

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

APOLONIO ALVES DE LIMA JUNIOR

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA
RIZOSFERA DE *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA**

Recife

2020

APOLONIO ALVES DE LIMA JUNIOR

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA
RIZOSFERA DE *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Pesquisadora Nível 1B do CNPq

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Katrine Rabelo da Silva

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lima Junior, Apolonio Alves de

Potencial biotecnológico de actinobactéria isolada da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) da Amazônia / Apolonio Alves de Lima Junior - 2020.

115 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Silvia Katrine Rabelo da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Actinobacteria 2. *Streptomyces* 3. Metabólitos

I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (Orientadora) II. Silva, Silvia Katrine Rabelo da (Coorientadora) III. Título

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-104

APOLONIO ALVES DE LIMA JUNIOR

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA
RIZOSFERA DE *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Presidente)
Departamento de Bioquímica e Fisiologia da UFPE

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Interno)
Departamento de Bioquímica Fisiologia da UFPE

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro Interno)
Departamento de Morfologia e Fisiologia animal UFRPE

Profa. Dra Norma Buarque Gusmão (Membro Externo)
Departamento de Antibióticos UFPE

Prof. Dr. Raphael Carlos Férrer de Santana (Membro Externo)
Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU

Dedico esta pesquisa ao Pai Maior (Deus), à minha mãe Izabel (in memoriam), ao meu pai Apolonio, aos meus irmãos, sobrinhos, familiares, ao meu namorado Ednan Cardoso, aos amigos e professores pelo incentivo a minha formação pessoal e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de alcançar mais esse mérito em minha existência.

À minha mãe Izabel Cristina da Silva de Lima (in memoriam) pela minha formação cultural e por tudo que sou hoje, sem seus ensinamentos, nada disso teria acontecido, entre eles: Jamais desistir dos seus sonhos. Com isso, estou aqui Mainha. AMO a senhora para toda minha vida. A Senhora sempre será meu tesouro...

Ao meu pai Apolonio Alves de Lima pela educação e toda a bondade que há em um ser, esse é o Senhor. À minha família pelo apoio, principalmente aos meus irmãos (Aurelia Lima, Aureliane Lima, Aucione Lima, Aucimary Lima e Manoel Lima) pelas palavras de conforto em todos os momentos difíceis e felizes. Pois, sempre compreenderam e entenderam a importância da realização deste estudo para a minha vida acadêmica e profissional e por compreender minha ausência em momentos importantes de suas vidas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, agradeço em especial, pelo repasse de informações, conhecimento científico, pela disponibilidade dispensada, pela compreensão de minhas limitações, enquanto estudante. Parabenizo-a pela simplicidade e pessoa humana que és. Agradeço demais ao seu acolhimento e amparo num momento tão difícil nessa minha caminhada. Onde em alguns momentos senti-me incapaz e a senhora fez-me chegar até aqui. Agradeço ainda pela sua vida dedicada à Academia. Todos os méritos são poucos, frente a toda sua trajetória de vida profissional. Meus mais sinceros parabéns.

À minha Co-orientadora Prof.^a Dr.^a Silvia Katrine Rabelo da Silva pela disponibilidade prestada, seu deslocamento de Santarém/PA a Recife, retirada de dúvidas, fundamentação dessa pesquisa, pelo carinho e pelo grande auxílio na realização desse estudo. Parabenizo-a também pelo olhar diferenciado que a senhora possui com seus alunos.

Ao Prof.^o Dr. Raphael Carlos Férrer de Santana por todo apoio desde a seleção do programa, todos anseios compartilhados e o ombro amigo que suportou esses quatro anos de estudo. Meus eternos agradecimentos.

Às Professoras Dra Norma Buarque Gusmão e Dra Leonor Alves de Nascimento da Silva pelo acolhimento e olhar diferenciado como ser humano que são. As senhoras são demais...

Ao meu Namorado Ednan Cardoso por todo apoio recebido, pelas privações de tempo que passamos juntos na busca da realização desse sonho. AMO-TE MUITO...

A Coordenação do Programa no nome da Prof.^a Dr^a Vera Lúcia de Menezes Lima, pelo desafio de manter esse programa “vivo” e com muitas histórias para contar.

A todos os professores que compõem o Programa do Doutorado de Bioquímica e Fisiologia da UFPE, em especial à Prof.^a Dra Patrícia Paiva e ao Prof. Dr. Tiago Napoleão. Agradeço pelas disciplinas ministradas, pela colaboração com as novas descobertas e consolidação de todos os conhecimentos apreendidos.

Às minhas colegas de turma e, hoje, eternas amigas do Doutorado (Cintia, Gabriela, Clécia e Cilene), com certeza, formamos uma família e nossa turma fez a diferença nesse programa. Estou muito feliz por conhecê-las.

Agradeço a Prof.^a Dra Glaucia Lima do Departamento de Antibióticos (UFPE) pelas primeiras orientações nesse mundo até então “desconhecido”. À Prof.^a Dra Janete Magali e aos Funcionários da Coleção de Microrganismos (UFPE) Dona Fátima, nossa Eterna “Fafa”, a senhora foi minha base, Marcela, Alana e Luiz Carlos. Aos colegas do Departamento de Antibióticos (UFPE) Suelen, Hanna e Vinicius.

A todos alunos colaboradores do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial - LAMAI, pela colaboração nesses últimos quatro semestres: Erik, Pérsio, Hugo Galindo e em especial a Thales.

Agradeço a todos os meus colegas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, em especial a Edjane Florêncio, Jefferson Vicente, Renta Lira, a Fernanda Moreira e às Enfermeiras Michelle Ribeiro e Talita Batista que acompanharam de perto toda minha dedicação e preocupação em concluir essa nova etapa de minha vida.

Agradeço aos meus colegas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco-UPE, em especial à Enfermeira Erika do Monte e a Maria José por compreender meus anseios.

Agradeço ainda a minha ex-chefe Prof.^a Terezinha Lima (Coordenadora de Graduação em Enfermagem da UNINASSAU-Recife), com sua contribuição esse sonho está sendo realizado. Agradeço também a Prof.^a Raquel Porto (Gerente dos Estágios da UNINASSAU-Recife), Prof.^a Nara Porto (Coordenadora Acadêmica de Saúde da UNINASSAU) e ao Prof.^o Júlio Vilanova (Professor do Curso de Enfermagem da UNINASSAU-Recife) pelo apoio e carinho dispensados.

Agradeço aos componentes da Banca de Defesa Prof.^a Dra Launa Coelho, Prof.^a Dra Patrícia Paiva, Prof. Dr. Raphael Férrer, Prof. Dr. Emmanuel Pontual e Prof.^a Dra Norma Gusmão pela disponibilidade dispensada e o enriquecimento que farão nesse trabalho.

Como também não poderia deixar de agradecer aos meus alunos do Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU-Recife, aos alunos das Pós-Graduações, e Cursos preparatórios para Concursos.

Finalizo agradecendo a todos meus colegas de turma do Curso de Medicina, da UNINASSAU-Recife, e todos aqueles que não citei ao longo desse texto, que contribuíram direta ou indiretamente na realização e consolidação desse sonho que está prestes de se realizar.

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças (MEGGINSON, 1963).

RESUMO

Actinobactérias são constituídas por um grupo variado de bactérias filamentosas. Morfologicamente são caracterizadas como gram positivas, aspecto microscópico comum entre elas, além de possuírem elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) em seu ácido desoxirribonucléico (DNA), modificando o percentual desse conteúdo entre os gêneros. Podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerófilas, sendo capaz de se desenvolver em ambientes extremos, poluídos e hostis. Elas formam um grupo de microrganismos que mais se destaca quanto à produção de compostos bioativos e estão sendo o alvo da indústria biotecnológica por serem estimadas como fonte abundante desses compostos bioativos com estrutura química e ação farmacológica bastante diversificada. Os compostos bioativos naturais de origem microbiana são as principais fontes de antimicrobianos utilizados na atualidade, por outro lado, o rápido aumento da carga global de resistência a antimicrobianos, com o declínio concomitante na descoberta de novas moléculas antimicrobianas, a partir de nichos ecológicos ainda inexplorados, exige a busca de novos e eficazes metabólitos secundários, com propriedade antimicrobiana. Sendo assim, este estudo avaliou o potencial biotecnológico de *Streptomyces sp.* que foi isolada do solo da rizosfera, da Amazônia, de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) pela técnica do ágar-bloco. Foi realizada a identificação clássica e molecular, realizada as características fisiológicas e bioquímicas do microrganismo, extração de metabólitos bioativos do líquido fermentado e da biomassa, cromatografia em camada delgada, extração de molécula antimicrobiana, prospecção química preliminar, atividade antioxidante e atividade inseticida do extrato bruto. A identificação clássica e molecular identificou a actinobactéria como *Streptomyces cinereus*. As características bioquímicas revelaram a produção de amilase tendo um halo enzimático de 21,6 mm e o diâmetro da colônia chegou a 18mm, caseinase halo enzimático de 48,6 e diâmetro da colônia 18,3 e hemólise halo enzimático 19,3 e diâmetro da colônia 11,8. O extrato bruto da *Streptomyces cinereus* foi obtido no caldo de fermentação seguido de extração com acetato de etila, para posterior avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*. Os metabólitos antifúngicos foram produzidos a partir da fermentação de 24h frente à *Candida albicans*, e após 48h ativos sobre *Candida krusei*. A concentração fungicida mínima para *Candida krusei* foi de 156µg/mL, para *Candida albicans* foi de 78,1µg/mL revelando a produção de compostos bioativos por *Streptomyces cinereus* com atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras de interesse clínico. Cromatografia em camada delgada revelou a presença de

metabólitos secundários pertencentes à classe das cumarinas, derivados de antracênicos, xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides. Ainda foi realizada a determinação da atividade antioxidante que apresentou varredura de 14,74% na concentração de 10mg/dl de ácido ascórbico. O poder redutor do íon molibdato teve a absorbância na concentração de 10mg/ml de 0,370. A atividade inseticida por fumigação e contato contra *Sitophilus zeamais* revelou uma potencial atividade inseticida do extrato bruto. Por fim, a *Streptomyces* revelou uma importante produção de metabólitos secundários bioativos sobre fungos e insetos.

Palavras-chave: Actinobacteria. *Streptomyces*. Metabólitos. Produtos biológicos. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Actinobacteria are constituted by a varied group of filamentous bacteria. Morphologically they are characterized as gram positive, a common microscopic aspect among them, besides having high G+C content (guanine and cytosine) in their deoxyribonucleic acid (DNA), modifying the percentage of this content between genera. They can be aerobic, anaerobic or microaerobic, and can develop in extreme, polluted and hostile environments. They form a group of microorganisms that stands out most regarding the production of bioactive compounds and are being the target of the biotechnological industry because they are estimated as an abundant source of these bioactive compounds with chemical structure and very diversified pharmacological action. Natural bioactive compounds of microbial origin are the main sources of antimicrobials currently used, on the other hand, the rapid increase in the global burden of antimicrobial resistance, with the concomitant decline in the discovery of new antimicrobial molecules, from ecological niches still unexplored, requires the search for new and effective secondary metabolites with antimicrobial property. Thus, this study evaluated the biotechnological potential of *Streptomyces* sp. which was isolated from the soil of the rhizosphere, from the Amazon, from *Aniba parviflora* Syn *fragrans* (Macacaporanga) by the block agar technique. Classical and molecular identification was performed, the physiological and biochemical characteristics of the microorganism, extraction of bioactive metabolites from fermented liquid and biomass, thin layer chromatography, extraction of antimicrobial molecule, preliminary chemical prospection, antioxidant activity and insecticide activity of crude extraction were performed. Classical and molecular identification identified actinobacteria as *Streptomyces cinereus*. Biochemical characteristics revealed the production of amylase having an enzymatic halo of 21.6 mm and the colony diameter reached 18 mm, enzymatic halo caseinase of 48.6 and colony diameter 18.3 and enzymatic halo hemolysis 19.3 and colony diameter 11.8. The crude extract of *Streptomyces cinereus* was obtained in the fermentation broth followed by extraction with ethyl acetate, for further evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) against *Candida albicans* and *Candida krusei* yeasts. The antifungal metabolites were produced from 24-hour fermentation against *Candida albicans*, and after 48h active on *Candida krusei*. The minimum fungicide concentration for *Candida krusei* was 156µg/mL, for *Candida albicans* it was 78.1µg/mL revealing the production of bioactive compounds by *Streptomyces cinereus* with antifungal activity against filamentous fungi and yeasts of clinical interest. Thin layer chromatography revealed the presence of secondary metabolites belonging to the class of coumarins, derived from

anthracenes, xanthines, phenolic compounds, triterpenes and steroids. Antioxidant activity that showed a scan of 14.74% at the concentration of 10mg/dl of ascorbic acid was also determined. The reducing power of the molybdate ion had absorbance at 10mg/ml of 0.370. Insecticide activity by fumigation and contact against *Sitophilus zeamais* revealed a potential insecticide activity of the crude extract. Finally, *Streptomyces* revealed an important production of bioactive secondary metabolites on fungi and insects.

Keywords: Actinobacteria. *Streptomyces*. Metabolites. Biological products. *Candida albicans*.

RESUMEN

Actinobacterias son instituidas por un grupo diverso de bacterias filamentosas. Morfológicamente se caracterizan por ser grampositivos, aspecto microscópico común entre ellos, además de tener un alto contenido de G + C (guanina y citosina) en su ácido desoxirribonucleico (ADN), cambiando el porcentaje de este contenido entre géneros. Pueden ser aeróbicos, anaeróbicos o microaerófilos, pudiendo desarrollarse en ambientes extremos, contaminados y hostiles. Forman un grupo de microorganismos que se destaca más en términos de producción de compuestos bioactivos y están siendo el objetivo de la industria biotecnológica porque se estiman como una fuente abundante de estos compuestos bioactivos con una estructura química y acción farmacológica muy diversa. Los compuestos bioactivos naturales de origen microbiano son las principales fuentes de antimicrobianos utilizados hoy en día, por otro lado, el rápido aumento de la carga global de resistencia a los antimicrobianos, con la disminución concomitante en el descubrimiento de nuevas moléculas antimicrobianas, a partir de nichos ecológicos aún sin explorar, requiere la búsqueda de metabolitos secundarios nuevos y efectivos, con propiedades antimicrobianas. Por lo tanto, este estudio evaluó el potencial biotecnológico de *Streptomyces sp.* que se aisló del suelo de la rizosfera del Amazonas, de *Aniba parviflora Syn fragans* (Macacaporanga) mediante la técnica de bloque de agar. Se realizó la identificación clásica y molecular, se realizaron las características fisiológicas y bioquímicas del microorganismo, extracción de metabolitos bioactivos del líquido fermentado y biomasa, cromatografía en capa fina, extracción de molécula antimicrobiana, prospección química preliminar, actividad antioxidante y actividad insecticida del extracto crudo. La identificación clásica y molecular identificó actinobacterias como *Streptomyces cinereus*. Las características bioquímicas revelaron la producción de amilasa que tiene un halo enzimático de 21,6 mm y el diámetro de la colonia alcanzó 18 mm, la caseinasa de un halo enzimático de 48,6 y un diámetro de colonia de 18,3 y una hemólisis enzimática de halo de 19,3 y un diámetro de colonia 11.8. El extracto crudo de *Streptomyces cinereus* se obtuvo en el caldo de fermentación seguido de extracción con acetato de etilo, para una evaluación posterior de la concentración inhibitoria mínima (MIC) contra las levaduras *Candida albicans* y *Candida krusei*. Los metabolitos antifúngicos se produjeron a partir de la fermentación de 24 h contra *Candida albicans*, y después de 48 h de actividad en *Candida krusei*. La concentración fungicida mínima para *Candida krusei* fue de 156 µg / ml, para *Candida albicans* fue de 78.1 µg/ml, lo que revela la producción de compuestos bioactivos por *Streptomyces cinereus* con actividad antifúngica contra hongos filamentosos y

levaduras de interés clínico. La cromatografía en capa fina reveló la presencia de metabolitos secundarios pertenecientes a la clase de cumarina, derivados de antracenos, xantinas, compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides. También se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante, que mostró un barrido del 14,74% en la concentración de 10 mg / dl de ácido ascórbico. El poder reductor del ion molibdato tenía una absorbancia a una concentración de 10 mg / ml de 0,370. La actividad insecticida por fumigación y contacto contra *Sitophilus zeamais* reveló una posible actividad insecticida del extracto crudo. Finalmente, *Streptomyces* reveló una producción importante de metabolitos bioactivos secundarios en hongos e insectos.

Palabras clave: Actinobacterias. *Streptomyces*. Metabolitos. Productos biológicos. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	ANIBA PARVIFLORA SYN FRAGANS (MACACAPORANGA).....	20
2.2	ACTINOBACTÉRIAS.....	20
2.2.1	Gênero <i>Streptomyces</i>.....	23
2.2.2	Metabólitos Secundários.....	25
2.2.3	Produção de moléculas antimicrobianas por <i>Streptomyces</i>.....	31
2.3	DESCOBERTAS E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR <i>STREPTOMYCES</i>	30
3	MATERIAIS e MÉTODOS.....	32
3.1	IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA.....	32
3.1.1	Actinobactéria.....	32
3.1.2	Condições de cultivo.....	33
3.1.3	Caracterização Bioquímica e Fisiológica.....	33
3.1.3.1	Produção de Caseinase e Gelatinase.....	33
3.1.3.2	Produção de Amilase.....	34
3.1.3.3	Produção de Catalase.....	34
3.1.3.4	Produção de Lipase e Esterase.....	35
3.1.3.5	Produção de Pectinase.....	35
3.1.3.6	Produção de L-glutaminase.....	35
3.1.3.7	Atividade hemolítica.....	35
3.1.4	Determinação do índice enzimático.....	35
3.1.5	Identificação microscópica e macroscópica.....	35
3.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	36
3.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	36
3.4	FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	38
3.5	EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DO LÍQUIDO FERMENTADO.....	39
3.6	EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DA MASSA CELULAR.....	39
3.7	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	40
3.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DE HEXANO, CLOROFÓRMIO E ACETATO DE ETILA.....	40
3.8.1	Difusão em disco.....	40
3.9	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI).....	40
3.10	PROSPECÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO BRUTO MAIS ATIVO.....	41

3.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	42
3.11.1	Atividade Antioxidante por DPPH.....	42
3.11.2	Poder Redutor do Íon Molibdato.....	42
3.12	ATIVIDADE INSETICIDA FRENTE A <i>SITOPHILUS ZEAMAI</i> S	43
3.12.1	Criação do inseto.....	43
3.12.2	Ensaio da avaliação de toxidade fumigante do complexo bioativo	43
3.12.3	Ensaio da avaliação toxicidade por contato.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS.....	45
4.2	ASPECTOS MICROMORFOLÓGICOS.....	47
4.3	ANÁLISE MOLECULAR.....	48
4.4	UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO...	49
4.5	CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl	50
4.6	CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS.....	51
4.7	PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	54
4.8	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	55
4.9	CURVA DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ANTIMICROBIANOS.....	55
4.10	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	56
4.11	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA – CMI.....	57
4.12	PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO.....	58
4.13	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	59
4.13.1	Atividade Antioxidante por DPPH.....	59
4.13.2	Poder Redutor do Íon Molibdato.....	59
4.14	ATIVIDADE INSETICIDA.....	60
4.15	ARTIGO I PERCEPÇÕES DE ACTINOBACTERIA E DO GÊNERO <i>STREPTOMYCES</i> - REVISÃO DE LITERATURA.....	62
4.16	ARTIGO II PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS DE ACTINOBACTERIA ISOLADA DO SOLO AMAZÔNICO.....	78
4.17	ARTIGO III AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PROSPECÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ATIVIDADE INSETICIDA FRENTE A <i>SITOPHILUS ZEAMAI</i> S POR METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR <i>STREPTOMYCES CINEREUS</i> DA AMAZÔNIA.....	90
5	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	ANEXO A – COMPOSIÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA.....	112

1 INTRODUÇÃO

A *Aniba parviflora*, planta pertencente à família das Lauraceae, conhecida como macacaporanga, é uma árvore aromática com flores e frutos, de médio porte da região amazônica (PEREIRA, 2010). Existem aproximadamente 49 gêneros com cerca de 2.500 espécies, aparecendo principalmente nos trópicos e subtropicais do sudeste asiático até o continente americano (GLIMN-LACY E KAUFMAN, 2006). No Brasil, a planta pode ser encontrada ao redor de igarapés da floresta amazônica ocidental, distribuída nas localidades de Santarém, Faro e médio rio Tapajós (REVILLA, 2002).

Os microrganismos presentes na rizosfera, região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato, representam cerca de 4 a 10% da superfície da raiz e é colonizada por microrganismos (PEREIRA, 2010). Na área do solo, ao redor das raízes, há uma influência sobre esses microrganismos, eles realizam atividades significantes para conservação e sobrevivência das comunidades vegetais e animais, devido à liberação de princípios ativos vegetais que bloqueiam ou beneficiam o crescimento microbiano, mas geralmente o número de microrganismos na raiz e em sua volta é muito mais elevado do que no solo livre (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Entre os microrganismos presentes na rizosfera temos o grupo actinobactérias que estão amplamente distribuídas em diferentes ecossistemas pelo planeta e podem colonizar diversos substratos. Esses microrganismos, anteriormente denominados actinomicetos (do grego, “*aktis*”, irradiado; “*mykes*”, fungo) foram inicialmente considerados um grupo intermediário entre bactérias e fungos, entretanto estudos mais precisos os reconheceram como organismos procarióticos (PANDEY, GHIMIRE e AGRAWAL, 2004; OGUNMWONYI, 2008).

A bioprospecção de microrganismos isolados de nichos ecológicos constitui uma importante estratégia para a obtenção de compostos antimicrobianos mais eficientes e menos tóxicos, que podem, em última análise, controlar o efeito patogênico de bactérias e fungos que são resistentes aos antimicrobianos habitualmente utilizados nos diversos cenários (APPELBAUM e JACOBS, 2005; BUTLER e BUSS, 2006; PELÁEZ, 2006; YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; RODRÍGUEZ- NORIEGA et al., 2010).

Actinobactérias tem atraído cada vez mais atenção dos estudiosos das diversas áreas da ciência, como agrônomos, químicos, taxonomistas, biólogos, entre outros, devido a sua alta capacidade de produzir diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria

farmacêutica, agrícola, alimentícia e têxtil. São uma única fonte de produtos naturais sendo responsável por sintetizar quase 40% de todos compostos bioativos conhecidos no mundo (BÉRDY, 2005; GOODFELLOW e FIEDLER, 2010; QIN et al., 2011).

De acordo com Arasu et al. (2009) e Batista et al. (2011), a produção de compostos bioativos originários de bactérias e fungos tem sido descrita desde o início do século XX, sendo o grupo das actinobactérias alvo da indústria biotecnológica por serem estimadas como fonte abundante de metabólitos secundários bioativos de estrutura química e ação farmacológica bastante diversificada.

Os compostos bioativos naturais de origem microbiana são as principais fontes de antimicrobianos utilizados na atualidade, por outro lado, o rápido aumento da carga global de resistência a estes antimicrobianos, com o declínio concomitante na descoberta de novas moléculas antimicrobianas, a partir de nichos ecológicos ainda inexplorados, exige a busca de novos e eficazes metabólitos secundários, com propriedades antimicrobianas (MILSHTEYN, SCHNEIDER E BRADY, 2015; DAS et al., 2018).

Ainda há muito para ser explorado das fontes naturais pelo planeta. É preciso conhecer cada vez mais a biodisponibilidade de compostos produzidos pelos microrganismos. É notório que o grupo actinobactérias é uma rica fonte de produtores de metabólitos secundários a ser pesquisado. Na atualidade, temos grandes resistências bacterianas e fúngicas. Clinicamente isso se torna um grande problema de saúde pública.

Diante desse relato, foi necessário o estudo e identificação da actinobactéria isolada da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) da Amazônia, com potencial biotecnológico que possa vir a ser útil para obtenção de novas moléculas bioativas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar à nível de espécie actinobactéria isolada da rizosfera de *A. parviflora* *Syn Fragans* (Macacaporanga) avaliando o seu o potencial biotecnológico antimicrobiano e inseticida.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar identificação clássica e molecular de actinobactéria isolada da *A. parviflora* *Syn Fragans*.
- Determinar as características bioquímicas da actinobactéria
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato;
- Realizar a atividade inseticida do extrato bruto frente ao inseto *Sitophilus zeamais*;
- Efetuar caracterização química parcial de compostos presentes no extrato bruto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *ANIBA PARVIFLORA SYN FRAGANS* (MACACAPORANGA)

A *Aniba parviflora* também conhecida como macacaporanga é uma espécie nativa da Amazônia pertencente à família das Lauraceae. É frequentemente confundida com o pau-rosa pela grande semelhança das folhas e frutos, apesar de conter linalol, produto químico que pode ser transformado em um número de derivados de valor agregado para a indústria de fragrâncias muito diferenciadas (MAIA e ANDRADE, 2009; SOUZA, 2010).

Aniba parviflora é uma espécie arbórea com propriedades de mata pluvial, solos argilosos e não inundáveis, as plantas chegam até 30 m sendo todas as suas partes aromáticas; casca pardo-amarelada, folhas coriáceas, inflorescência lateral de até 2,5 cm de comprimento, multifloral, de flores pequenas, cúpula do fruto espessa, ferrugínea, fruto do tipo baga, de aproximadamente 25 x 20 mm, cor vinho-escuro (MATTOSO, 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Do seu óleo essencial, são descritas diferentes classes de metabólitos secundários bioativos e extratos orgânicos como, por exemplo, taninos, compostos fenólicos de ampla importância para a indústria alimentícia devido à sua atividade antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante; saponinas, devido à sua ação imunoadjuvante e hemolítica; e flavonóides, compostos aromáticos com variada ação biológica, entre as quais ação vasoprotetora, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante (SOUZA, MELLO e LOPES, 2011).

