



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PRISCILLA ANDRADE DE MOURA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA CAATINGA

Recife

2019

PRISCILLA ANDRADE DE MOURA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACTINOBACTÉRIAS
ISOLADAS DA CAATINGA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Moura, Priscilla Andrade

Atividades biológicas de actinobactérias isoladas da Caatinga / Priscilla Andrade Moura– 2019.

94 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Ana Patrícia Silva de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Termita- controle 2. Bactérias 3. Inseticida I. Paiva, Patrícia Maria Guedes (orient.) II. Oliveira, Ana Patrícia Silva de (coorient) III. Título

595.736

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2022-010

PRISCILLA ANDRADE DE MOURA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DA CAATINGA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª.Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva (Orientadora)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Examinador Externo)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-UFRPE

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
(Examinadora Interna)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Dra. Ana Patrícia Silva de Oliveira (Examinadora Externa)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Dedico esse trabalho a duas estrelinhas
que tenho no céu: minha avó Maria, que
sei que ia tá com um orgulho danado de
mim agora, e sempre aplaudiu minhas
conquistas; e minha Malu, que tantas
vezes foi companhia nas noites
sombrias e nas madrugadas de estudo.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo pelo dom da vida e pela oportunidade de recomeçar todos os dias.

A toda minha família, pelo apoio e força de sempre. Principalmente a minha mãe, Geni, que sempre foi e é minha fonte de inspiração. Patrícia, minha irmã, pela companhia e os hambúrgueres compartilhados, quando eu chegava tarde demais do laboratório pra fazer o jantar!!

A minha orientadora, Profa. Patrícia Paiva. Aceitou me orientar mesmo sem me conhecer e sempre foi muito paciente, compreensiva, me passando ânimo e acreditando no meu trabalho quando nem eu acreditava. Muito obrigada e desculpe os aperreios!!

Às minhas co-orientadoras, Thâmarah e Ana Patrícia, sempre solícitas, compreensivas e dispostas a me dar todo o apoio necessário.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Micro-organismos (Labgen) que me receberam sempre com muito carinho e compreenderam minha correria e meus esquecimentos (kkkkkkk). Agradeço as Profas. Glaucia Lima e Janete Magali, pela colaboração no projeto, pela disponibilidade e carinho de sempre, e aos técnicos Allana, Marcela e Fátima (Fafá), sempre muito solícitas. E agradeço especialmente à Suellen, Wanda e Iranildo (o vizinho). Obrigada por tudo, meninos!!

Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Bioproteínas (Bioprot) que, mesmo sem me conhecer, me ajudaram em tudo o que precisei.

Aos membros do Laboratório de Produtos Naturais, onde também fiz alguns experimentos. Muito obrigada pela companhia e pelas tardes de conversas agradáveis. Agradeço principalmente aos técnicos Bruno e Seu João, que sempre me apoiaram quando precisei.

Aos colegas do laboratório que eu escolhi pra chamar de meu, Laboratório de Biologia Molecular. Muito obrigada pelas conversas animadas, pelos lanches, pelas músicas e vídeos compartilhados. E, principalmente, por tornarem esses dias menos pesados!! Amanda, Sivoneide, Bárbara, Rafael, Vitória, Henrique, muito obrigada!!!

Aos amigos que a vida acadêmica me deu e que, perto ou longe, sempre estão torcendo por mim e me mandando boas energias: Hortência, Lívia, Bruno, Mariana, Rafaela...além de Luís e Mayara. Sou eternamente grata a vocês e os levo pra a vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, principalmente a Adenilda. Obrigada por todos os “galhos quebrados” hehehe.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão

da bolsa.

À Universidade Federal de Pernambuco, minha segunda casa durante 6 anos. Que continue sendo um espaço democrático e de resistência!!

Enfim, agradeço a todos e todas que passaram pelo meu caminho nesses 4 anos e os tornaram melhores.

Muito obrigada!

RESUMO

A caatinga possui grande variedade de espécies endêmicas, que apresentam uma rica produção metabólica para adaptação às condições de estresse ambiental características. Por isso, sugere-se que os micro-organismos que habitam esse domínio morfoclimático podem ter adquirido a capacidade de sintetizar metabólitos ricos em atividades biológicas. *Streptomyces* representa o maior gênero dentro do filo Actinobacteria, e diversas aplicações biotecnológicas importantes foram descobertas a partir da produção de metabólitos deste gênero. Considerando estes aspectos, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial termiticida contra *Nasutitermes corniger*, a atividade inseticida contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, bem como a atividade antioxidante de 4 actinobactérias (CA-02, Ca-06, CA-07, CA-17) pertencentes ao gênero *Streptomyces* e gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos – UFPEDA. Para a atividade contra *N. corniger*, foram realizados ensaios termiticidas com os filtrados de cultura obtidos a partir da fermentação das 4 cepas, bem como foi avaliada a ação do filtrado sobre as enzimas digestivas. Também foi feita a análise química dos filtrados de cultura, por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. A amostra CA-06 apresentou a melhor atividade termiticida contra soldados e operários, causando também a inibição de endoglucanase. A prospecção química dos filtrados de cultura atestou a produção de diversos compostos pelas actinobactérias, incluindo flavonoides. Nos resultados de atividade antioxidante, as 4 cepas apresentaram tanto atividade antioxidante total (ATT) quanto a redução dos radicais livres DPPH, ABTS e NO, além de apresentarem compostos fenólicos totais e flavonoides em seus filtrados. Já na atividade inseticida contra os insetos praga *S. zeamais* e *T. castaneum*, foram avaliados o potencial de repelência, fumigação, toxicidade por contato e efeito sobre a taxa instantânea de crescimento do filtrado de cultura obtido a partir da fermentação da cepa CA-02. Os resultados evidenciaram atividade significativa no efeito fumigante e redução na taxa instantânea de crescimento contra *T. castaneum*. Trabalhos que avaliem a atividade de actinobactérias frente a insetos praga, bem como o potencial antioxidante da Caatinga ainda são escassos. Desse modo, se faz necessária a realização de estudos posteriores, para identificar e isolar os compostos com atividade termiticida, antioxidante e inseticida presentes nos filtrados de cultura.

Palavras-chave: *Streptomyces*; termiticida; inseticida

ABSTRACT

The Caatinga has a great variety of endemic species, which present a rich metabolic production to adapt to the characteristic environmental stress conditions. Therefore, it is suggested that the microorganisms that inhabit this morpho-climatic domain may have acquired the ability to synthesize metabolites rich in biological activities. *Streptomyces* represents the largest genus within the phylum Actinobacteria and several important biotechnical applications have been discovered from the production of metabolites of this genus. Considering these aspects, this paper aimed to evaluate the termiticide potential against *Nasutitermes corniger*, the insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*, as well as the antioxidant activity of 4 actinobacteria (CA-02, Ca-06, CA-07, CA- 17) whom belong to the genus *Streptomyces* and were kindly provided by the Collection of Cultures of the Department of Antibiotics – UFPEDA. For the activity against *N. corniger*, termiticidal tests were carried out with the culture filtrates obtained from the fermentation of the 4 strains, as well as its effect on the digestive enzymes. Chemical analysis of the culture filtrates was also performed by thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography. The CA-06 sample presented the best termiticidal activity against soldiers and workers, also causing inhibition of endoglucanase. The chemical prospecting of culture filtrates attested to the production of various compounds by actinobacteria, including flavonoids. In the antioxidant activity results, CA-02, CA-06, CA-07, CA-17 presented both total antioxidant activity (ATT) and reduction of free radicals DPPH, ABTS and NO, as well as total phenolic compounds and flavonoids in its filtrates. In the insecticidal activity against pest insects *S. zeamais* and *T. castaneum*, the potential of repellency, fumigation, contact toxicity and effect on the instantaneous rate of growth of the culture filtrate obtained from the fermentation of the strain CA-02 were evaluated. The results evidenced a significant activity in the fumigant effect against *T. castaneum* and reduction in the instantaneous growth rate for both pest insects, being the best result obtained in the influence of the growth against *T. castaneum*. Studies that evaluate the activity of actinobacteria against pest insects as well as the microbial potential of Caatinga are still scarce. Thus, it is necessary to carry out further studies to identify and isolate compounds with termiticide, antioxidant and insecticide activity present in the culture filtrate.

Keywords: *Streptomyces*; Termiticide; Insecticide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1	Mapa do Bioma Caatinga (IBGE, 2004) indicando a localização dos estados do Brasil e dos demais biomas (Cerrado, Mata Atlântica e Amazonas).	17
Figura 2	Visão da morfologia de uma colônia macroscópica (a) e da microscopia (b) de uma actinobactéria.	20
Figura 3	Representação do desenvolvimento de uma colônia de actinobactéria (<i>Streptomyces coelicolor</i>), desde a germinação até a maturação e dispersão dos esporos	21
Figura 4	Ciclo de vida e distintas castas dos térmitas.	31
Figura 5	<i>Sitophilus zeamais</i> . A: desenvolvimento do inseto dentro do grão de milho; B: <i>S. zeamais</i> adulto.	33
Figura 6	<i>T. castaneum</i> : larva (A e B), pupa (C) e adulto (D).	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1 CAATINGA.....	16
3.2 RIZOZFERA E SUA IMPORTÂNCIA.....	18
3.3 ACTINOBACTÉRIAS: CARACTES GERAIS.....	19
3.4 GÊNERO <i>Streptomyces</i>	23
3.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
3.6 INSETOS PRAGA.....	28
3.6.1 <i>Nasutitermes corniger</i>	30
3.6.2 <i>Sitophilus zeamais</i>	32
3.6.3 <i>Tribolium castaneum</i>	34
3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACTINOBACTÉRIAS.....	36
3.7.1 Atividade Antioxidante.....	35
3.7.2 Atividade Inseticida.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FILTRADO DE CULTURA DE <i>Streptomyces</i> ISOLADOS DA CAATINGA.....	39
5.2 ARTIGO 2 – EFEITO DO FILTRADO DE CULTURA DE <i>Streptomyces</i> spp. ISOLADAS DA CAATINGA SOBRE <i>N. corniger</i>	52

5.3 ARTIGO 3 – CONTROLE DOS INSETOS PRAGA <i>Sitophilus zeamais</i> E <i>Tribolium castaneum</i> POR <i>Streptomyces</i> sp. ISOLADA DA CAATINGA.....	68
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional avança em escala exponencial e, junto a ele, aumenta a demanda por alimentos, o que tem ocasionado o uso exacerbado de inseticidas para proteger as culturas de importância econômica contra os insetos praga e, consequentemente, aumentar a produtividade (ABROL; SHANKAR 2014, FISHEL, 2014). Além disso, o avanço das áreas urbanas causa desequilíbrio no ambiente natural de insetos, levando-os a ocupar as cidades e edificações e, consequentemente, causar danos a elas (LELIS, 2001), o que leva à utilização exacerbada de inseticidas também nos espaços urbanos. A utilização de inseticidas sem um manejo adequado pode resultar em inúmeros problemas que incluem: morte de insetos polinizadores e outras espécies não- alvo, eliminação de inimigos naturais dos insetos-praga (que os controla naturalmente), seleção e multiplicação de indivíduos resistentes, contaminação residual em alimentos, além da poluição do solo e dos mananciais (FISHEL, 2014).

Assim, estudos que envolvam novas fontes de compostos naturais com ação inseticida são importantes, com o objetivo de se manter a produtividade agrícola mitigando os danos à saúde e ao meio ambiente (CAMAROTTI et al, 2017).

As actinobactérias grupo de bactérias gram-positivas com alta quantidade de ligações G+C em seu DNA, têm sido relatadas na literatura como possuidoras de um papel significativo no controle biológico de insetos, através da produção de metabólitos secundários ativos (MARK et al., 2011). *Streptomyces* é o gênero o mais conhecido deste grupo, sendo comumente isolado a partir de solo, sendo abundante principalmente nas regiões de rizosfera (BEHIE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; WANG et al., 2017).

A Caatinga, domínio morfoclimático da região semiárida brasileira, se apresenta como um ecossistema único para micro-organismos que, para se adaptarem às condições adversas que esse ambiente oferece, precisam produzir uma série de metabólitos bioativos que podem ser explorados pela indústria, farmacologia, cosméticos e agricultura (TAN et al., 2017; 2018).

Adicionalmente, a formação de radicais livres é uma consequência natural do metabolismo, porém se não forem neutralizados levam ao estresse oxidativo, que pode favorecer o desenvolvimento de várias doenças, como diabetes, câncer e doenças degenerativas, como Alzheimer e Parkinson (BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018; WU et al., 2013). Com o crescimento no interesse pelos antioxidantes naturais, frente à possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos, (CAROCHO et al., 2018; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015), os micro-organismos e seus metabólitos podem ser fontes de antioxidantes naturais

(THENMOZHI et al., 2010). Desse modo, diversos estudos têm investigado a atividade antioxidante de micro-organismos isolados do solo da Caatinga, principalmente dos pertencentes ao gênero *Streptomyces* (GOZARI et al., 2018; SOWNDHARARAJAN; KANG et al., 2013; SANJIVKUMAR et al., 2019; KARTHIK et al., 2013).

Diante destes aspectos, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida contra *Nasutitermes corniger*, *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, bem como atividade antioxidante de actinobactérias isoladas de solo rizosférico da Caatinga, pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar e avaliar o potencial antioxidante e inseticida de filtrados de cultura obtidos a partir da fermentação de espécies microbianas (actinobactérias) oriundas da Caatinga.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a fermentação das actinobactérias em meios de cultura GYM para obtenção dos filtrados de cultura (CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17). Realizar a prospecção química dos filtrados de cultura obtidos na fermentação das actinobactérias.
- Realizar ensaios antioxidantes *in vitro* com os dos filtrados de cultura.
- Avaliar a atividade termiticida de CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 contra soldados e operários de *Nasutitermes corniger*.
- Determinar o efeito *in vitro* de CA-02, CA-06 e CA-07 sobre as atividades enzimáticas (endoglucanase e exoglucanase).
- Investigar a atividade inseticida de CA-02 contra *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais*.
- Avaliar os efeitos fumigante, repelente e sobre a taxa instantânea de crescimento (r_i) de CA-02 sobre *Tribolium castaneum* e *Sitophilus zeamais*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CAATINGA

A expressão “Bioma Caatinga” é um termo abrangente, usado para caracterizar as diversas fisionomias da região semiárida do Nordeste do Brasil, englobando fauna, flora e geomorfologia. A Caatinga (do tupi, mata branca) ocupa uma área de 844.453 km², que equivale a 11% de todo o território nacional, englobando os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (Figura 1) (HAUFF, 2010; MMA, 2018; SILVA et al., 2018). É o único bioma exclusivamente brasileiro e abriga muitas espécies endêmicas, podendo ser considerado um patrimônio biológico de imensurável valor (DRUMOND, 2013). A temperatura média da região é de 27,5°C, apresentando baixos níveis de umidade; a precipitação média anual nessa região varia entre 240 e 1500 mm, porém metade da sua área não recebe mais que 500 mm e a maioria das chuvas que ocorrem (50-70%) são concentradas em três meses consecutivos. O número de meses secos aumenta da periferia para o centro da região e algumas localidades possuem períodos de 7 a 11 meses de baixa disponibilidade de água (MEDEIROS et al., 2013; MMA, 2018).

Em relação à diversidade, a riqueza e o endemismo de espécies da Caatinga impressionam, ficando sem sombra de dúvida entre as regiões semiáridas mais biodiversas do mundo (GARDA et al., 2018). Estima-se que existam na região da Caatinga mais de 4500 espécies de Angiospermas; 221 espécies de abelhas, 241 de peixes, 177 de répteis, 79 de anfíbios, 591 aves e 178 espécies de mamíferos, todos bem adaptados às altas temperaturas, excesso de radiação, estresse hídrico e escassez de nutrientes característicos da região (GARDA et al., 2018; GIULIETT et al., 2006; MMA, 2018).

Na região semiárida nordestina podem ser encontradas variadas espécies que são descritas pelas comunidades rurais por seu potencial medicinal, sendo indicadas para o tratamento de diversas doenças, pois muitas vezes elas são o único recurso disponível para tratamento na região (MESQUITA et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Adicionalmente, a Caatinga apresenta ecossistemas também únicos para micro-organismos adaptados às condições adversas desse ambiente e, embora a diversidade de espécies seja menor em relação a outros biomas, as condições são favoráveis para as actinobactérias, que se estabelecem principalmente em diferentes tipos de solos

(LECHEVALIER, 1968; LIMA et al., 2017; PRADO et al., 2003; RODRIGUES, et al., 2018). As enzimas e outros metabólitos bioativos produzidos por micro-organismos oriundos deste bioma têm o potencial de possuir propriedades bioquímicas únicas, que podem ser exploradas em muitos segmentos da indústria, farmacologia, cosméticos e agricultura (MELO, 2014; TAN et al., 2017; 2018; TANVIR et al., 2014).

Figura. 1 Mapa do Bioma Caatinga (IBGE, 2004) indicando a localização dos estados do Brasil e dos demais biomas (Cerrado, Mata Atlântica e Amazonas).



Fonte: MMA (2018).

Embora este bioma apresente características únicas e grande diversidade, pouco tem sido feito para a sua proteção e conservação. Apenas 8,4% de seu território é protegido em unidades de conservação federais e estaduais, sendo a maior parte de Área de Proteção Ambiental (APA), que ocupa cerca de apenas 6,5% do mesmo. As terras indígenas, que também auxiliam na conservação da biodiversidade, representam apenas 0,24% de seu território.

Assim, mesmo sendo um dos biomas mais ameaçados e alterados pela ação antrópica, principalmente pelo desmatamento, ainda são escassas as políticas e iniciativas para o estudo e

a conservação da sua biodiversidade (HAUFF, 2010). Vale salientar que a Caatinga faz parte de um ecossistema que se restringe ao Brasil, portanto, grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo, o que reforça a importância do estudo e conservação dessa área (EMBRAPA, 2009; HAUFF, 2010).

3.2 RIZOSFERA E SUA IMPORTÂNCIA

O solo é um habitat que apresenta elevada diversidade de micro-organismos com comunidades altamente complexas, nas quais existem diferentes formas (eucariotos e procariotos), que interagem em um ambiente dinâmico e em estado de equilíbrio. As transformações microbianas, assim como suas diferentes reações químicas, podem ser alteradas mediante a interferência de fatores bióticos e abióticos (PREVIATI et al., 2012; LIMA et al., 2017).

A rizosfera é uma região do solo circundante e influenciada pelas raízes das plantas, possibilitando a proliferação microbiana, sendo considerada como um ecossistema bastante complexo. Os organismos encontrados na rizosfera incluem bactérias, fungos, nematóides, protozoários, algas, vírus e artrópodes. Espécies que compõem a rizosfera são parte de uma rede alimentar complexa que utiliza a grande quantidade de nutrientes liberados pela planta, denominados exsudatos. Esses exsudatos radiculares contêm uma grande quantidade de compostos, como açúcares, ácidos orgânicos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas e outros compostos, e influenciam no crescimento da microbiota adjacente (CAVALCANTI et al., 2017; MARTINS et al., 2014; SUBRAMANI et al., 2016). Em contrapartida, micro-organismos que habitam a rizosfera secretam uma ampla gama de compostos que podem contribuir para a defesa contra bactérias e fungos patogênicos, bem como auxiliar na eliminação de nutrientes da planta (BEHIE et al., 2017; RADHAKRISHNAN et al., 2014; RODRIGUES et al., 2018).

As comunidades microbianas do solo representam o maior reservatório de diversidade biológica conhecido e a rizosfera pode conter até 10¹¹ células microbianas por grama de raiz e mais de 30.000 espécies procarióticas (LIMA, 2017; PRADO et al., 2003; SUBRAMANI et al., 2016;). Ela pode variar em estrutura e composição de espécies em função do tipo de solo, espécie de plantas, estado nutricional, idade, estresse, doenças, dentre outros fatores, sendo capaz de afetar direta e indiretamente a composição e a biomassa de comunidades de plantas em ecossistemas naturais (SILVEIRA; FREITAS, 2007).

O solo rizosférico contém grande quantidade de actinobactérias e a relação entre esses micro-organismos e a espécie vegetal gera efeitos significativos no seu crescimento, pois com a

produção de diversos composto bioativos proporcionam o aumento da disponibilidade de nutrientes, bem como atuam na defesa contra patógenos (BEHIE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018; SILVEIRA; FREITAS, 2007).

3.3 ACTINOBACTÉRIAS: CARACTERES GERAIS

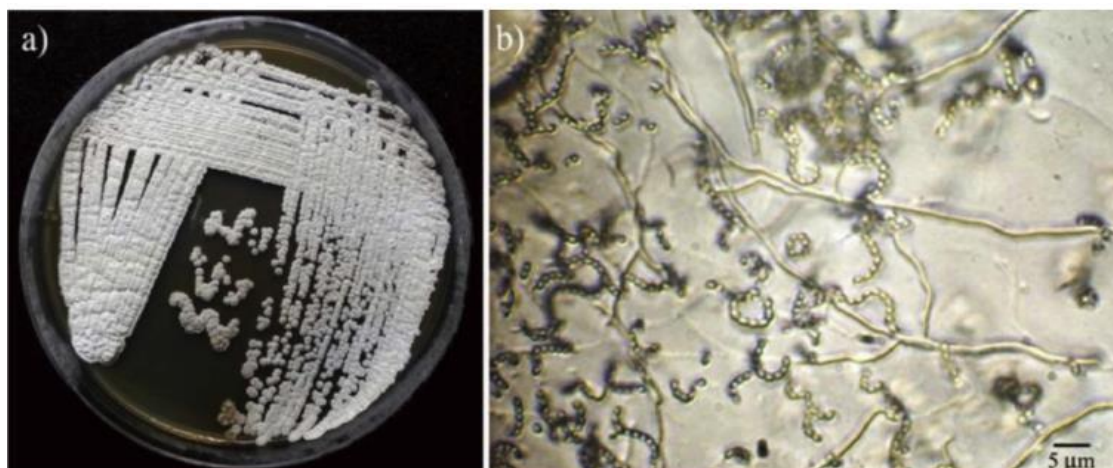
As actinobactérias, também denominadas actinomicetos, representam um grupo de bactérias gram-positivas com alta quantidade de ligações G+C em seu DNA, sendo classificadas no filo Actinobacteria e ordem Actinomycetales, constituindo um dos maiores filamentos entre os grupos de bactérias. Este filo é composto por bactérias filamentosas Gram positivas dividido em 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros, representando o maior grupo conhecido de bactérias (ALVAREZ et al., 2017; SATHYA et al., 2017).

Possuem uma ampla variedade morfológica, apresentando desde formas cocóides até espécies formadoras de hifas, além do amplo espectro fisiológico e metabólico (GAO-Y et al., 2017; PRASHITH KEKUDA et al., 2010; RAO et al., 2013). Podem ser encontradas nos mais diversos ecossistemas, como solo e água do mar, além de pele, trato pulmonar e trato gastrointestinal de humanos (GARG, 2013). Na natureza, a biodegradação realizada pelas actinobactérias é muito importante, sendo parte integrante dos processos de reciclagem de matéria orgânica (ALVAREZ et al., 2017; SHAMA, 2014).

