



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias
de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina**

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Ciências, Área: Química

Ribeirão Preto

2016

ANA PAULA FERRANTI PETI

**Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias
de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina**

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Ciências, Área: Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Aberto Beraldo de Moraes

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Peti, Ana Paula Ferranti

Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina. Ribeirão Preto, 2016.

131 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Moraes, Luiz Alberto Beraldo de.

1. Espectrometria de massas. 2. Produtos naturais. 3. Actinobactérias 4. Mastite Bovina. 5. Fracionamento guiado por bioensaio.

Nome: PETI, Ana Paula Ferranti

Título: Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

- Prof Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

FFCLRP - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 2

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 3

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 4

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 5

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

A meus pais, Cleonice e Paulo, assim como ao meu irmão Julio, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Isso significou segurança e a certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de chegar até aqui, iluminando sempre o meu caminho.

Agradeço ainda a minha família por toda a compreensão, dedicação e paciência que mostraram em todos esses anos. Àquelas que sempre estiveram presentes, minhas tias Cleusa, Cleide e Cléia apoiando todos os meus sonhos e me dando suporte para transpor qualquer obstáculo que aparecesse.

A todos os que contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, em especial meus irmãos científicos Ana Flávia, Eduardo, Fernanda e Julia que ao longo do caminho se tornaram parte indispensável de minha vida. Em especial aos meus pupilos Izadora e Geraldo, por terem me auxiliado nos experimentos e me concedido a oportunidade de ensiná-los o pouco do que sei. As amizades de todos vocês foram essenciais para tornar meus dias mais leves e produtivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto de Moraes, que sempre se mostrou um grande mestre e amigo, dedicando-se não só ao ensino do conhecimento científico, mas nos auxiliando em quaisquer situações. Sua participação foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

Aos colaboradores Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos da USP *campus* Pirassununga, Prof. Dr. Itamar Soares de Mello do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa em Jaguariúna e aos funcionários do DQ-FFCLRP Vinícius Palaretti e Lâmia Melloni Antunes e Silva.

Ao CNPq e ao Departamento de Química da FFCLRP - USP.

"Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim"

Isaac Newton

Resumo

PETI, A. P. F. Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neste trabalho foi explorado o potencial das actinobactérias como produtoras de agentes antimicrobianos contra bactérias causadoras da mastite bovina. Para este fim, foram otimizados dois diferentes bioensaios um de antagonismo e o outro de antibiose, contra 13 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas relacionadas a mastite bovina. Através do bioensaio de antagonismo 120 actinobactérias foram triadas, sendo 55% delas consideradas ativas. Para o ensaio de antibiose foram triados 70 extratos brutos e 60% mostram a formação de halos de inibição. Os extratos brutos Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25 foram considerados os mais promissores dentre todos os extratos estudados. Esses extratos brutos foram submetidos a estudos de desreplcação empregando LC-PAD-MS/MS e isolamento guiado por bioensaio para a identificação de seus metabolitos ativos. Os extratos Caat 1-54 e Caat 2-63 foram ativos principalmente contra as linhagens de bactérias Gram-positivas e a ação antimicrobiana observada foi atribuída a presença da lisolipina I e actinomicina D e V, respectivamente. O extrato Caat 8-25 foi ativo tanto contra bactérias Gram-positivas como para as Gram-negativas, sendo a oxitetraciclina associada a atividade contra as linhagens Gram-positivas e a herbicidina B ativo contra linhagens Gram-negativas. O estudo de desreplcação por LC-MS/MS também possibilitou a identificação de outros metabolitos secundários presentes nos diferentes extratos estudados. Para o extrato Caat 2-63 foi identificada a presença de outros peptídeos provenientes da via biossintética da actinomicina D e, no extrato bruto Caat 8-25 também foi identificado herbicidina F. Um estudo de mudança no metabolismo também foi realizado para a actinobactérias Caat 1-54 produtora de lisolipina. Através da suplementação de íons brometo no meio de cultivo em diferentes períodos da fermentação foi observada a produção de um análogo da lisolipina com bromo e da lisolipina clorada e bromada. Estudos de DESI-TLC-MS associado a bioautografia em TLC também foram aplicados para análise do extrato bruto Caat 2-63 e mostraram a potencialidade desta metodologia para acelerar a identificação de compostos ativos, pois a análise por espectrometria de massas na região da placa cromatográfica correspondente ao halo de inibição revelou a presença de actinomicina D e V, as quais já haviam sido associadas a atividade antimicrobiana deste extrato bruto. Assim os resultados obtidos nesta tese confirmam o grande potencial das actinobactérias como fonte promissoras de compostos bioativos e que a espectrometria de massas empregada nos seus diferentes modos de análise acelera o processo de identificação desses compostos.

Abstract

PETI, A. P. F. Identification of antimicrobials compounds produced by actinomycetes from soil with potential application to control bovine mastitis. Thesis (Doctorate) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

In this work were used two different bioassays to evaluate the antimicrobial potential of some actinomycetes against bacteria that cause bovine mastitis. For this propose an antagonism and antibiose assays were optimized against 13 Gram-positive and Gram-negative bacteria related with bovine mastitis. Through antagonism bioassay 120 actinomycetes were screened and 55% were considered active. In disk diffusion bioassay, 70 crude extracts were screened and 60% showed inhibition zones. The crude extracts Caat 1-54, Caat 2-63 and Caat 8-25 were considered the most promising of all the extracts. Dereplication studies and fractionation guided by bioassay were procedure with this extracts to identify the actives metabolites. The extracts Caat 1-54 and Caat 2-63 were active against strains of Gram-positive bacteria and the antimicrobial effect was related to lysolipin I and actinomycin D and V, respectively. The extract Caat 8-25 was active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Oxytetracycline were associated with activity against Gram-positives strains and a herbicidin B was active against Gram-negative bacteria. Using dereplication strategies by LC-MS/MS others compounds were characterized in different crude extracts. The extract Caat 2-63 was also identified the presence of other peptides from the same biosynthetic pathway of actinomycin D and for crude extract Caat 8-25 were identified herbicidin F. In addition, studies of the shift in secondary metabolism carried out for actinobacteria Caat 1-54 (lysolipin producer). Culture medium supplementation by bromide ions at different stages of fermentation induce the production of bromine lysolipin analog and a chloro-bromine lysolipin. DESI-MS TLC studies associated with TLC bioautography were used to analyze a crude extract Caat 2-63. This study showed how this method could be used to accelerate the identification of active compounds, because mass spectrometry analysis *in situ* at bioautography inhibition zone showed the presence of actinomycin D and V, which had been associated with antimicrobial activity of this crude extract. Therefore, the results of this thesis confirm the potential of actinobacteria as bioactives compounds source and the importance of mass spectrometry experiments to accelerate the identification of these compounds.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estruturas químicas dos principais antibióticos empregados no tratamento da mastite bovina. 3
- Figura 2.** Estrutura química de antibióticos produzidos por actinobactérias. 6
- Figura 3.** Representação esquemática da comunicação química existente na rizosfera. Pode-se observar alelopatia em (a); atração de micro-organismos para colonização da rizosfera em (b), (c) e (d); a formação dos nichos após a colonização microbiana em (e) e (f); além de relação de parasitismo em (g) 9
- Figura 4.** Estruturas químicas de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias de ambientes extremos. 10
- Figura 5.** Representação esquemática das etapas envolvidas no fracionamento guiado por bioensaio..... 11
- Figura 6.** Representação esquemática da metodologia de desreplicação, empregada para acelerar a identificação de metabólitos de interesse..... 16
- Figura 7.** Colônias de bactérias da Placa 1 estriadas em (a) TSBA, (b) BDA, (c) GYEA e (d) ISP-2 após 24h de crescimento em estufa a 37°C. 21
- Figura 8.** Bioensaio de antagonismo *in vitro* entre actinobactéria AMC 23 (centro da placa de Petri) contra bactérias causadoras de mastite (Placa 1), utilizando meio de cultivo sólido BDA. Em (a) as bactérias foram estriadas após 5 dias de crescimento da actinobactérias, enquanto em (b) o intervalo de tempo foi de 7 dias e em (c) de 10 dias..... 22
- Figura 9.** Bioensaio de antagonismo contra as linhagens tipo (Placa 2) em meio sólido BDA. Em (a) actinobactéria Actino-14 que não apresentou atividade, em (b) a actinobactéria CS072 que foi pouco ativa, em (c) a actinobactéria CS045 considerada como ativa e em (d) a actinobactéria Caat 1-42 como representante do grupo muito ativo. 24
- Figura 10.** Bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 1-37, que se mostrou (a, b) ativa em meio BDA (c, d) e sem atividade biológica em meio TSBA. 26
- Figura 11.** Bioensaio de antagonismo (Placa 2) da actinobactéria Actino-14, no qual é possível observar diferentes respostas biológicas para o ensaio dos mesmos micro-organismos empregando (a) meio BDA e (b) meio TSBA..... 27
- Figura 12.** Comparação do potencial antimicrobiano da actinobactéria AMC 39 em meio BDA frente às bactérias da (a) Placa 1 e (b) Placa 2, ilustrando maior resistência das bactérias da Placa 2 aos compostos ativos. 28
- Figura 13.** Resultados obtidos no bioensaio de antagonismo mediado por VOCs produzidos pelas actinobactérias (a) SB054, (b) SB035, (c) CS091 e (d) Caat 1-42. 29
- Figura 14.** Resultados obtidos no ensaio de bioautografia direta contra *Staphylococcus aureus* 211 para (a) DMSO, (b) AMC 23, (c) Caat 6-3, (d) Eucal 26 e (e) controle positivo DMSO. 31
- Figura 15.** Avaliação da toxicidade dos solventes triados para realização de bioautografia direta frente a (a) *Staphylococcus aureus* 211 e (b) *Escherichia coli* K12. 31
- Figura 16.** Bioensaio de disco-difusão empregando diferentes concentrações de tetraciclina frente as bactérias (a) *Staphylococcus aureus* 211, (b) SCN, (c) *Streptococcus agalactiae* e (d) *Staphylococcus aureus* 212. 32

