



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DE METABÓLITO SECUNDÁRIO DE *Streptomyces* sp., SUA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE; IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DA ACTINOBACTÉRIA**

**CAMILA BEATRIZ ATANÁSIO BORBA**

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho  
Coorientadora: Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

**Recife - PE  
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DE METABÓLITO SECUNDÁRIO DE *Streptomyces* sp., SUA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE; IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DA ACTINOBACTÉRIA**

**CAMILA BEATRIZ ATANÁSIO BORBA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obter do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho.

Coorientadora: Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva

**Recife – PE  
2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Borba, Camila Beatriz Atanásio**

**Avaliação de metabólito de *Streptomyces* sp., sua atividade antimicrobiana e citotoxicidade; identificação morfológica e molecular da actinobactéria/ Recife: O Autor, 2016.**

**64 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**

**Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira Silva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2016.**

*Inclui referências e anexos*

- 1. Antibióticos 2. Bactérias 3. Antioxidantes I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Silva, Leonor Alves de Oliveira (coorientadora) III. Título**

**615.329**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2017-027**

**CAMILA BEATRIZ ATANÁSIO BORBA**

**AVALIAÇÃO DE METABÓLITO SECUNDÁRIO DE *Streptomyces* sp., SUA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE; IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DA ACTINOBACTÉRIA**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco, como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 28/07/2016

BANCA EXAMINADORA

---

PROF.<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> LUANA CASSANDRA BREITEN BARROSO  
ORIENTADORA (PRESIDENTE)

---

PROF.<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> NORMA BUARQUE GUSMÃO  
1º EXAMINADOR

---

PROF.<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> LEONOR ALVES DE OLIVEIRA DA SILVA  
2º EXAMINADOR

---

PROF..<sup>a</sup> DR SEBASTIÃO JOSÉ DE MELO  
1º SUPLENTE

---

PROF.<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup> ELBA VERÔNICA MATOSO MACIEL DE CARVALHO  
2º SUPLENTE

:

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, senhor da vida e do tempo, por ter me guardado e me acalentado nos momentos difíceis. Por ser sempre bom e me permitir que minha vida fosse cheia de graça.

Aos meus pais, ao meu irmão e minha cunhada, minha família e base. Obrigada por estarem sempre presente na minha vida, se alegrarem com minhas vitórias, e acima de tudo por tratarem o pequeno Navi, como filho. Eu não poderia estar voando tão alto sem que vocês estivessem me impulsionando.

A minha orientadora Luana Cassandra, por ter aceitado a tarefa de me orientar. Obrigada por todas as correções, pelos puxões de orelha e os “graças e louvores ao Senhor!”, no final dessa jornada descobri que ganhei mais uma pessoa que deseja a mim o que há de melhor neste mundo.

A minha mãe científica Leonor Alves, a qual divido quase tudo da minha vida. Como costumamos dizer, a senhora é mais que minha orientadora! Um ser lindo que está comigo mesmo estando longe, que em apenas 1h consegue resolver todos os meus problemas. Obrigada por ser tão parceira, por botar no rosto aquele sorriso quando aconteceram coisas boas comigo e me oferecer colo, comida, água e tudo que pudesse me fazer ficar um pouco mais feliz nos momentos tristes. Como sempre digo no laboratório, não vou largar a senhora fácil. Ainda vai me aguentar por mais uns anos.

A minha ori 3, Norma Gusmão. Aquela que consegue “puxar a orelha” dos alunos sem levantar a voz ou fazer “cara feia”. Exemplo de liderança e sabedoria, a mãe da nossa família LAMAI, está sempre disposta a ajudar e instruir. Obrigada por todos os socorros, no laboratório e na vida pessoal. Obrigada pelo “Bom dia meninos”, “Camila você está ocupada, pode me ajudar a fazer uns MICs?” e principalmente “Camila venha cá, você está bem? Sente vamos conversar! Você precisa encontrar seu ponto isoeletrico”.

Aos meus queridos, Pérsio e Erik, meus irmãos mais velhos. Os homens da força, a braçal e a espiritual. Meus parceiros de jornada, com vocês aprendi a ser mais compreensiva, mais paciente, e acabei amadurecendo um pouco. A vocês agradeço todo o carinho e cuidado que irmãos têm com sua caçula, pelas palavras ditas, pela ajuda e pela doação a este ser tão pequeno.

Ao querido Rafael Lopes, meu índio favorito. Obrigada por me empurrar para frente, pela empolgação com meu mestrado, por estar sempre disposto a ajudar sua pupila. Te agradeço por desde o início da minha vida na bancada querer que eu cresça cada vez mais, mesmo que isso tivesse incluído brigas e choros. Sua presença e opinião sempre serão importantes pra mim.

Aos meus pupilos, Nínive, Augusto e Vinicius. O que seria da minha vida de pós-graduanda sem meus estagiários? NADA! Agradeço por toda prestatividade, pela bancada compartilhada, pelas risadas e por me ajudarem a aprender o que é ser orientadora.

As minha amigas de turma Iasmim, Leila, Wellma, Bela e Nel, com vocês compartilhei a alegria de ser aprovada no mestrado, o peso das disciplinas, a agonia dos seminários, as dúvidas antes das provas e os primeiros passos para me tornar uma pequena pesquisadora. Obrigada pelo companheirismo, vocês são parte da minha família e vou querer o bem de vocês pra sempre.

Aos lindos do LAMAI, em especial Robson, Patricia, Raphael e San Miris, obrigada por formarem o laboratório mais feliz que já conheci. Mesmo cheio de problemas e com dificuldades, nós conseguimos ser uma árvore de bons frutos, com raízes fortes e galhos flexíveis que nos deixam envergar, mas tombar nunca.

Aos amigos o Laboratório de Imunoepidemiologia, os “tuberculetes”. Agradeço por me acolherem com tanta alegria, paciência e energia boa. Agradeço a vocês por torcerem por mim desde a seleção até os experimentos do mestrado. Guardarei os dias felizes que tive com vocês dentro do coração.

Ao Prof. Rafael Ximenes, por “topar” dedicar um pouco do seu precioso tempo, aos meus experimentos, pelos aconselhamentos e ensinamentos.

A Larissa e a Profa. Dra. Regina Bressan, pela parceria, disponibilidade e ajuda.

À FACEPE pelo apoio financeiro durante todo o mestrado.

A Adenilda e a Marcelo, secretários do PPGCB/UFPE por sempre serem prestativos e dispostos a *resolver* minhas broncas.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e  
o amor, estes três, mas o maior destes é o  
amor.

**1 Coríntios 13:13-13**

## RESUMO

O crescente número de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos leva à busca para estudos de diferentes compostos bioativos. Neste contexto visando a busca de novos antimicrobianos, as actinobactérias vem sendo estudadas por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos, antioxidantes, compostos terpenóides, enzimas e antimicrobianos. Dentro do filo o gênero *Streptomyces* ganha destaque pois produzem 80% dos antibióticos conhecidos. Tendo em vista o potencial destes microrganismos para produção de compostos bioativos este trabalho tem objetivo produzir metabólito secundário de *Streptomyces hygroscopicus* avaliar sua atividade antimicrobiana, antioxidante e citotoxicidade, bem como detectar as classes de compostos presentes, além de identificar morfológica e molecularmente a actinobactéria produtora. Inicialmente a atividade antimicrobiana foi realizada através de teste em difusão de poço, onde o extrato acetato de etila (EA) mostrou atividade frente a *B. Subtillis* (23,61mm) e *S. aureus* (21,61mm), o extrato metanólico (EM) e extrato hexânico (EH) frente as mesmas bactérias teste *C. Kruzi* (EM:11,92mm, AH: 8,86mm), *B.subtillis* (EM: 18,07mm, EH: 18,07mm), *S. aureus* (EM: 15,24mm, EH: 29,66mm), *P. aeruginosa* (EM: 20,95mm, EH:17,91), com exceção da *E.coli* (EM:12,87mm) em seguida foi executado CMI com 4 bactérias testes que apresentaram maior halo de inibição e *Micobacterium tuberculosis* ATCC. Grande parte dos extratos estudados mostraram atividade inibitória frente aos microrganismos testes quando em concentração de 10mg/mL, Já o extrato Acetato de etila (EA) frente a *B.subtillis*, e Metanólico frente a *B.subtillis* e *P. aeruginosa* obtiveram MIC > 10mg/mL, o extrato hexânico (EH) apresentou MIC de 1,25 mg/mL frente a *B.subtillis*. Os extratos apresentaram as seguintes valores de MIC, 5mg (EA), 2,5mg (EM) e 1,25mg (EH), frente a *Micobacterium tuberculosis*. Ao realizar a atividade antioxidante dos extratos através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC<sub>50</sub>: 3,4916 mg/mL (EA), 2,0880 mg/mL (EM). Quando utilizado o método ABTS o extrato Acetato de etila (1,485 mg/mL) observou-se o pico de porcentagem de inibição do radical ABTS de 19,3548, e para o extrato metanólico (0,285 mg/mL), 19,7947. A detecção das classes de compostos foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde foram encontradas as seguintes classes: Protoantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, cumarinas e saponinas no extrato metanólico, já no extrato acetato de etila foram encontrados derivados cinâmicos, triterpenos e esteroides. A citotoxicidade dos extratos estudados foi avaliada pela técnica de MTT, onde foi observado CC<sub>50</sub> de 9,06 mg/mL para o extrato acetato de etila, 4,55 mg/ml para extrato hexânico e 1,81mg/mL para o extrato metanólico. Concluiu-se que à atividade antioxidante o extrato metanólico se mostrou mais promissor quando comparar ao extrato acetato, porém ao analisar suas toxicidades vê-se o contrário. Quanto a atividade antimicrobiana o extrato hexânico obteve melhores resultados, sendo efetivo frente a *Micobacterium tuberculosis* e *B.subtillis*, mostrando que extratos oriundos de *Streptomyces hygroscopicus* possui efetiva atividade antimicrobiana e antioxidante.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano. Antioxidante. *Micobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

The increasing number of infections caused by bacteria resistant to antibiotics leads to a search for studies of different bioactive compounds. In this context aimed at the search for new antimicrobials, the actinomycetes have been studied for their ability to produce bioactive metabolites, antioxidants, terpenoids compounds, enzymes and antimicrobial. Within the phylum the *Streptomyces* genus is highlighted as they produce 80% of the known antibiotics. Given the potential of these microorganisms for the production of bioactive compounds this study aimed to produce secondary metabolite of *Streptomyces hygroscopicus* evaluate its antimicrobial activity, antioxidant and cytotoxicidade and detect classes of compounds and identify morphological and molecularly producer actinobacteria. Initially, the antimicrobial activity was performed by test well spread, where the ethyl acetate extract (EA) showed activity against *B. subtilis* (23,61mm) and *S. aureus* (21,61mm), the methanol extract (EM ) and hexane extract (EH) against the same test bacteria *C. Kruzi* (MS: 11,92mm, AH: 8,86mm), *B.subtillis* (MS: 18,07mm, EH: 18,07mm), *S. aureus* ( iN: 15,24mm, EH: 29,66mm), *P. aeruginosa* (MS: 20,95mm, EH: 17.91), with the exception of *E. coli* (MS: 12,87mm) was then run CMI 4 bacteria tests showed greater inhibition zone and *Mycobacterium tuberculosis* ATCC. Much of the extracts tested showed inhibitory activity against the test microorganisms when in a concentration of 10mg / mL, already the ethyl acetate extract (EA) against *B.subtillis*, and methanol against *B.subtillis* and *P. aeruginosa* obtained MIC > 10mg / ml, hexane extract (SH) showed MIC of 1.25 mg / mL against *B.subtillis*. When performing the antioxidant activity of the extract by DPPH method, we obtained the following IC<sub>50</sub> values: 3.4916 mg / ml (EA), 2.0880 mg / ml (EM). When using the ABTS assay the ethyl acetate extract (1.485 mg / ml) observed peak percentage inhibition of ABTS radical 19.3548, and the methanol extract (0.285 mg / mL) 19.7947. The detection of classes of compounds was done by Thin Layer Chromatography (TLC) where the following classes were found: Protoantocianididas condensed, leucoanthocyanidins, coumarins and saponins in methanolic extract, as the ethyl acetate extract were found cinnamic derivatives, triterpenes and steroids . The cytotoxicity of the extracts tested was evaluated by MTT technique, which was observed CC<sub>50</sub> 9.06 mg / ml for the ethyl acetate extract, 4.55 mg / mL for the hexane extract and 1,81mg / ml to the methanolic extract. It was concluded that the methanol extract antioxidant activity was more promising when compared to acetate extract, but to analyze their toxicities sees otherwise. The antimicrobial activity hexane extract yielded better results, being effective against *Mycobacterium tuberculosis* and *B.subtillis*, mostranto that come from *Straptomyces hygrscopicus* extracts possesses effective antimicrobial and antioxidant.

**Keywords:** antimicrobial. Antioxidante. *Micobacterium tuberculosis*.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Classificação Filo actinobacteria, adaptado de Gao e Gupta (2012).....                         | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Antibióticos produzidos por actinobactérias. (adaptado de Guimarães et al., 2010).....         | 17 |
| <b>Figura3.</b> Ciclo de crescimento e esporulação do <i>Streptomyces</i> sp.(adaptado de Seipke et al.,2012).. | 19 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**RNA:** Ácido ribonucléico

**ATP:** Trifosfato de Adenosina

**CMI:** Concentração Mínima Inibitória

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**MPE:** Meio para produção de eritromicina

**CMB:** Concentração Máxima Bactericida

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPPH:** 2,2'-difenil-1-picrihidrazilo

**ABTS:** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

## SUMÁRIO

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                         | <b>11</b> |
| <b>2.OBJETIVOS.....</b>                                                           | <b>13</b> |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....                                                         | 13        |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                  | 13        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                              | <b>14</b> |
| 3.1. ACTINOBACTÉRIAS .....                                                        | 14        |
| 3.2. METABOLISMO DE ACTINOBACTÉRIA.....                                           | 16        |
| 3.3. STREPTOMYCES .....                                                           | 18        |
| 3.4. ANTIBIÓTICOS .....                                                           | 20        |
| 3.4.1 Principais classes de antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i> ..... | 21        |
| 3.4.1.1 $\beta$ -lactâmicos.....                                                  | 21        |
| 3.4.1.2 Aminoglicosídeos .....                                                    | 21        |
| 3.4.1.3 Macrolídeos .....                                                         | 22        |
| 3.4.1.4 Clorafenicol .....                                                        | 22        |
| 3.4.1.5 Tetraciclinas.....                                                        | 22        |
| 3.5. ANTIOXIDANTES .....                                                          | 22        |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>                                                        | <b>24</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                          | <b>25</b> |
| <b>APÊNDICES.....</b>                                                             | <b>33</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                               | <b>48</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Visando a busca de novos compostos antimicrobianos e antioxidantes, as actinobactérias vem sendo estudadas por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos. As actinobactérias são bactérias gram positiva com alto teor de Guanina (G) e Citosina (C) em seu DNA, geralmente são habitam o solo, porém podem ser encontradas em diversos habitats como água doce e salgada, e em plantas (Barla et al., 2016).