2.2 ACTINOBACTÉRIAS

Actinobactérias estão amplamente distribuídas em diferentes ecossistemas e podem colonizar diversos substratos. Elas são constituídas por um grupo variado de bactérias filamentosas, que morfologicamente são caracterizadas como Gram positivas, aspecto microscópico comum entre elas, além de haverem elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) em seu ácido desoxirribonucléico (DNA), modificando o percentual desse conteúdo

entre os gêneros. Podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerófilas (LACAZ et al., 2002; SULTAN et al., 2002).

Esses microorganismos apresentam sua parede celular composta pelos isômeros do ácido diamino lisina, do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP), ácido diamino ornitina ou ácido diaminobutírico. Com distribuição pelo mundo, são achadas nos mais diversos ecossistemas, especialmente nos solos. Habitam em sua maior parte como saprófitos, cumprindo um belo papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outras estão em relação mutualística ou parasita com plantas (ANDERSON e WELLINGTON, 2001; LACAZ et al., 2002; WHITMAN et al., 2012).

Ainda apresentam com uma grande multiplicidade de morfologias, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*); ocorre fragmentação de hifas e podem ser altamente diferenciadas em micélio ramificado, por exemplo, *Streptomyces spp*, superficialmente sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos. Diferem das outras bactérias por se desenvolverem lentamente (RAJU et al., 2010; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Pela taxonomia, as actinobactérias pertencem ao domínio Bactéria, filo Actinobacteriae, são um dos maiores e principais desse Filo, em relação ao número e variedades de espécies identificadas da classe Actinobacteria, que segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, compreende 13 ordens, 55 famílias, 240 gêneros e centenas de espécies (BREED, 2012). Alguns dos gêneros mais importantes são: *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Streptomyces* (VENTURA et al., 2007; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Em relação à micromorfologia das actinobactérias é distinguida de acordo com o gênero, podendo apresentar esporos esférico ou bacilar, compondo micélio aéreo de coloração variada (Figura 01). O crescimento das actinobactérias é caracterizado pela formação de hifas ramificadas que dão origem a um micélio típico, que é unicelular durante a fase inicial de crescimento (PEREIRA, 2010; MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).



Figura 01-Colônia com micélio aéreo de coloração variada aumento de 40X (fonte: Autores, 2020).

O micélio que se desenvolve no interior do substrato, é denominado micélio vegetativo, e tem como função de sustentar a colônia e absorver nutrientes através da liberação de enzimas extracelulares que degradam os compostos utilizados para sua nutrição. O micélio que se projeta na superfície do substrato é chamado micélio aéreo, que apresenta aparência aveludada e constitui o micélio reprodutivo, onde o mesmo se diferencia para formar os corpos de frutificação ou propágulos (HECK, 2007; CHATER et al., 2010; BATISTA et al., 2011; MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).

Em relação à reprodução do grupo das actinobactérias, pode acontecer por meio de fragmentação em determinadas espécies, como no gênero *Nocardia*, na qual as hifas se fragmentam em muitas células cocóides baciliformes, onde cada uma é capaz de originar um novo micélio. Outras espécies reproduzem-se pela concepção de esporos ou conidiósporos como *Streptomyces* e *Esporangiosporos*. Os esporos são produzidos em grande quantidade originando um novo organismo (PELCZAR JR et al., 2005; SLONCZEWSKI e FOSTER 2009).

Algumas espécies de Actinobactérias podem proporcionar reprodução por fragmentação de suas hifas, enquanto outros gêneros apresentam conidiósporos ou esporangiósporos, que são esporos assexuais. A formação de esporos em determinados gêneros das actinobactérias pode variar de zoósporos móveis a propágulos especializados. Os esporos resistem bem à dessecação, tendo uma ampla importância na preservação da espécie. Os esporos são formados quando ocorre escassez de nutrientes, podendo apresentar

motilidade como ocorre no gênero *Actinoplanes* (GAO e GUPTA, 2005; VENTURA et al., 2007; FLÄRDH e BUTTNER, 2009).

2.2.1 Gênero *Streptomyces*

Streptomyces são bactérias Gram-positivas, caracterizadas pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses microrganismos apresentam um complexo ciclo de vida que podem ocorrer em habitats aquáticos, entretanto, habitam preferencialmente o solo, sendo os solos alcalinos e neutros os mais favoráveis ao seu desenvolvimento. São conhecidas mais de 500 espécies; entre os metabólitos conhecidos produzidos por essas bactérias temos inúmeros tipos de antimicrobianos e substâncias biotecnológicas ativas (ANTUNES et al., 2013; MADIGAN et al., 2016).

Segundo Madigan et al. (2016), algumas das principais particularidades importantes na classificação das *Streptomyces* são as diferenças na forma e no arranjo dos filamentos aéreos e dos arcabouços contendo os esporos das múltiplas espécies. Os conídios e esporóforos são comumente pigmentados, colaborando para uma coloração específica da colônia em diferentes meios de cultura. Assim, dentre as características que facilitam as identidades das colônias das *Streptomyces* em meio de cultura sólido, pode-se destacar a aparência pulverulenta das colônias maduras, sua natureza compacta e coloração diversificada (Figura 02).

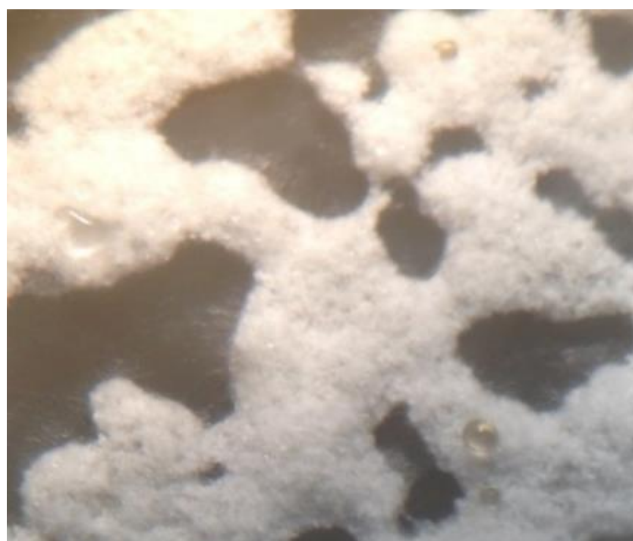


Figura 02- *Streptomyces* sp. em meio de cultura sólido aumento de 40X (Fonte: Autores, 2020)

Em geral os filamentos de *Streptomyces* apresentam de 0,5-1,0 μm de diâmetro, com dimensão indeterminada, e na sua maioria são desprovidos de paredes transversais, na fase vegetativa. O crescimento ocorre a partir da ponta dos filamentos, acompanhado pela constituição de ramificações, de modo que a fase vegetativa corresponde a uma matriz complexa, densamente entrelaçada, ocasionando um micélio compacto e, posteriormente, uma colônia. À medida que o micélio aéreo se desenvolve os diferentes esporóforos são formados. Os esporos contribuem para a preservação da espécie (VENTURA et al., 2007; MADIGAN et al., 2016).

Os esporóforos são filamentos aéreos peculiares que se projetam acima da superfície da colônia, há também presença de escleródios, morfologia da cadeia e ornamentação da superfície de esporos. Os esporos de *Streptomyces*, ou conídios, não possuem qualquer relação com esporos de outras bactérias como em que ocorre em *Bacillus* e *Clostridium*, visto que, os esporos dos estreptomicetos são determinados pela formação de paredes transversais multinucleado, com longas cadeias de esporóforos diversificada que é uma característica do gênero *Streptomyces* (KHANNA, SOLANKI e LAL, 2011; MADIGAN et al., 2016).

Os *Streptomyces* também exibem um complexo desenvolvimento biológico, envolvendo diferenciação morfológica, crescimento micelial, comunicação intercelular e comportamento multicelular coordenado com vários processos fisiológicos. O ciclo de vida do desenvolvimento culmina na produção de esporos adormecidos que permitem a micélica sésil desses organismos para se espalharem para novos habitats (MCCORMICK e FLARDH, 2012).

O gênero *Streptomyces* é amplamente estudado por sua capacidade de produzir compostos bioativos utilizados na síntese de cerca de 70% dos antibióticos de escolha no tratamento de infecções microbianas e 60% são usados amplamente na agricultura. Há produção de metabólitos diferentes, com características físicas e químicas peculiares, e na sobrevivência das espécies, em distintos habitats (LACAZ et al., 2002; EVANGELISTA-MARTÍNEZ e MORENO-ENRÍQUEZ, 2007; KIM et al., 2012; RASHAD et al., 2015).

Destaca-se também que há produção de outros metabólitos bioativos não-antimicrobianos tais como enzimas, inibidores enzimáticos, reguladores imunológicos e antioxidantes que são de numerosos usos práticos e de altos valores comerciais. Entre os actinomicetos, o maior grupo estudado é *Streptomyces spp.*, representando até 95% do actinomicetos encontrados no solo (BALLAV, DASTAGER e KERKAR, 2012; RODRIGUES et al., 2018).

2.2.2 Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários são compostos produzidos exclusivamente quando se interrompe o crescimento do microrganismo produtor e não são mais eficazes para o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, ou seja, na fase estacionária de crescimento microbiano. Eles são de grande importância biotecnológica, entre eles temos: celulases, amilases, pectinases, lipases, peroxidases, xilanases, agentes antitumorais, fitormônios, entre outros. A produção de metabólitos secundários bioativos é uma vantagem competitiva. As actinobactérias, especialmente as do gênero *Streptomyces*, são apropriadas de produzir inúmeros metabólitos secundários bioativos como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos. (RODRIGUES, BEZERRA NETO e COELHO, 2006; VERMELHO, BASTOS E BRANQUINHA, 2007; CANOVA, 2009; MIYAUCHI, 2012).

O metabolismo secundário de microrganismos pode ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, já que este pode sobreviver mesmo sem a sua formação. Assim, uma das justificativas para a produção dessas substâncias seria que, por serem produzidas dentro de várias reações bioquímicas que ocorrem no interior das células, quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, esse mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência. Além do que, ao se esgotar um nutriente vital, o metabolismo secundário mantém os mecanismos essenciais para a multiplicação celular, ativando outras vias para a sua produção, principalmente no que diz respeito à produção de enzimas (ZHANG & YING, 2014).

A versatilidade biossintética dos microrganismos é enorme. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos podem ser obtidos em grandes quantidades por processos fermentativos (SANCHEZ, DEMAINE e ALLMAN, 2012). Os *Streptomyces* e outras actinobactérias são responsáveis por cerca de três quartos de todos os produtos metabólitos conhecidos (SAISIVAM e KISHAN, 2006). Desde o início do século XX, os metabólitos desses microrganismos têm sido escopos de diversas pesquisas com a descoberta da estreptomicina (CHATER e CHANDRA, 2006).

Os Streptomycetes, por sua vez, pertencem à produção de compostos químicos mais competentes da natureza e em maior abundância e também diversificados metabólitos secundários como exemplos, terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citocalasinas e eniatinas. Utilizam diferentes fontes

de carbono e energia diversificada com ocorrência de exemplares quimiotróficos ou heterotróficos (SCHULZ et al., 2002; HOPWOOD, 2007).

Os metabólitos secundários nos vegetais possuem um papel ecológico, servindo como atrativos de polinizadores, contribuindo para adaptações químicas ao estresse do meio ambiente, ou agindo na defesa química da planta contra microrganismos, insetos e predadores maiores; em alguns casos até contra outras plantas. Os grupos principais de metabólitos secundários são os terpenóides, fenólicos e compostos contendo nitrogênio ou enxofre (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008; TAIZ e ZEIGER, 2012).

2.2.3 Produção de moléculas antimicrobianas por *Streptomyces*

As moléculas antimicrobianas são compostos naturais ou sintéticos capazes de dificultar o crescimento ou ocasionar a morte de bactérias ou fungos. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido reconhecidas como elaboradoras extraordinárias de metabólitos bioativos (BERDY, 2005; TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008). Possuem metabolismo variado. Essas bactérias do solo permanecem sendo uma fonte importante de substâncias antimicrobianas e outros compostos biologicamente ativos que foram e serão explorados por gerações de estudiosos da área da Biologia (HOPWOOD, 2007).

Liu e colaboradores (2010) relataram que dos metabólitos bioativos adquiridos a partir de experimentos com variados microrganismos, 45% são produzidos por actinobactérias, 38 % por fungos e 17% por outros grupos de bactérias. Esses metabólitos abrangem compostos com distintas atividades biológicas, como: antibacteriana (CHAROENSOPHARA et al, 2008), antifúngica e antitumoral (TUNTIWACHWUTTIKUL et al, 2008), antioxidante (ZHONG et al., 2011), antiviral, antiparasitária (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010), anti-inflamatória, inseticida (EL-KHAWAGH; HAMADAH; ELSHEIKH, 2011) e citotóxica (SHAABAN et al., 2011).

Mesmo com a disponibilidade de novos produtos antimicrobianos, a disseminação frequente de doenças epidêmicas, uso indiscriminado de antibióticos pela população, o surgimento incessante de patógenos resistentes a medicamentos e a intensidade com que esses patógenos transmitem entre as pessoas estabelecem a produção contínua de antibióticos cada vez mais eficazes. A maior parte dos antibióticos empregados na medicina humana e veterinária é produzida pelo gênero *Streptomyces* (CHATER et al., 2010).

A bioprospecção de microrganismos isolados de nichos ecológicos constitui uma importante estratégia para a obtenção de compostos antimicrobianos mais eficientes e menos tóxicos, que podem, em última análise, controlar o efeito patogênico de bactérias e fungos que são resistentes aos diversos antibióticos e antifúngicos habitualmente utilizados nos diversos serviços de saúde e agropecuária (APPELBAUM e JACOBS, 2005; BUTLER e BUSS, 2006; PELÁEZ, 2006; YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; RODRÍGUEZ- NORIEGA et al., 2010).

Os antibióticos produzidos por *Streptomyces* são fabricados na fase de transição, em pouca quantidade, isso se dá no início do desenvolvimento entre o micélio aéreo e vegetativo. A produção desses antibióticos depende de diversos fatores físicos e químicos, como oferta de oxigênio, temperatura, depende da disponibilidade de nutrientes, como fosfato, fontes de carbono e nitrogênio, taxa de crescimento, inativação ou indução. Pode ocorrer também inibição concorrente, que corresponde à inibição de uma atividade enzimática de um microrganismo por uma substância denominada antimetabólito, que é semelhante ao substrato normal da enzima (GUPTE e KUKARNI, 2002; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

O gênero *Streptomyces* produz distintas moléculas bioativas com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiparasitárias, herbicidas, inseticida e enzimas, que têm empregos na medicina, na agricultura e, além disso, em vários processos biotecnológicos. Cerca de 500 antibióticos diferentes são produzidos por espécies deste gênero sendo que mais de 60 possuem aplicação prática na medicina, veterinária, agricultura e indústria (Tabela 1) (ALBERTON et al., 2006; EDREVA et al. 2008; CHATER et al., 2010).

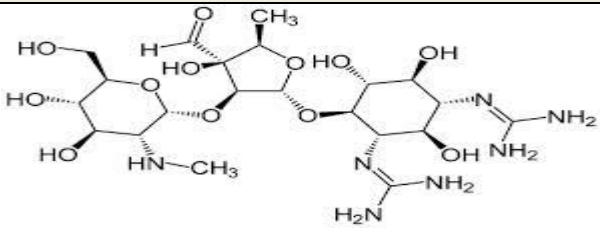
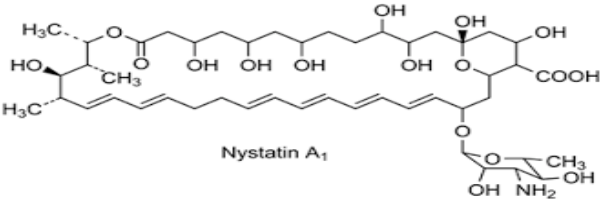
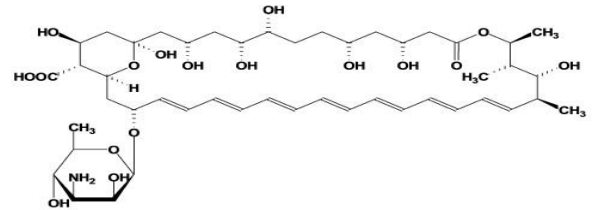
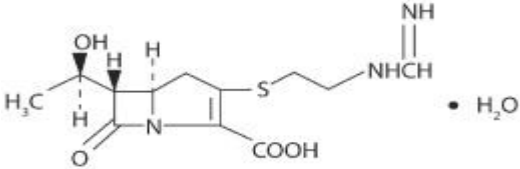
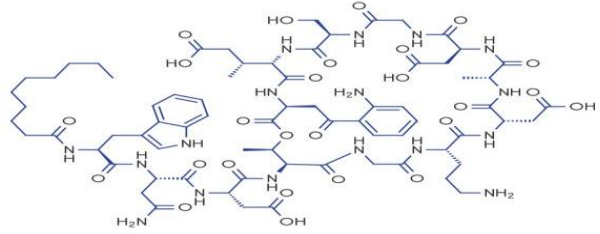
A diversidade química e as estruturas incomuns dos metabólitos secundários são representadas pelas muitas classes de compostos orgânicos como, por exemplo, os pertencentes à classe das cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclinas e estreptograminas (ANTUNES et al., 2013; MADIGAN et al., 2016).

Tabela 1 - Antibióticos produzidos por *Streptomyces* spp.

Classe química	Antibiótico	Microrganismo	Ação
Aminoglicosídes	Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Maioria de <i>Bacteria</i> Gram-negativas
	Espectinomicina	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , produtores de penicilinase
	Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Ampla espectro, geralmente utilizado topicamente devido à sua toxicidade
Tetraciclínas	Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Ampla espectro, Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, riquetsias e clamídias, Mycoplasma
	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	
Macrolídeos	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bactérias Gram-positivas, frequentemente utilizado em substituição à penicilina, <i>Legionella</i>
	Clindamicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Eficaz contra anaeróbios obrigatórios, especialmente <i>Bacteroides fragilis</i>
Políenos	Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	Fungos, especialmente em infecções por <i>Candida</i> .
	Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Fungos

O gênero *Streptomyces* é responsável pelo cultivo de diversas classes de antibióticos como: tetraciclínas, clorafenicol, eritromicina, estreptomicina, neomicina e nistatina. Estes produzidos desde a década de 40 (Tabela 02) e, além dos antibióticos há produção de agentes antitumorais, aminoácidos e vitaminas (PETROVA e VLAHOV, 2006; SIVARAMKRISHNA; MAHAJAN, 2009).

Tabela 02. Classes de Antibióticos produzidos pelo gênero *Streptomyces spp*

Espécies	Antibióticos	Estrutura Química
<i>Streptomyces griseus</i> (1944)	Estreptomicina	
<i>Streptomyces noursei</i> (1950)	Nistatina	
<i>Streptomyces nodosus</i> (1956)	Anfotericina B	
<i>Streptomyces cattleya</i> (1976)	Tienamicinas	
<i>Streptomyces roseosporus</i> (1980)	Daptomicina	

2.3 DESCOBERTAS E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *STREPTOMYCES*

Com a rápida evolução da ciência nos domínios da ecologia, genes, e a forte exigência de novos compostos antimicrobianos, para combater a resistência antimicrobiana, irão ser descobertos novos componentes antibióticos. Na ecologia do solo, os *Streptomyces* ainda são muito promissores para o biocontrole de pragas, como promotores de crescimento de plantas, biorremediação e biofertilizante, tornando-os indispensável na prática agrícola (ADEGBOYE e BABALOLA, 2012; BARKA et al., 2016).

No solo, os *Streptomyces* são abundantes e extremamente importantes, pois exercem a função de ciclar o carbono aprisionado em detritos insolúveis orgânicos, principalmente em fungos e plantas. Com essa função, há possibilidade de produzir uma vasta quantidade de exoenzimas hidrolíticas. Esse gênero ainda é capaz de uma ampla disseminação filogenética. Os componentes químicos produzidos por *Streptomyces* são os mais competentes da natureza em produzir uma grande quantidade e diversidade de metabólitos bioativos secundários, em consequência, são de grande importância na indústria e medicina (ADEREM, 2005; HOPWOOD, 2007).

O gênero *Streptomyces* é considerado os fundamentais elaboradores de diversos metabólitos secundários, incluindo os antibióticos, resistência a compostos químicos, e corantes naturais sendo conhecidos pela sua importância na biotecnologia industrial. As produções dessas substâncias pelos actinomicetos os tornam fortes candidatos a agentes no biocontrole e na biodiversidade, como por exemplo, de fitopatógenos em plantas (EL-TARABILY et al., 2009; SUBRAMANI e ALBERSBERG 2012; VERMA et al., 2013).

Estudos realizados por Vijayakumar et al. (2012), em solo marinho indiano revelaram que os actinomicetos marinhos do Estreito de Palk (costa leste da Índia) poderiam ser uma fonte potencial de novos antimicrobianos. O composto antimicrobiano identificou que o composto do extrato com acetato de etila obteve atividade antimicrobiana para a *C. albicans*, *K.pneumoniae*, *B. subtilis* e *E. Coli*.

Komaki e Harayama (2006) revelaram que *Streptomyces* sugere seu potencial para sintetizar novos policetídeos aromáticos. Essa descoberta de genes de policetídeo sintase envolvidos na biossíntese de policetídeos aromáticos. Isso aumentaria a probabilidade de descobrir novos medicamentos e reduzir os custos de amostragem, triagem e desreplicação. Pesquisa feita por Van Wezel e Mcdowall (2011) exaltou sobre os fatores de regulação da produção de antibióticos por *Streptomyces*, tendo novas tecnologias descritas e com potencial

para ampliar ainda mais a compreensão da regulação de genes sendo uma área fértil para descoberta e exploração.

Yague et al. (2013) realizou estudo clássico com *Streptomyces* visando a formação do micélio aéreo, em culturas sólidas, e nas fases de esporulação. Em contraste, aos estágios de pré-esporulação, incluindo a diferenciação em culturas líquidas, foram amplamente ignorados. Foi observado que novos conhecimentos sobre as etapas de presportação de *Streptomyces* em combinação com futuros trabalhos que visem compreender a regulação bioquímica desses processos, pois serão fundamentais para compreender e otimizar a diferenciação de hifas em fermentações industriais, bem como melhorar a triagem de novos metabólitos secundários a partir de cepas de *Streptomyces* naturais.

Streptomyces isoladas previamente de solo da rizosfera do campus da Sahyadri Science College, em Shivamogga, na Índia, obtiveram excelente atividade antimicrobiana contra as leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Como também contra *Staphylococcus aureus* (resistentes à meticilina) recuperados anteriormente de pacientes queimados (PALLAVI et al., 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA

3.1.1 Actinobactéria

Foi utilizada actinobactéria isolada da rizosfera de *A. parviflora* *Syn* *Fragans* e disponível no Laboratório de Coleção de Microrganismos Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA.

A amostra foi coletada a partir de 40 g de solo rizosférico de *Aniba parviflora* *Syn* *fragans* (Macacaporanga) em uma área de transição entre Floresta Densa, do Norte do Brasil, e uma área com características de cerrado (Latitude 20 28' 01.28'' de Longitude 54 49' 45.32'' O) no município de Santarém – PA, Brasil (Figura 03). A autorização para a realização do estudo foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, pelo número 47530-1.

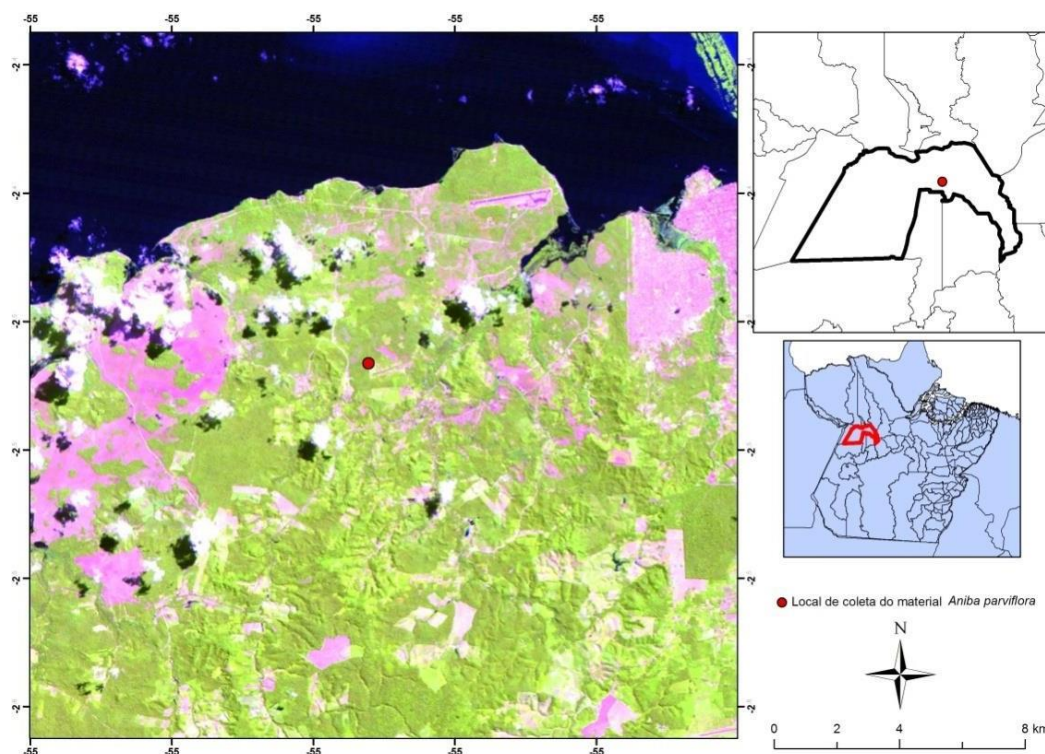


Figura 03 - Mapa de coordenadas geográficas do ponto de coleta do solo rizosférico de *Aniba parviflora* *Syn* *fragans* (Macacaporanga).

3.1.2 Condições de cultivo

A caracterização dos aspectos da cultura da linhagem foi determinada visualmente durante o cultivo nos meios de cultura ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ALA, BDA, SDA, AN, TSA (composição dos meios no Anexo 01) à 30°C durante 14 a 21 dias. Foram avaliadas a formação de micélio vegetativo e aéreo, a coloração das colônias, sua forma e produção de pigmentos, sendo diariamente observada a característica das colônias para seleção das colônias da actinobactéria. Os aspectos morfológicos utilizados como parâmetro para classificar visualmente as colônias de actinobactéria foram colônias aderidas ao meio, observando a saliência do meio ao redor da colônia que se afunda no mesmo; colônias normalmente enrugadas, secas e não viscosas, micro hifas, excreção de pigmentos no meio e no micélio aéreo.