Figura 17. Bioensaio de disco-difusão com diferentes concentrações de tetraciclina frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> 211. A bactéria foi plaqueada (a) após 24 h a inserção dos discos e (b) logo em seguida a solidificação do meio de cultivo.	33
Figura 18. Bioensaio de disco difusão para determinação da concentração ideal de extrato bruto. Em (a) diluições do extrato Eucal 26 contra <i>Staphylococcus aureus</i> 211, em (b) diluições do extrato AMC 23 contra <i>Staphylococcus aureus</i> 212 e em (c) extrato Caat 6-3 contra SCN.	34
Figura 19. Bioensaio de disco difusão indicando os níveis de atividade antimicrobiana. Em (a) o extrato bruto Caat 5-29, considerado muito ativo, em (b) o extrato ativo Caat 1-42, em (c) o extrato pouco ativo Caat 8-18.	35
Figura 20. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25 contra as bactérias: (a) SCN, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923, (c) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27.853, (d) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43.300, (e) <i>Escherichia coli</i> FD 1062 e (f) <i>Escherichia coli</i> K 12.	39
Figura 21. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 1-54 contra as bactérias: (a) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> 212, (c) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43.300, (d) SCN, (e) <i>Staphylococcus aureus</i> 211, (f) <i>Staphylococcus aureus</i> 213, (g) <i>Staphylococcus epidermis</i> e (h) <i>Streptococcus agalictae</i>	40
Figura 22. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63 contra as bactérias: (a) <i>Staphylococcus aureus</i> 211, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> 212, (c) <i>Staphylococcus aureus</i> 213, (d) SCN (e) <i>Streptococcus agalictae</i> , (f) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923, (g) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43.300 e (h) <i>Escherichia coli</i> FD 1062.	40
Figura 23. Espectros de DI-PDA-MS dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio BD pelas actinobactérias (a) Caat 2-62, (b) Caat 2-97, (c) Caat 5-29, (d) Caat 7-38, (e) Caat 7-48, (f) Caat 8-6, (g) Caat 8-18 e (h) Caat P5-8. Acima o espectro de MS em modo positivo, seguido da análise em modo negativo e abaixo o espectro de absorção UV-Vís.	43
Figura 24. Estrutura química dos compostos identificados nos extratos brutos Caat 5-29, Caat 8-6 e Caat 8-18.	44
Figura 25. Resultado do bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 1-54 frente as linhagens isoladas (Placa 1) em (a) meio BDA e (c) TSBA e contra as linhagens tipo (Placa 2) em (b) meio BDA e (d) TSBA.	45
Figura 26. Cromatograma de LC-UV do extrato bruto Caat 1-54, obtido a partir da fermentação de meio BD.	46
Figura 27. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto Caat 1-54 obtido a partir da fermentação de meio BD.	47
Figura 28. Espectros de massas, ESI+ e ESI-, da fração ativa Fr32 proveniente do fracionamento do extrato bruto Caat 1-54.	48
Figura 29. Espectros de massas em modo positivo (ESI+) para as frações ativas (a) Fr25; (b) Fr30 e (c) Fr35 provenientes da fermentação de meio BD.	49
Figura 30. Estrutura química da lisolipina I.	50
Figura 31. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) das Fr32-35 provenientes do extrato bruto Caat 1-54 obtido da fermentação de meio BD.	51

Figura 32. Espectro de HMQC (CD ₃ OD, 500 MHz) das Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.	52
Figura 33. Espectro de HMBC (CD ₃ OD, 500 MHz) das Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.	52
Figura 34. Correlações entre os núcleos de ¹ H e ¹³ C observadas no espectro de HMBC da lisolipina I, produzida pela actinobactéria Caat 1-54.	54
Figura 35. Espectros de CID da lisolipina I substituída com os isótopos ³⁵ Cl (<i>m/z</i> 598) e ³⁷ Cl (<i>m/z</i> 600), respectivamente.	54
Figura 36. Proposta de fragmentação para a lisopilina I.	55
Figura 37. Via hipotética para a biossíntese das lisolipinas. A via em azul representa a formação da cadeia do policetídeo a partir de malonamida e malonil-CoA. Alternativamente, a via em vermelho inicia-se pela condensação de malonil-CoA.	57
Figura 38. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio líquido BD contendo água do mar nas concentrações de (a) 0%, (b) 25%, (c) 50%, (d) 75%, (e) 100% pela actinobactéria Caat 1-54.	59
Figura 39. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 7 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com (b) KBr 50 mM t=0, (c) NaBr 50 mM t=0 e (d) NaBr 100 mM t=0.	62
Figura 40. Espectros de DI-MS (ESI+) dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 7 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com (b) KBr 50 mM t=0, (c) NaBr 50 mM t=0 e (d) NaBr 100 mM t=0.	63
Figura 41. Cromatogramas de LC-PDA para os extratos brutos produzidos pela actinobactérias Caat 1-54 a partir da fermentação em 12 dias de (a) meio BD (controle) meio BD com adição de NaBr nas concentrações de (b) 50 mM e 100 mM, ambos inoculados simultaneamente a adição do sal (t=0).	64
Figura 42. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 12 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com NaBr nas concentrações de (b) 50 mM e (c) 100 mM, sendo o sal adicionado após 5 dias do inóculo da actinobactéria (t=5).	65
Figura 43. Ampliação dos espectros de (a) <i>full scan</i> do extrato bruto que contém a lisolipina clorada e bromada (<i>m/z</i> 677) e (b) simulação da lisolipina I substituída também com um bromo.	66
Figura 44. Cromatogramas dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 20 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com KBR nas concentrações de (b) 50 mM (c) 100 mM e suplementado com NaBr nas concentrações de (d) 50 mM e (e) 100 mM, sendo os sais adicionados simultaneamente ao inóculo da actinobactéria.	67
Figura 45. Cromatogramas dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 20 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com KBR nas concentrações de (b) 50 mM (c) 100 mM e suplementado com NaBr nas concentrações de (d) 50 mM e (e) 100 mM, sendo os sais adicionados após 5 dias do inóculo da actinobactéria. ..	68
Figura 46. Espectros de CID dos íons de <i>m/z</i> 616 (hidroxi-lisolipina), <i>m/z</i> 564 (lisolipina não-halogenada), <i>m/z</i> 642 (lisolipina substituída com ⁷⁹ Br) e <i>m/z</i> 644 (lisolipina substituída com ⁸¹ Br) presentes nos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54.	70