Essas bactérias se apresentam muito versáteis quanto ao seu metabolismo, podendo ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas. E capazes de produzir diversos metabólitos bioativos de interesse industrial, utilizados na indústria farmacêutica, de papel e celulose, entre outras. Essa versatilidade promove uma maior competitividade com outros microrganismos do seu habitat (Procópio et al., 2012).

Quando se trata de compostos bioativos produzidos por actinobactérias encontramos antibióticos, antioxidante agentes tumorais, compostos anti-inflamatórios e inibidores de enzima, esses de grande importância para a indústria farmacêutica. Dentre os antibióticos pode-se citar a estreptomicina, composto ativo frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, a eritromicina e as cefalosporinas. Também apresentam potencial na produção de fungicida frente os gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* e *Fusarium*. (Soriano et al., 2008; Rojas et al., 2015).

Os antibióticos são compostos capazes de inibir ou matar fungos e/ou bactérias. O primeiro produzido foi o salvarsan, nos anos 1940-1960 diversas drogas foram inseridas no mercado, entre elas  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos. Já entre os anos 1960-1980 foram introduzidos ao mercado antibióticos semi-sintéticos, após os anos 2000 poucos foram descobertos apenas a linezolida e adaptomycin foram introduzidos. No ano de 2015 um novo antibiótico foi relatado, a teixobactina, esse mostrou-se eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a outros antibióticos.

Dentre as actinobactérias o gênero mais isolado é o *Streptomyces*, microrganismos aeróbios obrigatórios comumente encontrados no solo. Esse ganha destaque entre as actinobactérias quanto a diversidade da produção de metabólitos bioativos, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, antitumorais, antitrombótico, imunossuppressores e diversas enzimas extra celulares de interesse industrial. São eles os produtores da geosmina, substância que confere ao solo o odor característico de “terra molhada”.

Outros metabólitos visado pela indústria são os antioxidantes, definidos como substâncias capazes de desacelerar ou retardar a oxidação de um material oxidável, mesmo quando utilizado em quantidade muito modesto em comparação com a quantidade de material que tem que proteger. Esses compostos são utilizados com o objetivo de minimizar a diferença entre o excesso de produção de radicais livres e/ou espécies reativas e a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes, diferença essa que gera o estresse oxidativo.

Esses compostos possuem diversas aplicações: estudos mostram que a utilização de drogas antineoplásicas em conjunto com as antioxidantes promovem a potencialização da droga e diminuição de seus efeitos colaterais (Santos e Cruz, 2001). Elas também podem ser utilizada na odontologia, na melhora da união de restaurações após clareamento dentário. Após este processo radicais livres presentes no esmalte dental e dentina podem prejudicar a adesão de materiais resinosos (Oliveira et al., 2006).

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir metabólito secundário de *Streptomyces* sp. e avaliar sua atividade antimicrobiana e antioxidante, bem como avaliar sua citotoxicidade.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter metabólito secundário de *Streptomyces* sp. ;
- Caracterizar Metabólito quanto sua capacidade antimicrobiana;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) ;
- Avaliar o perfil químico o metabólito secundário;
- Analisar a citotoxicidade do extrato e das suas frações com atividade antimicrobiana ;

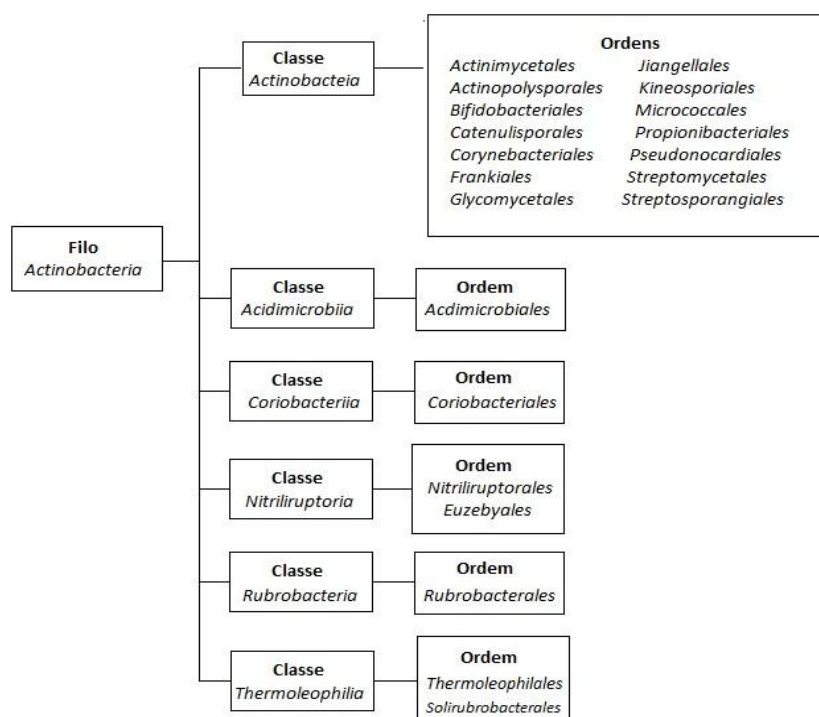
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias são bactérias gram positivas com alto teor de guanina e citosina em seu DNA. Sendo elas mais filamentosas e ramificadas que as comuns, capazes de formar hifas, estas podem se diferenciar e formar cadeias de esporos. Em geral são encontradas no solos, principalmente alcalinos e ricos em matéria orgânica, porém se adaptaram a diferentes ambientes ecológicos, como água doce e salgada (Madigan et al., 2010).

Essas bactérias representando o maior filo dentre o reino protista e são divididas em seis classes: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptorales*, *Rubrobacteria* e *Thermoleophilia*, constituída por mais de 55 famílias, 240 gêneros e milhares de espécies (Ludwig et al. 2012; Verma et al., 2013). A classe mais estudada dentre estas é a *Actinobacteria*, pois enquadra cerca de 80% das actinobacterias descritas, quanto aos gêneros, os mais conhecidos são: *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (Gao e Gupta 2012; Lacaz et al., 2002).

**Figura 1.** Classificação Filo actinobacteria, adaptado de Gao e Gupta (2012)



Apresentam grande diversidade morfológica, podendo apresentar forma de cocos, coco-bacilo, hifas curtas e rudimentares ou micélio ramificado (Ventura et al., 2007). Suas estratégias

reprodutivas levam a formação de uma diversidade de esporos: artrósporos, característico do Gênero *Streptomyces*, endósporos, ligados aos *Thermoactinomyces*; aleuriósporos, das *micromonosporas*; zoósporos móveis dos *actinoplantaceae* (Gao e Gupta, 2005; Ensing, 1978).

Seu é crescimento vegetativo abundante e ramificado, aparentemente exponencial, esses microrganismos apresentam micélio com hifas ramificadas com 1µm de diâmetro, geralmente formam colônias pequenas e bem aderidas ao substrato (Holt et al,1994).São capazes de crescer em locais antropizados e que apresentam condições ambientais hostis, sua abundância tende a ser maior em solos oligotróficos e menor um solos úmidos ( Lima, 2013; Fierer, Bradford e Jackson, 2007)

Seus representantes incluem patógenos humanos (*Mycobacterium* sp.), fitopatógenos (*Leifsonia* sp.), bactérias que habitam no solo (*Streptomyces* sp.), ambientes aquáticos (*Rhodococcus* sp.), e do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* sp.).

**Tabela 1.** Principais grupos de actinobactérias e suas características. (adaptado de Madgan et al.,2010)

| Classe                  | Representantes                | Características                                     |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Bactérias corineformes  | <i>Corynebacterium</i> sp.    | Bacilos, geralmente em forma de                     |
|                         | <i>Arthrobacter</i> sp.       | clava, como morfologia variada;                     |
|                         | <i>Cellulomonas</i> sp.       | não acidorresistentes ou                            |
|                         | <i>Kurthia</i> sp.            | filamentosos; divisão celular                       |
| Bactérias propiônicas   | <i>Brevibacterium</i> sp.     | com separação incompleta.                           |
|                         | <i>Propionibacterium</i> sp.  | De anaeróbias a aerotolerantes;                     |
|                         | <i>Eubacterium</i> sp.        | bacilos ou filamentos, ramificantes.                |
| Anaeróbios obrigatórios | <i>Bifidobacterium</i> sp.    |                                                     |
|                         | <i>Acetobacterium</i> sp.     |                                                     |
|                         | <i>Butyrivibrio</i> sp.       |                                                     |
|                         | <i>Thermoanaerobacter</i> sp. |                                                     |
| Actinomicetos           | <b>Actinomicetos:</b>         | Não acidorresistentes; aeróbios                     |
|                         | <i>Actinomyces</i> sp.        | facultativos; não formam                            |
|                         | <i>Arachnia</i> sp.           | micélios; células bacilares,                        |
|                         | <i>Bacterionema</i> sp.       | cococides ou corineformes                           |
|                         | <i>Rothia</i> sp.             |                                                     |
|                         | <i>Agromyces</i> sp.          |                                                     |
|                         | <b>Micobactérias:</b>         | Patógenos, saprofitas; aeróbios                     |
|                         | <i>Mycobacterium</i> sp.      | obrigatórios; crescimento lento e nutrição simples. |

|                                                                                                                                             |                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Actinomicetos fixadores de nitrogênio:</b><br><i>Frankia</i> sp.                                                                         | Simbiontes fixadores de nitrogênio de plantas, produzem micélio verdadeiro                                                                     |
| <b>Actinoplanes:</b><br><i>Actinoplanes</i> sp.<br><i>Streptoporangium</i> sp.                                                              | Produzem micélio verdadeiro; formam esporos, contidos no interior de esporângios.                                                              |
| <b>Grupo dermatófilo:</b><br><i>Dermatophilus</i> sp.<br><i>Geodermantophilus</i> sp.                                                       | Filamentos miceliais dividem-se transversalmente; ausência de micélio aéreo; ocasionalmente causadores de de infecção edpidérmicas.            |
| <b>Nocárdia:</b><br><i>Nocardia</i> sp.<br><i>Rhodococcus</i> sp.                                                                           | Ocasionalmente produzem esporos aéreos; conteúdo lipídico de células e paredes celulares bem elevado.                                          |
| <b>Streptomicetos:</b><br><i>Streptomyces</i> sp.<br><i>Streptovercillium</i> sp.<br><i>Sporichthya</i> sp.<br><i>Kitasatoa</i> sp.         | Micélio permanece intacto, micélio aéreo abundante e longas cadeias de esporos                                                                 |
| <b>Micromonosporas:</b><br><i>Micromonospora</i> sp.<br><i>Microbispora</i> sp.<br><i>Thermobispora</i> sp.<br><i>Thermoactinomyces</i> sp. | O micélio permanece intacto; formação de esporos únicos, em pares ou em cadeias curtas; vários são termófilos; saprofitas encontrados no solo. |

### 3.2. METABOLISMO DE ACTINOBACTÉRIA

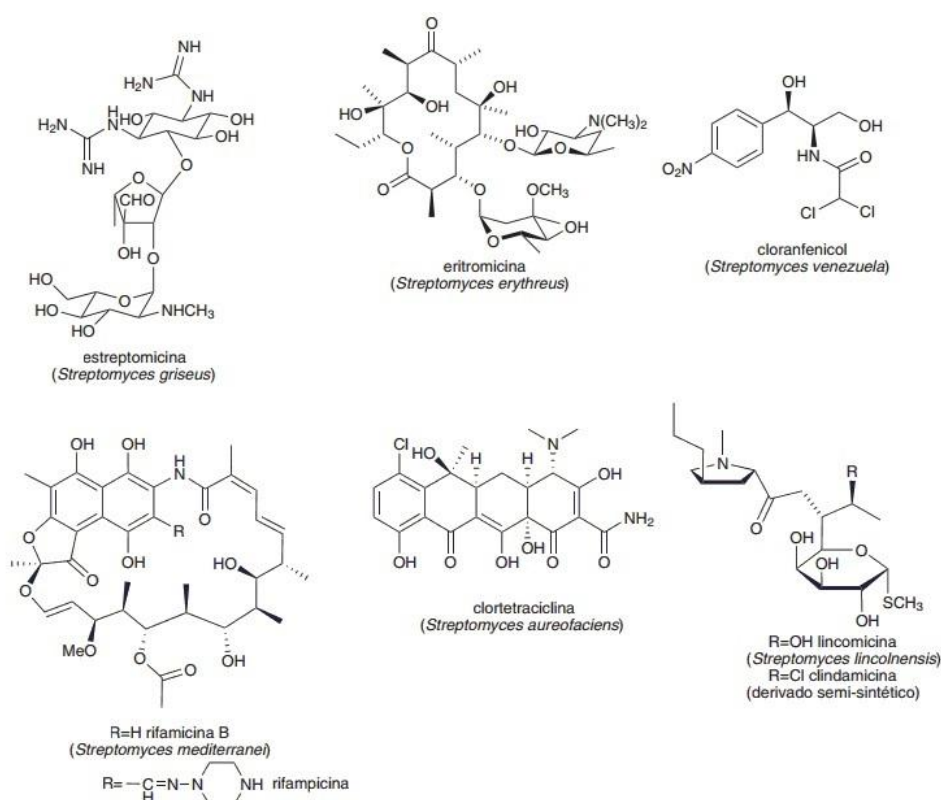
O metabolismo secundário de um microrganismo é relatado como a produção de compostos não necessário para sua seu crescimento e reprodução, porém quando há falta de substância vitais, este metabolismo garante a continuidade dos mecanismos essenciais para a multiplicação celular (Zhang, 2009).

As actinobactérias são muito versáteis quanto ao seu metabolismo, podem ser autotróficas, heteretróficas, quimitróficas ou fototróficas e utilizam varias fontes de carbono. São capazes de produzir diversos metabólitos secundários bioativos e de grande diversidade química, que há muito vem beneficiando a saúde humana e a indústria (Soares et al., 2012), esses compostos são muito

importantes, pois confere competitividade a outros microrganismos no ambiente (Procópio et al., 2012)

Quanto se trata de compostos bioativos com importância farmacêutica, encontramos antibióticos, agentes anti-tumorais, compostos anti-inflamatórios e inibidores de enzima (Shivilata e Satyanarayana, 2015). O primeiro antibiótico produzido pelo filo foi a estreptomicina, este efetivo frente ao *Micobacterium tuberculosis*, e em seguida foi descoberta a neomicina. Ao longos dos anos outros foram descobertos, a linezolida, a tigeciclina e a ceftobiprole, estas eficazes frente a bactérias gram positivas (Soriano et al., 2008). Desde a descoberta do primeiro antibiótico produzido por este grupo de bactérias, o maior número de antibióticos introduzidos no mercado, carbapenemos (cefalosporinas), macrolídeos (eritromicina), ansamicinas (rifampicina), glicopeptídeos (vancomicina), e tetraciclina (Demelocyclin), são oriundos desta família de microrganismos (Mohammadipanah e Wink, 2016).