As actinobactérias possuem uma forma de crescimento radial ou semelhante a estrela (do grego actino=raio), que ocorre por conta de seus filamentos ramificados. Em superfície, a morfologia se assemelha a dos fungos filamentosos, porém, seus filamentos têm um diâmetro bem pequeno, quando comparado ao dos fungos (Fig. 2). Apresentam crescimento vegetativo na forma de micélio com hifas ramificadas com 1 µm de diâmetro, geralmente formam colônias pequenas e bem aderidas ao substrato (RAO et al., 2013; TORTORA, 2012).

Algumas actinobactérias se assemelham mais aos fungos por formarem esporos assexuados de disseminação, os quais podem ser encontrados na parte aérea do micélio ou nas hifas encontradas no substrato, ou em ambos locais, sendo eles são carregados externamente e utilizados para a reprodução (ALVAREZ et al., 2017; RAO et al., 2013; TORTORA, 2012).

Figura 2. Visão da morfologia de uma colônia macroscópica (a) e da microscopia (b) de uma actinobactéria.



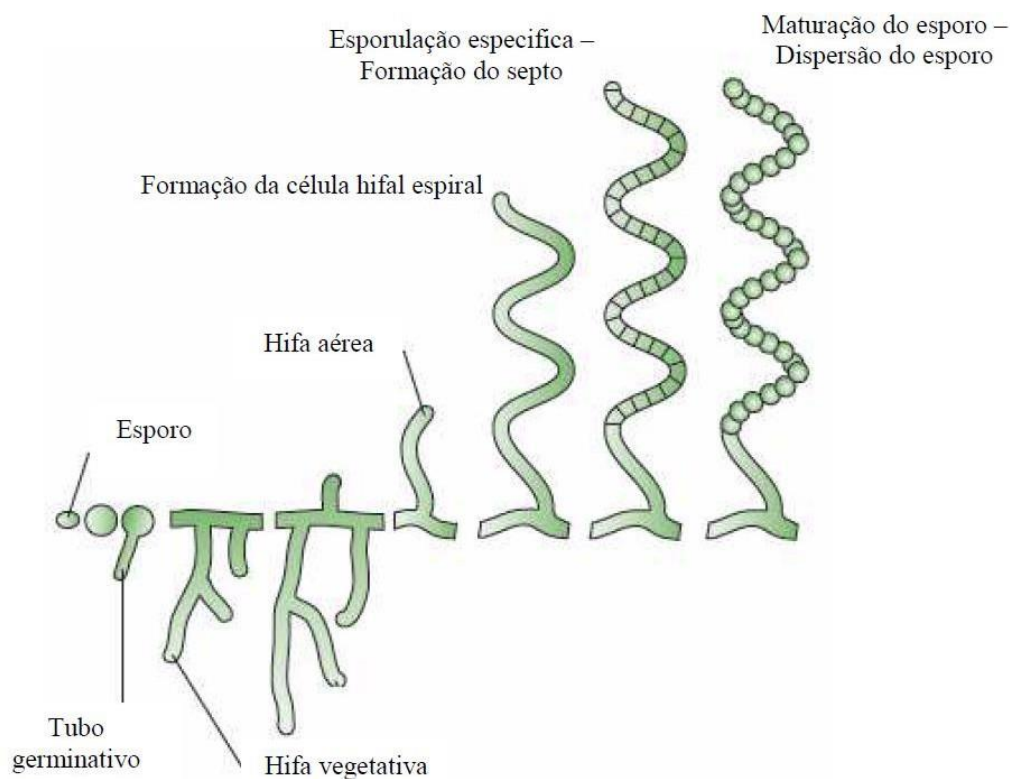
Fonte: Letek et al. (2017).

Os esporos podem também se agrupar em conídios com diferentes formas ou em esporângios, ou ainda apresentar motilidade, como ocorre em algumas. Quando o esporo adquire condições e nutrientes adequados, ele germina e cresce em um ou dois tubos germinativos para se tornarem hifas (Fig. 3). As hifas vegetativas crescem perpendicularmente para formar extensões e ramos também conhecidos como micélios vegetativos, que são evidentes sobre o substrato circundante. Como resultado da escassez de nutrientes e/ou outros fatores, a diferenciação morfológica faz com que as hifas aéreas se abram no ar, então os fragmentos de hifas aéreas começam a se dividir para formar cadeias de compartimentos pré-esporos, que depois se tornam esporos espécies (FLARDH et al.; 2009; RAO et al., 2013; TORTORA, 2012; SHAMA, 2014).

Os esporos contribuem para a preservação das espécies, pois normalmente podem sobreviver em um estado inativo por um longo tempo. Não são resistentes à altas temperaturas, mas resistem à dessecação, ajudando as espécies a sobreviverem em períodos de estiagem (FLARDH et al.; 2009; RODRIGUES et al., 2018).

Embora a maior ocorrência das actinobactérias seja no solo (com destaque para o gênero *Streptomyces*) os gêneros que compõem este grupo possuem ocorrência em diferentes habitats, como no trato gastrointestinal de animais (*Bifidobacterium* spp.), realizando comensalismo com plantas (*Leifsonia* spp.); atuando como fixadores de nitrogênio simbiotes (*Frankia* spp.). Algumas espécies são conhecidas por serem patogênicas contra animais, plantas e humanos, com destaque para *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia asteroides*, *Tropheryma whipplei*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Propionibacterium acnes*, os agentes causadores da tuberculose, hanseníase, nocardiose (infecção pulmonar grave em pacientes imunodeficientes), doença de Whipplei, difteria e acne, respectivamente (LETEK et al., 2017).

Figura 3. Representação do desenvolvimento de uma colônia de actinobactéria (*Streptomyces coelicolor*), desde a germinação até a maturação e dispersão dos esporos.



Fonte: Flardh; Buttner (2009).

A quantidade e as espécies de actinobactérias presentes em um determinado solo são influenciados por fatores físicos, químicos e biológicos do mesmo, como localização geográfica, temperatura do solo, tipo de solo, pH do solo, teor de matéria orgânica, tipo de cultivo, aeração e umidade. As actinobactérias fazem parte de um importante segmento da microbiota da maioria dos ambientes naturais, podendo ser encontradas abundantemente no solo, reservatórios de água doce, esterco, etc. Elas são de ocorrência universal na natureza, vivendo e multiplicando-se tanto em zonas frias como tropicais, e existem relatos de sua ocorrência mesmo sob as condições mais extremas do deserto (AMSAVENI, et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2017; LIMA et al., 2017; PRASHD KEKUDA et al., 2010; PREVIATI et al., 2012)

O filo Actinobactéria se caracteriza pela heterogeneidade funcional e potencial biotecnológico das espécies que fazem parte dele (MANIMARAN et al., 2017). Em 1943, o primeiro produto terapêutico produzido a partir de actinobactérias, a estreptomicina, foi descoberta por Albert Schatz, Elizabeth Bugie e Selman Waksman e rapidamente foi disponibilizada para tratar a tuberculose (SCHATZ et al., 1944).

Atualmente, estudos demonstram que metabólitos secundários oriundos destes micro-organismos apresentam importantes atividades biológicas principalmente relacionadas a efeitos benéficos à saúde humana, o que têm chamado bastante atenção da comunidade científica (LIA et al., 2017). Além disso, a ampla diversidade metabólica tem elevado a importância das actinobactérias como um grupo predominante na microbiota do solo e, portanto, grande colaborador no seu equilíbrio biológico (ALVAREZ et al., 2017; BHATTI et al., 2017).

A biossíntese de metabólitos secundários a partir de actinobactérias, com o auxílio da engenharia genética e da biotecnologia industrial, oferece uma vantagem significativa sobre os métodos convencionais de produção, pois produtos originados a partir de fontes microbianas podem ser obtidos em curto prazo e em qualquer época do ano, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo; podem ser produzidos em larga escala, necessitando de espaços relativamente pequenos; além da possibilidade de controle das condições de cultivo e da utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução (JANARDHAN et al., 2014; LIA et al., 2017).

As actinobactérias são os procariontes de maior valor econômico e biotecnológico, sendo responsáveis pela produção de cerca de metade dos metabólitos secundários já descritos. Contribuem com cerca 70% dos antibióticos disponíveis e vários outros metabólitos bioativos não-antibióticos tais como enzimas e inibidores enzimáticos (BEHIE et al., 2017; PRASHITH KEKUDA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2018; SER et al., 2015; SUNDARAMOORTHY et al., 2011). São as responsáveis pela produção de aproximadamente 10.000 compostos de importância clínica já descritos, sendo consideradas as principais fontes de antibióticos, dos quais cerca de 40% dos utilizados atualmente no mercado são delas derivados. Além disso, 35% dos antibióticos em uso clínico são derivados diretamente de produtos naturais oriundos das actinobactérias ou de seus derivados semissintéticos (ATTIMARAD et al., 2012; GAO-YI et al., 2017; SER et al., 2015; WEBER et al., 2015).

A abordagem tradicional para a descoberta de moléculas a partir de fontes microbianas, como as actinobactérias, geralmente envolveu o cultivo de micro-organismos sob diferentes condições de crescimento, a extração dos metabólitos e a análise dos extratos obtidos para a bioatividade (BAONE et al., 2018; HASSAN et al., 2017; RAMBABU et al., 2015).

Inúmeros compostos bioativos de actinobactérias têm sido isolados e caracterizados, incluindo aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, beta-lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, políenós, poliéster, policetídeos, actomicinas e tetraciclinas. (ALVAREZ et al., 2017; JANARDHAN et al., 2014; RAMBABU et al., 2015; PRASHITH KEKUDA et al., 2010; SUBRAMANI; AALBERSBERG, 2012). A maior parte desses

compostos são metabólitos secundários extracelulares, obtidos a partir de processos fermentativos, e apresentam um amplo espectro de atividades biológicas que trazem inúmeros benefícios à saúde humana e ao meio ambiente, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antioxidante, antitumoral, imunossupressora, anti-inflamatória, inibidora enzimática, dentre outras (BAONE et al., 2018; JANARDHAN et al., 2014; KARTHIK et al., 2013; MANIVASAGAN et al., 2014; PRASHITH KEKUDA et al., 2010).

Muitos antibióticos conhecidos, como a tetraciclina, a eritromicina, a vancomicina e a estreptomicina originam-se do metabolismo secundário das actinobactérias. Além dos antibióticos, outros produtos naturais úteis já estão descritos na literatura como isolados desse grupo de bactérias, incluindo o imunossupressor rapamicina, os agentes anticâncer doxorubicina e bleomicina, além do composto antifúngico nistatina (BAONE et al., 2018).

Actinobactérias têm sido citadas também como importantes produtoras de enzimas de interesse industrial, dentre elas: lignase, ribonuclease, celulase, quitinase, xilanase, amilase, lipases, collagenases, proteases, lignases, dentre outras (PRASHITH KEKUDA et al., 2010; SUBRAMANI, AALBERSBERG, 2012). Também tem sido relatado o potencial antioxidante destes micro-organismos (DONG-RYUNG et al., 2014; JANARDHAN et al., 2014; SOWNDHARARAJAN; KANG, 2013).

Por conta do potencial já descrito das actinobactérias, grandes esforços têm sido feitos para o isolamento de novas cepas de fontes terrestres em programas de seleção de novas drogas (ATTIMARAD et al., 2012; JANARDHAN et al., 2014). Recentemente, a taxa de descoberta de novos compostos oriundos de isolados terrestres tem caído, enquanto que a taxa de reisolamento de compostos conhecidos tem crescido. Desse modo, é interessante que novos grupos de actinomicetos de ambientes explorados ou inexplorados sejam pesquisados como fontes de novos metabólitos secundários bioativos (ATTIMARAD et al., 2012; HASSAN et al., 2017).

3.4 GÊNERO *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* foi proposto por Waksman & Henrici em 1943, pertencendo à ordem Actinomycetales e à classe Schizomycetes, e compreende cerca de 600 espécies registradas (RODRIGUES et al., 2018; SHAMA et al., 2014; SER et al., 2015).

Em relação às características morfofisiológicas, *Streptomyces* é caracterizado por colônias filamentosas, que crescem pela extensão da ponta de uma hifa para formar um micélio de hifas ramificadas. Além disso, exibe crescimento polarizado, que pode ocorrer em vários

locais ao longo do micélio. Os esporos reprodutivos assexuados deste gênero são formados na ponta dos filamentos aéreos, onde cada esporo vai procurar um substrato adequado, sendo capaz de germinar e produzir uma nova colônia. São micro-organismos estritamente aeróbicos e não fastidiosos, sendo capazes de produzir enzimas extracelulares que permitem a eles a utilização de proteínas, polissacarídeos e muitos outros materiais orgânicos encontrados no solo. A maioria das suas espécies é mesofílica, porém algumas cepas se mostram termofílicas, como a *S. thermophilus*, com temperatura ótima acima de 50 °C, sendo algumas delas responsáveis pela produção do antibiótico termomicina. Já *Streptomyces casei*, comumente isolado de queijo pasteurizado, resiste a altas temperaturas, sendo 100 °C o seu ponto de morte térmica (FLARDH; BUTTNER, 2009; SHAMA et al., 2014; VIJAYABHARATHI et al., 2014).

Streptomyces é o gênero o mais conhecido das actinobactérias e representa cerca de 95% dos exemplares deste grupo que são isolados a partir de solo. É abundante principalmente nas regiões de rizosfera, onde estimula a produção de fitohormônios pela planta, participa dos ciclos biogeoquímicos e contribui para fertilidade do solo através da remoção de toxinas (BEHIE et al., 2017; WANG et al., 2017). Os *Streptomyces* caracteristicamente produzem um composto gasoso chamado geosmina (sesqui- terpenoide), que confere ao solo úmido o odor típico de mofo (SHAMA, 2014; TORTORA, 2012).

Segundo Manivasagan et al. (2014) *Streptomyces* são responsáveis pela produção de 70-80% dos metabólitos secundários relevantes e que apresentam uma ampla gama de atividades, tais como antibacteriana, antifúngica, anticâncer, antitumoral, citotóxica, citostática, antiinflamatória, antiparasitária, antimalária, antiviral, antioxidante, dentre outras. Diversos compostos terapêuticos foram isolados a partir dos metabólitos secundários deste gênero, incluindo tetraciclina (antibiótico), anfotericina (antifúngico), hugromicina (antiparasitário), drogas antitumorais (como adriamicina, daunorubina e mitomicina C) e imunossupressoras (tacrolimus) (JANARDHAN et al., 2014; SER et al., 2015; SHAMA et al., 2004; SUBRAMANI, AALBERSBERG, 2012; THENMOZHI et al., 2013).

Dos antibióticos produzidos por actinobactérias, estima-se que mais de 60% foram isolados a partir do cultivo de cepas pertencentes ao gênero *Streptomyces* (SER et al., 2015; BAONE et al., 2018). À exemplo, as actinomicinas são uma classe de antibióticos cromopeptídicos produzidos por *Streptomyces* sp., das quais a Actinomicina D (Act-D) é o tipo mais estudado, sendo amplamente usado como um medicamento antitumoral para o tratamento de rabdomiossarcoma infantil e tumor de Wilms, além de exibir atividade antiviral contra o vírus coxsackievírus B3 e o vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (WANG et al., 2017).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (EROs/ERNs), também conhecidas como radicais livres ou oxidantes, são átomos ou moléculas produzidas durante os processos metabólicos que possuem um elétron desemparelhado na última camada, ocupando um único orbital atômico ou molecular (ALVES et al., 2007; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA et al., 2018).

A formação de radicais livres é uma consequência natural do metabolismo aeróbico, tendo importante função para o metabolismo celular na transferência de elétrons em várias reações químicas, participando da manutenção da homeostase nos tecidos e sendo essencial para a produção de energia destinada as atividades biológicas (BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018; SEIFRIED et al., 2007). São produzidos em organelas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro (mitocôndria, peroxissomos), atuando também na sinalização intercelular, em processos inflamatórios, na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na produção de substâncias biológicas importantes.

Os radicais livres são compostos reativos que tendem a capturar elétrons de moléculas biológicas estáveis (lipídeos, DNA, proteínas) para se estabilizarem, o que torna essas moléculas biológicas instáveis (CAROCHO et al., 2018).

Se não forem neutralizados, os radicais livres levam ao estresse oxidativo, resultando no desenvolvimento de muitos tipos de doenças, tais como Alzheimer, Parkinson, diabetes, artrite reumatóide, esclerose múltipla, esclerose amiotrófica lateral, talassemia, infertilidade, anormalidades na produção de melanina, catarata, câncer, além de problemas respiratórios e cardiovasculares, como hipertensão, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018; WU et al., 2013).

Os efeitos do estresse oxidativo variam entre os indivíduos de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta. Hábitos de vida inapropriados, como ingestão de álcool, tabagismo e dieta inadequada, condições ambientais impróprias como a exposição à radiação não ionizante UV e poluição, estresse emocional, envelhecimento e prática extrema de exercícios físicos (WU et al., 2013).

Um antioxidante pode ser definido, segundo Halliwell (1990) como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, inibem ou retardam significativamente ou evitam a oxidação desse substrato.

Para combater o estresse oxidativo, o corpo humano possui um conjunto de mecanismos antioxidantes endógenos definidos em três linhas de ação: uma linha preventiva, que é a

primeira linha de defesa na prevenção de reações que levam à formação de espécies reativas; uma linha de reparação, na qual essas moléculas interrompem as reações de oxidação do radical; e uma terceira linha, com a participação de inativadores dos produtos de reações de radicais livres pela reparação ou eliminação do dano (BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018; WU et al., 2013).

A atividade antioxidante pode ser realizada pelos compostos que possuem esse potencial através de reações de oxidação de radicais livres (prevenção de oxidantes), inibição da formação de radicais livres lipídicos, pela interrupção da propagação das reações de autooxidação em cadeia, através do sinergismo com outros antioxidantes, com a ação de antioxidantes como agentes redutores, que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis, através da ação de antioxidantes como quelantes de metais que convertem pró-oxidantes (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis, ou ação como inibidores de enzimas pro-oxidativas, como as lipooxigenases (CAROCHO et al., 2018; EMBUSCADO, 2015).

Os antioxidantes são compostos que inibem ou retardam o início da oxidação e podem ser classificados como sintéticos ou naturais (endógenos). Dentre os sintéticos, então as substâncias comumente utilizadas na indústria alimentícia para prevenir a deterioração oxidativa nos alimentos, destacando-se o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e tercbutilhidroquinona (TBHQ). Já os sistemas antioxidantes naturais são divididos em antioxidante enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos (CAROCHO; 2018; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Os compostos antioxidantes enzimáticos, por sua vez, podem ser divididos em defesa enzimática primária e secundária (CAROCHO et al., 2013). A defesa enzimática primária é composta por três enzimas importantes, que agem impedindo a formação ou neutralizando os radicais livres: glutathione peroxidase, que doa dois elétrons para reduzir os peróxidos e elimina também os peróxidos como substrato potencial para a reação de Fenton; catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular e tem uma das maiores taxas de turnover conhecida, uma vez que apenas uma molécula de catalase é necessária para converter 6 bilhões de moléculas de peróxido de hidrogênio; e a superóxido dismutase, que converte superóxido em peróxido de hidrogênio, como um substrato para catalase. Já a defesa enzimática secundária inclui: glutathione reductase, que reduz a glutatona (antioxidante) a partir da sua forma oxidada, reciclando-a para continuar a neutralizar os radicais livres; e a glicose-6-fosfato desidrogenase, que regenera o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato -coenzima utilizada em reações anabólicas), criando um ambiente redutor. Já os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione

(GSH), carotenoides, flavonoides, compostos nitrogenados (como o ácido úrico), dentre outros (CAROCHO et al., 2013; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013; OROIAN; ESCRICHE, 2015; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Dentre os antioxidantes naturais não enzimáticos estão α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona (GSH), os carotenoides (carotenos e xantofilas) os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos), dentre outros (EMBUSCADO, 2015; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013; OROIAN; ESCRICHE, 2015). Os compostos fenólicos por exemplo, interferem no processo de oxidação como terminadores de radicais livres e às vezes também como quelantes de metais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015)

Embora extremamente importantes para impedirem o estresse oxidativo, os antioxidantes endógenos humanos não são capazes de eliminar totalmente os radicais livres produzidos, sendo necessária a busca por fontes exógenas dos compostos com essa capacidade, principalmente a partir do consumo de antioxidantes nos alimentos (CAROCHO et al., 2018).

Atualmente, há um crescimento no interesse pelos antioxidantes naturais, principalmente por conta da preocupação em relação à possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos, além do aumento da preferência dos consumidores por produtos naturais ou por produtos que contenham menos aditivos sintéticos (CAROCHO et al., 2018; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015)

Existem vários métodos para mensurar a atividade antioxidante de uma determinada substância. As mais utilizadas avaliam a capacidade dos antioxidantes à partir da oxidação em um sistema modelo, monitorando as mudanças associadas utilizando meios físicos, químicos ou instrumentais. Os ensaios de eliminação radicais incluem métodos baseados em mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) ou de transferência de elétron único (SET). A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e a atividade antioxidante de captura total dos radicais (TRAP) são os principais métodos que medem o HAT; enquanto a capacidade antioxidante equivalente de trolox (TEAC), o poder antioxidante de redução do íon ferro (FRAP) e os ensaios de 2,2-difenil-1-picilidrazilo (DPPH) representam métodos baseados em SET. Os métodos baseados em HAT medem a capacidade clássica de um antioxidante para eliminar os radicais livres por doação de hidrogênio, enquanto os métodos baseados em SET detectam a capacidade de um determinado antioxidante para transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilas e radicais livres (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A maior parte dos antioxidantes exógenos são obtidos a partir das plantas, das quais diversos produtos fitoquímicos apresentam potencial antioxidante (SILVA et al., 2011). Compostos fenólicos presentes nos alimentos são comumente originados de plantas, das quais eles são umas das principais classes de metabólitos secundários. Em baixas concentrações, os compostos fenólicos atuam como um antioxidante e protetor de alimentos contra atividade oxidativa.

Além das plantas, os micro-organismos também podem ser fontes de antioxidantes naturais (THENMOZHI et al., 2010). Embora as plantas sejam a fonte primária dos compostos fenólicos, eles também são produzidos como metabólitos secundários de diversos micro-organismos, inclusive basidiomicetos, leveduras, algas verdes, bactérias endofíticas. A produção de compostos com ação antioxidante por micro-organismos apresenta algumas vantagens significativas em relação aos processos de síntese química, extração de plantas ou cultura de células vegetais, devido à rápida taxa de crescimento microbiano, pela facilidade de utilização e processamento em larga escala, além do alto custo-benefício e os benefícios meio ambiente. São três importantes compostos fenólicos de ocorrência natural com propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, antivirais, antimutagênicas e antiparasitárias. Vários micro-organismos foram explorados para a produção ácido gálico (GA), ácido elágico (EA) e ácido ferúlico (FA) (DEYA et al., 2016).