Figura 47. Estrutura química da lisolipina X e das lisolipinas bromada e não-halogenada....	71
Figura 48. Espectros de CID (energia de colisão de 35 eV) para os íons de m/z 676 e 678, referentes a uma lisolipina clorada e bromada produzida pela actinobactéria Caat 1-54.	72
Figura 49. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 7 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.....	73
Figura 50. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 12 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.	74
Figura 51. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 20 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.....	75
Figura 52. Resultado do bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 2-63 frente as bactérias isoladas do leite de vacas contaminadas (Placa 1) em (a) meio BDA e (c) TSBA e contra as linhagens tipo (Placa 2) em (b) meio BDA e (d) TSBA.	77
Figura 53. Cromatograma de LC-UV para o extrato bruto obtido a partir da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63.....	78
Figura 54. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio para extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 2-63	79
Figura 55. Espectros de massas (ESI+ e ESI-) das frações ativas (a) Fr14 e (b) Fr15 do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63.....	80
Figura 56. Espectro de CID, empregando energia de colisão de 40 eV, para os íons de m/z 1255 e 1270.	81
Figura 57. Estrutura química das actinomicinas D e V, presentes nas frações ativas Fr14-15 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 2-63.	82
Figura 58. Proposta de fragmentação para a actinomicina D.....	84
Figura 59. Via biossintética da actinomicina D.	86
Figura 60. Espectros de DI-MS das frações (a) Fr8 e (b) Fr 7, provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 2-63.....	87
Figura 61. Espectros de CID (energia de colisão de 30 eV) para os íons de (a) m/z 582, (b) m/z 597, (c) m/z 641, (d) m/z 741, (e) m/z 755 e (f) m/z 783.	88
Figura 62. Bioautografia em TLC do extrato bruto Caat 2-63 frente as linhagens (a) SCN, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> 211, (c) <i>Streptococcus agalactiae</i> , (d) <i>Staphylococcus aureus</i> , (e) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e (f) <i>Escherichia coli</i>	90
Figura 63. Espectro de DESI-TLC-MS para região da placa de TLC correspondente ao halo de inibição observado no ensaio de bioautografia do extrato bruto Caat 2-63.	91
Figura 64. Espectros de DESI-TCL-MS de regiões próximas ao halo de inibição identificado no ensaio de bioautografia para o extrato bruto Caat 2-63.	92
Figura 65. Ampliação do espectro de DI-MS (ESI+) do extrato bruto proveniente da fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 8-25.....	93
Figura 66. Cromatograma de LC-UV para o extrato bruto Caat 8-25 obtido a partir da fermentação de meio BD.....	94

Figura 67. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto Caat 8-25 obtido a partir da fermentação de meio BD.	95
Figura 68. Espectros de massas (ESI+) obtidos para as frações ativas (a) Fr7, (b) Fr8 e (c) Fr 9, provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 8-25.	96
Figura 69. Espectros de CID (energia de colisão de 20 eV) do íon de m/z 461 do (a) composto padrão e (b) presente nas frações ativas do extrato bruto Caat 8-25.	97
Figura 70. Cromatograma de LC-UV ($\lambda = 370$ nm) para o (■) extrato bruto Caat 8-25 e (■) oxitetraciclina.	98
Figura 71. Estrutura química da oxitetraciclina.	98
Figura 72. Bioensaio de disco-difusão para oxitetraciclina contra as bactérias Gram-positivas (a) SCN, (b) <i>Staphylococcus aureus</i> 211, (c) <i>Staphylococcus aureus</i> 213, (d) <i>Staphylococcus epidermis</i> , (e) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27.859 e (f) <i>Escherichia coli</i> FD2062.....	99
Figura 73. Espectro de CID dos íons de (a) m/z 454, (b) m/z 522 e de m/z 536, presentes no extrato bruto Caat 8-25.....	101
Figura 74. Espectros de LC-PDA das frações ativas (a) Fr 7, (b) Fr8 e (c) Fr9 provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 8-25.....	102
Figura 75. Cromatograma de LC-MS/MS para o íon de m/z 454, presente na fração ativa Fr9 proveniente do extrato bruto Caat 8-25.....	103
Figura 76. Espectro de HRMS em modo positivo (ampliação da faixa de m/z 450-550) do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25.....	104
Figura 77. Estrutura química das herbicidina B, 2'-O-Demetil-herbicidina F e herbicidina F, identificadas no extrato bruto Caat 8-25.	105
Figura 78. Representação esquemática do bioensaio de antagonismo e disposição das linhagens de bactérias nas diferentes placas que compõem o <i>screening</i> biológico. A Placa 1 (a esquerda) contém as linhagens isoladas, enquanto que a Placa 2 (a direita), as linhagens tipo.	116
Figura 79. Esquema do bioensaio de antagonismo mediado por VOCs.	117
Figura 80. Representação esquemática do processo de obtenção do extrato bruto.	117
Figura 81. Representação esquemática do ensaio de disco-difusão.....	119

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação da atividade biológica de acordo com a distância entre as colônias das bactérias alvo e a actinobactéria.....	24
Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio de antagonismo para as diferentes actinobactérias em meio BDA e TSBA.	25
Tabela 3. Actinobactérias consideradas mais promissoras no bioensaio de antagonismo contra bactérias envolvidas na mastite.	30
Tabela 4. Classificação da atividade biológica de acordo com diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias das bactérias alvo.	35
Tabela 5. Resultados do bioensaio de difusão dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio BD pelas actinobactérias contra as bactérias da mastite.....	36
Tabela 6. Dados de RMN para Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.	53
Tabela 7. Massa seca obtida na fermentação de meio BD com diferentes porcentagens de água do mar pela actinobactéria Caat 1-54.	58
Tabela 8. Massas e fórmulas moleculares obtidas nas análises de HRMS para os compostos presentes no extrato bruto Caat 8-25.....	104
Tabela 9. Gradiente de eluição usados nas análises de LC-UV dos extratos brutos.....	112
Tabela 10. Gradiente de eluição usados nas análises de LC-PDA-MS dos extratos brutos Caat 1-54.	113
Tabela 11. Descrição das linhagens de bactérias utilizadas nos bioensaios, indicando os códigos referente a cada uma delas.	113
Tabela 12. Composição dos meios de cultivo avaliados para o melhor crescimento bacteriano.	115
Tabela 13. Solventes testados na solubilização dos extratos brutos.....	118

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Mastite Bovina.....	1
1.2. Actinobactérias: Importância como produtoras de compostos com atividade antimicrobiana	4
1.3. Micro-organismos de rizosfera e ambientes extremos	7
1.4. Fracionamento guiado por bioensaio.....	11
1.5. Espectrometria de massas no processo de desreplicação	13
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Resultados	20
3.1. Desenvolvimento de bioensaio de antagonismo entre actinobactérias e bactérias causadoras de mastite	20
3.2. Desenvolvimento de bioensaio de antibiose para avaliação dos extratos brutos produzidos por actinobactérias frente a bactérias causadoras de mastite.....	30
3.3. Estudo do perfil metabólico de extratos brutos produzidos por actinobactérias	42
3.4. Desreplicação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 1-54	45
3.5. Estudo do perfil metabólico da actinobactéria Caat 1-54 cultivada na presença de sais de bromo e água do mar	56
3.5.1. Avaliação da influência do cultivo empregando água do mar no perfil metabólico da actinobactéria Caat 1-54	56
3.5.2. Estudo da influência dos sais NaBr e KBr no perfil químico da actinobactéria Caat 1-54	60
3.5.3. Estudo da influência de diferentes concentrações de NaBr no perfil químico da actinobactéria Caat 1-54	72
3.6. Desreplicação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63	76
3.7. Estudo empregando DESI-TLC-MS e bioautografia em TLC para avaliação do extrato bruto Caat 2-63	89