**Figura 2.** Antibióticos produzidos por actinobactérias. (adaptado de Guimarães et al., 2010)



Dentre as substâncias com atividade antitumoral, esses microrganismos produzem a L-asparaginase, estas diminuem os níveis de L-asparagina, aminoácido não sintetizado pelas células tumorais, porém necessário para sua sobrevivência (Amena et al, 2010; Szeliga & Obara-Michlewska, 2009). Outros compostos enquadrados neste grupo com essa atividade são: Bleomicinas, mitomicina C, antraciclina e actinomicina D, são antibióticos produzidos pelo gênero

*Streptomyces* e possuem atividade anticancerígena (Puppo et al., 2006). Quando relatado metabólitos isolados de actinobactérias marinhas, um exemplo é a marinomycin A, esta efetiva frente a linhagens celulares de melanoma humano (Becerril-Espinosa et al., 2012).

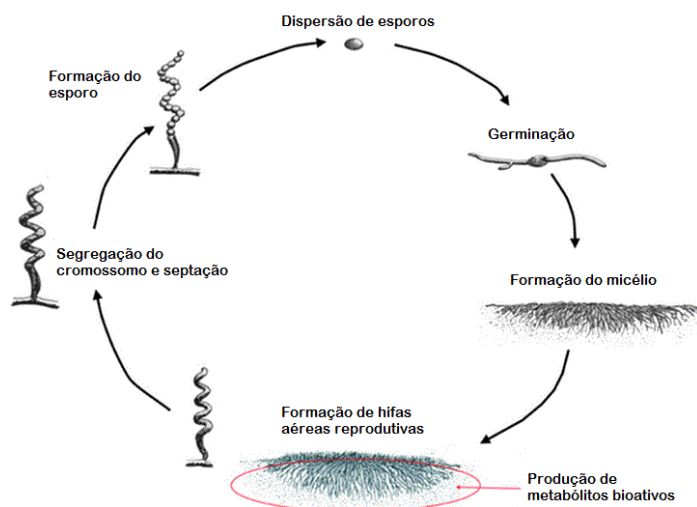
Actinobactérias vem se mostrando eficaz na produção de poderosos fungicidas e na eliminação de patógenos humanos, Gandotra e colaboradores (2012) observa que 33,3% dos *Streptomyces* sp. estudados mostram algum grau de atividade frente a *Cândida* sp. O controle de fitopatógenos por esses microrganismos se dá devido produção de antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana, e é de especial interesse quando se trata infecções pelos gêneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* e *Fusarium* (Rojas et al., 2015). As actinobactérias vem demonstrado atividade fungicida frente a esses microrganismos, como descrito por Horta e colaboradores (2012), onde cepas de actinobactérias e seus extratos orgânicos são efetivos no frente *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp.

Este filo também apresenta metabólitos de grande interesse na agroindústria, como a descontaminação do solo, decomposição de matéria orgânica e aproveitamento de resíduos, além de tratamento no controle de pH do solo, essas ações envolvem enzimas como a lignina, a celulase e a fosfatase alcalina (Ramírez e Calzadiaz, 2016).

### 3.3. STREPTOMYCES

Dentro do filo actinobacteria, o gênero mais comumente isolado e amplamente estudado é o *Streptomyces*. Microrganismos aeróbios obrigatórios comumente encontrados no solo, porém podem ser isolados de outros habitats como a água do mar, e espécimes humanos. (Silva, 2013; Koneman, 2001). Os filamentos de *Streptomyces* sp. normalmente apresentam de 0,5-1,0µm e geralmente são desprovidas de paredes transversais na forma vegetativa. A germinação do *Streptomyces* se inicia com a germinação dos esporos (conídios), em resposta nutricional ou estresse produzem hifas aéreas reprodutivas que sofrem divisão celular para formação dos esporos (Seipke et al., 2012).

**Figura 3.** Ciclo de crescimento e esporulação do *Streptomyces* sp. (adaptado de Seipke et al.,2012)



Normalmente possuem parede dos esporos mais espessa do que as hifas, sendo também mais hidrofóbicas, contribuindo com isso para a presença de um envelope externo. Estes esporos também toleram a dessecação e o calor permanecendo viáveis por muitos anos, no entanto, a resistência não se compara com a dos endosporos bacterianos (Pereira et al.,2012).

O gênero ganha destaque entre as actinobactérias quanto a diversidade da produção de metabólitos bioativos, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, antitumorais, antitrombótico, imunossupressores e diversas enzimas extra celulares de interesse industrial (Reddy, Ramakrishna e Rajagopal, 2011; Singh e Rai, 2012; Soares, Costa e Silva, 2012). Também conhecido pela capacidade de decompor polímeros (celulose, quitina e amido), e produzir vitamina B12 e timina (BATISTA et al., 2010). São esses microorganismos que produzem a geosmina, substância que confere ao solo o odor característico de “terra molhada” (KIESER et al., 2000).

O potencial enzimático dos estreptomicetos é um aspecto importante a ser considerado, pois depois dos antibióticos estes são os compostos mais explorados pela indústria biotecnológica, por terem origem microbiana, são de ampla diversidade bioquímica e susceptível a manipulação genética, este gênero produz várias enzimas extracelulares de interesse comercial, exemplo dessas são as pectinases, xilanases, proteases e celulasas (Silva et al.,2016; Silva et al., 2015). A atividade endoglucanásica é encontrada em diferentes espécies de *streptomyces*, *S. malaysiensis* AMT-3, *S. drozdowiczii* M-7A, *S. viridobrunneus* e *S. capoamus*, enzima esta de interesse na indústria de papel e celulose. (Grigorevski-Lima, 2005; Da Vinha, 2011).

Diferentes classes de antibióticos são produzidas pelos *Streptomyces* sp., cerca de 80% do antimicrobianos conhecidos são gerados pelo gênero (Carvalho e Sand, 2015), o primeiro relatado foi a estreptomicina, eficaz frente a *Micobacterium tuberculosis* (Waksman e Schatz, 1945). Ao

longo dos anos novos compostos foram descobertos ácido clavulânico (*S. clavuligenus*), tienamicina (*S. cattleya*), Clorafenicol (*S. Venezuela*), entre outros (Guimarães et al, 2010). Um outro exemplo é a natamicina, um macrolídeo produzida por estipes de *Streptomyces natalensis*, *S. chattanoogensis* e *S. lydicus* (ATTA et al, 2015).

A produção de antibióticos por actinobactéria inegavelmente gera um ganho na competição com outros microrganismos em um ambiente natural, porém, como a produção acontece depois do crescimento, o antibiótico pode servir como proteção para a biomassa da colônia até o completo desenvolvimento do micélio aéreo. Há ainda a produção de antibióticos em alguns *Streptomyces* simbioses de insetos e plantas, conferindo a estes, proteção a infecções. (Chater et al., 2010).

O *Streptomyces hygroscopicus* está incluso no táxon com mais 21 outros estreptomicetos, e pode ser subdividido em várias subespécies como *S. hygroscopicus* subsp. *Angustmyceticus* NRRL B-2347 e *S. hygroscopicus* subsp. *glebosus* NRRL B-324. A espécie foi considerado particularmente rica fonte de novos antibióticos e outros metabólitos bioativos, ao longo dos anos vários compostos foram obtidos a partir de *S. hygroscopicus*, a rapamicina, a validamicina A, ácido clavulânico, transglutaminases (Kumar e Gooldfellow, 2010).

### 3.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são compostos capazes de inibir (bacteriostáticos) ou causar a morte (bactericidas) a fungos e/ou bactérias, sendo eles naturais ou sintéticos. O primeiro antibiótico sintético, o salvarsan, foi desenvolvido em 1930, por Paul Ehrlich, em 1934 foi introduzido a clínica o proflavina, antibiótico amplamente utilizada na segunda guerra mundial, durante o tratamento de feridas profundas. O marco do tratamento contra infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, em 1928, por Alex Fleming, porém só vou iniciada sua utilização para fins terapêuticos em 1940 (Guimarães et al., 2010)., essas produzidas em 4 grandes grupo: penicilinas naturais, penicilinas penicilinase-resistentes, aminopenicilinas e penicilinas de amplo espectro (Goodman e Gilman, 2010).

De 1940 a 1960 vários antibióticos foram inseridos na terapêutica:  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, macrolídeos, peptídeos entre outros (Fernandes, 2006). Já entre os anos 60-80 foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos efetivos frente a patógenos gram positivos e gram negativos, sendo eles em grande maioria análogos dos fármacos naturais desenvolvidos nas décadas anteriores (Guimarães et al, 2010).

Ao analisar o período entre 1980-2000 houve uma queda drástica na produção de novos compostos, sendo assim utilizadas novas ferramentas para obtenção de fármacos, a genômica e a triagem de coleções de compostos, devido ao prejuízo às triagens de produtos naturais microbianos, foi nesta

época que começaram a surgir casos de resistência bacteriana aos antibióticos já existentes e assim a necessidade de compostos mais efetivos (Guimarães et al, 2010). Após os anos 2000 poucos antibióticos foram inclusos no mercado farmacêutico, dentre esses estão a linezolida, composto sintético da classe dos oxazolidinonas (Kaiser et al.,2007) e a daptomicina, fármaco isolado de *Streptomyces roseosporus* e aprovado em 2003 para tratamento de infecções causadas por bactérias Gram positivo (Picazo et al., 2010). Já em 2015 foi descoberto um novo antibiótico o teixobactina, esse inibe a síntese de parede celular e se mostrou eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a outros antibióticos (Ling et al.,2015).

### **3.4.1 Principais classes de antibióticos produzidos por *Streptomyces***

Aproximadamente 55% dos antibacterianos são produzidos por *Streptomyces*, e outros 11% por actinobactérias (Axenov-Gibanov et al., 2016). Esses podem ser enquadrados em diferentes classes:

#### **3.4.1.1 $\beta$ -lactâmicos**

Esses antibióticos possuem em comum no seu núcleo estrutural um anel  $\beta$ -lactâmico, este confere sua atividade bactericida. Sua ação impede a síntese de peptidoglicanos, através a inibição irreversível da enzima transpeptidase, essa catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicana da parede celular bacteriana, cadeia essa responsáveis por manter a integridade da parede celular bacteriana (Mota et al, 2010)

Os  $\beta$ -lactâmicos podem ser divididos em quatro subclasses: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems e monobactâmicos, e possuem ação variada frente a bactérias gram positivas e gram negativas, aeróbias e anaeróbias, de acordo com o subgrupo (Fuch, Wannmader e Ferreira, 2004). Dentro dessa classe encontramos o ácido clavulânico, um excelente inibidor de  $\beta$ -lactamases, constituído por um anel  $\beta$ -lactâmico condensado a um anel oxazolidina e produzido por *Streptomyces clavuligerus* (Mancilha et al., 2014)

#### **3.4.1.2 Aminoglicosídeos**

São fármacos que possuem uma unidade de açúcar e um grupo amino básico em sua estrutura. Apresentam atividade bactericida, pois se ligam a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a síntese de proteínas. São efetivos frente a gram negativas como a *P. aeruginosa*, porém requer cuidado com uso prolongado, pois apresenta efeito nefrotóxico e ototóxico. (Durante-Mangoni, 2009; Oliveira et al.,2006). O maior representante desta classe é a estreptomicina, composto produzido por *Streptomyces griseus*, ativo frente a *Micobacterium tuberculosis* e a grande parte das bactérias gram negativa (Madgan et al, 2010).

### 3.4.1.3 Macrolídeos

Esses antibióticos são caracterizados por um anel macrocíclico de lactona, agem contra bactéria inibindo a síntese protéica, para isso ligando a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, seus efeitos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas, isto depende da concentração de susceptibilidade do microrganismo (Da Silva Filho, Pinto e Stein, 2015). Nessa classe encontra-se a clindamicina, um derivado sintético da lincomicina, produzida por *Streptomyces lincolnensis*, droga essa eficaz contra anaeróbios obrigatórios, especialmente *Bacterioides fragilis* (Gómez-Meneses e González-Pérez, 2009). E a eritromicina, um dos mais seguros antibióticos em uso clínico, obtido a partir de cultivo uma cepa de *Streptomyces erythreus*, hoje denominada *Saccharopolyspora erythraea*. Este antibiótico possui efetividade frente a bactérias gram positivas e gram negativas (*Mycoplasma* sp. , *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*)(Oliva e García del Pozo, 2002).

### 3.4.1.4 Clorafenicol

Isolado a primeira vez do *Streptomyces Venezuela*, liga-se a subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a peptidil transferase, enzima esta responsável pela extensão da cadeia peptídica. Esse é o fármaco de escolha para a febre tifoide, porém não podem ser administrados em concomitância a macrolídeos e as lincosamidas, pois se ligam a mesma região na bactéria (Guimarães et al., 2010).

### 3.4.1.5 Tetraciclínas

O primeiro membro desta classe, a clortetraciclina, que é um produto da fermentação natural de *Streptomyces aureofaciens*. São antibióticos bacteriostáticos e possuem diversas propriedades favoráveis, tais como amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixo custo. Atuam se ligando a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo a ligação do aminoacilRNA. Como resultado, a adição de novos aminoácidos é bloqueado não ocorrendo o aumento da cadeia proteica. Seu espectro de atividade se estende a numerosos organismos gram positivos e gram negativos, inclusive, organismos anaeróbicos, micobactérias e protozoários, como a *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Giardia lamblia* e *Toxoplasma gondii* (Pereira-Maia et al., 2010; Guimarães et al., 2010).

## 3.5. Antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas, sua geração é um processo contínuo e fisiológico. Possuem papel determinante durante processo biológicos, pois atuam como mediadores para transferência de elétrons em várias reações químicas. Em quantidades adequadas possibilitam a formação de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes, participam de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, entre outros processos (Shami e Moreira, 2004; Ferreira e Matsubara, 1997).

O excesso de produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes, gera-se o estresse oxidativo. Esse conduz à oxidação de biomoléculas,

gerando danos como perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático. A evolução deste processo a um estado crônico leva ao desenvolvimento de diversas patologias, como câncer e obesidade, também considerado a principal causa de diversas doenças crônicas e degenerativas como a arterosclerose, a artrite reumatoide e diabetes mellitus (Lee et al.,2015).

Com o objetivos de inibir e/ou reduzir os danos causados pelo excesso de radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais são utilizados compostos antioxidantes, substâncias capazes de desacelerar ou retardar a oxidação de um material oxidável, mesmo quando utilizado em quantidade muito modesto em comparação com a quantidade de material que tem que proteger (Amorati et al.,2013). Esses compostos são definidos como qualquer substância que em menor concentração que o agente oxidável seja capaz de inibir ou atrasar sua capacidade oxidante. Podem agir diretamente neutralizando a ação dos radicais livres ou espécies não-radicaais, ou indiretamente participando de sistemas enzimáticos que possuem capacidade antioxidante (Halliwell e Whiteman, 2004).

