que levou a três isolados posteriormente analisados por espectrometria de massas. A análise química das substâncias isoladas estão em fase de elucidação estrutural e sugere-se que pertençam a classe dos macrolídeos, comumente encontrados no gênero *Streptomyces*. Assim, o presente trabalho contribui para o estudo da biodiversidade deste bioma e evidencia o seu potencial biotecnológico na produção de substâncias bioativas de origem microbiana.

Palavras-chave: Actinobacterias, Rizosfera, Metabolismo secundário, Solo da Amazônia.

ABSTRACT

The Amazon Rainforest is known as one of the main vectors rich in plants and animals with wide genetic range. However, there is little reference to the microbial of this biome. Therefore, it is important to investigate an autochthonous microbial diversity and describe its biotechnological potential. The genus *Streptomyces* is the important major biotechnology within the group of actinobacteria, being leading to the production of large part of antibiotics has known and by various various enzymes of industrial applications. This work aimed at the production of secondary antimicrobial metabolites and enzymes of industrial interest, by *Streptomyces sp.* soil of rhizospheric soil of a plant native to the Amazon. The actinobacteria line isolated from rhizospheric soil of *Aniba parviflora* *Syn Fragans* (Macacaporanga) was named MPO11, after identification by classical and molecular methods, presenting 99.9% similarity with *Streptomyces cinereus*. Regarding its antimicrobial potential, an activity of microorganisms of clinical and phytopathogenic interest was evaluated. The subproduction of MPO11 submersion, a type of action with antibacterial and phytopathogenic action, besides the production of several extracellular enzymes of industrial interest such as caseinase, lipase and catalase. The mean physiological and biochemical profile was salinity tolerant at concentrations of 3 to 5% NaCl. The ethyl acetate extract obtained from the submerged was subjected to reverse phase High Performance Liquid Chromatography to optimize the isolation of the metabolites present in the extract, which according to mass spectrometry. The chemical analysis of the three data sources undergoing structural elucidation and suggests that the class of macrolides, commonly found in the genus *Streptomyces*. Thus, the present work can contribute to the study of the microbial diversity of this biome and the discovery of its biotechnological potential in the production of bioactive substances of microbial origin.

Key words: Actinobacteria, Rhizosphere, Secondary metabolism, Soil of the Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Streptomyces</i> (adaptado de Flardh, 2009;Chater; Merrick,1979)...	21
Figura 2- Estrutura molecular dos metabólitos secundários produzidos por actinobactéria do gênero <i>Streptomyces</i>	23
Figura 3- Mapa de coordenadas geográficas do ponto de amostragem do solo rizosfera de <i>Aniba parviflora</i> syn <i>A. fragrans</i> (macacaporanga) (Latitude 2°28'01.28"S Longitude 54°49 '45.32).	27
Figura 4- Esquema da diluição seriada do solo rizosférico de <i>Aniba parviflora</i> <i>Syn fragrans</i> (Macacaporanga).....	28
Figura 5- Esquema da metodologia utilizada no ensaio “bloco de gelose” (Ichikawa, Ishikura e Ozaki, 1971).....	35
Figura 6- Esquema do processo de cultivo submerso.....	37
Figura 7- Aspecto morfológico do isolado MPO11; 1.a. colônia bacteriana de aspecto velutino cultivada em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Lupa, aumento de 40 x.; 1.b. esporos esféricos de superfície rugosa (MEV). 1.c. cadeia de esporos tipo <i>Retinaculum apertum</i> . Microscópio óptico de luz comum, aumento de 640x.	42
Figura 8- Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.....	44
Figura 9- Substratos de fontes de carbono, evidenciando a formação da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. MPO11. a. D-sacarose; b. Lactose; c. L-arabnose.....	46
Figura 10- Substratos de fontes de nitrogênio evidenciando a formação da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. MPO11. a. L-cisteína; b. L-histidina; c. L-glutamina.....	46
Figura 11- Prospecção enzimática de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 nos meios seletivos. a. Amilase; b. Caseinase; c. Lipase.....	49
Figura 12- Prospecção enzimática de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11nos meios seletivos. a. Esterase; b. Glutaminase; c. Hemólise.....	49
Figura 13- Atividade antimicrobiana de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11. a. <i>Staphylococcus aureus</i> , b. <i>Enterobacter aerogenes</i> , c. <i>Rhizoctonia solani</i>	51
Figura 14-Parâmetros físico-químicos avaliados durante o cultivo submerso de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 no meio MPE.	54
Figura 15- Parâmetros físico-químicos avaliados durante o cultivo submerso de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 no meio M1.....	55
Figura 16- Biomassa do cultivo submerso de <i>Streptomyces cinereus</i> MPO11 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa.....	56

Figura 17- Patógenos que apresentaram maior sensibilidade aos metabólitos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 sob cultivo submerso em meio M1.	57
Figura 18- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 em meio M1 durante 168h de cultivo submerso.	58
Figura 19- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 em meio MPE durante 168h de cultivo submerso.....	59
Figura 20- – Patógenos com maior sensibilidade aos metabólitos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 sob cultivo submerso em meio MPE.....	60
Figura 21- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 nos meios M1 e MPE durante 168h de cultivo submerso.....	61
Figura 22- Placa contendo ensaio da atividade antimicrobiana realizado pelo método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do extrato aceto etílico de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11, contra bactérias.	63
Figura 23- Cromatograma 1- Gradiente de ampla extensão do extrato bruto aceto etílico de metabolitos secundário de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 com fase móvel composta por solvente A:H ₂ O e solvente B: ACN variando de 5-100% de B em 60 minutos, vazão de 2,0mL min ⁻¹	64
Figura 24- Eluição isocrática acidificada 0,1% ácido fórmico, do extrato bruto aceto etílico de metabolitos secundário de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11, composta por: fase estacionária: Coluna Gemini C18 250X4,6mm, 5 μm e fase móvel H ₂ O:ACN 80:20, vazão 2mL/min.....	66
Figura 25- Eluição isocrática acidificada 0,1% ácido fórmico, do extrato bruto aceto etílico de metabolitos secundário de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11, composta por: fase estacionária: Coluna semi-preparativa Gemini C18 250X 10.0 mm, 5 μm e fase móvel H ₂ O:ACN; 80:20, vazão 2mL/min.....	67
Figura 26- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-01, modo [M + H] ⁺	68
Figura 27- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-02, modo [M + H] ⁺	69
Figura 28- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-03, modo [M + H] ⁺	69
Figura 29- O espectro de massas do isolado SC-01, modo [M + H] ⁺	70
Figura 30- O espectro de massas do isolado SC-02, modo [M + H] ⁺	71
Figura 31- O espectro de massas do isolado SC-03, modo [M + H] ⁺	72
Figura 32- Substâncias macrocíclicas isoladas do gênero <i>Streptomyces</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Microrganismos utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana (Ichikawa, Ishikura e Ozaki, 1971).	34
Tabela 2- Características macroscópicas da linhagem MPO11 cultivada em diferentes meios de cultura.	43
Tabela 3- Dados da identificação molecular.	45
Tabela 4- Aspectos bioquímicos e fisiológicos de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11.	47
Tabela 5- Produção de enzimas por <i>Streptomyces cinereus</i>	48
Tabela 6-Atividade antimicrobiana (mm) de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11, avaliada pelo método de bloco de ágar.	52
Tabela 7- Parâmetros físico químicos do cultivo submerso de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 nos meios M1 e MPE.	54
Tabela 8- Produção de biomassa em cultivo submerso de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 nos meios M1 e MPE.	55
Tabela 9- Produção de Metabólitos antimicrobianos no meio M1 durante 168H de cultivo submerso.	57
Tabela 10- Produção de Metabólitos antimicrobianos no meio M1 durante 168H de cultivo submerso.	58
Tabela 11- Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto aceto etílico de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11.	62
Tabela 12- Estimativa do % do solvente B (ACN) para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda Tz e do gradiente inicial (Snyder e Dolan, 1996).	65

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
ALA	Arginina Levedura gar
AN	gar nutriente
BDA	Batata Dextrose gar
CAA	Caseína Amido gar
CG EM	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>
CO ₂	Gás carbnico
CZ	Czapeck
DNA	cido Desoxirribonucleico
GAA	Glicerol Asparagina gar
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISP1	International <i>Streptomyces</i> Project n 1
ISP2	International <i>Streptomyces</i> Project n 2
ISP3	International <i>Streptomyces</i> Project n 3
ISP4	International <i>Streptomyces</i> Project n 4
ISP5	International <i>Streptomyces</i> Project n 5
LABCROL	Laboratório de Cromatografia Líquida da UFPA
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada  Espectrometria de Massas
LM	Líquido metabólico
M1	Meio 1
MPE	Meio de Produção de Euromicina
MHA	gar Meller-Hinton
O ₂	Oxignio
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico

RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotação por minuto
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
TSA	Trypticase Soy Ágar
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos – UFPE
v/v	Volume por Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	AMAZÔNIA E DIVERSIDADE MICROBIANA.....	16
2.2	SOLO RIZOSFÉRICO	16
2.3	<i>Aniba parviflora Syn fragans</i> (MACACAPORANGA)	17
2.4	ACTINOBACTÉRIAS.....	18
2.5	O GÊNERO <i>Streptomyces</i>	20
2.6	METABOLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	LOCAL DE COLETA DO MATERIAL	27
4.2	ISOLAMENTO DAS LINHAGENS DE ACTINOBACTÉRIAS.....	27
4.3.1	Caracterização Macromorfológica – Cultivo.....	29
4.3.2	Caracterização micromorfológica - Microcultivo.....	29
4.4.1	Extração de DNA bacteriano	29
4.4.2	Condições da PCR	30
4.4.3	Sequenciamento, análise e anotação das sequências.....	30
4.6.1	Produção de Proteases	31
4.6.2	Produção de amilase	32
4.6.3	Produção de Catalase.....	32
4.6.4	Produção de Lipase.....	32
4.6.5	Produção de Pectinase	33
4.6.6	Produção de L-glutaminase	33

4.6.7	Atividade hemolítica.....	33
4.8.1	Cultivo submerso.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	ISOLAMENTO DA LINHAGEM DE ACTINOBACTÉRIA.....	41
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	45
5.4	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA.....	45
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	51
5.7	CULTIVO SUBMERSO E OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS 53	
5.8	OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 61	
5.9	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	62
5.10	ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE <i>Streptomyces</i> sp. MPO11	64
5.11	Resultados espectrométricos.....	68
	CONCLUSÃO.....	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é reconhecida por sua biodiversidade, e abriga um ambiente complexo como o solo, importante nos processos de ciclagem de nutrientes, caracterizado por diversos processos químicos, físicos e biológicos (DING *et al.*, 2004). Esse ecossistema possui uma diversidade de microrganismos por se tratar de um ambiente rico e diversificado, que disponibiliza água e nutrientes para seu desenvolvimento (MICHEREFF *et al.*, 2005).

Nesse complexo, está inserida a rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes de plantas, com máxima atividade microbiana, que na maioria das vezes é enriquecida de substâncias provenientes do metabolismo vegetal, possibilitando a simbiose e manutenção da microfauna (RASCHE *et al.*, 2006; MELO e AZEVEDO, 2008; BERG e SMALLA, 2009).

Os microrganismos produzem substâncias ainda pouco conhecidas, o que desperta interesse devido a relação da biodiversidade microbiana com a produção de diversas biomoléculas de aplicação industrial (SOUZA *et al.*, 2004). Dentre os microrganismos produtores de moléculas bioativas, destacam-se as actinobactérias, um grupo diverso de bactérias Gram-positivas filamentosas que estão amplamente distribuídas na natureza, habitando preferencialmente o solo, e em especial a rizosfera (LACAZ *et al.*, 2002; VASCONCELLOS *et al.*, 2010). Este grupo de bactérias possui alto conteúdo de citosina e guanina (C+G) em seu DNA, apresentam morfologia variada de acordo com o gênero e se desenvolvem fisiologicamente como bactérias (LACAZ *et al.*, 2002).

O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica e econômica, devido o seu metabolismo de diversidade química, responsável pela produção de moléculas antibióticas tais como Rifampicina e Estreptomicina (HAYAKAWA; YOSHIBA; LIMURA, 2004), na ação em processos de ciclagem de matéria orgânica, na produção de biocombustíveis (MIAO; DAVIES, 2010), além da síntese de vitaminas, tais como Tiamina (Vitamina B1), Riboflavina (Vitamina B2) (HONGJUAN *et al.*, 2006), proteases, celulasas e xilanases (MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).

As actinobactérias são reconhecidas por seu potencial bioativo, entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade desses microrganismos no bioma Amazônia. Estudos sobre a diversidade funcional microbiana podem fornecer dados para a compreensão das funções exercidas pelas comunidades do solo, além do conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade, implicando em benefícios econômicos e estratégicos, como a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AMAZÔNIA E DIVERSIDADE MICROBIANA

O Bioma Amazônia é um dos mais importantes do mundo graças a sua rica biodiversidade e importância ambiental, abrangendo uma área de 4,2 milhões de km² (49,3% do território nacional brasileiro) contemplando os Estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Tocantins, Mato Grosso, Acre, Amapá, Rondônia e Roraima, com uma população em torno de vinte milhões de habitantes onde 60% vivem em áreas urbanas (IBGE, 2017).

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, estando concentrada principalmente na floresta Amazônica que é conhecida como um ambiente rico em flora e fauna com ampla diversidade genética. No entanto, pouco é conhecido sobre a biodiversidade microbiana (SOUZA et al., 2004).

Pesquisas com actinobactérias isoladas da região Amazônica já estão sendo realizadas, dentre elas 52 linhagens endofíticas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum Schum*) onde foi detectada atividade antimicrobiana de amplo espectro de ação, porém com maior efetividade no controle de fungos (MATSUURA, 2004).

Foram isolados 135 microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia, dentre eles 8 eram actinomicetos do gênero *Streptomyces*. E quando avaliados quanto à capacidade de sua atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias causadoras de doenças em animais (*Candida albicans*, e *Escherichia coli*) e plantas (*Phytophthora* sp), 65 isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos em teste (SMITH et al., 2008).

Souza et al. (2009) investigaram o potencial de substâncias produzidas por actinomicetos isolados da região Amazônica. Foram isolados 41 actinomicetos, dos quais, os 3 isolados produziram substâncias anti-fúngicas contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente.

2.2 SOLO RIZOSFÉRICO

O solo é uma matriz complexa, caracterizada por processos químicos, físicos e biológicos, fortemente influenciado por fatores ambientais, além de intensa atividade microbiana (DING et al., 2004). Este ecossistema oferece grande suporte para a manutenção da microfauna, tendo a diversidade microbiológica como sua principal característica.

Variadas espécies de microrganismos ocorrem em diferentes solos, porque é um *habitat* rico e diversificado que disponibiliza água e nutrientes necessários para o crescimento,

a proliferação e a sua sobrevivência (MICHEREFF et al., 2005). Neste complexo, a rizosfera é considerada uma região do solo bastante influenciada pelas raízes de plantas, com máxima atividade microbiana, que na maioria das vezes é enriquecida de substâncias provenientes do metabolismo vegetal. Assim, bactérias, fungos e plantas, vivem em um processo constante de simbiose (BERG e SMALLA, 2009). O solo presente na região radicular controla o desenvolvimento e crescimento das plantas e a associação com a microbiota da rizosfera exerce diversas atividades benéficas para a planta. Além disso, a rizosfera é importante para processos relacionados com as trocas de O₂ e CO₂, mineralização, nutrição da planta, gradientes de unidades do solo, nitrificação, simbiose, entre outros (EMBRAPA, 2012).

É na rizosfera que ocorre a maior concentração de nutrientes orgânicos oriundos das raízes, propiciando o desenvolvimento da microbiota. As raízes da planta exercem influência através da liberação de células mortas, mucilagens, exsudatos, açúcares, vitaminas, polissacarídeos, enzimas e outros compostos (MELO e AZEVEDO, 2008). Diante disso as alterações promovidas pela planta tem relação direta sobre os microrganismos presentes na rizosfera, de maneira que desempenham um papel importante no ciclo de vida da planta. Processos microbianos, ciclo geoquímico de minerais e patogênese ocorrem na rizosfera (KENT e TRIPLETT, 2002).

2.3 *Aniba parviflora* Syn *fragans* (MACACAPORANGA)

A espécie *Aniba parviflora*, conhecida popularmente como macacaporanga, tem como sinonímia *Aniba fragrans* Ducke, é uma espécie aromática, pertencente à família Lauraceae, nativa da Amazônia cujos ramos e a madeira, quando secos e transformados em pó são utilizados como sachês aromatizantes e em “banhos de cheiro”. É uma árvore de pequeno porte podendo atingir a altura de 15 m. O tamanho de suas folhas varia entre 8-17 cm de comprimento e 3-6,5 cm de largura e suas flores são geralmente pequenas. A madeira é amarelada e todas as partes da planta são aromatizadas. Esta planta é encontrada nos arredores de igarapés da floresta Amazônica ocidental, ocorrendo com frequência nas localidades de Santarém, Faro e médio rio Tapajós (REVILLA, 2002).

Segundo Mattoso (2005) dentre as Lauraceae, o gênero *Aniba* destaca-se na região amazônica. A mais conhecida dentre elas é a *Aniba rosaedora* popularmente denominada de pau-rosa, em função do óleo essencial extraído de seu lenho e largamente usado em aromas e fragrâncias por empresas de perfumaria internacionais. O gênero *Aniba* se destaca por apresentar espécies aromáticas de alto valor econômico, fornecendo óleos essenciais e

alcalóides empregados na perfumaria, cosmetologia e na fabricação de fármacos (MARQUES, 2001).

São descritas diversas classes de metabólitos secundários bioativos presentes no óleo essencial e extratos orgânicos de *Aniba parviflora* *Syn fragans* como taninos, compostos fenólicos de grande interesse para a indústria alimentícia devido sua ação antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante (MONTEIRO et al., 2005); saponinas, devido sua ação imunoadjuvante e hemolítica; e flavonoides, compostos aromáticos com variada ação biológica, entre as quais ação vasoprotetora, anti-inflamatória, anti-tumoral, e antioxidante (MONTEIRO et al., 2005; SOUZA, MELLO e LOPES, 2011). Metabólitos como os flavonoides e alguns compostos aromáticos originam-se em parte do caminho biossintético Acetil-SCoA que também produzem os macrolídeos, metabólitos secundários comumente encontrados no gênero *Streptomyces* (DEWICK, 2009).

2.4 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias são um grupo de bactérias Gram-positivas filamentosas, a maioria de vida livre (BORBA, 2016) ocorrendo frequentemente no solo, em especial na rizosfera, (VASCONCELLOS et al., 2010). Pertencem ao filo *Actinobacteria* um dos principais filos do domínio *Bacteria*, e dividido em seis classes: *Actinobacteria*, *Coriobacteriia*, *Acidimicrobiia*, *Rubrobacteria*, *Nitriliruptoria* e *Thermoleophilia*. A classe *Actinobacteria* contém 16 ordens, 55 famílias, 240 gêneros e centenas de espécies (BARKA et al., 2016; TORTORA et al., 2016; LAWSON, 2018).

Os representantes do filo *Actinobacteria* são amplamente distribuídos na natureza, habitando os ambientes aquáticos e terrestres. No solo incluem simbioses de fixação de nitrogênio e comensais associados a plantas. Entre os *habitats* também integram locais mais extremos, como sedimentos de águas profundas, solos áridos no deserto e foram encontradas no corpo humano sendo membros importantes da microbiota (OLIVEIRA et al.; TRAXLER e KOLTER, 2015; LAWSON, 2018).

Compreendem um grupo diversificado de microrganismos classificados taxonomicamente através de sua morfologia, coloração do micélio, composição e estrutura do peptídeoglicano, arranjo de conidiósporos, porcentagem de G+C, sequência de 16S rDNA, composição fosfolipídica da membrana celular e resistência dos esporos ao calor (OLIVEIRA, 2003).

Este grupo de bactérias apresenta morfologia variada de acordo com o gênero, sendo em sua maioria aeróbias e de crescimento relativamente lento. Desenvolvem-se semelhante aos fungos, na forma de hifas, porém estas estruturas apresentam diâmetros menores, se assemelhando de forma fisiológica com as bactérias (LACAZ et al., 2002). A formação destas hifas é característica deste grupo, sendo que o micélio vegetativo se desenvolve no interior do substrato, o qual é responsável pela sustentação e adsorção de nutrientes. Este fenômeno ocorre através da liberação de enzimas extracelulares que degradam compostos utilizados para sua nutrição (MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011; LIMA, SILVA e ARAÚJO, 2013).

Seu crescimento em meio favorável inicia-se pela formação de um tubo germinativo que se ramifica formando o micélio vegetativo cenocítico ramificado (fase nutritiva), seguido pela formação do micélio aéreo multicelular (fase reprodutiva). Nesta fase, ocorre a formação de algumas hifas que sofrem metamorfose originando a cadeia de esporos unicelulares (OLIVEIRA, 2004).

As actinobactérias podem exibir diferentes características micromorfológicas, como cocoide em *Micrococcus*, cocobacilo em *Arthrobacter*, fragmentação de hifas em *Nocardia spp.* ou micélio ramificado altamente diferenciado como visto em *Streptomyces spp.* Em relação a morfologia são semelhantes a fungos filamentosos, porém se diferenciam quanto a constituição da parede celular e reprodução. A parede celular destas bactérias filamentosas é formada por isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP) ou ainda por ácidos diamino, como lisina, ornitina ou butírico que possui a característica dos organismos procarióticos, em relação a reprodução ocorrem por meio de esporulação (BARKA et al., 2016; SILVA, 2016; LAWSON, 2018).

Segundo Barka et al (2016) a grande maioria das actinobactérias que habitam o solo são organismos saprófitas e influenciados diretamente pela umidade do solo, temperatura e pH. Possuem um crescimento ótimo principalmente em pH neutro e temperaturas entre 25 e 30°C, mas os representantes termófilos podem crescer em temperaturas que variam de 50 a 60°C. Em relação ao crescimento vegetativo das actinobactérias no solo há o favorecimento pela baixa umidade, principalmente se os esporos são submersos na água.

Possuem um metabolismo que utiliza diferentes fontes de carbono e energia, sendo assim é possível encontrar exemplares autotróficos, heterotróficos ou quimiotróficos. Por serem tão diversificados, apresentam várias propriedades fisiológicas, como a produção de numerosas enzimas extracelulares de interesse industrial, por exemplo, amilases, lignases, lipases, pectinases, quitinases e xilanases; além de milhares de produtos metabólicos antibióticos, como cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina, neomicina, nistatina e

tetraciclinas; agentes antitumorais como a actinomicina D; aminoácidos e vitaminas B1 e B2 (NERYS, 2015; SANTANA, 2015; SMITH *et al.*, 2015; SILVA-LACERDA *et al.*, 2016; REMALI *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017; BENHADJ *et al.*, 2018).

As actinobactérias desempenham também um papel como simbioses e como patógenos em comunidades microbianas associadas a plantas, sendo promotores no crescimento de plantas, resistência a doenças, no controle biológico (NGUYEN *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2017) e atividade herbicida de actinobactérias endofíticas (SINGH *et al.*, 2017). Além disso os actinomicetes, destacando o gênero de *Streptomyces*, sendo uma opção para biossorção ou adsorção de metais pesados, com baixo custo e alta eficiência de tratamento (SAHMOUNE, 2018).

De acordo com Barka *et al.* (2016) actinobactérias produzem a maioria dos antibióticos que ocorrem naturalmente, sendo que os primeiros antibióticos descobertos em 1940 denominada actinomicina de uma cultura de *Streptomyces*. Atualmente cerca de 80% de diversas classes de antibióticos clínicos são produzidas por actinomicetos.