As colônias selecionadas foram transferidas para placas de Petri contendo o meio ISP-2 (Extrato de Levedura 4 g, Extrato de Malte 10 g, Glicose 4 g, Ágar 15 g e Água destilada 1 L, pH= 7,2) (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) e posteriormente purificadas nos meios ISP-2 e ISP-3 (Farinha de Aveia 20g, Solução traços de sais 1mL, Ágar 15g e Água destilada 1L, pH 7,0 – 7,4), sendo incubadas por 07 dias à 37°C.

3.1.3 Caracterização Bioquímica e Fisiológica

Foram feitos os seguintes testes bioquímicos: catalase; Voges-Proskauer; medição de pH do meio Voges-Proskauer; crescimento a 50°C e a 60°C em estufa; Arginina Levedura Agar –ALA, crescimento em caldo nutriente com 7% de cloreto de sódio (NaCl); crescimento em meio Bacto Sabouraud Dextrose em pH 5,7; hidrólise do amido e decomposição da caseína.

3.1.3.1 Produção de Caseinase e Gelatinase

A produção de protease pela *Streptomyce* estudada produtora das enzimas proteolíticas caseinase e gelatinase foi realizada em meio sólido contendo caseína e gelatina como substrato indutor. A degradação da caseína foi observada em placas contendo o meio contendo a base de Solução 1 (10g leite desnatado, 90mL Água destilada) e Solução 2 (3g Ágar, 97mL Água destilada). Após 14 dias de incubação, a formação de uma zona clara ao redor da colônia indicou a produção da enzima. A avaliação de produção de gelatinase foi

realizada com o cultivo da bactéria em tubos de ensaio contendo o Meio Agar nutriente acrescido de 12% de gelatina a 37°C por 07 dias. Posteriormente os tubos foram incubados sob refrigeração entre 4 e 10°C e então foi verificado o estado do meio, que quando liquefeito indicou a positividade do teste.

3.1.3.2 Produção de Amilase

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

3.1.3.3 Produção de Catalase

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

3.1.3.4 Produção de Lipase e Esterase

Para a produção de lipase pela actinobactéria foi realizada a inoculação em triplicata, em meio contendo (10g Peptona, 05mL NaCl, 10mLTween 80 (10mLTween 80 e 40mL Água destilada, 15g Ágar, 1000mL Água destilada) (SIERRA, 1957). Para avaliação da esterase o meio base foi o mesmo já citado anteriormente, modificando a fonte de carbono para Tween 20. Após incubação em estufa a 28°C por 10 dias. A observação de um halo branco difuso constituído de precipitados de oleato de cálcio indicou a presença da enzima.

3.1.3.5 Produção de Pectinase

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

3.1.3.6 Produção de L-glutaminase

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

3.1.3.7 Atividade Hemolítica

A realização da atividade hemolítica foi analisada após cultivo em meio Ágar Sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado e incubadas à 30°C por 07 dias. A presença de um halo claro ao redor das colônias indicou a produção da enzima.

3.1.4 Determinação do Índice Enzimático (IE)

A determinação do índice enzimático (IE) foi feita pela relação: $IE = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro do colônia} + \text{halo}} \times 100$, determinada pelo método de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), através da relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia, sendo considerado com potencial enzimático aquelas que apresentaram índice enzimático acima de 1,5.

3.1.5 Identificação Microscópica e Macroscópica da Actinobactéria

A determinação da micromorfologia foi realizada nos isolados que apresentaram os melhores resultados através da metodologia em meio sólido, de acordo com a descrição em

Shirling e Gottlieb (1966), com modificações. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 14 dias, e posteriormente, a lamínula foi removida e disposta em lâmina de vidro (26 x 76 mm); para observação microscópica do micélio aéreo foi desenvolvido através de análise por microscopia óptica de luz comum em aumento microscópico de 400x (Holt et al., 1994). Depois foram visualizados e fotografados em microscópio óptico para observação de sua micromorfologia.

Com a determinação do gênero foi realizada a visualização da actinobactéria com o microscópio de varredura eletrônica.

3.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A linhagem da actinobactéria foi identificada através da técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A extração de DNA da cultura do microrganismo foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por Araújo e colaboradores (2009). Na PCR foram utilizados iniciadores específicos para a amplificação do gene RNA ribossômico 16S (16S rRNA), ou seja, foram utilizados os *primers* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991); para a amplificação do gene RNA ribossômico 28S (28S rRNA) foram utilizados os *primers* NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') e NL1 (5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAG-3') (Park et al., 2003). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,0%) e fotodocumentados. Os fragmentos amplificados foram sequenciados. Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas por meio da ferramenta BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), utilizando a base de dados do GenBank. Por fim, as sequências foram alinhadas multiplamente com ClustalX1.81.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana da linhagem da actinobactéria foi primeiramente realizada pelo método do bloco de gelose (ICHIKAWA et al., 1971), para determinar o potencial antagonístico frente a microrganismos de interesse clínico.

A linhagem de actinobactéria foi cultivada em meio ISP-2, à 30°C por 14 dias; foram removidos blocos de gelose circulares de 06 mm de diâmetro das placas contendo as colônias de actinobactérias e dispostos em placa de Petri (15mmx90mm) contendo Ágar Müeller-Hinton (MHA) para bactérias e Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) para fungos, previamente

semeadas com 100 µL da respectivas suspensões microbianas. Os microorganismos utilizados no teste foram da Coleção UFPEDA do Departamento de Antibióticos da UFPE e isolados clínicos (Tabela 03). As suspensões foram ajustadas a 0,5 da Escala de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC/ml e 10^4 esporos/mL, de bactérias e fungos, respectivamente.

Tabela 03. Relação dos microrganismos teste utilizados no ensaio antimicrobiano

Microrganismo	Meio de cultivo
<i>Staphylococcus aureus</i> - 02	MHA
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> - 800	MHA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> - 183	MHA
<i>Micrococcus luteus</i> – 100	MHA
<i>Bacillus subtilis</i> – 86	MHA
<i>Enterococcus faecalis</i> - 138	MHA
<i>Salmonella enteritidis</i> – 415	MHA
<i>Serratia marcescens</i> – 352	MHA
<i>Serratia liquefaciens</i>	MHA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – 416	MHA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – 396	MHA
<i>Serratia sp</i> – 398	MHA
<i>Escherichia coli</i> – 224	MHA
<i>Enterobacter aerogenes</i> - 348	MHA
<i>Citrobacter freundii</i>	MHA
<i>Proteus mirabilis</i> - 767	MHA
<i>Postia placenta</i> -	SDA
<i>Fusarium sp</i> -	SDA
<i>Polyporus sanguineus</i> -	SDA
<i>Rhizoctonia solani</i> -	SDA
<i>Candida albicans</i> - 1007	SDA
<i>Candida krusei</i> - 1002	SDA
<i>Candida sp</i> -	SDA

Coleção UFPEDA do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os microrganismos sem códigos são os isolados clínicos.

Para o controle negativo foram dispostos blocos contendo apenas o meio ISP-2. As placas foram incubadas à 37°C (bactérias) e à 30°C (Fungos). O efeito antagonístico foi revelado com o aparecimento de halos de inibição de crescimento microbiano em volta dos blocos contendo a actinobactéria após 24 h (bactérias), 48 h (leveduras) e 96 h (filamentosos).

Foi também avaliada a atividade antimicrobiana dos meios líquidos durante a fermentação (BAUER et al., 1966). Discos de papel Whatman nº4 estéril (5 mm) foram embebidos com 10 µL do líquido metabólico e transferidos para placas de Petri semeadas com suspensão de 0,5 McFarland dos microrganismos teste ou isolados clínicos. Os ensaios foram

realizados em triplicata e os resultados foram determinados pela média aritmética dos halos de inibição em milímetro.

3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Na realização da fermentação submersa para a cultivo dos metabólitos antimicrobianos foram utilizados os meios M1 e MPE. Para realização do pré-inóculo utilizou-se erlenmeyers de 250mL, contendo 50mL de meio de cultura ISP-2 líquido, sendo acrescentados três blocos de 6mm de diâmetro contendo a cultura da actinobactéria crescida previamente no meio ISP-2 sólido, à 30°C por 14 dias. Foram mantidos os frascos sob agitação de 180 rpm em mesa rotatória à 30°C por 48h. Logo após, 10% do volume do pré-inóculo foi transferido para erlenmeyers (1000mL) contendo 250mL de meio de cultura M1 e MPE. O mesmo processo foi mantido, nas mesmas condições, sendo a fermentação realizada num prazo de 168h.

Para realização e avaliação da atividade antimicrobiana o líquido fermentado foi coletado à cada 24h e centrifugado a 927g, durante um período de 10 minutos para obtenção da biomassa e do sobrenadante. Deste, foi retirado uma alíquota de um mL, filtrado em membrana de acetato de celulose com uma porosidade de 0,22µm. Utilizou-se a técnica de difusão em disco para realização da atividade antimicrobiana (BAUER et al., 1966). Sendo dispensado o volume de 30µL do líquido metabólico fermentado em discos de papel de filtro, previamente esterilizados de 6 mm de diâmetro. Estes foram dispostos em placas de Petri (95mmx15mm) contendo os meios de cultura MHA e SDA, para o teste antibacteriano e antifúngico respectivamente, previamente semeados com 100 µL da suspensão microbiana padronizada. A detecção da atividade antimicrobiana foi percebida pela presença de zonas de inibição em volta dos poços contendo o líquido metabólico fermentado que foi medida em milímetros. Foi adotado um esboço experimental diretamente casualizado com três repetições sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A biomassa, a temperatura e o pH foram devidamente registrados durante todo o percurso da fermentação visando padronizar e monitorar a melhor condição de fermentação para assim obter os metabólitos antimicrobianos.

3.5 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DO LÍQUIDO FERMENTADO

Na extração dos princípios ativos, o pH do líquido metabólico foi ajustado para 2,0 e 9,0, com utilização de ácido e base, e foi mantido o pH original da fermentação (5,9). O líquido fermentado em todos os valores de pH foi tratado com três solventes orgânicos (acetato de etila, hexano e clorofórmio), seguido de agitação mecânica por 15 min. Após filtração, a fase orgânica foi colocada em rotaevaporador até a evaporação total do solvente; posteriormente foi pesado e redissolvido em metanol, para uma concentração final de 1 mg/mL, visando a condução do bioensaio, realizado através do teste de disco.

O líquido fermentado foi filtrado à vácuo. O filtrado (líquido metabólico) foi dividido em volumes iguais e tratado em três condições para a extração de metabólitos: 1 – ajuste do líquido metabólico para pH 2; 2 – Manutenção do pH original do líquido metabólico; 3 - ajuste do líquido metabólico para pH 9.

A extração dos metabólitos secundários antimicrobianos foi realizada através de 03 extrações sucessivas utilizando os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e acetato de etila na proporção de 2:1 do líquido metabólico. As fases orgânicas de todas as extrações eram concentradas em evaporador rotativo à 40°C para a obtenção dos respectivos extratos brutos. A fase aquosa foi utilizada para o teste de atividade antimicrobiana por difusão em disco (BAUER et al., 1966), nas mesmas condições citadas acima para o ensaio de atividade do líquido metabólico, visando verificar se após a etapa de extração ainda restavam metabólitos antimicrobianos.

3.6 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS BIOATIVOS DA MASSA CELULAR

A massa celular, obtida pela filtração do mosto fermentado, foi tratada com solventes acetona, metanol e etanol, para a extração dos princípios ativos através de agitação mecânica por 15 min, visando a desidratação das células e, consequente, extração dos produtos bioativos. Ao final o material foi concentrado em rotaevaporador, obtendo-se o extrato bruto do microrganismo, que foi ressuscitado em metanol, para uma concentração final de 1 mg/mL, procedendo-se aos ensaios biológicos.

3.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para a avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos do líquido fermentado oriundos da actinobactéria foi realizada a cromatografia em camada delgada. Foram utilizados diversos reveladores, visando detectar no extrato carboidratos, esteróides, terpenos, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos, alcalóides, compostos nitrogenados heterocíclicos, cumarinas, antraquinonas, aminoácidos, aminas e aminoaçúcares, fenóis, esteróides e óleos essenciais.

A análise foi realizada com cromatofolhas de alumínio Sílica Gel 60 F254 (Merck). Alíquotas de 10 µL do extrato bruto em acetato de etila da linhagem ativa forma aplicadas nas cromatofolhas (5x5 cm). Os cromatograma foram revelados com vapores de I₂ (revelador universal), lâmpada UV, anisaldeído/ácido sulfúrico e Dragendorff, para identificar as principais classes de compostos presentes no extrato bruto. I₂ complexa-se com compostos insaturados, de modo que placas que os contiverem, ao serem colocadas em uma câmara contendo cristais de iodo, apresentaram pontos amarronzados. Compostos UV-ativos, apareceram como manchas escuras em fundo fluorescente, quando a placa for iluminada com lâmpada de luz ultravioleta. O revelador anisaldeído/ácido sulfúrico, permite detectar esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, terpenos, antibióticos (macrolídeos e tetraciclinas) e micotoxinas – tricotecenos. Dragendorff permite detectar compostos nitrogenados como alcalóides (JORK, FUNK, et al., 1990; WALL, 2005).

3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DE HEXANO, CLOROFÓRMIO E ACETATO DE ETILA

3.8.1 Difusão em disco

Os extratos foram diluídos a 10 mg/mL e posteriormente foi determinada a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco (BAUER et al., 1966), para verificar em qual extrato estavam os metabólitos ativos.

3.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

O extrato bruto da fermentação foi empregado para determinar a concentração inibitória mínima (CMI) pela técnica de microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory*

Standards Institute (CLSI, 2003). Em uma microplaca estéril de 96 poços foram dispensadas diluições do extrato bruto.

Previamente, foi preparado uma solução à 10.000µg/mL a partir do extrato bruto solubilizado no respectivo meio de cultura líquido (MC) a 5% de DMSO. Nos poços 3 a 8 foram dispensados 100µL do respectivo meio de cultura líquido e em seguida foi dispensado uma alíquota de 100µL da solução mãe no poço 03, iniciando a microdiluição em série até o poço 11. Em cada poço foi adicionado 10µL do inóculo microbiano. Na coluna 01 foram dispensados 100µL da solução de antimicrobiano padrão para cada microrganismo teste, e em seguida foi adicionado 10µL do inóculo microbiano (Controle positivo – C+). Na coluna 02 foi dispensado apenas o meio de cultura, sendo este o teste de esterilidade do meio (Controle de esterilidade - C), e na coluna 12 foram dispensados 100 µL do respectivo meio de cultura líquido e em seguida foi adicionado 10µL do inóculo microbiano (Controle de viabilidade no inóculo – Controle negativo (C-). Após o período de cultivo à 37°C (bactérias) por 24h, e 30°C (leveduras) por 48h e 30°C (fungos filamentosos) por 96h, as microplacas foram reveladas com 15 µL da solução de Resazurina a 0,01% e incubadas por 3 horas nas mesmas condições descritas anteriormente, para observação da coloração nos poços. A mudança de coloração dos poços inicialmente azul nos poços contendo as diferentes concentrações do extrato para vermelho indicou negatividade do teste, e a permanência da cor azul indicou a positividade. Nos poços de controle a permanência da cor azul indicou ação antimicrobiana e a mudança de coloração para vermelho indicou a viabilidade do inóculo.

A Concentração mínima fungicida ou bactericida foi determinada pela subcultura dos poços azuis da CMI em placa de Petri contendo o respectivo meio de cultura sólido. As placas foram incubadas à 37°C (bactérias) e 30°C por 48h (leveduras) ou 96h (fungos filamentosos), sendo que cada amostra foi testada em quatro experimentos independentes.

3.10 PROSPECÇÃO QUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO BRUTO MAIS ATIVO

O extrato bruto mais ativo foi diluído na concentração de 10 mg/mL do respectivo solvente e analisado pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de sílica gel (TLC) (Merck), 60mm x 100mm, utilizando diversas fases móveis de diferentes polaridades para as classes de metabólitos (METZ, 1961; SHARMA e DAWRA, 1991; WAGNER e BLADT, 1996; HARBORNE, 1998).

3.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.11.1 Atividade Antioxidante por DPPH

O potencial varredor do extrato bruto em acetato de etila ao radical DPPH foi avaliado como descrito por Molyneux (2004). Uma solução metanólica de DPPH foi preparada a uma concentração de 0,0047% (120 µM), 500 µL da solução de DPPH foram combinados a 500 µL das diluições (1-10 mg/mL) extrato bruto acetato de etila e incubadas no escuro por 30 minutos. A absorbância foi aferida a 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Evolution60 fabricado pela Thermo Scientific®). Os experimentos foram realizados em triplicata. O ácido ascórbico (1 mg/mL) foi utilizado para validação do método. A habilidade varredora do extrato bruto acetato de etila ao radical DPPH foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Varredura} = \frac{ABSc - ABSs}{ABSc} * 100$$

Onde: ABSc é a absorbância do controle e ABSs é a absorbância da amostra ou ácido ascórbico. A concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) do radical foi calculada por regressão linear e expressa em µg/mL.

3.11.2 Poder Redutor do Íon Molibdato

O poder redutor do extrato bruto em acetato de etila foi avaliado frente ao íon molibdato através da redução do MO₆⁺ ao complexo MO₅⁺ em pH ácido como descrito por Prieto et al. (1999) onde 0,1 mL das diluições (1-10 mg/mL) foram combinadas a 1 mL do reagente fosfomolibdênio (4 mM molibdato de amônio, 28 mM fosfato de sódio monobásico e 0,6 M ácido sulfúrico) em microtubos de 02 mL. Os tubos foram incubados a 95° C por 90 minutos. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, centrifugadas (3000 RPM/5 minutos) e a absorbância foi aferida a 695 nm usando espectrofotômetro UV/Vis (Evolution60 fabricado pela Thermo Scientific®) frente ao branco (1 mL do Reagente Fosfomolibdênio adicionados a 0,1 mL do solvente). Os experimentos foram realizados em triplicata. O poder redutor do íon molibdato foi calculado frente a uma reta padrão de ácido ascórbico (20-180 µg/mL) e expresso por µg/equivalentes de ácido ascórbico.

3.12 ATIVIDADE INSETICIDA FRENTE A *SITOPHILUS ZEAMAI*S

3.12.1 Criação do inseto

Foram utilizados os insetos *Sitophilus zeamais*. A criação dos mesmos foi realizada no departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco sendo estabelecida de forma contínua com condições laboratoriais. Foi realizado o acondicionamento do *S. zeamais* em frasco de vidro de 1,5 litros. Há um fechamento parcial do mesmo com perfuração na tampa plástica e envolvimento da tampa com um tecido fino tipo (Tecido não Tecido-TNT). Com isso, há permissão de troca de gases no compartimento. Essa criação foi mantida em estufa incubadora B.O.D., numa temperatura em torno de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com umidade relativa de 70% ($\pm 5\%$), passado por um período de 24 horas de fotofase. Foi utilizado como substrato alimentar para os insetos, milho adquiridos no mercado público de Afogados, Recife-Pernambuco, Brasil. Foi utilizado o teor de umidade de 13% de base úmida.

3.12.2 Ensaio da avaliação de toxicidade fumigante do complexo bioativo

O ensaio do efeito de toxicidade da fumigação foi realizado de acordo com Chu et al. (2010). No ensaio foram utilizados como câmara de fumigação recipientes de plástico (5,0 cm de largura, 6,0 cm de comprimento e 80 mL de volume) com tampas contendo papel de filtro (5,0 cm de diâmetro) embebido (30 μL) com extrato bruto da fermentação de acetato de etila (complexo biativo), previamente diluído em água destilada, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250mg/mL, numa divisão seriada. Após o tempo de evaporação de 30 s, 15 insetos adultos (*Sitophilus zeamais*) foram colocados em cada recipiente, as tampas foram bem fechadas para formar uma câmara selada e a taxa de mortalidade foi registrada diariamente, durante o período total de 10 dias onde contabilizada a morte dos insetos. Foram realizadas três experiências independentes. Como também foi utilizado um controle com o filtro embebido em água destilada.

3.12.3 Ensaio da avaliação toxicidade por contato

O ensaio de toxicidade por contato foi realizado de acordo com Liu e Ho (1999). O extrato bruto da fermentação (complexo biativo), foi previamente diluído em água destilada, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250mg/mL, numa divisão seriada. Em

seguida, alíquotas (05 µL) das soluções de teste foram aplicadas com micropipeta monocal, topicamente na parte dorsal do tórax dos *Sitophilus zeamais* em teste. Após esse procedimento, 15 insetos foram colocados em recipientes de plástico (5,0 cm de largura, 6,0 cm de comprimento e 80 mL de volume) com tampas de vedação. O teste foi realizado em duplicata. Como também foi realizado teste controle com água destilada aplicada diretamente nos insetos. A taxa de mortalidade foi contabilizada e registrada diariamente por 10 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASPECTOS MACROMORFOLÓGICOS

A actinobactéria desenvolveu micélio aéreo na maioria dos meios de cultura testados, sendo que foi possível observar já no 3º dia de cultivo a presença de micélio aéreo nos meios ISP2, ISP3, ALA e SDA, exceto os meios ISP5, CAA, GAA e CZ (Tabela 04).

Tabela 04 – Características macroscópicas da actinobactéria cultivada em diferentes meios de cultura.

Meio	Esporulação	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Pigmento difuso
ISP1	+	Branco	Bege	-
ISP2	++	Branco/ Cinza	Amarelo escuro	-
ISP3	++	Branco	Amarelo	-
ISP4	+	Branco	Amarelo	-
ISP5	-	-	-	-
ALA	+	Branco	Bege	-
CAA	-	-	-	-
GAA	-	-	-	-
CZ	-	-	-	-
SDA	+++	Branco/ Cinza	Amarelo claro	-
BDA	+	Branco	Amarelo claro	-
NA	+	Branco	Bege	-
TSA	+	Branco	Bege	-

+ Apenas Micélio vegetativo; ++ Micélio Aéreo pouco desenvolvido;

+++ Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

O micélio aéreo formado era predominantemente branco, e após 7 e 14 dias de crescimento, tornou-se cinza nos meios ISP3 e SDA, respectivamente. Já no meio ISP2 para o mesmo período de crescimento o micélio aéreo mantém a cor branca (Figura 04). O micélio vegetativo foi observado a partir do 1º dia de crescimento nos meios TSA, ISP1, ISP2, ALA e AN. A cor do micélio vegetativo variou entre tons de bege, Amarelo claro e amarelo escuro.

As colônias microbianas formadas nos meios ISP1, ISP3, ISP4, ALA, SDA, AN e TSA são pulverulentas e nos meios ISP2 e BDA são velutinas (Figura 05). Não foi observado crescimento nos meios CAA, GAA e CZ. Actinobactéria não produziu pigmento em nenhum dos meios testados.



Figura 04-Actinobactéria isoladas de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) cultivadas em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Lupa, aumento de 40X.

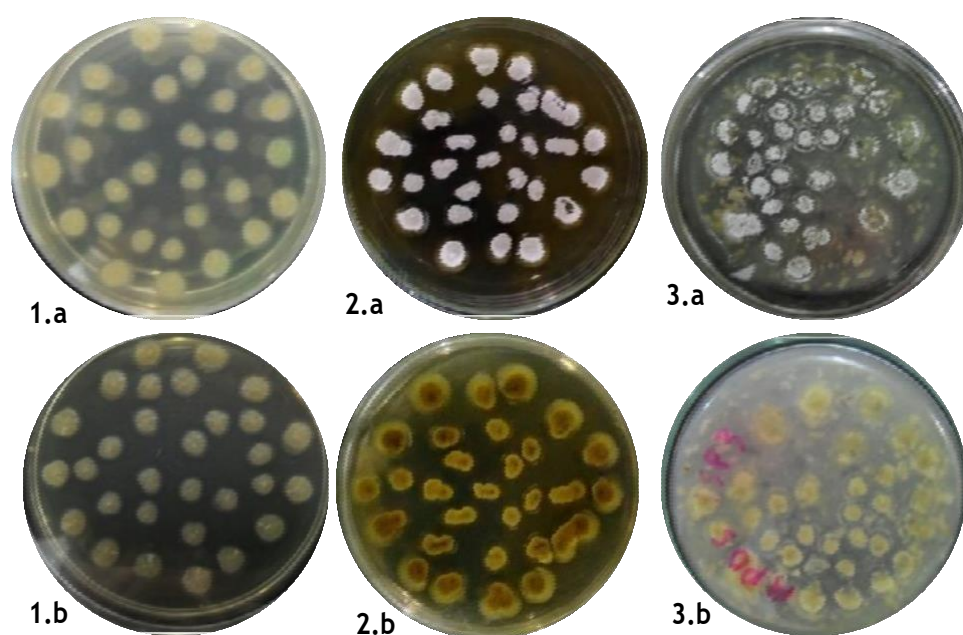


Figura 05 - Actinobactéria isolada nos diferentes meios de cultura após 14 dias de incubação à 37°C. 1.ISP1; 2. ISP2; 3. ISP3. a. Micélio aéreo, b. Micélio vegetativo.

Os isolados produziram micélio aéreo em torno de cinco dias após o cultivo em meio IPS2. Geralmente as colônias têm crescimento lento de sete a dez dias para ser desenvolvido o micélio aéreo. Esses achados estão de acordo com a maioria das características das actinobactérias que se desenvolvem em meio com amido, caseína, sais minerais e aminoácidos (FLARDH e BUTTNER, 2009; GOODFELLOW e FIEDLER, 2010).

4.2 ASPECTOS MICROMORFOLÓGICOS

Na figura 06 há apresentação do registro fotográfico de placa de microcultivo da actinobactéria isolada após 14 dias de crescimento à 37° C, indicando que a mesma desenvolveu micélio aéreo.