O sistema antioxidante pode ser dividido em enzimático e não enzimático, dentro do ultimo estão presentes diversas substâncias de origem endógena ou dietética. No sistema enzimático estão presentes a Superóxido Dismutase, a Catalase e a Glutathione Peroxidase, a duas últimas agem impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, pois essa espécie reativa culmina na geração de radical  $\text{OH}^+$ , radical com potencial reativo e grande instabilidade. No sistema não enzimático se destacam substâncias de origem dietética, vitaminas (Vitamina C, A e E), minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio), compostos fenólicos e outros carotenoides como o licopeno (Barbosa et al., 2010).

Os compostos antioxidantes possuem diversas aplicações: agente anticancerígeno, como descrito por Giampieri e colaboradores (2014), onde a capacidade antioxidante de compostos é utilizado como mecanismo para inibir a mutagenese de células, através da modulação da sinalização celular, impedido a formação do cancro. Além que potencializar a ação de drogas antineoplásicas e diminuir seus efeitos colaterais (Santos e Cruz, 2001). Manutenção e proteção do sistema imune humano, onde protegem os lipídios da membrana celular de células do sistema imune, conservando assim a comunicação entre células e receptores de membrana, mantendo a função celular normal (Zou et al., 2016). Além das práticas relacionadas acima apresentam eficácia na diminuir a incidência de doenças cardiovasculares e no retardo no desenvolvimento de aterosclerose, dentre diversas outras aplicações (Cerqueira et al., 2007).

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- Ao realizar identificação morfológica e molecular a actinobactéria foi apresentada como *S. hygrosopicus*;
- Os extratos obtidos através da fermentação de *S. hygrosopicus* apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos teste. Destacou-se o extrato hexânico que apresentou MIC de 3,2mg/mL e a atividade frente a *M. tuberculosis* onde valores de MIC de 1,25-5.
- Os extratos apresentaram expressiva atividade antioxidante, mantendo-a mesmo quando avaliado em pequenas concentrações, como o extrato metanólico (0,28 mg/mL), apresentou porcentagem de inibição de 19, 79.
- Quanto os extratos foram caracterizados quimicamente foram encontradas diferentes classes químicas: protoantocianididas condensadas, leucoantocianidinas, cumarinas e saponinas no extrato metanólico; já no extrato acetato de etila foram encontrados derivados cinâmicos, triterpenos e esteróide
- Extratos hexânico e metanólico apresentaram significativa citotoxicidade a células VERO. Porém o extrato acetato de etila (5mg/mL) apresentou citotoxicidade de aproximadamente 9%.

## REFERÊNCIAS

- AMENA, S.; VISHALAKSHI, N.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A.; LINGAPPA, K. Production, Purification and Characterization of LAsparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiolog*, v. 41, p.173-178, 2010.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10835–10847, 2013.
- ATTA, H.M.; EL-SAYED, A.S.; EL-DESOUKEY, M.A; HASSAN, M.; EL-GAZAR, M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentatin, extraction and biological activities. *Journal of Saud Chemical Society*, v. 19, p. 360-371, 2015.
- AXENOV-GIBANOV, D.V.; VOYTSEKHOVSKAYA, I.V.; TOKOVENKO, B.T.; PROTASOV, E.S.; GAMAIUNOV, S. V.; REBETS, Y.V.; LUZHETSKYY, A.N.; TIMOFEYEV, M.A.. Actinobacteria Isolated from an Underground Lake and Moonmilk Speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as Sources of Novel Biologically Active Compounds. *PLoS ONE*, v.11, n.2, p.1-12, 2016.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutricao*, v.23, n.4, p.629–643, 2010.
- BATISTA, W. B.; NOBRE, S.A.M.; NOBRE, P.B.; FERNANDES, B.H.A.; GOMES, H.A.R.G.; AGUIAR, R.M.; MELO, G.A.; PEREIRA, G.V.N. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro ( *Lycopersicon esculentum* ) de diferentes cultivares. *Unimontes científica*, Montes Claros, v.12, n. 1/2, p. 60–69. 2010.
- BECERRIL-ESPINOSA, A.; GUERRA-RIVAS, G.; AYALA-SÁNCHEZ, N.; E. SORIA-MERCADO I. Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, v. 47, n.2: p.317-325, 2012.
- CARVALHO, T.; SAND, S. V.D. Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18 (6) against multiresistant Gram-negative bactéria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.88, n.1, p.155-163, 2016.

- CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, n.2, p.441–449, 2007.
- CHATER K.F.; BIRÓ, S.; LEE K.J.; PALMER, T.; SCHREMPF, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Review*, v.34, p.171-198, 2010.
- DA SILVA FILHO, L. V. R. F.; PINTO, L. A.; STEIN, R. T. Use of macrolides in pediatric lung diseases: recent literature controversies. *Jornal de Pediatria*, v.91, n.6, p. S52–S60, 2015.
- DA VINHA, F. N. M. ; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P. ; FRANCO, M.N.; MACRAE, A.; DA SILVA BON, E.P.; NASCIMENTO, R.P.; COELHO, R. R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 164, n. 3, p. 256–267, 2011.
- DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E. Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 33, n.3, p.201-205, 2009.
- ENSIGN, J.C. Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Ann Rev Microbiol* 32: 185-219, 1978.
- FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development--the failure of success?. *Nature Biotechnology*, v.24, n.12, p.1497- 1503, 2006.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FIERER, N., BRADFORD, M.A., JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, v.88, p.1354-1364, 2007.
- FUCHS, F.D.; WANNMADER, L.; FERRERA, M.B.C. Antibióticos betalactâmicos, in: farmacologia clinica. Fundamentos da terapêutica racional. 3ª ed, Guanabara, Koogan, 2004.
- GANDOTRA, S.; BISHT, G. R.; SAHARAN, B. S. Antifungal activity of endophytic actinomycetes (*Streptomyces*) against *Candida* species. *International Journal of Microbial Resource and Technology*, v.1, p.375-378, 2012.
- GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.76, p.66–112, 2012.

GAO, B.; GUPTA, R.S. Conserved indels in proteins sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International Journal of Systematic and evolutionary microbiology*, v.90, p.2401-2412, 2005.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; BATTINO, M.; AGRARIE, S.; AMBIENTALI, A.; POLITECNICA, U.; RANIERI, V. Strawberry and Human Health: Effects beyond Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.64, p.3867–3876, 2014.

GÓMEZ-MENESES, M.A.; GONZÁLEZ-PÉREZ V.M. Manejo antibiótico de primera línea en pacientes sépticas ginecológicas y obstétricas en una clínica de Bogotá, *Revista Colombiana Salud Libre*, v.4, n.1, p.29-44, 2009.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GRIGOREVSKI-LIMA, A. L., NASCIMENTO, R. P., BON, E.P. S., COELHO, R. R. R. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial byproducts and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, p.272-277, 2005.

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

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, v.142, n.2, p.231-255, 2004.

HOLT, J.G.; KRIENG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. WILLIAMS, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 th. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 187p.

HORNA, H.; SIALER, C.; INCIO, M.; HERNÁNDEZ, A.; LEIVA, J. Antifúngicos de origen natural frente a los de síntesis química para el control de hongos fitopatógenos en Chenopodium quinoa "QUINUA" . *Revista Ingeniería: Ciencia, Tecnología e Innovación* , v.1, n.1, p.61-76, 2014. Identificação e Atividade Antimicrobiana de Streptomyces Sp. UFPE 968.” *Scientia Plena*, v.8, n.12, p.01–07, 2012.

KAISER, C. R.; CUNICO, W.; PINHEIRO, A. C.; DE OLIVEIRA, A. G.; DE SOUZA, M. V. N. Oxazolidinones : a new class of compounds against tuberculosis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.88, n.2, p.83–88, 2007.

KIESER, T.; BIBB, M.J.; BUTTNER, M.J.; CHATER, K.F.; HOPWOOD, D.A.; CENTRE, J.I.; PARK, N.R. Practical Streptomyces Genetics. John Innes Foundation, Norwich, England, 613p, 2000.

KONEMAN, E. W. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido . Rio de Janeiro: Medsi. 2001.

KUMAR, Y.; GOODFELLOW, M. Reclassification of *Streptomyces hygroscopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* s. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p.769–775, 2010.

LACAZ, S.C.; PORTO E.; MARTINS, J.E.C.; VACCARI,E.V.; MELO, N.T. Tratado de micologia médica. 9 ed. São Paulo:Sarvier, 2002.

LEE, J.; CABELLO; N. G.; BIOL, C.; MARCOS, S.; UNIVERSITARIA, C.; AISLADOS, A.; MEXICANA, R. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa ( *Solanum tuberosum* spp . andigena Hawkes ). *Revista Mexicana de Fitopatología*, v.33, n.2, p. 116–139, 2015.

LIMA, S.M.A. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS–9H isolada da rizosfera de *Paullini cupana* Kunth. Dissertação (Mestrado). Recife, UFPE, 2013.

LING L.L; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.,; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER,A.; SCHÄBERLE, T.F.; HUGHES, D.E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D.R.; FELIX, C. R.; FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517, 455–459, 2015.

LUDWIG W, EUZÉBY J, SHUMANN P, BUSSE HJ, TRUJILLO ME, KAMPFER P, WHITMAN WB. Road map to the phylum Actinobacteria. In Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg N.R, Ludwig W,

RAINEY FA, SCHLEIFER KH, WHITMAN W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 5: The Actinobacteria, Williams and Wilkins (ed.), Baltimore, p. 1-25, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUMLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1128p.

MANCILHA, M. D. A.; GUIMARÃES, G. C.; NARDI, J. C. S. D. C.; OLIVEIRA, J. H. H. L. Otimização da etapa de extração do ácido clavulânico presente no caldo de fermentação utilizando misturas de solventes. *Química Nova*, v.37, n.8, p.1335–1341, 2014.

MARTÍNEZ, M.O.A.; POZO, J.A.G. D. Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones. *Farmacología*, v.21, n.2, p.78-82, 2002

MOHAMMADIPANAH, F.; WINK, J. Actinobacteria from arid and desert habitats: Diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p.1–10, 2016.

MOTA L. M.; VILAR F.C.; DIAS, L.B.A.; NUNE, T.F.; MORIGUTI, J.C. Uso racional de antimicrobianos. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.43. n.2, p. 164-172, 2010.

OLIVEIRA, J.F.P.; CIPULLO, J.P.; BURDMANN, E.A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, v.2, n.4, p.444-452, 2006.

OLIVA Á. M. M.; GARCÍA DEL POZO, J.A. Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, v.21, n.2, p.78-82, 2002.

PEREIRA, D. S.; GOMES, R. C.; SEMÊDO, L. T. A. S. Potencial das Actinobactérias na Biodegradação de Hidrocarbonetos. *Revista Eletrônica TECCEN*, v.5, p.71–95, 2012.

PEREIRA-MAIA, E. C., SILVA, P. P., DE ALMEIDA, W. B., DOS SANTOS, H. F., MARCIAL, B. L., RUGGIERO, R., GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: Uma visão geral. *Química Nova*, v.33, p.700–706, 2010.

PICAZO, J. J.; BETRIU, C.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I.; CULEBRAS, E.; LÓPEZ, F.; GÓMEZ, M.; VIRA, G. Actividad comparativa de la daptomicina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y frente a estafilococos coagulasa negativa. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, v.28, n.1, p.13-16, 2010.

PROCÓPIO, R.E.L.; SILVA, I.S.; MARTINS, M.K.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.16, p.466-471, 2012.

PUPPO, M.T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N.A.J.C.; BORGES, W.S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Taft, C.A. (ed.), Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry, Kerala, India: Research Signpost, p. 51-58, 2006.

RAMÍREZ, M. V.; CALZADÍAZ, L. Industrial Enzymes and Metabolites from Actinobacteria in Food and Medicine Industry. In: Actinobacteria - Fundamentos e Aplicações Biotecnológicas, ed. Dharumadurai Dhanasekaran e Yi Jiang, p. 315-326, 2016.

REDDY, N. G.; RAMAKRISHNA, D. P. N.; RAJAGOPAL, S. V. Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* ( MTCC 10109 ) for the production of antimicrobial metabolites. *Egyptian journal of biology*, v.13, p.21-29, 2011.

ROJAS, F. P.; QUISPE, J.L.; CABELLO, N. G. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes. *Revista Mexicana De Fitopatología*, v. 33, n. 2, p.116-139, 2015.

SANTOS, H.S; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e no tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.47, n.3, p.303-308, 2001.

SEIPKE, R.F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Letters*, v.36, p. 862-876, 2012.

SELMAN A. WAKSMAN AND ALBERT SCHATZ. Streptomycin—origin, nature, and properties. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, v.34, n.11, p. 273-291, 1945.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v.17, n.2, p.227-236, 2004;.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: Biology and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-29, 2015.

SILVA, G. R. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013

SILVA, G.M.M.; RAQUEL PEDROSA BEZERRA, R.P.; TEIXEIRA, J.T.; SILVA, F.O.; CORREIA, J.M.; PORTO, T.S.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (*Streptomycetaceae*) isolated from Amazonian lichens. *Acta Amazonica*, v.46, n.3, p. 301 – 310, 2016.

SILVA; V. M; BRITO, F. A. E; RAMOS, K. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade Enzimática de Actinobactérias do Semiárido, *Revista Brasileira de Geografia Física*, v.08, n. IV SMUD, p.560-572, 2015.

SINGH, N.; RAI, V. Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *streptomyces rimosus* mtcc 10792 from soil of chhattisgarh. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, v. 4, n.4, 2012.

SOARES, E. C. L., COSTA, E. P., & SILVA, L. C. N. Isolamento , Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* sp . UFPEDA 968. *Sientia Plena*, v.8 ,n.12, p.1–7, (2012).

SORIANO,A; MARCO, F; MARTÍNEZ<sup>1</sup>, J.A.; PISOS,E; ALMELA, M; DIMOVA, V.P.; ALAMO, D.; ORTEGA, M.; LOPEZ, J. ; MENSA, J. Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, v.46, n.2,p.193-200, 2008.

SZELIGA, M.; OBARAMICHLEWSKA, M. Glutamine in neoplastic cells: Focus on the expression and roles of glutaminases. *Neurochemistry International*, v.55, p.71– 75, 2009.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007

VERMA M, LAL D, KAUR J, SAXENA A, KAUR J, ANAND S, LAL R. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Research in Microbiology*, v.164,p. 718-728, 2013.

WAKSMAN, S.A.; ALBERT, S. Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*,v.31,n.7,p.208-214, 1945.

ZHANG, Y.; MU, J.; FENG, Y.; KANG, Y.; ZHANG, J.; GU, P.J.; WANG, Y.; MA, L.F.; ZHU, Y.H. Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. *Marine Drugs*, v. 7, p. 97-112, 2009.

