**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Isolamento bioguiado de compostos de actinobactérias com
atividade fungitóxica**

Gislaine Vicente dos Reis

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2017**

Gislaine Vicente dos Reis
Engenheira Agrônoma

**Isolamento bioguiado de compostos de actinobactérias com atividade
fungitóxica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Reis, Gislaine Vicente dos

Isolamento bioguiado de compostos de actinobactérias com atividade fungitóxica / Gislaine Vicente dos Reis. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

135 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Streptomyces* 2. Compostos bioativos 3. Antracnose 4. Produtos naturais
5. Separação cromatográfica I. Título

A DEUS,

Pelo dom da vida.

Aos meus pais,

Jandira e Osvaldo,

Ao meu avô,

Geraldo (in memoriam),

E ao meu noivo,

Vinícios,

Pelo infinito amor e apoio incondicional em todas as etapas ao longo destes anos e principalmente pela força para superar a distância.

Com muito carinho dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realização do curso de doutorado e por todo conhecimento adquirido ao longo destes anos.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Possedente de Lira pelos ensinamentos acadêmicos e pela ajuda recebida durante a realização deste doutorado. Agradeço também pela paciência, pelos conselhos e por toda confiança recebida.

A CAPES e CNPq (processo nº 165534/2014-1) pela bolsa concedida, e aos projetos BIOprospeTA FAPESP (Projeto temático - 2013/50228-8) e FAPESP (Projeto regular - 2014/15760-3) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Roberto de Souza Gomes Berlinck (IQSC-USP São Carlos) pela colaboração e por disponibilizar o laboratório para as análises químicas. Agradeço também a técnica de laboratório Fabiana T. Rodrigues pela ajuda na utilização dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, responsável pelo Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP) pelas análises realizadas no espectrofotômetro de massas adquirido dentro da chamada de projetos multiusuários da FAPESP (processo nº 09/54094-0). Agradeço também ao Dr. Eduardo J. Crevelin pela aquisição dos espectros.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e a técnica Luciana Vizotto pelas análises de RMN (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear-UFSCAR).

Ao Aldimar Tadeu Jesuíno Constante (Central Analítica CAQI- IQSC/USP) pela obtenção do espectro na região do infravermelho em Espectrômetro FTIR.

Ao Prof. Dr. Márcio Weber Paixão e ao Ms. Gabriel Scatena (Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química/ UFSCar) pelas medidas de rotação específica.

A Dra. Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz (Embrapa Jaguariúna) pela disponibilização do laboratório.

Aos colaboradores da Genética, Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, Dra. Joelma Marcon, José Antônio da Silva (Zezo) e Jéssica Campos, pelas linhagens de actinobactérias cedidas e pela identificação molecular.

Aos Profs. Dr. Fernando Dini Andreote, Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello, Dra. Maria Carolina Quecine Verdi e Dr. José Belasque Júnior pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional.

Aos Profs. do Departamento de Química Dr. Marcos Y. Kamogawa, Dra. Wanessa M. Mattos, Dr. Arquimedes Lavorenti e Dr. Marcelo E. Alves.

Aos técnicos de laboratório Dr. Luiz Humberto Gomes, Ms. Felipe Gabriel Andrino, Lenita Maria Oliveira, Janaína Truffi, Rita de Cássia L. de Castro, Gertrudes C. B. Fornazier e às secretárias Nádia Borges e Luciane Brajão por toda ajuda recebida nesses anos e pela amizade.

A ex-secretária do PPG em Microbiologia Agrícola, Maria Fernanda Almeida Prado pela ajuda e amizade.

Aos amigos de laboratório: Ms. Diana Fortkamp, Ms. Richtier Gonçalves da Cruz, Dra. Joze Aparecida Marciano Correa, Dr. Sérgio Birello Sartori, Dra. Luciana Mecatti Elias, Luciane Paes, Dr. Flávio Rocha, Ms. Luciana Jankowsky, Dr. Marcos Canto Machado (Pipoca), Débora Grandino, Dra. Jeane Maria Cunha Machado Andrino, Ms. José Brites Neto, Ms. Isabela Maria Nascimento, Dra. Marina Colzato, Ms. Amanda Ribeiro Martins da Silva, Ms. Marcos P. Monteiro de Oliveira, Ms. Natália Alexandrino, Dr. Cleiton dos Santos Mattos, Guilherme Novaes, Ana Paula Silva por todo companheirismo, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos alunos de iniciação científica: Luís Claudio Martins, Higor Seraphim Pimpinato, Isabelli Casagrande, Jessica Aparecida Ferrarezi, Jonathas Oliveira, Eduardo Castro, André Patrício, Andressa Ducatti de Goes, Marília C. Ferreira e Fernanda Souza Krupek, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos amigos da Genética: Dra. Joelma Marcon, José Antônio da Silva (Zezo), Ms. Nathalia de Moraes, Ms. Daniel Prezzotto, Ms. Suzane Saito, Ms. Patrícia Schaker, Ms. Maria Carolina Kmit, Ms. Lucas Taniguti, Tatiane Shyton e Dra. Pilar Mariani pela amizade e por todas as confraternizações.

Aos meus pais, pelo amor e pela educação que me proporcionaram.

Ao meu noivo Vinícios, por todo amor e apoio para suportar os momentos difíceis.

A minha irmã Márcia, meu cunhado Renato e minha sobrinha Tamires pelo amor e incentivo que sempre recebi.

Aos meus avós Maria e Geraldo (*in memoriam*) que sempre acreditaram em mim.

As amigas de República: Rafaela dos Santos, Claudia Alves, Carolina Hayashibara, Gabriela Salgado, Simone Brand, Talita Egevardt, Francynes Macedo e Luciane Mendes pelos momentos de alegria e descontração.

As amigas do Paraná: Solange Favero, Gisele Rodrigues, Fabiana Tibola, Gracyele Teixeira e Karla Batista por sempre estarem ao meu lado.

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	16
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Produção de metabólitos secundários por micro-organismos.....	21
2.2 Actinobactérias.....	25
2.3 O gênero <i>Colletotrichum</i>	30
2.4 Aspectos gerais da cultura do guaranazeiro	33
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Obtenção das linhagens de actinobactérias.....	41
4.1.1 Coleta de solos rizosféricos de guaranazeiros	41
4.1.2 Isolamento e preservação das actinobactérias	41
4.2 Seleção de actinobactérias promissoras no controle do <i>C. gloeosporioides</i>	42
4.2.1 Ensaio pelo método de cultivo pareado.....	42
4.2.2 Ensaio pelo método de difusão em disco de papel	43
4.2.2.1 Obtenção do extrato bruto.....	43
4.2.2.2 Obtenção das frações	43
4.2.2.3 Ensaio antifúngico pelo método de difusão em disco de papel	43
4.3 Identificação molecular das actinobactérias	44
4.4 Técnicas cromatográficas empregadas no isolamento e purificação dos compostos antifúngicos produzidos pelas actinobactérias.....	46
4.4.1 Partição líquido-líquido do extrato bruto.....	46
4.4.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada	47
4.4.3 Cromatografia em coluna por permeação em gel	47
4.4.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)	47
4.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE	48
4.5 Caracterização estrutural dos compostos	49
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV-EM.....	49
4.5.2 Análises por Espectrometria de Massas (MS) - Inserção Direta	50

4.5.3 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a EM de alta resolução	50
4.5.4 Análise de Infra-vermelho	51
4.5.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	51
4.5.6 Rotação Ótica $[\alpha]_D$	51
4.6 Monitoramento da atividade biológica dos compostos isolados	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Isolamento de actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros da Amazônia	55
5.2 Seleção de actinobactérias pela técnica do cultivo pareado.....	55
5.3 Avaliação da atividade antifúngica dos compostos produzidos pelas actinobactérias frente ao <i>C. gloeosporioides</i>	59
5.4 Caracterização Molecular	61
5.5 Estudo químico e biológico dos extratos de actinobactérias.....	62
5.5.1 Estudo químico dos compostos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. AM1.....	62
5.5.2 Estudo químico dos compostos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. AM3.....	76
5.5.3 Estudo químico dos compostos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. AM 25.....	90
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS	105

RESUMO

Isolamento bioguiado de compostos de actinobactérias com atividade fungitóxica

As espécies patogênicas do gênero *Colletotrichum* apresentam importância mundial, pois causam danos a várias culturas de interesse agrônomo. Diversas medidas de controle são empregadas, mas estas nem sempre são eficazes devido à ocorrência de linhagens resistentes. Desta forma, se faz necessário a busca por novos compostos que possam ser utilizados no manejo integrado desta doença. Os produtos naturais isolados de micro-organismos podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas. Dentre os micro-organismos, as actinobactérias são conhecidas pela produção de inúmeros compostos antimicrobianos. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo o isolamento e a identificação de compostos antifúngicos produzidos por actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros. Para isto, a seleção de actinobactérias foi baseada em dois ensaios. No primeiro, as 65 actinobactérias foram avaliadas em ensaio de cultivo pareado frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Destas, os isolados mais promissores foram AM1 (43,78 % de inibição do crescimento micelial), AM3 (43,98 %), AM18 (37,86 %), AM25 (43,17 %), AM30 (47,12 %), AM61 (40,12 %) e AM68 (47,94 %). No segundo ensaio, estes isolados foram cultivados em meio BD e, após o cultivo, o meio metabólico foi submetido a três métodos de extração: **(a)** partição líquido-líquido com n-butanol; **(b)** partição líquido-líquido com acetato de etila e **(c)** coluna sílica gel C₁₈. As frações obtidas a partir das três metodologias foram avaliadas pelo método de difusão em disco de papel contra *C. gloeosporioides*. Neste ensaio de difusão em disco foram selecionadas as linhagens AM1(n-butanol), AM3 (acetato de etila) e AM25 (C₁₈) para o estudo de bioprospecção. Estas foram identificadas por técnicas moleculares como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A partir do extrato bruto da *Streptomyces* sp. AM1 foi isolado um composto análogo do ácido proclavamínico, o qual apresentou atividade mínima inibitória (MIC) de 1,25 mg mL⁻¹ contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Da linhagem *Streptomyces* sp. AM3 foi isolado o composto streptimidona que apresentou MIC de 1,25 mg mL⁻¹. Já no estudo de *Streptomyces* sp. AM25 um composto não identificado apresentou MIC de 2,50 mg mL⁻¹. Estes três compostos apresentaram atividade superior aos fungicidas Captan SC[®] (Captana) e Dithane NT[®] (Mancozeb), e inferior ao Score[®] (Difenoconazol). A atividade antifúngica destes compostos ao *C. gloeosporioides* está sendo relatada pela primeira vez.

Palavras-chave: *Streptomyces*; Compostos bioativos; Antracnose; Produtos naturais; Metabólitos secundários; Separação cromatográfica

ABSTRACT

Bioguided isolation of actinobacteria compounds with fungitoxic activity

The pathogenic species of the genus *Colletotrichum* present importance worldwide because they cause damage to numerous crops of agronomic interest. Several control methods are employed, but they are not always effective due to the occurrence of resistant strains. Thus, it is necessary searching for new compounds that can be used in the integrated management of this disease. Natural products isolated from microorganisms can be an alternative for the development of new agricultural pesticides. Among microorganisms, actinobacteria are known to produce numerous antimicrobial compounds. In this context, the present study aimed to isolate and identify antifungal compounds produced by actinobacteria from guarana rhizosphere. For this, the selection of actinobacteria was based on two tests. In the first one, the 65 actinobacteria were evaluated in paired cultivation test against the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. Among them, the most promising isolates were AM1 (43.78% inhibition), AM3 (43.98%), AM18 (37.86%), AM25 (43.17%), AM30 (47.12%), AM61 (40.12%) and AM68 (47.94%). In the second assay, these isolates were cultured in BD medium and, after culturing, the metabolic medium was subjected to three extraction methods: (a) liquid-liquid partition with n-butanol; (B) liquid-liquid partition with ethyl acetate and (c) silica gel column C₁₈. The fractions obtained from the three methodologies were evaluated by paper disc diffusion method against *C. gloeosporioides*. In this disk diffusion assay, the strains AM1 (n-butanol), AM3 (ethyl acetate) and AM25 (C₁₈) were selected for the bioprospecting study. These were identified by molecular techniques as belonging to the genus *Streptomyces*. From the crude extract of *Streptomyces* sp. AM1 the analogous compound proclavaminic acid was isolated, which presented minimal inhibitory activity (MIC) of 1.25 mg mL⁻¹ against the plant pathogen *C. gloeosporioides*. From *Streptomyces* sp. AM3, the compound streptimidone was isolated, which presented MIC of 1.25 mg mL⁻¹. In the study of *Streptomyces* sp. AM25 an unidentified compound had MIC of 2.50 mg mL⁻¹. These three compounds presented superior activity to the fungicides Captan SC[®] (Captan) and Dithane NT[®] (Mancozeb), and inferior to the Score[®] (Difenoconazole). The antifungal activity of these compounds to *C. gloeosporioides* is being reported here for the first time.

Keywords: *Streptomyces*; Bioactive compounds; Anthracnose; Natural products; Secondary metabolites; Chromatographic separation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura química do antibiótico penicilina, isolado do fungo *Penicillium notatum*.21
- Figura 2- Estrutura química do composto Taxol, produzido pela planta *Taxus brevifolia* e pelo seu endófito *Taxomyces andreanae*.22
- Figura 3- Estrutura química da resistoflavina, isolada de *Streptomyces chibaensis* 23
- Figura 4- Estrutura química do composto 2-furancarboxaldeído isolado de *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* (código SY224).24
- Figura 5- Estrutura do composto puro (2*S*,5*R*, 6*R*)-2-hidroxi-3,5,6-trimetiloctan-4-ona isolado de *Streptomyces* sp. VITDDK3.24
- Figura 6- Ciclo de vida de *Streptomyces* sp.26
- Figura 7- Estrutura química dos antibióticos produzidos por diferentes espécies do gênero *Streptomyces*.27
- Figura 8- Estrutura química da substância bialafos isolado de *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*.28
- Figura 9- Estrutura química do inseticida/acarecida Abamectina.29
- Figura 10- Estrutura química do inseticida spinosad, isolado de *Saccharopolyspora spinosa*.29
- Figura 11- Estrutura química do antibiótico oxitetraciclina, isolado a partir de *Streptomyces rimosus*.30
- Figura 12- Diferentes estratégias de colonização das espécies de *Colletotrichum*. A. Intracelular hemibiotrófica - O conídio (S) germina emitindo o tubo germinativo e na extremidade deste forma-se o apressório melanizado (A) que gera o peg de penetração. 1. Após a penetração, ocorre a formação da vesícula (IV) e da hifa primária (PH). 2. Estas hifas colonizam células da epiderme (E) e do mesofilo (MS). 3. Ocorre a formação da hifa secundária (SH). 4. As hifas secundárias secretam enzimas que degradam a parede celular, causando lesões necróticas. B. Subcuticular intramural - O conídio (S) germina, formando o tubo germinativo e o apressório melanizado (A). 1. O peg de penetração rompe a cutícula e a hifa desenvolve-se abaixo da cutícula. 2. Neste estágio as hifas penetram a epiderme (E) e o mesofilo (M) das células hospedeiras causando a morte destas.32
- Figura 13- Alcaloides do grupo das metilxantinas presentes nas sementes do guaraná34
- Figura 14- Os sintomas da antracnose nas folhas de guaranazeiros. A) Lesões necróticas em folíolos em expansão, B) Crestamento foliar em folíolos jovens e C) Deformação e enrolamento dos folíolos.35
- Figura 15- Percentual médio de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em ensaio antagônico *in vitro* frente a diferentes actinobactérias isoladas da rizosfera de guaranazeiros. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o controle continha apenas o fitopatógeno. Mesmas letras não diferem entre si de acordo com a análise estatística feita pelo teste Scott-Knott.56
- Figura 16- Actinobactérias que apresentaram as maiores porcentagens de inibição em cultivo pareado frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*. 1. Controle, A. AM1, B. AM3, C. AM18, D. AM25, E. AM30, F. AM61 e G. AM68. O

- crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C e os testes foram realizados em triplicata. 57
- Figura 17- Percentual de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* em ensaio de difusão em disco de papel frente às frações obtidas em: A) partição líquido-líquido com n-butanol; B) partição líquido-líquido com acetato de etila e C) coluna tipo Sep-Pak C₁₈. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C e os testes foram realizados em triplicata. Mesmas letras não diferem entre si de acordo com a análise estatística feita pelo teste Scott-Knott. 60
- Figura 18- Ensaio da atividade antifúngica *in vitro* das frações aquosa e n-butanólica obtidas a partir do meio metabólico da actinobactéria AM1, frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. 63
- Figura 19- Ensaio das frações resultantes da cromatografia em gel de Sephadex[®] LH20 (A2A a A2J) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. 64
- Figura 20- Cromatogramas das frações ativas A2D; A2F; A2G e A2I monitorados no $\lambda = 210$ nm. Condições de análise: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex[®] Kinetex 5 μ m C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm) e fase móvel em modo gradiente de água em acetonitrila (proporção inicial de 90H₂O:10ACN e após 25 min, 100% ACN), vazão de 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 30 min. 64
- Figura 21- Bioensaio das cinco frações obtidas na separação cromatográfica em coluna do tipo Sep-Pak de sílica gel (A2G1 a A2G5) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. 65
- Figura 22- Cromatograma da fração A2G5 monitorada no $\lambda = 230$ nm. 66
- Figura 23- Bioensaio das oito frações obtidas na separação em CLAE (A2G5A - A2G5H) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. 66
- Figura 24- Cromatograma da fração A2G5B monitorada no $\lambda = 230$ nm (A) e espectro de UV da fração A2G5B (B). 67
- Figura 25- Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A2G5B 67
- Figura 26- Estrutura química do composto ácido proclavamínico (CAS: 112240-59-2) 68
- Figura 27- Espectro de infravermelho do composto A2G5B obtido em espectrofotômetro FTIR BOMEM modelo MB-102, cuja amostra foi aplicada em pastilha de silício e o espectro foi plotado em *software* Origin Pro 8. 70
- Figura 28- Determinação da concentração mínima inibitória do composto A2G5B (ácido proclavamínico) pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120

	h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.....	72
Figura 29-	Determinação da concentração mínima inibitória dos fungicidas: A) Score [®] ; B) Captan [®] e C) Dithane NT [®] pela técnica de microdiluição conforme <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.....	72
Figura 30-	Estrutura química do princípio ativo difenoconazol (Score [®]).....	73
Figura 31-	Estrutura química do princípio ativo captana (Captan SC [®]).....	74
Figura 32-	Estrutura química do princípio ativo Mancozeb (Dithane NT [®])	75
Figura 33-	Fluxograma do estudo químico da fração ativa de <i>Streptomyces</i> sp. AM1 (A2G5B)	76
Figura 34-	Ensaio da atividade antifúngica das frações aquosa (FA) e acetato (A3), obtidas a partir do meio metabólico da actinobactéria AM3 frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	77
Figura 35-	Bioensaio com as oito frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A3A a A3H) contra o fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	78
Figura 36-	Bioensaio com as oito frações obtidas em cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A3A1 a A3A9) frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	78
Figura 37-	Cromatogramas das frações ativas A3A2 e A3A3. Coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex [®] Kinetex 5 µm C ₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm). Fase móvel em gradiente de água/acetonitrila/metanol (90:5:5), detector UV em 230 nm (A3A2) e 254 nm (A3A3). Fluxo de 1 mL min ⁻¹ , com tempo de análise de 25 min.	79
Figura 38-	Bioensaio realizado com oito frações obtidas na separação em CLAE (A3A2A – A3A2E) frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	79
Figura 39-	Bioensaio realizado com as três frações obtidas na separação em CLAE (A3A3A- A3A3C) contra o fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C em BDA.....	80
Figura 40-	Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A3A3B.....	81
Figura 41-	Cromatograma da fração A3A3B em modo negativo.....	82
Figura 42-	Espectro de massas de alta resolução em modo positivo e negativo da fração A3A3B	83
Figura 43-	Estrutura química do composto streptimidona (CAS: 738-72-7)	86
Figura 44-	Determinação da concentração mínima inibitória do composto streptimidona pela técnica de microdiluição conforme <i>National</i>	

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm. 87

Figura 45-	Fluxograma do estudo químico da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. (AM3)	89
Figura 46-	Ensaio <i>in vitro</i> da atividade antifúngica das frações aquosa (FA); H ₂ O: MeOH (FB) e a metanólica (A4), obtidas a partir do meio metabólico de <i>Streptomyces</i> sp AM25 frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.	90
Figura 47-	Bioensaio com as cinco frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A4A a A4E) frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	91
Figura 48-	Bioensaio com as seis frações obtidas em cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A4C1 a A4C6) frente ao fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	92
Figura 49-	Bioensaio com as cinco frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak C ₁₈ (A4C5A a A4C5E) contra o fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.....	93
Figura 50-	Cromatograma da fração ativa A4C5C.....	93
Figura 51-	Bioensaio realizado com oito frações obtidas após separação em CLAE (A4C5C1- A4C5C3) contra o fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> . O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C em BDA.	94
Figura 52-	Cromatograma da fração A5C5C2 monitorada no λ= 254 nm (A) e espectro de UV da fração A5C5C2 (B).....	94
Figura 53-	Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A4C5C2	95
Figura 54-	Espectro de massas de alta resolução em modo positivo e negativo da fração A4C5C2	96
Figura 55-	Estrutura química do Axinellin C (CAS: 480995-99-1).....	99
Figura 56-	Determinação da concentração mínima inibitória do composto isolado A4C5C2 pela técnica de microdiluição conforme <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.	100
Figura 57-	Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração A4C5C2 isolada de <i>Streptomyces</i> sp. (AM25).	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos (<i>primers</i>) para amplificação do gene 16S rDNA (Thompson et al., 2001)	46
Tabela 2- Sistema de eluição utilizado nas análises de CLAE acoplada a UV-EM.	49
Tabela 3- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A2G5B (DMSO- d_6) e do ácido proclavamínico (D $_2$ O).	69
Tabela 4 - Informações químicas dos compostos compatíveis encontrados no banco de dados <i>Dictionary of Natural Products</i>	84
Tabela 5- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A3B3B (DMSO- d_6) e da estreptimidona (CDCl $_3$).....	85
Tabela 6- Concentração mínima inibitória dos fungicidas comerciais Score $^{\text{®}}$, Captan SC $^{\text{®}}$ e Dithane NT $^{\text{®}}$ frente ao <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , pela técnica de microdiluição conforme <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i> (NCCLS, 2002).....	87
Tabela 7- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A4C5C2 (DMSO- d_6) e do Axinellin C (CD $_3$ OD)	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
ACA	Meio de cultivo ágar, amido e caseína
AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
BD	Meio de cultivo batata e dextrose
BDA	Meio de cultivo batata, dextrose e ágar
BLAST	Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais
°C	Graus Celsius
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFU	Unidade formadora de colônias
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
C ₁₈	Sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano
CH ₂ Cl ₂	Cloreto de metileno
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ELSD	Detector por Espalhamento de Luz Evaporativo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
ESI	Ionização por eletrospray
GABA	Ácido gama aminobutírico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC ₅₀	Dose letal média
j	Constante de acoplamento
LC ₅₀	Dose letal média

M	Molar
m	Multipeto
MeOH	Álcool metílico
m/z	Razão massa carga
mg	Miligrama
min	Minutos
MS	Espectrometria de massas
MIC	Concentração mínima inibitória
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M+Na]^+$	Molécula sodiada
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Microgramas em um mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
ppm	Partes Por Milhão
PCR	Reação em cadeia da polimerase
q	Quadrupeto
rpm	Rotações por Minuto
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SDS	Sulfato Duodecil de Sódio

1. INTRODUÇÃO

A busca por produtos naturais é uma das mais antigas atividades humanas. Os primeiros registros de produtos naturais datam de 2600 a.C, e nestes foram documentados o uso de produtos derivados de plantas pelos povos mesopotâmicos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012), possivelmente, as primeiras formas de utilização dos produtos naturais ocorreram pela ingestão de ervas visando o alívio e a cura de doenças (BARREIRO, 2006).