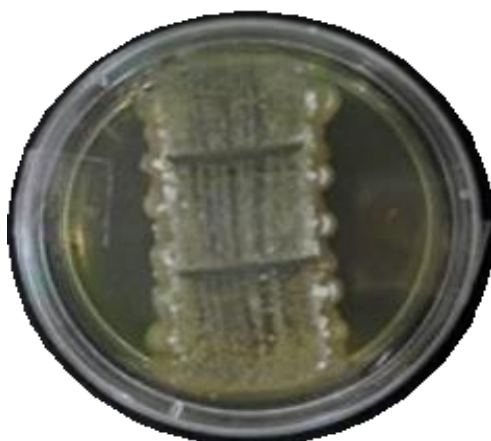


Figura 06- Microcultivo da actinobactéria isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn Fragans (Macacaporanga), após 14 dias de crescimento à 37° C.

Após 21 dias de acompanhamento de crescimento da actinobactéria estudada foi feita análise por microscopia óptica de luz comum. Foi observado também que a actinobactéria apresentou cadeias de esporos simples *Retinaculum-apertum* (seta) com esporóforo semelhante a um gancho, sugestivos para o gênero *Streptomyces* sp. (Figura 07).

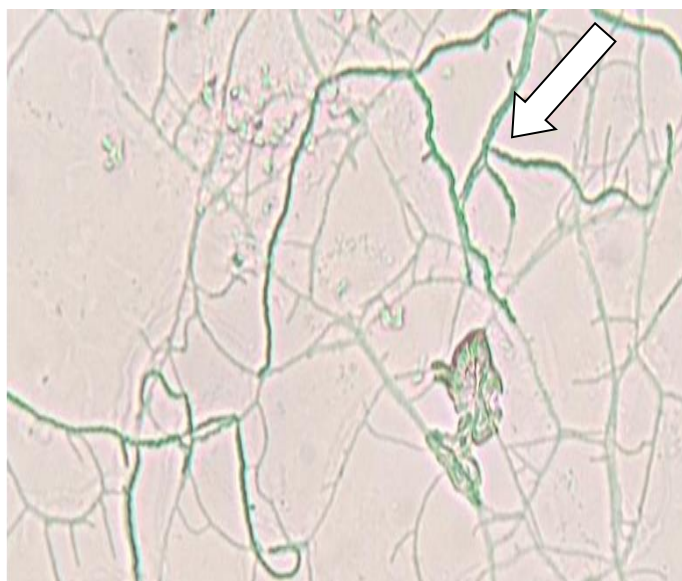


Figura 07 - Microscopia óptica mostrando a cadeia de esporos.

A microscopia eletrônica de varredura da actinobactéria estudada confirmou cadeias de esporos simples *Retinaculum-apertum* (setas) (figura 08).

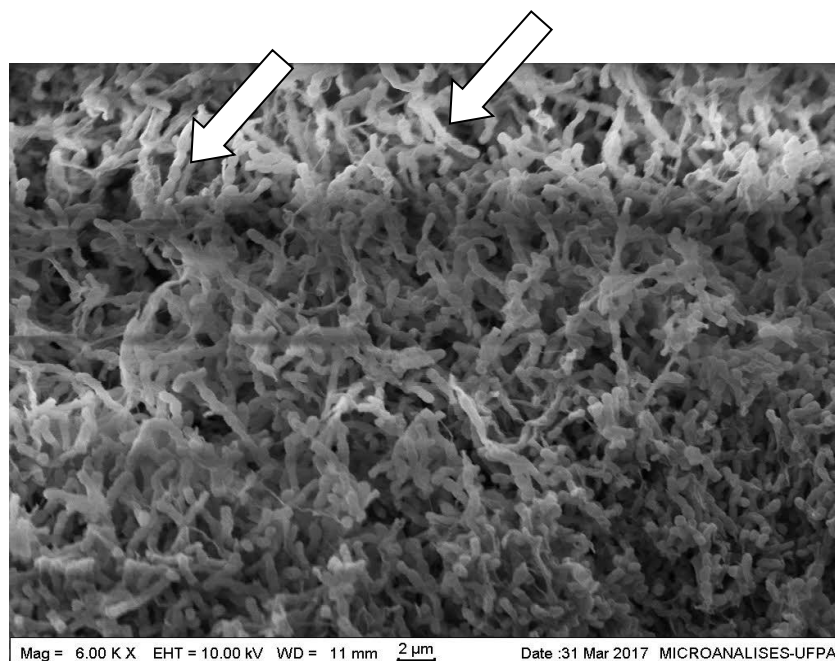


Figura 08 - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a cadeia de esporos simples *Retinaculum-apertum* de *Streptomyces sp*(setas).

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

Na análise molecular após a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi achada similaridade de 99% para *Streptomyces cinereus* (tabela 05).

Tabela 05 – Dados de identificação molecular da actinobactéria.

Con- teúd o de G+C	Tam anh o (bp)	Primer forward	Primer reverse	Simila ridade %	Correspon- dência	Gene- bank ID
58.57 %	828	Eub338F** - ACTCCTA CGG- GAGGCAGC AG	Act1159R*** - TCCGAGT- TRACCCCGGC	99%	<i>Streptomyces cinereus</i>	KR0632 15.1

* (Weisburg et al., 1991)

** (Fierer et al., 2005)

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

4.4 UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Actinobactérias têm preferência pelo uso de glicose como fonte de carbono. A *Streptomyces cinereus* desenvolveu o micélio aéreo, apenas no substrato com manitol, rhamnose e glicose (Tabela 06).

Tabela 06 – Utilização de fontes de carbono por *Streptomyces cinereus* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (macacaporanga).

Fontes	Consumo
L-Arabinose	-
Celulose	-
D-Manose	-
D-Fructose	-
D-Glicose	+
Inositol	-
D-Lactose	-
Manitol	+
D-Melezitose	-
D-Rhamnose	+
D-Sacarose	-
D-Sorbitol	-
Trealose	-
D-Xilose	-

+ positividade para o consumo da fonte; - negatividade para o consumo da fonte.

Como fonte de nitrogênio apenas não produziu em L-Histidina e L-Tirosina. Os substratos utilizaram a maior parte das fontes de nitrogênio testadas, sendo a L-Cisteína e L-Glutamina bem evidenciados (Tabela 07; Figura 09).

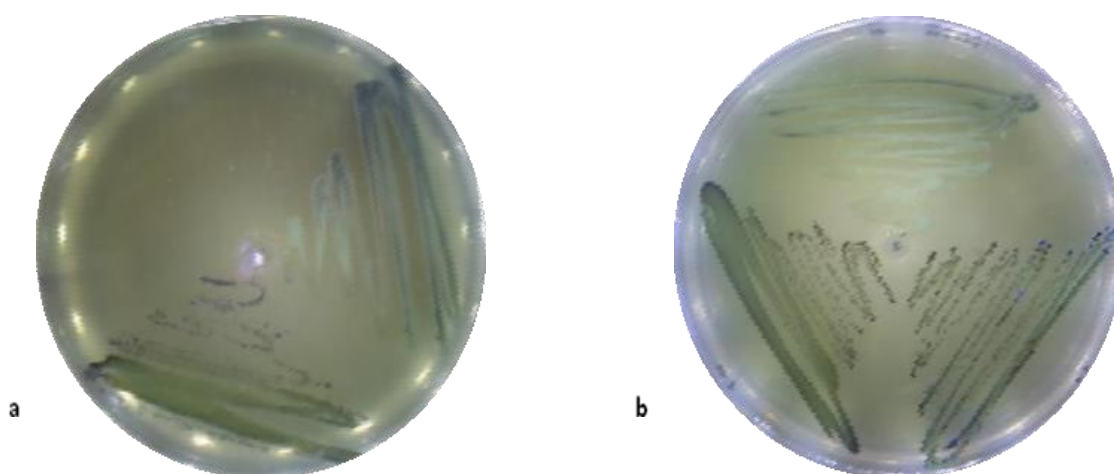


Figura 09 - Substratos evidenciando a formação de colônias da *Streptomyces cinereus* a. L-cisteína; b.L-glutamina.

Tabela 07 – Utilização de fontes de nitrogênio por *Streptomyces cinereus* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A Fragans* (macacaporanga).

Fonte	Consumo
L-Arginina	++
L-Asparagina	+
L-Cisteína	++
L-Fenilalanina	-
L-Histidina	-
L-Glutamina	+++
L-Metionina	++
L-Ornitina	-
L-Serina	+
L-Tirosina	-
L-Treonina	+++
L-Valina	+

+ menor positividade para o consumo da fonte; ++ média positividade para o consumo da fonte; +++ maior positividade para o consumo da fonte - negatividade para o consumo da fonte.

Actinobactérias são capazes de apresentar metabolismo variado e sendo assim, produz compostos variados. Elas conseguem obter carbono e nitrogênio hidrolizando esses substratos para seu crescimento. Os resultados aqui obtidos são compatíveis com um estudo de Oliveira (2015) onde foi utilizado sete linhagens de actinobactérias rizosféricas com potencial antimicrobiano, as quais utilizam preferencialmente o substrato, como fonte de carbono, contendo D – manitol e glicose e como fonte de nitrogênio L-serina, L – asparagina, L – alanina, L – arginina, L – glutamina.

4.5 CRESCIMENTO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl

A sobrevivência da *Streptomyces cinereus* em diferentes concentrações de cloreto de sódio deu-se entre 3 e 8%. Não havendo seu crescimento entre 9 a 10% de concentração do sal (Tabela 08).

Tabela 08 – Avaliação de crescimento em diferentes concentrações de NaCl.

Concentrações de NaCl	Crescimento
3%	++
4%	++
5%	+++
6%	++
7%	+
8%	+
9%	-
10%	-

+ pequeno crescimento; ++ médio crescimento; +++ alto crescimento; - ausência de crescimento.

4.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS

Foram usadas as técnicas clássicas para realizar caracterização bioquímica da *Streptomyces cinereus* (Tabela 09).

Tabela 09- Características bioquímicas de *Streptomyces cinereus* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Enzimas	Atividade
Amilase	+
Caseinase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Esterase	-
Pectinase	+
Urease	-
Catalase	+
H ₂ S	-
Indol	-
Triptofano Descarboxilase	-
Lisina Descarboxilase	-
Ornitina Descarboxilase	+
Citrato	-
Fermentação glicose	-
Produção de Gás (CO ₂)	-
L- Glutaminase	+
Hemolisina	+

Os halos enzimáticos e diâmetros das colônias estão expostos na tabela 10.

Tabela 10 - Halos enzimáticos e diâmetro das colônias de *Streptomyces cinereus* produtoras de enzimas

Enzima	Halo enzimático	Diâmetro da colônia (mm)
Amilase	21,6	18
Caseinase	48,6	18,3
Lipase	27,1	18,1
Pectinase	37,3	18,3
Hemolisina	19,3	11,8

A produção de amilase teve um halo enzimático de 21,6 mm e o diâmetro da colônia chegou a 18mm (figura 10a), caseinase halo enzimático de 48,6 e diâmetro da colônia 18,3 (figura 10b) e hemólise halo enzimático 19,3 e diâmetro da colônia 11,8 (figura 10c).

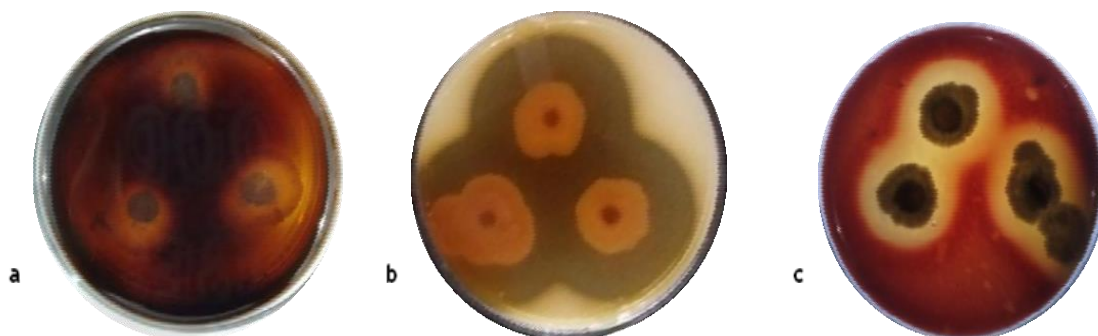


Figura 10. Produção de amilase (a); caseinase (b) e Hemolisina (c)

A amilase é capaz de hidrolisar as ligações O-glucosídicas do amido. As amilases por sua vez são as principais enzimas hidrolíticas. Elas têm sido alvo de pesquisas biotecnológicas representando um dos três maiores grupos de enzimas de interesse industrial. A produção de enzimas microbianas tem apresentado ampla diversidade bioquímica e suscetibilidade genética, e a produção de amilases microbianas é restrita a um número reduzido de microrganismos, incluindo actinobactérias. Além do mais, estas enzimas são utilizadas na agroquímica, na fabricação do papel, em nutrição, cosméticos e processos farmacêuticos. São também empregadas na produção de biocombustíveis (SHARMA e SATYANARAYANA, 2013; SINGH, KUMAR e KAPOOR, 2014).

Algumas actinobactérias hidrolisam o substrato contendo caseína e gelatina como descrito no trabalho realizado por Oliveira (2015). As enzimas apresentam grande potencial de aplicação biotecnológica em processos químicos orgânicos, formulação de detergentes, e na síntese de surfactantes e na indústria têxtil. Além de sua utilização em biocatálise estereoespecífica e na transesterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta.

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido alvo de pesquisa em direção às fontes enzimáticas inexploradas para obtenção de lipases de origem microbianas. (TAN et al., 2010; COLLA et al., 2010; YUAN et al., 2014).

As pectinases são enzimas líticas ativas no processo da compostagem, contribuindo para o ciclo natural do carbono, a partir da degradação de matéria orgânica. Elas também têm atraído grande importância biotecnológica industrial, por exemplo, na fabricação de sucos, fermentação de chás, estabilização da cor de vinhos, na indústria de papel, entre outras ações (RASHMI et al., 2008; VIIKARI, TENKANEN e SUURNÄKKI, 2008; PEDROLI et al., 2009).

A enzima L-glutaminase apresenta atividade antitumoral, especialmente contra leucemia linfocítica aguda (LLA) e atividade antiviral contra HIV. Ainda na indústria alimentícia é utilizada, tendo sua aplicação na intensificação de sabor, uma vez que aumenta o teor de ácido glutâmico nos alimentos em decorrência da hidrólise da glutamina. (RADHAKRISHNAN e SOMASUNDARAM, 2010; PLNSN et al., 2014).

Ainda foi checado o índice enzimático identificando o potencial enzimático de cada enzima estudada (Tabela 11). Foi considerado um bom potencial enzimático aquelas que apresentaram índice enzimático acima de 1,5 (HANKIN e ANAGOSTAKIS, 1975).

Tabela 11 - Determinação do índice enzimático (IE) da *Streptomyces cinereus* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Enzima	Índice enzimático
Lipase	1,5
Caseinase	2,6
Amilase	1,2
Esterase	-
Pectinase	2,0
Hemolisina	1,6
- ausente	

Karanja e colaboradores (2012) avaliando o potencial biotecnológico de actinobactérias com avaliação das lipases por *Streptomyces* foi achado o índice enzimático (IE) para lipase e esterase de 5,3 e 4,2, respectivamente.

4.7 PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Foram realizados testes com os diversos antibióticos de interesse clínico e mais utilizados pela população no combate às infecções (Tabela 13).

Tabela 13 - Antibiograma da *Streptomyces cinereus* isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Antibióticos	Sensibilidade
Ácido Nalidixico (30µg)	S
Amicacina (30µg)	S
Ampicilina (10µg)	S
Amoxicilina + Clavulanato (20µg/10 µg)	R
Cefepime (30µg)	R
Cefoxitina (30µg)	S
Cefazolina (30µg)	R
Ceftazidima (30µg)	R
Cefuroxima acetil (30µg)	R
Clindamicina (2µg)	S
Clorafenicol (30µg)	S
Gentamicina (120µg)	S
Eritromicina (15µg)	S
Meropenem (10µg)	S
Morfloxacin (5µg)	S
Estreptomicina (300µg)	S
Nitrofurantoína (300µg)	R
Neomicina (30µg)	S
Penicilina G (10µg)	R
Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75µg/125µg)	R
Tetraciclina (30µg)	S

S – Sensível; R – Resistente.

No geral, os maiores halos de inibição de crescimento com resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos entre 48h e 144h de fermentação em meio MPE.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizados testes de atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila do líquido fermentado com microrganismos patogênicos de interesse clínico disponíveis na Coleção de microorganismo do Departamento de Antibiótico da UFPE, o resultado não evidenciou atividade antibacteriana. Houve atividade antifúngica (tabela 12).

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila do líquido fermentado de *Streptomyces cinereus* do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga).

Microrganismos	Halo (mm)
<i>Candida albicans</i> - 1007	14,6±2,3
<i>Candida krusei</i> – 1002	10,6 ±1,5
<i>Candida SP</i>	-
- Ausência de Atividade	

Em estudo realizado por Oliveira (2015) o mesmo apresentou atividade contra fungos filamentosos e leveduriformes. A ação antimicrobiana de actinobactérias ocorre preferencialmente contra bactérias. Sendo bastante comum a ação contra as bactérias Gram positivas. Entretanto, além das atividades contra Gram positivas é seguido pela atividade antifúngica. Além do mais, o gênero *Streptomyces* é considerado um dos mais importantes agentes no biocontrole de fungos e enzimas hidrolíticas. Esta característica pode estar relacionada devido ao seu grande potencial na produção de diversos metabólitos antifúngicos. (AÇIKEL, ERŞAN e AÇIKEL, 2010; GUPTA, 2011).

4.9 CURVA DE PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ANTIMICROBIANOS

Foram determinados os parâmetros biológicos e a biomassa durante a fermentação do microrganismo (Tabela 14).

Tabela 14 - Parâmetros físico-químicos e biológicos avaliados durante a fermentação de *Streptomyces cinereus* nos meios M1 e MPE.

Tempo	M1			MPE		
	Biomassa (mg)	pH	T°C	Biomassa(mg)	pH	T°C
24	0,04	5,79	22,9	0,05	7,12	23,5
48	0,05	6,79	25,9	0,06	6,2	27,1
72	0,03	6,31	23	0,05	6,38	22,9
96	0,04	6,16	23,3	0,06	6,59	23,6
120	0,05	5,55	23,5	0,05	6,72	23,7
144	0,04	6,87	23,4	0,05	5,79	25,6
168	0,07	6,11	22,9	0,06	7,16	23,5

A fermentação líquida da *Streptomyces cinereus* foi produzida num período de 168h nos meio M1 e MPE. No meio M1 foi ativo conta *Candida albicans* tendo sua maior atividade em 24h com um halo de inibição de 15,3mm. No meio MPE teve a inibição de 13,6mm. Há também produção de atividade antifúngica contra a *Candida krusei*, sendo esta apenas no meio M1 onde em 72h houve halo de inibição de 10,6mm. O pH no melhor período de produção do antifúngico no meio M1 foi de 5,7 e no meio MPE foi de 7,1 (figura 11).

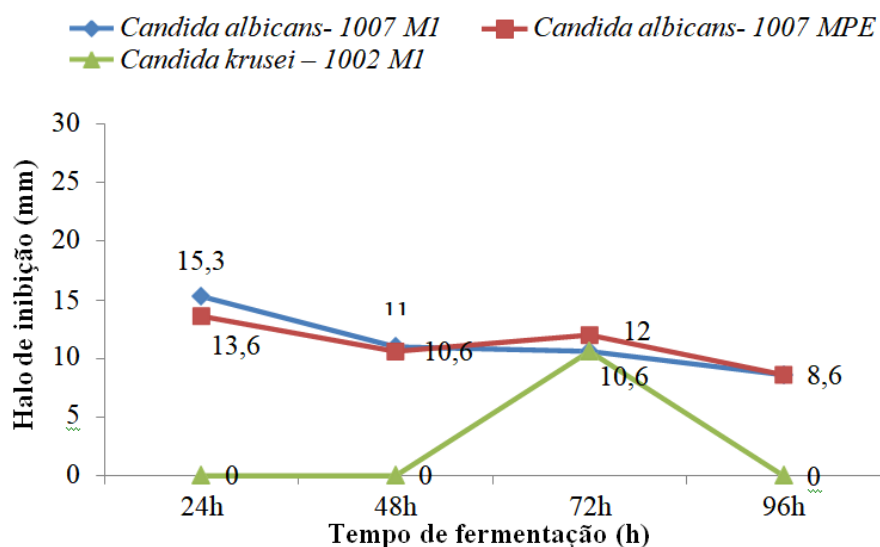


Figura 11 - Produção de metabólitos antifúngicos de *Streptomyces cinereus* em meio M1 e MPE durante 96h de fermentação.

Alguns microrganismos possuem a capacidade de sintetizar metabólitos secundários. Isso é uma capacidade de expressar fatores físico-químicos regulados no processo de obtenção em meio líquido ou sólido, como fonte de nitrogênio e carbono utilizadas, condições de aeração, pH, temperatura de crescimento microbiano, tempo de cultivo e presença de elementos-traço (THADIKAMALA e REDDY, 2011; MIYAUCHI, 2012).

4.10 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A extração de metabólitos secundários antimicrobianos de extrato mais ativo para *Streptomyces cinereus* foi em meio M1. Tendo seu maior rendimento da fermentação de extrato bruto com a extração em acetato de etila, com o líquido em pH 2,0 (ácido). Teve a obtenção de uma massa de 70mg/mL, com o menor rendimento do extrato bruto em

clorofórmio, com o pH original da fermentação tendo obtido quatro mg/mL de massa (Figura 12).

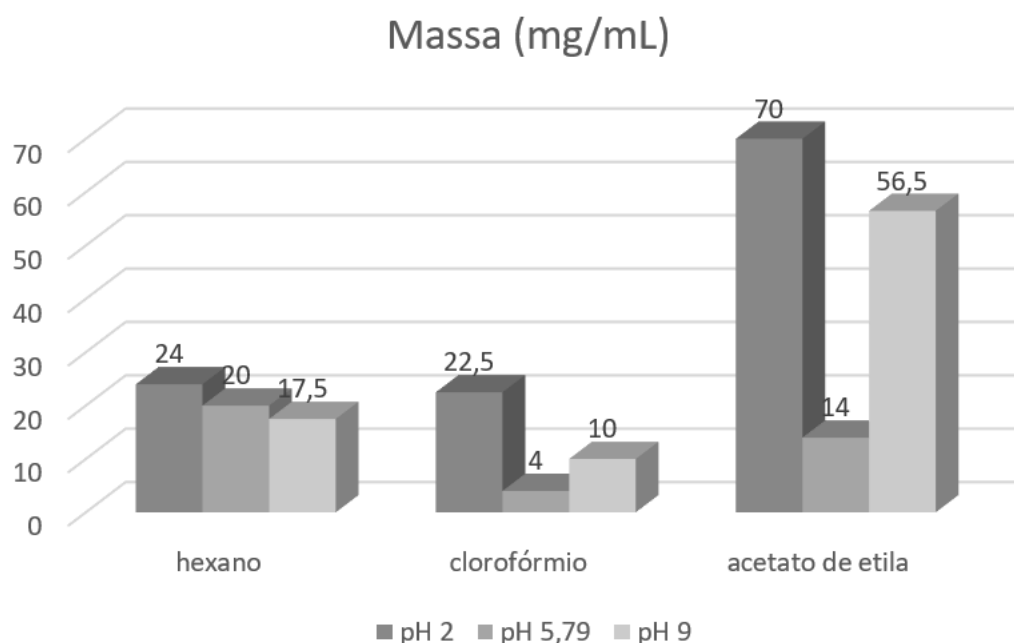


Figura 12 - Rendimento dos extratos brutos de *Streptomyces cinereus* obtidos através de extração do líquido metabólico de M1 em pH 2, pH 5,79 e pH 9 com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.

A atividade antimicrobiana dos extratos na concentração de 10mg/mL foi realizada pelo método de difusão em disco para verificar em qual dos extratos estava presente o metabólito antimicrobiano. Os solventes hexano e acetato de etila extraíram os metabólitos antimicrobianos (Tabela 15).

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana dos extratos brutos na concentração de 10 mg/mL contra *Candida albicans* e *Candida krusei*

Linhagem	Halo de inibição (mm)								
	pH2			pH5,79			pH9		
	H	C	A	H	C	A	H	C	A
<i>Candida albicans</i>	21	-	-	18	-	-	17	-	-
<i>Candida krusei</i>	12,0	-	-	11,0	-	-	10	-	-

- sem atividade; H. hexano; C. Clorofórmio; A. acetato de etila.

4.11 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

A concentração mínima inibitória da *Streptomyces cinereus* contra *Candida albicans* foi na concentração de 78,1µg/mL no extrato de acetato de etila. Com esse achado biológico,

de ação antimicrobiana, do extrato ativo contra *Candida albicans*, a CMI foi observada atividade com ação fungistática (Tabela 16).

Tabela 16 - Concentração mínima inibitória (CMI) do extrato contra *Candida albicans*.

Concentrações teste (µg / mL)									
	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	78,1	39,5
Resultado	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces cinereus</i> , meio M1 pH 5,79 + positividade para inibição do crescimento; - negatividade para a inibição do crescimento									

Já a concentração mínima inibitória do Extrato de acetato de etila de *Streptomyces cinereus* foi o ativo contra para *Candida krusei* com ação fungistática de 156 µg/mL. (Tabela 17).

Tabela 17 - Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra *Candida krusei*.

Concentrações teste (µg/mL)									
Extrato	10.000	5.000	2.500	1.250	625	312,5	156	78,1	39,5
Hexano	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces cinereus</i> , meio M1 pH 5,79; + positividade para inibição do crescimento; - negatividade para a inibição do crescimento									

O rendimento do extrato bruto que obteve mais atividade do extrato a linhagem *Streptomyces cinereus* foi a mais ativa contra *Candida albicans* e *Candida krusei*. O extrato de acetato de etila (pH 2,0), foi mais ativo, apresentando ação fungistática de 78,1µg/mL para *Candida albicans* e a 156 µg/mL para *Candida krusei*.

4.12 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO BRUTO

Após análise o extrato de acetato de etila de *Streptomyces cinereus* a sua cromatografia em camada delgada revelou a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das cumarinas, derivados de antracênicos, xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides.