ZHOU, QIN-WEI; DING, HAO-CHEN; LI, DONG-FANG; ZHANG, YAN-PING; DAI, ZHI-YUAN; ZHOU, TAO. Antioxidant Activity of Enzymatic Hydrolysate Derived From Hairtail Surimi Wash Water Using an Immobilized Chymotrypsin–Trypsin Column Reactor. *Journal of Food Biochemistry*, v.40, n.1, p. 39–46, 2016.

## **APÊNDICES**

### **ARTIGO 1**

#### **PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE METABÓLITO SECUNDÁRIO DE *Streptomyces hygroscopicus* QUANTO SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SUA CITOTOXICIDADE.**

**A ser submetido a Letters in Applied of Microbiology**

## **Produção e avaliação de metabólito secundário de *Streptomyces hygroscopicus* quanto sua atividade antimicrobiana e sua citotoxicidade.**

C B A Borba<sup>1</sup>, P A Da Silva<sup>1</sup>, A A Silva<sup>1</sup>, L A Linhares<sup>3</sup>, L I O De Souza<sup>3</sup>, M T S Correia, R C B Q Figueirodo<sup>3</sup>, N B Gusmao<sup>1</sup>, L M L M Pimentel<sup>3</sup>, L A O Da Silva<sup>1</sup> e L C B B Coelho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- Recife/PE

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco- Recife/PE

<sup>3</sup> Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz- Recife/PE

**Resumo:** Devido ao crescente número de infecções e um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado, a busca de novos antibióticos se intensificaram. Neste contexto visando a busca de novos antimicrobianos, as actinobactérias vêm sendo estudadas por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos. Este trabalho tem por objetivo produzir metabólito secundário de *Streptomyces hygroscopicus* avaliar sua atividade antimicrobiana e citotoxicidade, além de identificar morfológica e molecularmente a actinobactéria produtora. Inicialmente a atividade antimicrobiana foi realizada através de teste em difusão de poço, onde o extrato acetato de etila (EA) mostrou atividade frente a *B. Subtillis* (23,61mm) e *S. aureus* (21,61mm), o extrato metanólico (EM) e extrato hexânico (EH) frente as mesmas bactérias teste *C. Kruzi* (EM:11,92mm, AH: 8,86mm), *B.subtillis* (EM: 18,07mm, EH: 18,07mm), *S. aureus* (EM: 15,24mm, EH: 29,66 mm), *P. aeruginosa* (EM: 20,95mm, EH:17,91), com excessão da *E.coli* (EM:12,87mm) em seguida foi determinado CMI com 4 bactérias testes que apresentaram maior halo de inibição e *Micobacterium tuberculosis* ATCC. Grande parte dos extratos estudados mostraram atividade inibitória frente aos microrganismos testes quando em concentração de 10mg/mL, Já o extrato Acetato de etila (EA) frente a *B.subtillis*, e Metanólico frente a *B.subtillis* e *P. aeruginosa* obtiveram MIC > 10mg/mL, o extrato hexânico (EH) apresentou MIC de 1,25 mg/mL frente a *B.subtillis*. Os extratos apresentaram as seguintes valores de MIC, 5mg (EA), 2,5mg (EM) e 1,25mg (EH), frente a *Micobacterium tuberculosis* A citotoxicidade dos extratos estudados foi avaliada pela técnica de MTT, onde foi observado CC50 de 9,06 mg/mL para o extrato acetato de etila, 4,55 mg/ml para extrato hexânico e 1,81mg/mL para o extrato metanólico. Concluiu-se que Quanto a atividade antimicrobiana o extrato hexânico obteve melhores resultados, sendo efetivo frente a *Micobacterium tuberculosis* e *B.subtillis*, mostrando que extratos oriundos de *Streptomyces hygroscopicus* possui efetiva atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo o extrato acetato de etila considerado com menor toxicidade.

**Palavras-Chave:** *Streptomyces hygroscopicus*, antimicrobiano, MTT

### **Introdução**

O crescente número de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos leva à busca para estudos de diferentes compostos bioativo. Esta resistência em grande parte se deve também ao uso empírico e inadequado de antimicrobianos pela população, que no Brasil, até o ano de 2009, detinham o livre poder do compra destes fármacos. A incidência de isolados cada vez mais resistentes a atual terapêutica utilizada, tanto em meio hospitalar quanto na comunidade, vem crescendo ao longo dos anos (Queiroz et al, 2012). No entanto apenas duas novas classes de antibióticos foram introduzidas na medicina desde a década de 1960, a oxazolidinona linezolida (Zyvox; Pfizer) e o lipopeptídeo cíclico daptomicina (Cubicin; Cubist) em 2000 e 2003, respectivamente. Segundo Cordeiro e Brito (2012), um pequeno número de fármacos efetivos frente a bactérias resistentes aos já utilizados, foram lançados até 2012, cerca de quatro antibióticos foram classificados como novas entidades químicas, tigeciclina (Tygacil; Pfizer), retapamulina (Altabax; GlaxoSmithKline), telavancina (Vibativ; Theravance/ Astellas) e ceftarolina (Teflaro; Cerexa) (Brito e Cordeiro, 2012).

Neste contexto visando a busca de novos antimicrobianos, as actinobactérias vem sendo estudadas por sua capacidade de produzir metabólitos bioativos, pigmentos, compostos terpenóides e enzimas

com atividades antimicrobianas (Palaniyandi et al, 2013). As actinobactérias são caracterizadas como bactérias filamentosas gram positivas, com teor elevado de Guanina (G) e Citosina (C) em seu DNA, capazes de formar hifas em alguns estágios de seu desenvolvimento e de elevada diversidade morfológica. (Cheah et al., 2015; Carvalho, Oliveira, Van Der Sand, 2012).

Dentro do filo actinobacteria, está presente o gênero *Streptomyces*, microrganismos aeróbios obrigatórios que perfazem 30% da microbiota do solo. Este merece destaque quanto a produção de metabólitos bioativos, sendo produtores por aproximadamente 70% de todos os produtos naturais excretados por actinobactérias, dentre estes, antioxidantes, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, antitumorais, antitrombótico, imunossupressores e diversas enzimas de interesse industrial, sendo o grande destaque os antibióticos, como a Antracimicina, isolada de uma actinobactéria marinha e utilizada no combate ao bacilo *Anthrax* (Cunha et al, 2009; Singh, Rai, 2012; Rashad et al., 2015).

Diferentes classes de antimicrobianos são comumente produzidos pelo gênero *Streptomyces*. Há relatos que o primeiro antibiótico produzido pelo gênero foi a estreptomicina, este eficaz frente ao *Micobacterium tuberculosis*, trabalho este publicado por Waksman e Schatz em 1945. O segundo a ser relatado foi a neomicina em 1949 por Lechevalier e Waksman. Ao longo dos anos várias drogas foram descobertas, dentre elas a linezolida, a tigeciclina e a ceftobiprole, estas eficazes frente a bactérias gram positivas (Soriano, 2008). Um outro exemplo é a natamicina, um macrolídeo produzida por estipes de *Streptomyces natalensis*, *S. chattanoogensis* e *S. lydicus* (Atta et al, 2015).

Visando a produção de novas drogas com atividade efetiva frente a microrganismos patógenos humanos, extratos obtidos através de fermentação de actinobactéria, foram testados frente a diferentes microrganismos já conhecidos quanto sua capacidade patogênica, além de avaliar a citotoxicidade desses compostos.

## Resultados e discussão

### Identificação do microrganismo produtor por biologia molecular

O Microrganismo produtor do metabólito secundários estudado foi caracterizado a nível de gênero e espécie como *Streptomyces hygroscopicus*

### Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir de fermentação em biorreator.

#### Atividade antimicrobiana por difusão em poço

Após extração do metabólito secundário a partir da fermentação em biorreator foram obtidos três diferentes extratos, extrato acetato de etila, extrato metanólico e extrato hexânico. Ao realizar o ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em poço destes, frente as bactérias teste foi obtido o resultado mostrado na tabela 1.

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana por difusão em poço dos extratos obtidos através de fermentação em biorreator.

| Extratos obtidos         | Zona de inibição |                     |                  |                      |                      |                |
|--------------------------|------------------|---------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------|
|                          | <i>C. Kruzi</i>  | <i>B. Subtillis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>K. Pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| Extrato Acetato de etila | NA               | 23,61               | 22,62            | ND                   | ND                   | ND             |
| Extrato Metanólico       | 11,93            | 12,23               | 15,24            | ND                   | 20,95                | 12,87          |
| Extrato Hexânico         | 8,86             | 18,07               | 29,66            | NA                   | 17,92                | NA             |

ND: Não detectado

Maia-Araújo e colaboradores (2011), ao comparar os métodos de disco difusão e difusão em poço, utilizando diferentes quantidades de extrato etanólico de própolis frente a *S. aureus*, revela que não há diferença significativa ( $p > 0,5$ ) entre as técnicas, mostrando halos de inibição entre 11,11 e 15,66 mm, e 11,22 e 14,77mm, para poços e disco difusão, respectivamente. No entanto a técnica de difusão em poços é considerada de maior potencial de reprodutibilidade. Naine e colaboradores (2015) utilizando a técnica de difusão em poço observaram atividade antimicrobiana de extratos de *S.parvalus* frente a *S aureus* (24mm) e *P. aeruginosa* (20mm).

Quando analisados extratos n-butanólicos produzidos por *Streptomyces flavogrieus*, esses apresentaram eficácia frente a *B. subtilis* e *S. aureus*, obtendo halos de inibição de 15 e 13mm respectivamente (Dezfully e ramanayaka, 2013). Já Krishram Kannabiran e colaboradores (2013), observaram atividade antimicrobiana de extratos de acetato de etila frente a *P. aeruginosa* (17mm) e *C. albicans* (24mm), extrato esse produzido por *Streptomyces* sp. VITPK9. Observa-se assim que diferentes extratos oriundos de culturas de *Streptomyces* sp. apresentam atividade antibacteriana e/ou antifúngica frente a diferentes microrganismos, de forma eficaz.

### **Avaliação da atividade antimicrobiana por Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

Os valores de CMI variaram de 1,25mg/mL a  $> 10$ mg/mL, grande parte dos extratos estudados mostraram atividade inibitória frente aos microrganismos testes (*Bacillus subtilis* (UFPEDA-86), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-02) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-416)), quando em concentração de 10mg/mL, estes apresentando comportamento bacteriostático. O extrato Acetato de etila (EA) frente a *B.subtillis*, e Metanólico frente a *B.subtillis* e *P. aeruginosa* obtiveram CMI  $> 10$ mg/mL. E apenas o extrato hexânico em concentração de 3,2 mg/mL de mostrou bactericida frente a *B.subtillis*. Os extratos apresentaram as seguintes valores de CMI, 5mg (EA), 2,5mg (EM) e 1,25mg (EH), frente a *Micobacterium tuberculosis*.

Manikkam e seus colaboradores (2014) estudaram extratos de diferentes estirpes de Actinobacteria isoladas do solo de diferentes regiões, extratos de 39 das 54 cepas estudadas apresentaram atividade frente a uma ou mais cepas de *Mycobacterium tuberculosis* testadas. Enquanto 24 dessas inibiram o crescimento da estirpe padrão *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e enquanto cepas de SHRE (estreptomicina, isoniazida, rifampicina e etambutol) resistentes foram inibidas por 23 extratos.

Comparados aos extratos brutos, os compostos isolados de extratos de streptomyces apresentam inibição do crescimento da cepa teste quando utilizados em menor concentração, como descrito por Supong e colaboradores (2016), onde substâncias isoladas de extratos oriundos de *Streptomyces* sp. em concentrações entre 12-50 µg/mL inibiram o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*. Arasu e colaboradores (2008) verificaram atividade antimicrobiana de *Streptomyces* spp. ERI-26 isolada do solo e obtiveram CMI de 1500 µg/mL para *B. subtilis* e *S. aureus* a partir de uma das frações do extrato bruto metanólico.

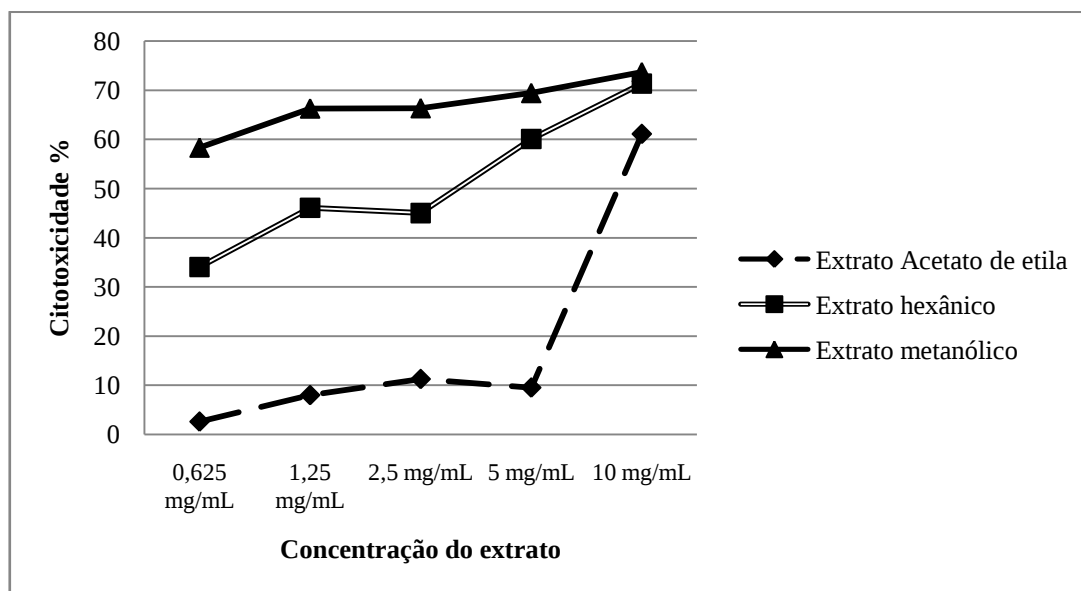
### **Citotoxicidade**

Ao avaliar a citotoxicidade dos extratos de *Streptomyces hygroscopicus* foi observado que há diferença de acordo com sua concentração. O extrato acetato de etila apresentou a menor toxicidade em todas as concentrações testadas, na de inibição de *Mycobacterium tuberculosis* (5,00 mg/mL ), a porcentagem de citotoxicidade foi 11,25%, essa ultrapassando 60% apenas ao chegar em 10mg/mL (Figura 1). Ainda foram calculados os CC50, onde se observou 9,06%, 4,55% e 1,81% para extrato acetato de etila, extrato hexânico e extrato metanólico, respectivamente.

Lertcanawanichakul (2015) analisando citotoxicidade de composto bioativo de cultura de *Streptomyces* sp., em células VERO, foi observado morte celular acima de 60%, quando esse em concentração de 10% e CC50 de 3,28%, sugerindo assim toxicidade deste composto frente a células

normais. Estudo realizado com frações de extrato acetato de etila provindos de fermentação de *Streptomyces* sp., os compostos obtidos mostraram-se eficazes quando sua atividade antimicrobacteriana e antimalarial, quando avaliada sua citotoxicidade para células vero, o CC50 variou de 4,04µM a concentrações acima de 84,7µM (Intaraudom et al.,2015).