Essas actinobactérias possuem metabolismo rico e, frequentemente, produzem metabólitos secundários de ampla diversidade química, os quais atraem o interesse de diversas indústrias (SOARES *et al.*, 2012). O gênero *Streptomyces* se destaca como mais promissoras para produção de diferentes classes de antibióticos, além de agentes antitumorais e produtores de enzimas de importância industrial (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Dentro da ordem *Actinomycetales*, o gênero *Streptomyces* é considerado o de maior importância, por conter um grande número de espécies que produzem compostos bioativos de importância industrial (MANSUR, 2003).

2.5 O GÊNERO *Streptomyces*

Streptomyces é um gênero de bactérias Gram-positivas que cresce em vários ambientes, preferencialmente no solo, possui forma filamentosa semelhante a fungos, contudo sua diferenciação morfológica envolve a formação de uma camada de hifas geralmente com diâmetro entre 0,5 e 1,0µm que pode se diferenciar primeiramente, nas estratégias reprodutivas, que levam à formação de uma variedade de estruturas de esporos (DUARTE, 2009).

Outra característica marcante do gênero é a de possuir um desenvolvimento multicelular complexo, onde os esporos germinam para formação das hifas, com micélio aéreo multinuclear, que forma septos em intervalos regulares, formando uma cadeia de

esporos uninucleados (OHNISHI et al.,2008). Quando o esporo encontra condições ideais como nutrientes, temperatura favorável e umidade, forma o tubo germinativo e a partir dele as hifas. Posteriormente surgem as hifas aéreas e o crescimento e ciclo celular. Outro ponto a ser destacado é a extremidade da hifa considerada como sendo a região mais importante, onde proteínas de membranas e lipídeos podem ser secretados e reunidos especialmente na zona apical de crescimento (FLARDH e BUTTNER, 2009).

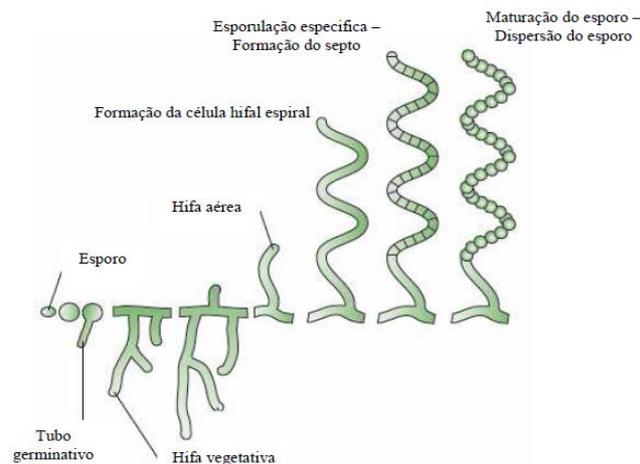


Figura 1: Ciclo de vida do *Streptomyces* (adaptado de Flardh, 2009;Chater; Merrick,1979).

As extremidades do cromossomo de *Streptomyces* apresentam telômeros com proteínas ligadas covalentemente, permitindo assumir forma circular sob condições naturais ou em laboratório. Essas regiões terminais possuem sequências repetitivas que codificam principalmente funções relacionadas à regulação, secreção, diferenciação, transporte e biossíntese de antibióticos (SALAMONI, 2010).

A morfologia das colônias de *Streptomyces* pode variar de acordo com a espécie, e geralmente são lisas, apresentando micélio aéreo e vegetativo. Os *Streptomyces* são importantes por causa da sua ampla taxa de metabólitos e processos de biotransformação, além de possuírem a capacidade de degradar lignocelulose e quitina e ainda sendo fundamentais nos ciclos biológicos da matéria orgânica (BENTLEY et. al., 2002).

A produção da maior parte das substâncias antimicrobianas é específica de cada espécie, pois conferem diversos mecanismos de sobrevivência como competitividade a outros microrganismos no ambiente em que vivem. Outro processo importante envolvendo a produção de antibióticos é a simbiose entre *Streptomyces* e plantas, enquanto o antibiótico

protege a planta contra fitopatógenos, a planta fornece exudatos para o desenvolvimento do *Streptomyces* (PROCÓPIO et al., 2012).

Estes microrganismos produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela coloração do micélio sob o substrato e micélio aéreo. A temperatura ideal de crescimento varia de 25 a 35 °C, sendo que algumas espécies são psicrófilas e termófilas. O pH para crescimento varia entre 6,5 a 8,0 (MARCON, 2002).

O gênero *Streptomyces* é conhecido por produzir inúmeros metabólitos secundários bioativos, antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, imunossupressores e principalmente antibióticos continua sendo considerado uma fonte de produção de metabólitos bioativos (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; KHAN, 2011).

Este gênero é capaz de produzir cerca de 39% dos metabólitos produzidos por microrganismos já conhecidos, sendo que, 73% possuem atividade antibiótica. Entre os produtos naturais provenientes desse gênero, as classes mais comuns são: os macrolídeos (eritromicina 1), antraciclina (doxorubicina 2), poliéteres (salinomicina 3), aminoglicosídeos (kanamicina 4), estreptotricinas (estreptotrisamina 5), actinomicinas (dactinomicina 6), lipodepsipeptídeos (daptomicina 7), tiopeptídeos (tioestreptona 8) e peptídeos quinoxalinos (echinomicina 9) (BÉRDY, 2012).

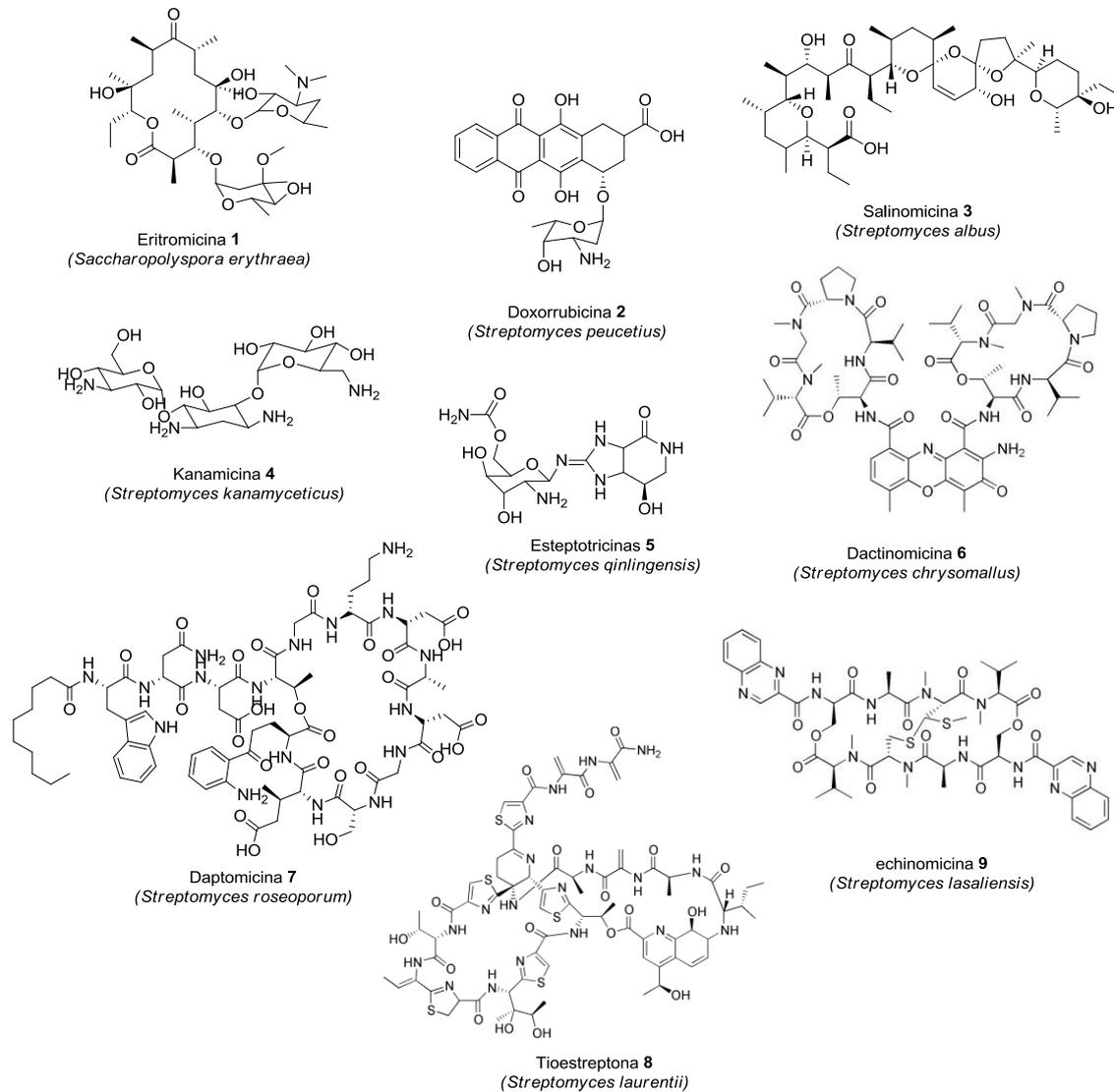


Figura 2- Estrutura molecular dos metabólitos secundários produzidos por actinobactéria do gênero *Streptomyces*.

2.6 METABOLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS

Os metabólitos secundários são sintetizados frequentemente ao final da fase de crescimento ou durante a fase estacionária, pois esses compostos não são essenciais ao crescimento do microrganismo (INOUE, 2006). Estas substâncias exercem efeito regulatório ou modulador, atuam em interações de antagonismo e sinergismo entre microrganismo, plantas e animais. Estes compostos conferem vantagens competitivas ao organismo produtor, podem também exercer função de molécula sinalizadora (BERDY, 2005).

Além das plantas, os microrganismos representam uma rica fonte de metabólitos bioativos e têm gerado importantes produtos para a indústria farmacêutica, dentre eles:

agentes antibacterianos β -lactâmicos, como a penicilina G e cefalosporina C, as tetraciclina, os aminoglicosídeos como a estreptomicina, os macrolídeos como a eritromicina, os glicopeptídeos como a vancomicina, os lipopeptídeos como daptomicina, os agentes imunossupressores como ciclosporina, os agentes hipolipêmicos como a lovastatina e os fármacos antihelmínticos e antiparasitários como a ivermectina (CRAGG, 2013).

O metabolismo secundário de actinobactérias é regulado por diferentes fatores físico-químicos, tais como a limitação nutricional (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fósforo), de oxigênio, temperatura, taxa de crescimento, controle por *feedback*, inativação ou indução (SALAMONI, 2010). Cerca de 47% dos metabólitos microbianos, aproximadamente 33000 compostos, apresentam algum tipo de atividade biológica, sendo que cerca de 28000 compostos, são antibióticos convencionais. As actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas como grandes produtoras de metabólitos bioativos, produzindo cerca de 39% de todos os metabólitos microbianos (BÉRDY, 2012).

O gênero *Streptomyces* é o de maior importância biotecnológica dentro deste grupo, pois é responsável pela produção de grande parte dos antibióticos já conhecidos e por produzir diversas enzimas de aplicação industrial (DING et al., 2004; LIRAS e MARTÍN, 2005; MADIGAN et al., 2010).

As enzimas presentes no solo são predominantemente de origem microbiana, especialmente as celulasas, xilanasas, quitinasas, amilases, pectinasas, as quais atuam na degradação de diversos compostos orgânicos, na geração do húmus e mineralização de nitrogênio e fósforo. Enzimas produzidas por actinobactérias são uma importante fonte de biodegradação e apresentam ainda a capacidade de agir sobre compostos orgânicos complexos de azoto, esteróides, borrachas e parafinas (MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).

Muitos dos antibióticos conhecidos, incluindo aqueles de importância médica tais como a estreptomicina, neomicina, cloranfenicol entre outros, além de um impressionante número de novos compostos com potencial para o combate de sérias doenças são produzidos por actinomicetos do gênero *Streptomyces* (OMURA et al., 2001). Outras substâncias importantes produzidas por isolados deste gênero incluem enzimas, agentes anti-tumorais, agentes antifúngicos, inseticidas, acaricidas e anti-helmínticos (STROBEL et al., 2004).

Existem espécies de *Streptomyces* que produzem mais de um tipo de antibiótico, bem como existem espécies de diferentes *habitats* que podem produzir o mesmo antibiótico. Essa diversidade dos metabólitos produzidos é devido ao tamanho do seu genoma e por apresentarem centenas de fatores de transcrição que controlam a expressão gênica (HOPWOOD, 1985).

A produção de antibióticos em bactérias sempre ocorre após a fase exponencial de crescimento celular. As poucas células presentes no início do crescimento produzem um nível de inibição do antibiótico na fase inicial, onde as fontes de nutrientes são direcionadas para a produção de biomassa. Assim, o gênero *Streptomyces* geralmente produz antibióticos na fase estacionária ou em baixa taxa de crescimento (INOUE, 2006).

Dados encontrados na literatura têm sugerido que alguns antibióticos foram originados como moléculas sinais, podendo induzir mudanças na expressão de alguns genes que não estão relacionados a uma resposta ao stress (CHATER et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Isolamento e atividade antimicrobiana dos compostos do extrato acetato etílico de actinobactéria do gênero *Streptomyces* sp. MPO11 isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora syn fragans* (macacaporanga) da Amazônia.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar uma actinobactéria de solo rizosférico da Amazônia através de técnicas clássicas de isolamento e cultivo;

- Identificar a linhagem isolada através de métodos clássicos e moleculares.

- Avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial enzimático da linhagem e do extrato acetato etílico oriundo de actinobactéria selecionada.

- Obter o perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho do extrato acetato etílico oriundo de *Streptomyces*.

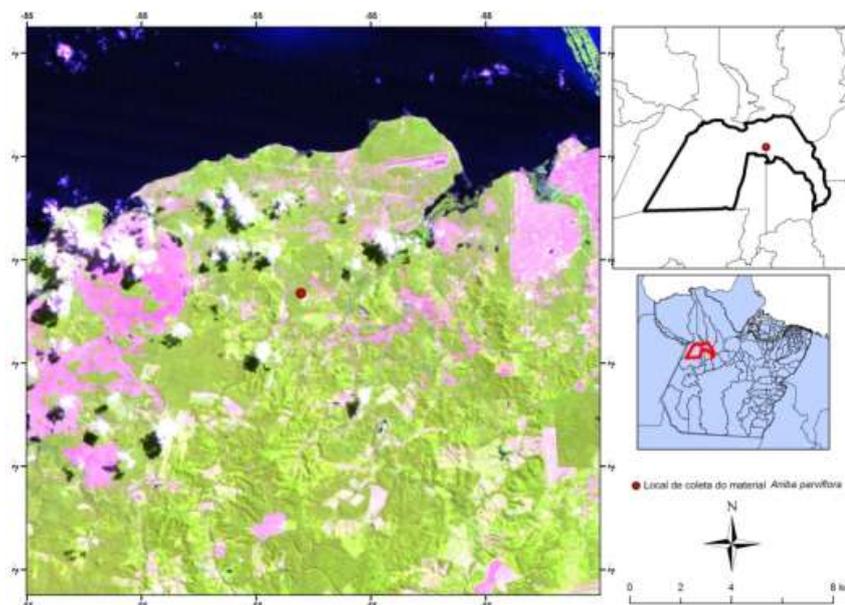
- Desenvolver um método de isolamento e identificar os compostos bioativos majoritários do extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE COLETA DO MATERIAL

Foi coletado o solo da rizosfera de uma espécie adulta de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (macacaporanga) nativa de uma área de transição entre floresta densa e savana na Amazônia. A coleta foi realizada durante a estação seca (2°28'S e 54°49'W) em Santarém - PA (Figura 3). A amostra de solo foi recolhida com o auxílio de uma espátula estéril à uma profundidade de 20 cm da região da planosfera, profundidade caracterizada como rizosfera.

Figura 3- Mapa de coordenadas geográficas do ponto de amostragem do solo rizosfera de *Aniba parviflora* *syn* *A. fragans* (macacaporanga) (Latitude 2°28'01.28"S Longitude 54°49 '45.32).

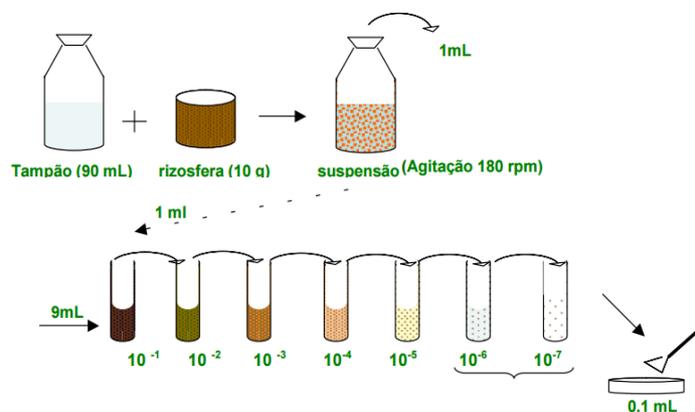


4.2 ISOLAMENTO DAS LINHAGENS DE ACTINOBACTÉRIAS

Dez gramas de solo foram adicionados a 90 mL de tampão de fosfato (PBS) esterilizado à pH 7.2 e agitado durante 30 min para obtenção da suspensão microbiana. A linhagem de actinobactéria foi obtidas pelo cultivo de solução microbiana realizada pela técnica de micro diluição seriada, em tampão fosfato, nas concentrações 10^{-1} até 10^{-5} ($\mu\text{g/mL}$) (Figura 4). Para o isolamento foi utilizado o meio Arginina Levedura Agar – ALA (L-Arginina 0,3 g, Glicose 1 g, Glicerol 1 g, K_2HPO_4 0,3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, NaCl 0,3 g, Extrato de Levedura 1 g, Solução de Sais 1 ml ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1g,

ZnSO₄.7H₂O 0,1g, Água Destilada 100 mL, pH= 7,0-7,4), Ágar 17 g, pH= 6,4, Água Destilada 1L) segundo NONOMURA e OHARA, 1969), à partir das cinco diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) e para inibir o crescimento de fungos filamentosos foi adicionado no meio ALA o antifúngico Nistatina (100µg/mL). Após semeadura de 100µL das diluições no meio, as placas foram acondicionadas em estufa por um período entre 14 e 21 dias a 37°C, sendo diariamente observada a característica das colônias para seleção das colônias de actinobactérias.

Figura 4- Esquema da diluição seriada do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga).



Os aspectos morfológicos utilizados, como parâmetro, para selecionar a colônia bacteriana foram: colônias aderidas ao meio, protuberância no entorno das colônias, o mesmo afunda-se; colônias normalmente enrugadas, secas e não viscosas, micro hifas, excreção de pigmentos restrito ao meio ou difuso no micélio aéreo.

A actinobactéria isolada foi nomeada MPO11, e foi transferida para placas de Petri contendo o meio ISP-2 (Extrato de Levedura 4 g, Extrato de Malte 10 g, Glicose 4 g, Ágar 15 g e Água destilada 1 L, pH= 7,2) (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) e posteriormente purificada nos meios ISP-2 e ISP-3 (Farinha de Aveia 20g, Solução traços de sais 1mL, Ágar 15g e Água destilada 1L, pH 7,0 – 7,4) incubadas por 7 dias à 37°C até a obtenção de culturas puras.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

4.3.1 Caracterização Macromorfológica - Cultivo

Para avaliar as características dos aspectos culturais da linhagem foi determinada durante o cultivo nos meios de cultura ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ALA, BDA, SDA, AN, TSA à 30°C durante 20 dias. Foram avaliados a formação de micélio vegetativo e aéreo, a coloração das colônias, sua forma e produção de pigmentos solúveis. O meio ISP-9 foi utilizado como base para determinar a utilização de diferentes fontes de carbono como recomendado por (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966).

4.3.2 Caracterização micromorfológica - Microcultivo

Para análise microscópica, foram utilizadas as técnicas de microcultivo (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966) e coloração de Gram. A linhagem MPO11 fora cultivada em caldo ISP-2 (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) à 30°C por 48 h sob agitação de 180 rpm, e uma alíquota da cultura foi utilizada para preparação do esfregaço bacteriano em lâmina de vidro e assim realizar a identificação morfológica através do método de coloração Gram.

Para o microcultivo foi realizado uma semeadura em estria larga no centro da placa de Petri contendo meio ISP-2, que posteriormente, foram inseridas lamínulas em posição vertical sobre a estria, formando um ângulo de aproximadamente 45°. As placas foram mantidas em estufa a 30°C por 14 dias, e posteriormente, foi removida a lamínula e disposta em uma lâmina de vidro (26 x 76 mm) para observação microscópica do micélio aéreo (PRIDHAM et.al., 1958; HOLT et al., 1994) Através de análise por microscopia óptica de luz comum com um aumento de 400x e microscopia eletrônica de varredura (LEO5410LV) em 10kV.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.4.1 Extração de DNA bacteriano

O DNA bacteriano foi extraído conforme descrito por Stirling em 2003. Cerca de 5 ml de suspensão celular ($OD_{600} > 1.8$) foi centrifugada à 16.000 rpm por 4 min. Após a centrifugação foi acrescentado ao precipitado 400 µL da Solução A (2% TrionX-100, 1% SDS, 0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCL (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)), 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm (Sigma Z763721-50EA) e 100 µl de Fenol:Clorofórmio (Invitrogen - 15593-049); e deixado sob agitação por 3 minutos.

Após a agitação foi acrescentado 400 µl de tampão TE (1mM Tris-HCl (pH 8.0) e 1mM EDTA (pH 8.0)), suspensão homogeneizada e submetida à centrifugação por 5 minutos à 16000 g. Sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 1 ml de etanol absoluto. Centrifugado à 16.000 g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 400 µl tampão TE. Após adicionar 10 µl de Acetato de Potássio (4M) e 1 ml de etanol absoluto seguida de centrifugação a 16.000 g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água ultra pura.

4.4.2 Condições da PCR

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima Platinum®.Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen 11304-011) seguida as recomendações do fabricante. As reações de amplificação foram feitas na Bioneer MyGenie 96 Thermal block (Global Genomics Partner) sob as seguintes condições: para o par de oligonucleotídeos Eub338F/Act1159R 95°C por 3'; 35 ciclos de 94 °C (30''), 68 °C (30''), 72 °C (90''); extensão de 72 °C (7') (FIERER et al., 2005). E para o par fd1/rD1 95°C por 3'; 30 ciclos de 94 °C (1'), 55 °C (30''), 72 °C (2'); extensão de 72 °C (7').

4.4.3 Sequenciamento, análise e anotação das sequências

Produto da PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034- 70) e subclonado no vetor pCRTM2.1-TOPO® utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisher Scientific 451641). O plasmídeo clonado foi propagado em E. coli DH5- alpha e purificado utilizando o kit (Fermentas K0503). Todos os procedimentos foram feitos seguindo as recomendações dos fabricantes. Para o sequenciamento foi utilizado os primers M13F (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os fragmentos subclonados no vetor pCRTM2.1-TOPO®. Para o completo sequenciamento do 16S rRNA foi utilizado os oligonucleotídeos (LANE, 1991) 341- 357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAATACGTA- GA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). O sequenciamento Sanger foi realizado com o ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, Applied Biosystems/Hitachi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (<http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/>). As sequências foram analisadas no programa CLC Main Workbench versão 7.0. Para anotação os contigs foram comparados contra o banco de dados BLAST.

4.5 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA

Após a confirmação do gênero *Streptomyces sp.* através da análise molecular o isolado foi cultivado em meio ISP9 para determinar a utilização de diferentes fontes de carbono (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966). As fontes de carbono testadas foram D-frutose, D-lactose, D-manose, D-melezitose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose, manitol, D-sacarose, trealose, celulose, D-glicose, inositol e D-sorbitol. O meio de cultura consistia de ágar basal de sais minerais e foi esterilizado em autoclave à 105°C durante 10min. A actinobactéria foi semeada em estrias e as placas encubadas à 30°C por 15 dias. Posteriormente foi analisada a utilização da fonte de carbono, comparando com controle positivo (fonte de carbono a ser testada) e controle negativo (sem nenhuma fonte de carbono).