3.8. Desreplicação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25	93
4. Conclusões.....	107
5. Parte Experimental	110
5.1. Materiais utilizados.....	110
5.1.1. Equipamentos.....	110
5.1.2 Solventes e reagentes	110
5.2. Metodologias cromatográficas e espectrométricas	111
5.2.1. <i>Fracionamento Guiado por Bioensaio</i>	112
5.2.2. <i>Metodologia de LC-PDA-MS</i>	112
5.3. Metodologias empregadas nos ensaios biológicos	113
5.3.1. <i>Bactérias alvos utilizadas em screening biológico</i>	113
5.3.2. <i>Meios de cultivo empregados nos estudos biológicos</i>	114
5.3.3. <i>Desenvolvimento de bioensaio de antagonismo entre actinobactérias e bactérias causadoras de mastite</i>	115
5.3.4. <i>Bioensaio de antagonismo mediado por compostos orgânicos voláteis</i>	116
5.3.5. <i>Obtenção dos extratos brutos</i>	117
5.3.6. <i>Bioautografia direta</i>	118
5.3.7. <i>Bioensaio de Disco-Difusão contra bactérias causadoras de mastite</i>	119
5.3.8. <i>Bioautografia em TLC e DESI-TLC-MS para o extrato bruto Caat 2-63</i>	120
5.3.9. <i>Estudo do metabolismo da actinobactérias Caat 1-54 cultivada em meio com adição de sais de bromo</i>	120
5.3.10. <i>Cultivo com água do mar para Caat 1-54</i>	121
6. Referências Bibliográficas	123

1. Introdução

Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina

1. Introdução

1.1. Mastite Bovina

A mastite é definida como uma inflamação das glândulas mamárias, e pode ser decorrente de processos infecciosos ou não, acometendo os mais diversos organismos da classe dos mamíferos.¹ Há muitos micro-organismos, hospedeiros e fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento da doença, sendo que algumas destas variáveis são comuns a todos os mamíferos doentes, enquanto outros são inerentes a cada das espécies acometidas pela mastite. Juntas, estas variáveis influenciam quais serão os agentes etiológicos mais prevalentes para cada caso, e ainda podem determinar as possíveis formas de transmissão entre os organismos infectados e as suas consequências para a saúde pública.²

Geralmente, a mastite bovina está associada a infecção bacteriana, entretanto é também correlacionada a invasão por fungos, leveduras e algas.³ As bactérias representam uma grande parcela dos agentes etiológicos desta doença e as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* são as causas mais comuns de infecções e têm se tornado um problema crescente nos rebanhos infectados.⁴ A mastite bovina afeta diretamente a economia mundial, pois a produção leiteira pode ser extremamente prejudicada quando há focos da infecção que não são contidos devido aos patógenos resistentes, o que pode levar a medidas extremas como, por exemplo, o sacrifício dos animais para controle da doença, além das perdas inerentes a má qualidade do leite obtido, bem como os gastos nos tratamento dos animais infectados.^{5,6}

Os animais que apresentam mastite podem variar quanto ao número de quartos mamários infectados, bem como o patógeno envolvido na infecção, isto faz com que

processos inflamatórios com intensidades diferentes sejam observados, fato este que dificulta o tratamento da doença, uma vez que cada caso em particular pode responder de uma forma ao tratamento empregado.⁷

A mastite bovina pode apresentar-se de duas formas distintas: a) mastite subclínica, a qual é caracterizada pela alteração na contagem de células somáticas, diminuição da produção de leite e ausência de sinais externos, como inchaço e descoloração do úbere, secreção anormal e reações sistêmicas; e b) mastite clínica, onde há sinais evidentes de alterações do úbere e, principalmente, do leite. Outra forma de classificação da doença leva em conta a forma de contágio, a qual pode ocorrer do ambiente para o animal, chamada de mastite ambiental, ou de animal para animal, denominada mastite contagiosa.⁸

O tratamento da mastite deve ser baseado nas diretrizes nacionais e internacionais sobre o uso prudente de agentes antimicrobianos e, principalmente, no diagnóstico bacteriológico, uma vez que ele facilita a seleção do antibiótico mais adequado. Entretanto, quando o diagnóstico bacteriológico não está disponível o tratamento deve ser iniciado com base em dados do rebanho. Isto faz com que não haja um tratamento único para todos os casos, sendo necessária uma avaliação individual para determinação do procedimento mais eficiente, dificultando assim o tratamento da doença.⁹ O uso de antibióticos no combate a mastite bovina vem ocorrendo desde 1940, auxiliando na eliminação dos patógenos, defesa do hospedeiro e prevenção da doença. Atualmente, diversos antibióticos inspirados em produtos naturais têm sido empregados no tratamento da mastite, os quais pertencem principalmente as classes dos: a) β -lactâmicos, como penicilina G (1), ceftiofur (2), cloxacilina (3) e amoxicilina (4); b) aminoglicosídeos, tal qual a neomicina (5); c) tetraciclinas, por exemplo oxitetraciclina (6); e d) lincosamidas, como a lincomicina (7), representadas na Figura 1.¹⁰⁻¹²

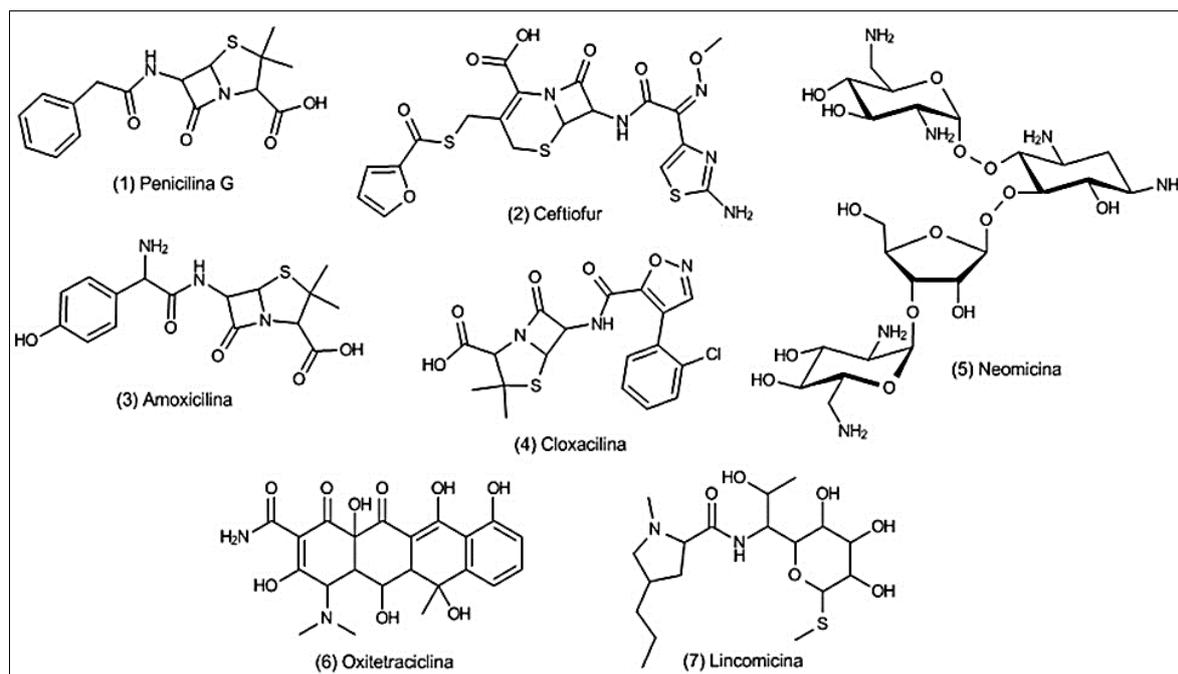


Figura 1. Estruturas químicas dos principais antibióticos empregados no tratamento da mastite bovina.