Os principais produtores de biomoléculas ativas com aplicabilidade farmacológica, agrícola e industrial são as plantas, os micro-organismos e alguns grupos restritos de animais. Por muito tempo, as buscas por compostos bioativos concentraram-se em espécies vegetais, porém, o estudo de micro-organismos mostrou-se importante para viabilizar a descoberta de substâncias com importância biotecnológica (SESSITSCH et al., 2004).

A forma como ocorre a biossíntese de produtos naturais, em geral metabólitos secundários, não está totalmente esclarecida, mas supostamente a produção destes compostos ocorre como forma de proteção do organismo produtor a um ambiente desfavorável, conferindo assim, propriedades importantes para a sobrevivência e perpetuação dessas espécies (MADIGAN, 2010). Por exemplo, a liberação destes metabólitos pode inibir o crescimento de outros organismos presentes no mesmo habitat, conferindo assim, vantagens adaptativas/ competitivas ao desenvolvimento do micro-organismo produtor (KHALDI et al., 2010). Além disso, uma vez isolados, os metabólitos podem ser utilizados para controlar e/ou prevenir importantes doenças, como exemplo, a antracnose causada por fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, que afeta diversas culturas, incluindo as do guaranazeiro.

O guaranazeiro é uma espécie nativa do estado do Amazonas e de importância econômica e social. Os produtores rurais alcançam bons preços na comercialização destes grãos. A produção desta cultura por muitos anos concentrou-se no Amazonas, mas atualmente, o estado da Bahia é o principal produtor (CONAB, 2016). Diversos são os fatores responsáveis por esta queda de produção no Amazonas, dentre os quais, destaca-se a incidência da antracnose, principal doença que ataca esta cultura (BENTES; MATSUOKA, 2002). Em

cultivares suscetíveis, a ocorrência deste fitopatógeno pode causar a redução de até 80% na produtividade (ARAÚJO, 2008).

A presença de micro-organismos em cultivos agrícolas nem sempre é prejudicial, pois em sua grande maioria, atuam como agentes promotores de crescimento, como fixadores de nitrogênio, na proteção contra fitopatógenos, entre outros (AZEVEDO et al., 2000; PEIXOTO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Dentre estes, destacam-se as actinobactérias que ocorrem em diversos ambientes e são reconhecidas pelo potencial de produção de compostos antimicrobianos (MCCARTHY; WILLIAMS, 1992). Além disso, os compostos isolados podem ser uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas.

Diante do contexto, o objetivo deste trabalho foi contribuir com a descoberta de biomoléculas que possam ser utilizadas no controle do agente causal da antracnose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de metabólitos secundários por micro-organismos

O estudo dos compostos de origem microbiana possui uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. A descoberta e o isolamento do antibiótico penicilina (Figura 1), a partir do fungo *Penicillium notatum* pelo Alexander Fleming, em 1929, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas e incentivou os pesquisadores na busca por compostos bioativos de origem microbiana (GALLO et al., 2008; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Figura 1- Estrutura química do antibiótico penicilina, isolado do fungo *Penicillium notatum*.

Fonte: Adaptado Guimarães; Momesso; Pupo (2010, p. 2).

As plantas e os micro-organismos produzem uma variedade de metabólitos que geralmente são classificados em dois grupos, de acordo com as funções que estes desempenham.

Os metabólitos primários, como proteínas, carboidratos, lipídeos, entre outros, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo. Já os metabólitos secundários são responsáveis pela interação do indivíduo com o ambiente (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Os micro-organismos produzem metabólitos secundários na fase estacionária do crescimento, geralmente sendo bioativos e de baixo peso molecular (LOPES, 2011). Esta produção ocorre a partir de precursores de metabólicos primários, como aminoácidos, acetato, piruvato acumulados (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; NIGAM, 2009).

Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas e no geral são agrupados em várias classes, incluindo

alcaloides, terpenos, policetídeos, peptídeos não ribossomais, compostos fenólicos, entre outros (SCHULZ; BOYLE, 2005; CHAPLA et al., 2012).

Devido às propriedades bioativas, vários destes compostos têm sido utilizados na área médica como agentes antitumorais, imunossupressores, agentes redutores de colesterol, hipoglicêmicos, antibióticos e agentes antiparasitários. (CLARDY et al., 2006; PRASHITH et al., 2010).

O Taxol[®] (paclitaxel) (Figura 2) é um importante diterpenoide com atividade contra câncer de ovário e de mama, que inicialmente foi extraído da planta *Taxus brevifolia*. Posteriormente, estudos levaram a descoberta de que o endófito *Taxomyces andreanae*, isolado desta mesma planta, também produzia este composto antitumoral (STIERLE et al., 1993).

Figura 2- Estrutura química do composto Taxol, produzido pela planta *Taxus brevifolia* e pelo seu endófito *Taxomyces andreanae*.

Fonte: Adaptado Stierle et al., (1993, p. 214).

Depois desta verificação, outros trabalhos também constataram a capacidade de endofíticos em sintetizar o mesmo metabólito produzido pelo hospedeiro. Este evento pode ser atribuído a uma transferência horizontal de genes entre micro-organismo e planta, que ocorreu ao longo da evolução (AZEVEDO, 1998, STROBEL, 2003).

O estudo de compostos isolados de plantas muitas vezes é dificultado pelo crescimento mais lento do vegetal, em relação ao crescimento microbiano. Além disso, os micro-organismos necessitam de menor espaço para o cultivo, sem

menção que as condições de cultivo podem ser modificadas visando o aumento na produção dos compostos bioativos (STROBEL; DAISY, 2003).

Devido à importância dos produtos naturais, pesquisas visando o isolamento, a elucidação da estrutura e o modo de ação aumentaram nos últimos anos (ARAÚJO et al., 2002). No entanto, ainda é baixa a porcentagem de biodiversidade microbiana investigada quimicamente para produção de compostos de interesse biotecnológico (ALY, 2011). A seguir serão relatados alguns estudos de bioprospecção.

O estudo realizado por RANA; SALAM, (2014) avaliou o potencial antimicrobiano das actinobactérias isoladas de diferentes locais da Índia. Dentre as 23 actinobactérias analisadas, os isolados n.4 e n.5 foram os mais eficientes no controle de *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella enterica typhimurium*, com concentração mínima inibitória (MIC) de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

O tratamento do câncer representa um dos maiores desafios da medicina. No estudo de GORAJANA et al., (2007), o composto citotóxico resistoflavina isolado da actinobactéria *Streptomyces chibaensis* (Figura 3) apresentou LC_{50} (dose letal média) = $0,013 \mu\text{g mL}^{-1}$ para adenocarcinoma gástrica e $\text{LC}_{50} = 0,016 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o carcinoma hepático.

Figura 3- Estrutura química da resistoflavina, isolada de *Streptomyces chibaensis*

Fonte: Adaptado Gorajana et al., (2007, p. 325).

Na área agronômica, compostos isolados de actinobactérias tem se mostrado eficientes no controle de fitopatógenos. Do endófito *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 foram isolados os compostos 5,7-dimetoxi-4-p-metoxifenilnilcoumarina e 5,7-dimetoxi-4-fenilcoumarina, que apresentaram atividade contra *Colletotrichum*

musae e *Fusarium oxysporum*, com MICs de 120 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (TAECHOWISAN et al., 2005).

O extrato bruto do endófito *Streptomyces cinnamomeus* subsp. *sparsus*, isolado da planta *Catharanthus roseus* foi capaz de inibir em 53 % o crescimento do *Colletotrichum gloeosporioides* MUCL 42003. O composto responsável pela inibição foi identificado como sendo Fungicromina (RAKOTONIRIANA et al., 2012).

O meio metabólico de *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* SY224 foi avaliado contra *C. gloeosporioides*. Em ensaio em estufa, as plantas com sintomas de antracnose foram submetidas aos seguintes tratamentos: 150 mL da cultura SY224 ($1,3 \times 10^{10}$ CFU mL^{-1}); meio de cultura sem inóculo, água estéril autoclavada e o fungicida Clorotalonil ($1,650 \mu\text{g mL}^{-1}$). Como resultado, o tratamento com SY224 reduziu 83 % a incidência da doença, enquanto que o fungicida inibiu somente 67 %. O composto bioativo foi identificado como sendo 2-furancarboxaldeído (LEE et al, 2012) (Figura 4).

Figura 4- Estrutura química do composto 2-furancarboxaldeído isolado de *Streptomyces cavourensis* subsp. *cavourensis* (código SY224).

Fonte: Adaptado Lee et al, 2012.

Streptomyces sp. VITDDK3 foi isolada do solo marinho e o seu extrato bruto foi avaliado em ensaio acaricida e larvacida contra *Rhipicephalus micropulus*, *Anophales subpictus* e *Aulex quinquefasciatus*. Após etapas cromatográficas, o composto (2S,5R, 6R)-2-hidroxi-3,5,6-trimetiloctan-4-ona (Figura 5) na concentração de 150 ppm apresentou mortalidade de 62, 87 e 79 % contra *R. micropulus*, *A. subpictus* e *A. quinquefasciatus*, respectivamente (DEEPIKA et al., 2012).

Figura 5- Estrutura do composto puro (2S,5R, 6R)-2-hidroxi-3,5,6-trimetiloctan-4-ona isolado de *Streptomyces* sp. VITDDK3.

Fonte: Adaptado Deepika et al., 2012.

Diante destes relatos, ficou evidente que os compostos de origem microbiana apresentam potencial biotecnológico e dentre os micro-organismos produtores, as actinobactérias são responsáveis pela produção de um vasto número de metabólitos secundários bioativos.

2.2 Actinobactérias

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas que apresentam alta porcentagem de guanina e citosina em seu material genético (MATSUI et al., 2012; JAYASHANTHA, 2016). Estas geralmente são aeróbias ou microaeróbias, mas também existem espécies anaeróbias (GOODFELLOW, 1989; MCCARTHY; WILLIAMS, 1992; AGHAMIRIAN; GHASIAN, 2007).

Alguns gêneros de actinobactérias são capazes de produzir micélio (SCHLEGEL, 1993). O crescimento das actinobactérias filamentosas é caracterizado pela formação de hifas ramificadas que originam um micélio típico. De acordo com a morfologia e a função, o micélio pode ser classificado como vegetativo (absorção de nutrientes) ou aéreo (reprodução) (CHATER, 2006; MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012; PEREIRA, 2010). Os exemplos de actinobactérias que formam filamentos são os gêneros *Streptomyces*, *Frankia*, *Actinomyces* e *Nocardia*. Já os gêneros *Mycobacterium* e *Corynebacterium* não produzem micélio (JAYASHANTHA, 2016).

A produção de esporos assexuais do tipo esporangiósporos ou conidiósporos, consiste na principal forma de multiplicação. A outra forma de reprodução seria por fragmentação dos filamentos bacilares e cocóides, como ocorre no gênero *Nocardia* (VENTURA et al.; 2007).

As actinobactérias são encontradas em diferentes ambientes, como no trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.), como comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), como simbiontes fixadores de nitrogênio (*Frankia* spp), como patógenos humanos (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae*), mas principalmente nos solos (*Streptomyces* spp.) (CHATER, 2006; LETEK et al., 2012).

No solo, as actinobactérias compreendem mais de 30% da população total de micro-organismos. Estas são conhecidas pelo potencial de degradar matéria orgânica, devido à síntese de enzimas hidrolíticas como proteases, queratinases,

quitinases, celulasas e amilases (MCCARTHY; WILLIAMS, 1992), além do potencial de produção de compostos antimicrobianos (HEMASHENPAGAN, 2011).

Dentre as actinobactérias presentes no solo, o gênero *Streptomyces* é o de maior ocorrência, cujo nome foi dado pela combinação de *Streptothrix* + *Actinomyces* por Waksman, em 1943 (STACKEBRANDT, 2006).

As actinobactérias pertencentes a este gênero são aeróbias obrigatórias, que sintetizam compostos voláteis como a geosmina, que confere ao solo o odor característico de terra molhada (TORTORA et al., 2011; MADIGAN et al., 2010). Atualmente mais de 770 espécies já foram descritas (LABEDA et al, 2012, SILVA et al, 2016).

O processo de crescimento de *Streptomyces* inicia-se com a germinação do esporo e com a formação do tubo germinativo (**A**), mas esta etapa ocorre somente em condições favoráveis de temperatura e nutrientes. Após, este tubo cresce por extensão da ponta originando a hifa vegetativa, que se ramifica formando o micélio vegetativo (**B**). Com a diminuição de nutrientes ocorre o crescimento de hifas aéreas que quebram a tensão superficial e se projetam da superfície do substrato (**C**). A hifa do micélio aéreo se diferencia pela formação de septos originando uma cadeia de esporos (**D**). A liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento chamado de polarizado, devido ao fato das duas hifas (vegetativa e aérea) emergirem de um esporo (Figura 6) (FLARDH; BUTTNER, 2009).

Figura 6- Ciclo de vida de *Streptomyces* sp.

Fonte: Adaptado Slonczewski, Foster, 2009.

Embora a identificação taxonômica de espécies do gênero *Streptomyces* seja complexa, a abordagem polifásica que inclui características genotípicas e fenotípicas tem sido utilizada nos últimos anos (SILVA et al. 2013a).

As análises de sequências do rRNA e o sequenciamento da β -subunidade do gene da RNA polimerase (*rpoB*) produzem bons resultados para análise filogenética destas actinobactérias (BARRETO, 2007).

O gênero *Streptomyces* é responsável pela síntese de quase 40% de todos os compostos bioativos conhecidos (BÉRDY, 2005; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; SILVA et al., 2013a), destes, destacam-se importantes antibióticos como tienamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicinas, vancomicina, entre outros (ABBAS, 2010) (Figura 7).

Figura 7- Estrutura química dos antibióticos produzidos por diferentes espécies do gênero *Streptomyces*.

Fonte: Adaptado Guimarães; Momesso; Pupo (2010, p. 2).

Dentre importantes aplicações de metabólitos secundários, podemos citar sua utilização na indústria agroquímica como produtos fitossanitários, pois apesar de todo desenvolvimento tecnológico iniciado na década de 40, as ervas daninhas, os insetos e os fitopatógenos continuam sendo um problema para agricultura.

Como as actinobactérias são conhecidas pelo potencial de produção de biomoléculas de diferentes propriedades químicas, uma vez isoladas, estas poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de novos defensivos agrícolas.

O herbicida glufosinato de amônio é derivado do produto natural chamado bialafos que foi isolado de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridochromogenes* (Figura 8). O seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da enzima glutamina sintetase (GS) na rota de assimilação do nitrogênio. O glufosinato de amônio é um herbicida de pós-emergência, de baixa translocação e de amplo espectro de controle de plantas daninhas. No Brasil, as duas formulações comercializadas são Finale[®] e Liberty[®] (LYDON; DUCKE, 1999; DUCKE et al., 2000; LATORRE et al., 2013).

Figura 8- Estrutura química da substância bialafos isolado de *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*.

Fonte: Adaptado Montague et al., (2007, p. 30).

Abamectina (Figura 9) é um inseticida e acaricida isolado de *Streptomyces avermitilis*, cujo produto comercial é utilizado no controle de ácaros, insetos minadores, besouros e também de endo e ectoparasitas que afetam bovinos. Este composto atua como um agonista do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), prejudicando a transmissão neurosináptica do sistema nervoso central dos artrópodes (DUNBAR et al., 1998).

Figura 9- Estrutura química do inseticida/acarecida Abamectina.

Fonte: Adaptado Li et al.,(2008, p. 5360).

O Spinosad (Figura 10) pertence ao grupo dos inseticidas chamados spinosinas, originalmente isolado do cultivo líquido de *Saccharopolyspora spinosa*. O produto comercial é composto por spinosina A e D, que controlam uma variedade de insetos, especialmente das ordens Diptera e Lepidoptera (CROUSE et al., 2001). As spinosinas atuam nos receptores nicotínicos da acetilcolina e no neurotransmissor GABA (WATSON, 2001; SALGADO; SPARKS, 2005).

Figura 10- Estrutura química do inseticida spinosad, isolado de *Saccharopolyspora spinosa*.

Fonte: Adaptado Salgado; Sparks, (2005, p. 208).

O Mycostop® é um biofungicida preparado com isolados de *Streptomyces griseoviridis* K61. O produto comercial é recomendado para o controle de algumas

doenças de podridão de raízes, causadas por *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Phytophthora* sp. (MINUTO et al., 2006).

Já o biofungicida Actinovate® é composto por esporos de *Streptomyces lydicus* WYEC 108. Este é utilizado no controle de fungos de plantas ornamentais e de jardinagem (CRAWFORD et al, 1993).

O antibiótico oxitetraciclina (Figura 11) é utilizado no controle de bactérias dos gêneros *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp., entre outros. Este composto foi isolado de *Streptomyces rimosus* e o seu modo de ação ocorre pela inibição da síntese proteica, devido a danos nos fragmentos ribossômico 30S (FINLAY et al., 1950, PETKOVIC et al., 2006).

Figura 11- Estrutura química do antibiótico oxitetraciclina, isolado a partir de *Streptomyces rimosus*.

Fonte: Adaptado Petkovic et al.,(2006, p. 706).

2.3 O gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum* foi proposto inicialmente por Tode (1790) com a denominação *Vermicularia*, mas no ano de 1831, Corda reclassificou como *Colletotrichum* (HYDE et al., 2009).

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* sp. (teleomorfo *Glomerella*) causam a antracnose em diversas plantas, principalmente nas culturas de interesse agrônomo, incluindo cereais, leguminosas, hortaliças, plantas ornamentais e diversas frutíferas (DEAN et al., 2012).

Estes fitopatógenos são de ampla distribuição geográfica, mas os maiores danos são registrados em regiões tropicais e subtropicais, devido ao ambiente quente e úmido (MENEZES, 2006).

Em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, este fitopatógeno pode infecta-la de forma altamente agressiva. Os principais sintomas observados são lesões necróticas em folhas, caules, flores e frutos. (JEFFRIES et al., 1990; BAILEY et al., JEGOR, 1992; PRUSKY; FREEMAN; DICKMAN, 2000).

Recentemente, o gênero *Colletotrichum* foi classificado como o 8º fitopatógeno mais importante do ponto de vista econômico e científico (DEAN, 2012).

No tecido do hospedeiro, o *Colletotrichum* sp. geralmente produz conídios em acérvulos, sendo estes, envoltos por uma mucilagem glicoproteica de elevado peso molecular (MENEZES, 1996). Esta substância tem a função de proteger os conídios contra os efeitos tóxicos dos compostos fenólicos produzidos pela planta, além de evitar a germinação prematura desses esporos (BAILEY et al., 1992; NICHOLSON, 1992, MENEZES, 1996).

As estruturas reprodutivas são dispersas pelo vento, por respingos de chuva, por insetos, por implementos agrícolas, por sementes infectadas, entre outros (MENEZES, 2006).

O processo de infecção inicia-se pela aderência do conídio à superfície do hospedeiro, que na presença de água, germina emitindo o tubo germinativo. Na extremidade deste, é formado um apressório de coloração escura capaz de fixar o patógeno ao tecido do hospedeiro (MENEZES, 2006).