A utilização de diferentes fontes de nitrogênio foi realizada de acordo com (WILLIAMS, SHARPE e HOLT, 1989). As fontes testadas foram: arginina, cisteína, fenilalanina, histidina, L-metionina, L-serina, L-treonina, L-valina, L-asparagina, L-glutamina, L-ornitina e L-tirosina. O meio de cultura basal foi esterilizado em autoclave à 121°C durante 15min, e utilizado controles positivo (meio basal suplementado com 0,1% de L-asparagina) e negativo (somente meio basal). Como controle de pH foi utilizado o azul de bromotimol a 0,3% possibilitando uma melhor análise, observando não haver alteração da coloração do meio quando a actinobactéria utiliza a fonte de nitrogênio testada comparado com o controle positivo, diferente do controle negativo no qual ocorre a alteração da coloração do meio.

O crescimento da actinobactéria em diferentes concentrações de NaCl (cloreto de sódio) foi testada após semeadura em 7mL de meio Brain Heart Infusion líquido (BHI) contendo NaCl nas concentrações 2, 5, 7, 9 e 10% incubadas à 30°C durante 14 dias. Posteriormente foi avaliado se houve o crescimento da actinobactéria no meio com o sal nas diversas concentrações, considerando assim o resultado positivo nas concentrações em que se desenvolveu sendo tolerante. O sistema foi realizado em triplicata e encubado por 14 dias.

4.6 PROSPECÇÃO DE ENZIMAS

4.6.1 Produção de Proteases

Para determinar a produção de enzimas proteolíticas, caseinase e gelatinase da actinobactéria, foi realizada utilizando meio sólido contendo caseína e gelatina como

substrato indutor. A degradação da caseína foi observada em placas contendo o meio composto de base de Solução 1 (10g leite desnatado, 90mL Água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97mL Água destilada). Após 14 dias de incubação, a formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A avaliação de produção de gelatinase foi realizada com o cultivo da bactéria em tubos de ensaio contendo o Meio ágar nutriente acrescido de 12% de gelatina a 37°C por 7 dias. Posteriormente os tubos foram incubados sob refrigeração entre 4 e 10°C e então foi verificado o estado do meio, que quando liquefeito indicou a positividade do teste.

4.6.2 Produção de amilase

Para determinar a produção de amilase a actinobactéria foi inoculada na forma de spots em triplicata no meio de cultura Agar-amido (5g Digestão péptica de tecido animal, 5g NaCl, 1,5g Extrato de carne bovina, 1,5g Levedura, 2g Amido solúvel, 15g Ágar, 1,5g Ácido glu-âmico, 1000 mL Água destilada, pH 7,4), e incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Posteriormente foram adicionados 10mL da solução de lugol a 1% nas placas, e a descoloração do meio em torno da colônia, resultante da hidrólise do amido indicou a produção da enzima (KUPIECKI e COON, 1957).

4.6.3 Produção de Catalase

Já para determinar a produção de catalase, a actinobactéria foi cultivada em meio de cultura NB (8g Caldo nutritivo, 15g Ágar, 1000 Água destilada)(MARIANO et al., 2000) e incubada em estufa por 10 dias a 28°C. Após esse período, amostras das colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina para lâminas de microscopia estéreis e adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A formação de bolhas imediatamente após a adição do peróxido de hidrogênio, indicou a positividade do teste.

4.6.4 Produção de Lipase

Para avaliar a produção de lipase e esterase, a linhagem de actinobactéria foi inoculada na forma de spots em triplicata, em meio contendo (10g Peptona, 5mL NaCl, 10mLTween 80 [10mLTween 80 e 40mL Água destilada], 15g Ágar, 1000mL Água destilada) (SIERRA, 1957). Para avaliação da esterase o meio base foi o mesmo citado anteriormente, modificando a fonte de carbono para Tween 20. Após incubação em estufa a 28°C por 10 dias. A observação de um halo branco difuso constituído de precipitados de oleato de cálcio indicou a presença da enzima.

4.6.5 Produção de Pectinase

A produção de pectinase foi avaliada em meio ágar TSA (1,5 g triptona, 0,5 g peptona de soja, 1,5 g NaCl, 1,5 g de ágar, pH 7,3) suplementado com 1% de pectina cítrica. As placas foram incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Posteriormente, foram adicionados 10mL da solução de lugol a 1% nas placas e a descoloração do meio em torno da colônia resultante da hidrólise da pectina cítrica, indicou a produção da enzima.

4.6.6 Produção de L-glutaminase

A produção da enzima L-glutaminase foi avaliada segundo (BALAGURUNATHAN, RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010) após cultivo em ágar glutamina as placas foram incubadas à 28°C por 7 dias e a produção da enzima foi indicada através da variação e intensidade da cor amarelo para rosa.

4.6.7 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi analisada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado e incubadas à 30°C por 7 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

4.7 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

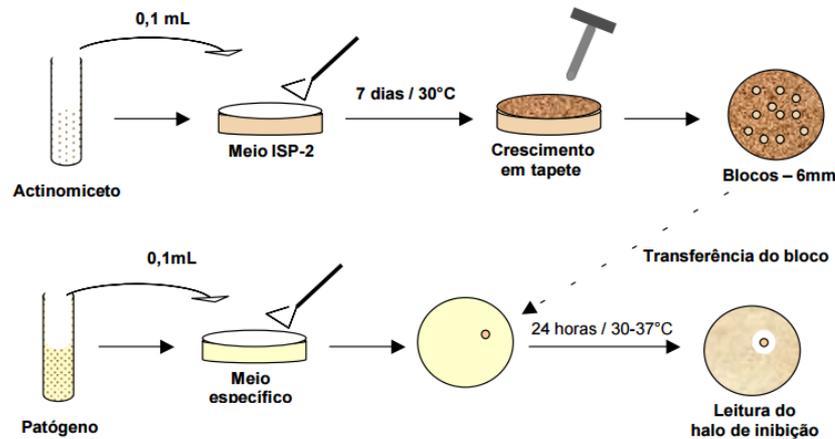
A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana da linhagem de *Streptomyces sp.* MPO11 foi primeiramente realizada pelo método do bloco de gelose (Figura 5), (ICHIKAWA et al., 1971). Após o cultivo da linhagem em meio ISP2, à 30°C por 7 dias, foram recortados blocos de ágar circulares de 6 mm de diâmetro das placas contendo colônias da actinobactéria e dispostos em placa de Petri (15mmx90mm) contendo Ágar Müller-Hinton (MHA) para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) para fungos, previamente semeadas com 100 µL da respectiva suspensão microbiana. As suspensões foram ajustadas a 0,5 da Escala de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC/ml e 10^4 esporos/mL, de bactérias e fungos, respectivamente. O antagonismo microbiano foi avaliado contra os microrganismos patogênicos (Tabela 1).

Tabela 1- Microrganismos utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana (Ichikawa, Ishikura e Ozaki, 1971).

MICROORGANISMOS TESTE	
<i>Bactérias gram-positivo</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA02)
	<i>Staphylococcus epidermides</i> (UFPEDA183)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (UFPEDA800)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA138)
	<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA86)
<i>Bactérias gram-negativo</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> (UFPEDA348).
	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA224).
	<i>Proteus mirabilis</i> (UFPEDA767).
	<i>Salmonella enteritidis</i> (UFPEDA415).
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA416).
<i>Fungos leveduriformes</i>	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA1007)
	<i>Candida krusei</i> (UFPEDA1002)
	<i>Candida</i> sp.
	<i>Postia placenta</i>
	<i>Polyporus sanguineus</i>
<i>Fungos filamentosos</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Fusarium</i> sp. (F101)

*UFPEDA – Coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Figura 5- Esquema da metodologia utilizada no ensaio “bloco de gelose” (Ichikawa, Ishikura e Ozaki, 1971).



As placas foram incubadas à 37°C (bactérias) e à 30°C (Fungos). O efeito antagônico foi revelado com o aparecimento de halos de inibição de crescimento microbiano em volta dos blocos contendo a actinobactéria após 24h (bactérias), 48h (leveduras) e 96h (filamentosos). Foi aferido os halos em milímetros nas três repetições e registrado em foto os resultados.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casual com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade

4.8 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.8.1 Cultivo submerso

Para a produção dos metabólitos antimicrobianos foi realizado um processo de cultivo submerso em dois meios diferentes: M1 e MPE e assim avaliar qual destes seria o melhor para a produção dos metabólitos e em quais condições físico-químicas. O pré-inóculo é o primeiro passo do processo, que consiste em uma fase de ativação da bactéria, onde foram utilizados erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio de cultura ISP2 líquido e adicionados três blocos de 6mm de diâmetro contendo a cultura da actinobactéria, crescida previamente no meio ISP2 à 30°C por 14 dias. Os frascos foram mantidos em agitação de 180 rpm em incubadora rotatória à 30°C por 48h. Posteriormente 10% do volume do pré-inóculo correspondente foi transferido para erlenmeyers de 1000mL contendo 250mL dos meios de culturas M1 e MPE em cada vidraria, os quais foram mantidos sob as mesmas condições,

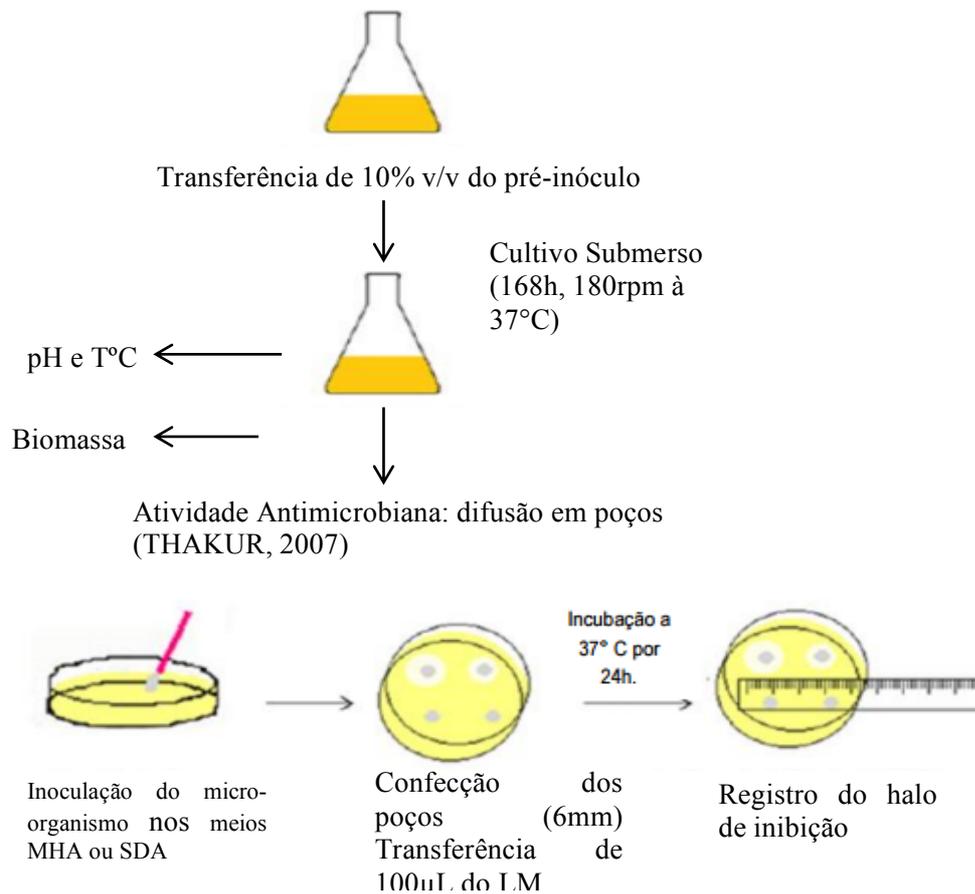
assim realizando o processo de cultivo submerso durante 168h (Figura-6).

Para avaliação da atividade antimicrobiana, o líquido cultivado foi coletado à cada 24h do processo, centrifugado (Mod: EEQ-9004/B/Marca: Edutec) à 180rpm, durante 10 minutos para obtenção da biomassa e do sobrenadante do qual foi retirado uma alíquota de 1 mL, filtrado em membrana de acetato de celulose (0,22 μm de porosidade) para a realização da atividade antimicrobiana, que foi testado através do método de difusão em poço (BAUER et al., 1966). Onde foram dispensados o volume de 100 μL do líquido metabólico dispostos em poços de 6 mm de diâmetro previamente confeccionados nos meios de cultura MHA e SDA, vertidos em placas de Petri (95mmx15mm) semeadas com 100 μL da suspensão microbiana, para o teste antibacteriano e antifúngico, utilizando as cepas que foram consideradas ativas no ensaio de triagem inicial. As placas foram mantidas à 37°C e 30°C para bactérias e fungos, durante 24h, 48h e 96h respectivamente. O halo de inibição foi registrado em milímetros nas três repetições e registro fotográfico das placas. A atividade antimicrobiana foi detectada pela presença de zonas de inibição em volta dos poços contendo o líquido metabólico, a qual foi expressa em milímetros.

A avaliação dos parâmetros físico-químicos como: temperatura, pH e biomassa foram registrados durante todo o período de fermentação visando a padronização do método de produção do antibiótico. Para isso, diariamente o líquido fermentado foi transferido para tubos de falcon (14mL) e submetido à centrifugação (Mod: EEQ-9004/B/Marca: Edutec) à 180rpm/10min para separação da biomassa (precipitado) e sobrenadante. A biomassa precipitada foi quantificada à partir do peso úmido em balança analítica (Mod: AUY220/Marca: Shimadzu), desprezando o peso (g) dos tubos e registrada. Já para aferição do pH e da temperatura durante todo o processo foi utilizado o pHmetro de bancada e termômetro (Mod:LUCA-210). O processo de cultivo submerso foi otimizado, levando em consideração os parâmetros avaliados para a obtenção dos metabolitos microbianos e assim obter um rendimento maior destes.

Adotou-se um delineamento experimental inteiramente casual com 3 repetições sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Figura 6- Esquema do processo de cultivo submerso



4.9 EXTRAÇÃO DO METABÓLITO ANTIMICROBIANO

O líquido cultivado foi centrifugado e o sobrenadante filtrado à vácuo com o auxílio de membrana de acetato celulose de 0,22µm de porosidade para a obtenção do líquido metabólico, livre de células, o qual foi submetido a extração líquida dos metabólitos secundários utilizando o solvente orgânico de média polaridade, acetato de etila na proporção de 2:1 (v:v) repetindo o processo por três vezes consecutivas, com o auxílio de um funil de decantação (500mL) sob agitação manual, onde era possível observar a presença de duas fases imiscíveis, denominadas: fase orgânica (metabólitos + solvente) e fase aquosa (resíduos do cultivo submerso) A fase orgânica é a que contem os metabólitos microbianos e a fase aquosa é a que contém o meio de cultura utilizado no cultivo.

A fase orgânica da extração foi concentrada em evaporador rotativo à 40°C para a obtenção do extrato bruto. A fase aquosa foi utilizada para o teste de atividade antimicrobiana por difusão em poço (BAUER et al., 1966), nas mesmas condições citadas acima para determinar a eficiência o método de extração e obtenção dos metabólitos de interesse.

4.10 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

O extrato bruto foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima (CMI) pela técnica de microdiluição conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). Em uma microplaca estéril de 96 poços foram dispensadas diluições do extrato bruto.

Previamente, foi preparado uma solução à 10.000 µg / ml a partir dos extrato bruto solubilizado, na proporção 80:20 H₂O:ACN respectivamente, no meio de cultura líquido (MC) a 5% de DMSO. Foram distribuídos 100µL de meio de cultura líquido Mueller Hinton (MH) nos poços e em seguida adicionados 100µL do extrato nos poços das colunas 1 a 9 e realizada a microdiluição sucessivamente nas linhas de A até H, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 µg/mL) realizado assim em triplicata. Após a diluição, em cada poço foi adicionado com 10µL do inóculo microbiano padronizado, sendo que nas colunas 11 e 12 nas linhas de A a C foram dispensados 100µL do respectivo meio de cultura líquido e em seguida adicionado 10µL do inóculo microbiano para o controle de viabilidade do inóculo (Controle positivo do inóculo – C+).

Os poços das colunas 11 e 12 nas linhas D e E não receberam o inóculo, apenas o meio de cultura líquido, sendo este o controle de esterilidade do meio (controle negativo; C-). Os poços da coluna 10 receberam 90µL do meio de cultura, 10µL do extrato, controle de viabilidade do extrato. Nas colunas 11 e 12, linhas F, G e H foram dispensados 100 µL da solução de antibiótico padrão Ciprofloxacino [5µg/mL], e em seguida foi adicionado 10µL dos inóculos microbiano (Controle positivo – C+).

Após o período de cultivo à 37°C (bactérias) por 24h, e 30°C (leveduras) por 48h e 30°C (fungos filamentosos) por 96h, as microplacas foram reveladas com 15 µL da solução de Resazurina a 0,01% e incubadas por 3 horas nas mesmas condições descritas anteriormente. A resazurina é um corante indicador de óxido-redução, onde a manutenção da cor azul é interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, ocorrência de crescimento.

A mudança de coloração dos poços inicialmente azul, contendo as diferentes concentrações do extrato para rosa indicou negatividade do teste, e a permanência da

coloração azul indicou a positividade. Nos poços de controle a permanência da cor azul indicou ação antimicrobiana e a mudança de coloração para rosa indicou a viabilidade do inóculo.

A CMI é definida como a menor concentração do antibiótico que inibe parcialmente o crescimento do microrganismo teste. A Concentração mínima fungicida ou bactericida foi determinada pela subcultura dos poços azuis da CMI em placa de Petri contendo o respectivo meio de cultura sólido, supracitados. As placas foram incubadas à 37°C (bactérias) e 30°C por 48h (leveduras) ou 96h (fungos filamentosos), sendo que cada amostra foi testada em triplicata em experimentos independentes.

4.11 GRADIENTE EXPLORATÓRIO PARA OBTENÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE *Streptomyces cinereus* MPO11.

Iniciou-se a otimização do método cromatográfico em fase reversa, a partir de uma eluição gradiente, na qual se empregam, como constituintes da fase móvel, H₂O (solvente A) e como solvente orgânico a ACN (solvente B), em misturas, com proporções variando com o aumento da concentração de B em função do tempo.

Em cromatografia de fase reversa além de ACN pode-se também utilizar como solventes orgânicos, o MeOH e THF. O uso de apenas estes três solventes, se dá pelo fato da completa miscibilidade dos mesmos em água.

Os procedimentos adotados, neste trabalho, seguiram a proposta apresentada por Snyder e Dolan (1996), que descrevem um método, via HPLC, como proposta para a eluição inicial da amostra em estudo, podendo-se prever, por este método, qual o modo de separação, se gradiente ou isocrático, será mais apropriado para a separação dos constituintes de uma determinada amostra.

Caso uma eluição isocrática seja possível, os autores também apresentam uma maneira de estimar a melhor composição da fase móvel (força), a qual deverá ser utilizada. Se a escolha for uma eluição gradiente, o método de Snyder e Dolan também permite estimar a melhor extensão do gradiente.

O perfil cromatográfico do extrato acetato etílico de *S. cinereus* MPO11 foi obtido considerando a metodologia de Snyder et al., (1997) com adaptações. Foram realizadas injeções em Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) usando uma coluna C₁₈ Gemini da Phenomenex® (250 X 0,46 mm, 5 µm, Å) acoplada a uma pré-coluna C₁₈ da Phenomenex® (4 X 3mm, 5 µm, Å). A vazão da fase móvel foi de 2mL min⁻¹ e a alça de

injeção foi de 20 μ L. Tendo como fase móvel constituída por solvente A = água e solvente B = acetonitrila, variando de 5 a 100% da concentração do solvente B em um tempo de 60 minutos em modo gradiente para a obtenção do perfil cromatográfico. A separação foi acompanhada por um detector de fotodiodo UV-Vis variando em comprimento de onda de 200 a 400nm, sendo o comprimento de onda fixado em 254 e 380nm. Esta análise possibilitou também a avaliação e desenvolvimento de um método cromatográfico para o isolamento de compostos majoritários presentes no extrato.

Uma alíquota de 1 mg do extrato foi solubilizada em 1 mL de H₂O:ACN 80:20 (v/v) e posteriormente a solução foi filtrada com auxílio de filtro de seringa de nylon 0,45 μ m de porosidade, e colocada em um vial de 1 mL sendo injetada no cromatógrafo com as condições descritas anteriormente.

4. 12 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ISOCRÁTICO PARA ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITARIOS NO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE *Streptomyces cinereus*

O desenvolvimento do método isocrático para o isolamento dos compostos majoritários no extrato aceto de etila de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus* MPO11, foram realizados em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Shimadzu® LC-10AD, binário, detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, degaseificador de membrana modelo DGU-14A, auto-injetor de amostra SIL-20A, interface de comunicação CBM-20A, conectado ao microcomputador com LCSolution como software de integração. Uma alíquota de 1 mg do extrato foi solubilizada em 1 mL de H₂O:ACN 80:20 (v/v) e posteriormente a solução foi filtrada com auxílio de filtro de seringa de nylon 0,45 μ m de porosidade, e colocada em um vial de 1 mL.

A análise cromatográfica procedeu-se com injeção automática, um *loop* com capacidade de 20 μ L, tendo coluna C₁₈-5 μ m (Phenomenex®) como fase estacionária.

Após a obtenção do perfil cromatográfico a partir do gradiente de ampla faixa (5-100% orgânico/60min) que demonstrou os componentes majoritários e detectáveis no extrato, bem como seletividade e formato de pico suscetíveis ao desenvolvimento em fase reversa para eluição em modo isocrático, determinou-se a concentração de B fixa de acordo com o nomógrafo descrito por SNYDER (1997). A fase móvel utilizada foi 20% de B em 30 minutos de análise. Para melhor resolução dos picos na análise foi acrescentado à fase móvel 0,1% de ácido fórmico.

A análise no modo isocrático também foi acompanhada por um detector de fotodiodo

UV-Vis variando em comprimento de onda de 200 a 400nm, sendo o comprimento de onda fixado em 254 e 380nm.

4.13 ANÁLISE DOS COMPOSTOS ISOLADOS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO EM ELETROSPRAY (ESI)

As três amostras majoritárias isoladas através do método preparativo em Cromatografia Líquida foram injetadas em um Cromatógrafo Líquido acoplado à Espectrometro de Massas modelo Xevo G2-XS QToF da Waters® e configuração ESI-QToF. O tempo de aquisição de dados foi de 1 minuto por infusão direta para cada pico isolado. Os espectros foram adquiridos no modo positivo e negativo na faixa de 50 a 1200 Da. As configurações do sistema operacional foram: tensão do capilar: 3kV; tensão do cone: 40V; temperatura da fonte: 120 °C; Temperatura de dessolvatação: 500 °C; Fluxo do gás de dessolvatação: 600L/h; Fluxo de gás no cone: 30L/h.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de pH, temperatura e biomassa da MPO11 foram avaliados por estatística descritiva, em função da média aritmética. No ensaio de atividade antimicrobiana foram feitas três repetições em delineamento inteiramente casualizado, sendo a análise estatística desenvolvida no software SISVAR versão 5.6, utilizando o teste de Tukey (5%) para a comparação das médias.