3.6 INSETOS PRAGA

Insetos praga são definidos como aqueles que causam danos econômicos às áreas agrícolas, florestais, agropecuárias e urbanas. Para que uma espécie seja definida como praga, deve-se levar em consideração alguns fatores como: a susceptibilidade da espécie ou do material vegetal armazenado, as condições ambientais do local, bem como a forma como o material vegetal é estocado (armazéns ou silos) (GALLO et al., 2002; GETU, 2018; CAMAROTTI et al, 2017).

De acordo com seus hábitos alimentares, os insetos são classificados como praga primária (aqueles que atacam grão íntegro e sadio), como os gêneros *Callosobruchus*, *Sitophilus*, *Rhyzopertha*; ou praga secundária (quando o inseto ataca o grão já quebrado e danificado), que inclui os gêneros *Oryzaephilus*, *Cryptolestes*, *Cadra* e *Tribolium* (GALLO et al., 2002; GETU, 2018; CAMAROTTI et al, 2017). Vários danos econômicos são gerados pelas perdas na produção agrícola decorrente de pragas (SALVADORI, et al., 2014; GETU, 2018).

Para evitar ataque de pragas ao material vegetal armazenado, é necessário tomar várias

medidas integradas que garantam a qualidade e segurança do mesmo, tais como limpeza e secagem dos grãos, manutenção da aeração, regulação da temperatura, além da aplicação de inseticidas (LOECK, 2002; VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Os inseticidas destinados a eliminar as pragas podem ser classificados em organossintéticos, inorgânicos e bioinseticidas (SANTOS, 2014). A utilização de produtos químicos orgânicos em larga escala para combate às pragas que infestam a produção agrícola ocorreu após as descobertas das propriedades inseticidas do organoclorado DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), em 1939, sendo o seu uso difundido no processo de expansão industrial após a II Guerra Mundial (NAKAMURA, 2014).

Os inseticidas aplicados para o combate de pragas agrícolas podem ser: de contato, que agem por serem absorvidos pela pele (tegumento) do inseto; inseticidas de ingestão, que penetram no inseto por via oral e são usados no controle dos mastigadores; inseticidas voláteis, que possuem ação por fumigação pelas vias respiratórias do inseto; inseticida de profundidade, que são os inseticidas com ação translaminar; e os de ação sistêmica, que são absorvidos e translocados para torná-la tóxica para os insetos (LAZZARI, et al. 2006; MENEZES, 2005; SANTOS et al., 2014).

O crescimento populacional avança em escala exponencial e, junto a ele, aumenta a demanda por alimentos, o que tem ocasionado o uso exacerbado de inseticidas para proteger as culturas de importância econômica e, conseqüentemente, aumentar a produtividade. Contudo, essa prática, junto à falta de um planejamento adequado para aplicação dos inseticidas, tem resultado em diversos problemas que incluem: morte de insetos polinizadores e outras espécies não-alvo, eliminação de inimigos naturais dos insetos-praga (que os controla naturalmente), seleção e multiplicação de indivíduos resistentes, contaminação residual em alimentos e diferentes formas de poluição ambiental (ABROL; SHANKAR 2014, FISHEL, 2014).

Diante deste panorama, estudos envolvendo a produção de inseticidas biológicos têm sido desenvolvidos, considerando a necessidade de se obter novos compostos para controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas que não resultem em contaminação ambiental, depósito de resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre populações de insetos benéficos, como os polinizadores (HATTING et al., 2018; CAMAROTTI et al, 2018).

Como a aplicação de inseticidas químicos em culturas para controle de insetos nocivos tornou-se perigosa para o meio ambiente e para a saúde humana, muitos esforços têm sido orientados para alterar seu uso para métodos de controle alternativos mais ecológicos e seguros.

3.6.1 *Nasutitermes corniger*

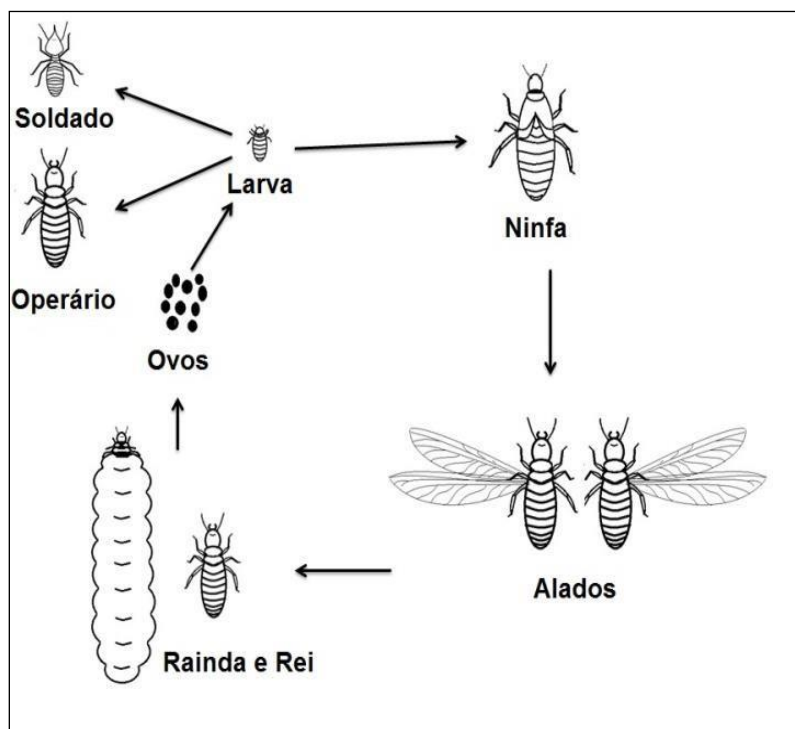
Cupins ou térmitas pertencem à ordem Isoptera e constituem um grupo de insetos eusociais que vivem em colônias e, em sua maioria, em ambientes naturais atuando como decompositores de matéria orgânica (CONSTANTINO; SCHLEMMERMEYER, 2000). A região neotropical é a terceira em número de espécies conhecidas de cupins, ficando atrás das regiões Etiópica e Oriental, onde há, atualmente, aproximadamente 600 espécies descritas, distribuídas em 7 famílias: famílias: Mastotermitinae, Kalotermitidae, Termopsidae, Hodotermitidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae e Termitidae, das quais a Termitidae é a mais abundante, com cerca de 2165 espécies descritas (CONSTANTINO, 2016; KRISHNA; WEESNER, 1969).

Em um ninho de cupim são encontradas três castas morfológicamente distintas e com funções específicas dentro da colônia: os operários, que formam a casta mais numerosa e são responsáveis pela obtenção de alimento, construção e reparação do ninho e túneis e cuidados com a prole; os soldados que são os responsáveis pela guarda do ninho e proteção dos operários durante a busca por alimento; e os reprodutores alados, que geram novos indivíduos e são, por isso, responsáveis pela multiplicação das colônias (KRISHNA; WEESNER, 1969; SANTOS et al., 2007).

Em relação à reprodução, os cupins são diploides e ambos os sexos estão presentes no sistema de casta. Apresentam três fases de desenvolvimento: o ovo, a ninfa e o estágio adulto (reprodutor ou estéril) (Fig. 4). As formas reprodutivas apresentam asas bem desenvolvidas e fazem a dispersão através de voos nupciais. Após o voo, um casal perde suas asas e passam a ser rei e rainha, os quais são pigmentados e são responsáveis pela produção de ovos. Em muitas colônias, só existe um casal de reprodutores (KRISHNA; WEESNER, 1969; MYLES, 2005).

O alimento básico dos cupins é a celulose, mas cada espécie tem a sua preferência em relação à fonte de celulose utilizada. A maioria das espécies alimenta-se de madeira (nos mais variados estágios de decomposição). Algumas espécies se alimentam de húmus, líquens, fezes de herbívoros, ou fungos cultivados no interior dos ninhos (SÁ et al, 2008; VASCONCELLOS et al., 2005).

Figura 4. Ciclo de vida e distintas castas dos térmitas.



Fonte: Lima et al. (2016).

Os cupins têm grande importância ambiental, desempenhando um papel fundamental no ciclo do carbono na natureza., sendo considerados grandes decompositores. Além disso, melhoram a qualidade do solo ingerindo e transportando partículas orgânicas e minerais, são fixadores de nitrogênio e podem funcionar como bioindicadores de qualidade ambiental e fertilidade do solo (HIGASHI; ABE, 1997). Porém, a invasão feita pelo homem do *habitat* natural levou à destruição da flora, o que provocou nos cupins situados nesses ambientes uma mudança de comportamento, passando então a forragear nas edificações (LELIS, 2001). Apesar de serem poucas as espécies de cupins consideradas pragas de áreas urbanas, estas provocam enormes prejuízos (FONTES; ARAÚJO, 1999).

Dentro da família Termitidae, *Nasutitermes* é o gênero mais amplamente distribuído, abrangendo todas as regiões tropicais. É também o gênero que apresenta maior riqueza de espécies, das quais 74 foram descritas somente na região Neotropical. (SÁ et al, 2008; CONSTANTINO, 2016). No Brasil, o gênero *Nasutitermes* está representado por aproximadamente 47 espécies que se distribuem em ambientes de Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (ZORZENON; POTENZA, 1998). *Nasutitermes* constroem ninhos cartonados acima da superfície do solo e geralmente ao redor de galhos ou forquilha de troncos de árvores (THORNE; HAVERTY, 2000).

Nasutitermes corniger (Isoptera, Termitidae) é uma espécie de cupins arborícolas e caracterizados pelo seu comportamento social, que é um mecanismo central na regulação das interações entre os indivíduos (WILSON, 1971). É o responsável pelos maiores danos causados em madeira do ponto de vista econômico. Em áreas urbanas, construções civis como monumentos históricos são ameaçados pela ação dos cupins que, devido à capacidade que eles têm de digerir qualquer material de origem celulósica, representam o principal perigo à integridade das construções (FONTES; ARAÚJO, 1999).

O método mais utilizado para se combater os cupins envolve o uso de produtos químicos sintéticos, principalmente organofosforados e piretróides, que são bastante prejudiciais para a saúde humana e para o meio ambiente. Por esta razão, tem crescido o interesse pelo uso de compostos de origem natural para o combate desses insetos (SANTANA et al., 2010).

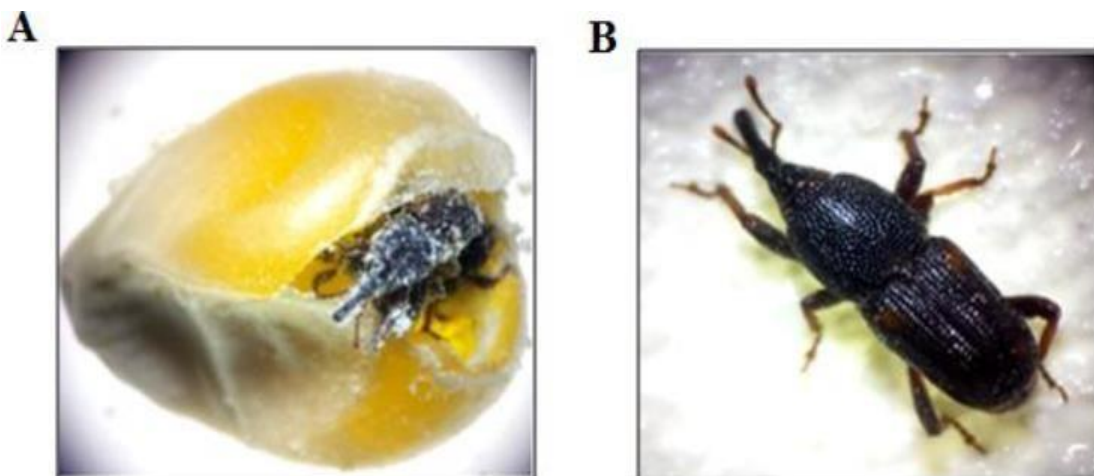
3.6.2 *Sitophilus zeamais*

O *Sitophilus zeamais*, conhecido popularmente como o gorgulho do milho, pertence à Família Curculionidae (Ordem Coleoptera), sendo insetos cosmopolitas de regiões tropicais e subtropicais. As condições favoráveis de temperatura e umidade relativa nessas regiões contribuem para o desenvolvimento de grandes populações (ACHEAMPONG et al, 2019; LORINI et al., 2015; FAZOLIN et al., 2010).

Os adultos de *S. zeamais* possuem de 3 a 4 mm de comprimento, coloração castanho-escuro, com quatro estrias avermelhadas nos élitros (asas anteriores) (Fig. 5) e cabeça prolongada para frente na forma de rostro curvado. Os machos apresentam rostro curto e grosso, enquanto as fêmeas apresentam rostro mais longo e afilado (GALLO et al., 2002; LOECK, 2002; LORINI et al., 2015).

O ciclo de vida do gorgulho do milho apresenta variações dependentes das condições ambientais e da qualidade do grão que vai lhe servir de alimento, apresentando alta taxa de reprodução. As fêmeas vivem em média 140 dias, dos quais 104 correspondem ao período de postura dos ovos, que ela deposita dentro dos grãos (média de 280 unidades por postura). Após 4 dias de postura dos ovos, as larvas se desenvolvem e se alimentam do endosperma da semente, passando então pelo estágio de formação de pupa, até o desenvolvimento e emergência dos novos insetos adultos, tendo esse ciclo uma duração média de 34 dias. As larvas de *S. zeamais* apresentam coloração amarelo-clara, com cabeça marrom-escura, enquanto as pupas são brancas (BOTTON et al., 2005; LOECK, 2002; LORINI et al., 2015).

Figura 5. *Sitophilus zeamais*. A: desenvolvimento do inseto dentro do grão de milho; B: *S. zeamais* adulto.



Fonte: Oliveira et al. (2016)

S. zeamais é a principal praga do armazenamento de grãos de milho, sendo classificada como praga primária interna. Contudo, este inseto praga também é capaz de danificar outros tipos de grãos, como arroz, trigo, milho, aveia, cevada e sorgo, além de produtos beneficiados (macarrão, biscoitos) e frutas, sendo por isso considerado uma praga polífaga. O gorgulho do milho apresenta infestação cruzada, ou seja, podem infestar sementes no campo e também no armazenamento (BOTTON, 2005; FAZOLIN et al., 2010).

Os danos causados por estes insetos em grãos armazenados são irreversíveis e, na maioria dos casos, podem chegar a 30%, provocando perdas quantitativas, como a perda de peso dos grãos, e qualitativas, através da desvalorização comercial dos grãos, da perda no valor nutritivo e na diminuição do poder germinativo das sementes (NORNBERG et al., 2013; PEREZ-MENDONZA, 1999).

Assim como outros insetos praga de grãos e produtos agrícolas, o *S. zeamais* causa grande preocupação, pois a deterioração, degradação e contaminação de grãos durante o armazenamento conduzem a perdas econômicas que chegam à escala de bilhões de dólares, além de afetar a segurança alimentar. Além disso, as perdas de grãos têm um grande impacto ecológico, já que energia, terra, água e recursos não renováveis foram utilizados para a produção de grãos que nunca será consumido (MUGO, 2012).

Atualmente, as estratégias de controle para *S. zeamais* se baseiam principalmente no uso de inseticidas convencionais, como piretróides, organofosfatos e fosfina, sendo fumigação o método mais usado (PEREZ-MENDONZA, 1999; VINHA et al., 2011). Porém, o uso indiscriminado de agentes químicos para combater insetos encontrados em grãos armazenados causa alguns prejuízos, como a morte de inimigos naturais e o efeito residual nos alimentos,

tornando-se uma ameaça à saúde humana por apresentarem, dentro outros malefícios, propriedades carcinogênicas. Desse modo, têm crescido a busca de novos compostos para uso no manejo e controle de pragas de grãos, principalmente aqueles oriundos de fontes naturais, pois o seu uso causa redução dos danos ambientais potencial redução de riscos à saúde (RASTELLO et al., 2009).

3.6.3 *Tribolium castaneum*

Conhecido popularmente como besouro castanho dos cereais, o *Tribolium castaneum* (Herbst) pertence à família Tenebrionidae, na qual são encontradas mais de 10.000 espécies de insetos conhecidos. Este inseto tem origem indo-australiana, sendo encontrado principalmente em áreas temperadas (FARIAS, 2010).

T. castaneum apresenta cor avermelhada (ou acastanhada), dos quais os adultos são besouros achatados, ovalados, de coloração castanha avermelhada e variam de 2 a 4 mm de comprimento (Fig. 6). O ciclo de vida pode ser completado em 21 dias sob condições ótimas de temperatura (35 °C) e umidade relativa do ar (75%), mas podem se desenvolver entre 22 e 40 °C. Os ovos desta espécie são pequenos, medindo aproximadamente 0,6 x 0,3 mm, claros e recobertos por substância viscosa, e o período de incubação é de aproximadamente sete dias. As fases de ovo e pupa apresentam maior resistência à ação dos inseticidas. A ovoposição é efetuada fora da massa de grãos de 2 a 3 vezes ao dia, sob sacarias, fendas ou alimentos, totalizando entre 400 e 500 ovos. As larvas apresentam-se branco amareladas, cilíndricas e finas, medindo até 7 mm de comprimento, e as fases de ovo e pupa apresentam maior resistência à ação dos inseticidas. A ovoposição é efetuada fora da massa de grãos de 2 a 3 vezes ao dia, sob sacarias, fendas ou alimentos São móveis e se alimentam dos embriões dos cereais, sendo esta nesta fase a de maior consumo de alimento. O adulto pode sobreviver por até 3 anos, tendo a capacidade de se dispersar através do voo por longas distâncias. Em condições favoráveis, este inseto pode produzir 4-5 gerações em um ano de condição favoráveis (ISLAM et al., 2017; GRÜNWALD et al., 2013).

T. castaneum é um dos principais insetos-praga na cultura do milho (BENHALIMA et al., 2004; LI et al., 2015), danificando sementes, grãos e produtos moídos. São os responsáveis por cerca de 9% de perdas em grãos armazenados em países em desenvolvimento; chegando essa perda a 20% nos países mais desenvolvidos (ISLAM, 2017; NATTUDURAI et al., 2012), sendo capazes de parasitar os grãos em todos os estágios de desenvolvimento (BOYER et al., 2012). O *T. castaneum* é uma das principais e mais graves pragas dos cereais e causa grandes

perdas econômicas no armazenamento de grãos. Devido à infestação severa causada pelo *T. castaneum*, a farinha decai e fica amarelada, com um odor desagradável, pungente, afeta negativamente o cozimento qualidade da farinha e, finalmente, torna-se insalubre para uso humano (LI et al., 2015).

Figura 6. *T. castaneum*: larva (A e B), pupa (C) e adulto (D)



Fonte: Lorini et al. (2015)

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ACTINOBACTÉRIAS

3.7.1 Atividade Antioxidante

Um antioxidante é qualquer substância que retarda ou previne a deterioração, dano ou destruição por oxidação de biomoléculas ou estruturas celulares (MANIVASAGAN et al., 2014). Nos últimos anos, muita atenção tem sido dedicada à obtenção de antioxidante oriundos de fontes naturais e sua associação com efeitos benéficos à saúde, havendo um considerável interesse da indústria farmacêutica pelo desenvolvimento de antioxidantes derivados de fontes naturais (PRASHD KEKUDA et al., 2010; SER et al., 2018).

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a atividade antioxidante dos mais variados tipos de compostos. Diversos estudos têm destacado o potencial antioxidante das actinobactérias, principalmente por conta da ampla gama de metabólitos secundários que esse grupo de micro-organismos é capaz de produzir, além da sua versatilidade em colonizar

diferentes tipos de ambientes, o que gera particularidades na produção de seus metabólitos secundários (RODRIGUES et al., 2018; WANG et al., 2017).

Karthik et al. (2013) investigaram a atividade antioxidante de isolados marinhos do gênero *Streptomyces* frente a diversos ensaios *in vitro*, sendo a atividade positiva atribuída à presença de compostos fenólicos nos extratos microbianos obtidos a partir da fermentação.

Garg et al. (2013) relatam em seu trabalho a produção de micotiol (MSH) e glutathiona (GSH) por actinomicetos (principalmente o gênero *Streptomyces*), que são tióis de baixo peso molecular e têm papel fundamental na manutenção do ambiente redutor nas células, necessário para a regulação das suas atividades metabólicas frente a condições de estresse.

Sowndhararajan e Kang (2013) avaliaram a atividade antioxidante frente a ensaios *in vitro* de extratos orgânicos obtidos a partir da fermentação de *Streptomyces* em diferentes meios de cultura.

No trabalho de Gozari et al. (2018) *Streptomyces* isolado de ambiente marinho foi analisado frente a ensaios antioxidantes *in vitro*, e os resultados obtidos propõem que este grupo de micro-organismos de fato possuem potencial para serem explorados como fontes de metabólitos com ação antioxidante, uma vez que os ambientes que oferecem condições extremas, assim como o marinho, expõem os micro-organismos a elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), obrigando-os a produzir compostos com ação antioxidante para se proteger.

Nafis et al. (2018) apresentaram resultados de atividade antioxidante total (ATT) do extrato bruto obtido a partir da fermentação de uma actinobactéria endofítica da planta medicinal *Aloe vera*, indicando-as como uma nova fonte de compostos bioativos.

Sanjivkumar et al. (2019) aplicaram nanotecnologia em seu trabalho, produzindo nanopartículas (AgNPS) a partir da biomassa fermentativa de *Streptomyces olivaceus*. Em seguida foi avaliada a atividade antioxidante dessas nanopartículas, obtendo-se bons resultados em relação ao sequestro de radicais livres *in vitro*.

A Caatinga, com suas características de região semiárida, como longos períodos de estiagem, alta insolação e temperaturas, favorecem o desenvolvimento de organismos com adaptações específicas para sobreviver a esse ambiente e ao estresse oxidativo ao qual são submetidos diariamente, o que faz dos micro-organismos isolados deste ambiente fontes promissoras de compostos com ação antioxidante (CARVALHO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

3.7.2 Atividade Inseticida

As actinobactérias têm sido relatadas na literatura como possuidoras de um papel significativo no controle biológico de insetos, através da produção de metabólitos secundários ativos. *Spinosad* é um produto inseticida da Dow AgroSciences (Indianapolis, Indiana, EUA), obtido a partir da fermentação da *Saccharopolyspora spinosa* Mertz e Yao (Bacteria: Actinobacteridae), uma actinobactéria de ocorrência natural no solo. O *Spinosad* apresentado alta atividade inseticida por contato ou ingestão contra diversos insetos-praga, pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Thysanoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hymenoptera, dentre outros (MARK et al., 2011).

Diversas bactérias têm sido descritas como produtoras de enzimas quitinolíticas, o que atesta que elas podem ser utilizadas na proteção de plantas contra parasitas e insetos praga. Dentre as bactérias produtoras de quitina já descritas na literatura, há estudos envolvendo espécies pertencentes ao grupo das actinobactérias, como *Arthrobacter*, *Micromonospora* e *Streptomyces*, que apresentaram um papel significativo na degradação da quitina e, consequentemente, possuem potencial para ação inseticida (GADELHAK et al., 2005; GOMES et al., 2018; SUBBANNA, et al., 2018).