Em algumas espécies, após este evento, ocorre a formação do peg de penetração que invade a cutícula do vegetal (PERES, 2005). A entrada pode ocorrer por meio de ferimentos, aberturas naturais ou diretamente pelo apressório (JEFFRIES et al., 1990).

Segundo BAILEY et al. (1992), as espécies de *Colletotrichum* podem apresentar dois tipos principais de estratégias de colonização: a intracelular hemibiotrófica e a subcuticular intramural (Figura 12).

A estratégia intracelular hemibiotrófica (Figura 12-A) apresenta dois estágios: o primeiro consiste na fase biotrófica em que há formação de uma vesícula esférica de infecção. Esta estrutura não causa o rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira, não havendo danos visíveis. Já no segundo estágio, as vesículas emitem hifas secundárias que colonizam intra e intercelularmente a epiderme e o mesofilo, causando desorganização nos tecidos e necrose (MENDGEN; HAHN, 2002; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Na colonização subcuticular intramural (Figura 12-B), o patógeno desenvolve-se abaixo da cutícula e no interior da parede periclinal e anticlinal das células epidérmicas, causando dissolução da parede celular (O'CONNELL et al., 2000). A fase biotrófica não ocorre neste tipo de colonização.

Figura 12- Diferentes estratégias de colonização das espécies de *Colletotrichum*. **A. Intracelular hemibiotrófica** - O conídio (S) germina emitindo o tubo germinativo e na extremidade deste forma-se o apressório melanizado (A) que gera o peg de penetração. 1. Após a penetração, ocorre a formação da vesícula (IV) e da hifa primária (PH). 2. Estas hifas colonizam células da epiderme (E) e do mesofilo (MS). 3. Ocorre a formação da hifa secundária (SH). 4. As hifas secundárias secretam enzimas que degradam a parede celular, causando lesões necróticas. **B. Subcuticular intramural** - O conídio (S) germina, formando o tubo germinativo e o apressório melanizado (A). 1. O peg de penetração rompe a cutícula e a hifa desenvolve-se abaixo da cutícula. 2. Neste estágio as hifas penetram a epiderme (E) e o mesofilo (M) das células hospedeiras causando a morte destas.

Fonte: Adaptado Perfect et al., (1999, p. 188).

Antigamente, a identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* era realizada com base em critérios clássicos, como morfologia de conídios e gama de hospedeiros. No entanto, esta identificação não deve ser realizada com base somente nestes caracteres, pois condições de cultivo podem causar variações no tamanho de conídios (FREEMAN et al., 1996) e a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a um único hospedeiro ou de uma mesma espécie atacando diversos hospedeiros é frequente (FREEMAN et al., 1998).

Para uma identificação precisa recomenda-se a abordagem polifásica, pois esta integra análises morfológicas, bioquímicas e moleculares (SORENSEN et al., 2011; DAMM et al., 2012; WEIR et al., 2012).

Uma das técnicas moleculares que têm sido empregada na identificação do *Colletotrichum* sp. é a análise de sequências de nucleotídeos de distintas regiões do genoma (BAILEY et al., 1996; CROUCH et al., 2005).

Em relação à análise bioquímica, uma metodologia que tem sido utilizada como uma importante ferramenta de identificação é a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization on Time-Of-Flight*) (SIMÕES et al., 2013).

2.4 Aspectos gerais da cultura do guaranazeiro

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* variedade *sorbilis*) é uma dicotiledônea pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Sapindales e família Sapindaceae (MIRANDA; METZNER, 2010). Em seu habitat natural é uma liana, podendo atingir a altura de 9 a 10 metros e quando cultivado em campo aberto é um arbusto subereto (LODEWIJKS, 1986).

A cultura do guaranazeiro tem um desenvolvimento adequado em áreas de clima tropical chuvoso, com precipitações médias anuais superiores a 1.300 mm, a temperatura ideal oscila entre 23 a 28 °C e a umidade relativa do ar acima de 80 %. Os solos para este cultivo devem ser profundos, bem drenados e de textura média (EMBRAPA, 2005).

Os grãos de guaraná apresentam altos teores de cafeína, além de outros alcaloides, como a teobromina e a teofilina (Figura 13). A cafeína é um alcaloide do grupo das metilxantinas com ação psicoativa, cujos principais efeitos em seres humanos incluem o aumento da concentração e da disposição, diminuição do cansaço e da sonolência, entre outros (SALDAÑA; MOHAMED; MAZZAFERA, 2000; RIBAS, 2010).

Além do efeito estimulante, a cafeína também pode ser utilizada como antitérmico; antigripal e analgésico. A presença desses alcaloides impulsiona a comercialização do guaraná para as indústrias farmacêuticas e para as fábricas de refrigerantes (TFOUNI et al., 2007; MIRANDA; METZNER, 2010).

Figura 13- Alcaloides do grupo das metilxantinas presentes nas sementes do guaraná

Fonte: Adaptado Saldaña; Mohamed; Mazzafera (2000, p. 254).

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná, com exceção de pequenas áreas plantadas na Venezuela e Peru. No ano de 2016, a área destinada ao cultivo de guaraná no Brasil foi de aproximadamente 11.848 hectares e a produção de grãos no país atingiu 3.686 toneladas (CONAB, 2016).

A produção por muito tempo concentrou-se na região do Amazonas, mas atualmente ocorreu uma expansão para os estados do Pará, Acre, Rondônia, Mato Grosso e Bahia (NASCIMENTO-FILHO et al., 2009).

Os estados do Amazonas e da Bahia detêm 93,7 % da área plantada de guaranazeiros no país, sendo a Bahia responsável por aproximadamente 70,5 % de toda produção nacional (CONAB, 2016). Esta produtividade superior é atribuída ao solo fértil, temperaturas mais amenas durante a noite e pelo bom índice de fitossanidade das plantas.

Por questão de logística, o preço de mercado dos grãos de guaraná no estado do Amazonas sempre teve melhor cotação, pois as principais empresas demandantes por este produto encontram-se nesta região (IBGE, 2015).

Atualmente, quase toda produção nacional é destinada ao mercado interno (BENTES; NETO, 2011), apenas uma pequena porcentagem é exportada para os Estados Unidos, Inglaterra, Japão, Itália, Alemanha e Espanha (ARAÚJO et al., 2009).

No Brasil, a comercialização do guaraná em ramas (sementes torradas) é a mais comum, mas também pode ser comercializado sob a forma de bastão, pó ou xarope (WALKER et al., 2000; MIRANDA; METZNER, 2010).

A antracnose do guaranazeiro é um dos fatores limitantes da produção e expansão da guaranicultura no estado do Amazonas. O agente causal é o

Colletotrichum guaranicola Albuq., descrito pela primeira vez por Albuquerque em 1961. Entretanto, a classificação do agente causal da antracnose nesta cultura é questionável, pois várias espécies do gênero *Colletotrichum* estariam possivelmente, envolvidas no ataque do guaranazeiro (BENTES; BARRETO, 2004).

Com a reavaliação taxonômica de *C. guaranicola* em 2004, Bentes e Barreto afirmaram não haver ocorrência deste fitopatógeno em outros hospedeiros, além do guaranazeiro (BENTES; BARRETO, 2004). Entretanto, no estudo realizado por MILÉO et al.,(2007), 11 espécies de plantas daninhas isoladas de áreas de cultivo do guaranazeiro estavam colonizadas pelo *C. guaranicola*.

O *Colletotrichum guaranicola* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Incertae sedis e Família Glomerellaceae (INDEX FUNGORUM, 2017).

Os sintomas predominantes da doença antracnose são lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom escuro e formato variado (Figura 14-A); crestamento foliar em folíolos jovens (Figura 14-B) e coalescimento das lesões, gerando deformação e enrolamento dos folíolos de guaranazeiros (Figura 14-C).

Em ataques severos da doença, ocorre a morte descendente e progressiva de ramos e consequentemente da planta inteira (ARAÚJO, 2008).

Figura 14- Os sintomas da antracnose nas folhas de guaranazeiros. A) Lesões necróticas em folíolos em expansão, B) Crestamento foliar em folíolos jovens e C) Deformação e enrolamento dos folíolos.

Fonte: Adaptado Araújo et al.,(2008, p. 1 e 2).

Devido à importância e a agressividade da antracnose na cultura do guaranazeiro, o controle químico desta doença deve ser complementado com outras medidas de controle, tais como o uso de mudas sadias que apresentam resistência ao fitopatógeno e podas fitossanitárias (RIBEIRO, 2012).

Atualmente, o controle químico constitui-se em pulverizações aéreas com os fungicidas Orkestra[®] SC (Fluxapiraxade e piraclostrobina) e TENAZ 250 SC (Flutriafol) (AGROFIT, 2017).

Desde a década de 70, a Embrapa Amazônia Ocidental desenvolve pesquisas com a cultura do guaraná. As cultivares BRS-Maués; BRS-Amazonas; BRS-CG-611; BRS-CG-648; BRS-CG-882 e BRS-CG-612 foram lançadas pelo programa de melhoramento genético, sendo estas, recomendadas para as regiões em que a antracnose constitui-se no fator limitante a produção (EMBRAPA, 2014).

As podas fitossanitárias são feitas logo após a colheita, para eliminar galhos secos e remanescentes de inflorescências. Em plantios altamente afetados, a poda também é realizada no final do período das chuvas (RIBEIRO, 2012).

Na agricultura, o procedimento de controle mais utilizado é o químico, mas devido ao uso intensivo de defensivos, diversos efeitos negativos são verificados no ambiente e na saúde humana (SOARES, 2010). Este uso indiscriminado, também pode causar o aumento da severidade de algumas doenças, por conta da diminuição da competição entre os micro-organismos, pela morte dos inimigos naturais e pela seleção de fitopatógenos resistentes (HEANEY et al., 2000; NEWTON et al., 2010).

Embora o controle químico seja eficiente, outras estratégias de controle devem ser adotadas, como por exemplo, o uso de compostos de origem microbiana no manejo integrado de doenças.

A busca por metabólitos produzidos por micro-organismos isolados de locais competitivos, como por exemplo, a rizosfera, aumenta as chances de selecionar micro-organismos produtores de compostos bioativos (GERHARDSON, 2002). Para suportar a pressão existente nesses locais, estes passam por adaptações morfológicas e fisiológicas, parte das quais, pode estar associada à produção de compostos bioativos para obtenção de tais benefícios evolutivos (BERG, SMALLA, 2009).

Diante disto, este estudo visa contribuir com a bioprospecção de biomoléculas produzidas por actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros e avaliar sua atividade contra o *Colletotrichum gloeosporioides*.

3. OBJETIVOS

Geral

Este trabalho teve como objetivo principal o isolamento e a identificação de compostos antifúngicos produzidos por actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros da Amazônia.

Específicos

- I. Seleção de actinobactérias promissoras no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, pela técnica do cultivo pareado e pelo método de difusão em disco de papel.
- II. Extração, separação e purificação dos compostos fungitóxicos por técnicas cromatográficas.
- III. Caracterização química dos compostos puros por técnicas espectroscópicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das linhagens de actinobactérias

A coleta, o isolamento e a preservação das linhagens de actinobactérias foram realizadas pelo grupo do professor Dr. João Lúcio de Azevedo (Laboratório de Genética de Microrganismos - Departamento de Genética/ESALQ-USP) e os isolados foram gentilmente cedidos para a realização deste estudo.

4.1.1 Coleta de solos rizosféricos de guaranazeiros

A coleta foi realizada no mês de novembro de 2010, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, localizada no município de Manaus-AM. Para o isolamento foram amostradas solos rizosféricos de cinco plantas adultas (02° 39' 41.4"S e 60° 07' 57.5"W), todas pertencentes ao mesmo clone (série 800), cultivadas no mesmo tipo de solo e sob as mesmas condições climáticas. As amostras foram conservadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixas de isopor com gelo para o transporte até o laboratório de Genética de Microrganismos ESALQ/USP – Piracicaba/SP, em que estas foram processadas.

4.1.2 Isolamento e preservação das actinobactérias

Para o isolamento das actinobactérias foram pesados 10 gramas de solo rizosférico de cada amostra, posteriormente distribuídos em frascos do tipo Erlenmeyer contendo 90 mL de solução tampão PBS (0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,14 % Na₂HPO₄ e 0,024% KH₂PO₄, pH ajustado para 7,4). Esses frascos foram acondicionados em agitador *shaker* sob velocidade de 150 rpm, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL do conteúdo de cada frasco foram distribuídos em microtubos de 1,5 mL, contendo 900 µL de solução salina estéril (0,85 M NaCl) para realização da diluição seriada, sendo realizada até 10⁻⁶. Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri contendo o meio de cultivo ACA (1 % amido; 0,03 % caseína; 0,2 % KNO₃; 0,2 % NaCl; 0,2 % K₂HPO₄; 0,005 % MgSO₄; 0,001 % FeSO₄ e 1,5 % ágar), acrescido pelo fungicida benomil (50 µg mL⁻¹). Para cada diluição

foram realizadas cinco repetições. As placas foram incubadas a 28 °C, por um período de 7 a 10 dias. A purificação das colônias foi realizada pelo método de esgotamento por estrias cruzadas em placas de Petri contendo o meio ACA e as colônias isoladas foram selecionadas.

As actinobactérias isoladas foram preservadas utilizando-se a técnica de criopreservação. Essas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo ACA e mantidas em incubadora do tipo BOD a 28 °C, por 7 dias. Após este período de crescimento, discos de aproximadamente 7 mm contendo estruturas vegetativas e reprodutivas de actinobactérias foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo o meio tripticaseína de soja (TSB). Estes foram acondicionados em agitador shaker sob a rotação de 150 rpm, a 28 °C por 7 dias. Após, 0,5 mL deste cultivo foi transferido para microtubos criogênicos contendo 0,5 mL de solução de glicerol 60 % e mantidos em ultrafreezer (- 80 °C).

4.2 Seleção de actinobactérias promissoras no controle do *C. gloeosporioides*

4.2.1 Ensaio pelo método de cultivo pareado

A avaliação do potencial antifúngico de actinobactérias frente ao *C. gloeosporioides* foi realizada pelo método do cultivo pareado (DENNIS; WEBSTER, 1971). Para isso, discos de 5 mm de diâmetro contendo meio e estruturas de actinobactérias foram inoculadas em uma das margens da placa de Petri (na distância de 1,5 cm da borda) contendo meio de cultura BDA. Após três dias, na extremidade oposta foram inoculados discos de 5 mm de diâmetro do fitopatógeno (na distância de 1,5 cm da borda). As placas controle continham apenas o fitopatógeno, sob as mesmas condições citadas. Os tratamentos e os controles foram mantidos em BOD a 28 °C (TECNAL TE-371), por um período de sete dias. Os testes foram realizados em triplicata.

Após o crescimento, as placas foram fotografadas e a porcentagem de inibição foi calculada aferindo-se a área de crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* pela área total da placa, utilizando-se o software Image J (ABRAMOFF et al., 2004). A análise estatística foi feita pelo teste Scott-Knott, pelo programa Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícola SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

A linhagem do fitopatógeno utilizada neste estudo foi *Colletotrichum gloeosporioides* (L1), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Pedro Queiroz da Universidade Federal do Amazonas- UFAM- Manaus/AM.

4.2.2 Ensaio pelo método de difusão em disco de papel

4.2.2.1 Obtenção do extrato bruto

As actinobactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e mantidas em BOD a 28 °C. Após 5 dias de crescimento, 3 discos de 5 mm foram retirados das colônias e transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer contendo 150 mL de meio BD (batata e dextrose), sendo acondicionados em shaker (TECNAL TE-421) a 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm, por um período de 7 dias (AL-HULU et al., 2012; RAJAN; KANNABIRAN, 2013; SHAABAN et al., 2013). Após o crescimento, o meio metabólico foi filtrado, concentrado em liofilizador, pesado, identificado e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

4.2.2.2 Obtenção das frações

Para o isolamento dos compostos das actinobactérias selecionadas em cultivo pareado (item 4.2.1) foram avaliadas três metodologias de extração: **(a)** partição líquido-líquido com n-butanol, **(b)** partição líquido-líquido com acetato de etila e **(c)** coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈. Estas metodologias estão descritas nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

As frações obtidas foram submetidas ao ensaio de atividade antifúngica pelo método de difusão em disco de papel.

4.2.2.3 Ensaio antifúngico pelo método de difusão em disco de papel

Neste ensaio de atividade inibitória, em uma das margens da placa de Petri contendo meio BDA foi inoculado um disco de 5 mm de diâmetro do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (na distância de 1,5 cm da borda) e na extremidade oposta foi posicionado um disco de papel filtro estéril de 6 mm de diâmetro (na distância de 1,5 cm da borda), no qual foram aplicados 2 mg da fração a ser

avaliada. As placas controle continham apenas o fitopatógeno, sob as mesmas condições citadas. Os tratamentos e os controles foram mantidos em BOD a 28 °C (TECNAL TE-371) e o período de incubação variou de 5 a 7 dias, tempo em que o controle deveria colonizar totalmente a placa de Petri. Os testes foram realizados em triplicata. Após este período, as placas foram fotografadas e a porcentagem de inibição de cada fração testada foi avaliada utilizando o programa *Image Processing and Analysis in Java* (ImageJ).

O ensaio de difusão em disco de papel também foi utilizado para monitorar as frações obtidas nas etapas cromatográficas do presente estudo, mas para estas, os ensaios não foram realizados em triplicata.

4.3 Identificação molecular das actinobactérias

A identificação molecular foi realizada pelo grupo de estudo da Professora Dra. Maria Carolina Quecine-Verdi, do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Para a extração do DNA, os isolados foram cultivados em meio TSB líquido e incubados a 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm por um período de 7 dias. Após o crescimento, 4 mL do meio de cultura foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescidos 400 µL de Tampão T₁₀E₁ (10mM Tris-HCl pH 8 e 1mM EDTA), 20 µL de SDS 10 % (dodecil sulfato de sódio) e dois volumes de sílica beads (Sigma[®]), sendo agitado durante 3 minuto em vortex até à lise celular. Em seguida, foram adicionados 400 µL de clorofane (na proporção de 25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) e homogeneizados por inversão. Após a homogeneização, a solução foi centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 1/10 volumes de NaCl (5 M) e 0,8 volume de isopropanol. A solução foi homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por um período de 10 minutos. Esta solução foi centrifugada a 12000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionado 1 volume de etanol 100% gelado na temperatura de -20 °C. Após, este foi homogeneizado por imersão e centrifugado a 12000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de etanol 70 % gelado na temperatura de -20 °C. Uma nova centrifugação foi realizada a 12000 rpm por 5

minutos, sendo descartado o sobrenadante. O DNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspensionado em 30 µL de água ultrapura esterilizada e acrescido de 3 µL de RNase (na concentração 10 mg/mL). A integridade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose (1 %). As amostras de DNA e o marcador de peso molecular foram corados com *SYBR Gold* (*Applied Biosystems*). O gel foi fotografado pelo fotodocumentador Kodak EDAS 20 (Kodak). Para quantificação do DNA e também verificação da sua pureza as amostras foram medidas seguindo-se as instruções do fabricante no aparelho NanoCell (*Thermo Scientific*).

A partir do DNA extraído foram feitas reações de PCR amplificando-se a região do 16S rDNA, utilizando-se os *primers* universais R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (HEUER et al., 1997). A reação de PCR foi realizada utilizando-se 3,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTPS; 0,2 M de cada *primer*; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase e tampão 10X, em um volume final de 50 µL. O produto amplificado foi obtido pela reação de PCR com desnaturação inicial de 4 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 62,5 °C de temperatura de anelamento, 30 segundos a 72 °C e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Os fragmentos amplificados foram detectados por *SYBR® Green* e quantificados por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (Fermentas) e fotodocumentado.

Os fragmentos do gene 16S rDNA amplificados (aproximadamente 1400 pb) foram purificados com polietileno glicol PEG 8000 (10 g de PEG 8000 e 7,3 g de NaCl solubilizados em 45 mL de água Mili-Q a 37°C, sob agitação. A solubilização leva em torno de 30 minutos e, ao final, o volume foi completado para 50 mL). A reação foi iniciada em um microtubo de 1,5 mL, no qual foi adicionado 50 µL do produto de PCR e 50 µL da solução de PEG, sendo a solução misturada com o auxílio de uma pipeta e incubada por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o tubo foi centrifugado em alta velocidade (10.000g) por 15 minutos a temperatura ambiente. Com a ajuda de uma pipeta, todo o sobrenadante foi descartado. Ao pellet, foram adicionados 125 µL de etanol 80% gelado, correndo o líquido pela lateral do tubo, deixando a solução descansar por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse tempo, foi retirado o sobrenadante com auxílio sempre de pipeta, e foram repetidos

os dois últimos passos. Ao final, o restante do álcool foi deixado secar a 37°C por 15 minutos e o produto foi dissolvido em 30 µL de água Mili-Q.