No ensaio de cultivo submerso e obtenção de metabólitos secundários foi empregado o delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 5x7. Os meios de cultura utilizados não foram comparados entre si. Para os fatores e interação detectados como significativos pelo teste F ($p \leq 0,05$), foi empregado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para todos os ensaios foi verificada a normalidade dos dados (teste de Shapiro-wilk).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DA LINHAGEM DE ACTINOBACTÉRIA

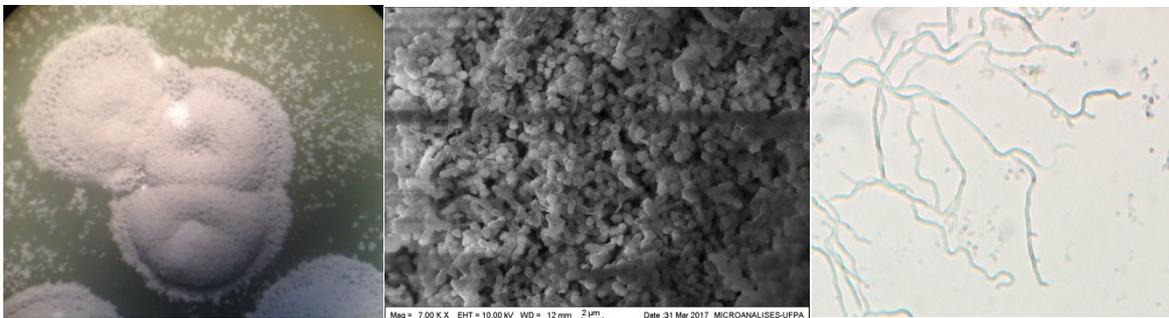
A actinobactéria foi isolada a partir da diluição seriada 10^{-3} do solo rizosférico de *Aniba parviflora syn fragans* (macacaporanga), identificada como MPO11, após 21 dias de cultivo em meio ALA.

A partir da análise por microscopia óptica de luz comum foi possível observar na lâmina

de microcultivo, a presença predominante de uma cadeia de esporos simples *retinaculum apertum* espiralada bem definida, característica do gênero *Streptomyces*.

O isolado MPO11 foi considerado Gram-positivo, a partir da coloração roxo verificada em microscópio e suas características macro, micro morfológicas e culturais foram comparadas com espécies de actinobactérias descritas no *Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology* (2012), sugerindo pertencer ao gênero *Streptomyces* sp (Figura 7).

Figura 7- Aspecto morfológico do isolado MPO11; 1.a. colônia bacteriana de aspecto velutino cultivada em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Lupa, aumento de 40 x.; 1.b. esporos esféricos de superfície rugosa (MEV). 1.c. cadeia de esporos tipo *Retinaculum apertum*. Microscópio óptico de luz comum, aumento de 640x.



De acordo com o gênero, as actinobactérias podem exibir diferentes características micromorfológicas, como cocoide em *Micrococcus*, cocobacilo em *Arthrobacter*, fragmentação de hifas em *Nocardia spp.* ou micélio ramificado altamente diferenciados como visto em *Streptomyces spp.* (Figura 1). (LETEK et al., 2012; RAJU et al., 2010).

Mais de 500 espécies de *Streptomyces* são conhecidas e podem ser encontradas em diversos habitats, com destaques para o solo, onde perfazem cerca de 30% da microbiota, e ambientes aquáticos (lagos, rios, mares) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Muitas actinobactérias são comumente isoladas de solo que apresentam a capacidade de colonizar a rizosfera ou mesmo o ambiente endofítico de espécies vegetais. Algumas promovem o crescimento de plantas, atuando como biofertilizante, bioestimuladora ou biocontroladora de fitopatógenos (QIN et al., 2012).

5.2 CARACTERIZAÇÃO MACRO-MORFOLÓGICA

A linhagem MPO11 desenvolveu micélio aéreo na maioria dos meios de cultura testados, sendo formado a partir do segundo dia de cultivo nos meios ISP1, ISP2 e ISP3, e partir do quarto dia nos demais meios de cultura (Tabela 2). A coloração do micélio aéreo

variou entre a cor branco e tons de cinza, sendo que no meio ISP2, ALA e GAA houve mudança de coloração do micélio aéreo inicialmente branco, tornando-se cinza após o sétimo dia de cultivo.

Tabela 2- Características macroscópicas da linhagem MPO11 cultivada em diferentes meios de cultura.

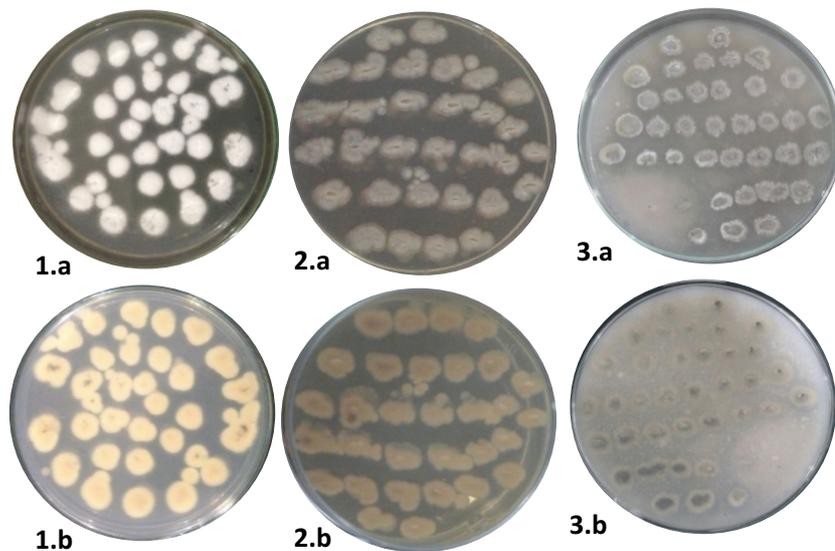
Meio	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	+++	Branco	Amarelo	-
ISP2	+++	Cinza	Amarelo	-
ISP3	+++	Cinza claro	Verde escuro	-
ISP4	++	Cinza claro	Verde escuro	Vermelho
ISP5	-	-	-	-
ALA	++	Cinza	Bege	-
CAA	+	Branco	Bege	-
GAA	++	Cinza	Amarelo	-
CZ	-	-	-	-
DAS	-	-	-	-
BDA	-	-	-	-
AN	-	-	-	-
TSA	-	-	-	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

O micélio vegetativo foi formado a partir do primeiro dia de cultivo nos meios ISP1, ISP2 e ISP3, e após o terceiro dia nos demais meios de cultura. A cor do micélio vegetativo variou entre o bege nos meios ALA e CAA, amarelo nos meios ISP1, ISP2 e GAA e verde escuro nos meios ISP3 e ISP4 (Figura 8).

As colônias crescidas nos meios de cultura ISP1 e CAA mantiveram a coloração branca do micélio aéreo durante todo o período de cultivo. Houve produção de pigmento difuso vermelho no meio ISP4 após o sétimo dia de cultivo. As colônias apresentaram aspecto pulverulento no meio ISP2 e velutino nos demais meios. Não houve crescimento microbiano nos meios ISP5, CZ, SDA, BDA, AN e TSA.

Figura 8- Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de cultivo à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo



O micélio aéreo se desenvolveu após cinco dias de cultivo no meio ISP2. Este aspecto é peculiar ao grupo das actinobactérias, sendo que as colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de 7 a 10 dias para desenvolver o micélio aéreo (SRINIVASAN, LAXMAN e DESHPANDE, 1991; HOPWOOD, 1999; FLARDH e BUTTNER, 2009). Outra característica da maioria dos membros do grupo das actinobactérias, é o crescimento preferencialmente em meios acrescidos de sais minerais, aminoácidos, amido e caseína (WILLIAMS, SHARPE e HOLT, 1989; GOODFELLOW e FIEDLER, 2010).

A produção de pigmentos solúveis é uma característica distinta das colônias de *Streptomyces*, diferindo do observado no metabolismo de outros membros do grupo, como ocorre nos gêneros *Frankia*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Thermoactinomyces* (SOARES et al., 2010).

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A análise da sequência de 763 pb (MPO11) do gene 16S RNAr comparados com a base de dados *GenBank* revelou um elevado grau de semelhança (98-99%) com o gênero *Streptomyces cinereus* (Tabela 3).

Tabela 3- Dados da identificação molecular

Linha-gem	Con-teúdo de G+C	Tama-nho (bp)	Primer forward	Primer reverse	Similari-dade %	Correspondência	Gene-bank ID
MP011	58.45%	763	Eub338F** - ACTCCTACGG-GAGGCAGCAG	Act1159R*** - TCCGAGT-TRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR063215.1

* (Weisburg *et al.*, 1991)

** (Fierer *et al.*, 2005)

*** (Blackwood, Oaks e Buyer, 2005)

A análise molecular realizada no trabalho, corroboram com os resultados encontrados por Zhao *et al.* (2018) que também isolaram de solo, a espécie *Streptomyces cinereus*.

5.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA

Em relação a caracterização bioquímica e fisiológica, a espécie *Streptomyces cinereus* consumiu onze das quatorze fontes de carbono testadas, o que proporcionou o melhor desenvolvimento do micélio aéreo abundante foram os substratos contendo L-arabnose, D-manose, D-lactose, D-melezitose, D-sacarose e sorbitol. Para o substrato contendo xilose o micélio aéreo apresentou desenvolvimento moderado, e nos substratos contendo celulose, inositol e D-manitol como fontes de carbono, não houve desenvolvimento do microrganismo (Figuras 10 e 11) e (Tabela 4).

Das onze fontes de nitrogênio testadas para o consumo do actinomiceto, as que melhor desenvolveram o micélio aéreo da linhagem foram: L-cisteína, L-histidina, L-glutamina. No entanto, apenas a L-metionina não foi consumida como substrato.

A actinobactéria isolada cresceu preferencialmente em meio basal contendo sais de 3%, 4% e 5% de NaCl, podendo ser considerada como médio tolerante a salinidade (tabela 5).

Figura 9- Substratos de fontes de carbono, evidenciando a formação da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11. a. D-sacarose; b. Lactose; c. L-arabnose.

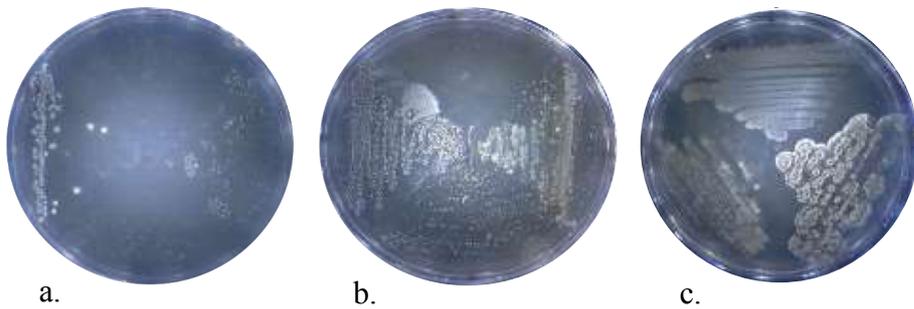


Figura 10- Substratos de fontes de nitrogênio evidenciando a formação da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11. a. L-cisteína; b. L-histidina; c. L-glutamina.

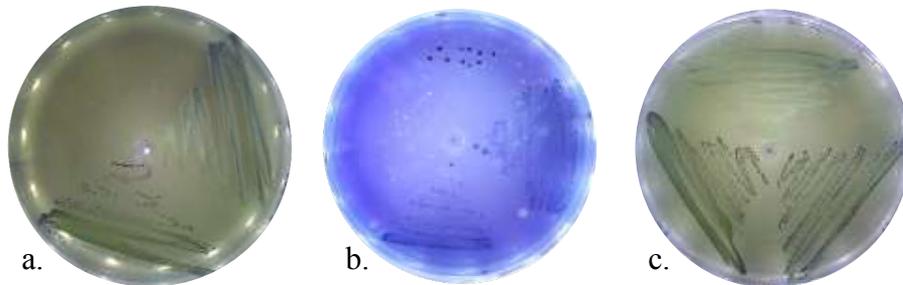


Tabela 4- Aspectos bioquímicos e fisiológicos de *Streptomyces* sp. MPO11.

<i>Streptomyces</i> sp. MPO11				
<i>Crescimento na presença de NaCl</i>			<i>Utilização de fontes de carbono</i>	<i>Utilização de Fontes de Nitrogênio</i>
3%	4%	5%		
+++	+++	+	L-arabnose	
+++	+++	+	Celulose	
+++	+++	+	D-manose	
+++	+++	+	D-frutose	
+++	+++	+	D-glicose	
+++	+++	+	Inositol	
+++	+++	+	D-lactose	
+++	+++	+	D-manitol	
+++	+++	+	D-melezitose	
+++	+++	+	L-rhamnose	
+++	+++	+	D-sacarose	
+++	+++	+	Sorbitol	
+++	+++	+	D-trealose	
+++	+++	+	D-Xilose	
+++	+++	+	L-arginina	
+++	+++	+	L-asparagina	
+++	+++	+	L-cisteína	
+++	+++	+	L-fenilalanina	
+++	+++	+	L-histidina	
+++	+++	+	L- glutamina	
+++	+++	+	L-metionina	
+++	+++	+	L-ornitina	
+++	+++	+	L-serina	
+++	+++	+	L-tirosina	
+++	+++	+	L-valina	

+ positividade para o crescimento; - negatividade para o crescimento.

As actinobactérias apresentam metabolismo de consumo variado, produzindo enzimas extracelulares capazes de hidrolisar diversos substratos para obtenção de carbono e nitrogênio, necessários para o crescimento celular (KENNEDY, 1999).

Zhao et al. (2018) ao realizar a caracterização bioquímica e fisiológica da linhagem *Streptomyces cinereus* DSM43033T, encontraram como melhores fontes de carbono e nitrogênio rhamnose, sorbitol, L-arginina, L-asparagina, serina e tirosina, resultados similares aos encontrados no trabalho para o metabolismo de consumo. Estes mesmos autores encontraram também para *Streptomyces cinereus* tolerância a salinidade NaCl de até 5%.

5.5 PROSPECÇÃO DE ENZIMAS

Foram utilizadas técnicas de microbiologia clássica para a caracterização bioquímica da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11, sobre a capacidade de prospectar enzimas. A linhagem apresentou potencial enzimático para as enzimas amilase, caseinase, gelatinase, lipase, esterase, catalase, glutaminase e hemolisina (Tabela 5) (Figura 12 e 13). Para a prospecção de pectinase e urease, a actinobactéria não foi ativa.

Após as triagens enzimáticas de interesse industrial, foi determinado o índice enzimático da linhagem, sendo considerado bom potencial, valores acima de 1,5. Diante disso para todas as enzimas testadas foram consideradas como bom índice, destacando-se os maiores índices para as enzimas amilase, esterase e lipase, sendo esta última com valor de 4,6 a melhor prospecção (Tabela5).

Tabela 5- Produção de enzimas por *Streptomyces cinereus*.

Enzimas	Teste	Halo enzimático	Diâmetro da colônia	Índice enzimático (ID)
Catalase	+	*	*	*
Amilase	+	33,6	14,1	2,4
Caseinase	+	26,3	15,6	1,7
Gelatinase	+	*	*	*
Pectinase	-	-	-	-
Esterase	+	20,3	11,3	2,7
Urease	-	-	-	-
Lipase Tween 80	+	35,3	7,6	4,6
Glutaminase	+	*	*	*
Hemólise	+	18,6	9,6	1,9

+ positividade para o crescimento; - negatividade para o crescimento; *não de aplica.

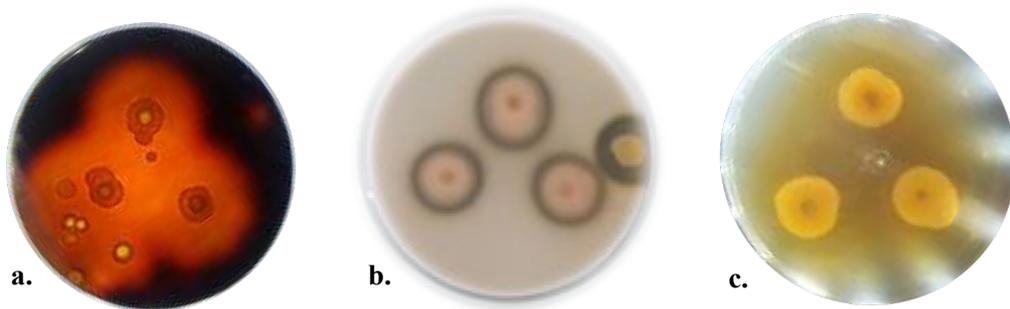


Figura 11- Prospecção enzimática de *Streptomyces* sp. MPO11 nos meios seletivos. a. Amilase; b. Caseinase; c. Lipase.

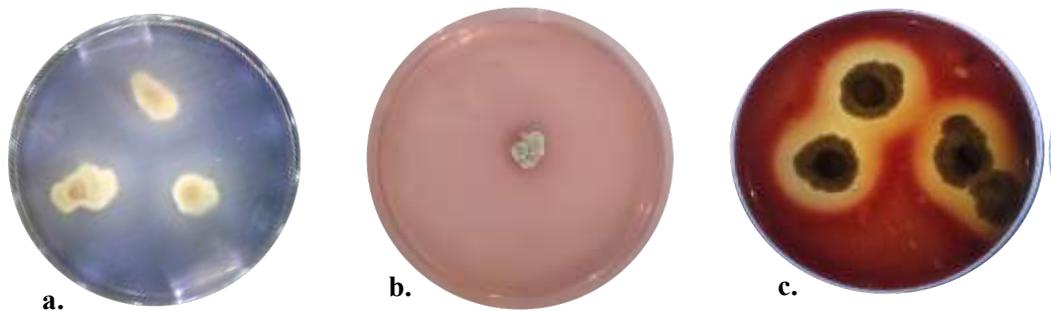


Figura 12- Prospecção enzimática de *Streptomyces* sp. MPO11 nos meios seletivos. a. Esterase; b. Glutaminase; c. Hemólise.

A produção de enzimas microbianas tem apresentado ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade genética, e a produção de amilases microbianas é restrita a um número reduzido de microrganismos, incluindo as actinobactérias (ALTAMIRANO et al., 2000; SIQUEIRA e MOREIRA, 2001; SINGH, KUMAR e KAPOOR, 2014).

As amilases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e têm sido alvo de estudos biotecnológicos voltados para , uma vez que representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013).

As amilases apresentam inúmeras aplicações industriais, tais como no processo de liquefação do amido e melhoramento da farinha para a indústria de panificação, na fermentação (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013), na produção de amido modificado para a indústria do papel (GUPTA et al., 2003) entre outras.

Vários estudos descrevem a produção de amilases por actinobactérias. Como exemplo destacam-se as α -amilases termoestáveis produzidas por actinobactérias endofíticas do gênero

Nocardiosis sp. (STAMFORD et al., 2002) e pela bactéria termofílica *Streptomyces* sp. MSC702 (SINGH, KUMAR e KAPOOR, 2014) e a gluco-amilase, produzida pelo endofítico *Streptosporangium* sp. (STAMFORD et al., 2002).

Algumas actinobactérias hidrolisam o substrato contendo caseína e gelatina como descrito por Oliveira (2015), que avaliou o potencial antimicrobiano e citotóxico de actinobactérias isoladas de vários habitats. Das 19 linhagens isoladas, 7 desempenharam maior atividade antagônica e foram submetidas à produção de metabólitos antimicrobianos em meio líquido. O potencial enzimático também foi avaliado e foi observado que as 7 linhagens produziram esterase e caseinase. Apenas uma linhagem não produziu lipase e urease, e todas elas foram catalases positiva.

As lipases e esterases de origem microbiana são biocatalisadores que chamam bastante atenção devido as suas propriedades bioquímicas e aplicações industriais na produção de biocombustíveis (JOSEPH, RAMTEKE e THOMAS, 2008; RODRIGUES et al., 2010, ZOTCHEV, 2012 DHEEMAN, FRIAS e HENEHAN, 2010; QIN et al., 2012).

As lipases são estáveis em diferentes condições de pH, temperatura, ativas em diversos solvente orgânicos e têm sido alvo da indústria biotecnológica como observado por (MANDER et al., 2012) que isolaram uma lipase com massa molecular de 39,8 kDa proveniente de *Streptomyces* sp. CS133 que foi capaz de atuar na transesterificação enzimática dos óleos vegetais de girassol, prímula e borragem.

Devido o grande espectro de aplicações das enzimas, vem crescendo a busca em direção à procura por fontes enzimáticas inexploradas, de origem microbiana como as produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces* (SZTAJER, MALISZEWSKA e WIECZOREK, 1988; YUAN et al., 2014).

No estudo de Cho et al. (2012) que realizou o isolamento de 700 microorganismos do solo com potencial biotecnológico na produção de biodiesel, foi selecionado a linhagem *Streptomyces* CS326, produtora de uma nova lipase altamente indutível com detergente e estável na presença de vários solventes, incluindo metanol.

Saxena et al. (2015) isolaram actinobactérias do solo e avaliaram o potencial destas bactérias filamentosas em produzir as enzimas antitumorais L-asparaginase e L- glutaminase e identificaram que dos 57 isolados que apresentaram excelente e boa produção de L-asparaginase, 51 isolados produziram L-glutaminase. A enzima L-glutaminase (E.C. 3.5.1.2) apresentou atividade antitumoral, especialmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) (ROBERTS et al., 2001; KOIBUCHI et al., 2004; PIETERS et al., 2011) e atividade antiviral contra HIV (SABU et al., 2000; PLNSN et al., 2014).

Outras actinobactérias do gênero *Streptomyces* também apresentaram grande potencial na produção de L- asparaginases, tais como a *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces venezuelae* (MOSTAFA e SALAMA, 1979), *Streptomyces albioflavus* (NARAYANA, KUMAR E VIJAYALAKSHMI, 2008), *Streptomyces gulbargensis* (AMENA et al., 2010) e *Streptomyces* sp. NEAE-119 isolado do solo egípcio (EL-NAGGAR et al., 2015).

Além de produzir diversos antibióticos, o gênero *Streptomyces* também é utilizado biotecnologicamente, graças a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, como proteases fibrinolíticas, que são enzimas com capacidade de degradar a fibrina, proteína de maior componente dos coágulos sanguíneos (Silva, 2016; Batista *et al.*, 2017; Benhadj *et al.*, 2018)

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na avaliação preliminar da produção de metabólitos microbianos, foi verificado o potencial antimicrobiano da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11, sendo observada ação sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, e fungos filamentosos de interesse (Tabela 6). A linhagem não apresentou atividade contra os fungos leveduriformes testados *Candida albicans* (UFPEDA1007), *Candida Krusei* (UFPEDA1002), *Candida sp.*, *Postia placenta* e *Polyporus sanguineus*.

A actinobactéria foi muito ativa quando testada com a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (UFPEDA02) (Figura 14) e também quando testadas contra os fungos filamentosos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium sp.* (F101), apresentando halos de inibição de 20mm de diâmetro considerando assim altamente ativas.

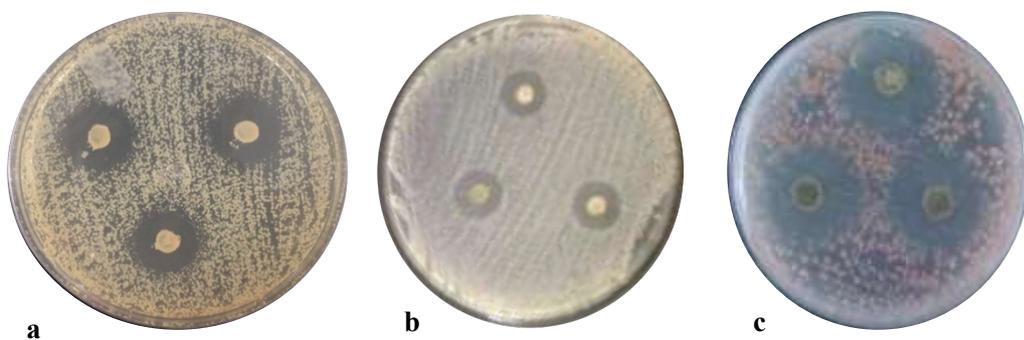


Figura 13- Atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. MPO11. a. *Staphylococcus aureus*, b. *Enterobacter aerogenes*, c. *Rhizoctonia solani*.