Sudha e Masilamani (2012) demonstra que extrato acetato de etila derivado de *Streptomyces avidinii* em concentração de 2mg/mL em contato com células vero, apresentação citotoxicidade, mostrando viabilidade celular de 19%, assim sua toxicidade chega a 89%.



**Figura 1** Citotoxicidade em células VERO de extratos de *Streptomyces* sp.

## Materiais e métodos

### Identificação da actinobactéria por biologia molecular

A extração de DNA foi realizada através da cultura do microrganismo em meio líquido ISP-2 durante 48 h a 37 °C. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada e extração de DNA foi realizada utilizando o kit de purificação de Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes. A sequência de DNA foi avaliada por electroforese em gel de agarose, em seguida, realizada a amplificação do gene de 16S rRNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleótidos universais (fD15'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; rD15'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). A reação consistiu em uma mistura de 50 ng de DNA, 10 pmoles de cada um dos oligonucleótidos, 200 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X buffer, 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies), para um volume final de 25 µL. As condições de reação: 5 min de desnaturação a 94 ° C, seguido de 25 ciclos de 1 min a 94 ° C, 30 s a 52 ° C e 2 min a 72 ° C, uma extensão final de 10 min a 72 ° C. O produto de amplificação foi analisado por electroforese em 1,2% gel de agarose e, subsequentemente, a amostra foi enviada para o sequenciamento.

A amostra foi sequenciado por Macrogen e esta sequência foi comparada a todas as sequências em GenBank, usando software Blast of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). A sequência foi alinhado com o software Clustal e a árvore filogenética foi construída utilizando Mega 5.5. Topology foi avaliada por meio da análise de bootstrap (1.000 resampling).

### Obtenção dos extratos em biorreator

A actinobactéria foi semeada em placas de petri contendo ISP2 ágar e mantida em estufa por 7 dias, em seguida 30 discos (9mm) foram inoculados em ISP2 caldo para obtenção do pré-inoculo da fermentação. A fermentação para obtenção do extrato foram realizadas em biorreator New Brunswick Scientific BIOFLO 110 ( capacidade de 4L) utilizando 3L de meio MPE, onde o pré-inoculo foi adicionado, tendo o objetivo o crescimento da actinobactéria e produção do metabólito secundário bioativo. O biorreator possui controle de temperatura, esta mantida a 37°C e agitação mecânica de 200rpm. O arrefecimento foi realizado pela injeção de ar comprimido, controlado no parâmetro: nível de O<sub>2</sub> (1/1) (v/v). O pH inicial foi em torno de 7,2.

### **Extração do metabólito secundário e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos a partir da biomassa**

Após as 96 h o produto da fermentação em meio MPE foi centrifugado a 10000 rpm por 7 min, com a finalidade de separar a biomassa do sobrenadante. Então a biomassa foi misturada com diferentes solventes (hexano, acetato de etila e etanol), na proporção de 1:1 biomassa/solvente e mantidos sob agitação durante 30 min. A mistura então será centrifugada a 10000 rpm por 7 min e o sobrenadante foi separado para as avaliações seguintes. Esta última etapa foi realizada por 3 vezes consecutivas.

### **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir de fermentação em biorreator.**

A avaliação da atividade antimicrobiana foi inicialmente realizada frente aos microrganismos *Candida albicans* (UFPEDA1007), *Bacillus subtilis*(UFPEDA86), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA02), *Candida khruzi* (UFPEDA1002), *Klebsiella pneumoniae*(UFPE396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA416) através da técnica *Cup-plate*, . Em seguida realizadas CMI e CMB, dos extratos frente aos 3 microrganismos que os mesmos obtiveram melhor atividade e ao *Micobacterium tuberculosis* (SILVA et al., 2013; GOMES et al., 2012).

### **Citotoxicidade**

Células da linhagem VERO (10<sup>5</sup> células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB e incubados em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações dos extratos por 24 horas em meio RPMI sem vermelho de fenol. Após este período, foram adicionados 10 µL de MTT e incubados por mais 3h em estufa de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> . Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e sua absorbância foi determinada espectrofotometricamente a 590 nm. Cada experimento foi realizado em quadruplicata em dois experimentos distintos e a porcentagem de células viáveis em relação às células controles foi estimada. A concentração capaz de causar a perda de viabilidade em 50% das células foi determinada por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos Mosmann (1983).

### **Referências**

- Arasu M V, Duraipandiyan V, Agastian P, Ignacimuthu S (2008) Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Mycol Med*, 18: 147—153.
- Atta HM, EL-Sayed AS, EL-Desoukey MA, Hassan M, EL-Gazar M (2015) Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentatin, extraction and biological activities. *Journal of Saud Chemical Society*, 19: 360-371.
- Brito MAB, Cordeiro BC (2012) Necessidade de novos antibióticos. *J Bras Patol Med Lab*, 48: 247-249.

Carvalho T S, Oliveira D V, Van Der Sand S T (2012). Avaliação da atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos contra bactérias Gram-negativas resistentes a beta-lactâmicos. R. Tróp.: Ci. agr. biol., 6: 154.

Cheah Yoke-Kqueen, Lee Learn-Han, Chieng Cheng-Yun C, Wong Vui-Ling CM (2015) Isolation, identification and screening of Actinobacteria in volcanic soil of Deception Island (the Antarctic) for antimicrobial metabolites. Polish Polar Research, 36: 67–78,

Cunha I G B, Sobrinho T J S P, Silva R E A, Amorim E L C, Araujo J.M. (2009). Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA, Rev Bras Farm, 90: 120-123.

Dezfully N K, RamanayakA, JG (2015) Isolation, Identification and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Streptomyces flavogriseus*, strain ACTK2 from Soil Sample of Kodagu, Karnataka State (India). Jundishapur J Microbiol, 8: 1-8.

Gomes F S, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG (2012) Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. J Appl Microbiol, 114: 672-679.

Intaraudom C, Bunbamrung N, Dramaee A, Danwisetkanjana K, Rachtawee P, Pittayakhajonwut P (2015) Antimalarial and antimycobacterial agents from *Streptomyces* sp. BCC27095. Tetrahedron Lett, 56: 6875–6877.

Lertcanawanichakul, M. (2015) Isolation, phylogenetic characterization and antibacterial activity of streptomyces strains isolated from air at walailak university. Int J Pharm Bio Sci, 6: 1089 – 1100.

Maia-Araújo Y L F, Mendonça L S, Orellana S C, Araujo E D (2011) Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Sci Plena, 7: 1-4,

Manikkam R, Venugopal G, Subramaniam B, Ramasamy B, Kumar V (2014). Bioactive Potential of Actinomycetes from Less Explored Ecosystems against *Mycobacterium tuberculosis* and Other Nonmycobacterial Pathogens. Int Sch Res Notices, 2014: 1-9.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63.

Naine S J, C. Subathra D, Mohanasrinivasan V, Vaishnavi B (2015) Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. Braz Arch Biol Technol, 58: 198-207.

Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh Joo-Won (2013) Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Appl Microbiol Biotechnol, 97: 9621–9636.

Queiroz GMQ, Silva LM, Pietro RCLR, Salgado HRS (2012). Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. Rev Bras Clin Med, 10: 132-138.

Rashada FM, Fathya HM, El-Zayat AS, Elghonaimy AM (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiol Res. 175: 34–47.

Silva L C N, Sandes J M, Paiva M M, Araújo J M, Figueiredo R C B Q, Silva M V, Correia M T S (2013) Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. Nat Prod Res, 7: 2067-2072.

Singh N, Rai V (2012) Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; streptomyces rimosus mtcc 10792 from soil of chhattisgarh. Int J Pharm Pharm Sci, 4: 94-101.

Soriano A, Marco F, Martínez1 Já, Pisos E, Almela M, Dimova Vp, Alamo D, Ortega M, Lopez J, Mensa J (2008) Influence of Vancomycin Minimum Inhibitory Concentration on the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Clin Infect Dis, 46: 193-200.

Sudha S, Masilamani, S M. (2012) Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete Streptomyces avidinii strain SU4. Asian Pac J Trop Biomed, 2: 770-773.

Supong K, Thawai C, Choowong W, Kittiwongwattana C, Thanaboripat D, Koohakan P, Parinthawong N, Pittayakhajonwut P. Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). Res Microbiol, 167: 290-298.

## ARTIGO 2

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PERFIL QUÍMICO DE EXTRATOS  
METANÓLICO E ACETATO DE ETILA DE *Streptomyces hygroscopicus*****A ser submetido a Brazilian Archives of Biology and Technology**

## **Avaliação da atividade antioxidante e perfil químico de extratos metanólico e acetato de etila de *Streptomyces hygroscopicus***

Camila Beatriz Atanásio Borba<sup>1</sup>; Pérsio Alexandre da Silva<sup>1</sup>; Rafael Matos Ximenes<sup>1</sup>; Norma Buarque Gusmão<sup>1</sup>; Leonor Alves de Oliveira da Silva<sup>1</sup> e Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco- Recife/PE

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco- Recife/PE

**Resumo:** Antioxidantes são substâncias capazes de desacelerar ou retardar a oxidação de um material oxidável. O acúmulo de moléculas provindas dessas reações (radicais livres) podem causar estresse oxidativo, distúrbio esse considerado a principal causa de doenças crônicas degenerativas. Visando a produção de metabólitos secundário bioativos por *Streptomyces* sp. esse trabalho avalia a atividade antioxidante de extratos obtidos através de fermentação de *Streptomyces hygroscopicus*, além de caracteriza-lo quimicamente. Ao realizar a atividade antioxidante dos extrato através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC<sub>50</sub>: 3,4916 mg/mL (EA), 2,0880 mg/mL (EM). Quando utilizado o método ABTS o extrato Acetato de etila (1,485 mg/mL) observou-se o pico de porcentagem de inibição do radical ABTS de 19,3548, e para o extrato metanólico (0,285 mg/mL), 19,7947. Os perfis químico dos extratos foram realizados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde foram encontradas as seguintes classes: Protoantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, cumarinas e saponinas no extrato metanólico, já no extrato acetato de etila foram encontrados derivados cinâmicos, triterpenos e esteroides. Concluiu-se que os extratos possuem expressiva atividade antioxidante e apresentam em sua composição diferentes classes químicas.

**Palavra-chave:** Antioxidante, *Streptomyces hygroscopicus*, Caracterização química.

### **Introdução**

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas, que podem ser produzidas no metabolismo celular normal. Quando em excesso, causam o estresse oxidativo, este é a principal causa de diversas doenças crônicas e degenerativas como a arteriosclerose, a artrite reumatoide e diabetes mellitus. (Ferreira e Matsubara, 1997; Lee et al., 2014).

Com o objetivo de minimizar o desequilíbrio entre a homeostase pró-oxidante e antioxidante, diversas substâncias antioxidantes vem sendo utilizadas na prática médica e em outras áreas da saúde. Dentre estas drogas estão a Hidroxicasolina butilado (BHA), Hidroxitolueno butilado (BHT) e vitaminas A, E e C. (Robledo et al., 2014). Estudos mostram que a utilização de drogas antineoplásicas em conjunto com as antioxidantes promovem a potencialização da droga e diminuição de seus efeitos colaterais (Santos e Cruz, 2001)

As actinobactérias são conhecidas pela sua capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas estruturas químicas e atividades biológicas, estas bactérias são tipicamente úteis na indústria farmacêutica para a sua aparentemente capacidade ilimitada de produzir estas substâncias bioativas. Especialmente o gênero *streptomyces*, é considerado fonte de metabólitos importantes como antifúngicos, antioxidante, antitumorais e antibióticos. (Rao e Rao, 2013)

Como o objetivo de obter novos compostos com atividade antioxidante, neste trabalho extratos provindos de fermentação de actinobactéria foram testados quanto sua capacidade antioxidante e caracterizados quimicamente.

## **Metodologia**

### **Obtenção dos extratos em biorreator**

A actinobactéria *Streptomyces higroscopicus* foi semeada em placas de petri contendo ISP2 ágar e mantida em estufa por 7 dias, em seguida 30 discos (9mm) foram inoculados em ISP2 caldo para obtenção do pré-inóculo da fermentação. A fermentação para obtenção do extrato foram realizadas em biorreator New Brunswick Scientific BIOFLO 110 (capacidade de 4L) utilizando 3L de meio MPE, onde o pré-inóculo foi adicionado, tendo o objetivo o crescimento da actinobactéria e produção do metabólito secundário bioativo. O biorreator possui controle de temperatura, esta mantida a 37°C e agitação mecânica de 200rpm. O arrefecimento foi realizado pela injeção de ar comprimido, controlado no parâmetro: nível de O<sub>2</sub> (1/1) (v/v). O pH inicial foi em torno de 7,2.

### **Avaliação da atividade antioxidante**

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos acetato de etila e metanólico foi baseada na capacidade de captação de radicais-livres em solvente polares, através do método do DPPH onde ocorre a redução do radical 2,2'-difênil-1-picrilhidrazilo (DPPH.) (FABRI et al., 2011) e do método do ABTS, que tem como princípio a utilização de persulfato de potássio para oxidar o ABTS ao seu radical catiônico (PEREIRA, 2010; SANTOS et al., 2012; SÁ et al., 2009). Para o método de DPPH o resultado foi expresso em IC<sub>50</sub> e para ABTS em porcentagem de inibição

### **Separação de compostos por cromatografia em camada delgada (CCD) e caracterização fitoquímica do metabólito secundário**

Os extratos produzidos pela actinobactéria foram submetidos a cromatografia em camada delgada utilizando placas de alumínio e sílica Macherey-Nagel ALUDRAM SIL G/UV<sub>254</sub>, e foram testados diferentes sistemas solventes, utilizando os seguintes solventes: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e Tolueno utilizando-se padrões já conhecidos para as classes testadas (BADJI et al., 2005; CARVALHO, 2007). Os reveladores utilizados para diferentes classes foram: Flavanóides e derivados cinâmicos- Reagente de Neu, Triterpenos, esteroides, mono, sesquiterpenos, e saponinas - reagente de Lieberman & Burchard, Alcalóides- reagente Dragendorff, Cumarinas- KOH e Proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas- Vanilina clorídrica (WAGNER, BLADT, 1996; HARBONE, 1998; ROBERTS et al., 1957).

### **Análise UV-Visível**

OS extratos obtidos foram analisados em espectrofotômetro Thermo Fischer Scientific modelo EVO60, na região UV-Visível.

## **Resultados e discussão**

### **Atividade antioxidante**

Ao realizar a atividade antioxidante dos extratos através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC<sub>50</sub>: 3,4916 mg/mL, 2,0880 mg/mL, para extrato acetato de etila e extrato metanólico, respectivamente. Quando utilizado o método ABTS o extrato Acetato de etila (1,485 mg/mL) observou-se o pico de porcentagem de inibição do radical ABTS de 19,3548, e para o extrato metanólico (0,285 mg/mL), 19,7947.