Anwar et al., (2014) obtiveram resultados significativos para atividade inseticida de sobrenadantes obtidos a partir da fermentação de *Streptomyces rochei*, *Streptomyces minutiscleroticus* e *Streptomyces phaeoluteigrisseus* contra larvas e adultos do inseto praga *T. castaneum*.

Rajesh et al. (2015) revelaram que os metabólitos secundários tetraciclina, avermectina, macrotetrolides e flavonoides oriundos de extratos orgânicos de acetato de etila obtidos a partir do cultivo de actinomicetos foram tóxicos para insetos do gênero *Culex*, que é um vetor de doenças, como a filariose.

Os actinomicetos desempenham um papel significativo no controle biológico de insetos praga através da produção de metabólitos secundários ativos e estão sendo testados. Esses metabólitos podem atuar isoladamente ou, o que é o mais comum, atuar com base em efeitos combinados (ANWAR et al., 2014; GADELHAK et al., 2005; GOMES, et al., 2018).

Adicionalmente, alguns estudos demonstram que as actinobactérias do gênero *Streptomyces* podem ser uma importante ferramenta para o controle biológico de insetos, através da produção de substâncias com potencial pesticida (SHAMA, 2014). Takahashi et al. (1989) descreveram a altemicidina, composto produzido a partir do cultivo de *Streptomyces sioyaensis* no meio de cultura ISP-4, que apresenta atividade acaricida. Sarauv et al. (2013) e Thenmozhi

et al. (2013) também evidenciaram propriedades acaricida contra *Haemaphysalis bispinosa* e *Rhipicephalus microplus*, respectivamente, de extratos butanólico, isopropanólico, clorofórmico, acetônico, hexânico, de acetato de etila e de éter de petróleo obtidos a partir de cultivo de *Streptomyces* isolados de ambiente marinho. Kekuda et al. (2010) relataram o potencial larvicida contra *Aedes aegypti* de extratos butanólicos obtidos da fermentação de actinobactérias do gênero *Streptomyces* isoladas do solo. Vijayabharathi et al. (2014) avaliaram o potencial pesticida de várias cepas de *Streptomyces* frente a *Helicoverpa armigera* e *Spoptera litura*, utilizando os metabólitos extracelulares obtidos a partir dos processos fermentativos das actinobactérias em estudo.

No trabalho de Anwar et al. (2014) o filtrado da cultura (líquido metabólico), bem como extratos metanólicos de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, apresentaram potencial inseticida contra *Tribolium castaneum*, causando 100% da mortalidade do inseto.

Marathe et al., (2016) isolaram e purificaram o inibidor de protease (PT) a partir do sobrenadante gerado nos processos fermentativos de *Streptomyces* spp., que causou alteração no ganho de peso e no desenvolvimento de larvas, pupas e indivíduos adultos de *Helicoverpa armígera*.

Ababutain et al. (2012), revelaram que o antibiótico lincomicina, obtido a partir da extração com éter dimetílico do líquido metabólico de *Streptomyces* sp., além de exibir atividade contra os patógenos *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, também exibiu atividade contra o inseto vetor *Culex pipiens*.

Desse modo, têm crescido o interesse pelo controle de insetos por cepas de actinobactérias isoladas dos mais diversos ambientes, considerando a relevância de trabalhos como estes tanto para o desenvolvimento agrícola quanto para a saúde pública. Contudo, esse potencial ainda é pouco explorado, visto que há poucos estudos sobre a ação de actinobactérias

4. RESULTADOS

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigos.

4.1. ARTIGO 1

Avaliação da Atividade Antioxidante de Filtrado de Cultura de *Streptomyces* Isolados da Caatinga

Priscilla Andrade de Moura^a; Thâmarah de Albuquerque Lima^a; Magda Rhayanny Assunção Ferreira^a; Luiz Alberto Lira Soares; Gláucia Manoela Lima^b; Thiago Henrique Napoleão^a; Márcia Vanusa da Silva^a; Ana Patrícia Silva de Oliveira^a; Patrícia Maria Guedes Paiva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

A Caatinga possui uma população microbiana altamente adaptada às condições de estresse ambiental. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e o potencial antioxidante de filtrado de cultura de *Streptomyces* isolados da Caatinga. A atividade antioxidante foi avaliada por diferentes métodos *in vitro* tais como AAT, DPPH, ABST e redução do NO, além da dosagem de fenóis e flavonoides totais. Os resultados obtidos revelam que os filtrados de cultura são importantes fontes de metabólitos antioxidantes. A amostra CA-02 apresentou maiores concentrações de fenóis e flavonoides, bem como teve maior poder de redução em todas as metodologias testadas. Portanto, *Streptomyces* isolados da Caatinga é uma promissora fonte antioxidante que pode ser usado para combater radicais livres no seto farmacêutico e alimentício.

1. INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação desempenham um papel essencial na produção de energia nas células. No entanto, neste processo são liberados radicais livres que podem causar danos oxidativos a compostos celulares (CAROCHO et al., 2018). O desequilíbrio entre esses radicais

livres e os antioxidantes (substâncias que estabilizam e/ou eliminam estes radicais) produzidos em nosso organismo resulta no estresse oxidativo, processo que pode estar relacionado ao desenvolvimento de várias doenças degenerativas, tais como câncer, envelhecimento e doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (BARBA et al., 2017; CAROCHO et al., 2018). Atualmente, existe um interesse considerável nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pelo desenvolvimento de antioxidantes derivados de fontes naturais, incluindo plantas, animais e microrganismos (SER et al., 2015).

Streptomyces representa o maior gênero dentro do filo Actinobacteria, que é composto por bactérias filamentosas gram-positivas. Foi proposto pela primeira vez por Waksman e Henrici (1943) e, atualmente, são conhecidas mais de 780 espécies e 30 subespécies já descritas na literatura (TAN et al., 2017). O gênero *Streptomyces* tem feito contribuições significativas para ciência e tecnologia, por sua capacidade de produzir uma ampla gama de compostos. Mais de 7.000 compostos bioativos com várias aplicações biotecnológicas importantes foram descobertos a partir deste gênero, incluindo compostos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticâncer, antifúngicas e imunossupressoras (BÉRDY, 2012; KARAM; WALI, 2015; SER et al., 2015; TAN et al., 2018; SANJIVKUMAR et al., 2019).

A caatinga possui grande variedade de espécies endêmicas, que apresentam uma rica produção metabólica para adaptação às condições de estresse ambiental características da região semiárida onde estão inseridas, como altas temperaturas e baixo índice pluviométrico (AGRA et al., 2007; CARTAXO et al., 2010; ROCHA et al., 2017). Por isso, sugere-se que os microrganismos que habitam esse domínio morfoclimático podem ter adquirido a capacidade de sintetizar metabólitos ricos em atividade antioxidante ou desenvolver mecanismos específicos de defesa antioxidante para a sobrevivência ao estresse oxidativo (CAROCHO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018; TANVIR et al., 2014).

Desse modo, *Streptomyces* isolados da Caatinga pode ser fonte de antioxidantes naturais que podem ser usadas no campo farmacêutico e alimentício (APAK et al., 2016; TAN et al., 2017; 2018). Este trabalho propôs avaliar o potencial antioxidante, bem como o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais frente a ensaios *in vitro* de isolados da Caatinga pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Actinobactérias

Para o desenvolvimento deste trabalho, 4 cepas de actinobactéria isoladas de solo rizosférico da Caatinga (CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17) e identificadas morfológicamente como *Streptomyces* sp. foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). As culturas foram mantidas em tubos com meio ISP-2 sólido, sob refrigeração.

2.2 Condições de cultivo e obtenção dos filtrados da cultura

Para o processo fermentativo, as cepas de actinobactérias (CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17) foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2, de modo a se obter um crescimento em tapete. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C. Após esse período, 5 discos da colônia em tapete (1 cm de diâmetro) foram inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml contendo cada um 100 mL de caldo GYM (Glicose Levedura Maltose – extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, glicose 4 g, q.s.p. 1000 mL), sendo o pH ajustado para 7,2 antes da esterilização, e os frascos foram então incubados em agitação (150 rpm) por 7 dias a 37 °C. Após a incubação, as culturas foram submetidas à centrifugação a 3.000 rpm durante 3 min, e em seguida à filtração, onde a biomassa microbiana foi desprezada e o filtrado da cultura separado para ser utilizado nos experimentos.

2.3 Dosagem de Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), onde 200 µL de cada filtrado da cultura nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%, foram adicionados em tubos, juntamente com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:1/v:v) e 2.5 mL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi incubada por 30 min em temperatura ambiente e, posteriormente, a absorbância foi medida à 765 nm. A estimativa de compostos fenólicos totais foi calculada utilizando uma equação obtida a partir da curva de calibração (equação: $y = 0,005x + 0,0685$; R^2 0,9932) do ácido gálico nas concentrações 400, 200, 100, 50 e 25 µM. O resultado foi expresso em equivalente de ácido gálico (mg EAG /g extrato).

2.4 Dosagem de Flavonoides Totais

Os flavonóides contidos nos extratos foram mensurados através da metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). Primeiramente, foi preparado o reagente, adicionando-se 100 mL etanol 2% a 2 g de cloreto de alumínio. Posteriormente, os filtrados da cultura foram diluídos em água nas concentrações 100, 50, 25 e 12,5%. Como padrão, foi utilizada a quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona) na concentração de 1 mg/mL. O procedimento foi feito em triplicata em uma placa de 96 poços, onde foram pipetados 100 µL dos filtrados da cultura, da quercetina (10 a 100 µg/mL) para obtenção da curva padrão e dos controles, todos adicionados a 100 µL do reagente. Após uma hora de incubação no escuro, as absorbâncias foram obtidas a 420 nm. O teor de flavonóides foi estimado usando a curva padrão da quercetina ($y = 0,0076x + 0,2169$; $R^2=0,9768$) e os resultados expressos em miligrama Equivalente da Quercetina por grama do extrato (mg EQ/g¹ extrato).

2.5 Atividade Antioxidante

2.5.1 Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total (ATT) dos filtrados da cultura foi avaliada pelo método de Pietro et al., (1999), na qual se utiliza o método do fosfomolibdênio, que se baseia na redução de Mo(VI) para Mo(V) pelo composto antioxidante, gerando a formação de um complexo fosfato/Mo(V) de coloração verde, que é formado sob condições de pH ácido e pode ser monitorado por espectrofotometria. Desse modo, uma alíquota de 0.1 mL de cada filtrado da cultura (concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%) foi misturada a 1 mL da solução reagente (600 mM de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio).

As amostras foram então incubadas em banho termostatizado a 95 °C, por 90 min e, posteriormente, a absorbância foi mensurada a 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico, que foi utilizado como padrão, e calculada através da fórmula: $\%TAC = (A_a - A_c) \times 100 / (A_{aa} - A_c)$, onde A_c representa a absorbância do controle (solução reagente, sem o LM), A_a a absorbância na presença do LM e A_{aa} a absorbância do ácido ascórbico.

2.5.2 Sequestro do radical DPPH

O potencial antioxidante dos filtrados da cultura das actinobactérias também foi avaliado através capacidade de sequestro do radical livre 2,2-difenil – 1 – picrilhidrazil (DPPH), segundo o método definido por Blois (1958). Em uma placa 96 poços, foram adicionados 10 µL de cada filtrado da cultura (diluído em água nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%) junto com 240 µL do reagente DPPH (diluído em metanol, 200µM). A placa foi então incubada no escuro por 30 min, à temperatura ambiente e, após a incubação, foi medida a absorbância a 517 nm. A porcentagem de atividade de captura do radical DPPH foi calculada através da fórmula: % Redução DPPH = $[(A_c - A_s) / A_c] \times 100$, onde A_c representa a absorbância do controle (DPPH + DMSO) e A_s a absorbância das amostras.

2.5.3 Sequestro do radical ABTS

A atividade de captura do radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato) dos filtrados da cultura foi determinada de acordo com Re et al., (1999). Para a reação, foram misturados 3 mL da solução de ABTS⁺ e 30 µL do extrato vegetal (concentração 1 mg/mL, diluição em DMSO). A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 6 min. Após a incubação, foram mensuradas as absorbâncias das amostras a 734 nm. Como controle, foi usada a mistura reagente + água.

A partir das absorbâncias mensuradas, foi calculada a porcentagem de redução do ABTS, através da fórmula: % Redução de ABTS = $[(A_c - A_s) / A_c] \times 100$, onde A_c representa a absorbância do controle e A_s a absorbância das amostras.

2.5.4 Sequestro do radical óxido nítrico (NO)

Para se avaliar a capacidade de inibição de NO, foi utilizada a metodologia de Johann Peter Griess (1958), que se baseia na capacidade da amostra em estudo sequestrar o radical NO liberado a partir do nitroprussiato de sódio (NPS) em solução aquosa, impedindo a formação do cromóforo rosa detectado por espectrofotometria após adição do reagente de Griess.

Para a reação, 50 µL do NPS (1,25mM) foi incubado com 50 µL de cada filtrado da cultura em diferentes concentrações (100, 50, 25 e 12,5%) por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 100 µL do reagente de Griess (1% p/v de sulfanilamida, 0,1%

p/v de N-(1-naftalenodiamina) e 2,5% v/v de ácido orto- fosfórico), sendo então a mistura submetida a leitura das absorvâncias a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e para o controle negativo, o NPS foi substituído por tampão. A partir dos resultados obtidos por espectrofotometria, foi calculada a porcentagem de captura do radical NO, utilizando-se a equação: % Redução de NO= $[(A_c - A_s) / A_c] \times 100$, onde A_c representa a absorvância do controle e A_s a absorvância dos filtrados da cultura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Dosagem de compostos fenólicos e flavonoides totais

Os compostos fenólicos compreendem um grupo químico mais estudado e apresentam elevada propriedade antioxidante. Embora as plantas sejam conhecidas como as fontes primárias desses compostos, existem evidências consideráveis do potencial de produção de compostos fenólicos como metabólitos secundários por microrganismos, incluindo o gênero *Streptomyces* (SER et al., 2015; KEKUDA et al., 2017; TAN et al., 2018).

Os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes a ácido gálico (EAG) por grama de extrato (Tabela 1). Todos os filtrados de cultura apresentaram teores significativos de compostos fenólicos totais, sendo o maior teor observado em CA-17 na concentração de 100% ($35,16 \pm 0,27$ mg EAG/g). Rufino et al. (2010) estabelece que, para espécies vegetais, é considerado alto o teor de fenóis totais > 50 mg EAG/g; médio para valores entre 10 e 50 mg EAG/g; e baixo para valores >10 mg EAG/g. Nesse sentido, todas as amostras apresentaram teores de compostos fenólicos medianos nas suas maiores concentrações.

Os flavonoides compreendem um grupo de substâncias polifenólicas amplamente distribuídas em plantas, podendo ser encontrados também em microrganismos. Trabalhos realizados sobre as propriedades farmacológicas desses compostos descreveram inúmeros benefícios por eles gerados, como atividade antitumoral, antibacteriana, antimutagênica, proteção cardiovascular, além da atividade antioxidante. A ação desses compostos como antioxidante consiste tanto na reação direta com radicais livres, como pelo sequestro de íons metálicos por quelação, além da prevenção da geração de radicais livres, protegendo assim os potenciais alvos biológicos do estresse oxidativo (TAN et al., 2017; POLJSK et al., 2013; RAHAL et al., 2014; WANG et al., 2013).

Tabela 1. Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e resultados das atividades antioxidantes *in vitro* dos filtrados de cultura obtidos da fermentação de CA-02, CA-06, Ca-07 e CA-17.

Amostras/ Concentração	Fenóis totais (mgEAG/g)^a±D P	Flavonoides totais (mg EQ/g)^b±DP	ATT (%)^c±DP	Sequestro DPPH (%) ± DP	Sequestro ABTS (%) ± DP	Sequestro NO (%) ± DP
CA-02						
100%	27,74±0,43	75,53±0,11	44,26±0,09	64,14±0,01	29,83±0,01	24,61±0,01
50%	13,08±0,11	46,32±0,05	22,38±0,02	49,69±0,02	17,41±0,04	17,14±0,01
25%	6,50±0,01	24,26±0,01	11,14±0,02	43,32±0,04	8,59±0,02	11,91±0,03
12,5%	3,65±0,01	16,89±0,00	5,29±0,01	28,45±0,03	2,81±0,01	9,61±0,01
CA-06						
100%	13,87±0,023	38,86±0,07	23,21±0,08	58,61±0,01	28,59±0,02	11,76±0,01
50%	8,74±0,01	25,05±0,01	9,18±0,02	43,46±0,02	15,41±0,03	9,09±0,01
25%	4,82±0,02	15,97±0,00	4,81±0,00	26,54±0,02	8,49±0,01	8,20±0,00
12,5%	2,75±0,01	10,66±0,00	2,37±0,01	18,23±0,02	3,9±0,02	7,84±0,01
CA-07						
100%	17,96±0,06	78,56±0,18	19,15±0,05	57,01±0,03	32,64±0,01	23,15±0,02
50%	10,96±0,01	50,53±0,09	9,36±0,03	51,87±0,01	19,26±0,01	13,79±0,01
25%	6,19±0,01	30,18±0,02	4,83±0,01	33,78±0,03	13,73±0,02	10,76±0,00
12,5%	3,61±0,01	17,33±0,00	2,25±0,00	27,74±0,05	13,48 ±0,08	8,83±0,01
CA-17						
100%	35,16±0,27	49,52±0,02	18,85±0,01	52,46±0,16	31,36±0,06	9,35±0,00
50%	13,20±0,07	30,09±0,01	9,8±0,01	55,84±0,14	8,74±0,03	7,89±0,01
25%	8,48±0,12	19,78±0,01	4,43±0,01	41,86±0,08	4,59±0,01	7,47±0,01
12,5%	3,64±0,02	12,09±0,00	2,07±0,00	33,67±0,07	1,83±0,04	6,64±0,00

Fonte: A autora (2009). a: teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg/g equivalentes a ácido gálico; b: teor de flavonoides totais, expresso em mg/g equivalentes a quercitina; c: atividade antioxidante total, expressa em função do ácido ascórbico

Nos resultados obtidos para a dosagem de flavonoides totais (Tabela 1), é possível evidenciar que todos os filtrados de cultura também apresentaram teores elevados, destacando-se CA-02 na concentração de 100% ($75,53 \pm 0,11$ mg EQ/g), o que sugere o bom desempenho dessa amostra nos ensaios antioxidantes relacionado à presença de flavonoides na sua composição e CA-07 na concentração de 100% ($78,56 \pm 0,18$ mg EQ/g).

Diversos estudos têm avaliado os flavonoides e suas propriedades farmacológicas benéficas, como atividade antitumoral, antibacteriana e antimutagênica, além da proteção cardiovascular. Contudo, a função mais importante dos flavonóides é a sua atividade antioxidante, isto é, a capacidade de eliminar espécies e radicais reativos de oxigênio e azoto. A ação antioxidante dos flavonóides não é causada apenas pela reação direta com os radicais livres, pois os flavonóides também podem sequestrar íons metálicos por quelação e prevenir a geração de radicais livres mediada por metais e, consequentemente, proteger os potenciais alvos biológicos do estresse oxidativo (KURTIC et al., 2011).

3.2 Atividade Antioxidante

3.2.1 Atividade Antioxidante Total

Antioxidantes são moléculas que conferem proteção contra o estresse oxidativo em células ou organismos, bloqueando ou retardando o dano oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio (KEKUDA et al., 2017; NAFIS et al., 2018; SANJIVKUMAR et al., 2019).

Nesse trabalho, a atividade antioxidante total (ATT) usou o método do fosfomolibdênio, que se baseia na redução de Mo (VI) para Mo (V) pelo composto antioxidante, gerando a formação de um complexo fosfato/Mo (V) de coloração verde. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), todos os extratos apresentaram capacidade antioxidante total. Porém, o melhor resultado foi obtido com a amostra CA- 02, que apresentou ATT de 44,26% na concentração de 100%, amostra da qual se obteve os maiores teores de flavonoides. Nafis et al., (2018) apresentaram resultados promissores de atividade antioxidante total (ATT) do extrato bruto obtido a partir da fermentação de uma actinobactéria endofítica. Além disso, o extrato apresentou teores significativos de fenóis ($15,42$ µg GAE/mg extrato) e de flavonoides ($11,41$ µg QE/mg extrato), dado que corrobora com os resultados deste estudo.

3.2.2 Sequestro do radical DPPH

O DPPH é um dos ensaios mais simples e rápidos para atividade antioxidante *in vitro*. Este ensaio utiliza um radical DPPH livre estável para avaliar a capacidade de um composto em conferir efeito antioxidante, através da transferência de átomos de hidrogênio ou elétron para os radicais DPPH, levando a mudanças de cor que podem ser detectadas por espectrofotometria (BAYGAR; UGUR, 2016; TAN et al., 2018).

Nos resultados obtidos (Tabela 1), todos os filtrados de cultura apresentaram redução do DPPH acima de 50% para as maiores concentrações, destacando-se CA-02, com redução de 64,14%. Interessantemente, CA-02 (100%) apresentou considerável teor de fenóis totais. Vários estudos associaram a atividade antioxidante de actinobactérias à presença de fenóis totais, avaliada através de dosagens quantitativas (ASWATHY et al., 2017; KEKUDA et al., 2017; TAN et al., 2017; ZHONG et al., 2011).

Sanjivkumar et al. (2019) mostrou em seus estudos que nanopartículas (AgNPs) produzidas a partir da biomassa de *Streptomyces olivaceus* são capazes de reduzir em 59% o DPPH. Tan et al., (2018) avaliou o potencial antioxidante de actinobactérias isoladas do solo de manguezal identificadas com *Streptomyces* sp., obtendo cerca de 36% de redução de DPPH na concentração de 4 mg/mL de extrato metanólico. O estudo relacionou a atividade antioxidante positiva à presença de compostos fenólicos totais nas amostras, evidenciada pela correlação de Pearson.

3.2.3 Sequestro do radical ABTS

A capacidade de eliminação de radicais livres protonados, como o ABTS, é um atributo importante para os antioxidantes. Nos resultados de captura do radical ABTS encontrados (Tabela 1), todas as amostras apresentaram redução do radical ABTS, destacando-se CA-07, que apresentou redução de $32,64 \pm 0,01$ na maior concentração (100%) e manteve redução de $13,48 \pm 0,08$ na menor concentração.

Vários estudos avaliam a atividade antioxidante de actinobactérias pelo método do sequestro do radical ABTS. Zhong et al. (2011) mostrou que o extrato acetato de etila obtido a partir da fermentação de *Streptomyces griseus* reduziu o radical ABTS em 82% e 52% nas concentrações de 360 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Tan et al. (2018) também utilizou esse método para avaliar o potencial antioxidante de *Streptomyces* sp., revelando redução de 68% na concentração de 4 mg/mL de extrato metanólico. Esses resultados também se

mostraram dose dependente, havendo correlação entre essa atividade e a presença de compostos fenólicos nas amostras.