Os fragmentos de 1400 pb foram sequenciados pelo laboratório de Biotecnologia Animal, no Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP. O sequenciamento foi realizado com o *primer* 1387R (HEUER et al., 1997). As linhagens de actinobactérias tiveram o 16S rDNA sequenciado completamente. Para isso, foram utilizados os iniciadores propostos por Thompson et al. (2001) apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos (*primers*) para amplificação do gene 16S rDNA (Thompson et al., 2001)

Primer	Sequências
16F358	5' CTC CTA CGG GAG GCA GT 3'
16F536	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3'
16F926	5' AAC TCA AAG GAA TTG ACG G 3'
16R339	5' ACT GCT GCC TCC CGT AGG AG 3'
16R519	5' GTA TTA CCG CGG CTG CTG 3'
16R1241	5' GCT ACA CAC GTG CTA CAA TG 3'

As sequências do 16S rRNA obtidas no sequenciamento foram visualizadas e editadas utilizando-se o software MEGA 6 e analisadas na base de dados BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

4.4 Técnicas cromatográficas empregadas no isolamento e purificação dos compostos fungitóxicos produzidos pelas actinobactérias

4.4.1 Partição líquido-líquido do extrato bruto

As actinobactérias foram cultivadas em maior volume como descrito no item 4.2.2.1 e para extração dos compostos de interesse, o meio metabólico foi submetido à partição líquido-líquido com solventes orgânicos em funil de decantação, utilizando os sistemas água: n-butanol (1:1) ou água: acetato de etila (1:1), processo repetido três vezes. A fração aquosa foi descartada e a fração orgânica foi concentrada em evaporador rotativo (MA 120-Marconi), pesada,

identificada e armazenada em geladeira a 4 °C. As frações orgânicas foram fracionadas por técnicas cromatográficas conforme a natureza dos compostos presentes.

4.4.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

Para a separação dos compostos bioativos foram realizadas cromatografias em coluna pré-empacotada do tipo SPE (Phenomenex Strata[®]) contendo cerca de 2, 5 ou 10 g de fase estacionária de sílica-gel ou sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈. A fase móvel foi utilizada em diferentes proporções em modo gradiente com os solventes (PA) cloreto de metileno (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

4.4.3 Cromatografia em coluna por permeação em gel

A fração ativa também foi fracionada por cromatografia em permeação em gel Sephadex[®] LH-20 (Sigma Aldrich), contida em uma coluna de vidro nas dimensões de 1,70 m de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno. A fase móvel foi em modo isocrático com metanol PA.

4.4.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para o monitoramento químico das separações cromatográficas utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD). Nestas análises foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 20x20 cm (Macherey-Nagel), sobre poliéster com indicador de fluorescência/UV 254 nm (Polygram[®] Sil G/UV 254, 0,20mm).

As frações foram aplicadas nas cromatofolhas e eluídas em uma combinação de solventes específica para cada amostra. Após essa etapa, as cromatofolhas foram inspecionadas em luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Inicialmente, os extratos brutos foram revelados com dragendorff (**A**), ácido fosfomolibdico (**B**) e ninidrina (**C**), com intuito de detectar os compostos nitrogenados ou da classe dos alcaloides, esteróis ou derivados de lipídeos e aminoácidos ou aminas, respectivamente.

A) DRAGENDORFF – **Solução 1:** 0,85 g de nitrato de bismuto dissolvido em 10 mL de ácido acético glacial.

Solução 2: 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água.

As duas soluções foram misturadas na proporção 1:1, após a aplicação, as cromatofolhas foram secas a temperatura ambiente.

B) ÁCIDO FOSFOMOLÍBDICO - 5 g de ácido fosfomolíbico em 100 mL de etanol, após a aplicação do revelador, as cromatofolhas foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos em chapa aquecedora.

C) NINIDRINA - 30 mg de ninidrina dissolvida em 10 mL de n-butanol, seguido pela adição de 0,3 mL de ácido acético glacial, após a aplicação do revelador, as cromatofolhas foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos em chapa aquecedora.

4.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

As frações com atividade antifúngica foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o equipamento HPLC-UV/Vis Agilent® HP 1100 (series UV/Vis), com bomba quaternária, acoplado a detector ultravioleta MWD (*Multiple Wavelength Detector*).

Em todas as etapas de purificação foi utilizada uma coluna com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex, 5 µm C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm).

As frações que foram submetidas à separação em CLAE foram eluídas em metanol grau HPLC na concentração de 10 mg mL⁻¹, sendo injetado 20 µL da amostra. A fase móvel com os solventes metanol, acetonitrila (grau HPLC) e água ultrapura Milli-Q, eluída com vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura de 28 °C, de acordo com o perfil químico de cada amostra:

- **Condição CLAE 1 (AM1):** Água/acetonitrila 90:10 em modo gradiente (15 min – 100% acetonitrila).
- **Condição CLAE 2 (AM3):** Água/metanol/acetonitrila 90:5:5 em modo gradiente (15 min - 100% orgânico).
- **Condição CLAE 3 (AM25):** Água/acetonitrila 50:10 em modo gradiente (15min – 100% acetonitrila).

Os comprimentos de ondas utilizados no detector UV/vis para visualização dos compostos foram 210, 230, 254, 275 e 365 nm.

4.5 Caracterização estrutural dos compostos

4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV-EM

As análises de HPLC-UV-EM das frações ativas foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, no Instituto de São Carlos-USP (IQSC/USP), em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Gomes Berlinck.

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado foi da marca Waters[®], modelo Alliance 2695, acoplado aos detectores de arranjo de fotodiodos com varredura no UV visível entre 200-800 nm (Waters[®], modelo 2996) e o outro detector, espectrômetro de massas da marca Waters[®], modelo ZQ 2000, com ionização por eletrospray e analisador do tipo quadrupolo com faixa de detecção entre 100 a 1500 Da.

A fase estacionária utilizada foi uma coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecil C₁₈ (Waters[®] X-Terra MS, 3,5 µm, 50 X 2,1 mm) e a fase móvel em gradiente de água ultrapura Milli-Q (0,1 % ácido fórmico), metanol (grau HPLC) e acetonitrila (grau HPLC), as condições de análise estão descritas na Tabela 2. As amostras foram diluídas em metanol grau HPLC na concentração de 1 mg mL⁻¹ e o volume injetado foi de 20 µL.

Tabela 2- Sistema de eluição utilizado nas análises de CLAE acoplada a UV-EM

Tempo (min)	Vazão (mLmin ⁻¹)	Sistema A (% Água+0,01 % A.F)	Sistema B (% Metanol)	Sistema C (% Acetonitrila)
0 a 15	0,5	90	5	5
16-20	0,5	-	50	50

Após o processamento dos espectros, os valores referentes à relação massa/carga dos compostos analisados foram obtidos. Uma busca na literatura e no banco de dados “*Dictionary of Natural Products*” foi realizada para verificar se o composto era conhecido.

4.5.2 Análises por Espectrometria de Massas (MS) - Inserção Direta

As análises das frações ativas por espectrometria de massas também foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP), em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes.

As amostras foram eluídas com metanol para uma concentração final de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e analisadas por inserção direta em um espectrômetro de massas XEVO TQ-S (Waters®) equipado com fonte de ionização por *eletrospray*, operando em modo positivo e negativo. As amostras foram injetadas via cromatografia líquida (Waters ACQTY), sem o uso de coluna cromatográfica.

Os parâmetros operacionais da fonte de ionização utilizados foram: voltagem do capilar de 3,20 kV; voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 150 °C; temperatura de dessolvatação 350 °C; fluxo do gás (cone) 20 Lh^{-1} e fluxo do gás (nebulizador) 350 Lh^{-1} . A varredura para análise foi na faixa de m/z de 150 a 2000 Da.

Após o processamento dos espectros, os valores referentes à relação massa/carga dos compostos analisados foram obtidos. Uma busca na literatura e no banco de dados "*Dictionary of Natural Products*" foi realizada para verificar se o composto era conhecido.

4.5.3 Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a EM de alta resolução

As análises de UPLC-EM para determinação das massas moleculares dos compostos puros foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, no Instituto de Química São Carlos-USP (IQSC/USP), em colaboração com o Prof. Dr. Roberto Gomes Berlinck.

As amostras foram eluídas em água e acetonitrila grau LC-MS (9:1) na concentração de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo injetado 10 μL da amostra. O espectrômetro de massas utilizado foi da marca Waters® XEVO G2-XS QToF em modo positivo e negativo, com detector MS^E centroid, faixa de detecção entre 100 a 1200 Da e energia de ionização de 30 eV. A fase estacionária utilizada foi a coluna Acquity

UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de água (+ 0,1% ácido fórmico) em metanol (+0,1% ácido fórmico) começando com 10 até 50% MeOH (6 min) e de 50 até 98% (3 min), totalizando 9 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

4.5.4 Análise de Infra-vermelho

O espectro da região do infravermelho (IV) foi obtido em um espectrofotômetro FTIR BOMEM modelo MB-102 (IQSC/USP). A amostra foi dissolvida em pequena quantidade de Metanol grau HPLC e aplicada sob forma de filme em um disco de silício, o solvente foi evaporado sob vácuo em dessecador. O espectro foi plotado em software Origin Pro 8.

4.5.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, campus São Carlos), em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

As amostras foram preparadas utilizando-se o solvente dimetilsufóxido deuterado (DMSO-*d*₆). O equipamento utilizado é da marca Bruker AVANCEIII, operando a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio (¹H). Desta forma, foram obtidos espectros unidimensionais de RMN ¹H.

4.5.6 Rotação Ótica [α]D

Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Márcio Weber Paixão (Laboratório de Síntese de Produtos Naturais - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Departamento de Química).

As rotações óticas foram medidas em um Polarímetro Polartronic H Schimidt + Haensch, em 589 nm. As amostras foram dissolvidas em 1 mL de MeOH grau HPLC ou H₂O. A análise foi realizada a temperatura de 20 °C e o comprimento do tubo de análise de 1 dm. Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{l \times c}$$

Onde:

$[\alpha]$ = rotação específica

T = temperatura na qual a medida foi tomada

λ = comprimento de onda

α = rotação observada

l = comprimento do tubo (em dm): 10 cm

c = concentração da solução (gramas por mililitro)

4.6 Monitoramento da atividade biológica dos compostos isolados

Os compostos puros foram avaliados quanto a sua atividade mínima inibitória contra *C. gloeosporioides* pelo método de microdiluição em placas de multipoços conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002), com modificações.

Para obtenção da solução de esporos foi utilizado uma placa de Petri contendo o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e adicionado solução salina 0,85 M NaCl. A suspensão foi filtrada em lã de vidro e a determinação de esporos foi realizada por câmara de Neubauer.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados previamente 40 µl de água ultrapura esterilizada. Em seguida, nos poços da coluna 1 foram adicionados 0,5 mg dos compostos puros diluídos em 40 µl água ultrapura, sendo realizada a diluição seriada até a coluna 12. Os compostos puros foram avaliados em concentrações decrescentes variando de 2,50; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,009; 0,004 e 0,002 mg mL⁻¹. Após a diluição, em cada poço foi inoculado 60 µL do meio malte 2 % juntamente com a suspensão de esporos (2,5x10⁵ células mL⁻¹). Para este ensaio, foi incluída uma fileira de controle de crescimento contendo 60 µl de meio com solução de esporos e 40 µl de água, mas sem o composto. Como controle positivo foi utilizado os fungicidas comerciais Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] diluídos em água ultrapura esterilizada e utilizados nas mesmas concentrações (princípio ativo) do composto puro. As microplacas foram cobertas com filme plástico

transparente e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, modelo SUNRISE, operado pelo software Magellan v 7.1, no comprimento de onda de 620 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros da Amazônia

O grupo de estudo do professor Dr. João Lúcio de Azevedo (ESALQ/USP) isolaram 65 actinobactérias da rizosfera de guaranazeiros da Amazônia. Os isolados foram gentilmente cedidos para a realização do presente estudo de bioprospecção.

5.2 Seleção de actinobactérias pela técnica do cultivo pareado

O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias foi avaliado em ensaio de cultivo pareado frente ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* e os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 15 e anexo 1.

Figura 15- Percentual médio de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em ensaio antagônico *in vitro* frente a diferentes actinobactérias isoladas da rizosfera de guaranazeiros. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. Os testes foram realizados em triplicata e o controle continha apenas o fitopatógeno. Mesmas letras não diferem entre si de acordo com a análise estatística feita pelo teste Scott-Knott.

Dentre as 65 actinobactérias avaliadas em cultivo pareado, 95,5 % apresentaram algum tipo de inibição do crescimento micelial do agente causal da antracnose do guaranazeiro.

Estas actinobactérias apresentaram variação na porcentagem de inibição, por isso foram reunidas em 4 grupos (A, B, C e D):

- Grupo A (7 isolados) a porcentagem de inibição variou de 37 a 47 %
- Grupo B (18 isolados) a porcentagem de inibição variou de 24 a 33 %
- Grupo C (25 isolados) a porcentagem de inibição variou de 12 a 23 %
- Grupo D (15 isolados) a porcentagem de inibição variou de 0 a 11 %.

As actinobactérias pertencentes ao grupo A podem ser visualizadas na Figura 16.

Figura 16- Actinobactérias que apresentaram as maiores porcentagens de inibição em cultivo pareado frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*. **1.** Controle, **A.** AM1, **B.** AM3, **C.** AM18, **D.** AM25, **E.** AM30, **F.** AM61 e **G.** AM68. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C e os testes foram realizados em triplicata.

As actinobactérias que apresentaram as maiores porcentagens de inibição em cultivo pareado foram AM1 (43,78 %), AM3 (43,98 %), AM18 (37,86 %), AM25 (43,17 %), AM30 (47,12 %), AM61 (40,12 %) e AM68 (47,94 %).

Diversos são os mecanismos de ação que podem influenciar o antagonismo exercido contra os fitopatógenos, entre estes, a produção de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes, a produção de enzimas hidrolíticas, entre outros. Os resultados verificados neste ensaio antagônico não

foram avaliados quanto ao tipo de mecanismo de antagonismo, pois este não era o objetivo deste estudo.

O método do cultivo pareado em disco de ágar é muito utilizado em estudos de antagonismos *in vitro*. Na literatura, há diversos relatos do uso desta técnica na seleção de micro-organismos promissores no controle de fitopatógenos. No trabalho realizado por KHALIL; MOUBASHER; HASAN, 2014, a atividade antagônica de 50 actinobactérias isoladas da rizosfera de arrozais, no Egito, foi avaliada contra *Pyricularia grisea*, agente causal da brusone.

Esta metodologia de seleção também foi utilizada por SILVA et al., 2013b, em que actinobactérias isoladas de plantas nativas do cerrado apresentaram resultados promissores em ensaio *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, agente causal da murcha de fusarium do maracujazeiro.

No estudo realizado por VIJAYAN e colaboradores (2014), o potencial antifúngico de 40 actinobactérias endofíticas de eucalipto e de cafeeiro foi avaliado em ensaio antagônico, dentre estas, os isolados NEK5, EE9 e CE1 foram capazes de inibir o crescimento micelial dos fungos do gênero *Fusarium* spp., *Phythium* spp., *Curvularia* spp. e *Cercospora* spp..

O ensaio antagônico realizado no presente estudo demonstrou ser adequado na seleção de actinobactérias capazes de inibir o crescimento micelial do agente causal da antracnose do guaranazeiro. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas 7 linhagens avaliadas como mais promissoras, ou seja, as do grupo A (AM1, AM3, AM18, AM25, AM30, AM61 e AM68), porém, muitas vezes o ensaio de cultivo pareado pode não refletir diretamente a produção de metabólitos secundários.

Diversos mecanismos de ação podem influenciar o antagonismo exercido contra os fitopatógenos, entre estes, a competição por espaço e/ou nutrientes, a produção de substâncias antimicrobianas, como sideróforos, enzimas hidrolíticas ou antibióticos.

Diversas pesquisas já foram realizadas, com intuito de identificar os possíveis mecanismos envolvidos no controle biológico de fitopatógenos. As enzimas hidrolíticas, por exemplo, podem atuar diretamente na degradação da parede celular do patógeno ou pode ocorrer um sinergismo com antibióticos (HOWELL, 2003).

Já a inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos pelos sideróforos varia de acordo com a habilidade deste, em sequestrar ferro, pois geralmente os sideróforos bacterianos privam os fungos deste elemento essencial, devido à baixa afinidade dos sideróforos fúngico com o ferro (FRANCO,2011).

Desta forma, um segundo ensaio foi realizado, com intuito de avaliar a ação dos compostos produzidos por actinobactérias frente ao desenvolvimento do *C. gloeosporioides*.

5.3 Avaliação da atividade antifúngica dos compostos produzidos pelas actinobactérias frente ao *C. gloeosporioides*

Após o cultivo em meio líquido, o meio metabólico das 7 actinobactérias selecionadas (AM1, AM3, AM18, AM25, AM30, AM61 e AM68) foi submetido a três métodos de extração: **(a)** partição líquido-líquido com n-butanol; **(b)** partição líquido-líquido com acetato de etila e **(c)** coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈. As frações foram ressuspensas em metanol e avaliadas contra o *C. gloeosporioides* em ensaio de difusão em disco de papel aplicando 2 mg disco⁻¹ e os resultados podem ser visualizados na Figura 17 e anexo 2.

Figura 17- Percentual de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* em ensaio de difusão em disco de papel frente às frações obtidas em: **A)** partição líquido-líquido com n-butanol; **B)** partição líquido-líquido com acetato de etila e **C)** coluna tipo Sep-Pak C₁₈. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C e os testes foram realizados em triplicata. Mesmas letras não diferem entre si de acordo com a análise estatística feita pelo teste Scott-Knott.

Dentre as frações obtidas na partição líquido-líquido com n-butanol, as que apresentaram as maiores porcentagens de inibição em ensaio de difusão em disco de papel foram isoladas do AM1 e AM3. Já no ensaio realizado com as frações resultantes da partição líquido-líquido com acetato de etila, verificamos as maiores porcentagens para as isoladas do AM3 e AM30, e finalmente na extração em fase sólida C₁₈, os maiores percentuais de inibição foram das frações isoladas de AM3, AM25 e AM30.

Em ensaio de difusão em disco, as frações de AM1, AM3, AM18, AM25 e AM30 apresentaram porcentagens de inibição superiores em relação ao obtido em ensaio de cultivo pareado, considerando a hipótese de atividade antifúngica estar relacionada à produção de metabólitos secundários, este aumento da atividade pode ser atribuído à etapa de extração e aos solventes utilizados.

Talvez ainda pelo mesmo motivo, para os isolados AM61 e AM68 os solventes utilizados na extração não foram capazes de extrair adequadamente o(s) composto(s) ativo(s) presentes no meio metabólico.

Na literatura, há relatos de autores que também realizaram mais de um ensaio para selecionar actinobactérias promissoras no controle de patógenos. Um exemplo, é o estudo realizado por BIZUYE et al., (2013), no qual a seleção de actinobactérias foi baseada em dois ensaios. No primeiro, os isolados de actinobactérias foram avaliados contra bactérias patogênicas em placa de Petri por meio de estrias perpendiculares, enquanto que no segundo, a avaliação foi feita com a fração acetato das actinobactérias, frente às mesmas bactérias.

Dentre as 07 actinobactérias que tiveram suas frações avaliadas pelo método de difusão em disco de papel, os isolados AM1 (61,15 %), AM3 (71,60 %) e AM25 (51,39 %) apresentaram as maiores porcentagens de inibição. Diante disso, estas actinobactérias foram selecionadas para purificação de seu(s) metabólito(s) secundário(s) com atividade contra *C. gloeosporioides*.

5.4 Caracterização Molecular

As três linhagens selecionadas em ensaio de difusão em disco de papel (AM1, AM3 e AM25) foram identificadas por análise molecular.

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram comparadas com as disponíveis no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As actinobactérias sequenciadas foram identificadas até nível de gênero como sendo *Streptomyces* sp.

O gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae; ordem Actinomycetales e classe Actinobacteria (ANDERSON; WELLINGTON, 2001).

Uma alternativa para o isolamento de outros gêneros de actinobactérias seria o uso de meio de cultivo mais complexo, com diferentes fontes de carbono ou nitrogênio (SANCHEZ; DEMAINE, 2002), pois a utilização de meios de cultivo que apresentam uma reserva de nutrientes essenciais ou de fácil metabolismo pode levar ao isolamento de espécies cosmopolitas.

Segundo WILLIAMS et al., 1983; OKUDOH; WALLIS, 2007, fatores como composição de meio de cultura, pré- tratamento das amostras e condições de incubação são fatores que mais influenciam a quantidade e a diversidade de espécies isoladas.

Independente do ambiente, a predominância deste gênero em isolamentos já foi relatada por outros pesquisadores como por exemplo, no estudo realizado por SILVA, 2010, dentre as 54 actinobactérias isoladas da rizosfera de guaranazeiros, 35% pertenciam ao gênero *Streptomyces*. Este evento também foi verificado por SILVA, 2015, pois dentre as 21 actinobactérias isoladas da esponja marinha *Aplysina fulva*, 52,3 % pertenciam ao gênero *Streptomyces*.

5.5 Estudo químico e biológico dos extratos de actinobactérias

5.5.1 Estudo químico dos compostos produzidos por *Streptomyces* sp. AM1

Em ensaio de cultivo pareado, a linhagem *Streptomyces* sp. AM1 inibiu 43,78 % do crescimento micelial do *C. gloeosporioides* e no ensaio com a fração butanólica, a porcentagem de inibição foi de 61,15 %. Desta forma, esta linhagem foi selecionada para uma investigação química detalhada de seu(s) metabólito(s) bioativo(s).

A actinobactéria AM1 foi cultivada em maior volume (6 L), após o crescimento, o meio metabólico foi submetido à partição líquido-líquido com o solvente n-butanol, obtendo-se duas frações, a aquosa (A1) e a n-butanólica (A2).

Estas frações foram avaliadas frente ao *C. gloeosporioides* em ensaio de difusão em disco de papel aplicando 2 mg disco⁻¹ (Figura 18).