A atividade antioxidante de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* pode apresentar grande variação, esta realidade vem sendo demonstrada por diferentes autores. Através da técnica de DPPH, Thenmozhi e Kannabiran (2012), obteve IC<sub>50</sub> de 0,6464 mg/mL em estudo utilizando extrato acetato de etila obtidos a partir de fermentação de *Streptomyces* sp. diferente de *Manivasagan* e colaboradores (2013), esses demonstraram que uma protease produzida por *Streptomyces* sp. obteve IC<sub>50</sub> de 78±0,28 mg/mL.

Ser e colaboradores (2016), em estudo de atividade antioxidante de uma nova espécie de *Streptomyces* sp. mostrou que extrato metanólico em concentração de 2mg/mL apresentaram porcentagem de inibição de  $27,24 \pm 1,91\%$ , já os obtidos neste trabalho apresentaram atividades de 50,73% em concentração de 2,09 mg/mL, dados obtidos quando utilizados método de DPPH. Ao quantificar a atividade desta nova espécie pelo método ABTS os mesmos verificaram porcentagem de inibição de  $27,87 \pm 2,19\%$ , esta maior que a porcentagem apresentada pelo extrato metanólico de *S. hygroscopicus* (19,79%), quando em concentração aproximadamente dez vezes menor.

Em estudo para avaliar atividade antioxidante de extrato metanólico provindo de *Streptomyces* sp. Tan e colaboradores (2015) encontraram atividade 8 vezes menor quando comparadas as atividades de extratos metanólicos obtidos neste trabalho quando em concentração de aproximadamente 2mg/mL.

### Caracterização química

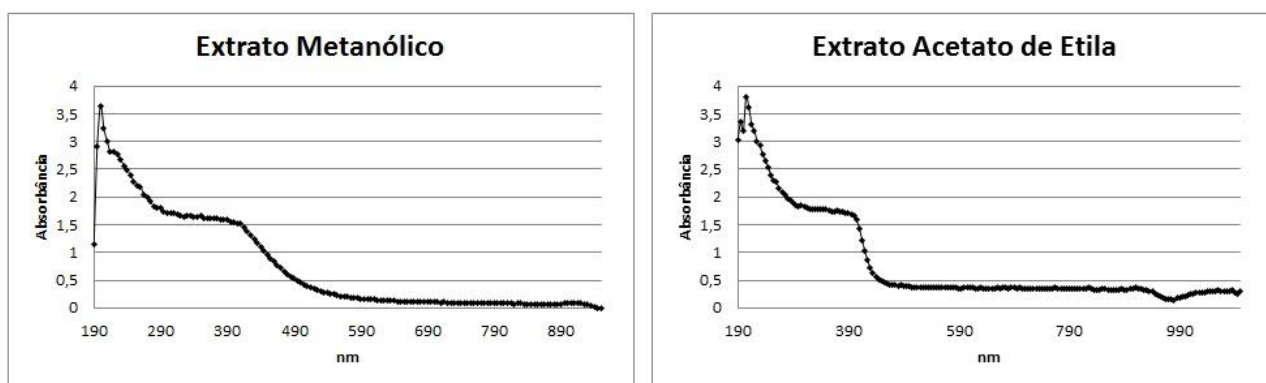
Ao realizar a caracterização química dos extratos em estudos foram encontradas as seguintes classes: Protoantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, cumarinas e saponinas no extrato metanólico, já no extrato acetato de etila foram encontrados monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides.

Diferentes classes de compostos são encontradas em extratos providos de culturas de *Streptomyces* sp. como demonstrado por Jaivel e colaboradores (2014), ao realizar a caracterização e identificação de compostos ou grupos funcionais do extrato acetato de etila obtidos de cultura de *Streptomyces* sp. detectaram a presença de cumarinas e fenóis. Distinto do observado por Lima e colaboradores (2014), que ao realizar análise fitoquímica observaram a presença de alcalóides, triterpenos, esteroides, apenas se igualando quanto a presença de fenóis.

### Análise em região UV-visível

Os extratos estudados apresentaram um pico majoritário na região entre 190-250nm. Pico este também apresentado em estudo realizado por Silva e colaboradores (2013), em análise fitoquímica do extrato seco de *Peperomia pellucida* L. foram encontradas saponina, esteróides e triterpenóides, classes também observadas neste trabalho.

**Fig 1.** Análise UV-visível extratos metanólico e acetato de etila



## Referências

- Jaivel, N; Uvarani, C.; Rajesh, R.; Velmurugan, D. and Marimuthu, P. (2014) Natural Occurrence of Organofluorine and Other Constituents from *Streptomyces* sp. TC1. *Journal of Natural Products*, 77: 2-8.
- Thenmozhi, M. and Kannabiran, K. (2012) Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces* sp VITSTK7. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 1: 51-57
- Badji, B.; Riba, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A. and Sabaou, N. Activité antifongique d'une source d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, v.15, p.211-219, 2005
- Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K. and Kim, Se-Kwon. (2013) Production, Characterization and Antioxidant Potential of Protease from *Streptomyces* sp. MAB18 Using Poultry Wastes. *BioMed Research International*, 2013: 1–13.
- Ser, Hooi-Leng ; Tan, L. Teng-Hern; Palanisamy, U. D.; Malek, S. N.A.; Yin, Wai-Fong; Chan, Kok-Gan; Goh, Bey-Hing and Lee, Learn-Han;.(2016) *Streptomyces antioxidans* sp. nov., a Novel Mangrove Soil Actinobacterium with Antioxidative and Neuroprotective Potentials. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-1.
- Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43:61-68.
- Robledo, S. N.; Tesio, A.Y.; Ceballos, C.D.; Zon, M.A.; Fernández, H (2014). Eletrochemical ultra-micro sensors for the determination of Syntetic and Natural antioxidants in edible vegetables oils. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192:467-473.
- Lee, Dong-Ryung; Lee, Sung-Kwon; Choi, Bong-Keun; Cheng, J.; Lee, Young-Sil; Yang, S.H.; Suh, Joo-Won; (2014). Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7: 962-967.
- Rao, K. V.R. and Rao, T.R. (2013). Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 from mangrove soil *Journal of Young Pharmacists*, 5: 121-126.
- Santos, H.S.; Cruz, W. M.S (2001) A terapia Nutricional com vitaminas e antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47:303-308.

Tan, L. Teng-Hern; Ser, Hooi-Leng; Yin, Wai-Fong; Chan, Kok-Gan; Lee, Learn-Han and Goh, Bey-Hing.(2015) Investigation of Antioxidative and Anticancer Potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 Isolated from Malaysia Mangrove Soil. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-12.

Lima, S. M. A.; Santana, T.I.S.; Aguiar, J. S.; Araújo, J. M. and Silva, T.G. (2014) Evaluation of antioxidant activity and chemical prospecting of metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* S75-5. *BMC Proceedings*, 8: 234.

Silva,R.M.F.; Ribeiro,J.F.A.; Freitas,M.C.C. ; Arruda,M.S.P.; NAscimento,M.N.; Barbosa,W.L.R.and Rolim Neto,P.J.(2013). Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.) *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15: 717-772.

Oliveira, P.H.C.; Esteves, O.M.; Cassoni, A.; Rodrigues, J.A.(2014) Técnicas e agentes antioxidantes utilizados para melhorar a união de restaurações após clareamento dental: uma revisão integrativa. *Revista Saúde*, 8: 53-65.

Fabri R.L.; Nogueira M.S.; Moreira J.D.; Bouzada M.L.;and Scio E. (2011) Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. *Journal of Medicinal Food*. 14: 840-846.

Pereira, M. O. S. Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos. Dissertação de Mestrado, Lisboa, 2010.

Santos, A.F.S.; Argolo, A.C.C.; Paiva, P.M.G.; Coelho, L.C.B.B. (2012) Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Tissue Extracts. *Phytotherapy Research*, 26: 1366-1370.

Sá, R. A. ; Argolo, A. C. C. ; Napoleão, T. H. ; Gomes, F. S. ; Santos, N. D.L. ; Melo, C. M. L. ; Albuquerque, A. C. ; Xavier, H. S. ; Coelho, L. C.B.B. ; Bieber, L. W. (2009) Antioxidant, *Fusarium* growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 470-477.

Harborne JB, *Phytochemical Methods*. 3<sup>a</sup> Ed. Londres: Chapman & Hall, 1998.

Roberts, E.A.H.; Cartwright, R.A.; Oldschool, M. (1957). Phenolic substances of manufactured tea. I. Fractionation and paper chromatography of water-soluble substances. *J Sci Food Agr* 8: 72-80.

Wagner, H.; Bladt, S. (1996). Plant drug analysis -A thin layer chromatography atlas. Springer. 2.ed. Munich.

Carvalho, M.P. Produção de metabólitos secundários de Basidiomicetos com Atividade antimicrobiana. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre, 2007.

Badji, B.; Riba, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N. (2005) Activité antifongique d'une source d'Actinomyces d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Journal de Mycologie Médicale, 15: 211-219.

## ANEXOS

## REGRAS DE SUBMISSÃO ARTIGO 1

Letters in  
Applied Microbiology



### Submission checklist for *Letters in Applied Microbiology*

#### Required information

- ☐ Are all persons named in the manuscript entitled to authorship and have they each approved the final version of the submitted manuscript?
- ☐ All authors must warrant that they have the authority to publish the material.
- ☐ All authors must warrant that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.
- ☐ Can you suggest at least two possible reviewers (not belonging to your institution) for your manuscript?
- ☐ Have you prepared your covering letter?
- ☐ Are you referencing material from a paper in press? (If so, please supply the proof electronically with your manuscript files.)

#### The manuscript

- ☐ Is the text double-spaced, with continuous line numbering and pages numbered?
- ☐ Does the structure of your manuscript comply with the author guidelines, as follows: Significance and Impact of the Study (max. 100 words); Abstract (max. 200 words); Introduction; Results and Discussion; Materials and Methods; Acknowledgements; References; Supporting Information; Tables; Figures.
- ☐ Is your manuscript under the **word limit** of 4000 words (including references, and taking into account the space required for tables and figures)?
- ☐ On the front page have you included the **title, name(s) of author(s) and place(s)** where the work was done, an **abbreviated running headline** not exceeding 35 letters and spaces and the **name and complete contact details** of the corresponding author?
- ☐ Are SI units used with negative indices e.g.  $\text{ml}^{-1}$  not /ml,  $\text{mol l}^{-1}$  not M or N? Note that the centrifugation unit should be given as g not rpm.
- ☐ Have you included relevant ethical statements and cited authorisation number/certificates as appropriate?

#### References

- ☐ Does the style of references comply with the author guidelines?
- ☐ In the text, multiple references should be cited in chronological order.
- ☐ In the text, use 'and' not '&' (e.g. Smith and Jones 1990).
- ☐ In the References section, journal titles should be abbreviated according to the *Index Medicus*.
- ☐ In the References section, references should not be numbered.

#### Figures and tables

- ☐ Are tables and table legends placed after the References section and numbered with an Arabic number (e.g. Table 1)?
- ☐ Are figures either placed after the References section or provided as separate files, and numbered with an Arabic number (e.g. Figure 1)?
- ☐ Have you checked that figures do not contain data labels and these are instead included in the legend?
- ☐ Have you checked that a list of figure legends is included after the References section?
- ☐ Have you prepared the original figures in electronic form and at high enough resolution? Wiley-Blackwell recommends 600 dpi Encapsulated PostScript (EPS) for line art, and 300 dpi TIFF for continuous tone, but figures can also be set from Word (.doc) and other formats.

#### Supporting information

- ☐ Have you included the files for any relevant supporting information?
- ☐ Are legends/explanations provided for these files, and labelled as e.g. Table S1, Video S1?

## REGRAS DE SUBMISSÃO ARTIGO 2



### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

#### General Information

The Journal ***Brazilian Archives of Biology and Technology – BABT*** aims to be internationally recognized for original publications of high quality and timeliness, and highly relevant articles for effective research carried out by the scientific community.

The journal publishes:

- Original research articles: It refers to unpublished research works. Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis. They must follow the usual presentation form, containing title, Running title, Abstract (maximum 250 words), Key words (three to six), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Times New Roman font)
- Short notes: They are a report on a single subject, which should be concise but definitive. This section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers. title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 6 (single space typed using Times New Roman font).
- Review articles: This is directed to the presentation of the progress in biology and technology, containing a critical view, with the main objective of benefiting the group formed by post graduating students and non-specialists in the area. The file must contain title, authors and affiliations, abstract (up to 250 words), six key-words, text with subtitles, acknowledgements (optional) and references. The maximum numbers of the pages are 12.
- Letter to Editor: It will be a presentation of some aspect in biology and technology, written down in a didactic way, with the objective of benefiting the group formed by graduating and post graduating students, non-specialists in the area. The maximum numbers of the pages are 3 (single space typed using Times New Roman font).

#### Aims and Scope

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas:

- Agriculture, Agribusiness and Biotechnology;
- Human and Animal Health;
- Biological and Applied Sciences;
- Food/Feed Science and Technology;
- Environmental Sciences;
- Engineering, Technology and Techniques.

The manuscript must be prepared in English only. We suggest that the manuscript should be reviewed before its submission for the first time by an English native speaker and, preferably, scientific experience in the area. Also, assistance of independent editing services can be found at

<http://journalexperts.com/>

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication."

#### **THE JOURNAL DOES NOT PUBLISH:**

- Articles with high similarity with other already published in the literature
- Items that are not contemplated by the journal's scope,
- Articles with outdated references. It is recommended that the author update any reference list at the time of submission.
- Articles with poor writing. As the official journal of the language is English, it is recommended that the authors provide for the review by someone who masters the language and preferably be presented a statement of the auditor regarding compliance in relation to the English language.
- Articles describing partial activities that are related to other research. When the authors wish to anticipate high relevance results without the work is completed, where the publication of opportunity (originality) is compromised by the time factor, we suggest using the mode "letter to the editor."
- Research articles specific to a local reality where the results cannot be extrapolated, generalized. In this case the Editor asks that authors seek to highlight the global application of that knowledge, even if the results are reported and apply to the specific site case.
- Review articles that overlap with others already published. Any review article must necessarily deepen some thesis that has no experimental proof but has potential for research. Or consisting of a compilation of relevant data to the field but are scattered in the literature.

### Examples of what is not:

- Validation of a protocol already established by international institutions,
- Set of measures that demonstrate the control of a specific process, such as glucose measurements on a specific population of animals, geographical distribution of a certain animal species, a set of measures with the aim of calibration equipment, etc.
- Analysis / composition of something that is already prior knowledge,
- Changes in products that aim to specific applications, such as use of flavoring to make a more palatable product.

### ERRATA (ERRATUM)

Errata applies only to cases where the journal has effectively wrong without the knowledge of the author. The author has a number of instances where errors / mistakes can and should be corrected such as author name, keywords, title, errors in the main text, etc.

The journal submits the final test of the revised and ready article for publication to the author of correspondence with the period of 1 (one) week for review and correction of the article. If the deadline for response expires without a return of the authors, the magazine considers that the article is approved (since the author has not spoken about the need for any changes / fixes) and therefore ready for publication.