Tabela 6-Atividade antimicrobiana (mm) de *Streptomyces sp.* MPO11, avaliada pelo método de bloco de ágar.

Microorganismos	<i>Streptomyces sp.</i> MPO11
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA02)	20,0 ± 0.36 a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (UFPEDA183)	10.3 ± 0.45 b
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (UFPEDA800)	-c
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA138)	10.5 ± 0.58 b
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA86)	10.5 ± 0.58 b
<i>Enterobacter aerogenes</i> (UFPEDA348)	10.3 ± 0.45 b
<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA224)	-c
<i>Proteus mirabilis</i> (UFPEDA767)	-c
<i>Salmonella enteritidis</i> (UFPEDA415)	-c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA416)	-c
<i>Candida albicans</i> UFPEDA 1007	-c
<i>Candida krusei</i> UFPEDA 1002	-c
<i>Candida sp.</i>	-c
<i>Postia placenta</i>	-c
<i>Polyporus sanguineus</i>	-c
<i>Rhizoctonia solani</i>	20,0 ± 0.36 a
<i>Fusarium sp.</i> (F102)	20,0 ± 0.36 a

Halos de inibição apresentados em milímetro (mm). - Sem atividade

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Turkey (p<001).

Em triagem preliminar realizada com actinobactérias isoladas de diferentes solos do cerrado, Oliveira (2015) selecionou 5 dos 16 isolados de actinobactérias, os quais foram ativos contra os microrganismos testados também neste estudo, incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos e leveduriformes. Na investigação de Oliveira (2015) a linhagem BC-A22 foi a que apresentou halo de inibição semelhante contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* similarmente observado neste estudo.

A ação antimicrobiana de actinobactérias sobre bactérias Gram positivas é algo comum (ZITOUNI et al., 2005; GUPTA, 2011), seguido de atividade antifúngica e por último, atividade sobre bactérias Gram negativas, enfatizado por Zitouni et al.(2005). Isto também foi observado para a linhagem MPO11, onde a actinobactéria em estudo apresentou melhor atividade a bactérias Gram positivas e fungos filamentosos do que bactérias Gram negativas.

Uma das proposições sustentadas refere-se à diferenças estruturais entre bactérias Gram positivas e Gram negativas, quanto à constituição da parede celular. As bactérias Gram positivas apresentam uma parede celular composta de uma camada espessa de

peptideoglicano, não se constituindo uma barreira eficaz à difusão e penetração de moléculas antimicrobianas, diferentemente das bactérias Gram negativas que apresentam uma membrana externa lipopolissacarídica (GEBREYOHANNES et al., 2013).

Silva (2013) utilizou a metodologia “bloco de gelose” para analisar a atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas da rizosfera da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma da Caatinga e constatou que apenas 16% das 68 actinobactérias isoladas foram ativas frente a alguns dos microrganismos utilizados no teste, destacando *Staphylococcus aureus* multirresistente e *Bacillus subtilis*.

O gênero *Streptomyces* tem potencial inibitório contra fungos fitopatogênicos caracterizados pela presença de quitina na parede celular (PORSANI, 2015; JONES et al., 2017), corroborando com o resultado encontrado neste trabalho, quando avaliado a atividade antagonica contra fitopatôgeno como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* sp.

Samer e Al-Hulu (2015) isolaram 30 actinobactérias do solo coletado na cidade de Hilla, Iraque dos quais 5 isolados exibiram atividade antimicrobiana para *S. aureus*. A actinobactéria identificada como *Streptomyces* sp foi ativo contra *S. aureus* com 20 mm de zona de inibição.

5.7 CULTIVO SUBMERSO E OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Durante o cultivo submerso de *Streptomyces* sp. MPO11 houveram variações nos parâmetros físico-químicos dos meios avaliados (M1 e MPE).

O pH do líquido cultivado foi um ponto marcante, variou entre 5 e 7 no meio M1, e entre 4 e 6 no meio MPE, durante as 168 h do processo. Ao término, o pH estava em 6,26 no meio MPE e 7,46 no meio M1.

Assim como também a temperatura do líquido cultivado variou entre 25°C e 28°C no meio MPE e 26°C e 28°C no meio M1. Outra mudança significativa nos meios cultivados, foi a produção de biomassa.

Estas variações podem ser justificadas pela ativação do metabolismo secundário microbiano, que levam a uma mudança no equilíbrio de íons de hidrogênio e do meio de cultura (ELIBOL et al., 2005).

Tabela 7- Parâmetros físico químicos do cultivo submerso de *Streptomyces* sp. MPO11 nos meios M1 e MPE

TEMPO	M1			MPE		
	Biomassa (g)	pH	T°C	Biomassa	pH	T°C
24 H	0,19	4,87	26,60	0,21	4,47	27,00
48 H	0,19	5,19	26,50	0,29	4,50	28,60
72 H	0,26	5,70	29,10	0,27	4,65	28,60
96 H	0,29	7,88	29,50	0,32	5,60	28,60
120 H	0,31	7,77	28,10	0,34	5,48	25,60
144 H	0,36	7,94	27,60	0,31	6,06	25,40
168 H	0,59	7,46	28,60	0,16	6,26	27,60
TOTAL	2,94	7,46	28,60	6,32	6,26	27,60

Figura 14-Parâmetros físico-químicos avaliados durante o cultivo submerso de *Streptomyces* sp. MPO11 no meio MPE.

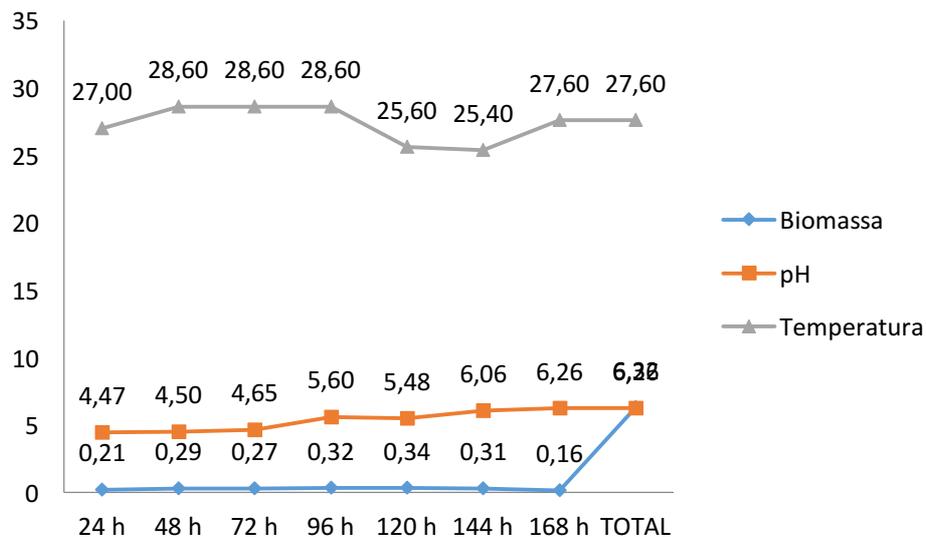
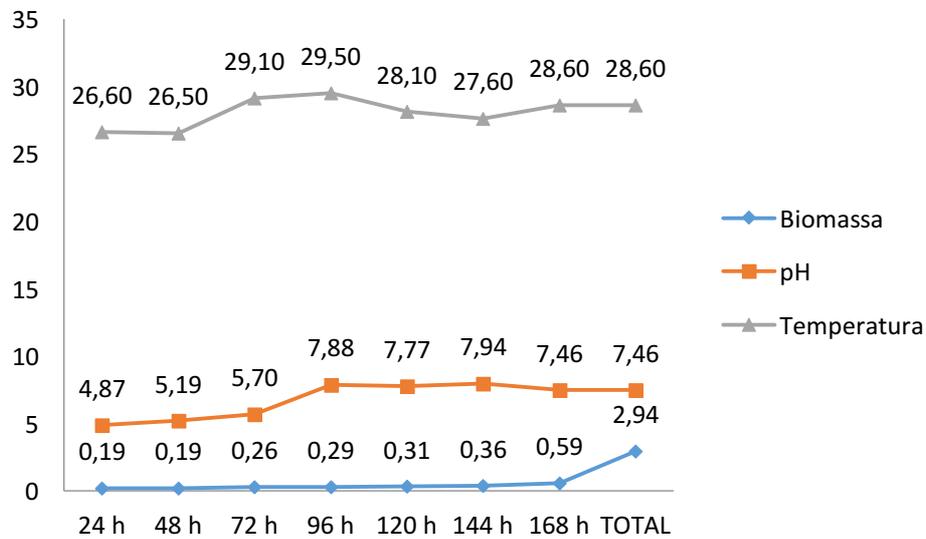


Figura 15- Parâmetros físico-químicos avaliados durante o cultivo submerso de *Streptomyces sp.* MPO11 no meio M1.

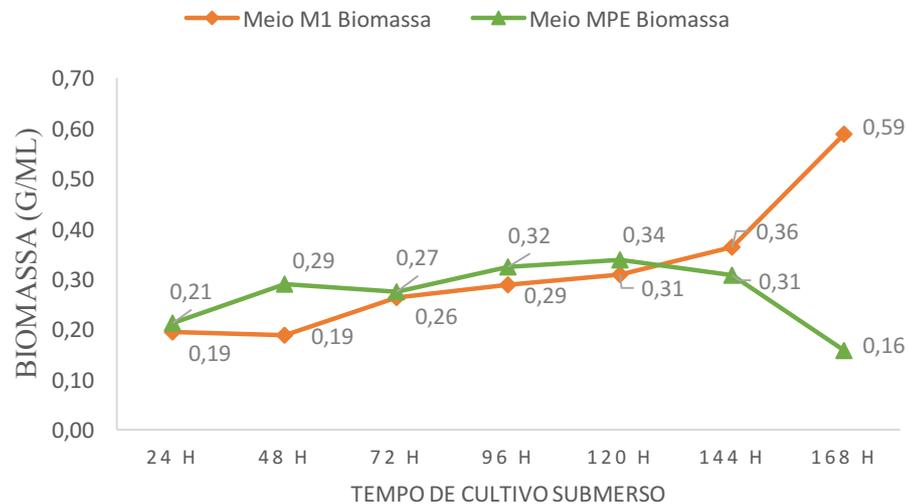


No meio MPE foi observado o maior rendimento de biomassa produzida por *Streptomyces sp.* MPO11 entre 96H e 120H. Neste período o pH da fermentação estava entre 5,60 e 5,48 sendo considerado moderadamente ácido. Já no meio M1 ocorreu a maior produção de biomassa registrada, quando comparado ao MPE, com pico de produção entre 144h e 168h, sendo este valor superior a qualquer registro de biomassa no meio MPE (Figura 17). Neste período o pH da fermentação se apresentou neutro entre 7,94 e 7,46 (Tabela 8).

Tabela 8- Produção de biomassa em cultivo submerso de *Streptomyces sp.* MPO11 nos meios M1 e MPE

	M1	MPE
TEMPO	Biomassa(g)	Biomassa (g)
24 H	0,19	0,21
48 H	0,19	0,29
72 H	0,26	0,27
96 H	0,29	0,32
120 H	0,31	0,34
144 H	0,36	0,31
168 H	0,59	0,16
TOTAL	2,94	6,32

Figura 16- Biomassa do cultivo submerso de *Streptomyces cinereus* MPO11 em meio M1 e MPE apresentando dados da Biomassa



A produção de antibióticos por actinobactérias sempre ocorre após a fase exponencial de crescimento celular. As células presentes na fase inicial de crescimento, inibem o desenvolvimento do antibiótico, onde as fontes de nutrientes são direcionadas para o desenvolvimento do microrganismo, ou seja, a produção de biomassa. Assim o gênero *Streptomyces* geralmente produz metabólitos antibióticos na fase estacionária ou em baixa taxa de crescimento (INQUE,2006; SILVA, 2012).

Streptomyces sp. MPO11 produziu metabólitos antimicrobianos no meio M1, sendo considerado o pico de maior produção, às 48 horas do cultivo submerso (Figura 18).

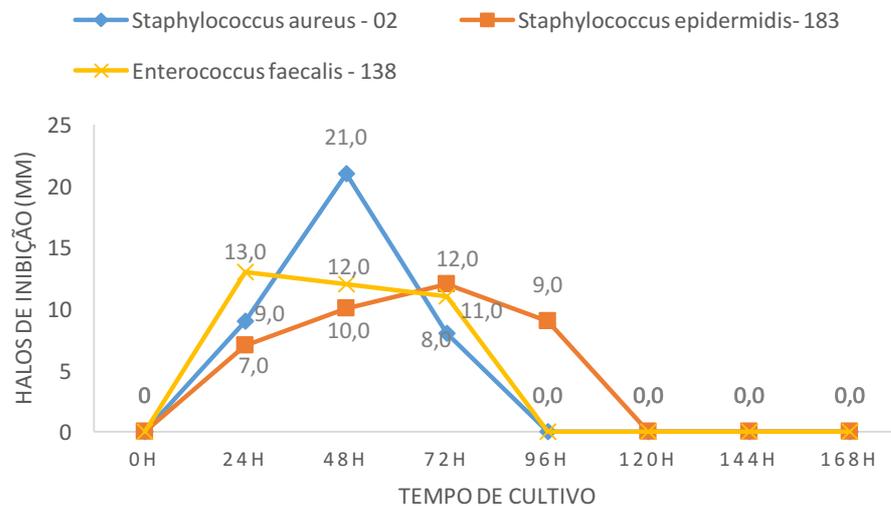
Por meio da análise estatística verificou-se que a bactéria mais sensíveis aos metabólitos do líquido cultivado de *Streptomyces* sp. MPO11 foi a *Staphylococcus aureus*, que apresentou halo de inibição de 21mm, o qual diferiu estatisticamente dos demais patógenos e tempos (Tabela 9) (Figura 19).

Tabela 9- Produção de Metabólitos antimicrobianos no meio M1 durante 168H de cultivo submerso.

	Meio M1						
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>Staphylococcus aureus</i> - 02	9,00 bC	21,00 dD	8,00 aB	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> -183	7,00 aB	10,00 aD	12,00 dE	9,00 bC	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
<i>Bacillus subtilis</i> - 86	7,00 aB	12,00 cD	10,00 bC	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
<i>Enterococcus faecalis</i> - 138	13,00 dD	12,00 cC	11,00 cB	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA
<i>Enterobacter aerogenes</i> - 348	10,00 cB	11,00 bC	11,00 cC	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA

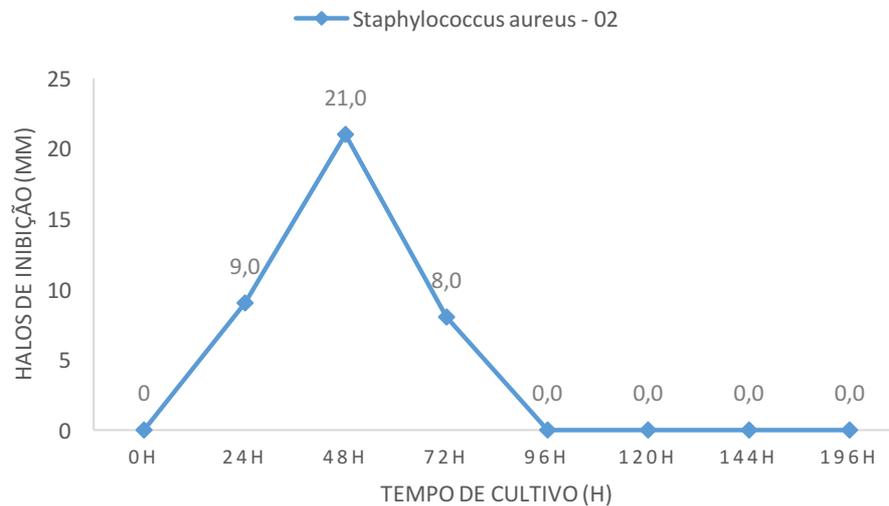
Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 17- Patógenos que apresentaram maior sensibilidade aos metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp. MPO11 sob cultivo submerso em meio M1.



Outras bactérias que apresentaram sensibilidade ao líquido cultivado em 96H foram *Staphylococcus epidermidis* que obteve halo de inibição de 9 mm e *Enterococcus faecalis* com 13 mm para o líquido fermentado às 24H do processo, ambas diferindo das outras bactérias neste período (Figura 18). A partir de 120H de cultivo submerso, nenhuma das bactérias testadas apresentaram sensibilidade.

Figura 18- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11 em meio M1 durante 168h de cultivo submerso.



O meio MPE foi o melhor para a produção dos metabólitos antimicrobianos de *Streptomyces* sp. MPO11, apresentando grande desempenho até as 168H para alguns dos patógenos testados (tabela 10).

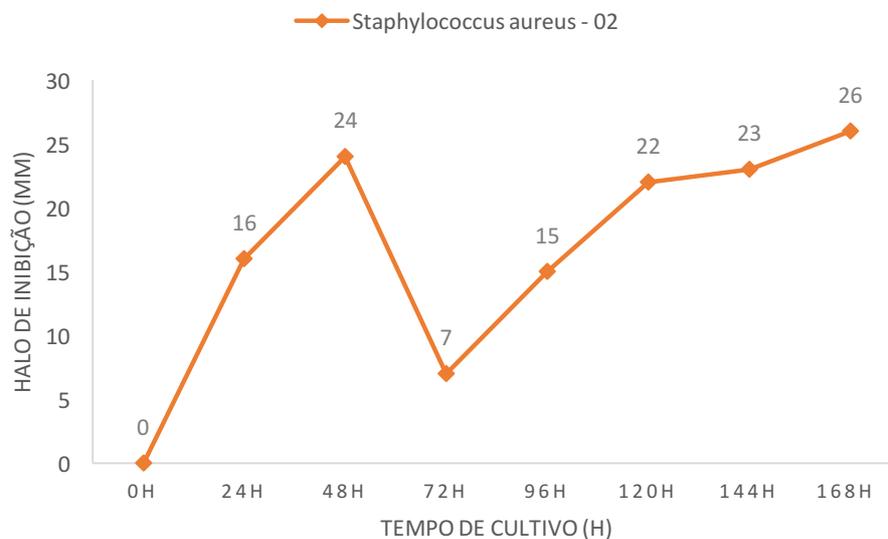
Tabela 10- Produção de Metabólitos antimicrobianos no meio M1 durante 168H de cultivo submerso

	Meio MPE						
	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>Staphylococcus aureus - 02</i>	16,00 dB	24,00 eE	15,00 dA	15,00 cA	22,00 cC	23,00 cD	26,00 dF
<i>Staphylococcus epidermidis- 183</i>	9,00 bA	12,00 bB	12,66 bC	14,00 bD	18,00 bE	20,00 bF	24,00 cG
<i>Bacillus subtilis - 86</i>	7,00 aB	10,00 aC	0,00 aA				
<i>Enterococcus faecalis - 138</i>	20,00 eC	13,00 cA	13,66 cB	14,00 bB	22,00 cD	20,00 bC	23,00 bE
<i>Enterobacter aerogenes - 348</i>	12,00 cB	20,00 dC	20,00 dC	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA	0,00 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna ou maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Por meio de análise estatística, verificou-se que a bactéria mais sensível aos metabólitos de *Streptomyces* foi *Staphylococcus aureus* que apresentou um halo inibição de 24mm as 48H de cultivo, após essa fase entre 72H e 96H houve uma diminuição de 37,5% da inibição (Figura 20). Entre o período de 120H e 168H constatou-se um crescimento significativo, com halos de inibição de 22mm (120H), 23mm (144H) e 26mm (168H).

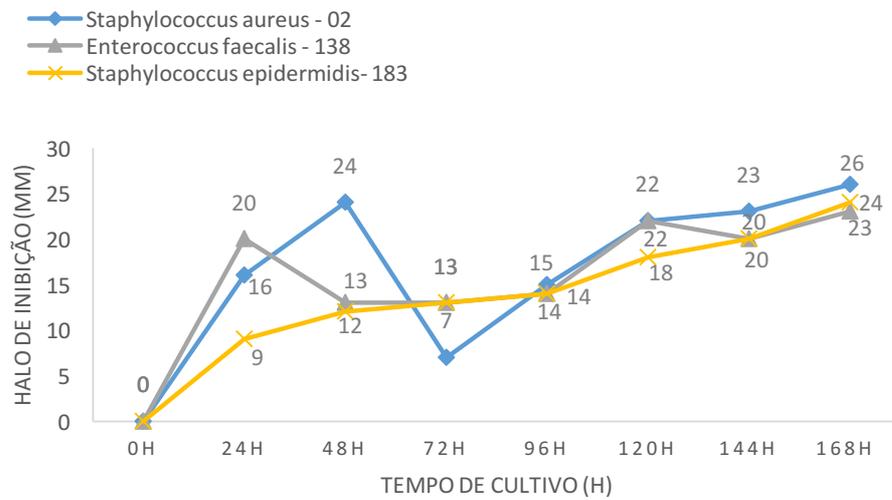
Figura 19- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11 em meio MPE durante 168h de cultivo submerso.



No tempo 168H de cultivo submerso, verificou-se que os metabólitos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* sp. MPO11 em meio MPE, foram efetivos também para *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* com halos de 24mm e 23mm, respectivamente (Figura 21). Neste mesmo período as bactérias *Bacillus subtilis* e *Enterobacter aerogens* não foram inibidas.

Houve um aumento de 40% da inibição de *Enterobacter aerogens* entre o período de 24 (12mm) e 48H (20mm) o qual manteve-se constante até 72H (20mm) de cultivo, sendo estes iguais estatisticamente.

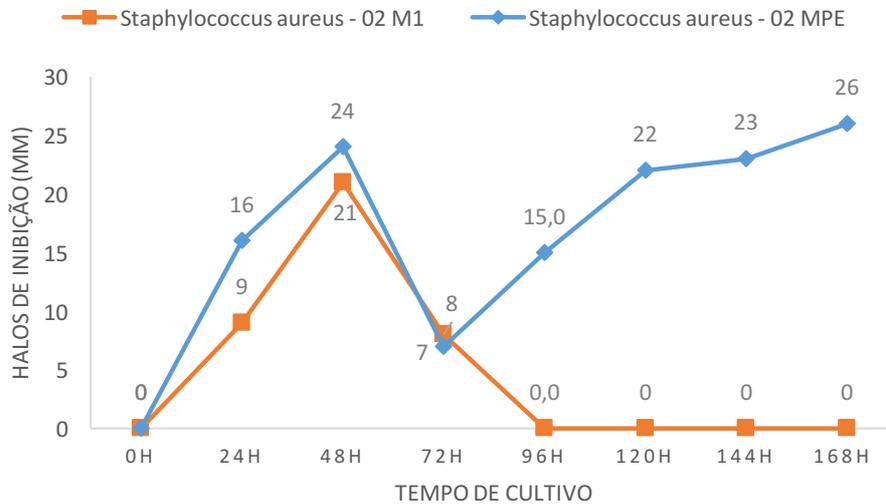
Figura 20- – Patógenos com maior sensibilidade aos metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp. MPO11 sob cultivo submerso em meio MPE



A biossíntese de metabólitos secundários, como os antibióticos, e sua expressão é regulada por fatores físico-químicos utilizados no processo de obtenção em meio sólido ou líquido, como fontes de carbono e nitrogênio, presença de elementos-traço, condições de aeração, pH, temperatura de crescimento microbiano e tempo de cultivo (IWAI e OMURA, 1982; THADIKAMALA e REDDY, 2011). Durante o processo de cultivo submerso ocorreram variações, observados nos diferentes picos de produção para os microrganismos patogênicos em razão destes fatores físico-químicos.