Figura 18- Ensaio da atividade antifúngica *in vitro* das frações aquosa e n-butanólica obtidas a partir do meio metabólico da actinobactéria AM1, frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

A fração aquosa (A1) não apresentou atividade, provavelmente por conter apenas nutrientes de composição do meio de cultura, e eventualmente compostos polares não ativos, por isso esta foi descartada. Desta forma, somente a fração n-butanólica foi submetida a demais etapas cromatográficas.

A fração n-butanólica (A2) foi avaliada por cromatografia de camada delgada (CCD), visando à análise do perfil químico da amostra. Os eluentes utilizados foram diclorometano/ metanol (8:2, v:v). Após a eluição, a cromatofolha foi observada sob a luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de ondas de 254 nm e 365 nm, em seguida revelada com os reagentes dragendorff, ácido fosfomolibdico e ninidrina. Os compostos presentes nesta fração apresentaram absorção no comprimento de onda de 254 nm e também reagiram com o reagente PMA (ácido fosfomolibdico).

O revelador ácido fosfomolibdico é indicativo de compostos fenólicos, de esteróis, de derivados de lipídeos, de terpenos, de sesquiterpenos e de saponinas (ZARZYCHI; BARTOSZUK; RADZIOWON, 2006).

A fração n-butanólica (A2) foi submetida à separação cromatográfica por permeação em gel Sephadex[®] LH-20. Desta separação, foram obtidas 26 frações que por similaridade química visualizada em CCD foram reunidas em 10. Estas frações foram avaliadas em ensaio biológico *in vitro* contra o *C. gloeosporioides* aplicando-se 1 mg disco⁻¹ (Figura 19).

Figura 19- Ensaio das frações resultantes da cromatografia em gel de Sephadex® LH20 (A2A a A2J) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Das dez frações avaliadas, seis apresentaram atividade: A2A (31,9 %); A2D (40,6 %); A2F (21,6 %), A2G (66,97 %), A2I (30,3 %) e A2J (18,27 %). Neste ensaio observamos que as frações com atividade antifúngica não são subsequentes. Então, as frações mais promissoras foram analisadas por CLAE-UV visando à verificação da similaridade química dos compostos ativos (Figura 20).

Figura 20- Cromatogramas das frações ativas A2D; A2F; A2G e A2I monitorados no $\lambda = 210$ nm. Condições de análise: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex 5 μ m C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm) e fase móvel em modo gradiente de água em acetonitrila (proporção inicial de 90H₂O:10ACN e após 25 min, 100% ACN), vazão de 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 30 min.

As frações A2A e A2J foram submetidas à análise em CLAE, mas dentre os 5 comprimentos de onda utilizados no monitoramento, nenhum foi possível observar bandas cromatográficas, por isso somente as frações A2D; A2F; A2G e A2I estão representadas nos cromatogramas acima.

Nos cromatogramas adquiridos foi possível observar a presença de duas bandas cromatográficas majoritárias no (t_R) de 2,3 e 3,0 minutos para todas as frações. A fração A2G (66,97 %) por apresentar o maior percentual de inibição foi selecionada para continuidade dos estudos.

A fração A2G foi submetida à separação cromatográfica em coluna de sílica gel e fase móvel em gradiente de diclorometano, acetato de etila e metanol. Desta separação cromatográfica, foram obtidas 10 frações que por similaridade química foram reunidas em 5. Estas frações foram avaliadas em ensaio antifúngico aplicando-se $0,5 \text{ mg disco}^{-1}$ (Figura 21).

Figura 21- Bioensaio das cinco frações obtidas na separação cromatográfica em coluna do tipo Sep-Pak de sílica gel (A2G1 a A2G5) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Neste ensaio de atividade antifúngica, dentre as cinco frações avaliadas, a fração A2G5 inibiu em 50,25 % o crescimento micelial do *C. gloeosporioides*. Na análise do perfil químico da amostra em placa de CCD foi verificada a presença de poucos compostos. Desta forma, a fração A2G5 foi submetida à separação em CLAE (Figura 22).

Figura 22- Cromatograma da fração A2G5 monitorada no $\lambda = 230$ nm.

Condições de análise: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex 5 μ m C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm) e fase móvel em modo gradiente de água em acetonitrila (proporção inicial de 90H₂O:10ACN e 100% ACN após 25 min), vazão de 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 30 min.

As frações foram coletadas conforme a sinalização da Figura 22. As 8 frações separadas em CLAE foram avaliadas em ensaio antifúngico aplicando-se 0,1 mg disco⁻¹ (Figura 23).

Figura 23- Bioensaio das oito frações obtidas na separação em CLAE (A2G5A - A2G5H) frente ao *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

A fração A2G5B com (t_R) de 2,3 minutos foi a única que apresentou inibição (29,87 %) ao crescimento micelial do fitopatógeno. Em relação ao ensaio com a fração precursora, verifica-se uma queda de atividade, da fração butanólica 61,14 % a fração A2G5B 29,87 %. Este fato pode ter ocorrido em relação à concentração do composto utilizado em ensaio *in vitro*, pois foi avaliado 0,1 mg da fração A2G5B, enquanto que no primeiro ensaio foi avaliado 2 mg da fração butanólica.

A fração A2G5B foi submetida à análise por CLAE acoplado aos detectores de (UV) e espectrometria de massas de baixa resolução (CLAE-UV-MS). Os dados são apresentados na Figura 24.

Figura 24- Cromatograma da fração A2G5B monitorada no $\lambda = 230$ nm (A) e espectro de UV da fração A2G5B (B).

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS- C_{18} (50 x 2,1mm, 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H_2O em MeOH/ACN, com vazão de 0,5 mL min^{-1} , com tempo de análise de 20 min.

No espectro de absorção na região do UV observamos uma banda de absorção mais intensa em 213 nm e duas bandas de absorção menos intensa em 266 e 298, respectivamente. As três bandas observadas apresentam $\lambda_{m\acute{a}x}$ acima de 200 nm, isto indica que provavelmente o composto apresenta cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

O espectro de massas de baixa resolução da amostra A2G5B foi obtido no modo positivo (Figura 25).

Figura 25- Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A2G5B

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS- C_{18} (50x2,1mm, 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H_2O em MeOH/ACN, com vazão de 0,5 mL min^{-1} , com tempo de análise de 20 min.

No espectro de massas de baixa resolução em modo positivo do composto A2G5B foram observados os sinais com m/z de 203 e 241. Esta diferença de 38 na relação m/z observada, sugere que o valor m/z 203 seja referente ao composto protonado $[M+H]^+$ e o segundo seria um íon aduto de potássio $[M+K]^+$, ou seja, o composto apresenta a massa molecular de 202 Da.

Neste espectro também observamos a presença de átomos de nitrogênio em número par, devido ao íon molecular apresentar-se em número ímpar. Portanto, estima-se que esta molécula possua nitrogênio em sua estrutura.

Diante desta informação, foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products* utilizando-se como palavras chaves o intervalo da massa molar “202,1 a 202,9 Da” e como fonte biológica “*Streptomyces*”.

Nesta busca foram encontrados 10 compostos: actinolactomicina (CAS: 865688-94-4); dihidro-3- (1-hidroxietil)-4-metil-2 (3H)-furanona, 5-acetoxi (CAS: 127395-64-6); 4-(3,5-Di-hidroxi-hexil) -3-metil-2-oxetanona (CAS: 1615213-42-7); feigrisolida A (CAS: 313949-16-5); feigrisolida A; 8-epimer (CAS: 313949-17-6); mansouramicina B; dechloro (CAS: 24011-07-2); ácido não-acético (CAS: 60761-12-8); okaspirodiol (CAS: 892397-47-6); ácido proclavamínico (CAS: 112240-59-2); triptamina; N^b-AC (CAS: 1016-47-3).

Diante destas dez possibilidades, a fração A2G5B foi submetida à análise de ressonância magnética 1H (RMN- 1H) para confirmação de sua identificação estrutural.

No espectro de RMN 1H (anexo 3) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto A2G5B e em comparação com os dados da literatura foi possível correlacioná-lo com o ácido proclavamínico (Figura 26) (BAGGALEY et al.,1990). Na tabela 3, verificamos os valores de RMN 1H do composto isolado (600 MHz) e do estudo de BAGGALEY et al., 1990 (400 MHz).

Figura 26- Estrutura química do composto ácido proclavamínico (CAS: 112240-59-2)

Fonte: Adaptado de Baggailey et al., 1990.

Tabela 3- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A2G5B ($\text{DMSO}-d_6$) e do ácido proclavamínico (D_2O).

Posição do H	Ácido proclavamínico	
	A2G5B	Baggaley et al.,(1990)
	δH , multiplicidade e J (Hz)	δH , multiplicidade e J (Hz)
2	4,27 d (5,2)	4,08 d (5,5)
3	4,90 m	4,20 ddd (9,4; 5,4; 3,9)
3OH	3,27 m	3,48 m
3'	3,01 m	3,01 t (4,0)
4	1,11 m	1,77 m
4'	3,66 m	3,55 m
5	3,10 m	3,10 m
COOH	-	-
NH ₂	8,47	-

d: dubleto, ddd: duplo duplo dubleto, m: multipeto, J =constante de acoplamento

Ao analisar o espectro de ^1H RMN verificaram-se quatro valores de deslocamento químico referentes a quatro grupos metilenos: o primeiro em δ 1,11 (m, 4-CH₂); o segundo em δ 3,01 (m, 3'-CH₂); o terceiro em δ 3,10 (m, 5-CH₂) e o quarto em δ 3,66 (m, 4'-CH₂). O espectro também indicou a presença de dois hidrogênios metínicos: em δ 4,27 (d, J =5,2, 2-CH) e em δ 4,90 (m, 3-CH).

Tanto no espectro do composto isolado, como no espectro do composto ácido proclavamínico, não foi possível observar o sinal característico do ácido carboxílico.

Segundo PAVIA et al., 2010, o hidrogênio do ácido carboxílico é desblindado pelo oxigênio e considerado altamente ácido. O seu sinal no espectro RMN ^1H é um pico largo e muito característico, no entanto, as ligações de hidrogênio e as trocas podem fazer o pico alargar-se muito na base e mostrar uma intensidade muito pequena ou desaparecer na linha de base, desta forma, o próton ácido poderá não ser observado.

Como acontece com muitos álcoois, o hidrogênio COOH faz trocas com H₂O e D₂O. Esta troca com D₂O converterá o grupo em COOD, desta forma, a absorção COOH perto de 12ppm irá desaparecer (PAVIA et al., 2010).

Com intuito de verificar a presença do grupo funcional carboxila, o composto A2G5B foi submetido à análise de absorção no infravermelho. Na Figura 27 observamos o espectro de infravermelho do composto A2G5B.

Figura 27- Espectro de infravermelho do composto A2G5B obtido em espectrofotômetro FTIR BOMEM modelo MB-102, cuja amostra foi aplicada em pastilha de silício e o espectro foi plotado em *software* Origin Pro 8.

Nesta análise algumas bandas características foram observadas, como as correspondentes ao grupo funcional carboxila. Em ácidos carboxílicos alifáticos aparecem uma banda do grupo C=O em 1730-1700 cm^{-1} , já o estiramento O-H aparece no espectro como uma banda muito larga que vai de 3400 a 2400 cm^{-1} (PAVIA et al., 2010). Neste espectro também observamos uma banda em 1560 cm^{-1} referente ao dobramento de grupos metilenos.

Ao analisar a estrutura química do composto ácido proclavamínico na Figura 26, observamos a presença do anel lactâmico. No entanto, no espectro de infravermelho do composto A2G5B não verificamos o sinal correspondente ao anel lactâmico em 1745 cm^{-1} .

Diante dos valores observados tanto no espectro de infravermelho, como nos valores observados em espectro de RMN ^1H , sugerimos que o composto A2G5B é um análogo do ácido proclavamínico, diante dos dados de BAGGALEY et al., 1990.

No estudo de BAGGALEY et al., 1990, o ácido proclavamínico foi obtido na biossíntese do ácido clavulânico. O nome químico deste composto é (2S,3R) 5-amino-3-hidroxi-2-(2-oxoazetidin-1-yl) ácido pentanóico, cuja fórmula estrutural é $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4$ e $[\alpha]^{20}_{\text{D}} +7.8^\circ$ (c 1,0; H_2O), (BAGGALEY et al., 1990).

O composto isolado apresentou $[\alpha]_D^{20} + 7,4^\circ$ (c 0,6; H₂O). A rotação óptica é afetada pela concentração da substância, pela estrutura da molécula, pelo solvente e pela temperatura (PAVIA et al., 2010).

O ácido proclavamínico foi o primeiro intermediário na via biossintética do ácido clavulânico a ser identificado. O uso do ácido proclavamínico como substrato e da enzima clavaminato sintase (CAS) foi capaz de gerar o ácido clavamínico (BAGGALEY et al., 1990; OLIVEIRA et al., 1994).

A conversão do ácido clavamínico em ácido clavulânico implica em modificações na cadeia lateral, assim como a inversão da estereoquímica do anel. O ácido clavulânico é constituído por um anel β -lactâmico condensado a um anel oxazolidina que age na inibição das β -lactamases produzidas pelas bactérias resistentes (BAGGALEY et al., 1990).

O ácido clavulânico foi descrito pela primeira vez por BROWN et al. (1976), em que este foi isolado de *Streptomyces clavuligerus*.

A resistência bacteriana consiste no principal problema de saúde pública e esta é uma consequência do uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais. Normalmente, esta resistência ocorre por mutações que proporcionam a síntese de enzimas capazes de inativar tais substâncias. Um exemplo deste evento é a resistência aos antibióticos β -lactâmicos, por bactérias capazes de produzir enzimas β -lactamases que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico, resultando em um composto inativo (OLIVEIRA et al., 2009).

A concentração mínima inibitória do composto isolado (análogo do ácido proclavamínico) e dos fungicidas Score[®], Captan[®] e Dithane NT[®] contra o *C. gloeosporioides* foi determinada pelo método de microdiluição em placas de multipoços conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).

No ensaio de microdiluição contra o agente causal da antracnose, a concentração mínima inibitória para o composto ácido proclavamínico foi de 1,25 mg mL⁻¹ (Figura 28).

Figura 28- Determinação da concentração mínima inibitória do composto A2G5B (ácido proclavamínico) pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.

O fungicida Score® apresentou concentração inibitória de 0,02 mg mL⁻¹ e os fungicidas Captan® e Dithane NT® não inibiram nas concentrações avaliadas pelo método de microdiluição (Figura 29). Desta forma, o fungicida Score® foi o único que apresentou MIC menor que o composto ácido proclavamínico.

Figura 29- Determinação da concentração mínima inibitória dos fungicidas: **A)** Score®, **B)** Captan® e **C)** Dithane NT® pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.

Figura 29- Determinação da concentração mínima inibitória dos fungicidas: **A)** Score®; **B)** Captan® e **C)** Dithane NT® pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm (continuação).

Os três fungicidas utilizados como controle positivo em ensaio de microdiluição apresentam um amplo espectro e cada um possui um mecanismo de ação específico.

Score® é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis cujo ingrediente ativo é o difenoconazol ($C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$) de nome químico cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1, 2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3- dioxolan-2-il] fenil 4-clorofenil- éter (Figura 30).

Figura 30- Estrutura química do princípio ativo difenoconazol (Score®)

Fonte: Adaptado Santiago et al., 2015

Este fungicida é indicado no controle de *Alternaria*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Mycosphaerella*, *Phoma*, *Ramularia*, *Septoria*, *Spaceloma*, *Sphaeroteca*, *Melampsora*, *Bipolaris*, *Erysiphe*, *Uromyces*, *Oidium*, *Phakopsora*, *Elsinoe* e *Pseudocercospora*. Este agroquímico é registrado para as seguintes culturas: abacate, abobrinha, álamo, alface, alho, amendoim, arroz, banana, batata, café, cebola, cenoura, citrus, couve, feijão, maçã, manga, maracujá, morango, pimentão, soja, tomate e uva (AGROFIT, 2017).

Os esteroides são biomoléculas responsáveis pela manutenção das membranas celulares dos seres vivos. O principal esteroide encontrado nos fungos é o ergosterol. Os fungicidas do grupo dos triazóis atuam em alvos específicos do metabolismo do ergosterol, pois estes inibem a enzima esterol C14 α demetilase, impedindo a demetilação da lanosterol, precursor do ergosterol. O resultado desta inibição é um desequilíbrio entre os lipídeos das membranas e um acúmulo de ácidos graxos livres, estes acontecimentos levam os fungos à morte (SANTIAGO et al., 2015).

O Captan SC[®] é um fungicida não sistêmico, com ação preventiva e que pertence ao grupo químico dicarboximida, cujo princípio ativo é a captana (C₉H₈Cl₃NO₂S) de nome químico de N-(triclora metiltio) 4-ciclo-hexano-1,2-dicarboximida (Figura 31).

Figura 31- Estrutura química do princípio ativo captana (Captan SC[®])

Fonte: Adaptado Madalosso; Balardin, 2014.

Este fungicida é indicado no controle de *Phytophthora* spp., *Rizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Stenocarpella maydis*, *Phomopsis sojae*, *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Nigrospora sphaerica*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma sorghina*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Septoria tritici*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*. Este fungicida é registrado para as seguintes culturas: alfafa,

algodão, amendoim, feijão, milho, soja, sorgo, trigo, batata, cebola, tomate e uva (AGROFIT, 2017).

Os fungicidas do grupo das carboxamidas atuam como inibidores da respiração mitocondrial, privando o fitopatógeno do principal produto, o ATP. O mecanismo de ação ocorre pela inibição da enzima Succinato Desidrogenase (SDHI), atuante no Complexo II da cadeia de elétrons, impedindo a oxidação de Succinato para Fumarato. Em outros estudos referentes ao mecanismo de ação das carboxamidas, ainda indicam seu efeito na biossíntese de proteínas, de lipídeos, de DNA e RNA (MADALOSSO; BALARDIN, 2014).

Dithane NT[®] é um fungicida de contato que pertence ao grupo dos ditiocarbamato, cujo princípio ativo é mancozeb (C₈H₁₉O₂PS₃) de nome químico Etileno-bis-ditiocarbamato de Manganês com íon Zinco (Figura 32).

Figura 32- Estrutura química do princípio ativo Mancozeb (Dithane NT[®])

Fonte: Adaptado Reis et al., 2010

Este fungicida é indicado no controle *Puccinia allii*, *Cercospora arachidicola*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Hemileia vastatrix*, *Diaporthe citri*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria brassicae*, *Peronospora parasítica*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Phytophthora capsici*, *Septoria lycopersici*, *Puccinia triticina*, *Bipolaris sorokiniana*, *Phomopsis viticola* e *Botrytis cinerea*. Este pode ser aplicado em diversas culturas como alho, amendoim, arroz, café, cebola, citrus, couve, feijão, figo, maçã, manga, pepino, pimentão, tomate, trigo e uva.

O mecanismo de ação dos ditiocarbamatos caracteriza-se pela peroxidação dos lipídios e pela interação com a enzima flavina-redutase do citocromo-c. Este fungicida inibe a respiração dos fungos devido aos seus produtos de redução, como sulfito de hidrogênio (REIS et al., 2010).

Até o momento, na literatura não foi relatado atividade antifúngica do ácido proclavamínico. Desta forma, este é o primeiro relato da atividade antifúngica do ácido proclavamínico. O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de fracionamento cromatográfico do composto isolado da actinobactéria *Streptomyces* sp. AM1 (Figura 33).

Figura 33- Fluxograma do estudo químico da fração ativa de *Streptomyces* sp. AM1 (A2G5B)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição.

* Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex 5 µm C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm) eluída em modo gradiente de H₂O em ACN 90:10, vazão 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 30 min.

5.5.2 Estudo químico dos compostos produzidos por *Streptomyces* sp. AM3

No cultivo pareado, o isolado AM3 inibiu em 43,98 % o crescimento micelial do *C. gloeosporioides* e em ensaio por difusão em disco, a fração acetato inibiu em 71,60 %. Desta forma, este isolado foi selecionado para investigação química detalhada quanto à presença de metabólito(s) bioativo(s).

Após o cultivo da actinobactéria em maior volume (3 L), o meio metabólico foi concentrado e particionado com o solvente acetato de etila, obtendo-se a fração aquosa (FA) e a acetato (A3). Estas frações foram avaliadas em ensaio *in vitro* contra *C. gloeosporioides* utilizando-se 2 mg disco⁻¹ (Figura 34).

Figura 34- Ensaio da atividade antifúngica das frações aquosa (FA) e acetato (A3), obtidas a partir do meio metabólico da actinobactéria AM3 frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Neste bioensaio de atividade antifúngica, verificamos que a fração aquosa (41,76 %) e a fração acetato (78,34 %) inibiram o crescimento micelial do fitopatógeno avaliado. Como a fração aquosa contém resíduos indesejáveis, como meio de cultura, decidimos trabalhar somente com a fração orgânica que apresentou maior porcentagem de inibição.

A análise do perfil químico da fração acetato (A3) foi feita por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como eluentes acetato de etila/ metanol (8:2, v:v). Após a eluição, a cromatofolha foi observada sob a luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de ondas de 254 nm e 365 nm, em seguida revelada com os reagentes dragendorff, ácido fosfomolíbdico e ninidrina. Os compostos presentes nesta fração apresentaram absorção no comprimento de onda de 254 nm e também reagiram com o revelador PMA (ácido fosfomolíbdico).

O revelador ácido fosfomolíbdico é indicativo de compostos fenólicos, de esteróis, de derivados de lipídeos, de terpenos, de sesquiterpenos e de saponinas (ZARZYCHI; BARTOSZUK; RADZIOWON, 2006).