Segundo estudos de Lima, Silva e Araújo (2013) foi identificada presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, triterpenos, esteroides e alcaloide no extrato bruto acetotílico de *Streptomyces hygroscopicus* isolado da rizosfera de *Paullinia cupana* Kuth.

Thomas et al. (2011) obtiveram metabólitos secundários de uma actinobactéria denominada com B-2, realizado a mesma metodologia aplicada na presente pesquisa. Após sucessivas extrações com diversos solventes orgânicos foi identificado a presença de esteróis e flavonoides no extrato bruto de acetato de etila, e apenas esteróis no extrato bruto de clorofórmio e éter de petróleo. Essas descobertas tornam-se extremamente pertinentes para o crescimento da indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

4.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.13.1 Atividade Antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante apresentou varredura de 14,74% na concentração de 10mg/dL de ácido ascórbico (Tabela 18).

Tabela 18- Atividade antioxidante extrato bruto acetato de etila de *Streptomyces cinereus*.

Atividade antioxidante extrato bruto acetato de etila			
Concentrações (mg/mL)	Percentual de Varredura (%)	IC ₅₀	Ácido Ascórbico (1 mg/mL)
1	2,23 %	Não detectado	94,78%
2	6,12%		
4	10,64%		
5	12,19%		
10	14,74%		
Ác. Asc. (1 mg/mL)	94,78%		

4.13.2 Poder Redutor do Íon Molibdato

O poder redutor do íon molibdato teve a absorbância na concentração de 10mg/mL de 0,370 (Tabela 19).

Tabela 19. Poder redutor do Íon Molibdato Extrato Bruto Acetato de Etila de *Streptomyces cinereus*

Poder Redutor Extrato Bruto Acetato de Etila		
Concentrações (mg/mL)	Absorbância	µg equiv. ác. Ascórbico
1	0,177	28,2
2	0,133	31,4
4	0,165	37,8
5	0,213	47,4
10	0,370	78,8
Ácido Ascórbico (180µg/mL)	0,922	

Vários estudos com actinobactérias tem mostrado a capacidade desses microrganismos produzirem metabólitos secundários antioxidantes (WANG et al., 2017). Gozari et al. (2017) isolaram agentes antioxidantes produzidas por *Streptomyces* marinhas. Um estudo de Rodrigues et al. (2018) com actinobactéria da Caatinga brasileira detectou a produção de agentes antioxidantes por se tratar de um bioma com altas temperaturas e baixíssima umidade do ar. Torna-se dessa forma, um meio para sobrevivência com condições extraordinárias para as actinobactérias.

3.14 ATIVIDADE INSETICIDA

Na avaliação da atividade inseticida para atividade de fumigação observou-se relevância na morte dos insetos (Figura 13).

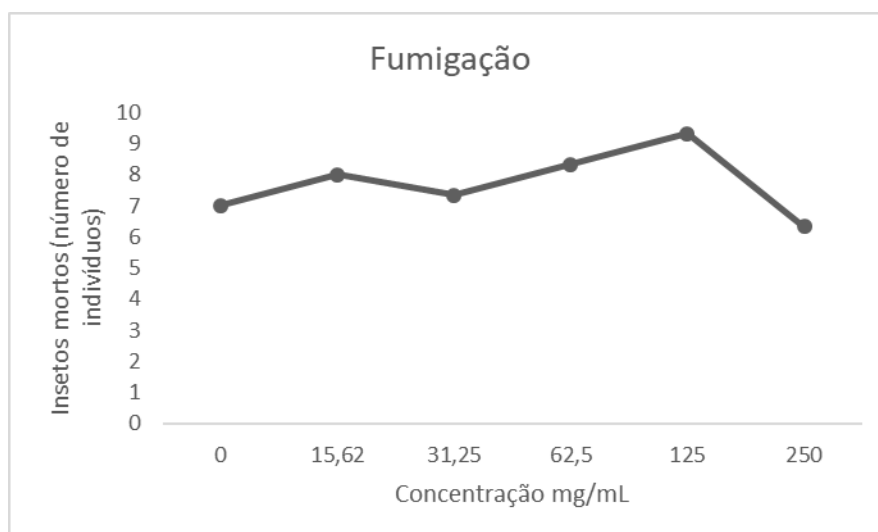


Figura 13-Teste de fumigação contra *S. zeamais* em diferentes concentrações de extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus*

Entretanto, no teste de contato com o extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus* (figura 14) há uma maior relavância na morte dos insetos. Trazendo à tona uma potencial atividade inseticida desse extrato.

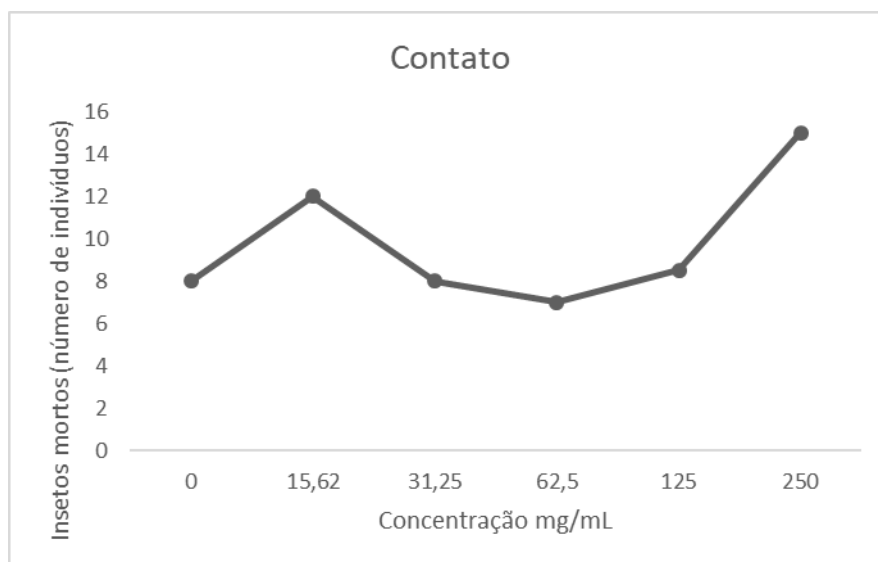


Figura 14-Teste de contato contra *S. zeamais* em diferentes concentrações de extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus*

Entre os metabólitos secundários mais encontrados como inseticidas estão as avermectinas. Estudos realizados por Tomilova et al. (2016) por *Streptomyces avermitilis* avaliando sua toxicidade foi visto que há ação inseticida diretamente na ligação de neurônios musculares de algumas espécies de insetos que causa paralisia e morte. Há relatos na literatura a cerca de que as actinobactérias são potentes possuídores de atividade de controle de insetos pela produção de metabólitos secundários ativos inseticidas (PHILLIPS, THRONE, 2010; ANWAR et al., 2014).

4.15 ARTIGO I PERCEPÇÕES DE ACTINOBACTERIA E DO GÊNERO *STREPTOMYCES* (REVISÃO DA LITERATURA)

Apolonio Alves de Lima Junior¹; Ednan Cardoso de Sousa²; Raphael Carlos Férrer de Santana³; Silvia Katrine Rabelo da Silva⁴; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

1-Departamento de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco

2- Departamento de Saúde da Faculdade Santa Maria, Cajazeiras-PB

3- Departamento de Saúde do Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife-PE

4- Departamento de Microbiologia Universidade Federal do Oeste do Pará

RESUMO

Nessa revisão foi abordada sobre actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Esse grupo de microrganismo tem atraído cada vez mais atenção dos estudiosos das diversas áreas da ciência, como agrônomos, químicos, taxonomistas, biólogos, entre outros, devido a sua alta capacidade de produzir diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e têxtil. Elas são instituídas por um grupo variado de bactérias filamentosas, que morfologicamente são caracterizadas como gram positivas, aspecto microscópico comum entre elas, além de possuírem elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) em seu ácido desoxirribonucleico (DNA), modificando o percentual desse conteúdo entre os gêneros. Podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerófilas, sendo capaz de se desenvolver em ambientes extremos, poluídos e hostis. As actinobactérias formam um dos microrganismos mais importantes quanto à produção de metabólitos secundários e estão sendo o alvo da indústria biotecnológica por serem estimadas como fonte abundante de metabólitos secundários bioativos de estrutura química e ação farmacológica bastante diversificada. Com esta revisão, foi possível ampliar o conhecimento sobre as actinobactérias, especialmente *Streptomyces*, esses procariontes especiais, com suas diversas características e excelente produção de metabólitos secundários utilizados na indústria, agricultura, medicina e reciclagem de biomateriais, propriedades antifúngicas, agentes anticâncer, entre outros.

Palavras-chave: Actinobacteria, *Streptomyces*, Metabólitos, Produtos biológicos.

ABSTRACT

In this review, we addressed actinobacteria of the genus *Streptomyces*. This group of microorganisms has increasingly attracted the attention of scholars from different areas of science, such as agronomists, chemists, taxonomists, biologists, among others, due to their high capacity to produce several secondary metabolites of great importance for the pharmaceutical, agricultural and food industries. and textile. They are instituted by a varied group of filamentous bacteria, which morphologically are characterized as gram positive, microscopic aspect common among them, in addition to having a high content of G + C (guanine and cytosine) in their deoxyribonucleic acid (DNA), changing the percentage of that content across genders. They can be aerobic, anaerobic or microaerophilic, being able to develop in extreme, polluted and hostile environments. Actinobacteria are one of the most important microorganisms in terms of the production of secondary metabolites and are being the target of the biotechnological industry because they are estimated as an abundant source

of bioactive secondary metabolites with a very diverse chemical structure and pharmacological action. With this review, it was possible to expand the knowledge about actinobacteria, especially *Streptomyces*, these special prokaryotes, with their diverse characteristics and excellent production of secondary metabolites used in industry, agriculture, medicine and recycling of biomaterials, antifungal properties, anticancer agents, among others.

Keywords: Actinobacteria, *Streptomyces*, Metabolites, Biological products.

INTRODUÇÃO

Actinobactérias são instituídas por um grupo variado de bactérias filamentosas, que morfológicamente são caracterizadas como gram positivas, aspecto microscópico comum entre elas, além de possuírem elevado conteúdo de G+C (guanina e citosina) em seu ácido desoxirribonucléico (DNA), modificando o percentual desse conteúdo entre os gêneros. Podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerófilas, sendo capaz de se desenvolver em ambientes extremos, poluídos e hostis (BALLAV; DASTAGER e KERKAR, 2012).

Esse grupo de microrganismos tem atraído cada vez mais atenção dos estudiosos das diversas áreas da ciência, como agrônomos, químicos, taxonomistas, biólogos, entre outros, devido a sua alta capacidade de produzir diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e têxtil. São uma única fonte de produtos naturais sendo responsável por sintetizar quase 40% de todos compostos bioativos conhecidos (GOODFELLOW e FIEDLER, 2010; QIN et al., 2011).

Actinobactérias apresentam sua parede celular composta pelos isômeros do ácido diamino lisina, do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP), ácido diamino ornitina ou ácido diaminobutírico. Com distribuição pelo mundo, são achadas nos mais diversos ecossistemas, especialmente nos solos. Habitam em sua maior parte como saprófitas, cumprindo um belo papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outras estão em relação mutualística ou parasita com plantas (WHITMAN et al., 2012).

MORFOLOGIA, TAXONOMIA E REPRODUÇÃO

Actinobactérias apresentam-se com uma grande multiplicidade de morfologias, como cocóide (*Micrococcus*) ou cocobacilo (por exemplo, *Arthrobacter*); ocorre fragmentação de

hifas e podem ser altamente diferenciadas em micélio ramificado, por exemplo, *Streptomyces spp.*, superficialmente sua morfologia assemelha-se a dos fungos filamentosos. Diferem das outras bactérias por se desenvolverem lentamente (RAJU et al., 2010; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Pela taxonomia, actinobactérias pertencem ao domínio Bactéria, filo *Actinobacteriae*, são um dos maiores e principais desse filo, em relação ao número e variedades de espécies identificadas da classe Actinobacteria, que segundo o Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, compreende 13 ordens, 55 famílias, 240 gêneros e centenas de espécies (BERGEYS, 2012). Alguns dos gêneros mais importantes são: *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Streptomyces* (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Em relação a micromorfologia das actinobactérias é distinguida de acordo com o gênero, podendo apresentar esporos esférico ou bacilar, compondo micélio aéreo de coloração variada (fig.1). O crescimento das actinobactérias é caracterizado pela formação de hifas ramificadas que dão origem a um micélio típico, que é unicelular durante a fase inicial de crescimento (MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).



Figura 01- Micélio aéreo de coloração variada aumento de 40X (fonte: Autores, 2020).

O micélio que se desenvolve no interior do substrato, é denominado micélio vegetativo, e tem como função de sustentar a colônia e absorver nutrientes através da liberação de enzimas extracelulares que degradam os compostos utilizados para sua nutrição. O micélio que se projeta na superfície do substrato é chamado micélio aéreo, que apresenta

aparência aveludada e constitui o micélio reprodutivo, onde o mesmo se diferencia para formar os corpos de frutificação ou propágulos (CHATER et al., 2010; BATISTA et al., 2011; MAHAJAN e BALACHANDRAN, 2011).

Em relação a reprodução das actinobactérias, pode acontecer por meio de fragmentação em determinadas espécies, como no gênero *Nocardia*, na qual as hifas se fragmentam em muitas células cocóides baciliformes, onde cada uma é capaz de originar um novo micélio. Outras espécies reproduzem-se pela concepção de esporos ou conidiósporos como *Streptomyces* e esporangiosporos. Os esporos são produzidos em grande quantidade originando um novo organismo (SLONCZEWSKI e FOSTER 2009).

Algumas espécies de Actinobactérias podem proporcionar reprodução por fragmentação de suas hifas, enquanto outros gêneros apresentam conidiósporos ou esporangiósporos, que são esporos assexuais. A formação de esporos em determinados gêneros das actinobactérias podem variar de zoósporos móveis a propágulos especializados. Os esporos resistem bem à dessecação, tendo uma ampla importância na preservação da espécie, porém, não são muito resistentes a temperaturas elevadas. Os esporos são formados quando ocorre escassez de nutrientes, podendo apresentar motilidade como ocorre no gênero *Actinoplanes* (FLÄRDH e BUTTNER, 2009; WHITMAN et al., 2012).

GÊNERO *STREPTOMYCES*

As *Streptomyces* são bactérias gram-positivas, caracterizadas pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários. Esses microrganismos apresentam um complexo ciclo de vida que podem ocorrer em habitats aquáticos, entretanto, habitam preferencialmente o solo, sendo os solos alcalinos e neutros os mais favoráveis ao seu desenvolvimento. São conhecidas mais de 500 espécies; entre os metabólitos conhecidos produzidos por essas bactérias temos inúmeros tipos de antibióticos e substâncias biotecnológicas ativas (ANTUNES et al., 2013; MADIGAN et al., 2016).

Segundo Madigan et al. (2016), algumas das principais particularidades importantes na classificação de *Streptomyces* são as diferenças na forma e no arranjo dos filamentos aéreos e dos arcabouços contendo os esporos das múltiplas espécies. Os conídios e esporóforos são comumente pigmentados, colaborando para uma coloração específica da colônia em diferentes meios de cultura. Assim, dentre as características que facilitam as identidades das

colônias de *Streptomyces* em meio de cultura sólido, pode-se destacar a aparência pulverulenta das colônias maduras, sua natureza compacta e coloração diversificada (fig. 02).

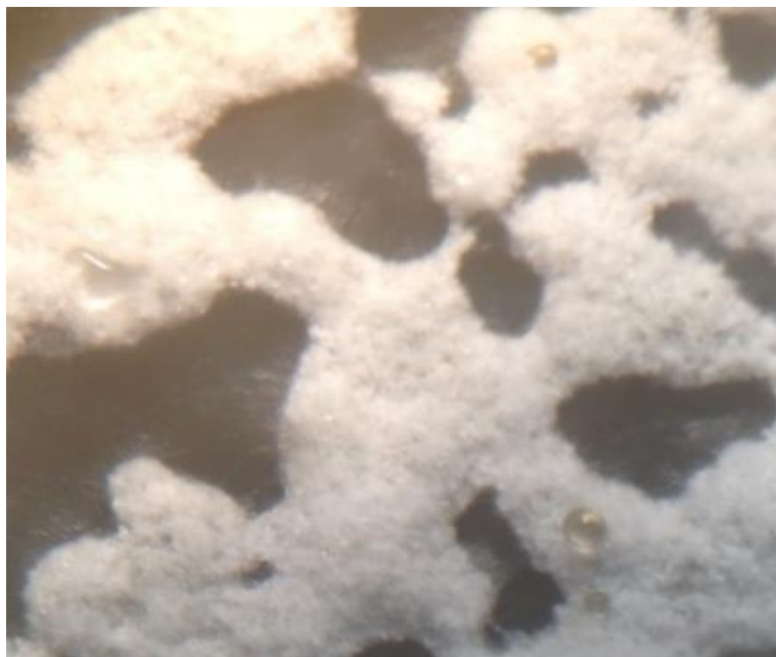


Figura 02- *Streptomyces* sp em meio de cultura sólido aumento de 40X (Fonte: Autores, 2020)

Em geral os filamentos de *Streptomyces* apresentam de 0,5-1,0 μm de diâmetro, com dimensão indeterminada, e na sua maioria são desprovidos de paredes transversais, na fase vegetativa. O crescimento ocorre a partir da ponta dos filamentos, acompanhado pela constituição de ramificações, de modo que a fase vegetativa corresponde a uma matriz complexa, densamente entrelaçada, ocasionando um micélio compacto e, posteriormente, uma colônia. À medida que o micélio aéreo se desenvolve os diferentes esporóforos são formados. Os esporos contribuem para a preservação da espécie (MADIGAN et al., 2016).

Os esporóforos são filamentos aéreos peculiares que se projetam acima da superfície da colônia, há também presença de escleródios, morfologia da cadeia e ornamentação da superfície de esporos. Os esporos de *Streptomyces*, ou conídios, não possuem qualquer relação com esporos de outras bactérias como em que ocorre em *Bacillus* e *Clostridium*, visto que, os esporos dos estreptomicetos são determinados pela formação de paredes transversais multinucleado, com longas cadeias de esporóforos diversificada que é uma característica do gênero *Streptomyces* (KHANNA, SOLANKI, e LAL, 2011; MADIGAN et al., 2016).

Os *Streptomyces* também exibem um complexo desenvolvimento biológico, envolvendo diferenciação morfológica, crescimento micelial, comunicação intercelular e

comportamento multicelular coordenado com vários processos fisiológicos. O ciclo de vida do desenvolvimento culmina na produção de esporos adormecidos que permitem a micélica sésil desses organismos para se espalharem para novos habitats (MCCORMICK e FLARDH, 2012).

O gênero *Streptomyces* é amplamente estudado por sua capacidade de produzir compostos bioativos utilizados na síntese de cerca de 70% dos antibióticos de escolha no tratamento de infecções microbianas e 60% são usados amplamente na agricultura. Há produção de metabólitos diferentes, com características físicas e químicas peculiares, e na sobrevivência das espécies, em distintos habitats (KIM et al., 2012; RASHAD et al., 2015).

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são compostos produzidos exclusivamente quando se interrompe o crescimento do microrganismo produtor e não são mais eficazes para o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, ou seja, na fase estacionária de crescimento microbiano. Eles são de grande importância biotecnológica, entre eles temos: celulasas, amilases, pectinases, lipases, peroxidases, xilanasas, agentes antitumorais, fitormônios, entre outros. A produção de metabólitos secundários bioativos é uma vantagem competitiva. Actinobactérias, especialmente as do gênero *Streptomyces*, são apropriadas de produzir inúmeros metabólitos secundários bioativos como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos (EL-TARABILY et al., 2009).

Os *Streptomyces* e outras actinobactérias são responsáveis por cerca de três quartos de todos os produtos metabólitos conhecidos. Desde o início do século XX, os metabólitos desses microrganismos têm sido escopos de diversas pesquisas com a descoberta da estreptomicina. Os *Streptomyces*, por sua vez, pertencem a produção de compostos químicos mais competentes da natureza e em maior abundância e também diversificados metabólitos secundários como exemplos, terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citocalasinas e eniatinas. Utilizam diferentes fontes de carbono e energia diversificada com ocorrência de exemplares quimiotróficos ou heterotróficos (BALLAV, DASTAGER e KERKAR, 2012; KUMAR et al., 2019).

PRODUÇÃO DE ANTIMICROBIANOS POR *STREPTOMYCES*

A bioprospecção de microrganismos isolados de nichos ecológicos constitui uma importante estratégia para a obtenção de antibióticos mais eficientes e menos tóxicos, que podem, em última análise, controlar o efeito patogênico de bactérias que são resistentes aos antibióticos habitualmente utilizados nos diversos cenários (RODRÍGUEZ- NORIEGA et al, 2010).

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de dificultar o crescimento ou ocasionar a morte de bactérias. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido reconhecidas como elaboradoras extraordinárias de metabólitos bioativos, pois possuem metabolismo variado. Essas bactérias do solo permanecem sendo uma fonte importante de antibióticos e outros compostos biologicamente ativos que foram e serão explorados por gerações de estudiosos da área da Biologia (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008).

De acordo com Arasu et al. (2009) e Batista et al. (2011), a produção de compostos bioativos originários de bactérias e fungos tem sido descrita desde o início do século XX, sendo as actinobactérias alvo da indústria biotecnológica por serem estimadas como fonte abundante de metabólitos secundários bioativos de estrutura química e ação farmacológica bastante diversificada.

Liu e colaboradores (2010) relataram que dos metabólitos bioativos adquiridos a partir de experimentos com microrganismos, 45% são produzidos por actinobactérias, 38 % por fungos e 17% por outros grupos de bactérias. Esses metabólitos abrangem compostos com distintas atividades biológicas, como: antibacteriana (CHAROENSOPHARA et al., 2008), antifúngica e antitumoral (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008), antioxidante (ZHONG et al., 2011), antiviral, antiparasitária (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010), anti-inflamatória, inseticida (EL-KHAWAGH; HAMADAH; ELSHEIKH, 2011) e citotóxica (SHAABAN et al., 2011).

Mesmo com a disponibilidade de novos produtos antimicrobianos, a disseminação frequente de doenças epidêmicas, uso indiscriminado de antibióticos, o surgimento incessante de patógenos resistentes a medicamentos e a intensidade com que esses patógenos transmitem entre as pessoas estabelecem a produção contínua de antibióticos cada vez mais eficazes. A maior parte dos antibióticos empregados na medicina humana e veterinária é produzida pelo gênero *Streptomyces* (CHAROENSOPHARA et al., 2008; PIMENTEL-ELARDO et al., 2010).

Os antibióticos produzidos por *Streptomyces* são fabricados na fase de transição, em pouca quantidade, isso se dá no início do desenvolvimento entre o micélio aéreo e vegetativo. A produção desses antibióticos depende de diversos fatores físicos e químicos, como oferta de oxigênio, temperatura, depende da disponibilidade de nutrientes do meio, como fosfato, fontes de carbono e nitrogênio, taxa de crescimento, inativação ou indução. Pode ocorrer também inibição concorrente, que corresponde à inibição de uma atividade enzimática de um microrganismo por uma substância denominada antimetabólito, que é semelhante ao substrato normal da enzima (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

O gênero *Streptomyces* produz distintas moléculas bioativas com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiparasitárias, herbicidas, inseticidas e enzimas, que têm empregos na medicina, na agricultura e além disso, em vários processos biotecnológicos. Cerca de 500 antibióticos diferentes são produzidos por espécies deste gênero sendo que mais de 60 possuem aplicação prática na medicina humana, medicina veterinária, agricultura e indústria alimentícia (Tabela 1). A diversidade química e as estruturas incomuns dos metabólitos secundários são representadas pelas muitas classes de compostos orgânicos como por exemplo, os pertencentes à classe das cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclinas e estreptograminas (EDREVA et al. 2008; ANTUNES et al., 2013).

O gênero *Streptomyces* é responsável pelo cultivo de diversas classes de antibióticos como: tetraciclinas, clorafenicol, eritromicina, estreptomicina, neomicina e nistatina. Estes antibióticos produzidos desde a década de 40 (Tabela 02) e, além dos antibióticos há produção de agentes antitumorais, aminoácidos e vitaminas (SIVARAMAKRISHNA e MAHAJAN, 2009).

Tabela 1 - Antibióticos produzidos por *Streptomyces spp.*

Classe química	Antibiótico	Microrganismo	Ação
Aminoglicosídes	Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Maioria de <i>Bacteria</i> Gram-negativas
	Espectinomicina	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , produtores de penicilinase
	Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Ampla espectro, geralmente utilizado topicamente devido à sua toxicidade
Tetraciclínas	Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Ampla espectro, Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, riquetsias e clamídias, Mycoplasma
	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	
Macrolídeos	Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Bactérias Gram-positivas, frequentemente utilizado em substituição à penicilina, <i>Legionella</i>
	Clindamicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Eficaz contra anaeróbios obrigatórios, especialmente <i>Bacteroides fragilis</i>
Políenos	Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	Fungos, especialmente em infecções por <i>Candida</i> .
	Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Fungos

DESCOBERTAS E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *STREPTOMYCES*

Com a rápida evolução da ciência nos domínios da ecologia, conhecimento dos genes e sua aplicabilidade, e a forte exigência de novos compostos antimicrobianos, para combater a resistência antimicrobiana, irão ser descobertos. Na ecologia do solo, os *Streptomyces* ainda são muito promissores para o biocontrole de pragas, como promotores de crescimento de plantas, biorremediação e biofertilizante, tornando-os indispensável na prática agrícola (ADEGBOYE e BABALOLA, 2012; BARKA et al., 2016).

No solo, os *Streptomyces* são abundantes e extremamente importantes, pois exercem a função de ciclar o carbono aprisionado em detritos insolúveis orgânicos, principalmente em fungos e plantas. Com essa função, há possibilidade de produzir uma vasta quantidade de exoenzimas hidrolíticas. Esse gênero ainda é capaz de uma ampla disseminação filogenética. Os componentes químicos produzidos por *Streptomyces* são os mais competentes da natureza em produzir uma grande quantidade e diversidade de metabólitos secundários bioativos, em consequência, são de grande importância na indústria e na medicina (LUDWIG et al., 2012).