Quando comparados os dois meios MPE e M1, em relação a produção de metabólitos antimicrobianos, foi possível observar que o meio mais ativo, foi o meio MPE, apresentando halos maiores para *Staphylococcus aureus* (Figura 22).

Figura 21- Produção de metabólitos antibacterianos da linhagem *Streptomyces* sp. MPO11 nos meios M1 e MPE durante 168h de cultivo submerso.



A produção do metabólito antimicrobiano ocorreu em 48h de cultivo submerso MPE, em meio ácido com pH 4,5; temperatura de 28,6°C; apresentando uma biomassa de 0,27g/ml, sendo esta a melhor condição para produção dos metabólitos de interesse nesse estudo. Esse processo foi otimizado a partir desses parâmetros para se obter um maior rendimento em massa dos metabólitos secundários antimicrobianos e posterior obtenção do extrato orgânico.

5.8 OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE *Streptomyces* sp. MPO11

Foi realizada a extração dos metabólitos antimicrobianos do líquido cultivado, nos meios MPE e M1 após centrifugação e filtração a vácuo obtendo-se um líquido livre de células que foi submetido a extração com o auxílio do solvente acetato de etila por partição líquido-líquido. A fase aquosa foi submetida ao experimento de atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poço, onde a mesma, não apresentou atividade para nenhum dos patógenos testados, indicando assim, que os metabólitos de interesse haviam sido extraídos pelo solvente de escolha e encontravam-se na fase orgânica.

As fases orgânicas foram concentradas em evaporador rotativo para a obtenção dos extratos brutos acetatos etílicos dos meios MPE e M1. O rendimento em miligrama de cada meio foi: 100mg de extrato em MPE e 70mg em M1. A partir dos rendimentos pode-se observar que o meio MPE foi o de maior rendimento, o que optou-se para a continuação do

isolamento dos metabólitos secundários. O aspecto físico do extrato acetato etílico oriundo do MPE, foi um sólido grudento, de coloração marrom escuro e cheiro levemente adocicado.

O solvente acetato de etila utilizado para extração dos metabólitos secundários neste estudo foi o solvente de escolha, baseado em Torres-Beltrán et al. (2012) e Atta & Yassen (2015), onde o composto antimicrobiano de interesse foi estudado a partir da fase orgânica e não houve relato de atividade antimicrobiana na fase aquosa.

Para se obter compostos bioativos a partir de microrganismos, em quantidades suficientes para realização de testes biológicos, é necessário elevar o rendimento dos metabólitos (YU et al., 2008). Dessa forma, a otimização dos parâmetros de fermentação e meios de cultivo permitem alcançar maior produção de biomassa e alto rendimento do extrato orgânico bruto (NANJWADE, 2010).

5.9 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

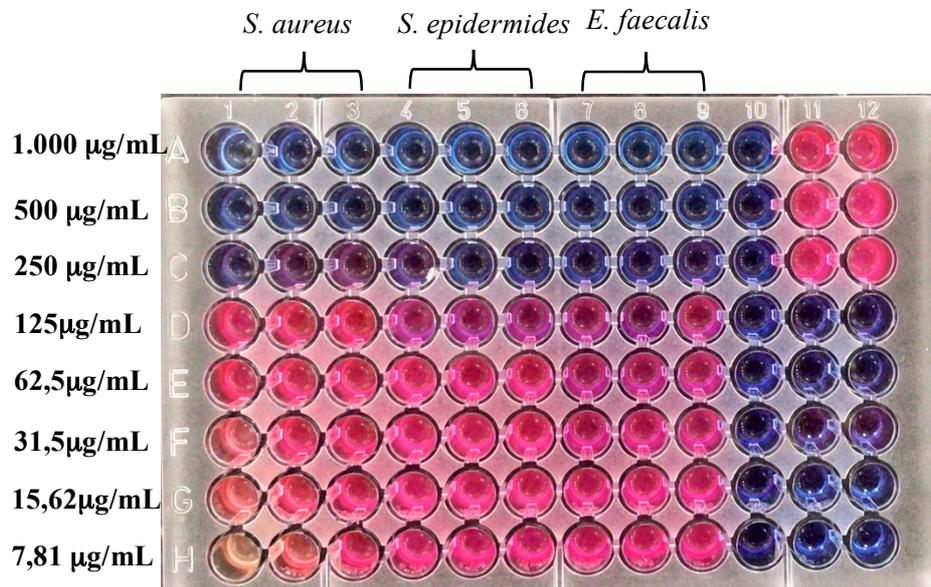
O extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11, em meio MPE, apresentou atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* sendo ativos nas concentrações de 1.000, 500 e 250µg/mL (Tabela 11).

Tabela 11- Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato bruto aceto etílico de *Streptomyces* sp. MPO11.

Microrganismos	Concentrações teste (µg/mL)							
	1.000	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	-

+ ativo; - sem atividade.

Figura 22- Placa contendo ensaio da atividade antimicrobiana realizado pelo método da microdiluição em caldo para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do extrato aceto etílico de *Streptomyces* sp. MPO11, contra bactérias.



A CMI bactericida foi determinada pela subcultura dos poços de coloração azuis, ou seja, nas concentrações de 1.000, 500 e 250 µg/mL. O resultado encontrado foi que o extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11 foi bactericida até a concentração de 500µg/mL e bacteriostático na concentração de 250µg/mL para os três patógenos testados.

O extrato etanólico do isolado de *Streptomyces* Bb36 revelou atividade contra *E. coli* e *S. aureus* e apresentou uma CMI de 10.000 à 5.000 µg/mL (SAADOUN; ALAWAWDEH, 2011), só não para *E.coli*, pois a linhagem em estudo não foi ativa contra a mesma. Comparando com os resultados encontrados para *Streptomyces* sp. MPO11, podemos sugerir que o solvente acetato de etila foi mais seletivo para os metabólitos secundários com propriedade antimicrobiana que o etanol citado no trabalho de Saadoun e Alawawdeh (2011).

Em estudo realizado por Sunaryanto et al. (2011), o extrato metanólico de *Streptomyces* sp., isolada de sedimento marinho, apresentou CMI para *S. aureus* de 80,2 µg/mL. Outro extrato acetonitrílico oriundo de actinomicetos exibiu atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans* com CMI de 500 a 600 µg/mL respectivamente (VIJAYALAKSHMI; SUDHA, 2011).

As atividades antimicrobianas do gênero *Streptomyces* nos mais variados extratos orgânicos podem está relacionadas com a capacidade de produção da classe de metabólitos

considerados potencialmente antibióticos como os macrolídeos (HATANAKA et al., 1988, MIRANZO, et al., 2010; BUSARAKAM et al., 2014)

5.10 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO EXTRATO ACETATO ETÍLICO DE *Streptomyces* sp. MPO11

Inicialmente, a viabilidade do melhor solvente para solubilizar o extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11 foi determinada através do teste de solubilidade com os solventes água, acetonitrila, metanol e acetona em diferentes concentrações. Obteve-se a melhor solubilidade usando acetonitrila (ACN) e água na concentração de H₂O/ACN (8:2), indicando a alta polaridade do extrato e o melhor sistema para o preparo da amostra para o isolamento dos metabólitos majoritários do extrato.

Através de uma eluição em modo gradiente de ampla faixa (5-100% de ACN em 60min) observou-se que o intervalo entre as bandas de interesse correspondentes aos analitos variaram entre 2 e 20min (Figura 23). Uma vez selecionada a faixa de interesse, iniciou-se os experimentos isocráticos para a otimização dos parâmetros de separação do extrato acetato etílico, buscando um método robusto e seletivo.

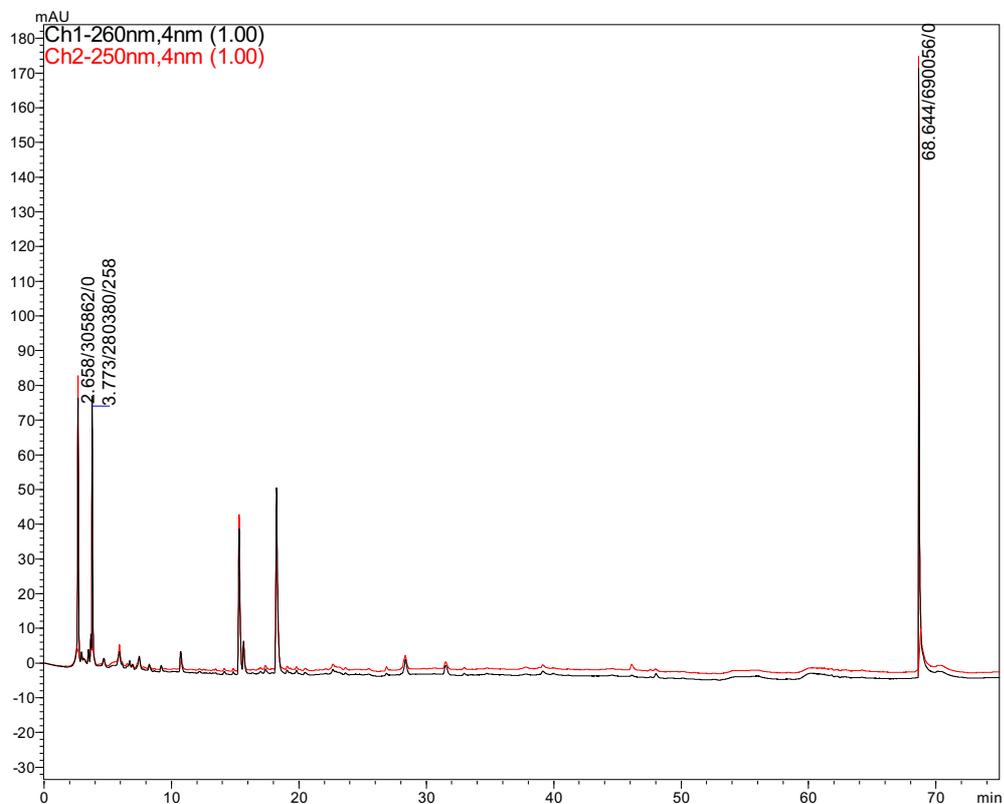


Figura 23- Cromatograma 1- Gradiente de ampla extensão do extrato bruto aceto etílico de metabólitos secundário de *Streptomyces* sp. MPO11 com fase móvel

composta por solvente A:H₂O e solvente B: ACN variando de 5-100% de B em 60 minutos, vazão de 2,0mL min⁻¹

Como a relação $(T_{rz} - T_{ra})/T_g$ apresentou valor menor que 0,4 ou seja, $(19,88 - 2,69)/60 = 0,28$ a separação pode ser realizada em modo isocrático. Baseado no tempo de retenção do último pico 19,88min, pode-se estipular o % de B em eluição isocrática (Tabela 12).

Tabela 12- Estimativa do % do solvente B (ACN) para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda Tz e do gradiente inicial (Snyder e Dolan, 1996).

T_z (min)	K = 5 (%) de ACN)	K = 10 (%) de ACN)	K = 20 (%) de ACN)
5	6	0	-
10	19	12	5
15	29	22	14
20	37	30	22
25	45	38	30
30	53	46	38
35	61	54	46
40	69	60	54
45	77	70	62
50	85	78	70
55	93	86	78
60	100	94	86
65	-	100	94

Condições: Coluna 15 X 0,46cm; gradiente 5- 100% de ACN em 60min; vazão 2mL/min (Snyder e Dolan, 1996).

Neste caso para os picos de interesse, a fase móvel correspondente foi de 20% de ACN para uma eluição isocrática. Nesta proposta, buscou-se os ajustes na seletividade desejada para os analitos mantendo-se o fator de retenção (K) constante (Figura 24).

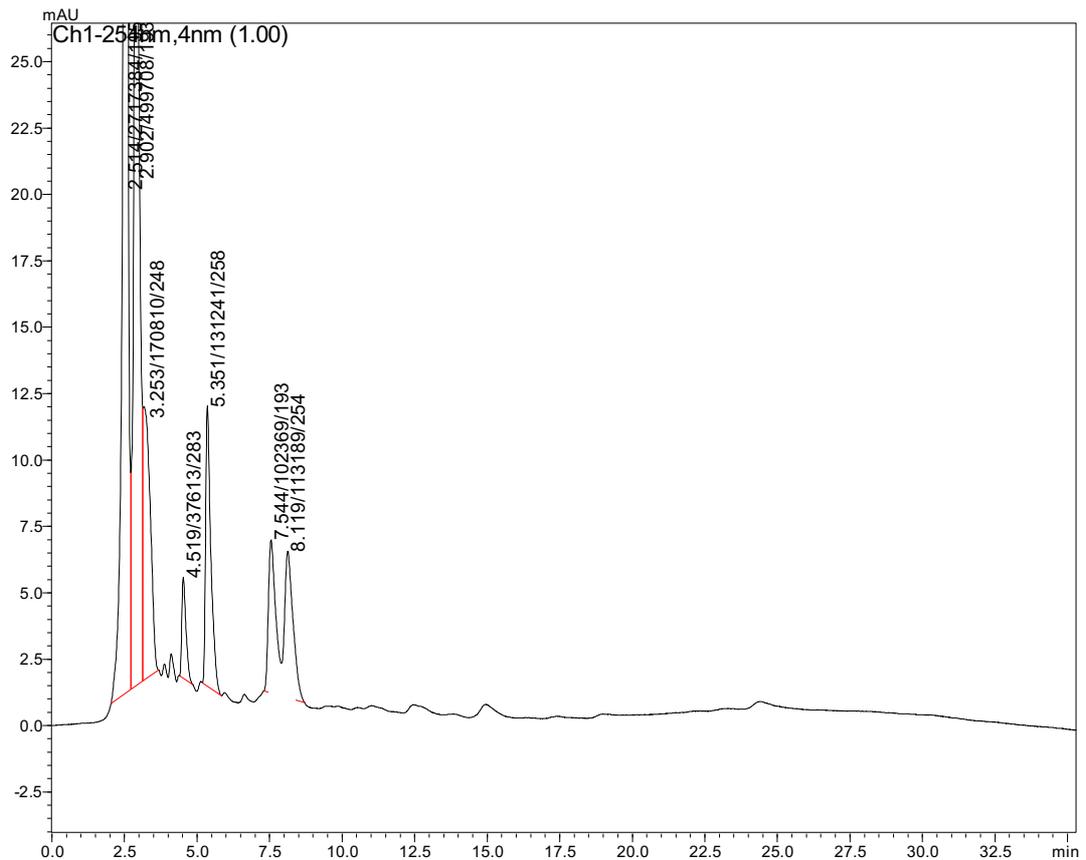


Figura 24- Eluição isocrática acidificada 0,1% ácido fórmico, do extrato bruto aceto etílico de metabolitos secundário de *Streptomyces* sp. MPO11, composta por: fase estacionária: Coluna Gemini C18 250X4,6mm, 5 μ m e fase móvel H₂O:ACN 80:20, vazão 2mL/min.

Uma vez que fixando o fator de retenção (K) e verificando que o o fator de separação (α) entre os picos 2 e 3 está ótimo optou-se por continuar com o sistema H₂O:ACN 80:20 acidificado à 0,1% de ácido fórmico, estabelecido assim o sistema de separação com a melhor seletividade encontrada, então o próximo passo foi escalonar a análise em coluna semi-preparativa e isolar os compostos majoritários, que foram separados em 3 blocos, sendo que no terceiro bloco foram isolados 3 compostos codificados como SC-1, SC-2 e SC-3 (Figura 25). Os três compostos isolados apresentaram característica de um sólido amorfo branco.

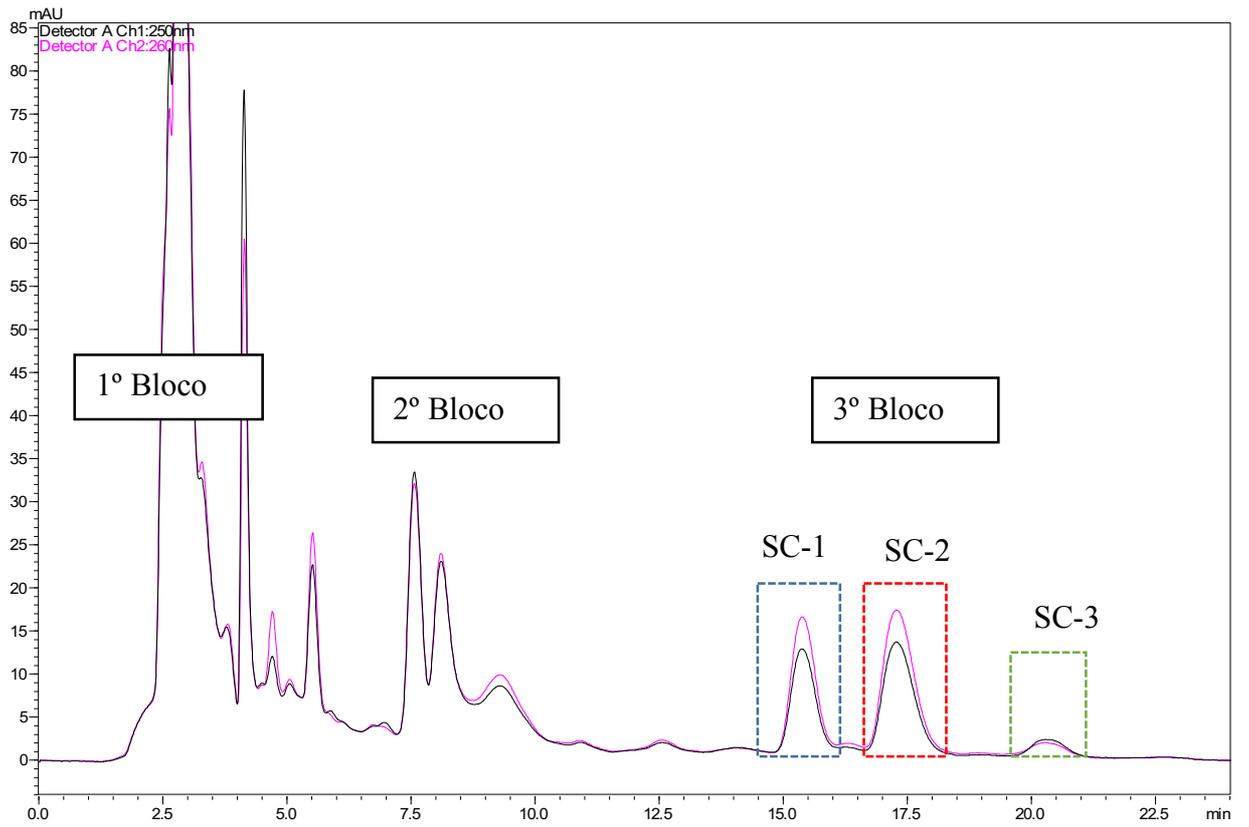


Figura 25- Eluição isocrática acidificada 0,1% ácido fórmico, do extrato bruto aceto etílico de metabólitos secundário de *Streptomyces* sp. MPO11, composta por: fase estacionária: Coluna semi-preparativa Gemini C18 250X 10.0 mm, 5 μ m e fase móvel H₂O:ACN; 80:20, vazão 2mL/min.

5.11 Resultados espectrométricos

Os cromatogramas de *full scan* obtidos via LC-MS para SC-01 (Figura 26), SC-02 (Figura 27) e SC-03 (Figura 28) oriundas do extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11 no modo $[M + H]^+$ e apresentaram perfis distintos de ionização e detecção de mais de um íon, sugerindo que os compostos não estão puros. Entretanto, observou-se que pela intensidade dos picos de cada composto, nota-se que apresentaram mais de 95% de pureza. Também os íons presentes nas amostras foram detectados no intervalo de tempo 0 min até 4 min via LC-MS, esta característica está de acordo com o observado no cromatograma obtido no isolamento via HPLC (Figura 25) e saem no início da eluição cromatográfica em fase reserva, sugerindo que estes compostos são de alta polaridade.

Figura 26- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-01, modo $[M + H]^+$

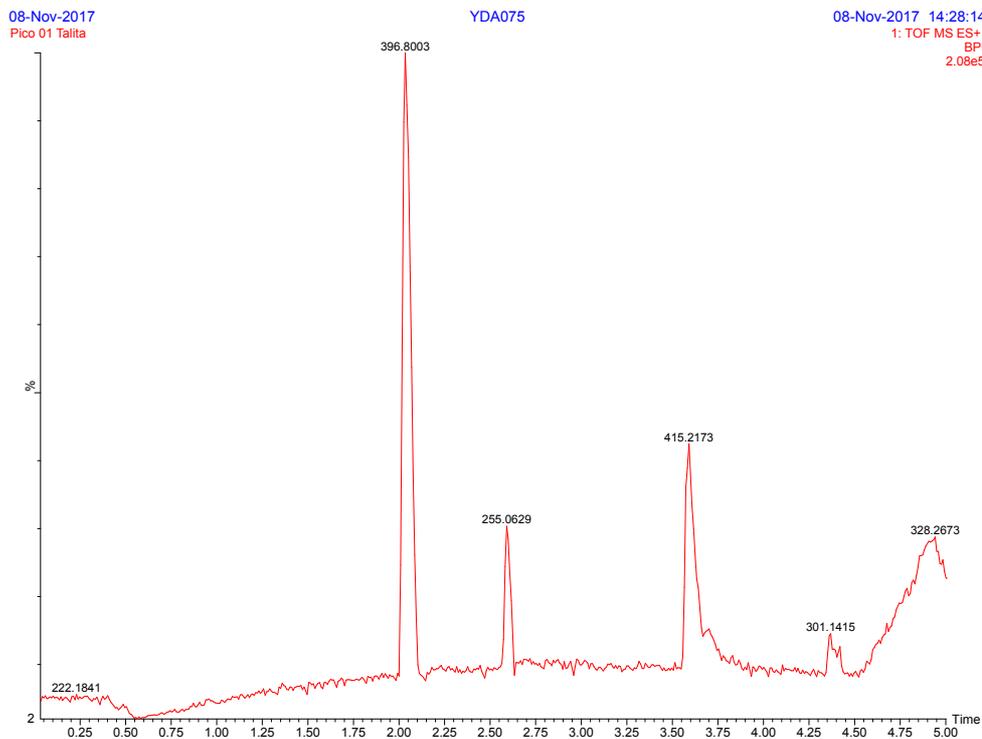
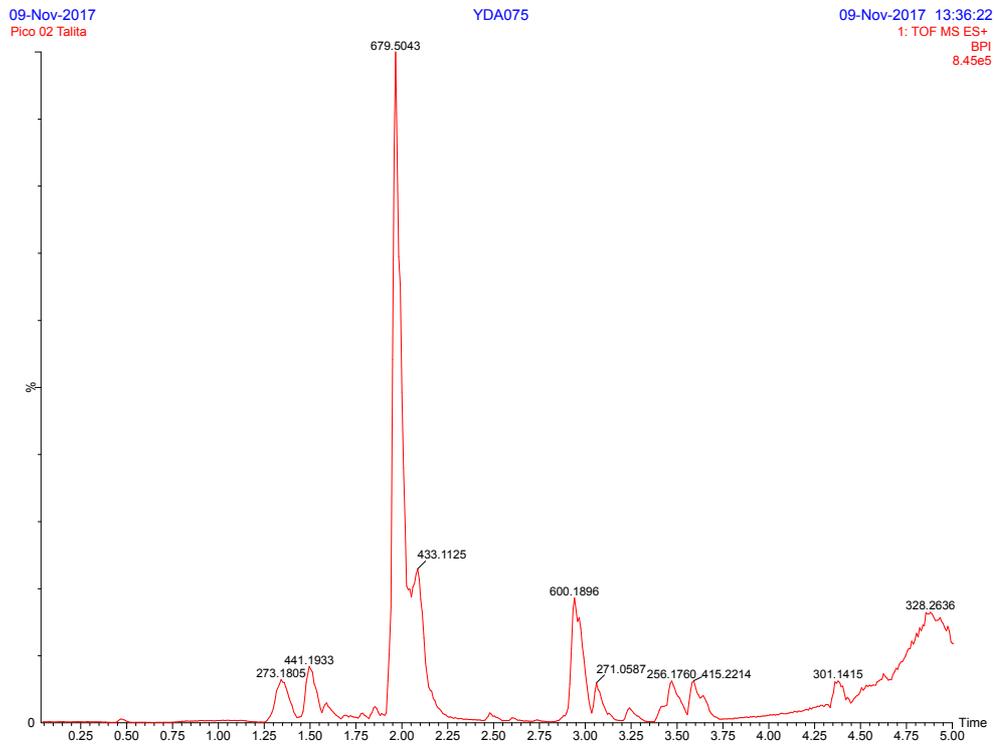
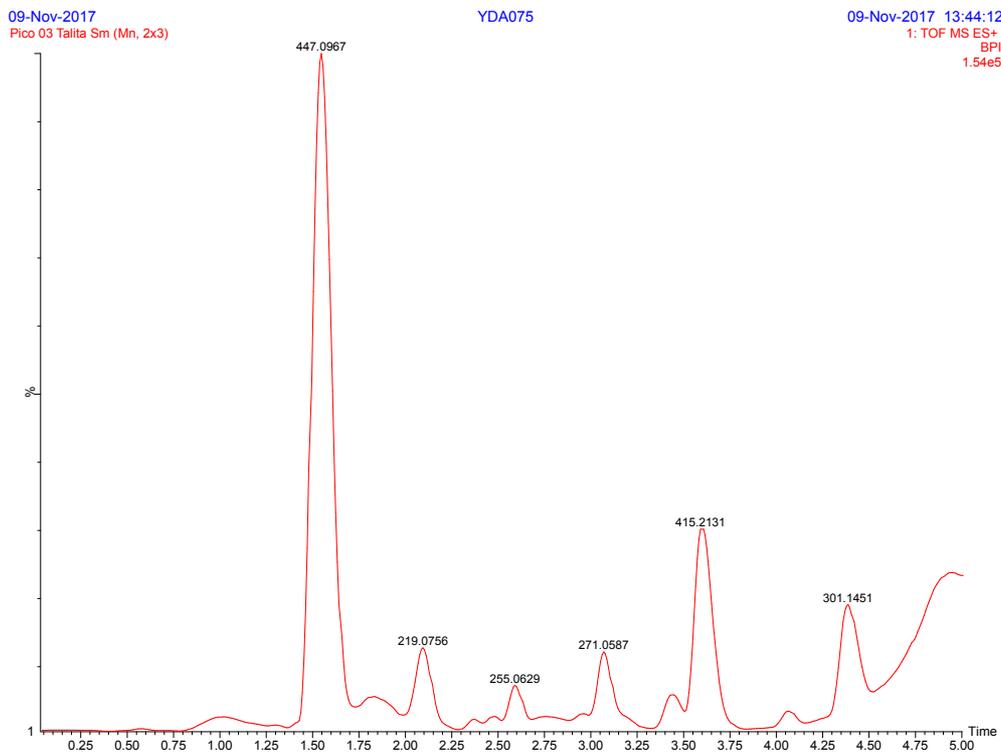


Figura 27- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-02, modo $[M + H]^+$ Figura 28- Cromatograma de full scan via LC-MS para SC-03, modo $[M + H]^+$ 

Dentre os íons detectados nos compostos, avaliou-se os espectros de massas de alta resolução de cada amostra, para auxiliar na elucidação das prováveis classes de metabólitos que foram isolados de *Streptomyces* sp. MPO11.