A fração acetato de etila (A3) foi submetida à separação cromatográfica em coluna do tipo Sep-Pak de sílica gel e fase móvel em gradiente diclorometano, acetato de etila e metanol. Desta separação cromatográfica foram obtidas 10 frações que por similaridade química observada em CCD foram reunidas em 8. Estas foram avaliadas em ensaio antifúngico *in vitro* aplicando 0,5 mg disco⁻¹ (Figura 35).

Figura 35- Bioensaio com as oito frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A3A a A3H) contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

No ensaio de atividade antifúngica, dentre as oito frações avaliadas, a fração A3A (50,93 %) apresentou o maior percentual de inibição ao crescimento micelial de *C. gloeosporioides*.

Após ensaio, a fração A3A foi submetida à separação cromatográfica em coluna Sep-Pak do tipo sílica gel e fase móvel em gradiente diclorometano, acetato de etila e metanol. Desta separação cromatográfica foram obtidas 12 frações, que por similaridade química foram reunidas em 9 frações, sendo estas, avaliadas em ensaio antifúngico aplicando 0,2 mg disco⁻¹ (Figura 36).

Figura 36- Bioensaio com as oito frações obtidas em cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A3A1 a A3A9) frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

No ensaio de atividade antifúngica, dentre as nove frações avaliadas, as frações A3A2 (24,70 %) e A3A3 (16,90 %) apresentaram o maior percentual de inibição ao crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. O perfil químico das duas frações ativas foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV (CLAE-UV), cujo cromatograma observamos na Figura 37.

Figura 37- Cromatogramas das frações ativas A3A2 e A3A3. Coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex 5 μ m C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm). Fase móvel em gradiente de água/acetonitrila/metanol (90:5:5), detector UV em 230 nm (A3A2) e 254 nm (A3A3). Fluxo de 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 25 min.

Na purificação das amostras A3A2 e A3A3, as frações foram coletadas conforme sinalização acima (Figura 37). A coluna utilizada foi de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ e a fase móvel foi em gradiente de 20 min na proporção inicial de H₂O: MeOH: ACN (90:5:5), após 15 min ACN: MeOH (50:50) e 100% MeOH em 17 min.

Na purificação da amostra A3A2 foram coletas 5 frações que foram avaliadas em ensaio antifúngico *in vitro* aplicando 0,1 mg disco⁻¹ (Figura 38).

Figura 38- Bioensaio realizado com oito frações obtidas na separação em CLAE (A3A2A – A3A2E) frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

A fração A3A2D, referente ao composto no tempo de retenção em 11,17 minutos inibiu em 19,71 % o crescimento micelial do fitopatógeno.

Na purificação da amostra A3A3 foram coletas 3 frações que foram avaliadas em ensaio antifúngico *in vitro* utilizando 0,1 mg disco⁻¹ (Figura 39).

Figura 39- Bioensaio realizado com as três frações obtidas na separação em CLAE (A3A3A- A3A3C) contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C em BDA.

A fração A3A3B com (t_R) de 11,16 minutos foi a única que inibiu em 50,5 % o crescimento micelial do fitopatógeno. Como as frações A3A2D (19,71 %) e A3A3B (50,5 %) apresentaram o mesmo tempo de retenção de 11,1 minutos, a fração A3A3B foi selecionada para continuidade dos estudos.

A fração A3A3B foi submetida à análise por inserção direta em espectrômetro de massas de baixa resolução (EM) XEVO TQ-S (Waters®). O espectro foi obtido em modo positivo (Figura 40).

Figura 40- Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A3A3B
Condições de análise: voltagem do capilar de 3,20 kV; voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 150 °C; temperatura de dessolvatação 350 °C; fluxo do gás (cone) 20 Lh⁻¹ e fluxo do gás (nebulizador) 350 Lh⁻¹. A varredura para análise foi na faixa de massas de m/z de 150 a 2000 Da.

O espectro de massa de baixa resolução em modo positivo para o composto A3A3B apresentou alguns picos na faixa de massas entre 250-600 Da. Pela análise mais detalhada do espectro foi possível observar sinais em m/z 294,3; 316,2; 587,4; 609,3 e 625,3. Esta diferença de 22 unidades de massa na relação m/z sugere que o valor m/z em 294,3 seja referente ao composto protonado $[M+H]^+$ e o segundo valor de m/z em 316,2 seria um íon aduto de sódio $[M+Na]^+$, ou seja, o composto apresenta a massa molar de 293,3 Da. Já o terceiro valor em m/z 587,4 seria o dímero $[2M+H]^+$, o quarto valor em m/z 609,3 seria o dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$ e o valor em m/z 625,3 seria o dímero aduto de potássio $[2M+K]^+$.

Ao analisarmos o espectro de massas (Figura 40), também observamos o perfil de fragmentação m/z 276,2 $[M+H]^+$ e 258,2 $[M-18+H]^+$, em que a perda de 18 Da corresponde a perda de H₂O. A perda de H₂O é indicativo de molécula com OH (hidroxila) como substituinte (LIU et al., 2011). Neste espectro também observamos a presença de átomos de nitrogênio em número ímpar, devido à molécula protonada apresentar-se em número par. Portanto, estima-se que esta molécula possui em sua estrutura hidroxila e nitrogênio.

A fração A3A3B foi submetida à análise de UPLC acopladas a espectrometria de massas de alta resolução. O cromatograma e o espectro são apresentados nas Figuras 41 e 42, respectivamente.

Figura 41- Cromatograma da fração A3A3B em modo negativo
Condições de análise: coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel em gradiente de água (+ 0,1% ácido fórmico) em metanol (+0,1% ácido fórmico) começando com 10 até 50% MeOH (6 min) e de 50 até 98% (3 min), totalizando 9 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Figura 42- Espectro de massas de alta resolução em modo positivo e negativo da fração A3A3B. Condições de análise: coluna Acquity UPLC BEH C_{18} (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de água (+ 0,1% ácido fórmico) em metanol (+0,1% ácido fórmico) começando com 10 até 50% MeOH (6 min) e de 50 até 98% (3 min), totalizando 9 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Pela análise de UPLC verificou-se que a amostra A3A3B apresentava bom grau de pureza, pois os picos com tempo de retenção em 6,76; 7,42; 7,94; 8,72 e 9,16 minutos corresponde a sinais do solvente, somente o pico em 4,35 minutos era referente ao composto.

Ao analisar o espectro de massas de alta resolução em modo positivo do composto em (t_R) de 4,35 min observamos o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 294,169 e os íons $[M+Na]^+$ em m/z 316,151 e $[2M+Na]^+$ em m/z 609,314, corroborando com os dados obtidos em espectrometria de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 293,162 Da. No espectro em modo negativo, observamos um sinal em m/z 292,154 referente ao composto desprotonado $[M+H]^-$.

Diante destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products* utilizando-se como palavras chaves o intervalo da massa molar “293,10 a 293,20 Da” e como fonte biológica “*Streptomyces*”. Nesta

busca foram encontrados 6 compostos: actifenamida (293,12 Da); antibiótico BU 4601A (283,19); anisomicina; O-De-Ac, 3-butanoil (293,16 Da); obscurolide C2 α ; 7-Epimer (293,12 Da); Ácido fenático A (293,12 Da) e estreptimidona (293,16 Da). As informações químicas destes compostos são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Informações químicas dos compostos compatíveis encontrados no banco de dados *Dictionary of Natural Products*

Nome do composto e referência na literatura	Número CAS ¹	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Actifenamida (Cheenpracha et al., 2011)	1352800-64-6	C ₁₅ H ₁₉ NO ₅
Antibiótico BU 4601A (Ohkuma et al., 1993)	148915-76-8	C ₁₇ H ₂₇ NO ₃
Anisomicina; O-De-Ac, 3-butanoil (Sobin et al., 1954)	96740-19-1	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄
Obscurolide C2 α ; 7-Epimer (Ritzau et al., 1993)	154272-84-1	C ₁₅ H ₁₉ NO ₅
Ácido fenático A (Fukuda et al., 2005)	861941-64-2	C ₁₅ H ₁₉ NO ₅
Streptimidona (Frohardt et al., 1959)	738-72-7	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄

¹ Número de registro no banco de dados *Dictionary of Natural Products*

Diante destas seis possibilidades, a fração A3A3B foi submetida à análise de ressonância magnética unidimensional ¹H (600 MHz) para confirmação da sua identificação estrutural.

Dentre os seis possíveis compostos, somente os compostos anisomicina e streptimidona apresentavam massa exata de 293,16 Da, porém no espectro de RMN ¹H do composto anisomicina apresentava valores de deslocamento em δ 7 a 8,5 ppm, típicos de deslocamentos de hidrogênio de anéis aromáticos (PAVIA et al.,

2010), valores estes, que não foram verificados no espectro de RMN ^1H do composto A3A3B. Ao comparar os valores de deslocamento de hidrogênio do composto isolado (Anexo 4) com os valores da literatura, este foi compatível com o composto streptimidona. Na tabela 5, verificamos os valores de RMN ^1H do composto isolado e dos estudos de KIM et al., 1999 (500 MHz) e KONDO et al., 2000 (270 MHz)

Tabela 5- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A3B3B ($\text{DMSO}-d_6$) e da estreptimidona (CDCl_3)

Posição do H	A3A3B	streptimidona Kim et al.(1999)	Streptimidona Kondo et al.(2000)
	δH , multiplicidade e J (Hz)	δH , multiplicidade e J (Hz)	δH , multiplicidade e J (Hz)
NH	10,62 s	8,76 s	8,07 s
2	2,29 dd (16,5 e 10,2)	2,27m e 2,70 m	2,32 ddd (7,7; 10 e 17,3)
2'	2,29 dd (16,5 e 10,2)	2,27m e 2,70 m	2,32 ddd (7,7; 10 e 17,3)
3	2,47 m	2,45m	2,49 dd (9,2 e 18)
4	1,26 m	1,32 ddd (14, 8,7 e 3)	1,32 ddd (2,6, 8,8 e 14)
	1,33 m	1,57 ddd (14, 10,3 e 3,5)	1,59 ddd (4,9, 10,4 e 14)
5	3,97 m	4,10 m	4,10m
5-OH	3,33 s	3,42 (br s)	3,26 s
6	2,52 m	2,53 dd (17,9 e 3,3)	2,65 dd (2,6 e 1,8)
	2,54 m	2,61 dd (17,9 e 8,4)	2,77 m
8	3,56 dq (9,8 e 6,8)	3,48 dq (9,7 e 6,8)	3,49 d (6,9 e 6,6)
8-Me	1,06 d (6,8)	1,15 d (6,8)	1,18 d (6,6)
9	5,37 d (9,7)	5,31 d (9,7)	5,31 dd (0,7 e 9,7)
10-Me	1,78 d (1,22)	1,80 d (1,24)	1,83 d (1,5)
11	6,34 dd (17,5 e 10,7)	6,33 dd (17,4 e 10,7)	6,36 ddd (0,7, 10,6 e 17,2)
12	5,01 d (10,7)	5,03 d (10,7)	5,08 d (10,6)
	5,17 d (17,5)	5,18 d (17,4)	5,22 d (17,2)

s: singleto, br s: singleto brando, d: dubleto, dd: duplo dubleto, ddd: duplo duplo dubleto, dq: duplo quarteto, m: multipeto, J =constante de acoplamento

Ao analisar o espectro de ^1H RMN verificou-se dois valores de deslocamento químico referentes a 2 metilas em δ 1,06 (d, J =6,8, 8- CH_3) e δ 1,78 (d, J =1,2, 10- CH_3). O espectro indicou a presença de cinco grupos metilenos: o primeiro e o segundo são prótons sobrepostos em δ 2,29 (dd; J =16,5 e 10,2, 2 e 2'- CH_2), o terceiro em δ 1,26 (m) e em δ 1,33 (m, 4- CH_2), o quarto em δ 2,52 (m) e em δ 2,54 (m, 6- CH_2) e o quinto em δ 5,01 (d, J =10,7) e em δ 5,17 (d, J =17,5, 12- CH_2). O espectro também indicou a presença de cinco hidrogênios metínicos: em δ 2,47 (m, 3-CH); em δ 3,97 (m, 5-CH); em δ 3,56 (dq, J = 9,8 e 6,8, 8-CH); em δ 5,37 (d, J = 9,7, 9-CH) e em δ 6,34 (dd, J =17,5 e 10,7, 11-CH).

Neste espectro também foi possível observar um singlete em δ 10,62, referente ao hidrogênio do grupo NH. Os hidrogênios ligados ao N amida têm deslocamentos químicos variáveis, pois o valor depende da temperatura, da concentração e do solvente (PAVIA et al., 2010).

Os valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento do composto isolado foram compatíveis ao do streptimidona, portanto, não foram necessárias análises adicionais. Desta forma, o composto A3A3B produzido por *Streptomyces* sp. AM3 refere-se ao composto conhecido como streptimidona (Figura 43).

Figura 43– Estrutura química do composto streptimidona (CAS: 738-72-7)

Fonte: Adaptado Kim et al., 1999

O composto streptimidona é um antibiótico glutarimídico que estruturalmente é caracterizado pela presença de um anel glutarimida e uma cadeia lateral na posição 3 (BECKER; RICHARDS, 1976). Este composto possui nome químico 4-(2-hidroxi-5,7-dimetil-4-oxo-6,8-nonadienil)-2,6-piperidinadiona, fórmula molecular $C_{16}H_{23}NO_4$, máxima absorção ultravioleta em 232 e 291 nm (EtOH) e rotação ótica de $[\alpha]^{25}_D +238^\circ$ (c. 0,5; $CHCl_3$) (KIM et al., 1999).

Streptimidona foi relatada pela primeira vez por FROHARDT et al., (1959), como um antibiótico isolado de *Streptomyces rimosus*, posteriormente este composto foi isolado de outras espécies do gênero *Streptomyces* e também de *Micromonospora coerulea*. Este composto, também apresenta atividade antimicrobiana contra leveduras, fungos filamentosos e protozoários (KONDO; ORITANI; KIYOTA, 2000), cujo mecanismo de ação ocorre pela inibição da síntese proteica (OBRIG et al., 1971; KIM et al., 1999).

A determinação da concentração mínima inibitória do composto streptimidona (A3A3B) e dos fungicidas comerciais Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] foi

realizada pela técnica de microdiluição. Os resultados deste ensaio podem ser visualizados na Figura 44.

Figura 44- Determinação da concentração mínima inibitória do composto streptimidona pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.

O composto streptimidona apresentou concentração mínima inibitória de 1,25 mg mL⁻¹ frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*. Já o fungicida Score[®] apresentou MIC 0,02 mg mL⁻¹ e os fungicidas Captan SC[®] e Dithane NT[®] não foram capazes de inibir a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* nas concentrações avaliadas. Desta forma, o composto streptimidona na concentração de 1,25 mg mL⁻¹ apresentou atividade inibitória superior que os fungicidas comerciais Captan SC[®] e Dithane NT[®]. Os dados do ensaio de microdiluição dos fungicidas comerciais são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Concentração mínima inibitória dos fungicidas comerciais Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*, pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Grupo químico	Tipo	CMI* (mg mL ⁻¹)
difenoconazol	Score [®]	Triazóis	sistêmico	0,02
captana	Captan SC [®]	Dicarboximida	não sistêmico	-
mancozebe	Dithane NT [®]	ditiocarbamato	contato	-

* Concentração mínima inibitória

A atividade antimicrobiana da streptimidona foi relatada pela primeira vez contra *Kloeckera africana* M1570 (NRRL Y-1274) em ensaio de difusão em disco de papel (FROHARDT et al., 1959).

Na literatura, há relatos de outras atividades inibitórias deste composto, como por exemplo, a streptimidona isolada da actinobactéria *Micromonospora coerulea* que inibiu o crescimento micelial de *Phytophthora capsici*, *Didymella bryoniae*, *Magnaporthe grisea* e *Botrytis cinerea*, cujos MICs variaram de 3-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (KIM et al., 1999).

A atividade biológica também foi verificada para compostos homólogos do antibiótico streptimidona. No estudo realizado por SAITO et al., 1973, o composto 9-metil streptimidona foi capaz de inibir o desenvolvimento do poliovírus, do vírus da estomatite vesicular e do vírus da doença de Newcastle, na concentração de 0,02 mcg mL^{-1} .

Este mesmo composto homólogo, em ensaio antifúngico realizado por ALLEN et al., (1976), inibiu 50% o crescimento micelial de *Monilinia fructicola*, agente causal da podridão parda, na concentração de 6,2 ppm.

O composto 9-metil streptimidona isolado de *Streptomyces hygroscopicus* S-632 não foi capaz de inibir o crescimento de fungos filamentosos e nem de bactérias Gram-positivas, mas foi ativo contra *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0304 e *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai n. 7, nas concentrações de 0,7 a 3,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 1,56 a 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (OTANI et al., 1988).

No estudo realizado por CHATTERJEE et al., 1994, o composto 9-metil streptimidona foi capaz de inibir 100% o crescimento da daninha *Lemna gibba* e *Avena sativa*, na concentração de 2 ppm, mas este composto não apresentou atividade contra fitopatógenos.

Em resumo, a fração A3A3B demonstrou ser o mesmo composto conhecido na literatura como streptimidona (KIM et al., 1999; KONDO et al., 2000). Na análise elementar das massas dos íons do composto A3A3B, este apresentou fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ (XEVO G2-XS QTof). Já a análise de rotação específica, a fração A3A3 apresentou $[\alpha]_D^{20} +228^\circ$ (c 0,5; MeOH), enquanto que na literatura encontramos o valor de $[\alpha]_D^{25} +238^\circ$ (c 0,5; CHCl_3). A rotação óptica é afetada pela concentração da substância, pela estrutura da molécula, pelo solvente e pela

temperatura. Neste caso, os fatores que podem ter influenciado o valor de $[\alpha]$ foi à temperatura e o solvente utilizado.

Até o momento, na literatura não foi relatado atividade antifúngica do antibiótico streptimidona contra o agente causal da antracnose do guaranazeiro.

Por fim, o fluxograma a seguir sumariza o trabalho de fracionamento cromatográfico do composto bioativo isolado da actinobactéria *Streptomyces* sp. AM3 (Figura 45).

Figura 45- Fluxograma do estudo químico da actinobactéria *Streptomyces* sp. (AM3)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição;

* Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Phenomex® Kinetex 5 μ m C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm) eluída em modo gradiente com H₂O/ACN/MeOH 90:5:5, vazão 1 mL min⁻¹, com tempo de análise de 25 min.

5.5.3 Estudo químico dos compostos produzidos por *Streptomyces* sp. AM 25

Em ensaio de cultivo pareado, o isolado AM25 inibiu em 43,17 % o crescimento micelial do *C. gloeosporioides* e no ensaio de difusão em disco, a fração metanólica inibiu em 51,39 %. Este isolado foi selecionado para uma investigação química detalhada de seu(s) metabólito(s) bioativo(s).

A actinobactéria foi cultivada em maior volume (15 litros), após o crescimento, o meio metabólico foi submetido à cromatografia em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈. Desta extração foram obtidas três frações: aquosa, H₂O: MeOH e a metanólica. As três frações foram avaliadas em ensaio antifúngico aplicando 2 mg disco⁻¹ (Figura 46).

Figura 46- Ensaio *in vitro* da atividade antifúngica das frações aquosa (FA); H₂O: MeOH (FB) e a metanólica (A4), obtidas a partir do meio metabólico de *Streptomyces* sp AM25 frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Esta metodologia de extração foi selecionada, dentre as três avaliadas (partição líquido-líquido com acetato de etila, partição líquido-líquido com n-butanol e coluna do tipo Sep-Pak C₁₈), pois a atividade da fração metanólica (A4) foi superior às demais. A fração aquosa (FA) e a fração H₂O: MeOH (FB) não apresentaram atividade, provavelmente por conterem compostos polares não ativos.

Em relação à extração de compostos de interesse, a partir do meio metabólico produzido por micro-organismos, verifica-se que a partição líquido-líquido com solventes imiscíveis extrai uma quantidade maior de compostos do que a coluna C₁₈ (fase reversa). Entretanto, isso não significa que essa maior quantidade seja de compostos interessantes, pois muitos interferentes são extraídos. Na literatura, há relatos de trabalhos que empregaram esta metodologia na extração de compostos de interesse, como exemplo, no estudo realizado por PADILHA et al., (2015), que utilizaram a coluna C₁₈ para extração de compostos antivirais do extrato

bruto de actinobactérias. Do mesmo modo, STULBERG et al., (2016) utilizaram esta metodologia para extração de compostos de interesse do meio metabólico de *Streptomyces* sp. 2AW.

O perfil químico da fração metanólica (A4) foi avaliado por cromatografia de camada delgada (CCD) e os eluentes utilizados foram acetato de etila e metanol (8:2, v:v). Após a eluição, a cromatofolha foi observada sob a luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de ondas de 254 nm e 365 nm, e em seguida revelada com os reagentes dragendorff, ácido fosfomolibdico e ninidrina. Os compostos presentes na fração metanólica apresentaram absorção nos comprimentos de ondas de 254 e 365 nm e também reagiram com o ácido fosfomolibdico.

A fração metanólica (A4) foi submetida à separação cromatográfica em coluna Sep-Pak do tipo sílica gel e fase móvel em gradiente diclorometano, acetato de etila e metanol. Desta separação, foram obtidas 12 frações que por similaridade química visualizada em CCD foram reunidas em 5. Estas frações foram avaliadas em ensaio biológico *in vitro* contra o *C. gloeosporioides* aplicando 1 mg disco⁻¹ (Figura 47).