A mastite é uma doença infecciosa que leva a inúmeros custos quando acomete um rebanho, pois há perdas associadas aos custos de tratamento, abate e morte de animais, além da diminuição da produção e presença de resíduos de antibióticos no leite.¹³ Estimam-se perdas de produção entre 10 a 30% por problemas quanto a lactação, de acordo com os patógenos envolvidos, tempo de infecção, idade e nutrição do animal, bem como fatores genéticos.¹⁴ Assim, a mastite continua sendo um grande desafio para a indústria de laticínios no mundo todo, apesar da implementação de diversas estratégias de controle da doença. E, embora um declínio no número de casos reportados seja observado, uma mudança no quadro de patógenos tem sido observada, muitos dos quais estão associados ao surgimento de linhagens resistentes.^{15,16}

Tendo em vista tais fatores, a descoberta de novos antibióticos mais eficazes e seletivos para as linhagens envolvidas na mastite podem proporcionar tratamentos mais efetivos para bovinos, além de minimizar o risco de resíduos de antibióticos em leite e carne, contribuindo para a melhoria da saúde humana. Sendo assim, os produtos naturais microbianos destacam-se para a descoberta de novas moléculas com atividade antimastítica, uma vez que os

micro-organismos aparecem como uma promissora fonte de novos compostos a serem explorados devido à grande variedade de linhagens existentes, sendo que muitas delas ainda não foram descobertas, e pelo destaque na produção de um vasto número de metabólitos secundários bioativos, em especial as actinobactérias, pois foram responsáveis por avanços significativos na história do antibióticos.¹⁷

1.2. Actinobactérias: Importância como produtoras de compostos com atividade antimicrobiana

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com elevada teor de citosina e guanina em seu DNA e constituem-se como um dos maiores filos do reino Bacteria. Elas são organismos procariotos, possuem organização filamentosa, sofrem diferenciação morfológica complexa e estão distribuídas principalmente nos ecossistemas aquáticos e terrestres. São caracterizadas também pela sua ampla diversidade de metabólitos secundário, responsável pela produção de cerca de dois terços de todos os antibióticos de uso clínico inspirados em produtos naturais (PN).¹⁸

Por mais de 70 anos, actinobactérias foram reconhecidas como importantes fontes de compostos naturais bioativos e dentre seus quase 18.000 compostos ativos conhecidos, mais de 10.000 foram descritos a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*, tornando a família Streptomycetaceae a principal representante deste filo.¹⁹ Atualmente mais de 200 medicamentos baseados em metabólitos produzidos por estes micro-organismos estão em ensaios clínicos ou aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), sendo utilizados para o tratamento de infecções, câncer, distúrbios do sistema imune, entre outros.²⁰

Em 1941, Waksman e Woodruff reportaram o primeiro isolamento de metabólito com atividade antibiótica produzido por actinobactérias, chamado actinomicina e, em 1942, foram

responsáveis pela descoberta de estreptotricina (8), isolada de uma linhagem de *Streptomyces*. Após dois anos, foi relatada a descoberta da estreptomicina (9), permitindo que os tratamentos para a tuberculose fossem possíveis²¹ e, a partir de então, o termo antibiótico foi utilizado pela primeira vez por Waksman.²² Os resultados promissores para a atividade antimicrobiana dos compostos citados anteriormente, aliado ao desenvolvimento dos tratamentos a base de penicilina, fizeram com que os cientistas intensificassem a busca por antibióticos microbianos, especialmente aqueles produzidos pelo gênero *Streptomyces*, tornando as actinobactérias uma das fontes mais promissoras para a prospecção de antibióticos.²³

A produção da maioria dos antibióticos é específica da espécie, e estes metabólitos secundários são importantes para que as actinobactérias possam competir com outros organismos presentes no mesmo ambiente. Outro processo que contribui para a produção de antibióticos é a simbiose com plantas, cujo exsudato da planta auxilia no desenvolvimento do micro-organismo e o metabólito microbiano protege a planta contra patógenos.^{24,25} Além disso, alguns relatos da literatura também sugerem que alguns antibióticos podem atuar como moléculas sinalizadores, as quais são capazes de produzir alterações na expressão de alguns genes do receptor em resposta a exposição do estímulo recebido.²⁶

As actinobactérias são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos, desde compostos com estruturas químicas semelhantes (séries homólogas) ou até mesmo moléculas pouco usuais.²⁷ Desta forma, estes metabólitos secundários podem estar associados não somente a ação antibiótica, mas também a outras atividades biológicas, como antitumoral, imunossupressora, inibidora de enzimas, antiparasitária, bioherbicida, reguladora de crescimento, biopesticida ou bioinseticida.²⁸ Esta diversidade química encontrada para as actinobactérias resulta da necessidade de defesa, comunicação e competição por espaço e nutrientes entre os organismos, que desenvolveram diversos mecanismos biossintéticos para sobrevivência ao longo do processo evolutivo.²⁹ Desta forma, um micro-organismo é capaz de

produzir diversas classes de compostos, de acordo com as condições nutricionais e os parâmetros físicos utilizados nos processos fermentativos.³⁰ A diversidade química dos antibióticos produzidos por actinobactérias pode ser observada na Figura 2, como mostram os compostos ciclomarina (10), esporolida A (11), aculeximicina (12), lipomicina (13), salfredina (14) e asterobactina (15).