3.2.4 Sequestro do radical óxido nítrico (NO)

As actinobactérias provocaram a redução do radical NO, destacando-se CA-02, com redução de $24,62 \pm 0,01\%$. O excesso de óxido nítrico (NO) produzido por indução da enzima óxido nítrico sintase (NOS) está relacionado ao desenvolvimento de inúmeras desordens que conduzem à perda da homeostasia. O estresse oxidativo gerado pelo aumento da produção endógena de NO pode levar a efeitos de toxicidade induzida, tais como peroxidação lipídica, nitração de proteínas e danos ao DNA. Desse modo, compostos que sejam capazes de sequestrar o radical NO podem diminuir a toxicidade das espécies reativas de nitrogênio, atuando na modulação de processos inflamatórios e, consequentemente, prevenindo ou reduzindo danos (MAIA et al., 2009; ZHONG et al., 2011).

Os antioxidantes apresentam efeitos benéficos nas doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas associadas com o óxido nítrico (NO). Os compostos fenólicos comuns, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonas e antocianinas têm sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a produção de NO (DUSSE et al., 2003; VALKO et al., 2007). A presença de elevadas concentrações de fenóis associada a redução de NO obtido por CA-02 pode indicar esse filtrado de cultura como promissor agente antioxidante.

Maia et al (2009) avaliou a atividade antioxidante através do experimento de sequestro do radical NO do extrato metanólico de algas marinhas e associou a redução do teor de NO em 46% na concentração de 7,5 mg/mL à presença de polifenóis no extrato. No estudo de Sanjivkumar et al. (2019) nanopartículas (AgNPs) produzidas a partir da biomassa de *Streptomyces olivaceus* reduziram em 51% o radical NO na concentração 100 µg/mL.

4. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a atividade antioxidante de filtrado de cultura de actinobactérias isoladas da Caatinga e pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Todos os filtrados de cultura apresentam potencial para produção de antioxidantes. Os 4 isolados testados (CA-02, CA-06 CA-07 E CA-17) apresentaram redução para os radicais DPPH, ABTS, NO. Todas as amostras possuem atividade antioxidante total (ATT), com destaque para CA-02. Essa atividade pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos e flavonoides no processo fermentativo

das actinobactérias. Desse modo, microrganismos isolados da Catinga apresentam potencial para a produção de metabólitos antioxidantes. Estudos posteriores são necessários para identificar e isolar esses compostos antioxidantes do filtrado de cultura.

5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “CaririParaibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- APAK, R. et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028-1045, 2016.
- ASWATHY, R. et al. Green synthesis and characterization of marine yeast-mediated silver and zinc oxide nanoparticles and assessment of their antioxidant activity. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 10, n. 10, p. 235-240, 2017.
- BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 195–206, 2017.
- BAYGAR, T.; UGUR, A. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces griseorubens* isolated from soil and their antioxidant activity. **IET nanobiotechnology**, v. 11, n. 3, p. 286-291, 2016.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199–1200, 1958.
- 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.
- DUSSE, L. M. S. et al. Revisão sobre óxido nítrico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.
- KEKUDA, P. T. R.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Potent insecticidal activity of two *Streptomyces* species isolated from the soil of the Western ghats of Agumbe, Karnataka. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 29-32, 2010.
- KUNTIĆ, V.; FILIPOVIĆ, I.; VUJIĆ, Z. Effects of rutin and hesperidin and their Al (III) and Cu (II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1378-1388, 2011.

- MAIA, R. M. et al. Evaluation of nitric oxide (NO) scavenging for the metanol extract of the alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 489-493, 2010.
- NAFIS, A. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plant Aloe vera: isolation, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity assays and taxonomic study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 10, p. 513, 2018.
- PIETRO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal. Biochem.** v. 269, p. 337–341, 1999.
- POLJSK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.
- RAHAL, A. et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. **Free Radical & Medicine**, v. 6, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.
- ROCHA, E. A. L. S. S.; MEDEIROS, A. C. D.; CASTRO, R. D.; ROSALEN, P. L.; SARAIVA, K. L. A.; GODOY, G. P; SILVA, R. L. A.; ALEIXO, C. S. S.; SILVA, P. G.; COSTA, E. M. M. B. Antifungal activity, phytochemical characterization and thermal profile of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2017.
- 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.
- SANJIVKUMAR, M. et al. Investigation on characterization and biomedical properties of silver nanoparticles synthesized by an actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 151-159, 2019.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.
- SER, H. L.; MUTALIB, M. S. A.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H; LEE, L. H. Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC137

- Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. **Frontiers of Microbiology**, v. 6, n. 1398, p. 1-11, 2015.
- SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.** 16, 144–158, 1965.
- TAN, L. T. H. et al. Streptomyces sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 276, 2017.
- TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with Asteraceae plants: isolation, biodiversity and bioactivities. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 4, p. 767-773, 2014.
- THENMOZHI, M.; GOPAL, J. V.; KANNABIRAN, K.; RAJAKUMAR, G.; VELAYUTHAM, K.; RAHUMAN, A. A. Eco-friendly approach using marine actinobacteria and its compounds to control ticks and mosquitoes. **Parasito Res**, v. 112, p. 719-729, 2013.
- WANG, D. et al. Identification, bioactivity, and productivity of actinomycins from the marine-derived Streptomyces heliomyces. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1147, 2017.
- WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **J. Apic. Res**, v. 37, n.2, p. 99-105, 1998.
- ZHONG, K. et al. Antioxidant activity of a novel Streptomyces from the rhizosphere of *Rhizoma curcuma* Longae. **Current Research in Bacteriology**, v. 4, n. 2, p. 63-72, 2011.

4.2. ARTIGO 2

Efeito do filtrado de cultura de *Streptomyces* spp. Isoladas da Caatinga Sobre *N. corniger*

Priscilla Andrade de Moura^a; Natália Adriely Ribeiro da Silva^a; Thâmarah de Albuquerque Lima^a; Magda Rhayanny Assunção Ferreira; Luiz Alberto Lira Soares; Gláucia Manoela Lima^b; Thiago Henrique Napoleão^a; Márcia Vanusa da Silva^a; Ana Patrícia Silva de Oliveira^a; Patrícia Maria Guedes Paiva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

* Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541.

E-mail: pri-moura88@hotmail.com

RESUMO

Os cupins possuem grande importância ambiental, mas por conta da ação antrópica no seu habitat, passaram então a causar prejuízos a edificações em áreas urbanas. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade contra *N. corniger* de actinobactérias do gênero *Streptomyces* isoladas da Caatinga. Para isso, os filtrados de cultura das 4 cepas foram utilizados para se avaliar a atividade termiticida, bem como os efeitos sobre as enzimas digestivas. Também foi realizada a análise química dos filtrados de cultura. A amostra CA-06 apresentou a melhor atividade termiticida contra soldados e operários, causando também a inibição de endoglucanase, bem como teve maior poder de redução em todas as metodologias testadas. A análise química evidenciou a presença dos flavonoides rutina e vitexina na amostra. Os resultados obtidos revelam que os filtrados de cultura de *Streptomyces* isolados da Caatinga são fontes promissoras de metabólitos termiticidas, tais como flavonoides, o que pode ter relação à desregulação do processo digestivo desses insetos.

1. INTRODUÇÃO

Os cupins possuem grande importância ambiental, desempenhando um papel fundamental no ciclo do carbono na natureza. São considerados grandes decompositores, pois melhoram a qualidade do solo através da ingestão e transporte de partículas orgânicas e minerais, e podem funcionar como bioindicadores de qualidade ambiental e fertilidade do solo (KORB, 2019; LIMA et al, 2016; COSTA-LEONARDO, 2002). Porém, a ação antrópica no *habitat* natural desses insetos tem levado à uma mudança de comportamento dos mesmos, que passaram então a causar prejuízos a edificações em áreas urbanas. Atualmente os cupins são considerados uma das pragas de insetos mais comuns e importantes em áreas urbanas do Brasil e em grande parte da América do Sul, causando danos consideráveis em edifícios históricos, coleções de documentos, construções urbanas e árvores ornamentais (SUGIO et al, 2018; FRANÇA et al, 2016; COSTA- LEONARDO, 2002).

Nasutitermes corniger (Isoptera, Termitidae) é uma espécie de cupim arborícola amplamente distribuído nas Américas, ocorrendo do sul do México ao norte da Argentina. É caracterizado pelo seu comportamento social e divisão em castas, sendo altamente adaptado a fixar seus ninhos tanto em ambientes naturais como árvores, raízes ou solo, como também em áreas urbanas e agrícolas (LIMA et al, 2016; SANTANA et al, 2010). O controle de cupins se principalmente por meio do uso de inseticidas sintéticos, o que tem causado o suregimento de populações resistentes, efeitos deletérios na saúde humana e ao meio ambiente. Como alternativa ao uso de inseticidas químicos, compostos de fonte biológica, como plantas e micro-organismos, tem sido utilizados como estratégia para o controle desses insetos-praga, o que reduz o surgimento de pragas resistentes e a contaminação de organismos não-alvos (ABROL; SHANKAR 2014, FISHEL 2014; LIU et al., 2014; MENEZES, 2005).

As actinobactérias representam um grupo de bactérias gram-positivas, filamentosas e com alta quantidade de ligações G+C em seu genoma. São pertencentes ao filo Actinobacteria, que compreende mais de 200 gêneros com amplo espectro fisiológico e metabólico (PRASHITH KEKUDA et al., 2010; RAO et al., 2013; GANESAN et al, 2017). *Streptomyces* é o gênero de ocorrência predominante no solo, sendo conhecido pela grande capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos, que podem ser usados como antibióticos, antifúngicos, agentes antitumorais, antiinflamatórios, bioestimulantes agrícolas e inseticidas (ELBENDARY et al, 2018; KEENAN et al, 2019; PUPPALA et al, 2019; VALIPOUR et al, 2018; SHI et al, 2018, GANESAN et al, 2018; CAO et al, 2018).

A Caatinga é um bioma que abriga diversas espécies de microorganismos endêmicos (DRUMOND, 2013) adaptados às condições adversas desse ambiente, tais como altas temperaturas, excesso de radiação, estresse hídrico e escassez de nutrientes característicos da região (GIULIETT et al., 2006; MMA, 2018; MEDEIROS et al., 2013). Essas adaptações resultam na biossíntese de diversos metabólitos secundários bioativos com propriedades bioquímicas únicas, que podem ser exploradas em muitos segmentos da indústria, farmacologia e agricultura (MELO, 2014). Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial termiticida de cepas pertencentes ao gênero *Streptomyces* isoladas de solo da Caatinga.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Actinobactérias

Para o desenvolvimento deste trabalho, quatro cepas de actinobactérias isoladas de solo da Caatinga e identificadas morfológicamente como CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17, foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio ISP-2 sólido, sob refrigeração.

2.2 Condições Fermentativas e extração do líquido metabólico

Para o processo fermentativo as 4 cepas de actinobactérias foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ISP-2, de modo a se obter um crescimento em tapete. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C. Após esse período, 5 discos da colônia em tapete (1 cm de diâmetro) foram transferidos para Erlenmeyers de 250 ml contendo cada um 50 mL de caldo GYM. O pH foi ajustado para 7,2 antes da esterilização, os frascos foram então incubados por 48 horas a 37 °C sob agitação (150 rpm) para formação do pré-inóculo. Para a realização da fermentação, 5 mL de cada pré-inóculo foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do caldo GYM. Os frascos foram incubados por 96 horas a 37 °C sob agitação (150 rpm). Após o crescimento, as culturas foram submetidas à filtração, onde a biomassa microbiana foi desprezada e o filtrado da cultura separado e liofilizado, para obtenção dos extratos aquosos denominados de CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17.

2.3 Insetos

Colônias de *N. corniger* foram coletados no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife-Brasil), em um fragmento de Mata Atlântica (8°00'45''S, 34°56'57''W). Os autores tiveram autorização (36.301) do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. Os ninhos de cupins foram selecionados com base na integridade, foram removidos do tronco de uma árvore e transferidos para o laboratório, sendo mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o período necessário para separação e transferência dos operários e soldados ao bioensaio.

2.4 Atividade Termiticida

A atividade termiticida foi realizada de acordo com o método descrito por Kang et al. (1990). Cada experimento foi feito utilizando-se placas de Petri (90 x 15 mm) contendo dieta artificial composta por celulose e mantidas no escuro a 28°C . Os extratos (CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17), foram incorporados em uma dieta artificial, nas concentrações de 2, 4, 10, 20, 50 e 100%. Para a preparação da dieta artificial, os extratos foram misturados com uma solução de matriz de celulose a 20% (p/v) (Avicel) e essa mistura foi adicionada (1 ml) em placas de Petri, em discos. As placas foram mantidas na estufa (56°C) por 24 h para permitir a secagem dos discos. Em seguida, 16 operários e 4 soldados foram transferidos diretamente do ninho para cada placa de Petri. Para o controle, foi utilizada a dieta artificial sem os extratos. Três ensaios independentes foram realizados, em quintuplicatas, e foram calculadas as concentrações letais necessárias para matar 50% (CL50) dos cupins submetidos ao bioensaio.

2.5 Efeito dos filtrados de cultura sobre as enzimas digestivas do intestino de *N. corniger*

Os extratos de intestino de operários de *N. corniger* foram obtidos de acordo com Napoleão et al. (2011). Um grupo de 100 soldados ou operários foram imobilizados a 20°C por 15 minutos. O intestino de cada inseto foi removido manualmente e homogeneizados (100 intestinos) com 1 mL da solução tampão (acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 ou Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, ambos contendo NaCl 0,15 M). Os homogenatos foram centrifugados (9000 g, 4°C , 15 min) e os sobrenadantes coletados (extratos de intestino de soldados ou operários) foram utilizados para avaliação de atividades enzimáticas e avaliação da concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951).

O efeito de CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 nas atividades das enzimas digestivas de soldados e operários foi avaliado por prévia incubação (30 min, 28°C) do extrato de intestino com CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 seguido da determinação das atividades enzimáticas. Os resultados foram comparados com os ensaios sem CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 (controle 100% enzimático). Controle foi feito também sem o substrato (branco da reação).

As atividades de endoglucanase e exoglucanase foram determinadas de acordo com adaptações dos métodos descritos por Li et al. (2009) e Wood and Bhat (1988), respectivamente. O extrato de intestino de soldados (50 µL; 65 µg de proteína) ou operários (50 µL; 98 µg de proteína) mais CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 (50 µL) ou acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 (50 µL) foram incubados (10 min, 50°C) com 400 µL das soluções (1%, p/v) de carboximetilcelulose (para atividade de endoglucanase) ou Avicel (para atividade de exoglucanase) em acetato de sódio pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M. Após incubação, foi adicionado 500 µL de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) para parar a reação. Em seguida as amostras foram aquecidas (100°C, 6 min) e imediatamente resfriadas em gelo (15 min). Logo após, foi feita a leitura da absorbância a 540 nm. A quantidade de açúcares redutores foi determinada usando curva de glicose como padrão ($y = 0,7216x + 0,0216$, onde Y é a absorbância a 540 nm e X é a concentração de glicose em mg/mL). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para gerar 1 µmol de glicose por minuto.

2.6 Análise química dos filtrados de cultura

A análise química dos filtrados de cultura obtidos da fermentação foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 foram diluídos com 2 mL de metanol e levada ao ultrassom durante 60 minutos para completa solubilização. Os padrões (Tabela 1) foram utilizados na concentração de 1 mg/mL.

A amostra e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Tabela 1). A cuba foi saturada durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 5 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa. Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luzultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em

seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Tabela 1). As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Tabela 1: Sistemas, Reveladores e padrões utilizados na análise química

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão
Taninos Hidrolisáveis	90:5:5	Cloreto férrico	Ác. Gálico
Taninos condensados	90:5:5	Vanilina clorídrica	Catequina
Flavonoides	90:5:5	Cloreto de alumínio	Quercetina e Rutina
Terpenos e Esteroides	70:30	Lieberman-Burchard + Δ	β -Sitosterol
Cumarinas	50:50:50	KOH + Δ	Cumarina
Saponinas	100:11:11:26	Lieberman-Burchard+ Δ	Escina
Antraquinonas	50:6,75:5	HNO ₃ + KOH 10%	Senosídeo A
Alcalóides	50:6,75:5	Dragendorf	Atropina
Açúcares Redutores	50:20:10:10	Timol + H ₂ SO ₄ 10% + Δ	D-frutose
Derivados Cinâmicos	90:5:5	Cloreto de alumínio	Ác. Cafeico e Ác. clorogênico

Sistemas: 90:5:5 - Acetato de etila: ácido fórmico: água; 70:30 - Tolueno: acetato; 50:50:50 - Éter etílico: acetato de etila: ácido acético 10% (saturação); 100:11:11:26 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:20:10:10 - Acetato de etila: ácido acético: ácido fórmico: água; 50:6,75:5 - Acetato de etila: metanol: água

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com os 4 extratos (CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17), primeiramente foi preparada uma solução estoque de cada extrato, para a qual de 10 mg da amostra foi pesado, diluído com 2 mL de metanol: água (1:1; v/v) e levadas ao banho de ultrassom (Unique[®]) durante 30 minutos para completa solubilização. Foi retirada uma alíquota de 800 μ L da solução estoque para balão volumétrico de 2 mL, sendo o volume aferido com água ultrapura (Purelab[®], Elga LabWater, EUA. Por fim, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 μ m para vials. Os padrões de flavonoides utilizados (vitexina e rutina) foram pesados e diluídos para 10 mL de metanol (grau HPLC, Tedia[®]).

Destas soluções, alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 2 mL, aferindo o volume com água ultrapura. Por fim, as soluções finais foram filtradas em filtro de PVDF 0,45 μ m para vials. Também foi injetada uma solução contendo alíquotas da solução amostra e dos padrões, para confirmar a presença dos compostos na amostra. Ao final, a solução da amostra+padrão foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 μ m para vials.

A análise por CLAE foi realizada num sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 350 nm para a detecção de flavonoides. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] (EUA) equipada com pré-coluna (C18 de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 29 °C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 5-20% B; 10-15 min, 20-25% B; 15-18 min, 25-40% de B; 18-25 min, 40-80% de B; 25-30 min, 80% de B; 30-34 min, 80-5% B; 34- 36 min, 5% B. Para a análise e processamento dos dados, o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado. Os teores foram calculados de acordo com as equações da reta dos padrões: $y = 0,9054x + 0,1589$ (vitexina) e $y = 0,7015x - 0,2726$ (rutina).

2.7 Análise estatística

Diferenças significativas entre os grupos tratados no teste termiticida foram analisados pelo teste t-Student ($p < 0,05$) usando programa Origin 6.0. Desvio-padrão (DP) foi calculado usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e os dados foram expressos como a média das replicatas $\pm$ DP. As concentrações letais para matar 50% (CL50) dos soldados e operários após 2 dias foram calculados por análise de probit usando o software StatPlus[®]2006 (Analyst Soft, Canada).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Actinobactérias possuem metabólitos secundários bioativos contra diversas espécies de insetos (ARASU et al., 2013; GANESAN et al., 2018; MARATHE et al., 2016). Nesse trabalho, foi avaliado o efeito termiticida dos filtrados de cultura obtidos da fermentação de 4 cepas de actinobactérias, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, isoladas do solo da caatinga.

A análise por CCD dos líquidos metabólicos revelou a presença de flavonoides, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares redutores em todas as amostras. Em adição a estes

componentes, CA- 07 e CA-17 contem também terpenos e esteroides e apenas em CA-07 foram identificados taninos condensados (tabela 2).

Tabela 2. Análise química por CCD dos filtrados de cultura.

	CA-02	CA-06	CA-07	CA-17
Flavonóides	+	+	+	+
Derivados cinâmicos	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+
Açúcares Redutores	+	+	+	+
Antraquinonas	-	-	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-
Taninos condensados	-	-	+	-
Terpenos e esteroides	-	-	+	+
Cumarinas	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-

(+) positivo: presença; (-) negativo: ausência.

Baseado nos resultados da CCD, as amostras foram avaliadas por CLAE no comprimento de onda de 350 nm para a detecção dos flavonoides rutina e vitexina. Os cromatogramas de todos os líquidos metabólicos evidenciaram a presença de um ou dois picos identificados como rutina e vitexina (figura 1), que foram confirmados com a co- injeção da amostra com quantidades conhecidas dos padrões. Um terceiro pico foi detectado para CA-02 não relacionado com os padrões usados. O teor de rutina para CA- 02, CA-06, CA-07 e CA-17 foi de $49,63 \pm 0,66$, $35,37 \pm 0,92$, $8,25 \pm 0,55$ e $13,57 \pm 0,33\text{mg\%}$, respectivamente. O teor de vitexina para CA-02 e CA-06 foi de $7,82 \pm 2,98$ e $6,75 \pm 3,95$. Não foi detectada a presença de vitexina para CA-07 e CA-17.

Os filtrados de cultura CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17, provenientes da fermentação de actinobactérias, foram testados quanto a sua toxicidade em soldados e operários de *N. corniger* nas concentrações de 2%, 4%, 10%, 20%, 50% e 100%. Todas as amostras testadas foram termiticidas para operários, com exceção de CA-17. CA-06 foi a única amostra de efeito termiticida para soldados (CL50 1,36%), sendo CA-06 a amostra mais tóxica (CL50 4,05%) (tabela 3).

Figura 1: Análise por CLAE dos filtrados de cultura. O perfil do cromatograma monitorado a 350 nm mostrou a presença de vitexina (pico 1) e rutina (pico 2) com base no tempo de retenção padrão

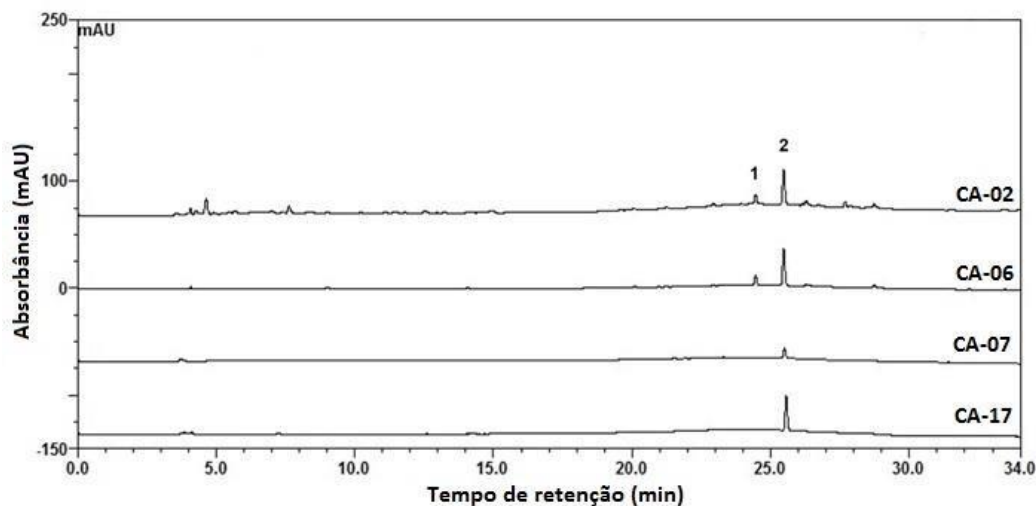


Tabela 3: Toxicidade dos filtrados de cultura sobre *N. corniger*

CL ₅₀ (%)	CA-02	CA-06	CA-07	CA-17
Soldados	ND	1,36	ND	ND
Operários	14	4,05	6,23	ND

CL₅₀: concentração letal necessária para matar 50% dos cupins. ND: não determinado.