Figura 47- Bioensaio com as cinco frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A4A a A4E) frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Neste ensaio antifúngico, dentre as cinco frações avaliadas, as frações A4C (53,68 %) e A4E (20,61 %) apresentaram o maior percentual de inibição ao crescimento micelial de *C. gloeosporioides*. Como perfil químico destas frações era semelhante, a fração A4C foi selecionada para continuidade dos estudos.

A fração A4C foi submetida à separação cromatográfica em coluna Sep-Pak do tipo sílica gel e fase móvel em gradiente diclorometano, acetato de etila e metanol. Desta separação cromatográfica foram obtidas 8 frações que por similaridade química foram reunidas em 6. Estas frações foram avaliadas em ensaio biológico *in vitro* contra o *C. gloeosporioides* aplicando 0,5 mg disco⁻¹ (Figura 48).

Figura 48- Bioensaio com as seis frações obtidas em cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak de sílica-gel (A4C1 a A4C6) frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

A fração A4C5 inibiu em 47,97% o crescimento micelial do fitopatógeno avaliado. Esta fração foi submetida à cromatografia em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ e a fase móvel foi em gradiente de água em metanol. Desta separação foram obtidas cinco frações que apresentaram perfis distintos em cromatografia em camada delgada. Estas frações foram avaliadas em ensaio antifúngico aplicando 0,3 mg disco⁻¹ (Figura 49).

Figura 49- Bioensaio com as cinco frações obtidas na cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak C₁₈ (A4C5A a A4C5E) contra o fitopatôgeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatôgeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Dentre as cinco frações avaliadas, a fração A4C5C inibiu em 53,82% o crescimento micelial do *C. gloeosporioides*. Pela análise química da amostra em placa de CCD verificamos a presença de poucos compostos. Desta forma, a fração A4C5C foi submetida à separação em CLAE em fase reversa (Figura 50).

Figura 50- Cromatograma da fração ativa A4C5C
Coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Phenomex® Kinetex 5 µm C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm). Fase móvel em gradiente de água/acetonitrila (50:50), detector UV em 230 nm. Fluxo de 1 mL min⁻¹.

As frações foram coletadas conforme a sinalização da figura acima. As 3 frações foram avaliadas em ensaio antifúngico *in vitro* aplicando 0,1 mg disco⁻¹ (Figura 51).

Figura 51- Bioensaio realizado com oito frações obtidas após separação em CLAE (A4C5C1-A4C5C3) contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. O controle (1) continha apenas o fitopatógeno. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C em BDA.

A fração A4C5C2 referente ao composto com tempo de retenção em 4,22 minutos foi a única que se apresentou ativa com inibição de 42,68 % ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Esta fração ativa foi submetida à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de baixa resolução (EM). Na Figura 52 podemos observar o cromatograma e o espectro de UV da fração A4C5C2.

Figura 52- Cromatograma da fração A5C5C2 monitorada no $\lambda = 254$ nm (A) e espectro de UV da fração A5C5C2 (B).

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1mm, 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN, com vazão de 0,5 mL min⁻¹, com tempo de análise de 20 min.

No espectro de absorção na região do UV observamos uma banda de absorção em 243,7 nm. A banda observada apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ acima de 200 nm, isto indica que provavelmente o composto apresenta cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

O espectro de massas de baixa resolução da amostra A4C5C2 foi obtido no modo positivo (Figura 53).

Figura 53- Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração A4C5C2
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50 x 2,1mm, 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN, com vazão de 0,5 mL min⁻¹, com tempo de análise de 20 min.

No espectro de massas em modo positivo foi observado um sinal em m/z 938 [M+H]⁺. Após, a fração A4C5C2 foi submetida à análise por UPLC-MS Xevo G2-XS QToF (Waters®) com detector de ZSpray ESI/ESCI. Os espectros de massas de alta resolução em modo positivo e negativo estão apresentados na Figura 54.

Figura 54- Espectro de massas de alta resolução em modo positivo e negativo da fração A4C5C2. Condições de análise: coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel em gradiente de água (+ 0,1% ácido fórmico) em metanol (+0,1% ácido fórmico) começando com 10 até 50% MeOH (6 min) e de 50 até 98% (3 min), totalizando 9 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

O espectro de massas de alta resolução em modo positivo apresenta alguns sinais de íon molecular. Pela análise mais detalhada foi possível observar sinais em m/z 938,286 e 960,267. Esta diferença em 22 unidades na relação m/z observada,

sugere que o valor m/z 938,286 seja referente ao composto protonado $[M+H]^+$ e o segundo valor de m/z 960,267 seria um íon aduto de sódio $[M+Na]^+$, ou seja, o composto apresenta massa molar de 937,278 Da. No espectro em modo negativo observamos um sinal em m/z 936,291 referente ao composto desprotonado $[M+H]^-$.

Diante destas informações, uma busca foi realizada no banco de dados *Dictionary of Natural Products* utilizando-se como palavras chaves o intervalo de massa molar do composto “937.0 a 937,9 Da” e desta busca foram encontrados 24 compostos.

Diante destas 24 possibilidades, a fração A4C5C2 foi submetida à análise de ressonância magnética 1H (RMN- 1H) para confirmação de sua identificação estrutural.

No espectro de RMN 1H (anexo 5) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto A4C5C2 e em comparação com os dados da literatura foi possível correlacioná-lo com o peptídeo Axinellin C (TABUDRAVU et al., 2002). Na tabela 7, verificamos os valores de RMN 1H do composto isolado e do estudo de TABUDRAVU et al., 2002 (400 MHz) .

Tabela 7- Dados de RMN 1H (600 MHz) do composto A4C5C2 (DMSO- d_6) e do Axinellin C (CD $_3$ OD)

Resíduo	Átomo	A4C5C2	Axinellin C Tabudravu et al.(2002)
		δH , multiplicidade e J (Hz)	δH , multiplicidade e J (Hz)
Thr ¹	α	5,33 m	4,97 dd (3,2, 8,4)
	β	4,44 m	4,31 m
	γCH_3	1,30 d (6,8)	1,19 d (6,4)
	CO	-	-
	NH	7,95 d (6,8)	7,72 d (6,8)
Val ²	α	5,15m	4,66 d (8,8)
	β	2,38 m	2,33 m
	$\gamma_1 CH_3$	0,89 d (6,7)	0,93 d (6,8)
	$\gamma_2 CH_3$	0,87 d (6,7)	0,84 d (8,0)
	CO	-	-
	NH	8,10 t (5,6)	7,74 d (7,9)
Pro ³	α	4,05 dd (7,6, 16,2)	4,14 dd (7,60)
	β	1,82 m	1,81 m
	γ	1,86 m	1,90 m
	δ	3,95 d (6,6)	3,95 m
	CO	-	-

Tabela 7- Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto A4C5C2 (DMSO- d_6) e do Axinellin C (CD $_3$ OD), continuação.

Resíduo	Átomo	A4C5C2	Axinellin C Tabudravu et al.(2002)
		δH , multiplicidade e J (Hz)	δH , multiplicidade e J (Hz)
Trp ⁴	α	-	4,34 m
	β	3,19 m	3,39 m
	2	6,96 t (16,1)	6,96 s
	3	-	-
	4	-	-
	5	7,52 d (8,0)	7,55 m
	6	7,07 t (14,9)	7,06 m
	7	7,09 t (14,9)	7,09 m
	8	7,25 m	7,25 m
	9	-	-
	CO	-	-
	NH(índole)	8,17 d (4,6)	8,06 s
	NH	7,31 d (8,0)	7,32
Pro ⁵	α	-	4,34 m
	β	1,43 m	1,40 m
	γ	1,64 m	1,65 m
	δ	3,82 dd (6,6, 16,2)	3,62 m
	CO	-	-
Phe ⁶	α	4,49 m	4,56 dd (9,6, 4,0)
	β	2,62 m	2,62 m
	1	-	-
	2/6	7,16 s	7,12 m
	3/5	7,25 m	7,27m
	4	7,18 m	7,18 m
	CO	-	-
	NH	8,39 d (7,6)	8,22 d (7,9)
Pro ⁷	α	3,92 d (5,8)	3,94 m
	β	1,82 m	1,78 m
	γ	1,64 m	1,64 m
	δ	3,33 d (12,8)	3,55 m
	CO	-	-
Leu ⁸	α	3,72dd (5,6, 16,1)	3,66 m
	β	1,72 m	1,72 m
	γ	1,59 m	1,52 m
	$\delta_1\text{CH}_3$	0,85 s	0,91 d (6,8)
	$\Delta_2\text{CH}_3$	0,83 d (7,4)	0,89 d (6,8)
	CO	-	-
	NH	8,84 dd (7,4, 12,8)	8,78 d (8,4)

s: singlete, d: dublete, dd: duplo dublete, m: multiplete, J =constante de acoplamento

Ao analisar o espectro de RMN ^1H do composto A4C5C2 verificamos que os valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento são próximos dos valores do espectro RMN ^1H do peptídeo Axinellin C, entretanto, no

espectro de RMN ^1H da fração A4C5C2 verificamos os sinais de deslocamento de hidrogênio de NH em 10,84 ppm e os sinais de deslocamento de amina aromática em 8,28 ppm e em 8,53 ppm que não são relatados para o composto Axinellin C. Desta forma, sugere-se que o composto isolado seja um análogo Axinellin, mas para confirmação desta hipótese será necessário adquirir os espectros de ^{13}C e os bidimensionais.

O Axinellin C (CAS: 480995-99-1) é um octapeptídeo cíclico caracterizado pela presença de três prolinas, uma fenilalanina, uma leucina, uma valina, uma treonina e um triptofano (Figura 55). O nome químico é ciclo (L-leucil-L-treonil-L-valil-L-prolil-L-triptof-L-prolil-L-fenilalanil-L-prolil), com fórmula química $\text{C}_{50}\text{H}_{68}\text{N}_9\text{O}_9$, com $\lambda_{\text{máx}}$ em 290 (MeOH) e rotação óptica específica de $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 53.1^\circ$ (MeOH), (Tabudravu et al., 2002).

Figura 55- Estrutura química do Axinellin C (CAS: 480995-99-1)

Fonte: Adaptado Tabudravu et al.2002.

Os peptídeos cíclicos tem despertado interesse dos pesquisadores devido ao seu amplo espectro de atividade farmacológica e por apresentar estruturas químicas interessantes. Um exemplo é a classe de peptídeo cíclico de origem marinha que apresentam atividades antivirais e imunomodulantes, sendo estes, ricos em prolina e normalmente contendo sete ou oito aminoácidos (RANDAZZO et al., 1998).

Os peptídeos cíclicos Axinellins A e B foram isolados da esponja marinha *Axinella carteri* (RANDAZZO et al., 1998), estes apresentaram atividade antitumoral *in vitro* contra o carcinoma broncopulmonar e câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC-N6), com IC₅₀ de 3,0 e 7,3 µg ml⁻¹, respectivamente.

Já o Axenellin C que foi isolado da esponja marinha *Stylotella aurantium* (TABUDRAVU et al., 2002) e em ensaio citotóxico apresentou atividade contra o câncer de ovário A2780 e contra a leucemia K562 com IC₅₀ de 13,17 e 4,46 µg ml⁻¹, respectivamente.

No estudo químico de *Streptomyces* sp. AM 25 foi determinado a concentração mínima inibitória do composto isolado (A4C5C2) e dos fungicidas comerciais Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] pela técnica de microdiluição. Os resultados deste ensaio, verificamos na Figura 56.

Figura 56- Determinação da concentração mínima inibitória do composto isolado A4C5C2 pela técnica de microdiluição conforme *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). As microplacas foram cobertas e incubadas em BOD a 28 °C durante 120 h. As leituras foram feitas a cada 12 horas no leitor de microplacas TECAN, no comprimento de onda de 620 nm.

O composto isolado A4C5C2 apresentou concentração mínima inibitória de 2,50 mg mL⁻¹ frente ao *Colletotrichum gloeosporioides*. Já o fungicida Score[®] apresentou MIC 0,02 mg mL⁻¹ e os fungicidas Captan SC[®] e Dithane NT[®] não foram capazes de inibir a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides* nas concentrações avaliadas. Desta forma, o composto isolado A4C5C2 na concentração de 2,50 mg mL⁻¹ apresentou atividade inibitória superior que os fungicidas comerciais Captan SC[®] e Dithane NT[®]. Os dados do ensaio de microdiluição dos fungicidas comerciais são apresentados na Tabela 5.

Em resumo, a fração A4C5C3 apresenta $[\alpha]_D^{20} - 48,1^\circ$ (c 0,001; MeOH), enquanto que na literatura encontramos o valor de $[\alpha]_D^{25} - 53,1^\circ$ (c 0,4; MeOH). A rotação óptica é afetada pela concentração da substância, estrutura da molécula, pelo solvente e pela temperatura.

O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de fracionamento cromatográfico do composto bioativo A4C5C2 isolado da actinobactéria *Streptomyces* sp. AM25 (Figura 57).

Figura 57- Fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração A4C5C2 isolada de *Streptomyces* sp. (AM25).

m: massa da fração e B: porcentagem de inibição;

* Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Phenomex® Kinetex 5 µm C₁₈ 100A, 250X4,6 mm) eluída em modo gradiente com H₂O/ACN 90:10, vazão 1 mL min⁻¹.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo comprovou o potencial das actinobactérias como fontes promissoras na produção de compostos antimicrobianos. Além disso, o uso de diferentes técnicas de *screening* possibilitou a seleção de actinobactérias em um período relativamente curto.

No ensaio antagônico foram triadas 65 actinobactérias frente ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Destas, 7 isolados foram selecionados. Em um segundo ensaio, o meio metabólico destas actinobactérias foi submetido a três metodologias de extração: **(a)** partição líquido-líquido com n-butanol; **(b)** partição líquido-líquido com acetato de etila e **(c)** coluna Sep-Pak C₁₈. As frações obtidas foram avaliadas contra *C. gloeosporioides* em ensaio de difusão em disco de papel. Dentre as frações avaliadas, as mais promissoras foram isoladas de AM1, AM3 e AM25. Estes três isolados foram identificados por técnicas moleculares como pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

A actinobactéria *Streptomyces* AM1 inibiu 43,78 % do crescimento micelial do *C. gloeosporioides* em ensaio antagônico, e no ensaio com a fração butanólica a porcentagem de inibição foi de 61,15 %. A partir do isolamento bioguiado foi possível inferir que a atividade antifúngica está associada à presença do composto análogo ácido proclavamínico (MIC 1,25 mg μL^{-1}). Na literatura, não há relatos da atividade antifúngica deste composto.

Em ensaio antagônico, a linhagem *Streptomyces* sp. AM3 inibiu 43,98 % do crescimento micelial do *C. gloeosporioides* e no ensaio de difusão em disco, a fração acetato inibiu em 71,60 %. A atividade antimicrobiana contra *C. gloeosporioides* foi associada à presença do composto streptimidona (MIC 1,25 mg μL^{-1}). Na literatura, não há relatos da atividade antifúngica deste composto contra o agente causal da antracnose do guaranazeiro.

Já a actinobactéria *Streptomyces* AM25 apresentou atividade no ensaio antagônico (43,17 %) e a fração metanólica foi ativa em ensaio de difusão em disco de papel (51,39 %). Pelo isolamento bioguiado foi obtido um composto com bom grau de pureza (MIC 2,50 mg μL^{-1}), porém a identificação deste composto ainda não foi concluída.

O presente trabalho apresenta significativa contribuição científica em termos de ter relacionado uma nova atividade biológica (inibição do crescimento micelial do *Colletotrichum gloeosporioides*) a dois compostos já conhecidos na literatura. Estudos complementares serão necessários para avaliar a toxicidade e os mecanismos de ação destes compostos, auxiliando assim, no manejo integrado da antracnose.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S.; SUBHAN, M.; DURRANI, F.; MEHMOOD, S.; KHAN, H.; HAMEED, A. Biosynthesis of antibiotic through metabolism of actinomycetes strain MH-9 through shake flask fermentation. **Sarhad Journal of Agriculture**, Pakistan, v. 26, n.1, p. 7-18, 2010.
- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHÃES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Pittsfield, v 11, p. 36-42, 2004.
- AGHAMIRIAN, M.R.; GHIASIAN, S.A. Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran. **The Open Microbiology Journal**, Netherlands, v.3, p. 53-57, 2007.
- AGROFIT. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 24 jan. 2017.
- AL-HULI, S.M.; JARALLAH, E.M.; AL-CHARRAKH, A.H. Extraction and partial purification of antimicrobial gent produced by *Streptomyces* spp. In Babylon province. **Journal of Babylon University/ Pure and Applied Science**, Iraque, v.22, n.1, p. 279-284, 2012.
- ALLEN, M.S., BECKER, A.M.; RICHARDS, R.W The glutarimide antibiotic 9-methylstreptimidone: structure, biogenesis and biological activity. Australian **Journal of Chemistry**, Melbourne, v.29, p. 673-679, 1976.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.50, n.3, p.3-19, 2011.
- ANDERSON, A.S.; WELLINGTON, E.M.H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 797-814, 2001.
- ARAÚJO, I.L.; FREITAS, D.V.; NUNES-SILVA, C.G.; ASTOLFI-FILHO, S. Guaraná, os segredos moleculares de uma planta lendária. **Ciência Hoje**, São Paulo, p. 30-35, 2009.
- ARAÚJO, J.C.A.; PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M.R. Controle químico da antracnose do guaranazeiro. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 2 p. (Comunicado Técnico, 61).
- ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S de; AZEVEDO, J.L. (Eds.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: **EMBRAPA – CNPMA**, p. 351-367, 1998.
- ARAÚJO, L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. Manual isolamento de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: **CALQ**, 86 p, 2002.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (coords) **Ecologia microbiana**, Jaguariúna: Editora Embrapa/CNPMA, p.445-461, 1998.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, J.R.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, Valparaíso, v.3, p. 40-65, 2000.

BAGGALEY, K.K.H., ELSON, S.W.; NICHOLSON, N.H.; SIME, J.T. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. Part 4. Synthetic routes to the monocyclic β -Lactam precursor, proclavaminic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, p. 1513-1520, 1990.

BAILEY, J.A.; NASH, C.; MORGAN, L.W.; CONNELL, R.J.O.; TEBEEST, D.O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.10, p. 1076-1083, 1996.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, p.88-120, 1992.

BARREIRO, E.J.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.2, p. 1-12, 2006.

BARRETO, T.R. **Densidade populacional, diversidade genética e atividade de promoção de crescimento de actinomicetos associados à rizosfera de cacauzeiro** 2007. 56p. Dissertação (mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia, 2007.

BECKER, A.M.; RICHARDS, R.W. 256. The absolute configuration of the glutarimide antibiotics streptimidone and 9-methylstreptimidone¹. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 59, p. 2393-2401, 1976.

BENTES, J.L.S.; BARRETO, L.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. Agente causal da antracnose do guaranazeiro. **ACTA Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 129-131, 2004.

BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.1, p. 71-77, 2002.

BENTES, J.L.S.; NETO, P.Q.C. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **ACTA Amazonica**, Manaus, v. 41, n. 2, p. 251-256, 2011.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, p. 1-26, 2005.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.68, p.1-13, 2009.

BIZUYE, A.; MOGES, F.; ANDUALEM, B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, north west Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Haikou, v.3, n.5, p. 375-381, 2013.

BROWN, A.G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HODD, J.D.; READING, C.; ROLINSON, G.N. Naturally occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. **Journal Antibiotic**, Tokyo, v.29, p.668-669, 1976.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos Endofíticos: Uma fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, ISSN1984-6835, 2012.

CHATER, K. F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 361, p. 761-768, 2006.

CHATTERJEE, S.; VIJAYAKUMAR, E.K.S.; CHATTERJEE, S.; BLUMBACH, J.; GANGULI, B.N. 5-Hydroxy-9-methylstreptimidone, a new glutaramide from a *Streptomyces* sp. HIL Y-9065403. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.48, n.3, p. 271-273, 1994.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_23_11_05_42_09guarana_nov-16cg.pdf. Acesso: 20 dez. 2016.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; OUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n.11, p. 3889-3905, 1993.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.; LEWIS, N. Natural products (secondary metabolites). In BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONEAS, R (eds). Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Biologists**, Rockville, p. 1250–1268, 2000.

CROUCH, J.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Phylogenetic relationships and fungicide sensitivities of *Colletotrichum graminicola* isolates from turgrass in North America. **International Turfgrass Society Research**, Washington, v.10, p.186-195, 2005.

CROUSE, G.D.; SPARKS, T.C.; SCHOONOVER, J.; GIFFORD, J.; DRIPPS, J.; BRUCE, T.; LARSON, L.L.; GARLICH, J.; HATTON, C.; HILL, R.L.; WORDEN, T.V.; MARTYNOW, J.G. Recent advances in the chemistry of spinosyns. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, p. 177- 185, 2001.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 73, p. 37-113, 2012.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, n.4, p.414-430, 2012.

DEEPIKA, T.L.; KANNABIRAN, K.; GOPIESH, K.V.; RAJAKUMAR, G.; JAYASEELAN, C.; SANTHOSHKUMAR, T.; RAHUMAN, A.A. Isolation and characterisation of acaricidal and larvicidal novel compound (2s,5r,6r)-2-Hydroxy-3,5,6-Trimethyloctan-4-One from *Streptomyces* sp. against blood-sucking parasites. **Parasitology Research**, Berlin, v.111, n.3, p. 1151-1163, 2012.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.57, n. 3, p.359-363, 1971.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, Basel, v.2, n.2, p. 303–333, 2012.

DUCKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, Oxford, v. 40, n.1, p. 99-111, 2000.