O gênero *Streptomyces* são considerados os fundamentais elaboradores de diversos metabólitos secundários, incluindo os antibióticos, resistência a compostos químicos e corantes naturais sendo conhecidos pela sua importância na biotecnologia industrial. A produção dessas substâncias por esses microrganismos os torna fortes candidatos a agentes no biocontrole e na biodiversidade, como por exemplo de fitopatógenos em plantas (EL-TARABILY et al., 2009; SUBRAMANI e ALBERSBERG 2012; VERMA et al., 2013).

Estudos realizados por Vijayakumar et al. (2012), em solo marinho indiano revelaram que os actinomicetos marinhos do Estreito de Palk (costa leste da Índia) poderiam ser uma fonte potencial de novos antimicrobianos. O composto antimicrobiano identificou que o composto do extrato com acetato de etila obteve atividade antimicrobiana para a *C. albicans*, *K.pneumoniae*, *B. subtilis* e *E. Coli*.

As *Streptomyces* possuem grande potencial para sintetizar novos policetídeos aromáticos. A descoberta de genes de policetídeo sintase envolvidos na biossíntese de policetídeos aromáticos aumentaria a probabilidade de descobrir novos medicamentos e reduzir os custos de amostragem, triagem e processos de identificação rápida. Há ainda atuação das *Streptomyces* sobre os fatores de regulação da produção de antibióticos, tendo novas tecnologias descritas e com potencial para ampliar ainda mais a compreensão da

regulação de genes sendo uma área fértil para descoberta e exploração (VAN WEZEL E MCDOWALL, 2011).

Yague et al. (2013) realizaram estudo clássico com *Streptomyces* visando a formação do micélio aéreo, em culturas sólidas, e nas fases de esporulação. Em contraste, aos estágios de pré-esporulação, incluindo a diferenciação em culturas líquidas, foram amplamente ignorados. Foi observado que novos conhecimentos sobre as etapas de presportação de *Streptomyces*, em combinação com futuros trabalhos que visem compreender a regulação bioquímica desses processos, será fundamental para compreender e otimizar a diferenciação de hifas em fermentações industriais, bem como melhorar a triagem de novos metabólitos secundários a partir de cepas de *Streptomyces* naturais.

Streptomyces isoladas previamente de solo da rizosfera do campus da Sahyadri Science College, em Shivamogga, na Índia, apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra as leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Como também contra *Staphylococcus aureus* (resistentes à meticilina) isolados anteriormente de pacientes queimados (PALLAVI et al., 2013).

CONCLUSÃO

Com essa revisão, pôde-se ampliar o conhecimento sobre actinobactérias, em especial, as *Streptomyces*, esses procariontes tão especiais, com suas diversas particularidades, e com excelente produção de metabólitos secundários utilizados na indústria, agricultura, medicina, além da reciclagem de biomateriais, propriedades antifúngicas, agentes anticancerígenos, entre outras.

Desde a década de 40 que as aplicações dos compostos produzidos por *Streptomyces* vem sendo usada em benefício para a humanidade. Entre eles pode-se destacar os antibióticos. Na atualidade, espera-se debelar a resistência antimicrobiana, tão desafiadora para a humanidade, com a descoberta de novos fármacos. Esses microrganismos nos surpreendem cada vez mais com suas descobertas tendo um papel fundamental em diversos processos biológicos, pois as actinobactérias encontram-se distribuídas em vários habitats.

A presente pesquisa também poderá servir de subsídio para outros trabalhos científicos futuros, enaltecendo a área de pesquisa científica em Microbiologia, caso haja necessidade de literaturas, mais precisas, acerca das actinobactérias, pois há muito para ser explorado e utilizado na biotecnologia em benefício para o planeta.

REFERÊNCIAS

- ADEGBOYE FM, BABALOLA OO (2012) Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res* 7:2255–2261
- ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, 2013. ISSN 1980-4849.
- ARASU, M. V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009. ISSN 1156-5233.
- BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. *Recent Research in Science and Technology*, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012.
- BARKA EA, VATSAA P, SANCHEZA L, GAVEAU-VAILLANTA N, JACQUARDA C, KLENKB HP et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol R.* 2016;80(1):1-43.
- BATISTA, W. B. et al. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. *Unimontes Científica*, v. 12, n. 1/2, p. pág 60-68, 2011. ISSN 2236-5257.
- CHAROENSOPHARAT, K. et al. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No 87. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 9, p. 1362-1368, 2008.
- CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, v. 34, n. 2, p. 171-98, Mar 2010. ISSN 0168-6445.
- EDREVA A, VELIKOVA V, TSONEV T, DAGNON S, GUREL A, AKTAS L, GESHEVA E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of function and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiology* 34: 67-78, 2008.
- EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K.H. SH.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011
- EL-TARABILY, K.A. NASSAR, A.H. HARDY, G.E.ST.J. SIVASITHAMPARAM, K., A.H. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (5). pp. 1765-1766 . 2009.
- FLÄRDH K, BUTTNER MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in filamentous bacterium. *Nat Rev. Microbiol.* 2009 Jan;7(1):36-49. doi: 10.1038/nrmicro1968.
- GOODFELLOW M, FIEDLER H-P (2010) A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:119–142

GROMYKO, O.M. Microbial Culture Collection Of Antibiotic Producers. *Streptomyces* sp, 2008. Disponível em: http://lv-microbcollect.lviv.ua/en/strain_card/id/399/

HOPWOOD D.A. (2007) *Streptomyces* in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York, NY.

KHANNA, M., SOLANKI, R., LAL, R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotechnol Res* 2: 357-375, 2011.

KIM, B. Y.; ZUCCHI, T. D.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.62, pt.2, p.279-283, Feb 2012.

KUMAR, P., KUNDU, A., KUMAR, M., SOLANKI, R., & KAPUR, M. K. (2019). Exploitation of potential bioactive compounds from two soil derived actinomycetes, *Streptomyces* sp. strain 196 and RI.24. *Microbiological Research*, 126312. doi:10.1016/j.micres.2019.126312.

LIU, CHONG-XI; ZHANG, JI; WANG, XIANG-JIN; QIAN PING-TING, JI-DONG WANG; YA-MEI GAO; YI-JUN YAN, SHU-ZHEN ZHANG, PENG-FEI XU, WEN-BIN LI ; AND WEN-SHENG XIANG .Antifungal Activity of Borrelidin Produced by a *Streptomyces* Strain Isolated from Soybean. *LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of the actinomycetes. J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (5), pp 1251–1257

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 et al. *Microbiologia de Brock*. 14ª Edição. Editora Artemed, 2016.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, v. 4, p. 240-253, 2011. ISSN 1945- 0494.

MCCORMICK, JR; FLARDH, K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev* 36 (2012) 206–231.

PALLAVI S, MANASA M, YASHODA KAMBAR, ASHA M.M, CHAITHRA M, VIVEK M.N, SACHIDANANDA SWAMY H.C, SUNITA C. MESTA, ONKARAPPA R, PRASHITH KEKUDA T.R, MALLIKARJUN N. Anti-Staphylococcus aureus and Anti-yeast activity of *Streptomyces* species isolated from rhizosphere soil of Sahyadri Science College, Shivamogga, Karnataka. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 03 (24); 2013; 07-11.

PIMENTEL-ELARDO, S. KOZYTSKA, T.S. BUGNI, C.M. IRELAND, H. MOLL, U. HENTSCHEL Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges *Mar Drugs*, 8 (2010), pp. 373–380.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobactérias. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 89, p. 457-473, 2011.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. *Chemistry European Journal*. Vol. 16, p.3194 – 3200, 2010.

RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol. Res.*, v.175, p.34-47, Jun 2015.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., Seas C., GUZMÁN-BLANCO, M., Mejía C., ALVAREZ, C., BAVESTRELLO, L., ZURITA, J., LABARCA, J., LUNA, C. M., SALLES, M. J., GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Diseases*. 2010; 14: e560-e566

SHAABAN, K. A.; SRINIVASAN, S.; KUMAR, R.; DAMODARAN, C.; ROHR, J. Landomycins P-W, cytotoxic angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. *Journal of Natural Products*, v. 74, n.1, p. 2–11, 2011.

SIVARAMAKRISHNA, H.; MAHAJAN G. Microbes an eternal source of innovative drugs. *Express Pharma*, p. 16-30, 2009.

SLONCZEWSKI JL, FOSTER JW. Bacterial Cultural, Growth and Development. In Slonczewski JL, Foster JW (eds.), *Microbiology: An Evolving Science*, W. W. Norton & Company, Nova York, p. 145, 2009.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine Actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*. 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Artmed, 2012. ISBN 8536326980.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp SUC1. *Tetrahedron*, v. 64, p. 7583-7586, 2008.

VAN WEZEL, G. P.; MCDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Natural Product Reports*, v. 28, p. 1311-1333, 2011.

VERMA M, LAL D, KAUR J, SAXENA A, KAUR J, ANAND S, LAL R. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Res Microbiol* 164: 718-728, 2013.

VIJAYAKUMAR, R.; PANNEERSELVAM, K.; MUTHUKUMAR, C. et al. Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J. Microbiol.*, v.52, p.230-239, 2012.

WHITMAN, W., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M., LUDWIG, W., SUZUKI, K.-I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria*, 2012.

YAGUE P, LÓPEZ-GARCÍA MT, RIOSERAS B, SÁNCHEZ J, MANTECA A. Pre-sporulation stages of streptomyces differentiation: State-of-the-art and future perspectives. *Fems Microbiol Lett.* 2013;342(2):79-88.

ZHONG, L.; XU, L.; MENG, X.; PENG, Y.; CHEN, Y.; SUI, P.; WANG, M.; ZHOU, L. Botrallin from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and its antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 10, n. 79, p. 18174–18178, 2011.

4.16 ARTIGO II PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADES ANTIFUNGICAS DE ACTINOBACTERIA ISOLADA DO SOLO AMAZÔNICO

Apolonio Alves de Lima Junior¹; Ednan Cardoso de Sousa²; Raphael Carlos Férrer de Santana³; Silvia Katrine Rabelo da Silva⁴; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

1-Departamento de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco

2- Departamento de Saúde da Faculdade Santa Maria, Cajazeiras-PB

3- Departamento de Saúde do Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife-PE

4- Departamento de Microbiologia Universidade Federal do Oeste do Pará

RESUMO

Este estudo avaliou o potencial antifúngico de *Streptomyces* sp. A MPO-3 foi isolada do solo da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) pela técnica do ágar-bloco. Metabólitos secundários foram obtidos no caldo de fermentação seguido de extração com solvente com acetato de etila, para posterior avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato bruto contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*. A *Streptomyces* sp. (MPO-3) foi ativa contra as *C. albicans* e *C. krusei*. Os metabólitos antifúngicos foram produzidos a partir da fermentação de 24 horas frente à *Candida albicans*, e após 48 horas para *Candida krusei*. A concentração fungicida mínima para *Candida krusei* foi de 312,5µg/mL, para *Candida albicans* foi de 78,1µg/mL. Neste estudo foi revelada a produção de compostos bioativos por *Streptomyces* sp. MPO-3 com atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras de interesse clínico e ambiental.

Palavras-chave: Antagonismo, *Streptomyces* sp, Produtos biológicos, *Candida albicans*, *Candida krusei*.

ABSTRACT

This study evaluated the antifungal potential of *Streptomyces* sp. MPO-3 was isolated from the rhizosphere soil of *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga) using the agar-block technique. Secondary metabolites were obtained in the fermentation broth followed by solvent extraction with ethyl acetate, for further evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude extract against the yeasts *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Streptomyces* sp. (MPO-3) was active against *C. albicans* and *C. krusei*. The antifungal metabolites were produced from the 24-hour fermentation against *Candida albicans*, and after 48 hours for *Candida krusei*. The minimum fungicidal concentration for *Candida krusei* was 312.5µg / mL, for *Candida albicans* it was 78.1µg / mL. Conclusion: In this study, the production of bioactive compounds by *Streptomyces* sp. MPO-3 with antifungal activity against filamentous fungi and yeasts of clinical and environmental interest.

Keywords: Antagonism, *Streptomyces* sp, Biological products, *Candida albicans*, *Candida krusei*.

INTRODUÇÃO

Os compostos bioativos naturais de origem microbiana são as principais fontes de antimicrobianos utilizados na atualidade, por outro lado, o rápido aumento da carga global de resistência aos antimicrobianos disponíveis, com o declínio concomitante na descoberta de novas moléculas bioativas, a partir de nichos ecológicos ainda inexplorados, exige a busca de novos e eficazes metabólitos secundários, com propriedade antimicrobiana (MILSHTEYN, SCHNEIDER E BRADY, 2015; DAS et al., 2018).

Entre as infecções que acometem a população, as fúngicas tem alcançado números expressivos ao longo dos últimos anos. Na busca de combatê-las, os produtos naturais tem desempenhado um papel importante para se desenvolver novos agentes terapêuticos. Sendo que, a introdução, descoberta e desenvolvimento de um novo antimicrobiano, que combatam as infecções, são processos que requerem muito conhecimento, pois trata-se de mecanismos especiais. Além do mais, as estruturas químicas dos agentes antimicrobianos, especialmente aquelas derivados da natureza, são complexas (PEREIRA et al., 2014; NEWMAN E CRAGG, 2016; JAKUBIEC et al., 2018).

Em se tratando de produtores de moléculas bioativas, actinobactérias são um grupo de microrganismo que tem atraído cada vez mais atenção dos estudiosos das diversas áreas da ciência, como agrônomos, químicos, taxonomistas, biólogos, entre outros, devido a sua alta capacidade de produzir diversos metabólitos secundários de grande importância para indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia e têxtil. São uma única fonte de produtos naturais sendo responsável por sintetizar cerca de 40% de todos compostos bioativos conhecidos. Com distribuição pelo mundo, actinobactérias são achadas nos mais diversos ecossistemas, especialmente nos solos (QIN et al., 2011; WHITMAN et al., 2012)

O gênero *Streptomyces* é amplamente estudado por sua capacidade de produzir compostos bioativos utilizados na síntese de cerca de 70% dos antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções microbianas e 60% são usados amplamente na agricultura. Há produção de diferentes metabólitos, com características físicas e químicas peculiares, e na sobrevivência das espécies, em distintos habitats (KIM et al., 2012; RASHAD et al., 2015).

No gênero *Streptomyces*, há ainda produção de outros metabólitos bioativos não-antibióticos tais como enzimas, inibidores enzimáticos, reguladores imunológicos e antioxidantes que são de numerosos usos práticos e de altos valores comerciais. Entre os actinomicetos, o maior grupo estudado é *Streptomyces spp.*, representando até 95% dos actinomicetos encontrados no solo. Essas bactérias são cosmopolitas e podem ser encontradas

em vários habitats, mesmo os mais hóstis (BALLAV, DASTAGER e KERKAR, 2012; RODRIGUES et al., 2018).

Com o uso inadequado dos fármacos antimicrobianos disponíveis, os patógenos humanos adquirem resistência a estes compostos, levando a resistência aos antimicrobianos disponíveis com consequente fracasso de sua eficácia (LEKHAK, SINGH E BHATTA, 2018). Com isso, este estudo avaliou o potencial antifúngico de metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* sp. MPO-3 isolada do solo da Amazônia contra patógenos de interesse clínico e ambiental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento, cultivo e manutenção de *Streptomyces* sp. (MPO-3)

A linhagem de actinobactérias MPO-3 utilizada neste estudo foi isolada do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *fragans* (Macacaporanga), coletada na zona de transição entre floresta tropical e cerrado próximo a Santarém, Pará, Brasil (2°28'S e 54°49' O) (figura 1). A autorização para a realização do estudo foi emitida pelo Ministério do Meio Ambiente - MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio, pelo número 47530-1.



Figura 1. Mapa do Brasil indicando a área onde foi coletado o ponto de amostragem do solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga), (2°28'S e 54°49'O) - Santarém, Pará, Brasil, 2015.

10 gramas de solo foram adicionados em 90 mL de água destilada estéril e agitados durante 30 min. A *Streptomyces* sp. (MPO-3) foi isolada utilizando a técnica de micro-diluição. A amostra de solo (0,1 mL da diluição) foi espalhada sobre o meio de levedura aspargina ágar (ALA)

(Himedia) suplementado com Nistatina (64 µg / mL) para prevenção do crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 30°C por 21 dias. *Streptomyces sp.* (MPO-3) foi subcultivada em ALA e Agar Internacional do Projeto *Streptomyces* (ISP2) (Pridham et al., 1956) até ser obtida cultura pura. A cultura pura foi armazenada pela técnica do óleo mineral.

Características bioquímicas, morfológicas e fisiológicas

Linhagem pura de actinobactérias MPO-3 foi cultivada em caldo ISP2 a 30°C por 3 dias e após cultura a *Streptomyces sp.* (MPO-3) foi colocada numa lâmina de vidro estéril e aquecida suavemente sobre a chama. O método de Gram foi utilizado para confirmar as características morfológicas dos microrganismos. Os resultados observados foram microrganismos Gram positivos.

As propriedades bioquímicas, morfológicas e fisiológicas foram determinadas com base nos métodos padrão. Utilizou-se os meios ISP 1, meio ISP 2, meio ISP 3, meio ISP 4, meio ISP 5 para determinar a cor da massa aérea e pigmentos solúveis, e o meio ISP 9 foi usado para determinar a utilização de fonte de carbono como recomendado por Shirling e Gottlieb (1966). A utilização da fonte de nitrogênio, a degradação do amido, da gelatina e a da caseína foi feita de acordo com Williams et al (1989) e a sensibilidade aos antibióticos foi realizada conforme descrito por Petrova e Vlahov (2007). A capacidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl foi realizada usando o meio ISP 2.

Identificação molecular

O gene 16S rRNA (767 pb, sequência parcial) da linhagem de actinobactérias MPO-3 foi analisado após extração de DNA por (Stirling, 2003). O método de PCR usado foi 1 par de primers [Eub338 Forward (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG -3 ') / Act1159 Reverse (5'-TCCGAGTTRACCCCGGC -3)] (Fierer et al., 2005).

O ciclo de PCR incluiu: (1) um passo de desnaturação inicial durante 3 min a 95°C; (2) 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s de anelamento em 68°C e 90s em 72°C, e extensão de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit GFX (GE Healthcare 28-9034-70) e subclonado no vetor pCRTM2.1-TOPO® utilizando o kit TOPO TA Cloning (ThermoFisher Scientific 451 641). O plasmídeo clonado foi propagado em *E. coli* DH5-alfa e purificado utilizando o kit (Fermentas K0503).

Para sequenciamento, foram utilizados os seguintes primers: primer M13F (GTAAAC-GACGGCCAGT) e M13R (AACAGCTATGACCATG) para todos os fragmentos subclonados no vetor pCRTM2.1-TOPO®.

Para o sequenciamento completo 16S rRNA foram utilizados oligonucleótidos (Weisburg et al., 1991) 341-357F (CCTACGGGAGGCAGCAGCAG), 685-704f (GTAGSGGTGAAA-TACGTAGA) e 1099-1114f (GCAACGAGCGCAACCC). O sequenciamento Sanger foi realizado utilizando o ABI PRISM 3730 DNA ANALYZER, o Applied Biosystems / Hitashi no Laboratório de Genômica e os elementos transponíveis (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo ([http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new /](http://gate.ib.usp.br/GateWeb-new/)).

As sequências foram analisadas com o software versão do CLC Main Workbench 7.0, os contigs anotados foram comparados com o banco de dados BLAST acessado em 20 de dezembro de 2018.

Teste de microrganismos

As leveduras de interesse clínico foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os microrganismos alvos deste estudo foram as leveduras *Candida albicans* (UFPEDA1007) e *Candida krusei* (UFPEDA1002). Os microrganismos foram mantidos em Sabouraud Dextrose Agar a 30°C até à preparação da suspensão fúngica utilizada.

A linhagem de actinobactérias MPO-3 foi cultivada em meio ISP2 (Shirling e Gottlieb, 1966) na placa de Petri (95x15mm de diâmetro) incubada a 30° C por 168h para observar sua esporulação e completa colonização da superfície do meio de cultura. Os microrganismos de teste foram mantidos em Sabouraud Dextrose Agar a 30°C até à preparação da suspensão fúngica utilizada nos testes.

Atividade antifúngica

Para investigar o potencial antifúngico da linhagem de actinobactérias MPO-3 foi realizado um teste de antagonismo primário contra fungos através da técnica de ágar (Ichikawa et al., 1971) e foi realizado teste secundário para a produção de compostos antifúngicos, por fermentação submersa em meio líquido ISP2 em agitação por 5 dias.

Para o bloco de teste Agar foram cortados blocos circulares de 6 mm de diâmetro contendo colônias de linhagem de actinobactérias MPO-3 cultivadas por 168 h em meio ISP2 e dispostas em placas de Petri (95x15mm de diâmetro) contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

previamente inoculado com 100uL de suspensões fúngicas ajustadas a 0,5 na escala MacFarland.

Os blocos foram posicionados equidistantes em 25mm, proporcionando melhor visualização dos possíveis halos de inibição. A produção de biocompostos com atividade antifúngica foi observada pela formação de zonas claras de inibição do crescimento fúngico e expressas em milímetros (mm). A intensidade da atividade inibitória foi classificada sendo o tamanho da zona de inibição dividido em quatro grupos diferentes: grupo passivo - zona de inibição inferior a 10 mm; grupo ligeiramente ativo - zona de inibição entre 11 e 20 mm; grupo moderadamente ativo - zona de inibição entre 21 mm e 30 mm; e grupo altamente ativo, cuja zona de inibição é maior que 31mm (Brown et al., 1976).

O teste foi realizado em triplicado e as placas foram incubadas a 32 °C por 48h. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Obtenção dos metabólitos antifúngicos

Para a produção de metabólitos antifúngicos foi utilizado o meio ISP-2 (4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte, 4 g de dextrose, 1000 mL de água destilada, pH 7,0) (Pridham et al., 1956). Para o inóculo foram preparados com 50 mL de meio de cultura ISP-2 e três blocos de 6 mm de diâmetro com cultura por linhagem de actinobactérias MPO-3 em um agitador (180 rpm) a 30 ° C por 48h. Em seguida, 10% do volume foi transferido para 250 mL de meio de cultura ISP2 nas mesmas condições por cinco dias.

Para avaliar a atividade antifúngica a cada 24 h o líquido fermentado foi centrifugado (927 x g, 10 minutos) para a separação da biomassa e o sobrenadante foi retirado de alíquota para teste pelo método de difusão de poços (Şahin e Uğur, 2003). O teste foi realizado em triplicado e as placas foram incubadas a 32 °C por 48h. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Extração de antimicrobianos

Após fermentação em 120h, o líquido foi filtrado através de filtro de membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm, e o produto filtrado foi submetido à extração dos metabólitos secundários usando o solvente orgânico acetato de etila na relação 2: 1 (v: v) do líquido fermentado, seguido de agitação a 180 rpm durante 1 hora, permitindo a separação em duas fases líquidas distintas, a fase aquosa e a fase orgânica. Este processo foi realizado duas

vezes utilizando apenas 100 mL do solvente em cada passo da extração, seguido de agitação a 180 rpm durante 30 e 15 min, respectivamente. A fase orgânica de todas as etapas de extração foi concentrada em um evaporador rotativo para obter o extrato bruto.

Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) da extrato bruto da linhagem de actinobactérias MPO-3

O extrato bruto de fermentação foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição (Wikler, 2006). As seguintes concentrações foram testadas: 2500µg / mL, 2000µg / mL, 1500µg / mL, 1000µg / mL e 500 µg / mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem de actinobactérias MPO-3 foi uma actinobactéria gram-positiva filamentosa, e a característica cultural mostrou crescer em diferentes meios (ISP1, ISP2, ALA e SDA), formando micélio de cor predominantemente branco, sem produção de pigmento difusível (Figura 2). (Tabela 1).

Tabela 1. Características da cultura da linhagem de actinobactérias MPO-3 em diferentes meios.

Meio	Esporulação	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento
ISP-1	+	Branco	Branco	-
ISP-2	++	Branco/Cinza	Amarelo escuro	-
ISP-3	++	Branco	Amarelo	-
ISP-4	+	Branco	Amarelo	-
SDA	+++	Branco/Cinza	Amarelo claro	-
ALA	+	Branco	Bege	-

+, presente; -, ausente.



Figura 2- Actinobactéria MPO3 isolada de solo rizosférico de *Aniba parviflora* Syn *A. Fragans* (Macacaporanga) cultivada em meio ISP2 após 14 dias à 37°C. Lupa, aumento de 40X.

Os resultados das propriedades fisiológicas e bioquímicas (Tabela 2) identificou que a linhagem de bactérias ativas MPO-3 cresceu a 30°C e o melhor crescimento a 5% na concentração de NaCl.

Tabela 2. Características fisiológicas e bioquímicas de *Streptomyces* sp. (MPO-3).

Características	Atividade
Gram	Positivo
Produção de pigmento difusível	-
Crescimento na presença de NaCl	3-8%
Produção H ₂ S	-
Amilase	+
Caseinase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Pectinase	+
<i>Utilização de fontes de carbono</i>	
Nenhuma fonte de carbono (-controle)	-
Celulose	-
L-Arabnose	-
D-Manose	-
D-Fructose	-
D-Glicose (+ controle)	+
D-Inositol	-
D-Lactose	-
D-Manitol	+
D-Melezitose	-
D-Rhamnose	+
D-Sacarose	+
D-Sorbitol	-

D-Treose	-
D-Xylose	-
<i>Utilização das fontes de Nitrogênio</i>	
L-Arginina	++
L-Asparagina	+
L-Cisteína	++
L-Fenilalanina	-
L-Histidina	-
L- Glutamina	+++
L-Metionina	++
L-Ornitina	-
L-Serina	+
L-Tirosina	-
L-Treonina	+++
L-Valina	+
<i>Antibiótico Padrão</i>	
Gentamicina 10 µg	S
Ampicilina 10 µg	S
Tetraciclina 30 µg	S
Penicillina 10 µg	R
Clorafenicol 30 µg	S
Neomicina 10 µg	S
Clindamicina 10 µg	S
Nitrofurantoína 300 µg	R

+ positivo; - negativo; R- resistente; S- sensível

A sequência do gene 16S rRNA da linhagem de actinobactérias MPO-3, obtida uma sequência parcial de 767 pb, está mostrada na figura 3. A sequência foi submetida ao GenBank com número de acesso (KR063215.1) e indica *Streptomyces cinereus* correspondente, com 99% de similaridade.