Após 2 dias, CA-02 causou morte significativa dos operários nas concentrações de 50 e 100% e após 6 dias, 10% de CA-02 foi significativamente tóxica para os operários (figura 2A). Para os soldados, CA-02 não reduziu significativamente a sobrevivência de soldados após os 7 dias de teste (figura 2B). A CL₅₀ dos operários foi determinada após 2 dias, com valor de 14%.

A atividade termiticida de CA-06 sobre operários e soldados é apresentada na figura 2. Comparado ao controle, as concentrações de 50% e 100% apresentaram toxicidade significativa aos operários no segundo dia de experimento (figura 2C). Quanto aos operários, CA-06 causou a morte significativa depois de 5 dias de experimento (figura 2D). A CL₅₀ foi de 1,36% para soldados e 4,05% para operários.

CA-07 (20, 50 e 100%) reduziu significativamente a sobrevivência de operários em relação ao controle, sendo determinado no segundo dia de teste a CL₅₀ de 6,23% para operários (figura 2E). Para os soldados, CA-07 não foi capaz de causar a morte significativa dos insetos

(figura 2F). A amostra CA-17 não apresentou efeito termiticida para soldados e operários (figura 2G e H).

Os efeitos dos filtrados de cultura nas enzimas digestivas dos cupins também foram analisados. A atividade de exoglucanase dos operários aumentou após o tratamento com CA-02, porém a atividade de endoglucanase não foi alterada. CA-06 não promoveu alteração nas atividades de endoglucanase e exoglucanase de operários, no entanto estimulou a atividade de endoglucanase de soldados. Ainda, as atividades das celulases não foram alteradas quando tratadas com CA-07.

De acordo com Lima et al. (2016), endoglucanases e exoglucanases são as principais enzimas digestivas identificadas em extrato de intestino de *N. corniger*. Operários possuem a função de digerir o alimento para nutrição de outras castas como os soldados (LIMA et al., 2016). A toxicidade de CA-02 para operários e de CA-06 para soldados pode estar associada à estimulação da atividade dessas celulases e desregulação da fisiologia digestiva do inseto. A toxicidade de CA-07 para operários deve estar ligada a outros mecanismos diferentes não relacionados ao sistema digestivo do inseto.

As actinobactérias são conhecidas pela incrível capacidade de se adaptar a condições extremas do ambiente, e isso as torna fontes importantes de metabólitos secundários com as mais variadas bioatividades, tais como alcaloides, policetídeos e averctinas (LIU et al, 2017, BURG et al., 1979; YADAV et al, 2018; ZHANG et al, 2008; MASCHIO et al, 2019; CHAROUSOVÁ et al. 2018).

Existe na literatura vários compostos bioativos isolados de actinobactérias que podem ser aplicados no controle de insetos. Avermectinas são os metabólitos secundários mais conhecidos como inseticidas. São produzidos por *Streptomyces avermitilis* e sua toxicidade é devido a ligação a neurônios musculares de algumas espécies de insetos causando paralisia e morte (Burg et al., 1979; Cox et al., 1995; Tomilova et al., 2016). Filtrado de cultura de actinobactérias de solo foi larvicida para larvas no estágio L3 de *Culex* sp. (RAJESH et al, 2015).

Flavonóides, derivados cinâmicos, saponinas e açúcares redutores foram os grupos químicos encontrados em todos os filtrados de cultura analisados. Terpenos e esteroides foram identificados apenas em CA-07 e CA-17, e em apenas CA-07 foi detectada a presença de taninos condensados. Flavonóides são muito comuns em plantas, porém micro-organismos, incluindo *Streptomyces* sp., também podem produzi-los (BALACHANDRAN et al., 2014). A atividade de flavonoides sobre enzimas de insetos já foi reportada. Os flavonoides taxifilina e quercetina isolados de espécies de árvores coníferas inibiram enzimas detoxificadoras de *Leptinotarsa*

decemlineata (Wang et al., 2016).

A atividade termiticida dos filtrados de cultura podem ser devido a presença de flavonoides. A presença de terpenos e esteroides e ausência de vitexina para CA-17 pode ter desencadeado um efeito negativo ou antagônico na toxicidade sobre os cupins.

Figura 2: Taxa de sobrevivência de operários (A, C e E) e soldados (B, D e F) de *Nasutitermes corniger* tratados com filtrados de cultura de actinobactérias (2-100%). Cada ponto representa a média de 5 replicatas.

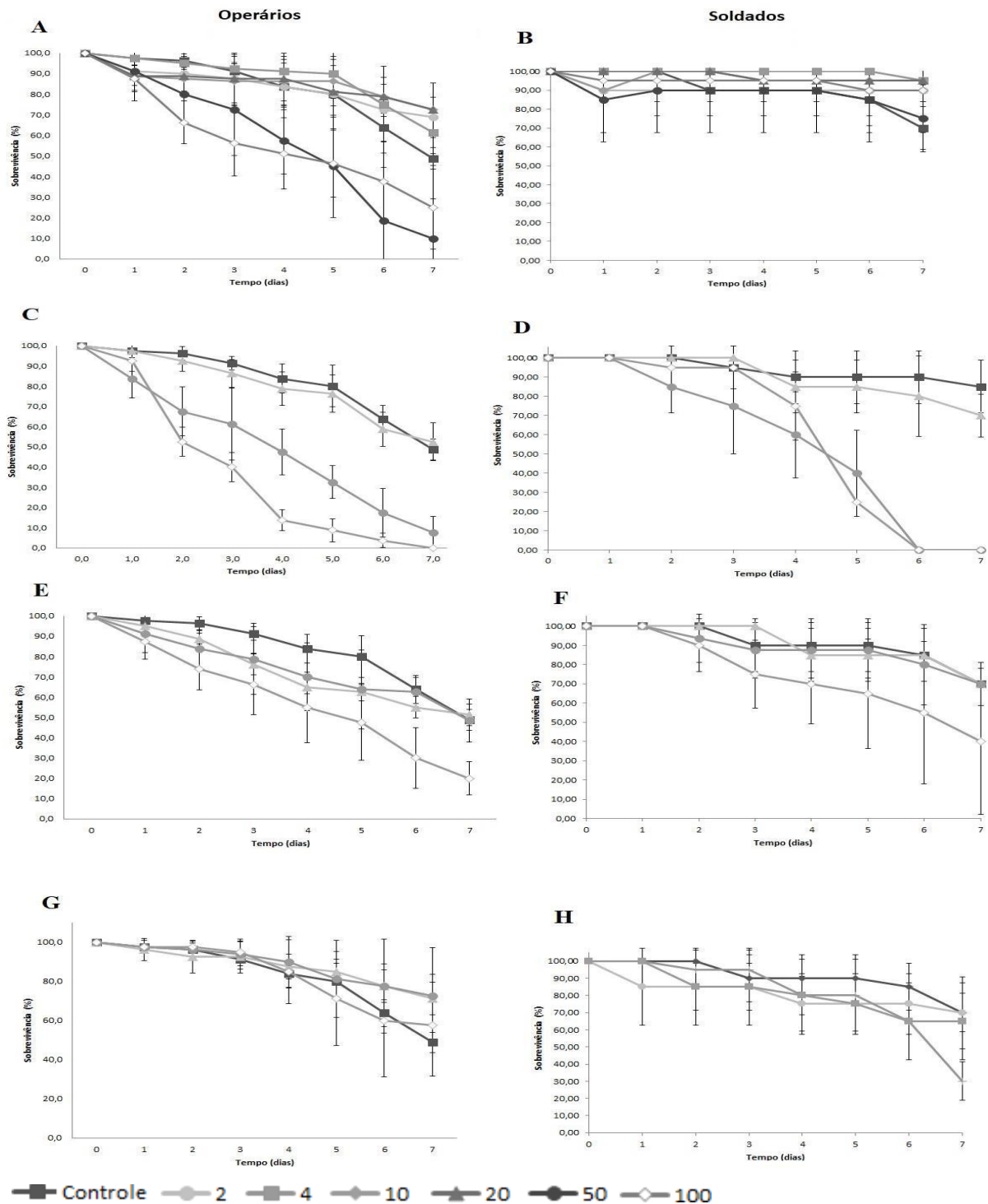
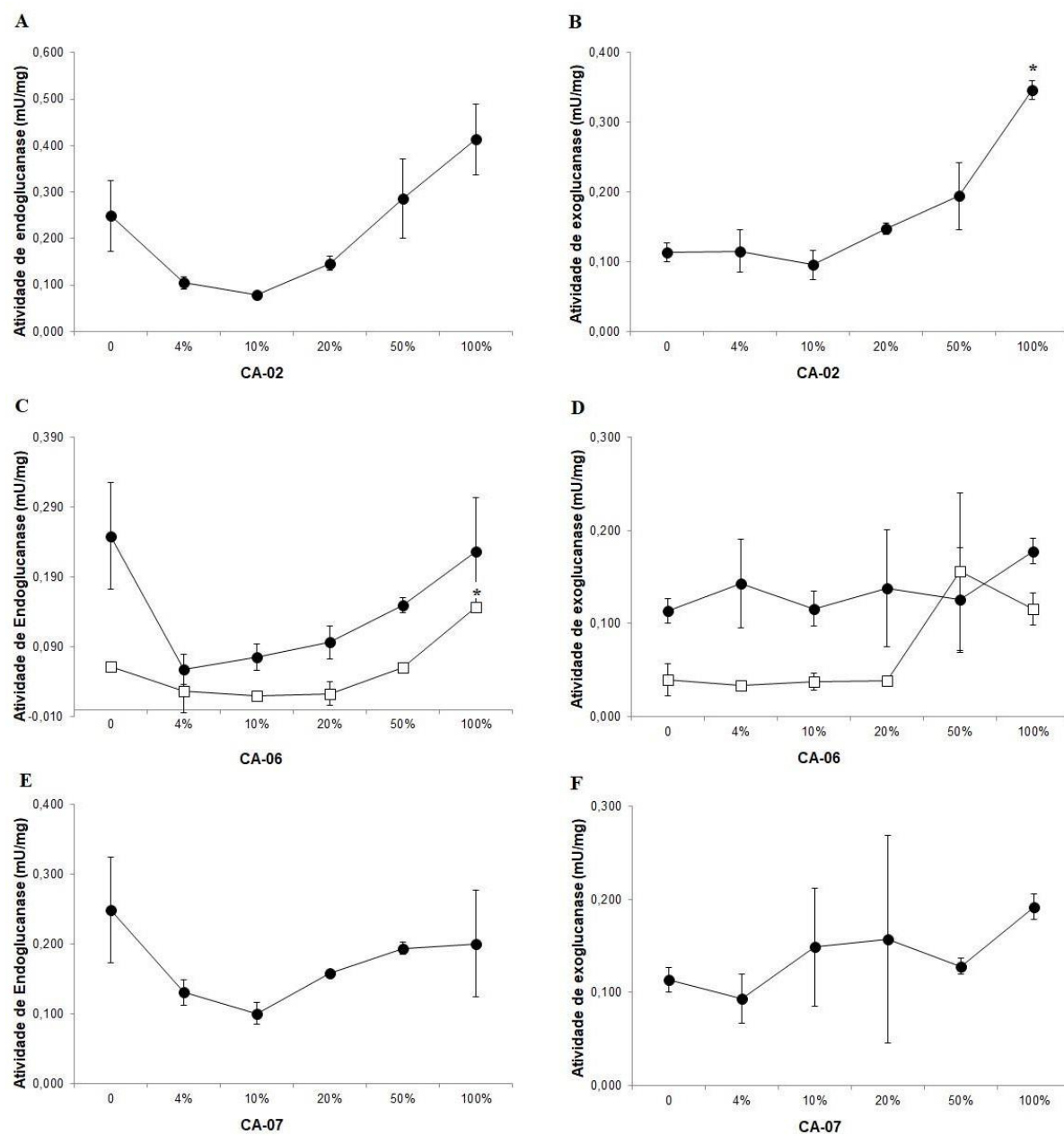


Figura 3: Efeito dos filtrados de cultura na atividade de endoglucanase e exoglucanase de extrato de intestino de operários (-■-) e soldados (-□-) de *N. corniger*.



4. CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho revelam que filtrado de cultura obtidos da fermentação de actinobactérias da Caatinga são fontes promissoras de metabólitos termiticidas, tais como flavonoides. Adicionalmente, o efeito termitica pode estar ligado a desregulação do processo digestivo desses insetos.

5. REFERÊNCIAS

- ABROL, D.P., SHANKAR, U. Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. **Integrated Pest Management, Pesticide Problems**, v. 3, p. 167-200, 2014.
- ARASU, M.V. et al. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BMC Microbiol.** v. 13, p. 105, 2013.
- BALACHANDRAN, C. et al. A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspase dependant pathway. **Chemico- Biological Interactions**, v. 224, p. 24-35, 2014.
- CAO, B., CHEN, X., XU, M., BI, X., GUAN, P., JIANG, Y., XU, J., HAN, L., HUAN, X. Violacin A, a new chromanone produced by *Streptomyces violaceoruber* and its anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p 947-951, 2018.
- CHAROUSOVÁ, I., MEDO, J., HLEBA, L., JAVOREKOVÁ, S. *Streptomyces globosus* DK15 and *Streptomyces ederensis* ST13 as new producers of factumycin and tetrangomycin antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 49, p. 816-822, 2018.
- COSTA-LEONARDO, A. M. **Cupins-Praga: morfologia, biologia e controle**. Rio Claro: DIVISA, 2002 128 p.
- COX, D.L., REMICK, D.M., LASOTA, J.A., DYBAS, R.A., 1995. Toxicity of avermectins to *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae and adults. **J. Econ. Entomol.** v. 88, p.1415-1419.
- DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa et al. (Org.). **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, cap.1, p. 1-18, 2013.
- 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.
- ELBENDARY, A.A. et al. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 25, p. 44-46, 2018.
- FISHEL, F. M. **Pesticide effeccts on nontarget organisms**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2014.
- GANESAN, P., DAVID, R.H.A., REEGAN, A.D., GANDHI, M.R., PAULRAJ, G.M., IGNACIMUTHU, S., AL-DHABI, N. Isolation and molecular characterization of actinomycetes with antimicrobial and mosquito larvicidal properties. **Beni-suef university**

Journal of basic and applied sciences, v. 6, p. 209-217, 2017.

GANESAN, P., STALIN, A., PAULRAJ, G.M., BALAKRISHNA, K., IGNACIMUTHU, S., AL-DHABI, N. Biocontrol and non-target of fractions and compound isolated from *Streptomyces rimosus* on the immature stages of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and the compound interaction with acetylcholinesterase (AChE1).

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 161, p. 120-128, 2018.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A. Nordeste semi-árido: caracterização geral e lista das fanerógamas. 2006, pp. 15-359, in A.M. Giulietti & L.P. de Queiroz (eds.), **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste v. 1, 2006, 488p.

JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B.; SAIGOPAL, D. V. R.; NARASIMHA, G. Production of bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. **Biotechnology Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014. KEENAN, T., MILLS, R., POCOCK, E., BUDHADEV, D., PARMEGGIANI, F., FLITSCH, S., FASCIONE, M. The characterization of a galactokinase from *Streptomyces coelicolor*. Carbohydrate Research, v. 472, p. 132-137, 2019.

KORB, J. Social evolution in termites. In: **Encyclopedia of Animal Behavior**. 2 ed. Germany, 2019, p. 609-616.

LELIS, A. T. **Manual de biodeterioração de madeiras em edificações**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), São Paulo, 2001, 54p.

LIMA, T.A.; DORNELLES, L.P.; OLIVEIRA, A.P.S.; NAPOLEAO, T.H.; PAIVA, P.M.G. An overview on the interface between feeding habits, ecological role and digestive processes of termites. In: **Timothy White. (Org.). Termites and Mites: Distribution Patterns, Biological Importance and Ecological Impacts**. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2015, v. 4, p. 1-34.

ANWAR, S.; BASHARAT, A.; QAMAR, F.; SAJID, I. Insecticidal Activity of Actinomycetes Isolated from Salt Range, Pakistan against Mosquitoes and Red Flour Beetle. **Pakistan J. Zoo.**, v. 46, n. 1, p. 83-92, 2014.

SHAMA, M. Actinomycetes: sources, identification and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 801-832, 2014.

LIU, H., CHEN, Z., ZHU, G., WANG, L., DU, Y., WANG, Y., ZHU, W. Phenolic polyketides from the marine alga-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434. Tetrahedron. v. 73, p. 5451-5455, 2017.

MARATHE, K., KASAR, S., CHAUDHARI, A., MAHESHWARI, V. Purification and

- characterization of a novel heterodimer protease inhibitor from *Streptomyces* spp. VL J2 potential biopesticidal activity against *H. armigera*. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1650-1663, 2016.
- MASCHIO, L., PARNELL, A.E., LEES, N.R., WILLIS, C.L., SCHAFFITZEL, C., STACH, J.E.M., RACE, P.R. Cloning, expression, and purification of intact polyketide synthase modules. **Methods in Enzymology**. In press. 2019.
- MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–746, 2013.
- MELO, I. S. **Biodiversidade e Bioprospecção de micro-organismos da Caatinga**. In: Fórum de apresentação de resultados de pesquisa: avanços e oportunidades, Campinas. Anais. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2014. RE014, 4 p.
- MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modos de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. BRASIL. **Caatinga**. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>> Acesso em: março de 2018
- PRASHITH KEKUDA, T. R.; SHOBBA, K. S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites, **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p.205-256, 2010.
- PRASHITH KEKUDA, T. R.; SHOBBA, K. S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites, **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p.205-256, 2010.
- PUPPALA, K.R., BHAVSAR, K., SONALKAR, V., KHIRE, J.M., DHARNE, M.S. Characterization of novel acidic and thermostable phytase secreting *Streptomyces* (NCIM 5533) for plant growth promoting characteristics. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. In press, 2019.
- RAMBABU, V.; SUBRAMANIYAN, S.; SUBURAMANIYAN, V. Antimicrobial and antiproliferative prospective of kosinostatin — a secondary metabolite isolated from *Streptomyces* sp. **Journal of Pharmaceutical Analysis** v. 5, p. 378–382, 2015.
- RAO K. V. B.; SRINIVASAN, D.; CHRISTO, S. D.; GEORGE, S. L.; KARTHIK, L.; KUMAR, G. Biosynthesis of Zirconium oxide nanoparticles using marine actinobacteria and its applications. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 109-119, 2013.
- SER, H. L.; MUTALIB, M. S. A.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H; LEE, L. H. Evaluation

- of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. **Frontiers of Microbiology**, v. 6, n. 1398, p. 1-11, 2015.
- SHI, L., NWET, T.T., GE, B., ZHAO, W., LIU, B., CUI, H., ZHANG, K. Antifungal and plant growth-promoting activities of *Streptomyces roseoflavus* strain NKZ-259. *Biological Control* V 125, Pages 57-64, 2018.
- SUBRAMANI, R., AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, p. 571– 580, 2012.
- SUGIO, K., MIYAGUNI, Y., YOSHIMURA, T. Damage and ecological characteristics of termite *Neotermes koshunensis* on Taiwan cherry tree *Cerasus campanulata* in Okinawa Island. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, 2018, p. 1424-1429.
- THENMOZHI, M.; SINDHURA, S.; KANNABIRAN, K. Characterization of Antioxidant activity of *Streptomyces* species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 46-52, 2010.
- 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.** v. 140, 2015.
- VALIPOUR, B., MOHAMMADI, S.M., ABEDELAHI, A., MARAGHEH, B.F.A., NADERALI, E., DEHNAD, A., CHAROUDEH, H.N. Culture filtrate ether extracted metabolites from *Streptomyces levis* ABRIINW111 increased apoptosis and reduced proliferation in acute lymphoblastic leukemia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p.216-223, 2018.
- WANG, Z.; ZHAO, Z.; CHENG, X.; LIU, S.; WEI, Q.; SCOTT, I.M. Conifer flavonoid compounds inhibit detoxification enzymes and synergize insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.127, p.1-7, 2016.
- YADAV, A.N.; VERMA, P.; KUMAR, S. et al. Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions and Potential Biotechnological Applications. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. 2018. p. 13–41

4.3. ARTIGO 3

Controle dos insetos praga *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* por *Streptomyces* sp. isolada da Caatinga

Priscilla Andrade de Moura^a; Natália Adriely Ribeiro da Silva^a; Thâmarah de Albuquerque Lima^a; Cilene Rejane Inácio de Magalhães^a; Gláucia Manoela Lima^b; Janete Magali de Araújo^b; Thiago Henrique Napoleão^a; Márcia Vanusa da Silva^a; Patrícia Maria Guedes Paiva^a

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

* Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil. Tel.: +55(81)21268540; fax: +55(81)21268541. E-mail: profa.priscillamoura@gmail.com

RESUMO

Considerando-se a grande riqueza metabólica de actinobactérias, principalmente isoladas de ambientes com condições extremas, bem como a necessidade de novos biopesticidas, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inseticida de *Streptomyces* spp. isolado da Caatinga contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, dois insetos praga agrícolas. Para isso, foram avaliados a repelência, fumigação, toxicidade por contato e o efeito sobre a taxa instantânea de crescimento dos filtrados de cultura obtidos da fermentação da actinobactéria. A cepa CA-02 mostrou atividade positiva no efeito fumigante contra *T. castaneum* e reduziu a taxa instantânea de crescimento para ambos os insetos praga, sendo o melhor resultado obtido na influência do crescimento de *T. castaneum*. Trabalhos que avaliem o potencial de actinobactérias frente a insetos praga ainda são escassos. Assim, se faz necessária a realização de estudos posteriores, para identificar e isolar esses compostos com atividade inseticida presente no filtrado de cultura.

1. INTRODUÇÃO

A proteção de cultivos alimentares de ataques por insetos pragas é uma grande preocupação tanto para a indústria de alimentos e produtores agrícolas, quanto para as organizações de saúde pública e agências ambientais, pois a população avança exponencialmente e, junto a ele, aumenta a demanda por alimentos, o que tem ocasionado o uso exacerbado de pesticidas para proteger as culturas de importância econômica e, consequentemente, aumentar a produtividade. Contudo, essa prática, junto à falta de um planejamento adequado para aplicação dos inseticidas, tem resultado em diversos problemas que incluem: morte de insetos polinizadores e das espécies que controla esses insetos-praga naturalmente, seleção e multiplicação de indivíduos resistentes, contaminação residual em alimentos e diferentes formas de poluição ambiental (ABROL; SHANKAR 2014, FISHEL 2014; PHILLIP; THRONE, 2010; VIJAYABHARATHI et al., 2014).