DUNBAR, D.M.; LAWSON, D.S.; WHITE, S.M.; NGO, N.; DUGGER, P.; RICHTER, D. Emamectin benzoate: control of the heliothine complex and impact on beneficial arthropods. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 1998, San Diego, California, Proceedings, USA, v. 2, p.1116-1118, 1998.

EMBRAPA. Boas Práticas de Cultivo de Guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). Embrapa Amazônia Ocidental, Relatório de Impacto das Tecnologias – Embrapa Amazônia Ocidental, p. 36, 2014.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. Manaus, 33p. 2005 (Sistema de Produção 2).

FINLAY, A.C.; HOBBY, G.L.; P'AN, S.Y.; REGNA, P.P.; ROUTEIN, J.B.; SEELEY, D.B.; SHULL, G.M.; SOBIN, B.A.; SOLOMANS, I.A.; VINSON, J.W.; KANE, J.H. Terramycin, a new antibiotic. **Science**, Washington, v. 111, p.85, 1950.

FLARDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 36-49, 2009.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.6, p.596-605, 1998.

FREEMAN, S; SHABI, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n.6, p. 395-404, 1996.

FROHARDT, R. P.; DION, H.W.; JAKUBOWSK, Z.L.; RYDER, A.; FRANCH, J.C.; BARTZ, Q.R. Chemistry of Streptimidone, A New Antibiotic. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 81, n.20, p. 5500-5506, 1959.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R.L.; BORA, T.C. **Microbial Biotechnology**, Oxford, p. 139-168, 2008.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, London, v. 20, n.8, p. 338-343, 2002.

GOODFELLOW, M.; CROSS, T. Classification. In GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. (eds.), *Biology of the Actinomycetes*, **Academic Press**, London, p. 7-164, 1989.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, p. 119-142, 2010.

GORAJANA, A.; VINJAMURI, S.; BAPIRAJU, V.V.S.N.; PEELA, S.; JANGAM, P.; POLURI, E.; ZEECK, A. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUB 1/7. **Microbiological Research**, Pavia, v.162, n. 4, p. 322-327, 2007.

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

HEANEY, S.P.; HALL, A.A.; DAVIES, S.A.; OLAYA, G. Resistance to fungicides in the Qol-Star cross resistance group: current perspectives. **The BCPC Conference: Pest & Disease**, Brighton, v.2, p. 755-762, 2000.

HEMASHENPAGAM, M. Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes. **International Journal of Microbiology Research**, Navi Mumbai, v.3, n.3, p. 148-156, 2011.

HYDE, K.D.; CAI, L.; MCKENZIE, E.H.C.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 39, p. 1-17, 2009.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=328628>. Acesso em: 20 jan.2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). 2011. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2012/lspa_201202](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2012/lspa_201202)>. Acesso em: 13 jul. 2015.

JAY, J.M. Micotoxinas. In: Microbiologia de Alimentos. 6 ed. **Artmed**, Porto Alegre, 2005.

JAYASHANTHA, E.T. Actinobacteria - morphology, physiology, biochemistry, diversity & industrial applications of genus Actinobacteria. Conference paper. p.1-16, 2016.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER, M.J.; PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**. London, v.39, p.343-366, 1990.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London v.3, p. 937-947, 2005.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F. T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W. C.; WOLFE, K. H.; FEDOROVA, N. D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 47, n.9, p. 736-741, 2010.

KHALIL, M.S.; MOUBASHER, H.; HASAN, F.F. Biological control of rice blast disease by *Streptomyces flavotricini*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, India, v.5, n.5, p. 1453-1461, 2014.

KIM, B.S.; MOON, S.S.; HWANG, B.K. Isolation, antifungal activity, and structure elucidation of the glutarimide antibiotic, streptimidona, produced by *Micromonospora coerulea*. **Journal of Agricultural and food chemistry**, Washington, v.47, p. 3372-3380, 1990.

KONDO, H.; ORITANI, T.; KIYOTA, H. Synthesis and antifungal activity of the four stereoisomers of streptimidona, a glutarimide antibiotic from *Streptomyces vimosus* forma *paromycinus*. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, p. 3459-3462, 2000.

LABEDA, D.P.; GOODFELLOW, M.; BROWN, R.; WARD, A.C.; LANOOT, B.; VANNCANNEYT, M.; SWINGS, J.; KIM, S.B.; LIU, Z.; CHUN, J.; TAMURA, T.; OGUCHI, A.; KIKUCHI, T.; NISHII, T.; TSUJI, K.; YAMAGUCHI, Y.; TASE, A.; TAKASHI, M.; SAKANE, T.; SUZUKI, K.I.; HATANO, K. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, p. 73-104, 2012.

LATORRE, D.O.; SILVA, I.P.F.; JUNIOR, J.F.E.; PUTTI, F.F.; SCHIMIDT, A.P.; LUDWIG, R. Herbicidas inibidores da glutamina sintetase / herbicide inhibitors glutamine synthetasei. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, Tupã, v. 7, n.3, p. 134-141, 2013.

LEE, S.Y.; HAMISI, T.; YONG, S.L.; K, W.N.; SEONG, H.H.; YI, N, K, Y.K. Biocontrol of Anthracnose in Pepper Using Chitinase, β -1,3 Glucanase, and 2-Furancarboxaldehyde Produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. **Journal Microbiology Biotechnology**, Seoul, v 22, p. 1359-1366, 2012.

LETEK, M.; FIUZA, M.; VILLADANGOS, A. F.; MATEOS, L. M.; GIL, J. Cytoskeletal proteins of actinobacteria. **International Journal of Cell Biology**, New York, v. 1-10, 2012.

LI, M.; CHEN, Z.; LIN, X.; ZHANG, X.; SONG, Y.; WEN, Y.; JILUN, L. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, n.20, p. 5359-5363, 2008.

LODEWIJKS, M.P. Aspects of the growth of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), a “relatório” for Agro Brahma and the Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC). Dept. of Forestry, Agric. University, Wageningen, p. 25. 1986.

LOPES, F.R. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. Dissertação mestrado.

LYDON, J.; DUCKE, S.O. Inhibitors of glutamine biosynthesis, In: SINGH B.K, Plant amino acids: **Biochemistry and Biotechnology**, San Diego, p. 445-464, 1999.

MADALOSSO, M.G.; BALARDIN, R. Mecanismo e modo de ação do grupo químico das Carboxamidas [Inibidores da enzima Succinato Desidrogenase (SDHI)], 7p, 2014. MADIGAN, M. T. Microbiologia de Brock, 12ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p 459-451, 2010.

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from Actinomycetes - a review. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 4, p. 240-253, 2012.

MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**, London v. 8, n.3, p. 282-293, 2005.

MATSUI, J.; TANAKA, J.; NAMIHIRA, N.; SHINZATO, N. Antibiotics production by an actinomycetes isolated from the Termite gut. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 52, n.6, p.731, 2012.

MCCARTHY, A.J.; WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, v. 1, n. 2, p. 189-192, 1992.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends Plant Science**, Kidlington, v.7, p. 352-356, 1992.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MENEZES, M.; HANLIN, R.T. Morphological variability of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado trees from northeast Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, p. 228-236. 1996.

MILEO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. **Planta daninha**, Viçosa, v.25, n.4, p.771-782, 2007.

MINUTO, A.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.L. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, Oxford, v. 24, p. 468-475, 2006.

MIRANDA, M.V.; METZNER, B.S. *Paullinia cupana*: revisão da matéria médica. **Revista de Homeopatia**. São Paulo, p. 1-7, 2010.

MONTAGUE, A.; ZIAUDDIN, A.; LEE, R.; AINLEY, W.M.; STROMMER, J. High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 91, n.1, p. 29-36, 2007.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal General Plant Pathology**, Tokyo, v.68, n.4, p. 307-320, 2002.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L.; CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Adaptabilidade e estabilidade de clones de guaraná. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1138-1144, 2009.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 17 jan.2017.

NCCLS (CLSI) Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi: Approved Standard – M38-A, v.22, n.16, 2002.

NEWTON, A.C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J.M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 157, p. 343-359, 2010.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p. 369-389, 1992.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam, P.S.; Pandey, A. (Eds.) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*. **Springer Science**, Netherlands, p. 129-145, 2009.

OBRIG, T. G.; CULP, W. J.; MCKEEHAN, W. L., HARDESTY, B. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.246, p.174–181, 1971.

O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. **APS Press**, Minnesota, p. 57-77, 2000.

OKUDOH, V.I.; WALLIS, F.M. Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in Kwazulu-Natal, South Africa. **South African Journal of Science**, Johannesburg, v. 103, p. 216-222, 2007.

OLIVEIRA, J.H.H.L.; GRANATO, A.C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Ácido Clavulânico e Cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processo, de isolamento e mecanismo de ação. **Química nova**, São Paulo, v. 32, n.8, p. 2142-2150, 2009.

OTANI, T.; SASAKI, T.; MINAMI, Y.; MARUNAKA, T. New glutarimide antibiotics, S-632-B1 and B2 - I. Taxonomy of producing strain, fermentation and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.42, n.5, p. 647-653, 1988.

PADILHA, M.A.; RODRIGUES, R.A.F.; BASTOS, J.CS.; MARTINI, M.C.; BARNABÉ, A.C.S.; KOHN, L.K.; UETANABARO, A.P.T.; BOMFIM, G.F.; AFONSO, R.S.; GARBOGGINI, F.F.; ARNS, C.W. Actinobacteria from termite mounds show antiviral activity against bovine viral diarrhea virus, a surrogate model for *Hepatitis C Virus*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2015, p. 1-9, 2015.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, v.4, 2010. 716p.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, J. C. Populações de actinomicetos como compostos da comunidade bacteriana nos solos. Disponível em: <www.cnpad.gov.br>. Acesso em: 19 mar. 2010.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORREL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, v.89, n.8, p. 784-796, 2005.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNEL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2 e 3, p.186-198, 1999.

PETKOVIC, H.; CULLUM, J.; HRANUELI, D.; HUNTER, I.S.; CONCHA, N.P.; PIGAC, J.; THAMCHAIPENET, A.; VUJAKLIJA, D.; LONG, P. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n.3, p. 704-728, 2006.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from mediterranean sponges. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 2, p. 373-380, 2010.

PRASHITH K. T. R.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and Potent biological activities of Actinomycete metabolites. **Journal of Pharmacy Research**, Bangalore, v. 3, n. 2, p. 250-256, 2010.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum*: host specificity, pathology and host-pathogen interaction. **APS Press**, Minnessota, v.50, n.5, p. 645-650, 2000.

RAJAN, B.M.; KANNABIRAN, K. Antimicrobial activity of *Streptomyces Albofaciens* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant *Enterococcus* multi-drug resistant species. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, Índia, v.4, n.3, p. 1248-1257, 2013.

RAKOTONIRIANA, R. F.; CHATAIGNE, G.; RAOELISON, G.; RABEMANANTSOA, C.; MUNAUT, F.; JAZIRI, M.; RATSIMAMANGA, S.U.; BRYNAERT, J.M.; CORBSIER, A.M.; DECLERCK, S.; LECLERCG, J.Q. Characterization of an endophytic whorl-forming *Streptomyces* from *Catharanthus roseus* stems producing polyene macrolide antibiotic. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 58, p. 617-627, 2012.

RANA, S.; SALAM, M.D. Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from soil samples of Punjab, India. **Journal of Microbiology & Experimentation**, London. v.1, n.2, p. 1-6, 2014.

RANDAZZO, A.; PIAZ, F.D.; ORRU, S.; DEBITUS, C.; ROUSSAKIS, C.; PUCCI, P.; PALOMA, L.G. Axinellins A and B: New proline-containing antiproliferative

cyclopeptides from the vanuatu sponge *Axinella carteri*. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, p. 2659-2665, 1998.

REIS, E.M.; REIS, A.C.; CARMONA, M.A. Manual de fungicidas: guia para o controle químico de doenças de plantas. UPF Editora: Passo Fundo, 2010. 226p.

RIBAS, S.F. Cafeína no retardo da fadiga e melhora da performance. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**. São Paulo, p. 285-297. 2010.

RIBEIRO, A. Controle da antracnose do guaranazeiro. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2012. 1 p. (Prosa Rural). Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2012>>.

SAITO, N.; KITAME, F.; KIKUCHI, M.; ISHIDA, N. Studies on a new antiviral antibiotic, 9-Methylstreptimidone. I-Physicochemical and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 27, n.3, p. 206-214, 1973.

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from maté tea leaves. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.17, n.3, p.251-260, 2000.

SALGADO, V.L.; SPARKS, T.C. The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of action, and resistance. In: GILBERT, L.I.; LATROU, H.; GILL, S.S (Ed). **Comprehensive molecular insects science**. Boston: ELSEVIER, Boston, 2005, p. 137-173.

SANCHES, S.; DEMAINE, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p. 895-906, 2002.

SANTIAGO, V.S.; FRANLIM, T.N.; LOPES, N.D.; LIMA, M.E.F. CYP51: Uma Boa Ideia? *Revista Virtual de Química*, Niterói, v.7, n. 2, p. 539-575, 2015.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolismos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade UFRGS e Editora da UFSC, 2001. p. 209-216.

SCHLEGEL, H.G. General Microbiology. **Cambridge University Press**, 1993.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 109, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 239-249, 2004.

SHAABAN, M.; ABDEL-RAZIK, A.S.; ABDEL-AZIS, M.S.; AbouZied, A.A.; FADEL, M. Bioactive secondary metabolites from marine *Streptomyces albogriseolus* isolated from red Sea Coast. **Journal of Applied Sciences Research**, Faisalabad, v.9, n.1, p. 996-1003, 2013.

SILVA, F.S.P. Bioprospecção de actinobactérias associadas a esponja marinha *Aplysina fulva*: isolamento, caracterização e produção de compostos bioativos. 2015. 160p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2015.

SILVA, F.S.P.; SOUZA, D.T.; ZUCCHI, T.D.; PANSA, C.C.; VASCONCELLOS, R.L.F.; CREVELIN, E.J.; MORAES, L.A.B.; MELO, I.S. *Streptomyces atlanticus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from marine sponge *Aplysina fulva* (Pallas, 1766). **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 109, n.11, p. 1-8, 2016.

SILVA, G.R. Bioprospecção de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Do Bioma Caatinga. 2013. 95p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013 c.

SILVA, J. M. Isolamento de actinobactérias do solo da região Maués/AM e avaliação do potencial antimicrobiano. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Formação de Professores de Nazaré da Mata, Universidade de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, J.S.; COIMBRA, J.L.; TAVARES, D.G.; AFONSO, G.O. Inibição *in vitro* do crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* utilizando isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de plantas nativas do cerrado baiano. **Natureza on line**, Santa Tereza, v.11, n. 1, p. 15-19, 2013b.

SILVA, L.J.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S.; GOODFELLOW, M.; ZUCCHI, T.D. *Streptomyces araujoniae* sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercule. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 103, n.6, p. 1235-1244, 2013a.

SIMÕES, M.F.; PEREIRA, L.; SANTOS, C.; LIMA, N. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: Concepts and Applications. **Management of Microbial Resources in the Environment**, p. 91-117, 2013.

SLONCZEWSKI, J.L, FOSTER, J.W. Bacterial cultural, growth and development. In SLONCZEWSKI, J.L, FOSTER, J.W (eds.), *Microbiology: An Evolving Science*, W. W. **Norton & Company**, New York, p. 145, 2009.

SOARES, W.L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010. 150p. Tese (Doutorado em Saúde pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

SORENSEN, A., LÜBECK, P.S., LÜBECK, M., NIELSEN, K.F., AHRING, B.K., TELLER, P.J., FRISVAD, J.C. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a black *Aspergillus* species isolated in Denmark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, p. 3077-3083, 2011.

SPONG, K.; RHAWAI, C.; CHOOWONG, W.; KITTIWONGWATTANA, C.; THANABORIPAT, D.; LAOSINWATTANA, C.; KOOHAKAN, P.; PARINTHAWONG, N.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 167, n. 4, p. 1-9, 2016.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. **Prokaryotes**, Berlin, v. 3, p. 297-321, 2006.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, Washington, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n.4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n.6, p. 534-535, 2003.

STULBERG, E.R.; LOZANO, G.L.; MORIN, J.B.; PARK, H.; BARABAN, E.G.; MLOT, C.; HEFFELFINGER, C.; PHILLIPS, G.M.; RUSH, J.S.; PHILLIPS, A.J.; BRODERICK, N.A.; THOMAS, M.G.; STABB, E.V.; HANDELSMAN, J. Genomic and secondary metabolite analyses of *Streptomyces* sp. 2AW provide insight into the evolution of the cycloheximide pathway, **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1-12, 2016.

TABUDRAVU, J.N.; MORRIS, L.A.; BOSCH, J.J.K.V.; JASPARS, M. Axinellin C, a proline-rich cyclic octapeptide isolated from the Fijian marine sponge *Stylotella aurantium*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, p. 7863-7868, 2002.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology Society**, Washington, v.151, p.1691-1695, 2005.

TFOUNI, S.A.V.; CAMARGO, M.C.R.; VITORINO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.1, p. 63-68, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 10ª ed., Editora Artmed, 2011. 894 p.

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

VIJAYAN, V.M.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHA, R. Bioprospecting of endophytic actinomycetes for antiphytofunga activity. **International Journal of ChemTech Research**, Mumbai, v. 6, n. 5, p. 2689-2694, 2014.

WALKER, T.H.; CHAAR, J.M.; MEHR, C.B.; COLLINS, J.L. The chemistry of guaraná: Guaraná, Brazil's super-fruit for the caffeinated beverages industry, Caffeinated Beverages. **American Chemical Society**, Washington, v. 754, p. 305-314, 2000.

WATSON, G.B. Actions of insecticidal spinosyns on γ -aminobutyric acid responses from small-diameter cockroach neurons. **Pesticide Biochemistry**, New York, v. 71, n.1, p. 20-28, 2001.

WEIR, B.S.; JOHNSTON, P.R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 73, p. 115-180, 2012.

WHARTON, P.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v.61, n.1, p. 3-22, 2004.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E.M.H.; SNEATH, P.H.; SACKIN, M.J. Numerical taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, London, v 129, p 1743-1813, 1983.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, n.1, p. 437-458, 2005.

YU, ZHIYIN.; WANG, Y.; YANG, J.; SUN, Y.; MINGMING, Y.; YAN, Y.; MA, Y.T.; HUANG, S.X. A new antifungal macrolide from *Streptomyces* sp. KIB-H869 and structure revision of halichomycin. **Tetrahedron letters**, Oxford, v. 57, n.12, p. 1375-1378, 2016.

ZARZYCKI, P.K.; BARTOSZUK, M.A.; RADZIOW, A.I. Optimization of TLC detection by phosphomolybdic acid staining for robust quantification of cholesterol and bile acids. **Journal of Planar Chromatography**, Budapest , v.19, p. 52-57, 2006.

ANEXOS

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C.

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM1
AM3
AM5
AM7
AM9
AM10
AM12
AM16

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM17
AM18
AM19
AM20
AM21
AM22
AM23
AM24

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM25
AM27
AM28
AM29
AM30
AM31
AM32
AM33

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM36
AM38
AM39
AM40
AM41
AM42
AM43
AM45

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM46
AM49
AM50
AM51
AM52
AM53
AM54
AM55

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM56
AM57
AM58
AM60
AM61
AM62
AM63
AM64

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM67
AM68
AM69
AM71
AM73
AM74
AM75
AM76

Anexo 1- O potencial antimicrobiano das 65 actinobactérias avaliado em ensaio de cultivo pareado contra o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. (continuação).

Linhagens de actinobactérias	Cultivo pareado			
	Controle	Placa 1	Placa 2	Placa 3
AM80
AM83
AM85
AM88
AM90
AM95
AM98
AM99

Anexo 2- Ensaio de difusão em disco de papel com as frações obtidas em partição líquido-líquido com acetato de etila frente ao *C. gloeosporioides* (2 mg disco⁻¹). O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. Os testes foram realizados em triplicata.

Linhagens de actinobactérias	Ensaio de difusão em disco de papel		
	Controle	F. aquosa	F. acetato
AM1
AM3
AM18
AM25
AM30
AM61
AM68

Anexo 2- Ensaio de difusão em disco de papel com as frações obtidas em partição líquido-líquido com n-butanol frente ao *C. gloeosporioides* (2 mg disco⁻¹). O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28 °C. Os testes foram realizados em triplicata.

Linhagens de actinobactérias	Ensaio de difusão em disco de papel		
	Controle	F. aquosa	n-butanólica
AM1
AM3
AM18
AM25
AM30
AM61
AM68

Anexo 2- Ensaio de difusão em disco de papel com as frações obtidas em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C_{18} frente ao *C. gloeosporioides* (2 mg disco^{-1}). O crescimento fúngico foi mensurado após sete dias de incubação a 28°C . Os testes foram realizados em triplicata.

Linhagens de actinobactérias	Ensaio de difusão em disco de papel			
	Controle	F. aquosa	F. $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$	F. metanólica
AM1
AM3
AM18
AM25
AM30
AM61
AM68

Anexo 3- Espectro de RMN ^1H do composto ácido proclavamínico (A2G5B) em DMSO_{d6} (600MHz)

Anexo 3- Espectro de RMN ^1H do composto ácido proclavamínico (A2G5B) em DMSO_{d6} (600MHz)- Ampliado

Anexo 4- Espectro de RMN 1H do composto streptimidona (A3A3B) em DMSO_{d6} (600MHz)

Anexo 4- Espectro de RMN 1H do composto streptimidona (A3A3B) em DMSO_{d6} (600MHz)- Ampliado

Anexo 5 - Espectro de RMN 1H do composto isolado (A4C5C2) em DMSO_{d6} (600MHz)- Ampliado