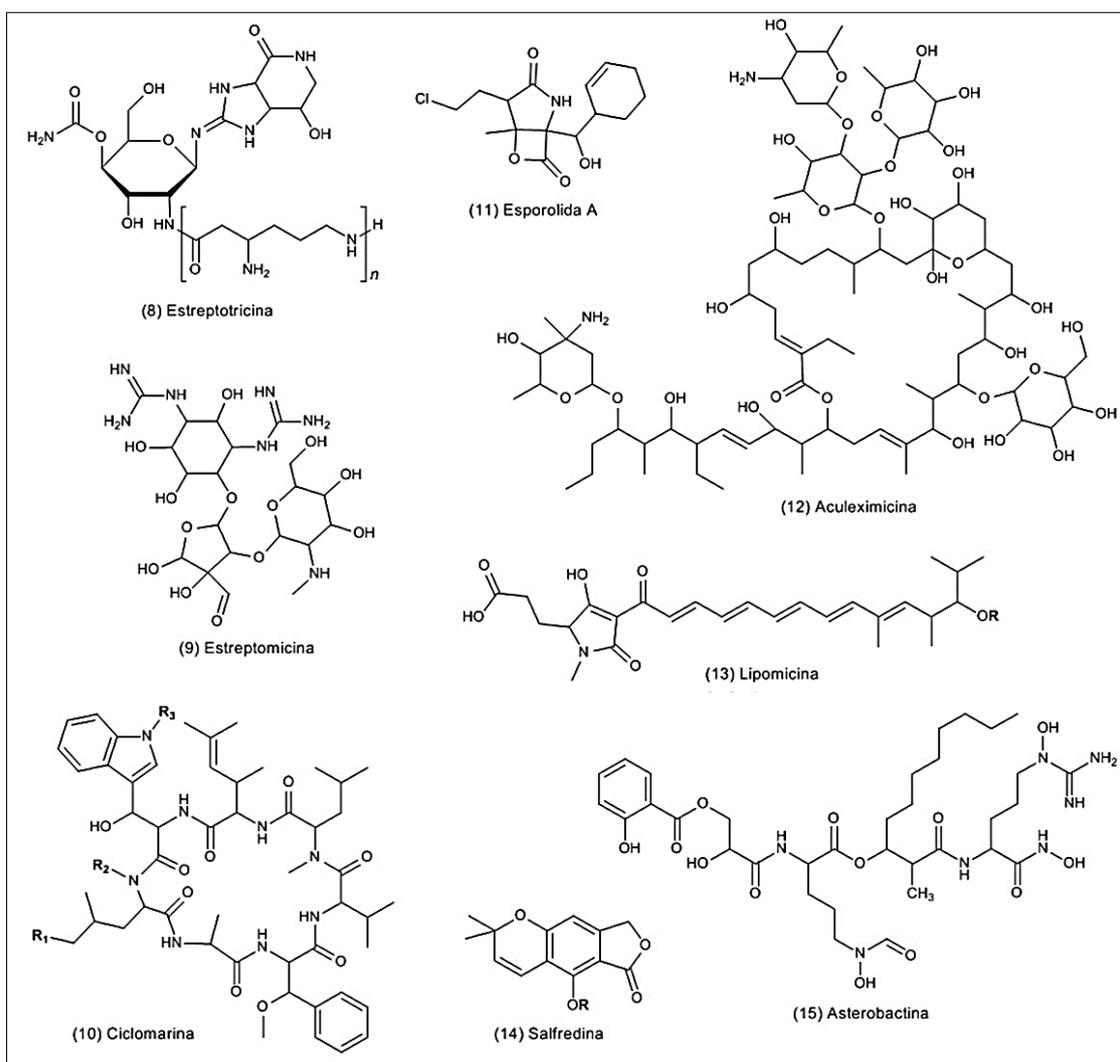


Figura 2. Estrutura química de antibióticos produzidos por actinobactérias.

A diversidade estrutural e as características físico-químicas dos metabólitos secundários microbianos é bastante diferente quando comparadas as moléculas sintéticas, uma vez que os produtos microbianos frequentemente apresentam esqueletos carbônicos maiores e mais

complexos, além de muitos centros estereogênicos, enquanto que os compostos sintéticos são mais limitados em tamanho, estrutura e complexidade. Assim, os antibióticos naturais e seus derivados podem ser mais específicos em seu modo de ação, pois sua estrutura química mais complexa pode facilitar uma maior afinidade por seus alvos biológicos.³¹

Embora a crescente dificuldade de encontrar novas moléculas tenha levado a um declínio na pesquisa de antibióticos naturais, as doenças infecciosas associadas à resistência a múltiplos fármacos estão se espalhando rapidamente, e como consequência, os tratamentos disponíveis no mercado não são mais eficazes na terapia. Assim, a preocupação em encontrar novos compostos com ação antibiótica ressurgiu, devido a atual necessidade de combater as linhagens patógenas resistentes.³² Diante deste cenário e da história dos antibióticos naturais, os produtos naturais microbianos voltam a se destacar como ponto de partida para a inovação da química medicinal e, embora muitos compostos já sejam conhecidos e tenham sua ação antimicrobiana comprovada, as espécies de *Streptomyces* ainda têm sido amplamente estudadas para o combate das doenças infecciosas associadas a resistência, como por exemplo, a mastite.^{33,34} Entretanto, novas estratégias têm surgido para aumentar as chances de identificação de compostos inéditos, explorando linhagens de actinobactérias menos estudadas ou raras, provenientes de ambientes extremos, além da utilização de condições de cultivo não usuais, expressão/supressão de genes, bem como estratégias de monitoramento químico e isolamento guiado pela atividade biológica para acelerar o processo de caracterização dos compostos considerados promissores como novos antibióticos.³⁵⁻³⁷

1.3. Micro-organismos de rizosfera e ambientes extremos

As raízes das plantas têm a capacidade de influenciar os organismos que a circundam, isto é, o microbioma da rizosfera, através da criação de nichos específicos no solo mediada

pela liberação de entidades químicas de acordo com vários fatores, tais como: tipos de organismos envolvidos, propriedades do solo, e as condições climáticas e nutricionais.³⁸

A rizosfera é caracterizada pela grande diversidade microbiana a qual abriga e, dentre os micro-organismos mais abundantes estão as actinobactérias, que diante da sua capacidade de produção de compostos bioativos podem oferecer vantagens na associação com plantas, melhorando suas condições de defesa e saúde.³⁹ A densidade microbiana da rizosfera varia de 10^8 a 10^9 bactérias por grama de solo, sendo tipicamente mais elevada do que em outras regiões do solo, que têm aproximadamente 10^4 espécies bacterianas por grama de solo.⁴⁰

Como consequência da diversidade de organismos presentes na rizosfera, a dinâmica desta região é marcada pela presença de inúmeros mediadores químicos, os quais são responsáveis pela comunicação entre as comunidades que ali habitam. Tal sinalização pode ocorrer de vários modos e basicamente pode ser dividida em três categorias: (a) entre os micro-organismos de uma mesma espécie ou de espécies distintas, (b) de plantas para micro-organismos, e (c) emitida de micro-organismos a planta.⁴¹ Assim, a rizosfera contém uma série de metabólitos primários e secundários que podem atrair, repelir ou eliminar organismos, com a finalidade de manutenção das espécies existentes ali.⁴² A Figura 3 apresenta um esquema da comunicação química que ocorre na rizosfera.

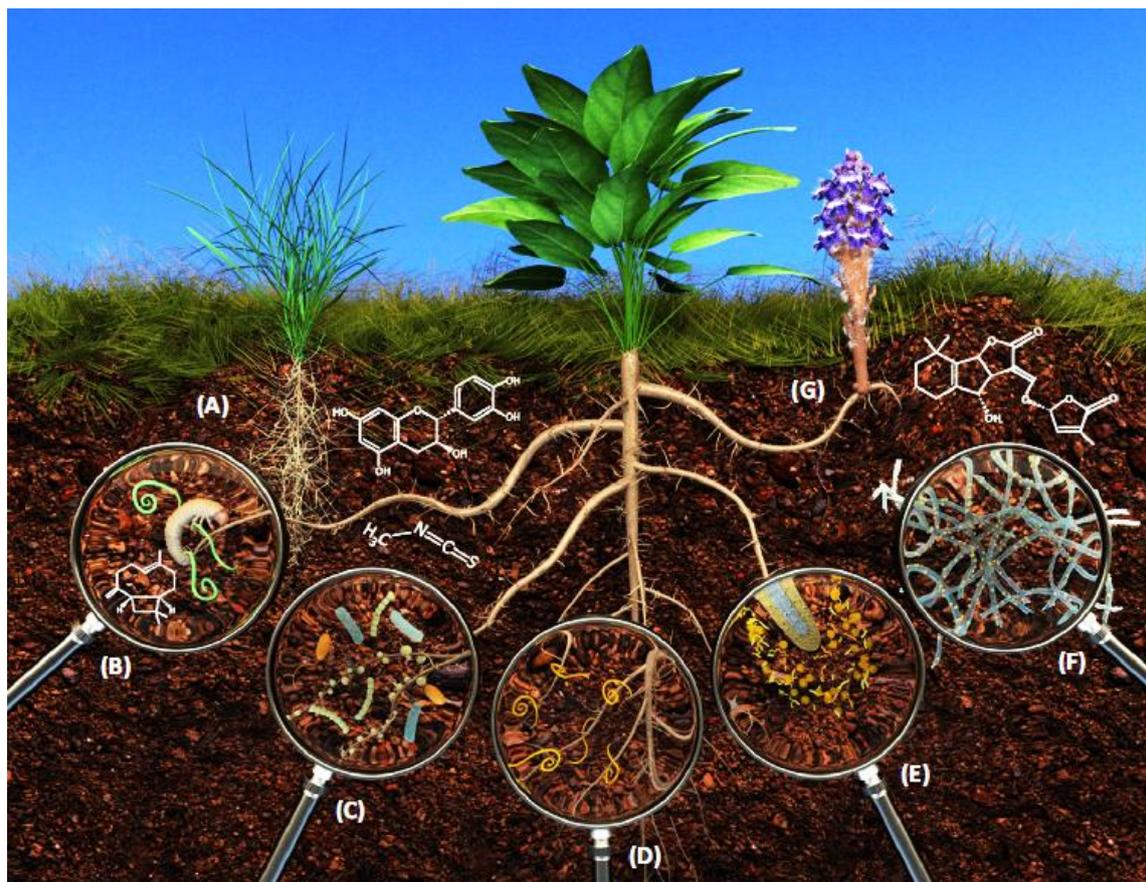


Figura 3. Representação esquemática da comunicação química existente na rizosfera. Pode-se observar alelopatia em (a); atração de micro-organismos para colonização da rizosfera em (b), (c) e (d); a formação dos nichos após a colonização microbiana em (e) e (f); além de relação de parasitismo em (g) ⁴²