Por isso, estudos envolvendo a produção de inseticidas biológicos têm sido desenvolvidos, considerando a necessidade de se obter novos compostos para controle de insetos vetores de doenças e pragas agrícolas que não resultem em contaminação ambiental, depósito de resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre populações de insetos benéficos, como os polinizadores (MENEZES, 2015; GOMES et al., 2018; SUBBANNA, et al., 2018).

Os micro-organismos oriundos de ambientes com condições extremas, como a Caatinga, podem ser uma fonte em potencial para a produção de compostos com atividades biológicas de interesse, uma vez que precisam adaptar sua fisiologia para sobreviver nesses ambientes, o que pode gerar grande diversidade de compostos bioativos (CARVALHO et al., 2016; DRUMOND, 2013; RODRIGUES et al., 2018).

O uso de bactérias com propriedades antimicrobianas tornou-se uma das opções mais atraentes para aumentar a sustentabilidade da produção agrícola devido, principalmente, ao baixo custo de produção e uso reduzido de recursos não renováveis. Entre elas, as actinobactérias são a boa alternativa para o manejo de pragas, pois representam uma alta proporção da biomassa microbiana do solo e têm a capacidade de produzir ampla variedade de metabólitos secundários. Várias cepas de actinobactérias têm sido reconhecidas como produtoras de metabólitos bioativos valiosos como antibacterianos, antifúngicos, antibióticos, antiparasitários, inseticidas e herbicidas (ANWAR et al., 2014; SHAMA, 2014; RODRIGUES et al., 2018).

O gênero *Streptomyces* representa o maior dentro filo Actinobacteria, que é composto por bactérias filamentosas Gram- tem sido alvo de inúmeros trabalhos por sua capacidade de

produzir uma ampla gama de compostos bioativos atuantes em diversas atividades biológicas (MANIVASAGAN et al., 2014; SUBRAMANI, AALBERSBERG, 2012; THENMOZHI et al., 2013). Atualmente, mais de 7.000 compostos bioativos com várias aplicações clínicas importantes foram descobertos a partir deste gênero, incluindo compostos com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticâncer, antifúngicas e imunossupressoras (KARAM; WALI, 2015; SER et al., 2015; TAN et al., 2018; SANJIVKUMAR et al., 2019). O estudo de *Streptomyces* isolados da Caatinga ambiente pode ser uma abordagem bastante eficiente para a descoberta de novos metabólitos bioativos (APAK et al., 2016; TAN et al., 2017; 2018).

Considerando estes aspectos, este trabalho objetivou avaliar o potencial de controle frente aos insetos praga *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*, de uma actinobactéria isolada da Caatinga pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Actinobactérias

Para o desenvolvimento deste trabalho, 1 cepa de actinobactéria isoladas de solo da Caatinga e identificada *Streptomyces* sp. Como foi gentilmente cedida pela Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco – UFPEDA. A cultura foi mantida em tubos com meio ISP-2 sólido, sob refrigeração.

2.1 Condições Fermentativas

No processo fermentativo, a cepa *Streptomyces* (CA-02) foi inoculada em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 ml contendo cada um 100 ml de caldo GYM (glicose levedura malte). O Ph foi ajustado para 7,2 antes da esterilização, e os frascos foram então incubados em agitação (150 rpm) por 7 dias a 37 °C. Após a incubação, as culturas foram submetidas à centrifugação e posteriormente à filtração, onde a biomassa microbiana foi desprezada e o filtrado de cultura separado, para ser utilizado nos experimentos de atividade inseticida.

2.2 Atividade Inseticida contra *S. zeamais* e *T. castaneum*

2.2.1 Criação dos Insetos

Foram estabelecidas criações contínuas de *S. zeamais* e *T. castaneum* em condições de laboratório. Os insetos serão acondicionados em frascos de vidro de 1,5 L, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tecido fino para permitir as trocas gasosas. As criações serão mantidas em câmara climática tipo B.O.D, a 28 ± 2 °C, $70 \pm 5\%$ de UR e 24h de fotofase, sendo utilizado como substrato alimentar pó de milho adquirido no Mercado Público de Serra Talhada-PE, com teor de umidade de 13% base úmida (b.u.).

2.2.2 Repelência do filtrado de cultura sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*

Foi avaliado o efeito repelente do filtrado de cultura da actinobactéria CA-02, obtido a partir de processos fermentativos, sobre adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum*. As amostras foram testadas em arenas compostas por dois recipientes plásticos, interligados a um pote central por dois tubos plásticos. Em um dos potes serão colocadas 20 g de pó de milho tratado com o extrato fermentativo, aplicado diretamente no pó de milho, e no outro a mesma quantidade de pó de milho não tratado (testemunha). No pote central foram liberados 10 adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum* e, após 5 dias, os insetos contidos em cada recipiente foram contados. O pó de milho sem insetos foi acondicionado em outro recipiente, para o experimento de emergência da repelência. Os adultos emergidos foram contabilizados após 22 dias de infestação. O índice de repelência (IR) foi avaliado pela fórmula: $IR = 2G / (G + P)$, onde G = % de insetos atraídos no tratamento e P = % de atraídos na testemunha.

Os valores de IR variam entre zero e dois, sendo que $IR = 1$ indica repelência semelhante entre o tratamento e a testemunha (tratamento neutro), $IR > 1$ indica menor repelência do tratamento em relação à amostra testemunha (tratamento atraente) e $IR < 1$ corresponde à maior repelência do tratamento em relação à testemunha (tratamento repelente).

2.2.3 Fumigação do filtrado de cultura sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*

Foi avaliado o efeito fumigante do filtrado de cultura obtido da fermentação de CA-02 sobre adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum* de acordo com a metodologia adaptada de Aslan et al. (2004). Foram utilizadas como câmaras de fumigação, recipientes de vidro (tipo bomboniere), onde foram confinados 10 adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum*, em experimentos individuais para cada espécie.

O filtrado de cultura de Ca-02 foi utilizado nas concentrações de 50 e 100% v/v, sendo impregnado em tiras de papel de filtro de 5 x 2 cm, presas na superfície inferior da tampa dos recipientes. Os recipientes foram fechados, para impedir a saída dos vapores. Passadas 48 horas após a montagem dos experimentos, foi avaliada a porcentagem de mortalidade dos insetos.

2.2.4 Efeito do filtrado de cultura sobre a taxa instantânea de crescimento (r_i) de *S. zeamais* e *T. castaneum*

A taxa instantânea de crescimento (r_i) tem sido utilizada na avaliação dos efeitos letal e subletal de inseticidas em pragas e seus inimigos naturais, por apresentar resultados mais consistentes, em relação a outras técnicas usadas em toxicologia. Essa taxa é uma medida direta do crescimento populacional, e também integra a sobrevivência e fecundidade, como a taxa intrínseca de crescimento (r_m), e ambas proporcionam resultados semelhantes (WALTHALL; STARK, 1997).

Desse modo, foi avaliado o efeito do filtrado de cultura de CA-02 sobre a taxa instantânea de crescimento de adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum*. Neste experimento, as unidades experimentais consistiram de potes fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tecido fino para permitir as trocas gasosas. Cada pote continha 20 g de grãos de milho. O filtrado de cultura foi aplicado diretamente nos grãos de milho com pipeta automática nas concentrações de 50 e 100%, tendo sido os grãos homogeneizados por 30 segundos. Em cada pote foram liberados 10 adultos não sexados de *S. zeamais* com 0 a 15 dias de idade. As unidades experimentais foram armazenadas por 60 dias em câmara climatizada ajustada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ UR e fotofase de 24 horas.

Após os 60 dias, foram avaliados o número de insetos emergidos e calculada a taxa instantânea de crescimento populacional. Para este cálculo utilizou-se a equação: $r_i = [\ln(N_f/N_0)/\Delta T]$, onde N_f = Número final de insetos; N_0 = Número inicial de insetos; e ΔT = Variação de tempo (número de dias em que o ensaio foi executado). Valor positivo de r_i indicou

crescimento populacional; $r_i = 0$ significou que a população permaneceu estável; e valor negativo de r_i indica declínio da população até a extinção, quando $N_f = 0$ (WALTHALL & STARK, 1997).

2.2.5 Toxicidade por contato do filtrado de cultura sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*

O ensaio de toxicidade de contato foi realizado de acordo com Liu e Ho (1999). O filtrado de cultura de CA-02 foi utilizado nas concentrações de 50 e 100%. Alíquotas (0,5 ml) das soluções teste foram aplicadas na superfície dorsal do tórax de insetos usando uma micropipeta, e os insetos no controle negativo foram tratados com água. Após este procedimento, os insetos foram transferidos para recipientes plásticos (diâmetro de 2,5 cm, comprimento de 5,5 cm) e a taxa de mortalidade foi registrada diariamente por 8 dias. Cada experimento teve quatro repetições

3. Análise Estatística

Diferenças significativas entre os grupos tratados foram analisados pelo teste t-Student ($p < 0,05$) usando programa Origin 6.0. Desvio-padrão (DP) foi calculado usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e os dados foram expressos como a média das replicatas $\pm$ DP.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. 1 Repelência e Fumigação de *S. zeamais* e *T. castaneum*

A actinobactéria identificada como *Streptomyces* sp. CA-02 foi cultivado sob agitação e, após o cultivo, o filtrado de cultura obtido foi utilizado para avaliar o índice de repelência (Tabela 1) e fumigação (Figura 1) contra *S. zeamais* e *T. castaneum*, em duas concentrações: 50 (1) e 100% (2).

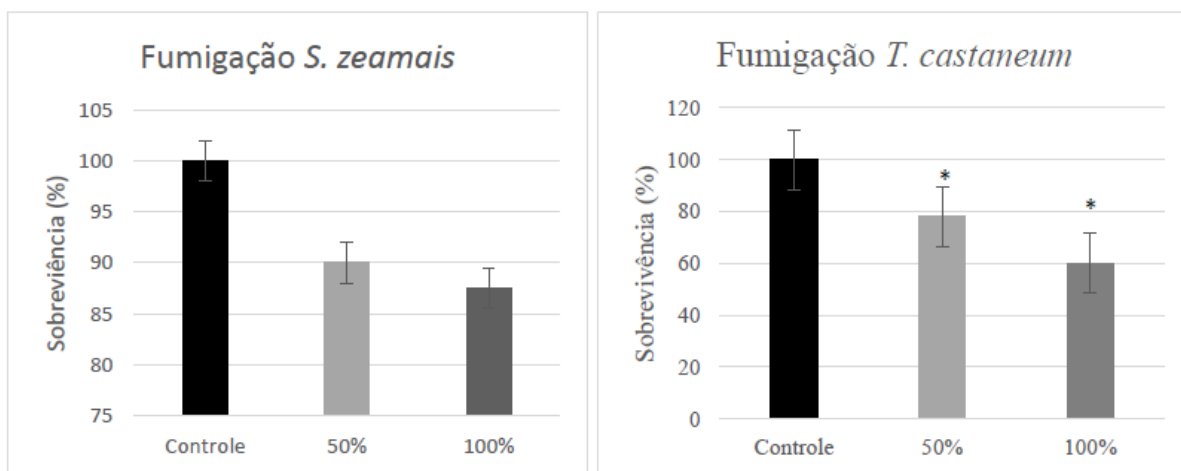
Tabela 1. Efeito repelente do filtrado de cultura de CA-02 sobre adultos de *S. zeamais* e *T. castaneum*, Temperatura.: $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, Umidade relativa: $70\pm 5\%$ e fotofase: 24 horas.

Inseto	Extrato fermentativo	Adultos Atraídos (%)		IR±DP ¹	IS ²	FC;
		Extrato	Testemunha			
<i>S. zeamais</i>	FC1 FC2	4,5	5,5	0,9 ± 0,2	N	
		5,7	4,25	1,15± 0,6	N	
<i>T. castaneum</i>	FC 1 FC2	4,25	5,75	0,85± 0,41	N	
		4,75	6	0,9 ± 0,47	N	

filtrado de cultura; IR: índice de repelência; R: repelente; N: não-repelente.

1: concentração 50%; 2: concentração 100%

Figura 1. Efeito fumigante do filtrado de cultura obtido a partir do cultivo de CA-02 sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*. (50% e 100 %: concentração do filtrado de cultura 100% utilizado no experimento).



Nos resultados obtidos para repelência, é possível observar que não houve efeito repelente nem atraente das amostras testadas para ambos os insetos praga, uma vez que o valor de IR está próximo a 1, considerando-se o desvio padrão em cada teste, o que indica atividade neutra de repelência.

Para atividade de fumigação, observou-se que nos resultados contra o inseto *S. zeamais*, não houve diferença significativa entre as amostras e o controle, com valor de $P > 0,05$. Porém para a fumigação contra *T. castaneum* houve aumento da mortalidade com as amostras teste, apresentando diferença significativa entre as amostras e o controle a partir da aplicação do teste t ($P < 0,01$). Esse resultado sugere que o filtrado exerceu ação tóxica ao *T. castaneum*.

quando este foi exposto continuamente, por um certo período de tempo.

As actinobactérias têm sido relatadas na literatura como possuidoras de potencial para o controle biológico de insetos, através da produção de metabólitos secundários ativos (PHILLIPS, THRONE, 2010). Porém, trabalhos que avaliem a atividade de actinobactérias contra insetos praga são bastante escassos.

Marathe et al., (2016) isolaram e purificaram o inibidor de protease (PT) a partir do sobrenadante gerado nos processos fermentativos de *Streptomyces* spp., que causou alteração no ganho de peso e no desenvolvimento de larvas, pupas e indivíduos adultos de *Helicoverpa armígera*.

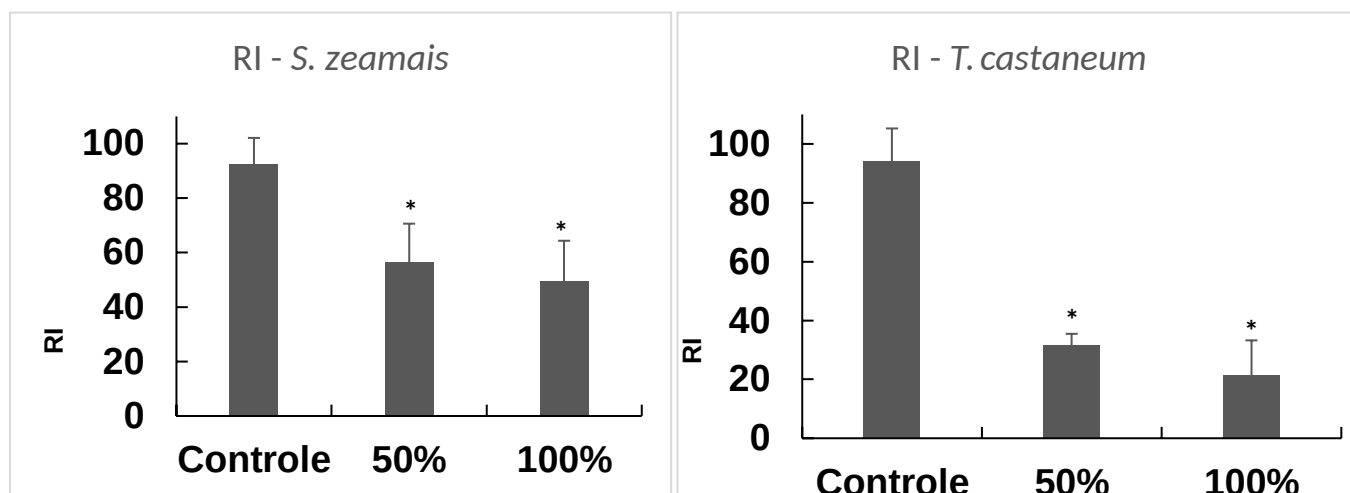
Anwar et al., (2014) obtiveram resultados significativos para atividade fumigante de sobrenadantes obtidos a partir da fermentação de *Streptomyces rochei*, *Streptomyces minutiscleroticus* e *Streptomyces phaeoluteigriseus* contra larvas e adultos do inseto praga *T. castaneum*, chegando a 100% de mortalidade das larvas para algumas cepas microbianas. Nas análises cromatográficas também realizadas, foi possível notar a grande diversidade de metabólitos secundários produzidos, que podem estar proporcionando essa atividade agindo separadamente ou em conjunto.

Em estudos realizados anteriormente (MOURA et al., a ser submetido) foi realizada a caracterização química do filtrado de cultura da actinobactéria CA-02, no qual foi possível observar a variedade de compostos por ela produzidos durante o processo fermentativo, dentre eles flavonoides, açúcares redutores e derivados cinâmicos, o que reforça a importância de se explorar esses micro-organismos em busca de novos compostos que atuem no controle de insetos praga.

2.2 Efeito do filtrado de cultura sobre a taxa instantânea de crescimento (r_i) de *S. zeamais* e *T. castaneum*

Em relação à taxa instantânea de crescimento (r_i) (Figura 2), houve diferença significativa entre a amostra testada e o controle ($p < 0,05$) tanto para *S. zeamais*, quanto para *T. castaneum*. Porém, uma alteração maior na taxa instantânea de crescimento foi obtida na concentração 100% contra o *T. castaneum*.

Figura 2. influência na taxa instantânea de crescimento (ri) do filtrado de cultura obtido a partir do cultivo de CA-02 sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*. (50% e 100 %: concentração do filtrado de cultura 100% utilizado no experimento).



Magalhães et al. (2015) avaliaram o efeito fumigante e o efeito sobre a taxa instantânea de crescimento (ri) de óleos essenciais vegetais sobre *T. castaneum*. Os efeitos de atividade fumigante não foram tão satisfatórios, porém dois óleos essenciais, extraídos de *Croton heliopofolius* e *Croton pulegiurus* proporcionaram menor taxa de crescimento instantâneo em relação ao controle, reforçando a nova tendência pela busca por compostos bioinseticidas. O trabalho de Lira et al. (2015) avaliou a atividade inseticida do óleo essencial de *Alpinia purpurata* contra *S. zeamais* e obteve resultado significativo no método de fumigação, com o aumento da taxa de mortalidade dos insetos praga; a caracterização química desse óleo essencial revelou a presença de 30 constituintes voláteis, sendo a maior parte mono e sesqui-terpenos.

2.3 Toxicidade por contato do filtrado de cultura sobre *S. zeamais* e *T. castaneum*

Para este teste, alíquotas de 0,5 mL do filtrado de cultura de CA-02 foram aplicadas na superfície dorsal do tórax dos insetos *S. zeamais* e *T. castaneum*. A actinobactéria CA-02 não se mostrou tóxica por contato para ambos os insetos praga testados e, por isso, os resultados de mortalidade por toxicidade não foram significativos. Este resultado sugere que os metabólitos secundários encontrados no filtrado de cultura de Ca-02 não são absorvidos pelo dorso nos insetos. Desse modo, a actinobactéria tem potencial inseticida, frente aos demais resultados, mas os seus metabólitos não atuam por esse mecanismo (SANTOS et al., 2014).

Atualmente, a aplicação de agentes químicos ainda é um método muito utilizado para controlar as doenças vegetais e os insetos praga. Porém, a maioria dos produtos químicos

utilizados como inseticidas no setor agrícola para proteção de cultivos tem efeitos indesejáveis em seres vivos, além de serem grandes poluidores ambientais. Por isso têm crescido o interesse pela utilização de agentes de biocontrole, principalmente espécies vegetais e actinobactérias (CARVALHO et al., 2016; GOMES, ET AL., 2018; LI et al., 2015).

Habib et al. (2016) avaliou a toxicidade de extratos metanólicos preparados a partir das flores de *Calotropis gigantea* contra *T. castaneum*, sugerindo que a espécie vegetal apresenta potencial inseticida para o controle dos insetos praga. Silva-Bessa et al. (2019) encontraram atividade inseticida contra *S. zeamais* nos extratos orgânicos produzidos com folhas de *Anadenanthera columbrina*, planta endêmica da Caatinga.

Rajesh et al. (2015) revelaram que os metabólitos secundários tetraciclina, avermectina, macrotetrolides e flavonoides, oriundos de extratos orgânicos de acetato de etila obtidos a partir do cultivo de actinobactérias, foram tóxicos para insetos do gênero *Culex*, que é um vetor de doenças, como a filariose. Em trabalhos realizados anteriormente (Moura et al., a ser submetido) foi detectada a presença de flavonoides no filtrado produzido pela actinobactéria CA-02, o que sugere que a atividade inseticida evidenciada neste estudo pode estar relacionada à presença desse composto no filtrado de cultura.

3 CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, foi possível evidenciar dados sobre atividade inseticida de uma actinobactéria isolada da Caatinga e pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A cepa CA-02 mostrou atividade positiva nos ensaios que avaliaram o efeito fumigante e a influência na taxa instantânea de crescimento, sendo os melhores resultados contra o inseto praga *Tribolium castaneum*. Trabalhos que avaliem esse potencial ainda são escassos, o que reitera a importância dos dados apresentados. Desse modo, estudos posteriores são necessários para identificar e isolar esses compostos com atividade inseticida produzidos por *Streptomyces* spp.

4 REFERÊNCIAS

- ABROL, D.P., SHANKAR, U. Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. **Integrated Pest Management, Pesticide Problems**, v. 3, p. 167-200, 2014.
- 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.
- APAK, R. et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028-1045, 2016.
- ASLAN, İ., H. ÖZBEK, Ö. ÇALMASUR & F. ŞAHİN. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Ind. Crop.**
- CARVALHO, RMM; SILVA, MR; CARVALHO, FCT, REBOUÇAS, RH; SOUZA, OV. BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO EM SOLO RIZOSFÉRICO DA CAATINGA. **Revista Geonorte**, Edição Especial 5, v. 7, n. 26, p. 48-60, 2016.
- DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeireiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, cap.1, p. 1-18, 2013.
- FISHEL, F. M. **Pesticide effects on nontarget organisms**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2014.
- GOMES, E. B.; DIAS, L. R. L.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 17, p. 552-559, 2018.
- HABIB, M. R.; KARIM, M. R. Chemical characterization and insecticidal activity of *Calotropis gigantea* L. flower extract against *Tribolium castaneum* (Herbst). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 12, p. 996-999, 2016.
- LI, Y.-Y. et al. Prevalence and diversity of *Wolbachia* bacteria infecting insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 93-100, 2015.

- LIRA, C. S. et al. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v. 71, p. 95-100, 2015.
- LIU, Z. L. & S. H. HO. 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). **Journal of Stored Products Research**, v. 35.
- MAGALHÃES, CRI et al. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. a00101s1, p. 1150-1158, 2015.
- MANIVASAGAN, P. et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological research**, v. 169, n. 4, p. 262-278, 2014.
- MARATHE, K.; KASAR, S.; CHAUDHARI, A.; MAHESHWARI, V. Purification and characterization of a novel heterodimer protease inhibitor from *Streptomyces* spp. VL J2 with potential biopesticidal activity against *H. armígera*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1650-1663, 2016.
- MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modos de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2015.
- PHILLIPS, T. W.; THRONE, J. E. Biorational approaches to managing stored-product insects. **Annual review of entomology**, v. 55, 2010.
- RAJESH, K.; DHANASEKARAN, D.; TYAGI, B. K. Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex larvae* (Diptera: Culicidae). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 14, n. 2, p. 116-122, 2015.
- 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
- SANTOS, T. **Defensivos Agrícolas – apostila**. If Cursos, 2014. Disponível em: <<http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/08-45-16-apostiladefensivosagricolas.pdf>> Acesso em: março de 2018.
- SHAMA, M. Actinomycetes: sources, identification and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 801-832, 2014.