Figura 3. 16S ribossomal RNA gene sequence of the *Streptomyces* sp. MPO-3.

```
CGAAATCTTTACCCCGAAGGCATGCTGGCACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT
TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCGACCACAA
GGGGGACACTGTCTCCAGTGTTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGCATCTTCGCGTTGC
GTCGAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGC
CTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGGCACGACGACGTTGG
AATGTCGCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTATCGGCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGT
GTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCGAAGTC
TAGCCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGCGAC
AAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCTCGCGCCCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTC
CCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGG
CTTCGCCCCAGGCAATG
```

Durante o teste de antagonismo a atividade mais antagonista foi observada para *Candida albicans* em 24 h com halos de inibição de 14,6mm. Observou-se que a atividade antagônica diminuiu ao longo do tempo para ensaios com a levedura *Candida albicans*.

Relacionado ao melhor tempo de produção dos metabólitos antifúngicos, o mesmo foi de 24h para *Candida albicans* e *C. krusei* com 72h, sendo *C. albicans* o microrganismo mais sensível, apresentando alta intensidade de antimicrobiano pelo líquido fermentado (Tabela 3).

Tabela 3. Halos de inibição (mm) de *Candida albicans* e *Candida krusei* frente ao líquido de *Streptomyces* sp. MPO3 fermentado nos meios M1 e MPE.

Atividade antimicrobiana do Líquido Fermentado de <i>Streptomyces</i> sp. MPO3				
Tempo	<i>Candida albicans</i> - 1007		<i>Candida krusei</i> – 1002	
	Meio M1	Meio MPE	Meio M1	Meio MPE
24h	15,3±0,58	13,6±0,58	-	-
48h	11±0,0	10,6±0,58	-	-
72h	10,6±0,58	12±0,0	10,6±0,58	-
96h	8,6±0,0	8,6±0,58	-	-

- sem atividade.

A concentração fungistática mínima para *Candida krusei* foi de 156 µg/mL e para *Candida albicans* 78,1 µg/mL. Actinobactérias, em especial o Gênero *Streptomyces* sp, são um grupo de filamentosas bactérias gram-positivos, que têm sido uma fonte excepcionalmente rica em produtos naturais utilizados para tratar doenças infecciosas e são fonte da maioria dos antimicrobianos usados atualmente, além de serem microrganismos antagônicos que são comumente isolados da rizosfera como um dos agentes de biocontrole mais relatados. (HAMID, 2011; NEWMAN E CRAGG, 2016; ZENG et al., 2018).

A prevalência global de resistência a medicamentos antimicrobianos criou uma necessidade urgente de descoberta de novos medicamentos anti-infecciosos, no entanto a busca incessante dos pesquisadores, de as actinobactérias do gênero *Streptomyces* produzirem metabólitos secundários, são alvo dos estudos revelando o grande potencial desses microrganismos com ótima atividade antimicrobiana, principalmente atividade antifúngica (MEKLAT ET AL., 2011; XU et al., 2018). Este estudo revelou a produção de compostos bioativos por *Streptomyces cinereus* com atividade antifúngica contra leveduras de interesse clínico.

REFERÊNCIAS

- BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. *Recent Research in Science and Technology*, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012.
- BROWN, A. G. et al. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*, v. 29, n. 6, p. 668-9, Jun 1976. ISSN 0021-8820 (Print)
- DAS, Ranjita et al. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC microbiology*, v. 18, n. 1, p. 71, 2018.
- FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon- specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n. 7, p. 4117-20, Jul 2005. ISSN 0099-2240 (Print)
- HAMID, M. E. Variable antibiotic susceptibility patterns among *Streptomyces* species causing actinomycetoma in man and animals. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 10, p. 5, 2011. ISSN 1476-0711. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000208655000024 >.
- ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol (Praha)*, v. 16, n. 3, p. 218-24, 1971. ISSN 0015-5632 (Print)
- JAKUBIEC-KRZESNIAK K, RAJNISZ-MATEUSIAK A, GUSPIEL A, ZIEMSKA J, SOLECKA J. Secondary Metabolites of Actinomycetes and their Antibacterial, Antifungal and Antiviral Properties. *Pol J Microbiol*. 2018;67(3):259-272. doi: 10.21307/pjm-2018-048.
- KIM, B. Y.; ZUCCHI, T. D.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.62, pt.2, p.279-283, Feb 2012.
- LEKHAK B, SINGH A, BHATTA DR. Antibacterial and Antifungal Property of Actinomycetes Isolates from Soil and Water of Nepal. *J Nepal Health Res Counc*. 2018 Jul 3;16(2):136-139.
- MEKLAT, A. et al. Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 18, p. 6710-6714, Sep 2011. ISSN 0099-2240. Available at: <<Go to ISI>://WOS:000294691400051 >.
- MILSHTEYN A, SCHNEIDER JS, BRADY SF. Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chem Biol*. 2015;21:1211–23.
- NEWMAN, D. J., AND CRAGG, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- PEREIRA, C.A.; SOUSA, N.M.; FRANCO, P.I.R.; REIS, A.F.; BARBOSA, M.S. Análise das principais micoses encontradas na rotina de um laboratório de análises clínicas na cidade de Jataí, estado de Goiás, Brasil. *Ver. Saúde e Biol.*, v.9. p.108-114, 2014.

PETROVA, Detelina; VLAHOV, Stoyan. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21e–producer of thermostable collagenase. *Journal of Culture Collections*, v. 5, n. 1, p. 3-9, 2007.

PRIDHAM, T. G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot Annu*, p. 947-53, 1956. ISSN 0570-3131 (Print)

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobactérias. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 89, p. 457-473, 2011

RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol. Res.*, v.175, p.34-47, Jun 2015.

RODRIGUES JP, PROVA SS, MORAES LAB, IFA DR. Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. from caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2018 Nov;410(27):7135-7144. doi: 10.1007/s00216-018-1315-0. Epub 2018 Sep 8.

ŞAHİN, NURETTİN; UĞUR, AYSEL. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turkish Journal of Biology*, v. 27, n. 2, p. 79-84, 2003.

XU, DONGBO el al. Bioprospecting deep-sea actinobacteria for novel anti-infective natural products. *Frontiers in microbiology*, v. 9, 2018.

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

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. *Methods Mol Biol*, v. 226, p. 53-4, 2003. ISSN 1064-3745 (Print)

ZENG, J., XU, T., CAO, L., TONG, C., ZHANG, X., LUO, D., ... ZHU, Y. (2018). The Role of Iron Competition in the Antagonistic Action of the Rice Endophyte *Streptomyces sporocinereus* OsiSh-2 Against the Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Microbial Ecology*. doi:10.1007/s00248-018-1189-x

WEISBURG, William G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITMAN, W., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M., LUDWIG, W., SUZUKI, K.-I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 5: The Actinobacteria*, 2012.

WIKLER, M. A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. ISBN 1562385887.

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

4.17 ARTIGO III AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, PROSPECÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ATIVIDADE INSETICIDA FRENTE A *SITOPHILUS ZEAMAI*S DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *STREPTOMYCES CINEREUS* DA AMAZÔNIA

Apolonio Alves de Lima Junior¹; Ednan Cardoso de Sousa²; Patrícia Maria Guedes Paiva¹; Thiago Henrique Napoleão¹; Thâmarah de Albuquerque Lima¹; Raphael Carlos Férrer de Santana³; Silvia Katrine Rabelo da Silva⁴; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

1-Departamento de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco

2- Departamento de Saúde da Faculdade Santa Maria, Cajazeiras-PB

3- Departamento de Saúde do Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife-PE

4- Departamento de Microbiologia Universidade Federal do Oeste do Pará

RESUMO

Grande é a riqueza da produção de metabólitos secundários das actinobacérias, em especial as *Streptomyces*. Entre eles há a produção de moléculas antioxidantes e inseticidas. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar atividade antioxidante, prospecção química e potencial atividade inseticida frente a *Sitophilus zeamais* por metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces cinereus* da Amazônia. Sendo assim, foram avaliados os compostos químicos por cromatografia delgada, sendo revelada a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das cumarinas, derivados de antracênicos, xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides. Ainda foi realizada a determinação da atividade antioxidante que apresentou varredura de 14,74% na concentração de 10mg/dl de ácido ascórbico. O poder redutor do íon molibdato teve a absorbância na concentração de 10mg/ml de 0,370. A atividade inseticida por fumigação e contato revelou uma potencial atividade inseticida do metabólito. Por fim, a *Streptomyces* revelou uma importante produção de metabólitos secundários com atividades biológicas essenciais na natureza.

Palavras-chave: *Streptomyces*, Metabólito, Antioxidante, Inseticida

ABSTRACT

Great is the richness of the production of secondary metabolites of actinobacteria, especially *Streptomyces*. Among them is the production of antioxidant molecules and insecticides. Thus, this study aimed to evaluate antioxidant activity, chemical prospecting and potential insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* by secondary metabolites produced by *Streptomyces cinereus* from Amazonia. Therefore, the chemical compounds were evaluated by thin chromatography, revealing the presence of secondary metabolites belonging to the coumarin class, derived from anthracenes, xanthines, phenolic compounds, triterpenes and steroids. The determination of antioxidant activity was also carried out, which showed a 14.74% scan in the concentration of 10mg / dl of ascorbic acid. The reducing power of the molybdate ion had an absorbance at a concentration of 10mg / ml of 0.370. Insecticidal activity by fumigation and contact revealed a potential insecticidal activity of the metabolite. Finally, *Streptomyces* revealed an important production of secondary metabolites with essential biological activities in nature.

Keyword: *Streptomyces*, Metabolite, Antioxidant, insecticide

INTRODUÇÃO

Os radicais livres são moléculas instáveis que são formadas na quebra do alimento em energia. Sendo esta energia consumida pelo organismo. Causando o processo de oxidação que induz ao estresse oxidativo provocando as modificações fisiológicas moleculares. (BAJEROVA et al., 2014; WALIA et al., 2015; CAROCHO et al., 2018). Entre os produtores de metabólitos bioativos não-antimicrobianos tais como enzimas, inibidores enzimáticos, reguladores imunológicos e antioxidantes estão as *Streptomyces* que representam até 95% do actinomicetos encontrados no solo. Esses compostos possuem numerosos usos práticos e de altos valores comerciais (BALLAV, DASTAGER e KERKAR, 2012; RODRIGUES et al., 2018).

A produção de metabólitos secundários por *Streptomyces* pertencem à produção de compostos químicos mais competentes da natureza e em maior abundância. Desses diversificados metabólitos secundários temos como exemplos, terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citocalasinas e eniatinas. Como também há produção de metabólitos secundários com ação inseticida (HOPWOOD, 2007; EL-KHAWAGH; HAMADAH; ELSHEIKH, 2011).

Com isso, a descoberta de novos agentes com atividade inseticida é importante para o controle de insetos-praga que causam a destruição de alimentos e produtores agrícolas. Entre os insetos que causam esse dano temos o *Sitophilus zeamais*, sendo conhecido como gorgulho de milho (FAZOLIN et al., 2010; FISHEL, 2014; CAMAROTTI et al, 2017).

O *Sitophilus zeamais* é uma praga que se multiplica rapidamente tendo sua média de vida em torno de 140 dias, sendo 104 dias para oviposição, com uma média de 280 ovos por grão de milho. Os prejuízos causados são irrecuperáveis, pois tanto as larvas quanto os insetos alimentam-se no interior do grão (MUGO et al., 2012; LORINI et al., 2015).

Sendo assim, esse estudo teve como objetivo avaliar atividade antioxidante, prospecção química e potencial atividade inseticida frente a *Sitophilus zeamais* por metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces cinereus* da Amazônia.

METODOLOGIA

Actinobactéria

Nesse estudo foi utilizada a *Streptomyces cinereus* isolada de rizosfera de *Aniba parviflora* *Syn fragans* (Macacaporanga) da floresta amazônica. A amostra foi gentilmente cedida pelo laboratório de culturas de microrganismos da Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA. A cultura foi mantida sob refrigeração (+2 a +8°C).

Fermentação submersa

Na realização da fermentação submersa para a cultivo dos metabólitos secundários foram utilizados os meios M1 e MPE, o pH foi ajustado para 7,2 antes da esterilização. Para realização do pré-inóculo utilizou-se erlenmeyers de 250mL, contendo 50mL de meio de cultura ISP-2 líquido, sendo acrescentados três blocos de 6mm de diâmetro contendo a cultura da actinobactéria crescida previamente no meio ISP-2 sólido, à 30°C por 14 dias. Foram mantidos os frascos sob agitação de 180 rpm em mesa rotatória à 30°C por 48h. Logo após, 10% do volume do pré-inóculo foi transferido para erlenmeyers (1000mL) contendo 250mL de meio de cultura M1 e MPE. O mesmo processo foi mantido, nas mesmas condições, sendo a fermentação realizada num prazo de 168h.

Após a incubação o líquido fermentado foi coletado à cada 24h, alíquotas de 50mL, o mesmo era centrifugado a 927g, durante um período de 10 minutos para obtenção da biomassa e do sobrenadante, posteriormente foi realizada à filtração, deste, foi retirado uma alíquota de um mL, sendo filtrado em membrana de acetato de celulose com uma porosidade de 0,22µm. Onde a biomassa microbiana foi desprezada e o filtrado de cultura foi separado, para ser utilizado nos experimentos de atividade inseticida.

Durante a fermentação a biomassa, a temperatura e o pH foram devidamente registrados durante todo o percurso, visando padronizar e monitorar a melhor condição de fermentação para assim obter os metabólitos secundários bioativos.

Extração de Metabólitos Bioativos do Líquido Fermentado

Na extração dos princípios ativos, o pH do líquido metabólico foi ajustado para 2,0 e 9,0 e foi mantido o pH original da fermentação (5,9). O líquido fermentado em todos os valores de pH

foi tratado com três solventes orgânicos (acetato de etila, hexano e clorofórmio), seguido de agitação mecânica por 15 min. Após filtração, a fase orgânica foi colocada em rotaevaporador até a evaporação total do solvente; posteriormente foi pesado e redissolvido em metanol, para uma concentração final de 1 mg/mL, visando a condução do bioensaio.

O líquido fermentado foi filtrado à vácuo. O filtrado (líquido metabólico) foi dividido em volumes iguais e tratado em três condições para a extração de metabólitos: 1 – ajuste do líquido metabólico para pH 2; 2 – Manutenção do pH original do líquido metabólico; 3 - ajuste do líquido metabólico para pH 9.

A extração dos metabólitos secundários bioativos foi realizada através de 03 extrações sucessivas utilizando os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e acetato de etila na proporção de 2:1 do líquido metabólico. As fases orgânicas de todas as extrações eram concentradas em evaporador rotativo à 40°C para a obtenção dos respectivos extratos brutos.

Extração de Metabólitos Bioativos da Massa Celular

A massa celular, obtida pela filtração do mosto fermentado, foi tratada com solventes acetona, metanol e etanol, para a extração dos princípios ativos através de agitação mecânica por 15 min, visando a desidratação das células e, conseqüente, extração dos produtos bioativos. Ao final o material foi concentrado em rotaevaporador, obtendo-se o extrato bruto do microrganismo, que foi ressuspensionado em metanol, para uma concentração final de 1 mg/mL, procedendo-se aos ensaios biológicos.

Cromatografia em Camada Delgada

Para a avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos oriundos da actinobactéria foi realizada a cromatografia em camada delgada. Foram utilizados diversos reveladores, visando detectar nos extratos carboidratos, esteróides, terpenos, compostos fenólicos, ácidos hidroxâmicos, alcalóides, compostos nitrogenados heterocíclicos, cumarinas, antraquinonas, aminoácidos, aminas e aminoaçúcares, fenóis, esteróides e óleos essenciais.

A análise foi realizada com cromatofolhas de alumínio Sílica Gel 60 F254 (Merck). Alíquotas de 10 µL do extrato bruto em acetato de etila da linhagem ativa foram aplicadas nas cromatofolhas (5x5 cm). Os cromatogramas foram revelados com vapores de I₂ (revelador universal), lâmpada UV, anisaldeído/ácido sulfúrico e dragendorff, para identificar as principais classes de compostos presentes no extrato bruto. I₂ complexa-se com compostos

insaturados, de modo que placas que os contiverem, ao serem colocadas em uma câmara contendo cristais de iodo, apresentaram pontos amarronzados. Compostos UV-ativos, apareceram como manchas escuras em fundo fluorescente, quando a placa foi iluminada com lâmpada de luz ultravioleta. O revelador anisaldeído/ácido sulfúrico, permite detectar esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, terpenos, antibióticos (macrolídeos e tetraciclina) e micotoxinas – tricotecenos. Dragendof permite detectar compostos nitrogenados como alcalóides (JORK, FUNK, et al., 1990; WALL, 2005).

Prospecção química preliminar do extrato bruto mais ativo

O extrato bruto mais ativo foi diluído na concentração de 10 mg/mL do respectivo solvente e analisado pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de sílica gel (TLC) (Merck), 60mm x 100mm, utilizando diversas fases móveis de diferentes polaridades para as classes de metabólitos (METZ, 1961; SHARMA e DAWRA, 1991; WAGNER e BLADT, 1996; HARBORNE, 1998).

Determinação da Atividade Antioxidante

Atividade Antioxidante por DPPH

O potencial varredor do extrato bruto em acetato de etila ao radical DPPH foi avaliado como descrito por Molyneux (2004). Uma solução metanólica de DPPH foi preparada a uma concentração de 0,0047% (120 µM), 500 µL da solução de DPPH foram combinados a 500 µL das diluições (1-10 mg/mL) extrato bruto acetato de etila e incubadas no escuro por 30 minutos. A absorbância foi aferida a 517nm em espectrofotômetro UV/Vis (Evolution60 fabricado pela Thermo Scientific®). Os experimentos foram realizados em triplicata. O ácido ascórbico (1 mg/mL) foi utilizado para validação do método. A habilidade varredora do extrato bruto acetato de etila ao radical DPPH foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Varredura} = \frac{ABSc - ABSs}{ABSc} * 100$$

Onde: ABSc é a absorbância do controle e ABSs é a absorbância da amostra ou ácido ascórbico. A concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) do radical foi calculada por regressão linear e expressa em µg/mL.

Poder Redutor do Íon Molibdato

O poder redutor do extrato bruto em acetato de etila foi avaliado frente ao íon molibdato através da redução do MO_6^{+} ao complexo MO_5^{+} em pH ácido como descrito por Prieto et al. (1999). 0,1 mL das diluições (1-10 mg/mL) foram combinadas a 1 mL do reagente fosfomolibdênio (4 mM molibdato de amônio, 28 mM fosfato de sódio monobásico e 0,6 M ácido sulfúrico) em microtubos de 02 mL. Os tubos foram incubados a 95° C por 90 minutos. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, centrifugadas (3000 RPM/5 minutos) e a absorbância foi aferida a 695 nm usando espectrofotômetro UV/Vis (Evolution60 fabricado pela Thermo Scientific®) frente ao branco (1 mL do Reagente Fosfomolibdênio adicionados a 0,1 mL do solvente). Os experimentos foram realizados em triplicata. O poder redutor do íon molibdato foi calculado frente a uma reta padrão de ácido ascórbico (20-180 $\mu\text{g/mL}$) e expresso por μg /equivalentes de ácido ascórbico.

Atividade inseticida frente a *Sitophilus zeamais*

Criação do inseto

Foram utilizados os insetos *Sitophilus zeamais*. A criação dos mesmos foi realizada no departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco sendo estabelecida de forma contínua com condições laboratoriais. Foi realizado o acondicionamento do *S. zeamais* em frasco de vidro de 1,5 litros. Há um fechamento parcial do mesmo com perfuração na tampa plástica e envolvimento da tampa com um tecido fino tipo (Tecido não Tecido-TNT). Com isso, há permissão de troca de gases no compartimento. Essa criação foi mantida em estufa incubadora B.O.D., numa temperatura em torno de 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), com umidade relativa de 70% ($\pm 5\%$), passado por um período de 24 horas de fotofase. Foi utilizado como substrato alimentar para os insetos, milho adquiridos no mercado público de Afogados, Recife-Pernambuco, Brasil. Foi utilizado o teor de umidade de 13% de base úmida.

Ensaio da avaliação de toxicidade fumigante do complexo bioativo

O ensaio do efeito de toxicidade da fumigação foi realizado de acordo com Chu et al. (2010). No ensaio foram utilizados como câmara de fumigação recipientes de plástico (5,0 cm de largura, 6,0 cm de comprimento e 80 ml de volume) com tampas contendo papel de filtro (5,0 cm de diâmetro) embebido (30 μL) com extrato bruto da fermentação (complexo bioativo),

previamente diluído em água destilada, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250mg/mL, numa divisão seriada. Após o tempo de evaporação de 30 s, 15 insetos adultos (*Sitophilus zeamais*) foram colocados em cada recipiente, as tampas foram bem fechadas para formar uma câmara selada e a taxa de mortalidade foi registrada diariamente durante o período total de 10 dias foi contabilizada a morte dos insetos. Foram realizadas três experiências independentes. Como também foi utilizado um controle com o filtro embebido em água destilada.

Ensaio da avaliação toxicidade por contato do complexo bioativo

Para realização do ensaio de toxicidade por contato foi feito de acordo com Liu e Ho (1999). O extrato bruto da fermentação (complexo biativo), foi previamente diluído em água destilada, nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250mg/mL, numa divisão seriada. Em seguida, alíquotas (05 µL) das soluções de teste foram aplicadas com micropipeta monocal, topicamente na parte dorsal do tórax dos *Sitophilus zeamais* em teste. Após esse procedimento, 15 insetos foram colocados em recipientes de plástico (5,0 cm de largura, 6,0 cm de comprimento e 80 ml de volume) com tampas de vedação. O teste foi realizado em duplicata. Como também foi realizado teste controle com água destilada aplicada diretamente nos insetos. A taxa de mortalidade foi contabilizada e registrada diariamente por 10 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antioxidante apresentou varredura de 14,74% na concentração de 10mg/dl de ácido ascórbico (Tabela 1).

Tabela 1- Atividade antioxidante extrato bruto acetato de etila de *Streptomyces cinereus*.

Atividade antioxidante extrato bruto acetato de etila			
Concentrações (mg/mL)	Percentual de Varredura (%)	IC ₅₀	Ácido Ascórbico (1 mg/mL)
1	2,23 %	Não detectado	94,78%
2	6,12%		
4	10,64%		
5	12,19%		
10	14,74%		
Ác. Asc. (1 mg/mL)	94,78%		

Poder Redutor do Íon Molibdato

O poder redutor do íon molibdato teve a absorvência na concentração de 10mg/ml de 0,370 (Tabela 2).

Tabela 2. Poder redutor do Íon Molibdato Extrato Bruto Acetato de Etila de *Streptomyces cinereus*

Poder Redutor Extrato Bruto Acetato de Etila		
Concentrações (mg/mL)	Absorvência	µg equiv. ác. Ascórbico
1	0, 177	28,2
2	0, 133	31,4
4	0, 165	37,8
5	0, 213	47,4
10	0, 370	78,8
Ácido (180µg/mL)	Ascórbico	0, 922

Vários estudos com actinobactérias tem mostrado a capacidade desse grupo microrganismos produzirem metabólitos secundários antioxidantes. Gozari et al. (2018) isolou do ambiente marinho agentes antioxidantes por *Streptomyces* marinhas. Assim como na Caatinga brasileira um estudo de Rodrigues et al. (2018) houve produção de agentes antioxidantes por se tratar de um meio com altas temperaturas e muita seco. Torna-se dessa forma, um meio para sobrevivência com condições extraordinárias para as actinobactérias (WANG et al., 2017).

Em relação a prospecção química, após análise do extrato bruto de hexano de *Streptomyces cinereus* a sua cromatografia em camada delgada revelou a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das cumarinas, derivados de antracênicos, xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides. Segundo estudos de Lima, Silva e Araújo (2013) foi identificada presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, triterpenos, esteroides e alcaloide no extrato bruto acetatoetílico de *Streptomyces hygrosopicus* isolado da rizosfera de *Paullinia cupana Kuth.*

Thomas et al. (2011) para obter metabólitos secundários de uma actinobactéria denominada com B-2, realizado a mesma metodologia aplicada na presente pesquisa. Isso feito de sucessivas extrações com diversos solventes orgânicos foi indentificado a presença de esteróis e flavonoides no extrato bruto de acetato de etila, e apenas esteróis no extrato bruto de clorofórmio e éter de petróleo. Essas descobertas tornam-se extremamente pertinentes para o crescimento da indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

Na avaliação da atividade inseticida para atividade de fumigação observou-se pequena relevância na morte dos insetos (Figura 1).

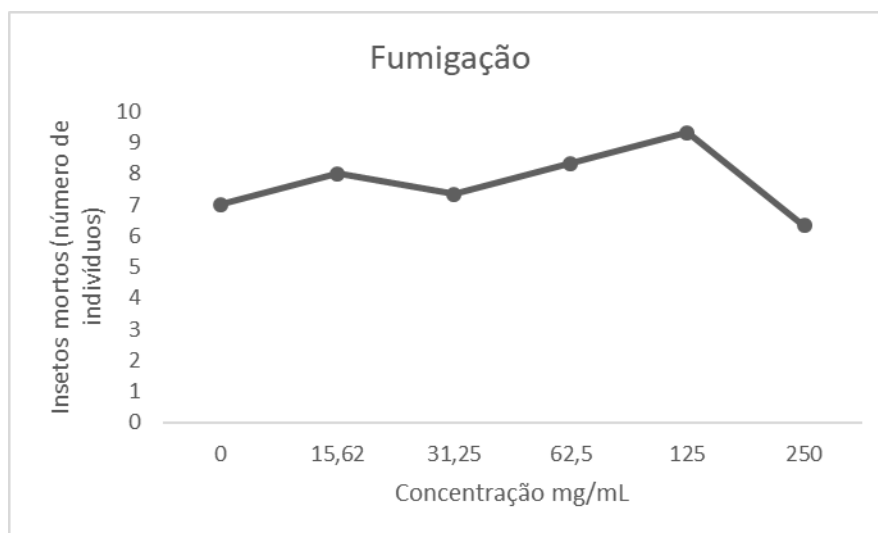


Figura 1-Teste de fumigação contra *S. zeamais* em diferentes concentrações de extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus*

Entretanto, no teste de contato com o extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus* (figura 02) há uma maior relevância na morte dos insetos. Trazendo à tona uma potencial atividade inseticida desse extrato.