Um fator extremamente importante que define a comunidade microbiana que constitui a população da rizosfera, assim como o perfil metabólico apresentado, são os fatores ambientais e nutricionais. A disponibilidade ou escassez de fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes, bem como o estresse hídrico, salinidade, pH e índices de radiação são fatores-chaves na ativação ou silenciamento de rotas biossintéticas capazes de garantir a sobrevivência do organismo em um ambiente pouco favorável.⁴³ A competição entre micro-organismos por espaço e nutrientes em ambientes extremos tem sido uma força seletiva significativa que leva à evolução, através do desenvolvimento de estratégias adaptativas para sobrevivência nesses ambientes complexos.⁴⁴

Os ambientes extremos são qualificados por características físicas e químicas que diferem significativamente daqueles encontrados em ambientes que suportam formas de vida

mais abundantes e variadas.⁴⁵ Assim, os micro-organismos presentes nestes ambientes podem ser classificados de acordo com as características encontradas lá, como por exemplo termófilos para ambientes com altas temperaturas, acidófilos quando o pH é ácido, halófilos para alta salinidade, metalotolerantes em locais com elevadas concentrações de metais, radiorresistentes para lugares onde há grande incidência de radiação (por exemplo, radiação ultravioleta).⁴⁶

Os organismos extremófilos são então considerados promissores para a biotecnologia, em virtude de sua capacidade de produzir diversas extremoenzimas (proteases, amilases, xilanases, desidrogenases), além de metabólitos com função protetora, como ácidos graxos poli-insaturados responsáveis por manter a estrutura celular em ambientes frios; carotenos para absorção de radiação; surfactantes, para manutenção da membrana celular em ambientes salinos; dentre outros.⁴⁷⁻⁴⁹ Pode-se citar como exemplos de metabólitos secundários produzidos por extremófilos o antibiótico antineoplásico tubercidina (16) isolado de *Actinopolyspora erythraea*, uma actinobactéria halófila,⁵⁰ ou mesmo os antifúngicos abenquinas A-D (17), isolados de uma linhagem xerófila (resistente a dissecação) de *Streptomyces*.⁵¹

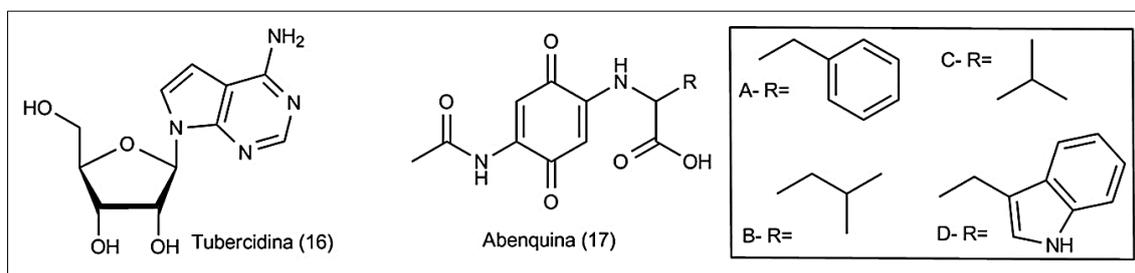


Figura 4. Estruturas químicas de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias de ambientes extremos.

1.4. Fracionamento guiado por bioensaio

Como os micro-organismos são capazes de produzir uma série de compostos através de seu metabolismo primário e secundário, os extratos brutos gerados nos processos fermentativos, normalmente, constituem-se como uma mistura complexa, o que dificulta a associação da atividade metabólica a uma molécula específica. Nestes casos, o estabelecimento de uma relação causa-efeito inequívoca não é possível. Assim, estratégias que consigam interligar técnicas analíticas e ensaios biológicos podem ser empregadas com a finalidade de identificar as substâncias isoladas quanto sua relevância biológica.⁵²

O fracionamento guiado por bioensaio consiste em alternar etapas de testes biológicos com os fracionamentos dos extratos brutos através de diferentes métodos cromatográficos. A partir da fração que produz o efeito biológico desejado realiza-se, então, o isolamento e identificação do composto ativo, isto é, somente as frações ativas nos ensaios biológicos são levadas a novas etapas de fracionamento, até que se consiga relacionar a atividade a uma fração purificada.⁵³ A Figura 5 mostra uma representação esquemática deste processo.

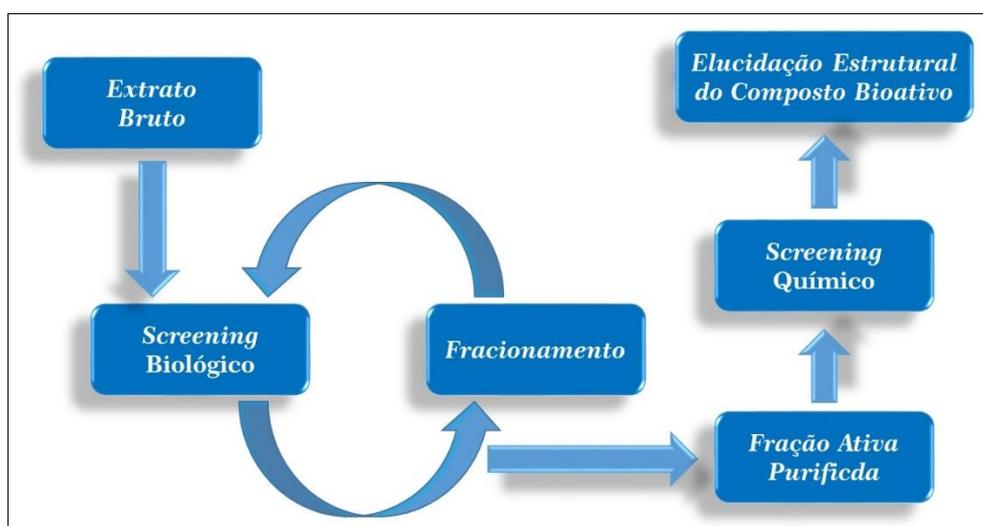


Figura 5. Representação esquemática das etapas envolvidas no fracionamento guiado por bioensaio.