Os espectros de massas de SC-01 (Figura 29), SC-02 (Figura 30) e SC-03 (Figura 31) apresentaram massas de alta resolução calculadas $[M + H]^+_{\text{Cal}}$ e observadas experimentalmente $[M + H]^+_{\text{Obs}}$ de 792,5972 (m/z), 679,5096 (m/z) e 893,1910 (m/z) respectivamente.

A partir dos dados espectrais foram obtidos: 46 proposições de composição elementar para SC-01 (Anexo N), 40 proposições de composição elementar para SC-02 (Anexo O) e 34 proposições de composição elementar para SC-03 (Anexo P). Através desses valores espectrais, foram utilizados os bancos de dados *on-line* Dictionary of Natural Products (ChemNetBase), Massbank of North American (MoNA) e The PubChem Project (PubChem) afim de tentar identificar os compostos com essas massas e que são produzidos por *Streptomyces*.

Figura 29- O espectro de massas do isolado SC-01, modo $[M + H]^+$



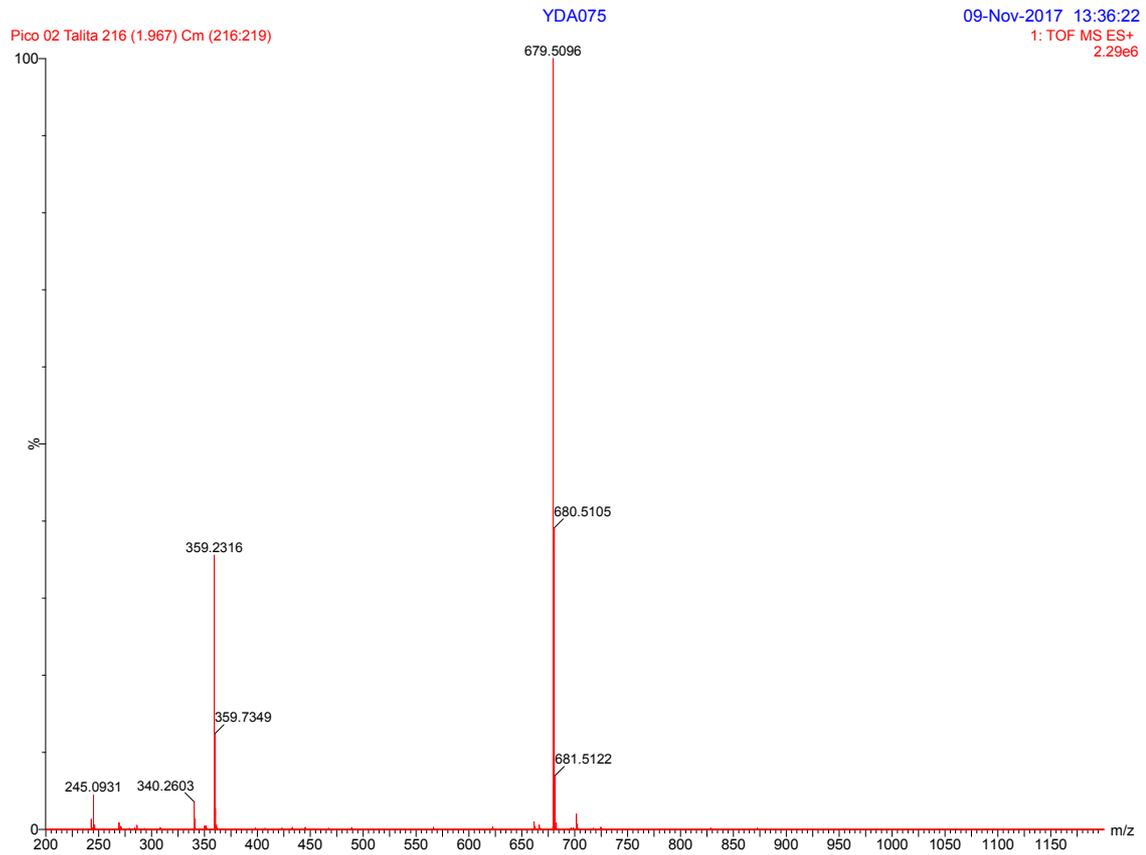
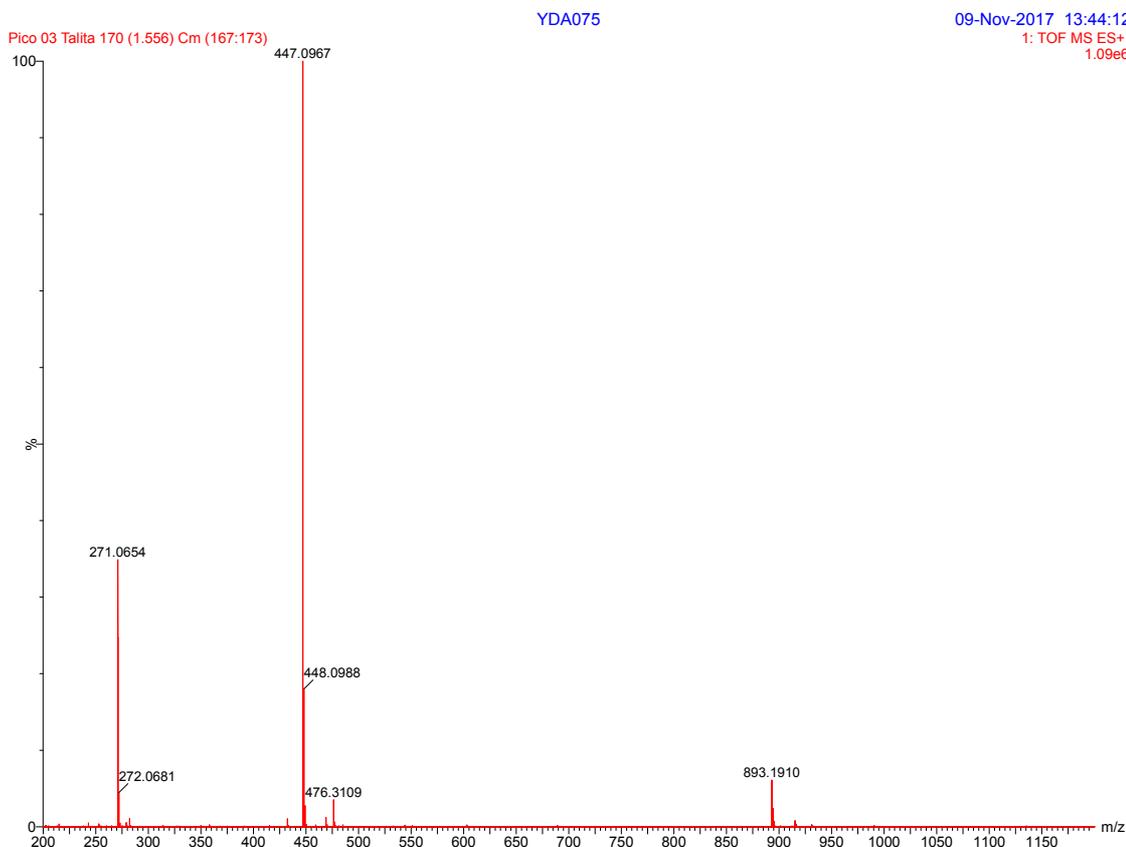
Figura 30- O espectro de massas do isolado SC-02, modo $[M + H]^+$ 

Figura 31- O espectro de massas do isolado SC-03, modo $[M + H]^+$ 

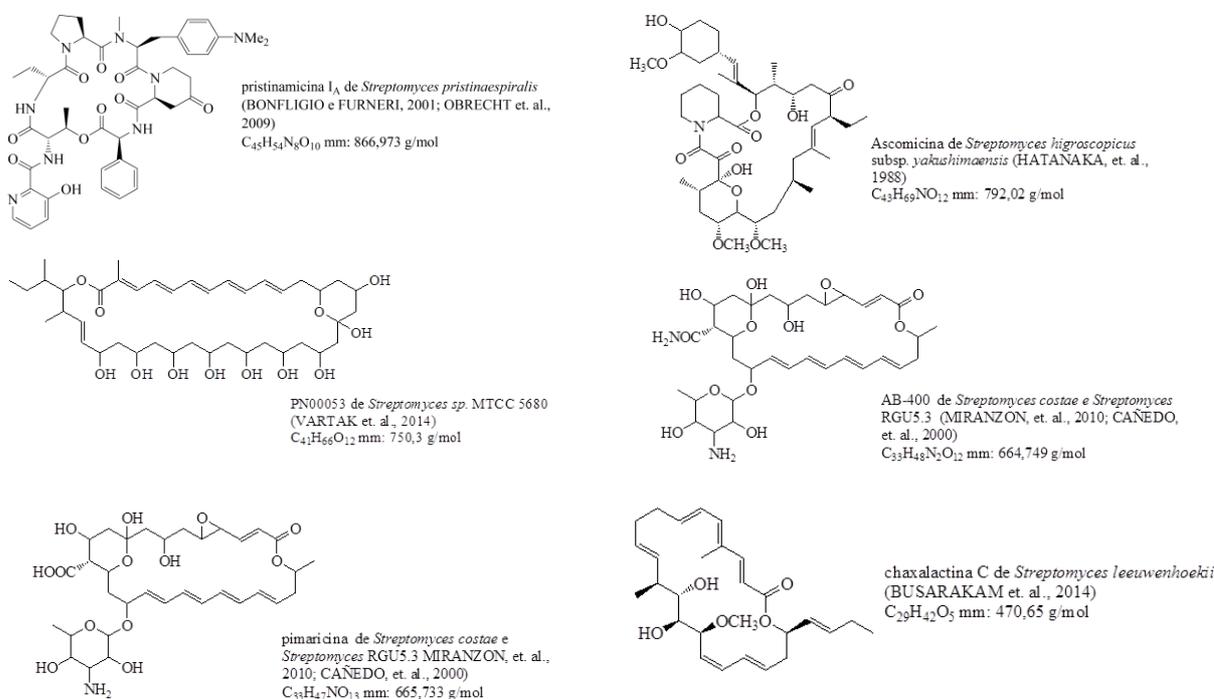
Vale ressaltar que, na consulta dos bancos de dados, não houve resultados satisfatórios tanto para as fórmulas preditas quanto para as massas experimentais encontradas, o que nos sugere ser compostos podem ser inéditos e ainda não descritos na literatura. É importante observar também que, para a caracterização química estrutural de um composto, as análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio-1 e carbono-13 uni e bidimensionais são fundamentais para a elucidação completa dos compostos isolados.

Pelos altos valores de massas/carga dos três compostos isolados e, sabendo-se que no gênero *Streptomyces* é relatado na literatura a ocorrência de lactonas macrocíclicas também conhecidas como macrolídeos, sugere-se que os metabólitos isolados do extrato acetato etílico pertençam a classe dos macrolídeos aliados aos resultados encontrados neste estudo para a atividade antimicrobiana do líquido fermentado e do extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11

Na figura 31 estão algumas estruturas de macrolídeos e suas massas moleculares, já descritas na literatura com seus dados espectrais de RMN e EM e que foram isolados de espécies do gênero *Streptomyces* com potencial antimicrobiano.

A maioria dos antibióticos produzidos pelo gênero *Streptomyces*, são policetídeos, os quais são sintetizados pela condensação de unidade de ácidos carboxílicos. Esse grupo tornou-se importante alvo de estudo devido seu potencial no uso das sínteses policetílicas (PKSs) e por produzir novos policetídeos pela biossíntese combinatória de banco de dados de moléculas sintéticas (LOBATO, 2010).

Figura 32- Substâncias macrocíclicas isoladas do gênero *Streptomyces*.



CONCLUSÃO

Foi isolada 1 linhagem de actinobactérias do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (macacaporanga), identificadas através de micromorfologia e identificação molecular, com 99,9% de similaridade a *Streptomyces cinereus*.

A actinobactéria *Streptomyces* sp. MPO11 apresentou um espectro de ação variando entre bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos filamentosos.

Streptomyces sp. MPO11 produz enzimas de interesse biotecnológico como amilase, hemolisina e L- glutaminase, com alto índice enzimático na produção de lipase.

Houve produção de metabólitos antimicrobianos nos meios M1 e MPE, sendo que o meio MPE foi o mais ativo na produção de metabólitos.

O extrato acetato etílico do cultivo submerso em meio MPE e submetivo a CMI, apresentou sensibilidade aos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* até a concentração 250µg/mL, sendo considerado bactericida nas concentrações de 1000 e 500µg/mL, e bacteriostáticos em 250µg/mL.

O isolamento por cromatografia líquida de alta performance, levou a purificação de 3 compostos oriundos do extrato acetato etílico de *Streptomyces* sp. MPO11 e a análise por espectrometria de massas, levou a identificação das massas moleculares de 792,59 (m/z) para SC-01, 679,50 (m/z) para SC-02 e 893,19 (m/z) para SC-03 sugerindo ser da classe dos macrolídeos.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 798-811, 2015. ISSN 0734-9750.
- ARASU, M. V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. ISSN 1092-2172.
- BATISTA, J. et al. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 69, n. 1, p. 123-129, 2017. ISSN 0102-0935.
- BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BENHADJ, M. et al. Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. **Journal of King Saud University-Science**, 2018. ISSN 1018-3647.
- BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v.65, n. , p. 35-395, 2012.
- BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**. v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 68, n. 1, p. 1-13, Apr 2009. ISSN 0168-6496.
- BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, 2017. ISSN 0882-4010.
- BONFIGLIO, G.; FURNERI, P.M. Novel streptogramin antibiotics. **Expert. Opin. Investig. Drugs**, **2001**, *10*, 185-98.
- BORBA, M. P. Caracterização de isolados de actinobactérias utilizando BOX-PCR e URP-PCR e purificação de composto bioativo produzido por um isolado de *Streptomyces* sp. 2016.
- BRAGA, A. et al. Ciclamicina e ciclacidina. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 39, 1967.
- BRITO, P. H.; DO NASCIMENTO, R. P. **Avaliação do potencial enzimático de actinobactérias isoladas de ambientes costeiros. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro 2016.
- BUSARAKAM, K., BULL, A.T., GIRARD, G. et al. *Streptomyces leeuwenhoekii* sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in *Streptomyces* gene trees. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2014. ISSN1572-9699.
- CANEDO, L. M., COSTA, L., CRIADO L. M., PUENTES, J. L. F. and MORENO, M. A. AB-400, a New Tetraene Macrolide Isolated from *Streptomyces coastae*. **The Journal of Antibiotics** Vol 53, No6, 2000.

CHAROUSOVÁ, I. et al. Streptomyces globosus DK15 and Streptomyces ederensis ST13 as new producers of factumycin and tetrangomycin antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018. ISSN 1517-8382.

CHATER, K.F.; BIRÓ, S.; LEE, K.J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of Streptomyces. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 34, n. 2, p.171-98, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 130, n.6, p. 3670-3695, 2013.

DE LIMA PROCÓPIO, R. E. et al. Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 466-471, 2012.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product - A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 546 pp. 2009. ISBN: 978-0-470-74168-9.

DING, C. et al. High activity xylanase production by E-86. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 20, p. 7-10, 2004. ISSN 0959-3993.

ELBENDARY, A. A. et al. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017. ISSN 1319-562X.

ELIBOL, M & MOREIRA, A.R. (2005). **Process biochemistry**. 40, 1951-1956.

ESCHER, S. K. S. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Aniba parviflora Syn fragans* (Macacaporanga) da Amazônia e avaliação da atividade antimicrobiana. 2016.

FERREIRA, H. K. L. et al. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico. **Revista Brasileira de Gestao Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, n. 6, p. 367-373, 2016. ISSN 2359-1412.

GHOSH, A.; MEHTA, A.; KHAN, A. M. Metagenomic Analysis and its Applications. 2016. ISSN 0128096330.

GOLINSKA, P. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p. 267-289, 2015. ISSN 0003-6072.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119-42, Aug 2010.

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

HATANAKA, H., KINO T., MIYATA, S., INAMURA, N., KURODA, A., GOTO, T., TANAKA, H. and OKUHARA, M. Fr-900520 and fr-900523, novel immunosuppressants isolated from a streptomyces ii. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. **The Journal of Antibiotics**. Vol XLY, No 11, 1988.

HAYAKAWA, M.; YOSHIDA, Y.; LIMURA, Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. **Jornaul of Applied Microbiology, Oxford**, v.96, n. 5, p. 973-981, Jan. 2004.

HOLT, J. et al. Gram-positive cocci. **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins**, p. 544-51, 1994.

HOPWOOD, D.A.; MALPARTIDA, F.; KIESER, H.M.; IKEDA, H., DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B. A. M.; FLOSS, H. G.; OMURA, S. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v. 314, p. 642-644, 1985.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de cobertura vegetal**. Amazônia. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> Acesso em: 14 de Junho de 2017.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol (Praha)**, v. 16, n. 3, p. 218-24, 1971.

INOUE, O.O. **Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de Retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB 20**. Sao Paulo: EPSP. Tese (Doutorado em Engenharia). Escola Politecnica de Sao Paulo, Sao Paulo, 2006.

JACKSON, S. A. et al. Diverse and abundant secondary metabolism biosynthetic gene clusters in the genomes of marine sponge derived *Streptomyces* spp. Isolates. **Marine drugs**, v. 16, n. 2, p. 67, 2018.

JONES, S. E. et al. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. **Elife**, v. 6, 2017.

JONES, S. E.; ELLIOT, M. A. 'Exploring' the regulation of *Streptomyces* growth and development. **Current opinion in microbiology**, v. 42, p. 25-30, 2018. ISSN 1369-5274.

KAMIYAMA T, ITEZONO Y, UMINO T, SATOH T, NAKAYAMA N, YOKOSE K. J. Tetrafabricin, a novem fibrinogen receptor antagonista II. Estrutural elucidation. **The journal of Antibiotics**, vol. 46, n 7, 1993.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016. ISSN 1367-5435.

KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPPEU, T.; ARIMA, K. Antiviral Antibiotic 515-1. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. **The journal of antibiotics**. Tokio, v. 29, n. 3, p. 242-247, 1976.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 211-236, 2002.

KIM, J.-N. et al. Comparative genomics reveals the core and accessory genomes of *Streptomyces* species. **J Microbiol Biotechnol**, v. 25, n. 10, p. 1599-605, 2015.

KODZIUS, R.; GOJOBORI, T. Marine metagenomics as a source for bioprospecting. **Marine genomics**, v. 24, p. 21-30, 2015. ISSN 1874-7787.

LACAZ, C. D. S. et al. **Tratado de micologia médica**: SciELO Brasil 2002.

LAWSON, P. A. The Phylum Actinobacteria. In: (Ed.). **The Bifidobacteria and Related Organisms**: Elsevier, 2018. p.1-8.

LIMA, S. M. D. A.; SILVA, T. G. D. O.; ARAÚJO, J. M. D. C. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paulinia cupana* Kunth. 2013.

- LINS, C. V.; ARAÚJO, J. M. "**Biodiversidade de actinobactérias da rizosfera de plantas da Caatinga.**" Embrapa Meio Ambiente-Resumo em anais de congresso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. Resumo 335-1, 2012.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: (Ed.). **Microbial Processes and Products: Springer**, 2005. p.149-164.
- LOBATO, AKCL. Análise de fluxos metabólitos para otimização da síntese do antibiótico cosmomicina por *Streptomyces olindensis* ICB 20. Natal: UFRGN. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.
- MADIGAN, M. et al. Microbiologia De Brock. 12ª edição, editora Artmed. **Porto Alegre**, 2010.
- MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 4, p. 240-253, 2011.
- MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus spp.* e interação com *Xylella fastidiosa*.** Piracicaba: USP. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- MARIANO, R. L. R., MICHEREFF, S. J., SILVEIRA, E. B., ASSIS, S. M. P., GOMES, A. M. A., & MARIANO, R. **Isolamento de bactérias para testes de antagonismo.** Manual de práticas em Fitobacteriologia. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 115-119 (2000).
- MARQUES, C. A. **Importância econômica da família *Lauraceae* Lindl.** Revista Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.195-206, 2001.
- MATSUURA, T. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.).** Campinas: UEC. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- MATTOSO, E. **Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia.** Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas, Brasil, 2005.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Estratégias no Isolamento de Microrganismos Envolvidos na Degradação de Xenobióticos. **MELO, IS; AZEVEDO, JL Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2008.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais.** Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2005.
- MIRANZO, D., SECO, E. M., CUESTA, T., MALPARTIDA, F. Isolation and characterization of pcsB, the gene for a polyene carboxamide synthase that tailors pimaricin into AB-400. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010. 85:1809–1819.
- NERY, L. L. D. A. Avaliação das atividades antimicrobiana e anticâncer de metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp UFPEDA 3407. 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016. ISSN 0163-3864.