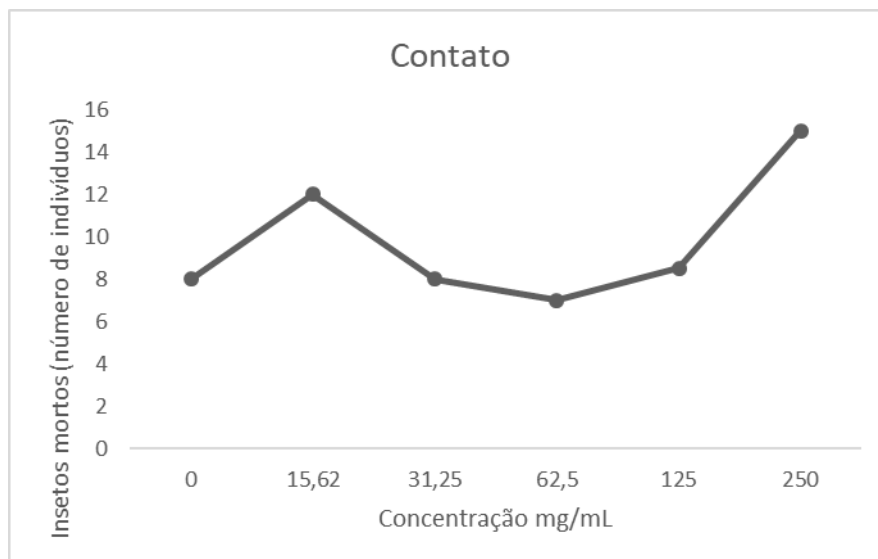


Figura 2-Teste de contato contra *S. zeamais* em diferentes concentrações de extrato bruto de metabólitos secundários de *Streptomyces cinereus*

Entre os metabólitos secundários mais encontrados como inseticidas são as avermectinas. Estudos realizados por Tomilova et al. (2016) por *Streptomyces avermitilis* avaliando sua toxicidade foi visto que há ação inseticida diretamente na ligação de neurônios musculares de

algumas espécies de insetos que causa paralisia e morte. Há relatos na literatura a cerca de que as actinobactérias são potentes possuídores de atividade de controle de insetos pela produção de metabólitos secundários ativos inseticidas (PHILLIPS, THRONE, 2010; ANWAR et al., 2014).

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo revelaram a atividade antioxidante, prospecção química e atividade inseticida da *Streptomyces cinereus* tendo a mesma uma importante produção de metabólitos secundários com atividades biológicas essenciais na natureza.

A presente pesquisa também poderá servir de subsídio para outros trabalhos científicos futuros, enaltecendo a área de pesquisa científica em Microbiologia, caso haja necessidade de literaturas, mais precisas, acerca das actinobactérias, pois há muito para ser explorado e utilizado na biotecnologia em benefício para o mundo.

REFERÊNCIAS

ANWAR, S. et al. Insecticidal activity of actinomycetes isolated from salt range, Pakistan against mosquitoes and red flour beetle. Pakistan Journal of Zoology, v. 46, n. 1, 2014.

BAJEROVA, P., ADAM, M., BAJER, T., VENTURA, K. Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. Journal of Separation Science, v. 37, p. 835–844, 19 jan. 2014.

BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. Recent Research in Science and Technology, v. 4, no. 4, p. 31-39, 2012.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. R. F.; MORALES, P.; SOKOVIĆ, M. Antioxidants and Prooxidants: Effects on Health and Aging. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2018, p. 1-7, 2018.

CAMAROTTI, J. R. S. L.; OLIVEIRA, A. P. S.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. Phytoinsecticides for controlling pests and mosquito vectors of diseases. In: Victor Green. (Org.). Biocontrol Agents: Types, Applications and Research Insights. 1ªed. New York: Nova Science Publishers, v. 5, p. 147-188, 2017.

CHU, S.S., LIU, Q.R., LIU, Z.L., 2010. Insecticidal activity and chemical composition of the essential oil of *Artemisia vestita* from China against *Sitophilus zeamais*. Biochem. Syst. Ecol. 38, 489 -492.

EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K.H. SH.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011

FAZOLIN, M. et al. Fumigação de milho para o controle do gorgulho utilizando caule de *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae). Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2010.

PHILLIPS, T. W.; THRONE, J. E. Biorational approaches to managing stored-product insects. Annual review of entomology, v. 55, 2010.

GOZARI, M. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine *Streptomyces* sp. isolated from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, v. 17, n. 2, p. 413-426, 2018.

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

HOPWOOD D.A. (2007) *Streptomyces* in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York, NY.

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

LIU, Z.L., HO, S.H., 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Stored Prod. Res. 35, 317- 328.

LORINI, I. et al. Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento – Série Sementes. Londrina: Embrapa Soja, 2010b. 12 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 73).

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

MUGO, S. et.al. Storage insect pests of maize and methodologies for minimizing postharvest losses, 16e20 January 2012. In: Proceedings of the 2012 Science Week and MAIZE & WHEAT CRP Meetings. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the free stable radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2004: 26 (2): 211-219.

RODRIGUES, J. P.; PROVA, S. S.; MORAES, L. A. B.; IFA, D. R. Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. From caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 410, n. 27, p. 7135-7144, 2018.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Structural and biochemical features of acidic alpha-amylase of *Bacillus acidicola*. *Int J Biol Macromol*, v. 61, p. 416-23, Oct 2013. ISSN 0141-8130.

THOMAS, A., T., et al. In vitro anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. *Braz. J. Pharm. Sci.* vol.47 no.2 São Paulo Apr./June 2011

TOMILOVA, O.G., KRYUKOV, V.Y., DUSEMBEKOV, B.A., YAROSLAVTSEVA, O.N., TYURIN, M.V., KRYUKOVA, N.A., ET AL., 2016. Immune-physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* in Colorado potato beetle larvae. *J. Invert. Pathol.* 140, 8_15.

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

WANG, D. et al. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomyces*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1147, 2017.

WALIA, M.; KUMAR, S; AGNIHOTRI, VIJAI K. UPLC-PDA quantification of chemical constituents of two different varieties (golden and royal) of apple leaves and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96.5: 1440-1450.

5 CONCLUSÃO

A identificação clássica e molecular revelou a actinobactéria como *Streptomyces cinereus*.

As características bioquímicas obtiveram a produção de amilase, caseinase e hemolisina.

Foi obtido o caldo de fermentação para concentração mínima inibitória do extrato bruto de acetato de etila contra as leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*

A concentração fungistática mínima contra *Candida albicans* foi de 78,1µg/mL e *Candida krusei* foi de 156µg/mL identificando a produção de compostos bioativos por *Streptomyces cinereus* com atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduras de interesse clínico.

Cromatografia em camada delgada revelou identificou a presença de metabólitos secundários pertencentes à classe das cumarinas, derivados de antracênicos, xantinas, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides.

A determinação da atividade antioxidante que apresentou varredura de 14,74% na concentração de 10mg/dl de ácido ascórbico. O poder redutor do íon molibdato teve a absorbância na concentração de 10mg/ml de 0,370.

A atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* por fumigação e contato identificou uma potencial atividade inseticida do metabólito.

A *Streptomyces* revelou uma importante produção de metabólitos secundários com atividades biológicas essenciais na natureza.

REFERÊNCIAS

- AÇIKEL, Ü.; ERŞAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Processing*, v. 88, n. 1, p. 31-39, 2010. ISSN 0960-3085.
- ADEGBOYE FM, BABALOLA OO (2012) Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr J Agric Res* 7: 2255–2261
- ADEREM, A. Systems Biology: Its Practice Commentary and Challenges. *Cell*, Vol. 121, 511–513, May 20, 2005, Copyright ©2005 by Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cell.2005.04.020
- ALBERTON, L. R. et al. Avaliação do potencial de uso do extrato bruto da fermentação por *Streptomyces Viridosporus* T7 A em medicinaveterinária. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, v. 9, n. 1, p. 41-47, 2006. ISSN 1415-8167.
- ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, p. 797-814, 2001.
- ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 11, n. 2, 2013. ISSN 1980-4849.
- ANWAR, S. et al. Insecticidal activity of actinomycetes isolated from salt range, Pakistan against mosquitoes and red flour beetle. *Pakistan Journal of Zoology*, v. 46, n. 1, 2014.
- APPELBAUM, P. C., JACOBS, M. R. Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8: 510-517.
- ARASU, M. V. et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces spp.* ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009. ISSN 1156-5233.
- ARAÚJO, F.,R, RAMOS, C.,A.,N., LUÍZ, H.,L., PÉRES, I.,A.,H.,F.,S., OLIVEIRA, R.,H.,M., SOUZA, I.,I.,F., et al. Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total. Campo Grande: Embrapa MS, 2009. Comunicado Técnico 120. 2009. p. 5.
- BALAGURUNATHAN, R.; RADHAKRISHNAN, M.; SOMASUNDARAM, S. L-Glutaminase producing actinomycetes from marine sediments–selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aust J Basic Appl Sci*, v. 4, n. 5, p. 698-705, 2010.
- BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. *Recent Research in Science and Technology*, v. 4, no. 4, p. 31-39, 2012.

BARKA EA, VATSAA P, SANCHEZA L, GAVEAU-VAILLANTA N, JAKARDA C, KLENKB HP et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol R.* 2016; 80 (1): 1-43.

BATISTA, W. B. et al. Avaliação de actinomicetos com potencial para promoção de crescimento em plântulas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) de diferentes cultivares. *Unimontes Científica*, v. 12, n. 1/2, p. pág 60-68, 2011. ISSN 2236-5257.

BAUER, A., W., KIRBY, W., M., SHERRIS, J., C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5325707>

BREED, R. S. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 6ª Edição. Editora: The Williams & Wilkins, 2012.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*, v. 58, n. 1, p. 1-26, Jan 2005. ISSN 0021-8820 (Print)

BUTLER, M. S., BUSS, A. D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 919-929.

CANOVA, S. P. Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais. 2009. Universidade de São Paulo.

CHATER, K. F., & CHANDRA, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS microbiology reviews*, 30(5), 651-672.

CHATER, K. F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Rev*, v. 34, n. 2, p. 171-98, Mar 2010. ISSN 0168-6445.

COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol*, v. 101, n. 21, p. 8308-14, Nov 2010. ISSN 0960-8524.

DAS, RANJITA et al. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC microbiology*, v. 18, no. 1, p. 71, 2018.

EDREVA A, VELIKOVA V, TSONEV T, DAGNON S, GUREL A, AKTAS L, GESHEVA E. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of function and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiology* 34: 67-78, 2008.

EL-KHAWAGH, M.A.; HAMADAH, K.H. SH.; EL-SHEIKH, T.M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, v. 4, no. 1, p. 103-113, 2011

EL-TARABILY, K.A. NASSAR, A.H. HARDY, G.E.ST.J. SIVASITHAMPARAM, K., A.H. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (5). pp. 1765-1766. 2009

- EVANGELISTA-MARTÍNEZ; MORENO-ENRÍQUEZ.; Metabolitos secundários de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Bio Tecnología*, Vol. 11 N°. 3, 2007
- FLÄRDH K, BUTTNER MJ. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in filamentous bacterium. *Nat Rev. Microbiol.* 2009 Jan; 7 (1): 36-49. doi: 10.1038 / micron1968.
- GAO, B.; GUPTA, R. S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobactéria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2401–2412, 2005.
- GLIMN-LACY, J; KAUFMAN, P. B. Botany Illustrated: introduction to plants, major groups, flowering plant families. Nova York: Springer, 2006.
- GOODFELLOW M, FIEDLER H-P (2010) A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98: 119–142
- GOZARI, M. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine Streptomyces sp. isolated from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, v. 17, n. 2, p. 413-426, 2018.
- GROMYKO, O.M. Microbial Culture Collection Of Antibiotic Producers. Streptomyces sp, 2008. Available at: http://lv-microbcollect.lviv.ua/en/strain_card/id/399/
- GUPTA, R. S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 100, n. 2, p. 171-82, Aug 2011. ISSN 0003-6072.
- GUPTE, M. D.; KULKARNI, P. R. A study of antifungal antibiotic production by Streptomyces chattanoogensis MTCC 3423 using full factorial design. *Lett Appl Microbiol*, v. 35, n. 1, p. 22-6, 2002. ISSN 0266-8254 (Print)
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* v.67, p.597- 607, 1975.
- HARBORNE, J. B. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Springer Science & Business Media, 1998. ISBN 0412572702.
- HECK, M. G. Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de Streptomyces sp. linhagem 2S. 2007.
- HOLT, J. et al. Gram-positive cocci. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Ed. Williams e Wilkins, p. 544-51, 1994.
- HOPWOOD D.A. (2007) Streptomyces in Nature and Medicine. The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York, NY.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol (Praha)*, v. 16, n. 3, p. 218-24, 1971. ISSN 0015-5632.

JORK, H. et al. *Thin-Layer Chromatography – Reagents and Detection Methods*. Weinheim: Vch Verlagsgesellschaft MbH, v. 1a, 1990.

KARANJA, E. N. et al. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. In: *Scientific Conference Proceedings*. 2012.

KHANNA, M., SOLANKI, R., LAL, R. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int J Adv Biotechnol Res* 2: 357-375, 2011.

KIM, B. Y.; ZUCCHI, T. D.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.62, pt.2, p.279-283, Feb 2012.

KOMAKI, H., HARAYAMA, S. Sequence Diversity of Type-II Polyketide Synthase Genes in *Streptomyces*. *Actinomycetologica* (2006) 20:42–48. VOL. 20, NO. 2

KUPIECKI, F. P.; COON, M. J. The enzymatic synthesis of beta-aminoisobutyrate, a product of valine metabolism, and of beta-alanine, a product of beta-hydroxypropionate metabolism. *J Biol Chem*, v. 229, n. 2, p. 743-54, Dec 1957. ISSN 0021-9258.

LACAZ, C., S. et al. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier, 2002.

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

MADIGAN, Michael T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, v. 4, p. 240-253, 2011. ISSN 1945-0494.

MAIA, G. S.; ANDRADE, E. H. E. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MATTOSO, E. *Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 2005.

MCCORMICK, JR; FLARDH, K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev* 36 (2012) 206–231.

MILSHTEYN A, SCHNEIDER JS, BRADY SF. Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chem Biol*. 2015; 21: 1211–23.

MIYAUCHI, M. Y. H. Biocontrole de fungos patogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucária angustifolia*. 2012. 106 f. Tese (Doutorado em

Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the free stable radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2004; 26 (2): 211-219.

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

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892, 2006. ISSN 0100-4042.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

OGUNMWONYI, I. N. H. Actinomycetes diversity of Tyume River and Nahoon beach. Honours dissertation submitted to Department of Biochemistry and Microbiology, University of Fort Hare, Alice South Africa, 2008.

OLIVEIRA, B. F. R. D. Análise das atividades antimicrobiana e citotóxica de actinobactérias isoladas de diversos habitats. 2015.

PALLAVI S, MANASA M, YASHODA KAMBAR, ASHA MM, CHAITHRA M, VIVEK MN, SACHIDANANDA SWAMY HC, SUNITA C. MESTA, ONKARAPPA R, PRASHITH KEKUDA N. Anti-Staphylococcus aureus and Anti-yeast species isolated from rhizosphere soil of Sahyadri Science College, Shivamogga, Karnataka. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 03 (24); 2013; 07-11.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*, v. 29 (Pt 2), p. 119-31, Apr 1999. ISSN 0885-4513.

PARK, C. Y., KWAK, M., GUTIERREZ, O., GRAHAM, D. Y. & YAMAOKA, Y. (2003). Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 41, 3336–3338

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – can history repeat. *Biochem Pharmacol*. 2006; 71: 1981-1990

PELCZAR JR, M. J. et al. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Pearson Makron Books, 2005. ISBN 8534604541.

PEREIRA, I. C. Fitoquímica, biometria e germinação de *Aniba fragrans* (macacaporanga) cultivadas no município de Santarém. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia). Universidade Federal do Oeste do Pará e Universidade de Campinas, 2010.

PETROVA, Detelin; VLAHOV, Stoyan. Taxonomic characterization of the thermophilic actinomycete strain 21e – producer of thermostable collagenase. *Journal of Culture Collections*, v. 5, no. 1, p. 3-9, 2007.

PHILLIPS, T. W.; THRONE, J. E. Biorational approaches to managing stored-product insects. Annual review of entomology, v. 55, 2010.

PIMENTEL-ELARDO, S. KOZYTSKA, T.S. BUGNI, C.M. IRELAND, H. MOLL, U. HENTSCHEL Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges Mar Drugs, 8 (2010), pp. 783-968. 373–380.

PLNSN, S. D. et al. Antitumour property l-glutaminase on from *Aspergillus oryzae* through submergrd fermentation. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, v. 3, n. 3, p. 819- 823, 2014.

PRIDHAM, T. G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. Antibiot Annu, p. 947-53, 1956. ISSN 0570-3131 (Print)

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. Analytical Biochemistry. 1999: 269:337-341.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, no. 89, p. 457-473, 2011.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. Chemistry European Journal. Vol. 16, p.3194 – 3200, 2010.

RASHAD, F. M.; FATHY, H. M.; EL-ZAYAT, A. S.; ELGHONAIMY, A. M. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiol. Res., v.175, p.34-47, Jun 2015.

RASHMI, R. et al. Partial purification and biochemical characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* isolated from groundnut seeds. J. Appl. Biosci, v. 9, n. 1, p. 378-384, 2008.

REVILLA, J. Plantas Úteis da Bacia Amazônica. Manaus: SEBRAE–AM/INPA, 2002

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. Fitopatologia Brasileira, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, J. P.; PROVA, S. S.; MORAES, L. A. B.; IFA, D. R. Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. From caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI–MS). Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 410, n. 27, p. 7135-7144, 2018.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., Seas C., GUZMÁN-BLANCO, M., Mejía C., ALVAREZ, C., BAVESTRELLO, L., ZURITA, J., LABARCA, J., LUNA, C. M., SALLES, M. J., GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. Int J Infect Diseases. 2010; 14: e560-e566

- SAISIVAM, S., & KISHAN, V. (2006). Taxonomy, fermentation and biological activities of a new strain of *Streptomyces luridus* from Indian soil. *Indian Journal of Microbiology*, 46(2), 153.
- SANCHEZ, S., DEMAINE, A.L., ALLMAN A.R. 2012 by Taylor & Francis Group, LLC. CRC Press. As a professor of industrial microbiology, Dr. Sanchez published.
- SHAABAN, K. A.; SRINIVASAN, S.; KUMAR, R.; DAMODARAN, C.; ROHR, J. Landomycins P-W, cytotoxic angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. *Journal of Natural Products*, v. 74, no. 1, p. 2–11, 2011.
- SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Structural and biochemical features of acidic alpha-amylase of *Bacillus acidicola*. *Int J Biol Macromol*, v. 61, p. 416-23, Oct 2013. ISSN 0141-8130.
- SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K. Thin-layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. *Journal of Chromatography A*, v. 587, n. 2, p. 351-354, 1991. ISSN 0021-9673.
- SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., RÖMMERT, A. K., & KROHN, K. (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological research*, 106(9), 996-1004.
- SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst*, 1966, Citeseer.
- SHIRLING, E., B., GOTTLIEB D. *International Journal of Systematic Bacteriology. Methods For Characterization of Streptomyces Species*. 1966. Disponível em: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/16/3/ijis-16-3-313.pdf?expires=1526177787&id=id&accname=guest&checksum=9869F4114268B5D9AF4288DD4A9D9A0E>
- SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957. ISSN 0003-6072.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 175: 184-191.
- SIVARAMKRISHNA H, MAHAJAN G (2009). Microbes: An eternal source of innovative drugs. www.exprespharmaonline.com.
- SLONCZEWSKI JL, FOSTER JW. Cultural Bacterial, Growth and Development. In Slonczewski JL, Foster JW (eds.), *Microbiology: An Evolving Science*, W. W. Norton & Company, New York, p. 145, 2009.

SOUZA, G. H. B. D.; MELLO, J. C. P. D.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. Editora UFOP, 2011. ISBN 8528802701.

SOUZA, R., C., Z. Avaliação das frações voláteis de espécies de Aniba por Microextração em Fase Sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME-CG) e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (CG × CG). Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Estadual de Campinas, 2010.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Marine Actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. Microbiological Research. 2012

SULTAN, M.Z et al. In vitro antibacterial activity of na active metabolite isolated from Streptomyces species. Biotechnology, Frankfurt, v.1,2/4, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. Biotechnol Adv, v. 28, n. 5, p. 628-34, Sep-Oct 2010. ISSN 0734-9750.

THADIKAMALA, S.; REDDY, S. Modeling the effect of L-glutamine, aeration and agitation regimes on production of L-glutaminase in stirred tank reactor using Bacillus subtilis RSP-glu. International Journal of Industrial Biotechnology, v. 1, p. 27-33, 2011.

THOMAS, A., T., et al. In vitro anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. Braz. J. Pharm. Sci. vol.47 no.2 São Paulo Apr./June 2011

TOMILOVA, O.G., KRYUKOV, V.Y., DUISEMBEKOV, B.A., YAROSLAVTSEVA, O.N., TYURIN, M.V., KRYUKOVA, N.A., ET AL., 2016. Immune-physiological aspects of synergy between avermectins and the entomopathogenic fungus Metarhizium robertsii in Colorado potato beetle larvae. J. Invert. Pathol. 140, 8_15.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. Artmed, 2012. ISBN 8536326980.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A-D, secondary metabolites from Streptomyces sp. SUC1. Tetrahedron, v. 64, p. 7583-7586, 2008.

VAN WEZEL, Gilles P.; MCDOWALL, Kenneth J. The regulation of the secondary metabolism of Streptomyces: new links and experimental advances. Natural product reports, 2011, 28.7: 1311-1333.

VIIKARI, L.; TENKANEN, M.; SUURNÄKKI, A. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. In: (Ed.). Biotechnology Set: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p.523- 546. ISBN 9783527620999.

VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiology and molecular biology reviews, v. 71, n. 3, p. 495- 548, 2007. ISSN 1092-2172.

VERMA M, LAL D, KAUR J, SAXENA A, KAUR J, ANAND S, LAL R. Phylogenetic analyzes of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. *Res Microbiol* 164: 718-728, 2013.

VERMELHO, A.; BASTOS, M.; BRANQUINHA, M. *Bacteriologia geral*. Rio de Janeiro, 2007.

VIJAYAKUMAR, R.; PANNEERSELVAM, K.; MUTHUKUMAR, C. et al. Optimization of Antimicrobial Production by a Marine Actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 Isolated from Palk Strait, East Coast of India. *Indian J. Microbiol.*, V.52, p.230-239, 2012.

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

WHITMAN, W., GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H.-J., TRUJILLO, M., LUDWIG, W., SUZUKI, K.-I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 5: The Actinobacteria, 2012.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Chromatographic science series, volume 99, 2008

WALL, P. E. *Thin-layer Chromatography*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.

WANG, D. et al. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived *Streptomyces heliomycini*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 1147, 2017.

WEISBURG W., G., BARNS, S., M., PELLETIER, D., A., LANE, D., J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1987160>

YAGUE P, LÓPEZ-GARCIA MT, RIOSERAS B, SÁNCHEZ J, BUTTER A. Pre-sporulation stages of streptomyces differentiation: State-of-the-art and future perspectives. *Fems Microbiol Lett*. 2013; 342 (2): 79-88.

YONEYAMA, H., KATSUMATA R. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006; 70: 1060-1075.

YUAN, D. et al. Screening and characterization of a thermostable lipase from marine *Streptomyces* sp. strain W007. *Biotechnol Appl Biochem*, Dec 30 2014. ISSN 0885- 4513.

ZHANG, G.; CAO, T. YING, Y., MA, L. Diversity and novelty of actinobacteria in Arctic marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 4, p. 743-754, 201, 2014.

ZHONG, L.; XU, L.; MENG, X.; PENG, Y.; CHEN, Y.; SUI, P.; WANG, M.; ZHOU, L. Botrallin from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and its antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 10, no. 79, p. 18174–18178, 2011.

ANEXO A (COMPOSIÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA)

Composição do meio ISP-1.

Componentes*	Concentração (g/L)
Tryptona,	5
Extrato de levedura	3
Ágar	15
*pH 7,0-7,2	

Composição do meio ISP-2.

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

*pH 7,2.

Composição do meio ISP-3.

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

*Solução traço de sais (1 ml/L):

FeSO₄. 7H₂O 0,1g/mL, MnCl₂.

4H₂O 0,1g/mL, ZnSO₄. 7H₂O

0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

Composição do meio ISP-4.

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

Ágar	15g
Solução traço de sais	1mL

*Solução traço de sais (1 ml/L):
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

Composição do meio ISP-5.

Componentes*	Concentração (g/L)
L-asparagina	1
Glicerol	10
K_2HPO_4	1
Ágar	15g
Solução traço de sais	1mL

*Solução traço de sais (1 ml/L):
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

Composição do meio BDA.

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

*pH 6,8.

Composição do meio ALA.

Componentes*	Concentração (g/L)
L-Arginina	0,3
Glicose	1
K_2HPO_4	0,3
Ágar	17
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,3
Extrato de levedura	1
Solução traço de sais	1 mL

*Solução traço de sais (1 ml/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g/mL, Água destilada 100 mL, pH 7,0-7,4.

Composição do meio TSA.

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

*pH 7,3.

Composição do meio AN.

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

*pH 6,9.

Composição do meio SDA

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

*pH 5,6.

Composição do meio M1.

Componentes*	Concentração (g/L)
Glicose	10
Farinha de soja	10
NaCl	5
CaCO_3	1

*pH 7,.

Composição do meio MPE.

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

*pH 6,7 – 7,0.