Submission and publishing is **free of charge** and do not result in **commercial and profitable purpose**.

### The manuscript submission in Brazilian Archives of Biology and Technology implies that:

- The manuscript hasn't been partial or entirely published. *The manuscript should not be in selection process for publishing in another journal and/or another language;*
- The authors agree to transfer copyright to the journal and they are responsible for all of the subject and their legal consequences text.
- The submission must have been approved for all the co-authors and whenever necessary, by the authorities of the institution where the work was developed;
- Any study involving human subjects should have *Ethic Institutional Review Board Approval and the protocol number should be informed.*
- When working with experimental animal the regulations should be observed and the work should be approved by the local ethical

committee. *The protocol number should be informed.*

- Authors must ensure that the manuscript does not represent misconduct like fabrication, falsification, plagiarism or duplication of dates. In case of confirmed research misconduct, we will issue a retraction notice to correct the scientific record. *Please refer to Singapore Statement*

at: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>

- The journal does not take responsibility and/or takes part in eventual lawsuits related to the published articles.

-The veracity of the information and of the bibliographic citations is of exclusive responsibility of the authors.

**Submission of manuscripts will only be accepted when submitted electronically using the following link:**

<http://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>

The BAPT strongly condemns plagiarism and self-plagiarism. Authors must make sure that the content is unpublished and original. Previously published ideas should be properly cited in accordance with the norms.

The submitted manuscripts are pre-evaluated in its conformity to the norms, consistence, grammatical quality and English language. The authors need to observe the content referring to scientific relevance and/or technological and originality. Manuscripts accepted in this stage will be forwarded for review by specialists and sent for judgment by at least two referees.

When submitting a manuscript, please check:

- If article complains with all BAPT's rules indicated in this guideline,

- If article encompass the right category (original article, review, short note or letter to editor). Sometimes a good article is rejected due to wrong category, like a good short note was categorized as original article.

- The **names of the authors** must appear only in the platform's register and **not in the manuscript**, to double-blind trial.

- The authors should indicate five specialists in the same area of the manuscript who may eventually contribute to the evaluation process. The authors should not indicate coworkers specialists or from the author's department/Institution for ethic issues.

### **Authorship**

Any changes regarding the inclusion, exclusion or reorganization of author's names in the manuscript must be formally requested during the process of evaluation. The document might be forwarded by the SciELO system (ScholarOne platform), dated and assigned by all authors, still including the confirmation of

inclusion or exclusion, containing:

- Article title,
- Reason for the change,
- Author's names organized.

### **Publication Ethics Statement**

Scientific Research Publishing (SCIRP) is committed to maintain high standard through a rigorous peer-review together with strict ethical policies. Any infringements of professional ethical codes, such as plagiarism, fraudulent use of data, bogus claims of authorship, should be taken very seriously by the editors with zero tolerance. SCIRP follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct. The submitted manuscript should not have been previously published in any form and must not be currently under consideration for publication elsewhere.

**There is no fee for on line access, submission and evaluation articles.**

### **Organization of the manuscript**

*The manuscript must be organized according to the following categories*

**Research paper:** the file must contain Title, Running title, Abstract (maximum 250 words), Key words (three to six), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Times New Roman font).

**Short note:** the file must contain title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 6 (single space typed using Times New Roman font).

**Review:** the file must contain title, authors and affiliations, abstract (up to 250 words), six key-words, text with subtitles, acknowledgements (optional) and references. The maximum numbers of the pages are 12 (single space typed using Roman Font).

**Letter to Editor:** the file must contain title, authors and affiliations, abstract (maximum 50 words), three to six key-words; text not divided in topics; acknowledgements (optional), references. The maximum numbers of the pages are 3 (single space typed using Times New Roman font).

*The manuscript must be arranged in the following order:*

#### **Title**

*Must be precise, clearly reflecting the content of the manuscript.*

#### **Running Title**

*Must be short, reflecting the content of the manuscript.*

### **Abstract**

*Must be prepared as concise as possible, describing the goal and the results of the study.*

### **Key-words**

*Must present terms or subjects that represent the content of the manuscript, which will be used in the index of the article.*

### **Introduction**

*Must present the purpose of the study, clearly presenting the explanations and objectives of the article, offering information, which allows the reader to properly evaluate the presented results, specifying what new progress was obtained from research. The introduction must not contain data or conclusions from the referred manuscript.*

### **Materials and Methods**

*Must offer, in a clear and concise way, enough information allowing other researchers to reproduce the study. Standardized techniques don't need to be described in details.*

### **Results and Discussion**

*These sections can be presented separately or in a combined way.*

#### **Results**

*Must offer a concise description of the results obtained in the necessary experiments to sustain the conclusions of the research. The section can be divided in sub-sections, each of them with a subtitle. Do not repeat in the text all the data presented in tables or illustrations that may be used when necessary.*

#### **Discussion**

*This section should be limited to the content of the new information, relating them to the pre-existing knowledge. Only the indispensable citations must be included.*

### **Conclusions**

*The main conclusions must be presented in a concise and clear way.*

### **Acknowledgments**

*This section is optional. Must be brief, used to thank/quote people, scholarships, projects and support received from organisms of promotion. The names of the financing organizations must be fully written.*

### **References**

*Only the citations included in the text must be presented, being referenced and organized in numerical order, superscript numeral in the main text, considering the last name of the first author. **See Figure 1** (below) for guidance. Non-published results must not be included in the references list. Only article in ahead of print and with d.o.i or e-pub can be refereed. Observe that all references given in the list should be cited in the text and vice versa.*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TEXT FONT: TIMES NEW ROMAN</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <h1 style="margin: 0;">Use of Solid Waste from Thermoelectric Plant in the Cultivation of Microalgae</h1>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Title (Font 10, bold); initials of author</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <p><b>Running title:</b> Use of coal ash in the cultivation of microalgae.</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-top: 5px;">Running title (Font 12); with up to 40 characters</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <div style="background-color: red; color: black; padding: 5px; font-weight: bold;">! NO IDENTIFICATION OF AUTHORS IN THE MAIN TEXT</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <p><b>ABSTRACT</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-top: 5px;">Abstract (Font 12 and bold): Text - Font 10, italicized</div> <p><i>The aim of this study was to analyze the influence of solid waste on the cultivation of Spirulina sp. LEB 18 and Chlorella fusca LEB 111 with 0, 40, 80 and 120 ppm of mineral coal ash. The addition of the ash did not inhibit the cultivation of microalgae at the tested concentrations. It could be used for the cultivation of these microalgae due to the minerals present in the ash, which might substitute the nutrients needed for their growth.</i></p> <p><b>Key words:</b> ashes; Chlorella fusca LEB 111; microalgae; mineral coal; Spirulina sp.</p> |
| <p><b>INTRODUCTION</b></p> <p>As technology and industry develops, there is increasing environmental concern about industrial waste which can damage the ecosystem. The rapid expansion of different industries has resulted in increased amounts of toxic wastes. Mineral coal ash is one of the most produced in Brazil in terms of volume<sup>1</sup>. The burning of coal from south Brazil produces a high amount of ash, around 53% (w/w), which is a serious environmental problem. Due to the presence of trace elements in this waste, it must be disposed and used carefully and an appropriate treatment must be chosen in order to protect the ground and the surface water<sup>1,2</sup>.</p> <p>...follow (MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSION) .....</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <p><b>REFERENCES</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-top: 5px; text-align: center; font-weight: bold;">REFERENCES: MUST BE INDICATED AND ORDERED NUMERICALLY</div> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Soares PSM, Santos MDC, Possa MV. Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente. Rio de Janeiro: CETEM/MCT; 2008.</li> <li>2- Benito Y, Ruiz M, Cosmen P, Merino JL. Study of leaches obtained from the ash of coal from PFBC and AFBC processes. J Chem Eng. 2001; 84: 167-171.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                 |

**Figure 1:** General aspect of manuscript with key-notes for author's guidance.

## Preparation of the manuscript

The manuscript must be prepared in one column with maximum 12 pages (single space typed using Times New Roman font) for original and review manuscripts, maximum 6 pages short notes and 3 pages for letter do editor (single space typed using Times New Roman font, including tables, graphics, figures, images and references) in WORD (.doc) format, paper size A-4 (210x297 cm), with margins (2.5 cm left, right 2.0 cm, top and bottom 3.0 cm).

- Save the file in .doc Format.
- The journal is published online, so figures can be in color form.
- Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of the units according to SI (International Systems of Units).
- Scientific names: The International Code of Zoological Nomenclature and International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants must be observed.

### **Title (Font 18 and Bold)**

With initials capitalized up to 250 characters.

### **Running title (Font 12):**

With up to 40 characters.

### **Authors and institutional affiliation**

There must not be information that identifies authorship, institutional address or e-mail in the manuscript. This information will be registered at the moment of the submission of the manuscript and put in the article only after its acceptance.

### **Abstract (Font 12 and bold)**

Text - Font 10, italicized with up to 200 words (100 words for short notes). The Font style must be normal for scientific names, being highlighted in the text.

### **Key-words (Font 10 and bold)**

Font 10, separated by a comma. There must be at least 3 (three) and up to 6 (six) terms.

### **INTRODUCTION (Font 12, bold and caps lock)**

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

### **MATERIAL AND METHODS (Font 12, bold and caps lock)**

Text - Font 11, one column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

For Titles and Subtitles, use the following levels:

- First level - Other sections can be created: uppercase, font 12, bold.
- Second level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, bold
- Third level: only the first letter of each word is uppercase, font 11, italicized.

### **RESULTS AND DISCUSSION (Font 11, bold and caps lock)**

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

### **CONCLUSIONS (Font 12, bold and caps lock)**

Text - Font 11, 1 column, simple space and no tabulation in the paragraphs.

### **ACKNOWLEDGMENTS (Font 12, bold and caps lock)**

Text - Font 11, simple space and no tabulation in the paragraphs.

### **REFERENCES (Font 12)**

Reference list should be in Font 10, with special tabulation of 0.3 cm, being referenced and organized in numerical order. The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style see link below:

([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

- The titles of the journals must be abbreviated as *Braz Arch Biol Technol*.
- The format for the list of journal abbreviations can be found at:
  - In the specific journal, or
  - ISI Journal Title Abbreviations. <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISIabbr/> ; or
  - Biological Journals and Abbreviations, or
  - Index Medicus - abbreviations of journal titles, or
  - Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>
  - All references cited in the text should be in the references list and vice versa.

#### **- List of references:**

The full list of references, at the end of the article, must follow the Vancouver style ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)) in numerical order.

#### **- Important Note:**

There will be no restrictions on the reference article source language, despite the recommendation be in English, however the title should be translated and presented in English, between brackets.

#### **- Journal Article**

Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal, abbreviated italicized. Date of publication; volume (number/supplement): initial-final page of the article.

#### **Examples:**

- One author up to six authors: Pandey A. Recent developments in solid-state fermentation. *Process Biochem*. 1992; 27: 109-117.
- Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002; 347(4): 284-287.
- More than six authors: (list the first six authors followed by "et al.") Arakaki AH, Vandenberghe LPS, Thomaz Soccol V, Masaki R, Rosa Filho EF, Gregório A, et al. Optimization of Biomass Production with Copper Bioaccumulation by Yeasts in Submerged Fermentation. *Braz Arch Biol Technol*. 2011; 54(5): 1027-1032.

#### **- Web article**

Author(s) of the article. Title of the article. Title of the journal abbreviated italicized [journal in the internet]. Date of publication [date of accession]; volume (number): number of pages. Available from: address of the *website*.

#### **Example:**

Nandan A, Gaurav A, Pandey A, Nampoothiri KM. Arginine specific aminopeptidase from *Lactobacillus brevis*. *Braz Arch Biol Technol* [Internet]. 2010 [cited 2011 Oct. 19]; 53 (6): 1443-1450. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_pdf&pid=S151689132010000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S151689132010000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)

#### **- In books**

Authors. Book title. Edition. City: Publisher; Year.

#### **Example:**

Tengerdy RP. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey A, editor. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Educational Publishers & Distributors; 1998.

#### **- Chapter in book**

Authors. Chapter Title. In: Editors. Book title. Edition. City: Publisher; Year. Pages of citation.

#### **Example:**

Tengerdy RP. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: Pandey A, editor.

Advances in Biotechnology. New Delhi: Educational Publishers & Distributors; 1998. p. 13-16.

#### **- In conferences**

Author(s) of the work. Title of the presented work. In: responsible editor(s) for the event (if any). Title of the event: Proceedings of ... title of the event; date of the event; place of the event. City of publication: Publisher; Year of publication. Initial- final page of the work.

#### **Example:**

SEMINÁRIO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO, 3., 1993, Brasília. Anais.Brásíia: MEC, 1994. 300 p.

#### **- Part of Website/ homepage**

Author(s) of the homepage (if any). Title [homepage on the internet]. City: institution; date(s) of register [date of the last update with the expression "updated in"; date of access with the expression "accessed in"]. Title of the part of the homepage. Available from: website address.

### **UNITS AND ABBREVIATIONS**

The "SI" system must be used. In the case of other units, they must be added in parentheses. Only the standard abbreviations for the units must be used. Dots must not be included in the abbreviations.

### **TABLES**

Must be numbered consecutively in Arabic digits and inserted in proper place in the text. A brief and descriptive title must be included above each table and the explanations put below as a subtitle.

#### **Formatting of Tables:**

- Title and content: Font Times New Roman 10.
  - Footnotes: Font Times New Roman 9.
  - Width 16.5 cm.
  - Vertical and Diagonal lines must not be used in tables.
  - The tables must be elaborated and edited in cells, using the resources of the text editor.
- Observation: Tables in figure format (**jpg, tiff or png**) are not accepted, or that contain lines drawn.

### **FIGURES**

Must be numbered consecutively in Arabic digits and cited in the text in numerical order.

- Figures should be submitted preferably in color.
- Letters and numbers must have readable size after reduction or print, use the following fonts: Times New Roman, 18.
- Images must be adjusted to the width (16.5 cm) of the page, and must be smaller than the page to allow the inclusion of the subtitle.
- Figures must be presented in separated file and in **.tiff** format with a minimum of 300 dpi. Illustrations must be cited in the text with the word "Figure", without being abbreviated when it is part of a sentence. When it appears in parentheses, it must be abbreviated "(Fig.)".
- When figures present different parts, each one must be indicated by uppercase (Fig. 1 A, B, C, etc).
- Page charges: there will be no page charges.

### **COMPLETING PUBLISHING PROCESS**

- Proofs: After the layout, the manuscript is converted to pdf (proof sheet) and forwarded to the authors for approval. The Proofs must return to the Editorial Production in a maximum of 1 week. Other changes after this stage, in the approved manuscript, won't be accepted.

**Alana Marielle R G Kluczkovski, DSc**

***Brazilian Archives of Biology and Technology***

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC  
81350-010 Curitiba-PR, Brazil

Tel.: +5541-3395-2018