NGUYEN, P.-A. et al. Biocontrol of *Fusarium verticillioides* using organic amendments and their actinomycete isolates. **Biological Control**, 2017. ISSN 1049-9644.

NIU, G. Genomics-Driven Natural Product Discovery in Actinomycetes. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 238-241, 2018. ISSN 0167-7799.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. The distribution of actinomycetes in soil. VI. A selective plate culture isolation method for *Microbispora* and *Streptosporangium* strains Part I. **J. Ferm. Technol**, v. 47, p. 463-469, 1969.

OBRECHT, D., ROBINSON, J.A., BERNARDINI, F., BISANG, C. , DEMARCO, S.J., MOEHLE, K. AND GOMBERT, F.O. Recent Progress in the Discovery of Macrocyclic Compounds as Potential Anti-Infective Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, 2009, 16, 42-65.

OHNISHI, Y.; ISHIKAWA, J.; HARA, H.; SUZUKI, H.; IKENOYA, M.; IKEDA, H.; YAMASHITA, A.; HATTORI, M.; HORINOUCI, S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal Bacteriology**, v.190. n. 11, p. 4050-4060, 2008.

OLIVEIRA, J. et al. Caracterização e identificação de actinobactérias de interesse biotecnológico isoladas de solo do cerrado. Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE), In: SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG, 4., 2017, Belo Horizonte. Metabolismo microbiano: saúde, ambiente e biotecnologia: resumos. Belo Horizonte: UFMG, 2017. p. 215.

OMURA, S.; IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; TAKAHASHI, C.; SHINOSE, M.; TAKAHASHI, Y.; HORIKAWA, H.; NAKAZAWA, H.; OSONOE, T.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98. n. 21, p. 12215-20, 2001.

PETROVA, D.; VLAHOV, S. Taxonomic Characterization of the Thermophilic Actinomycete Strain 21e–Producer of Thermostable Collagenase. **Journal of Culture Collections**, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2006.
PORSANI, M. V. Otimização da produção de actinomicinas e potencial antimicrobiano e entomopatogênico de *Streptomyces longwoodensis* isolado da região entre-marés da Ilha do Mel, Pr, Brasil. 2015.

PRIDHAM, T. G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiot Annu**, p. 947-53, 1956.

PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. **Appl Microbiol**, v. 6, n. 1, p. 52-79, Jan 1958. ISSN 0003-6919.

PUPO, M. T.; GUIMAR ES, D.O.; FURTADO; N. A. C.; BORGES, S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In Carlton A. Taft. Org. **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2006, p. 51-7.

QIN, S. et al. Draft genome sequence of marine *Streptomyces* sp. strain W007, which produces angucyclinone antibiotics with a benz[a]anthracene skeleton. **J Bacteriol**, v. 194, n. 6, p. 1628-9, Mar 2012. ISSN 0021-9193.

REMALI, J. et al. Genomic characterization of a new endophytic *Streptomyces kebangsaanensis* identifies biosynthetic pathway gene clusters for novel phenazine antibiotic production. **PeerJ**, v. 5, p. e3738, 2017. ISSN 2167-8359.

REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. SEBRAE-AM/INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Manaus – AM, 444 p. 2002.

SAHMOUNE, M. N. Performance of *Streptomyces rimosus* biomass in biosorption of heavy metals from aqueous solutions. **Microchemical Journal**, 2018. ISSN 0026-265X.

SALAMONI, S.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas**. Porto Alegre: UFRGS. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SANGKANU, S. et al. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. **Microbial pathogenesis**, v. 112, p. 303-312, 2017. ISSN 0882-4010.

SANTANA, R. C. F. D. Potencial biotecnológico de actinobactérias da coleção UFPEDA contra *Candida* spp. 2015.

SHE, W. et al. *Streptomyces alfalfae* sp. nov. and comparisons with its closest taxa *Streptomyces silaceus*, *Streptomyces flavofungini* and *Streptomyces intermedius*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 1, p. 44-49, 2016. ISSN 1466-5034.

SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst.* 1966.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA-LACERDA, G. et al. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2016.

SILVA, I. R. D. Caracterização de compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* sp. 2016.

SINGH, H. et al. Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. **Annals of Agrarian Science**, 2017. ISSN 1512-1887.

SMITH, J. R.; ROBERTS, K. D.; RYBAK, M. J. Dalbavancin: a novel lipoglycopeptide antibiotic with extended activity against Gram-positive infections. **Infectious diseases and therapy**, v. 4, n. 3, p. 245-258, 2015. ISSN 2193-8229.

SMITH, S.A.; TANK, D.C.; BOULANGER, L.A.; BASCOM-SLACK, C.A., EISENMAN, K.; et al. Bioactive Endophytes Warrant Intensified Exploration and Conservation. **Plos One**, v.3, p. 30-52, 2008.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M. “Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968.” **Scientia Plena**, 8 (12): 01–07. 2012.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI, F.S.; Pinheiro, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazonia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SRINIVASAN, M. C.; LAXMAN, R. S.; DESHPANDE, M. V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 7, n. 2, p. 171-84, Mar 1991. ISSN 0959-3993.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. **Methods Mol Biol**, v. 226, p. 53-4, 2003.

STROBEL, G.A.; EZRA, D.; CASTILHO, U. A question concerning the identity of *Streptomyces* sp. MSU-2110. **Microbiology**, v.150, p. 3094-3096, 2004.

TAN, G.-Y.; LIU, T. Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in actinobacteria. **Metabolic engineering**, v. 39, p. 228-236, 2017. ISSN 1096-7176.

THAKUR, D. et al. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 17, n. 4, p. 242-249, 2007.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713541.

TRAXLER, M. F.; KOLTER, R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. **Natural product reports**, v. 32, n. 7, p. 956-970, 2015.

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

VARTAK, A., MUTALIK, V., PARAB, R.R., SHANBHAG, P., BHAVE S., MISHRA, P.D. and MAHAJAN, G.B. Isolation of a new broad spectrum antifungal polyene from *Streptomyces* sp. MTCC 5680. **Letters in Applied Microbiology**, 2014. ISSN 0266-8254

VASCONCELLOS, R. L. F. D. et al. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

WANG, L. et al. Identification of genetic variations associated with epsilon-poly-lysine biosynthesis in *Streptomyces albulus* ZPM by genome sequencing. **Scientific reports**, v. 5, p. 9201, 2015. ISSN 2045-2322.

WILLIAMS, S.; SHARPE, M.; HOLT, J. **Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4. Williams and Wilkins, London**. ISBN 0-68309-061-5. 1989.

ZHANG, G. et al. Advanced tools in marine natural drug discovery. **Current opinion in biotechnology**, v. 42, p. 13-23, 2016. ISSN 0958-1669.

ZHAO, J., LI, D., JIANG, H. et al. *Streptomyces xiangluensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2018. ISSN1572-9699.

ZHAO, P. et al. Actinobacteria-Derived Peptide Antibiotics since 2000. **Peptides**, 2018. ISSN 0196-978.

ANEXO A. Composição do meio ISP-1.

Componentes*	Concentração (g/L)
Triptona,	5
Extrato de levedura	3
Ágar	15

*pH 7,0-7,2

ANEXO B. Composição do meio ISP-2.

Componentes*	Concentração (g/L)
Extrato de malte	10
Extrato de levedura	4
Glicose	4
Ágar	15

*pH 7,2.

ANEXO C. Composição do meio ISP-3.

Componentes*	Concentração (g/L)
Farinha de aveia	20
Extrato de levedura	3
Ágar	15
Solução traço de sais	1 mL

*Solução traço de sais (1 ml/L): FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂. 4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

ANEXO D. Composição do meio ISP-4.

Componentes*	Concentração (g/L)
Amido solúvel	20
Extrato de levedura	3
K ₂ HPO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	2
NaCl	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
CaCO ₃	4
Ágar	15g
Solução traço de sais	1mL

*Solução traço de sais (1 ml/L): FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂. 4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

ANEXO E. Composição do meio ISP-5.

Componentes*	Concentração (g/L)
L-asparagina	1
Glicerol	10
K ₂ HPO ₄	1
Ágar	15g
Solução traço de sais	1mL

*Solução traço de sais (1 ml/L): FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂. 4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

ANEXO F. Composição do meio BDA.

Componentes*	Concentração (g/L)
Batata	200
Glicose	20
Ágar	15g

*pH 6,8.

ANEXO G. Composição do meio ALA.

Componentes*	Concentração (g/L)
L-Arginina	0,3
Glicose	1
K ₂ HPO ₄	0,3
Ágar	17
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,3
Extrato de levedura	1
Solução traço de sais	1 mL

*Solução traço de sais (1 ml/L): FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂. 4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

ANEXO H. Composição do meio TSA.

Componentes*	Concentração (g/L)
Triptona	1,5
Peptona de soja	0,5
NaCl	1,5
Ágar	15g

*pH 7,3.

ANEXO I. Composição do meio AN.

Componentes*	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	3
NaCl	5
Ágar	15g

*pH 6,9.

ANEXO J. Composição do meio SDA

Componentes*	Concentração (g/L)
Peptona micológica	10
Dextrose	40
Ágar	15g

*pH 5,6.

ANEXO K. Composição do meio M1.**Tabela 13** - Composição do meio M1.

Componentes*	Concentração (g/L)
Glicose	10
Farinha de soja	10
NaCl	5
CaCO ₃	1

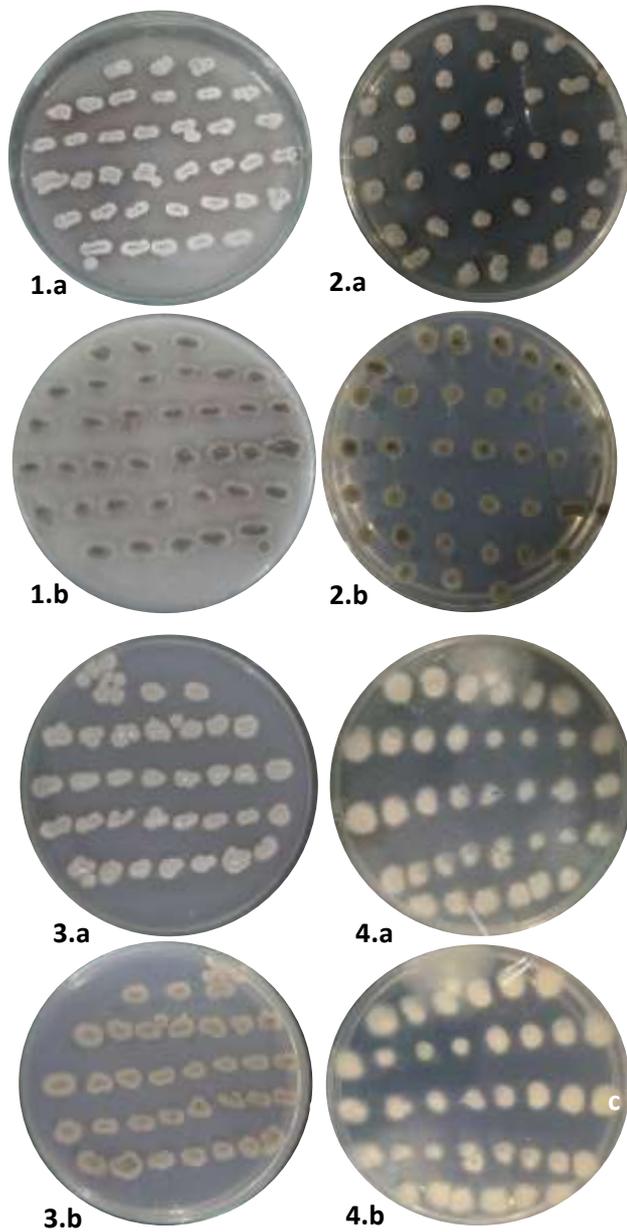
*pH 7,0.

ANEXO L. Composição do meio MPE.

Componentes*	Concentração (g/L)
Glicose	20
Farinha de soja	20
NaCl	20
CaCO ₃	2

*pH 6,7 – 7,0.

ANEXO M. Linhagem MPO11 nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP2; 2. ALA; 3. GAA; 4.CAA. a. Micélio aéreo; b. Micélio vegetativo.



ANEXO N: Proposições de composição elementar para SC-01

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

10445 formula(e) evaluated with 46 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-30 O: 0-30 Na: 0-1

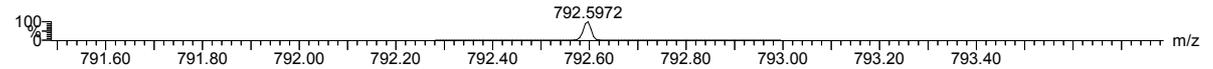
YDA075

08-Nov-2017 14:28:14

Pico 01 Talita 223 (2.035) Cm (222:229)

1: TOF MS ES+

9.47e+005



Minimum: -1.5
 Maximum: 10.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
792.5972	792.5970	0.2	0.3	7.5	C27 H67 N27 Na
	792.5976	-0.4	-0.5	12.5	C43 H74 N11 O3
	792.5968	0.4	0.5	0.5	C27 H74 N19 O8
	792.5966	0.6	0.8	3.5	C44 H83 N O9 Na
	792.5979	-0.7	-0.9	8.5	C45 H79 N5 O5 Na
	792.5963	0.9	1.1	7.5	C42 H78 N7 O7
	792.5981	-0.9	-1.1	5.5	C28 H70 N23 O4
	792.5984	-1.2	-1.5	1.5	C30 H75 N17 O6 Na
	792.5957	1.5	1.9	2.5	C26 H71 N23 O4 Na
	792.5954	1.8	2.3	6.5	C24 H66 N29 O2
	792.5990	-1.8	-2.3	6.5	C46 H82 N O9
	792.5952	2.0	2.5	9.5	C41 H75 N11 O3 Na
	792.5992	-2.0	-2.5	13.5	C46 H75 N9 O Na
	792.5949	2.3	2.9	2.5	C41 H82 N3 O11
	792.5995	-2.3	-2.9	10.5	C29 H66 N27
	792.5995	-2.3	-2.9	-0.5	C31 H78 N13 O10
	792.5949	2.3	2.9	13.5	C39 H70 N17 O
	792.5997	-2.5	-3.2	6.5	C31 H71 N21 O2 Na
	792.6003	-3.1	-3.9	11.5	C47 H78 N5 O5
	792.5941	3.1	3.9	1.5	C23 H70 N25 O6
	792.5939	3.3	4.2	4.5	C40 H79 N7 O7 Na
	792.6008	-3.6	-4.5	4.5	C32 H74 N17 O6
	792.5936	3.6	4.5	8.5	C38 H74 N13 O5
	792.6011	-3.9	-4.9	0.5	C34 H79 N11 O8 Na
	792.5930	4.2	5.3	3.5	C22 H67 N29 O2 Na
	792.6016	-4.4	-5.6	16.5	C48 H74 N9 O
	792.6019	-4.7	-5.9	12.5	C50 H79 N3 O3 Na
	792.5925	4.7	5.9	10.5	C37 H71 N17 O Na
	792.5925	4.7	5.9	-0.5	C39 H83 N3 O11 Na
	792.6021	-4.9	-6.2	-1.5	C35 H82 N7 O12
	792.5923	4.9	6.2	3.5	C37 H78 N9 O9
	792.6021	-4.9	-6.2	9.5	C33 H70 N21 O2
	792.6024	-5.2	-6.6	5.5	C35 H75 N15 O4 Na
	792.5917	5.5	6.9	-1.5	C21 H71 N25 O6 Na
	792.6029	-5.7	-7.2	-1.5	C20 H71 N27 O5 Na
	792.5912	6.0	7.6	5.5	C36 H75 N13 O5 Na
	792.6035	-6.3	-7.9	3.5	C36 H78 N11 O8
	792.5909	6.3	7.9	-1.5	C36 H82 N5 O13
	792.5909	6.3	7.9	9.5	C34 H70 N19 O3
	792.6038	-6.6	-8.3	-0.5	C38 H83 N5 O10 Na
	792.6038	-6.6	-8.3	10.5	C36 H71 N19 Na
	792.5904	6.8	8.6	16.5	C49 H74 N7 O2
	792.5898	7.4	9.3	0.5	C35 H79 N9 O9 Na
	792.5896	7.6	9.6	4.5	C33 H74 N15 O7
	792.6048	-7.6	-9.6	8.5	C37 H74 N15 O4
	792.6051	-7.9	-10.0	4.5	C39 H79 N9 O6 Na

ANEXO O: Proposições de composição elementar para SC-02.

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

8356 formula(e) evaluated with 40 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-30 O: 0-30 Na: 0-1

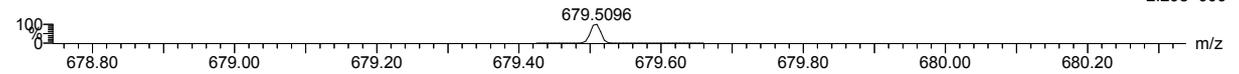
YDA075

09-Nov-2017 13:36:22

Pico 02 Talita 216 (1.967) Cm (216:219)

1: TOF MS ES+

2.29e+006



Minimum: -1.5
Maximum: 10.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
679.5096	679.5095	0.1	0.1	7.5	C32 H63 N12 O4
	679.5098	-0.2	-0.3	3.5	C34 H68 N6 O6 Na
	679.5100	-0.4	-0.6	0.5	C17 H59 N24 O5
	679.5090	0.6	0.9	14.5	C47 H67 O3
	679.5090	0.6	0.9	2.5	C16 H56 N28 O Na
	679.5085	1.1	1.6	-1.5	C33 H72 N2 O10 Na
	679.5085	1.1	1.6	9.5	C31 H60 N16 Na
	679.5109	-1.3	-1.9	12.5	C33 H59 N16
	679.5109	-1.3	-1.9	1.5	C35 H71 N2 O10
	679.5082	1.4	2.1	2.5	C31 H67 N8 O8
	679.5111	-1.5	-2.2	8.5	C35 H64 N10 O2 Na
	679.5114	-1.8	-2.6	5.5	C18 H55 N28 O
	679.5116	-2.0	-2.9	1.5	C20 H60 N22 O3 Na
	679.5073	2.3	3.4	1.5	C13 H55 N30 O3
	679.5071	2.5	3.7	4.5	C30 H64 N12 O4 Na
	679.5122	-2.6	-3.8	6.5	C36 H67 N6 O6
	679.5068	2.8	4.1	8.5	C28 H59 N18 O2
	679.5125	-2.9	-4.3	2.5	C38 H72 O8 Na
	679.5066	3.0	4.4	11.5	C45 H68 O3 Na
	679.5127	-3.1	-4.6	-0.5	C21 H63 N18 O7
	679.5063	3.3	4.9	15.5	C43 H63 N6 O
	679.5058	3.8	5.6	-0.5	C29 H68 N8 O8 Na
	679.5135	-3.9	-5.7	11.5	C37 H63 N10 O2
	679.5055	4.1	6.0	3.5	C27 H63 N14 O6
	679.5138	-4.2	-6.2	7.5	C39 H68 N4 O4 Na
	679.5140	-4.4	-6.5	4.5	C22 H59 N22 O3
	679.5050	4.6	6.8	10.5	C42 H67 N2 O5
	679.5049	4.7	6.9	-1.5	C11 H56 N30 O3 Na
	679.5143	-4.7	-6.9	0.5	C24 H64 N16 O5 Na
	679.5044	5.2	7.7	5.5	C26 H60 N18 O2 Na
	679.5149	-5.3	-7.8	5.5	C40 H71 O8
	679.5042	5.4	7.9	9.5	C24 H55 N24
	679.5042	5.4	7.9	-1.5	C26 H67 N10 O10
	679.5152	-5.6	-8.2	12.5	C40 H64 N8 Na
	679.5039	5.7	8.4	12.5	C41 H64 N6 O Na
	679.5154	-5.8	-8.5	-1.5	C25 H67 N12 O9
	679.5157	-6.1	-9.0	5.5	C25 H60 N20 O Na
	679.5031	6.5	9.6	0.5	C25 H64 N14 O6 Na
	679.5162	-6.6	-9.7	10.5	C41 H67 N4 O4
	679.5028	6.8	10.0	4.5	C23 H59 N20 O4

ANEXO P: Proposições de composição elementar para SC-03

Elemental Composition Report

Page 1

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

3108 formula(e) evaluated with 34 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-50 H: 0-100 N: 0-30 O: 0-30 Na: 0-1

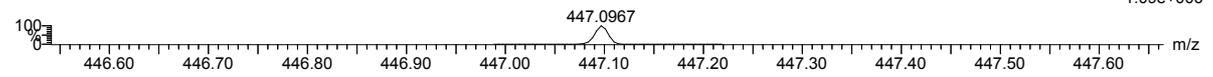
YDA075

09-Nov-2017 13:44:12

Pico 03 Talita 170 (1.556) Cm (167:173)

1: TOF MS ES+

1.09e+006



Minimum: -1.5
Maximum: 10.0 10.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
447.0967	447.0970	-0.3	-0.7	23.5	C26 H12 N6 O Na
	447.0962	0.5	1.1	11.5	C10 H12 N14 O6 Na
	447.0962	0.5	1.1	0.5	C12 H24 O16 Na
	447.0973	-0.6	-1.3	20.5	C9 H3 N24
	447.0973	-0.6	-1.3	9.5	C11 H15 N10 O10
	447.0975	-0.8	-1.8	16.5	C11 H8 N18 O2 Na
	447.0975	-0.8	-1.8	5.5	C13 H20 N4 O12 Na
	447.0959	0.8	1.8	4.5	C10 H19 N6 O14
	447.0959	0.8	1.8	15.5	C8 H7 N20 O4
	447.0957	1.0	2.2	18.5	C25 H16 N2 O5 Na
	447.0954	1.3	2.9	22.5	C23 H11 N8 O3
	447.0981	-1.4	-3.1	21.5	C27 H15 N2 O5
	447.0949	1.8	4.0	6.5	C9 H16 N10 O10 Na
	447.0986	-1.9	-4.2	14.5	C12 H11 N14 O6
	447.0948	1.9	4.2	17.5	C7 H4 N24 Na
	447.0986	-1.9	-4.2	3.5	C14 H23 O16
	447.0946	2.1	4.7	10.5	C7 H11 N16 O8
	447.0946	2.1	4.7	-0.5	C9 H23 N2 O18
	447.0989	-2.2	-4.9	10.5	C14 H16 N8 O8 Na
	447.0941	2.6	5.8	17.5	C22 H15 N4 O7
	447.0994	-2.7	-6.0	26.5	C28 H11 N6 O
	447.0997	-3.0	-6.7	22.5	C30 H16 O3 Na
	447.0999	-3.2	-7.2	19.5	C13 H7 N18 O2
	447.0999	-3.2	-7.2	8.5	C15 H19 N4 O12
	447.0935	3.2	7.2	1.5	C8 H20 N6 O14 Na
	447.0935	3.2	7.2	12.5	C6 H8 N20 O4 Na
	447.1002	-3.5	-7.8	15.5	C15 H12 N12 O4 Na
	447.0932	3.5	7.8	5.5	C6 H15 N12 O12
	447.0932	3.5	7.8	16.5	C4 H3 N26 O2
	447.0930	3.7	8.3	19.5	C21 H12 N8 O3 Na
	447.1004	-3.7	-8.3	1.5	H15 N16 O13
	447.0927	4.0	8.9	23.5	C19 H7 N14 O
	447.0927	4.0	8.9	12.5	C21 H19 O11
	447.1007	-4.0	-8.9	8.5	H8 N24 O5 Na