- SILVA-BESSA, C. M. A. et al. Evaluation of the insecticidal potential of leaf extracts of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb) Altschul against *Tetranychus urticae* Koch and *Sitophilus zeamais* Mots. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 4, n. 1, p. 048-056, 2019.
- SUBBANNA, A. R. N. S. RAJASEKHARA, H.; STANLEY, J.; MISHRA, K. K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal perspectives of chitinolytic bacteria in agricultural pests management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 116, p. 52-66, 2018.
- SUBRAMANI, R., AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, p. 571– 580, 2012.
- TAN, L. T. H. et al. Streptomyces sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 276, 2017.
- TAN, L. T. H. et al. Antioxidative Potential of a Streptomyces sp. MUM292 Isolated from Mangrove Soil. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.
- VIJAYABHARATHI, R. et al. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidopteran insects (Noctuidae: Lepidoptera). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 4, p. 759-769, 2014.
- WALTHALL, W. K.; STARK, J. D. A comparison of acute mortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.37, p.45-52, 1997.

5. CONCLUSÕES

- A prospecção química evidenciou a presença de flavonoides, que foi confirmada com a dosagem *in vitro*; açúcares redutores e derivados cinâmicos em CA-02, CA- 06, CA-07 e CA-17
- CA-02, CA-06, CA-07 e CA-17 apresentaram atividade antioxidante total ATT, bem como redução dos radicais DPPH, ABTS, NO, com os melhores resultados obtidos por CA-02;
- Filtrado de cultura obtidos da fermentação de actinobactérias da Caatinga são fontes promissoras de metabólitos termiticidas;
- A cepa Ca-02 apresentou atividade positiva no efeito fumigante e taxa instantânea de crescimento, sendo melhores resultados obtidos contra o inseto praga *Tribolium castaneum*.
- Estudos posteriores são necessários para identificar e isolar esses compostos com atividade inseticida e antioxidante presente nos filtrados de cultura produzidos por *Streptomyces* spp.

REFERÊNCIAS

- ABABUTAIN, I. M.; AZIZ, Z. K. A.; AL-MESHHEN, N. A. Lyncomycin antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* sp. Isolated from Saudi Arabia Soil II – Extraction, Separation and Purification of Lincomycin. **Canadian jornal of Pure and Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 1905-1912, 2012.
- ABROL, D.P., SHANKAR, U. Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. **Integrated Pest Management, Pesticide Problems**, v. 3, p. 167-200, 2014.
- ABROL, D.P., SHANKAR, U. Pesticides, Food Safety and Integrated Pest Management. **Integrated Pest Management, Pesticide Problems**, v. 3, p. 167-200, 2014. ACHEAMPONG, A., AYERTEY, J.N., EZIAH, V.Y., IFIE, B.E. Susceptibility of selected maize seed genotypes to *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 81, p. 62-68, 2019.
- ALVAREZ, A. et al. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metal. **Chemosphere**, v. 166, p. 41-62, 2017.
- ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos e Ciência**, v. 12, 2007.
- AMSAVENI, R.; SURESHKUMAR, M.; VIVEKANANDHAN, G.; BHUVANESHWARI, V.; KALAISELVI, M. Screening and isolation of pigment producing Actinomycetes from soil samples. **International Journal of Biosciences and Nanosciences**, v. 2 n. 2 p. 24-28, 2015.
- ANWAR, S.; BASHARAT, A.; QAMAR, F.; SAJID, I. Insecticidal Activity of Actinomycetes Isolated from Salt Range, Pakistan against Mosquitoes and Red Flour Beetle. **Pakistan J. Zoo.**, v. 46, n. 1, p. 83-92, 2014.
- ATTIMARAD, S. L.; EDIGA, G. N.; KARINGAR, A. A.; KARADI, R.; CHANDRASHEKHAR, N.; SHIVANNA, C. Screening, isolation and purification of actinobacterial agents from marine actinomycetes. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n.2, p. 394-402, 2012.
- BARBA, F. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORLIEN, V. Bioaccessibility of bioactive compounds from

fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 195–206, 2017.

BEHIE, S. W.; BONET, B.; ZACHARIA, V. M.; MCCLUG, D. J.; TRAXLER, Molecules to ecosystems: actinomycete natural products *in situ*. **Frontiers of Microbiology**, v. 7 n. 2149, 2017.

BHATTI, Asma Absar; HAQ, Shamsul; BHAT, Rouf Ahmad. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, 2017.

BOTTON, M., I. LORINI, AFONSO, A. P. S. Ocorrência de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura da videira no Rio Grande do Sul. **Neotrop. Entomol**, v. 34, p. 355-356, 2005.

BOYER S, ZHANG H, LEMPÉRIÈRE G. A review of control methods and resistance mechanisms instored-product insects. **Bull Entomol Res**, v. 102, p. 213–229, 2012.

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.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15– 25, 2013.

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.

CAVALCANTI, F. G.; MARTINS, C. M.; SILVEIRA MARTINS, S. C. Interações bióticas entre actinobactérias e rizóbios em solos da região semiárida brasileira. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 26, p.1010-1037, 2017.

CONSTANTINO, R. 2016. **On-line termite database**. Brasília, [s.d.]. Disponível em: <http://164.41.140.9/catal/> Acesso em: janeiro de 2017.

COSTA-LEONARDO, A. M. **Cupins-Praga: morfologia, biologia e controle**. Rio Claro: DIVISA, 2002 128 p.

DEYA, T. P.; CHAKRABORTYA, S.; KAVJAINA, K. K.; SHARMAA, A.; KUHADAB, R. C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solidstate fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology** v. 53, p. 60-74, 2016.

DONG-RYUNG, L.; SUNG-KWON, L.; BONG-KEUN, C.; JINHUA, C.; YOUNG-SIL, L.; SEUNG, H. Y.; JOO-WON, S. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, p. 962-967, 2014.

DRUMOND, M. A. Potencialidades de algumas espécies arbóreas madeiras do bioma Caatinga. In: SILVA, Márcia Vanusa *et al.* (Org.) **A Caatinga e seu potencial**. 23 ed. Recife: Ed. Universitária, cap.1, p. 1-18, 2013.

EMBRAPA. **Biodiversidade e bioprospecção de microrganismos da Caatinga**. 2009. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/29362/biodiversidade-e-bioprospeccao-de-microrganismos-da-Caatinga>>. Acesso em: janeiro de 2018.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Funcional Foods**, v. 18, p.811-819, 2015. FAO, 2009. **Post-harvest Losses Aggravate Hunger**. FAO Media Centre. Disponível em: <http://www.fao.org/news/story/en/item/36844/icode>.

FARIAS, P. M. **Bioecologia de *Tribolium castaneum* (H.) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2010_1/tribolium/index.htm. Acesso em: março de 2018.

FAZOLIN, M.; C. R., DE OLIVEIRA DAMACENO, J. E., DE ALBUQUERQUE, E. S., DA SILVA CAVALCANTE, A. S., ESTRELA, J. L. V. 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.

FISHEL, F. M. **Pesticide effects on nontarget organisms**. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2014.

FLARDH, K.; BUTTNER, M J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 36, 2009.

FONTES, L.R.; ARAUJO, R.L. Os cupins. In: MARICONI, F.A.M. (coord.). **Insetos e outros invasores de residências**, FEALQ, Piracicaba, p.35-90, 1999.

GADELHAK, G.; EL-TARABILY, K. A.; AL-KAABI, F. K. Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. **Int J Agri Biol**, v. 7, n. 4, p. 627- 633, 2005.

GALLO, D., O. NAKANO, S. SILVEIRA NETO, R.P.L. CARVALHO, G.C. BAPTISTA, E. BERTI FILHO, J.R.P. PARRA, R.A. ZUCCHI, S.B. ALVES, J.D. VENDRAMIN, L.C. MARCHINI, J.R.S. LOPES; C. OMOTO. **Entomologia Agrícola**. FEALQ. 920p, 2002.

GAO-YI, T.; TIANGANG, L.; Rational synthetic pathway refactoring of natural products biosynthesis in Actinobactéria. **Metabolic Engineering**, v. 39, p. 228–236, 2017.

GARDA, A. A. et al. Os animais vertebrados do Bioma Caatinga. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 29-34, 2018.

GARG, A.; PALIYA, B. S.; VERMA, S.; JADAUN, V. Low molecular weight thiols: glutathione (GSH), mycothiol (MSH) potential antioxidant compound from actinobacteria **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 117-120, 2013.

GETU, B. H. E. Host type and textures on the survival of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) parental and filial generations. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 1, p. 622-626, 2018.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A. Nordeste semi-árido: caracterização geral e lista das fanerógamas. 2006, pp. 15-359, in A.M. Giulietti & L.P. de Queiroz (eds.), **Diversidade e caracterização das fanerógamas do semi-árido brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste v. 1, 2006, 488p.

GOMES, E. B.; DIAS, L. R. L.; MIRANDA, R. C. M. Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 17, p. 552-559, 2018.

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.

GRÜNWALD, S. The red flour beetle *Tribolium castaneum* as a model to monitor food safety and functionality. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 135, p. 111-122, 2013.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, p.1-32, 1990.

HASSAN, S. S.; SHAIKHB, A. L. Marine actinobacteria as a drug treasure house **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 46–57, 2017.

HATTING, J. L.; MOORE, S. D.; MALAN, A. P. Microbial control of phytophagous invertebrate pests in South Africa: current status and future prospects. **Journal of invertebrate pathology**, 2018.

HAUFF, S. N. **Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga**. 2010, 54 p. Disponível em: www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/representativconservcaat_shauff_revisojoo_03_produto_final_203.pdf.> Acesso em: abril de 2017.

HIGASHI, M.; ABE, T. Global diversification of termites driven by the evolution of symbiosis and sociality. In: ABE, S.; LEVIN, S.A., HIGASHI, M. (Orgs.). **Biodiversity: an ecological perspective**. New York: Springer, p. 83-112, 1997.

ISLAM, W. et al. Eco-Friendly Approaches for the Management of Red Flour Beetle: *Tribolium castaneum* (Herbst). **Science Letters**, v. 5, n. 2, p. 105-114, 2017.

JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B.; SAIGOPAL, D. V. R.; NARASIMHA, G. Production of bioactive compounds by Actinomycetes and their antioxidant properties. **Biotechnology Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

KARTHIK, L.; KUMAR, G; RAO, K. V. B. Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 325- 332, 2013.

KEKUDA, P. T. R.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Potent insecticidal activity of two *Streptomyces* species isolated from the soil of the Western ghats of Agumbe, Karnataka. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 29-32, 2010.

- KRISHNA, K., WEESNER, F. M. Biology of termites. **Academic Press**, v. 1, pp. 1-17, 1969.
- LAZZARI, S. M.N., KARKLE, A.F., LAZZARI, F.A. Resfriamento artificial para o controle de Coleoptera em arroz armazenado em silo metálico. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, p. 293- 296, 2006.
- LECHEVALIER, M. P. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 71, n. 6, p. 934-944, 1968.
- LELIS, A. T. **Manual de biodeterioração de madeiras em edificações**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), São Paulo, 2001,54p.
- LETEK, M.; FIUZA, M.; VILLADANGOS, A. F.; MATEOS, L. M.; GIL, J. A. LI, L. et al. Multiplexed site-specific genome engineering for overproducing bioactive secondary metabolites in actinomycetes. **Metabolic engineering**, v. 40, p. 80-92, 2017.
- LI, Y.-Y. et al. Prevalence and diversity of *Wolbachia* bacteria infecting insect pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 62, p. 93-100, 2015.
- LIA, L., ZHENG, G., CHEN, J., GEC, M., JIANG, W., LU, Y. Secondary metabolites in actinomycetes. **Metabolic Engineering**, v. 40, p. 80–92, 2017.
- LIMA, S. M. A. et al. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 711-723, 2017.
- LOECK, A. E. **Pragas de produtos armazenados**. Pelotas: EGUPEL, 2002. 113 p.
- LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 63, p. 1–10, 2013.
- LORINI, I.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, F. A.; HENNING, A. A. **Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas**. Embrapa, Brasília-DF. 2015. 88 p.

MANIMARAN, M.; GOPAL, J. V.; KANNABIRAN, K. Antibacterial activity of *Streptomyces* sp. VITMK1 isolated from mangrove soil of Pichavaram, Tamil Nadu, India. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 499-506, 2017.

MANIMARAN, M.; GOPAL, J. V.; KANNABIRAN, K. Antibacterial activity of *Streptomyces* sp. VITMK1 isolated from mangrove soil of Pichavaram, Tamil Nadu, India. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 499-506, 2017.

MANIVASAGAN, P. et al. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological research**, v. 169, n. 4, p. 262-278, 2014.

MARATHE, K.; KASAR, S.; CHAUDHARI, A.; MAHESHWARI, V. Purification and characterization of a novel heterodimer protease inhibitor from *Streptomyces spp.* VL J2 with potential biopesticidal activity against *H. armígera*. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1650-1663, 2016.

MARK, B. H.; THOMPSON, G. D.; SUBRAMANYAMB, B.; ATHANASSIOU, C. G. Spinosad: a new natural product for stored grain protection. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, p. 131-146, 2011.

MARTINS, C. M.; PINHEIRO, M. S.; FIÚZA, L. M. C. G.; OLIVEIRA, A. V.; MARTINS, S. C. S. Comunidade microbiana cultivável do solo rizosférico de leguminosas no semiárido brasileiro. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 2858-2868, 2014.

MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–746, 2013.

MELO, I. S. **Biodiversidade e Bioprospecção de micro-organismos da Caatinga**. In: FÓRUM DE APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS DE PESQUISA: AVANÇOS E OPORTUNIDADES, Campinas. Anais. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2014. RE014, 4 p.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modos de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005.

MESQUITA, M. O. M.; PINTO, T, M. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 119- 249, 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. BRASIL. **Caatinga**. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>> Acesso em: março de 2018.

MUGO, S. 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.

MYLES, T. G. **Termite biology, Urban Entomology Programme**. 2005. Disponível em: [http:// www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm](http://www.utoronto.ca/forest/termite/termite.htm). Acesso: janeiro de 2018.

NAFIS, A. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plant Aloe vera: Isolation, antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity assays and taxonomic study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 10, p. 513, 2018.

NAKAMURA, C. S. **Uso de Defensivos Agrícolas Biológicos: uma Análise Técnica e de Mercado** – Dissertação: Mestrado em Engenharia Bioquímica, Universidade de São Paulo – USP. 2014.

NATTUDURAI, G., IRUDAYARAJ, S. S., PAULRAJ, M. G., BASKAR, K., IGNACIMUTHU, S. Insecticidal and repellent activities of *Toddalia asiatica* (L.) extracts against three major stored product pests. **Entomol Ornithol Herpetol**, v. 4, p.148, 2012.

NORNBERG, S. D., D. E. NAVA, A.D. GRUTZMACHER, J. M. S. BENTO, A. L. OZELAME & L.K. HUBNER. Flutuação populacional e distribuição de *Sitophilus zeamais* em pomares de pessegueiro e macieira. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 48, p. 358-364, 2013.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

PEREZ-MENDONZA, J. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). **J. Stored Prod. Res.** v. 35, p. 107-115, 1999.

PRADO, D. E. **As Caatingas da America do Sul**. In: Leal IR, Tabarelli M, da Silva JMC, editors. Ecologia e conservação da Caatinga. Brasil: Editora Universitária UFPE; 2003. p.3–74.

PRASHITH KEKUDA, T. R.; SHOBBA, K. S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites, **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p.205-256, 2010.

PREVIATI, R.; SILVA, J. R. R.; DE SOUZA, C. R.; JANKE, L. Isolamento e quantificação das populações das bactérias em geral e de actinomicetos presentes no solo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 155–160, 2012.

RADHAKRISHNAN, M. et al. In vitro antioxidant activity and antimicrobial activity against biofilm forming bacteria by the pigment from Desert soil *Streptomyces* sp. D25. **Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol**, v. 6, n. 06, p. 148-150, 2016.

RAJESH, K.; DHANASEKARAN, D.; TYAGI, B. K. Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex larvae* (Diptera: Culicidae). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 14, n. 2, p. 116-122, 2015.

RAMBABU, V.; SUBRAMANIYAN, S.; SUBURAMANIYAN, V. Antimicrobial and antiproliferative prospective of kosinostatin — a secondary metabolite isolated from *Streptomyces* sp. **Journal of Pharmaceutical Analysis** v. 5, p. 378–382, 2015.

RAO K. V. B.; SRINIVASAN, D.; CHRISTO, S. D.; GEORGE, S. L.; KARTHIK, L.; KUMAR, G. Biosynthesis of Zirconium oxide nanoparticles using marine actinobacteria and its applications. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 109-119, 2013.

RASTELLO, R. M.; MEGEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, 304-307, 2009.

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.

SÁ, R. A.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; GOMES, F. S.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H. S.; COELHO, L. C. B. B.; BIEBER, L. W.; PAIVA, P. M. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 460-464, 2008.

SALVADORI, J. R.; MASSARO JUNIOR, A. L.; LAU, D.; PEREIRA, P. R. V. S. **Pragas e métodos de controle**. Sistemas de Produção Embrapa – Embrapa Trigo. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&p_r_p_76293187_sistemaProducaoId=3704&p_r_p_996514994_topicoId=1314. Acesso em: dezembro, 2017.

SANJIVKUMAR, M. et al. Investigation on characterization and biomedical properties of silver nanoparticles synthesized by an actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 151-159, 2019.

SANTANA, A. L. B. D.; MARANHÃO, C. A.; SANTOS, J. C.; CUNHA, F. M.; CONCEIÇÃO, G. M.; BIEBER, L. W.; NASCIMENTO, M. S. Antitermitic activity of extracts from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, p. 7-12, 2010.

SANTOS, P. P.; VASCONCELLOS, A.; DELABIE, J. H. C. Use of nests of *Nasutitermes* spp. (Isoptera; Termitidae) by ants (Hymenoptera; Formicidae) in Bahia, Brazil. **O Biológico**, v. 69, n. 2, p. 356-367, 2007.

SANTOS, T. **Defensivos Agrícolas – apostila**. If Cursos, 2014. Disponível em: <http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/08-516apostiladefensivosagricolas.pdf> Acesso em: março de 2018.

SARAU, K.; RAJAKUMAR, G.; KANNABIRAN, K.; RAHUMAN, A. A.; VELAYUTHAM, K.; ELANGO, G.; KAMARAJ, C.; ZAHIR, A. A. Larvicidal activity of marine *Streptomyces* against *Rhipicephalus microplus*, *Anopheles subpictus* e *Culex quinquefasciatus*. **Parasitol Research**, v. 112, p. 2015-226, 2013.

SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, S. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 102, 2017.

SCHATZ, A; BUGLE, E.; WAKSMAN, S. A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. **Exp. Biol. Med.** v.55, p.66–69, 1944.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567–579, 2007.

SER, H. L.; MUTALIB, M. S. A.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H; LEE, L. H. Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC137 Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. **Frontiers of Microbiology**, v. 6, n. 1398, p. 1-11, 2015.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAMA, M. Actinomycetes: sources, identification and their applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 801-832, 2014.

SILVA, J. M. C.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M (Ed.). **Caatinga: the largest tropical dry forest region in South America**. Springer, 2018.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. (Ed.). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, 312 p.

SOWNDHARARAJAN, K.; KANG, S. C. Evaluation of in vitro free radical scavenging potential of *Streptomyces* sp. AM-S1 culture filtrate. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 227–233, 2013.

SUBBANNA, A. R. N. S. RAJASEKHARA, H.; STANLEY, J.; MISHRA, K. K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal perspectives of chitinolytic bacteria in agricultural pests management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 116, p. 52-66, 2018.

SUBRAMANI, G. K; ARUMUGAM, S.; VIJAYABRSTHI, R (Eds). **Plant growth promoting actinobacteria**. Springer Nature, 2016, 310 p.

SUBRAMANI, R., AALBERSBERG, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, p. 571– 580, 2012.

SUNDARAMOORTHY, C.; VEGANDESH, K SARAUBH, G.; KARTICK, K.; TAMILSELVI, N. Production and characterization of antibiotics from soil-isolated actinomycetes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 4, p. 114-118, 2011.

TAKAHASHI, A.; KURASAWA, S.; IKEDA, D.; OKAMI, Y.; TAKEUCHI, T. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. **The Journal of Antibiotic**, v. XLII, n. 11, p.1556-1561, 1989.

TAN, L. T. H. et al. Streptomyces sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 276, 2017.

TAN, L. T. H. et al. Antioxidative Potential of a Streptomyces sp. MUM292 Isolated from Mangrove Soil. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with Asteraceae plants: isolation, biodiversity and bioactivities. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 4, p. 767-773, 2014.

THENMOZHI, M.; GOPAL, J. V.; KANNABIRAN, K.; RAJAKUMAR, G.; VELAYUTHAM, K.; RAHUMAN, A. A. Eco-friendly approach using marine actinobacteria and its compounds to control ticks and mosquitoes. **Parasito Res**, v. 112, p. 719-729, 2013.

THENMOZHI, M.; SINDHURA, S.; KANNABIRAN, K. Characterization of Antioxidant activity of *Streptomyces* species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 46-52, 2010.

THORNE, B.L.; HAVERTY, M.I. Nest growth and survivorship in three species of neotropical *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae). **Environmental Entomology**, v. 29, n. 2, p. 256-264, 2000.

TORTORA, 2012, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. – Porto Alegre: Armed, 2012.

VASCONCELLOS, A.; MÉLO, A.C.S.; SEGUNDO, E.M.V.; BANDEIRA, A.G. Cupins de duas florestas de restinga do nordeste brasileiro. **Iheringia - Série Zoologia**, v. 95, p.127-131, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390-400, 2003.

VIJAYABHARATHI R.; KUMARI, B. R.; SATHY, A.; SRINIVAS, V.; ABHISHEK, R.; SHARMA, H. C.; GOPALAKRISHNAN S. Biological activity of enthomopatogenic actinomycetes against lepidopteran insects. **Can. J. Plant Sci.**, v. 94, p. 759-756, 2014

VINHA, M. B., PINTO, C. L. O., PINTO, C. M. F., SOUZA, C. F., SOUZA, M. R. M., OLIVEIRA, L. L. Impactos do uso indiscriminado de agrotóxicos em frutas e hortaliças. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 27, n.1, p. 1-5, 2011.

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

WEBER, T.; CHARUSANTI, P.; MUSIOL-KROLL, E. M.; JIANG, X.; TONG, Y.; KIM, H. U.; LEE, S. W. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 16-26, 2015.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press, 1971.

WU, J. Q., KOSTEN, T. R., & ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defence systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 46, 200–206, 2013.

ZORZENON, F. J.; POTENZA, M. R. **Cupins: pragas em áreas urbanas**. Bol. Técn. Inst. Biol., São Paulo, n. 10, 1998, 40 p.