Como os produtos naturais microbianos são excelentes fontes para a obtenção de uma diversidade química de candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos, diferentes ensaios podem ser empregados na triagem biológica.⁵⁴ Inicialmente, para a triagem de inúmeros extratos brutos, bioensaios com alto desempenho e respostas rápidas são empregados. Entretanto, após o fracionamento, bioensaios mais específicos podem ser utilizados para determinar o modo de ação da molécula bioativa isolada.⁵⁵ Atualmente, com as técnicas de miniaturização dos ensaios biológicos e HTS (do inglês *High Throughput Screening*) mais de uma atividade distinta podem ser monitoradas simultaneamente, potencializando ainda mais a metodologia, de forma que um maior número de *hits* sejam encontrados.⁵⁶

Entretanto, vale ressaltar que o fracionamento biomonitorado deve ser bem planejado, uma vez que existem algumas limitações. Como os compostos ativos geralmente estão presentes em pequenas quantidades, é imprescindível uma análise criteriosa para que os mesmos não sejam descartados. Além disso, a purificação dos analitos de interesse pode não ser trivial dada a complexidade de alguns extratos brutos microbianos. Finalmente, também deve-se atentar a perda da atividade por modificações estruturais que podem ocorrer no processo de separação, como a formação de artefatos ou mesmo reações de degradação, entre outros.⁵⁷

Uma vez que a avaliação biológica é realizada e a separação do metabólito bioativo tenha sido alcançada inicia-se o processo de elucidação estrutural do composto. Esta etapa de caracterização é dependente de técnicas analíticas diversas, podendo representar um conjunto de dados com diferentes informações a serem conectadas. Em geral, as técnicas mais amplamente empregadas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) e infravermelho (IR, do inglês *Infrared*).⁵⁸

1.5. Espectrometria de massas no processo de desreplicação

Diversos estudos mostram a importância e a eficiência dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias como antibióticos.⁵⁹ Entretanto sua obtenção pode não ser trivial, sendo necessárias diversas etapas, entre elas: produção dos extratos brutos através de processos fermentativos; extração dos compostos de interesse; fracionamento dos extratos brutos até que a atividade biológica possa ser associada a um determinado composto; e caracterização estrutural.⁶⁰ Durante todo este processo, geralmente são obtidas pequenas quantidades de extratos brutos e, principalmente, de compostos isolados, assim uma etapa crucial nos processos de desreplicação e fracionamento consiste na escolha da técnica analítica, a qual deve ser sensível, rápida e robusta. Desta forma, a espectrometria de massas faz-se uma ferramenta importante no processo de desreplicação de metabólitos em matrizes complexas, uma vez que permite uma análise rápida e sensível, bem como fornece informações valiosas, como a massa molecular e mesmo acerca da estrutura química.

Outra vantagem é que os perfis químicos gerados por MS permitem comparar extratos brutos, além de facilitarem o monitoramento e detecção de metabólitos de interesse, estreitando a busca de potenciais biomoléculas ou até mesmo evitando que extratos brutos quimicamente similares sejam estudados isoladamente em um estágio inicial do trabalho.⁶¹

As análises por MS são ideais para a triagem química e comparação detalhada dos metabólitos secundários de um conjunto de fermentações microbianas, revelando rapidamente as diferenças ou biomarcadores entre os grupos. Além disso, através da espectrometria de massas sequencial pode-se ainda obter informação estrutural de compostos numa fase inicial do trabalho, além da possibilidade de obtenção da fórmula estrutural por meio das análises por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*).

Diversas plataformas em MS podem ser empregadas nos estudos do metabolismo secundário microbiano, desde a injeção direta no equipamento (DI-MS, do inglês *Direct Infusion/Injection Mass Spectrometry*) até mesmo ao acoplamento com diversas técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), cromatografia gasosa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) ou mesmo cromatografia em camada delgada (TLC-MS do inglês *Thin Layer Chromatography Mass Spectrometry*).⁶²

A partir de todas as informações coletadas por MS (tais como massa e fórmula molecular, padrão isotópico, perfil de fragmentação, modo de ionização) é possível comparar com a literatura e/ou bancos de dados a informação estrutural fornecida. Assim, as estruturas conhecidas podem ser identificadas sem a necessidade de um processo de isolamento; além disso, os padrões de fragmentação observados no espectro MS/MS ou MSⁿ podem permitir a identificação de entidades desconhecidas dentro de uma mesma família química por meio de correlações espectrais.^{63,64} Desta forma, a MS têm contribuído imensamente para o desenvolvimento de metodologias de desreplicação dos extratos brutos cada vez mais rápidas e eficientes.

Um dos pontos fortes da espectrometria de massa é que pequenas quantidades de amostra são necessárias para realização das análises e, apenas com um único espectro é possível obter algumas informações relevantes como composição elementar e massa molecular. Além disso, grandes avanços instrumentais têm sido observados nas últimas décadas, principalmente com relação as técnicas de ionização, como exemplo a ionização ambiente, que levou à análise de amostras para um ambiente externo ao espectrômetro de massas.^{65,66}

A ionização ambiente permitiu que não só os extratos brutos pudessem ser analisados, mas também as próprias colônias microbianas. A análise direta das células de um micro-

organismo permite detectar metabólitos específicos de uma dada comunidade e, por este motivo, tem representado um crescente interesse nas pesquisas de microbiologia para o estudo das interações intra e interespecies.⁶⁷

Apesar das inúmeras vantagens da utilização de MS para desreplicação é preciso cuidado para a interpretação dos dados obtidos, pois identificações equivocadas podem ser cometidas devidos as a geração de íons protonados ($[M+H]^+$) ou coordenados com metais como sódio e potássio ($[M+Na]^+$ e $[M+NH_4]^+$).⁶⁸, Deve-se também ressaltar que as análises que não envolvem separação cromatográficas também estão sujeitas ao efeito de supressão iônica, no qual as diversas espécies presentes nos extratos brutos competem no processo de ionização e moléculas facilmente ionizáveis mascaram a presença de analitos com menor potencial de ionização.^{69,70}

No entanto, as análises espectrométricas podem não ser suficientes para se chegar a uma estrutura viável, pois a elucidação estrutural se torna difícil com altas massas moleculares e a pesquisas em bancos de dados podem gerar resultados falso-positivos. Para isso, o maior número de informações estruturais deve ser utilizado, como as técnicas espectroscópicas de RMN (ressonância magnética nuclear), IV (infravermelho), DC (dicroísmo circular), UV-Vis (ultravioleta-visível), em virtude da complementaridade entre elas.⁷¹

Assim, os protocolos de desreplicação podem envolver diversas análises para que se identifique uma molécula o mais rápido possível, evitando etapas de purificação de compostos que não sejam de interesse, confrontando os dados obtidos nas análises estruturais a dados da literatura e bancos de dados. A Figura 6 mostra uma representação esquemática abordada para a acelerar a identificação dos metabólitos de interesse.

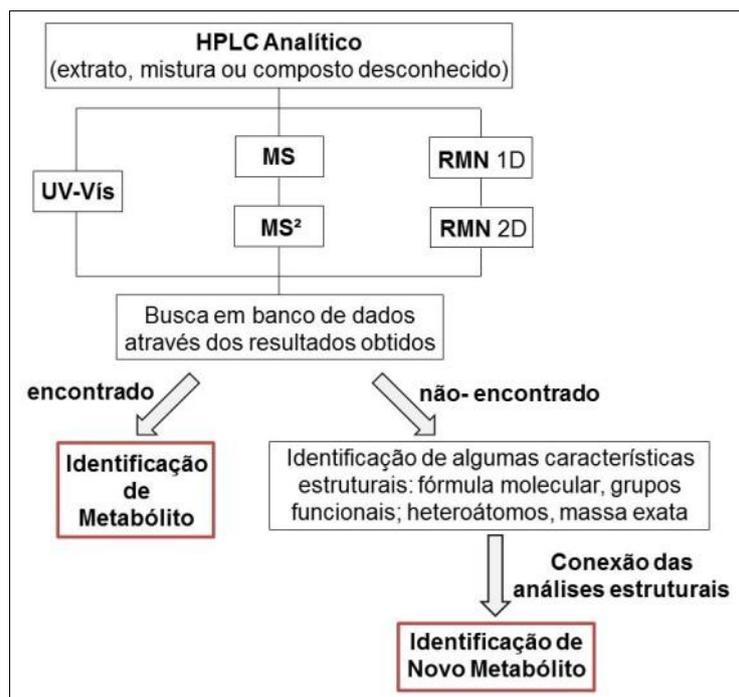


Figura 6. Representação esquemática da metodologia de desreplicação, empregada para acelerar a identificação de metabólitos de interesse.

Embora sejam necessários alguns cuidados, as metodologias em MS permitem o estudo da diversidade de metabólitos produzidos por micro-organismos e a dinâmica das comunidades microbianas a partir tanto da análise de metabólitos excretados para o meio de cultivo, quanto de amostras vivas. E os dados gerados, combinado com abordagens de informática, facilitam a caracterização destes organismos a nível molecular, resultando em inúmeros avanços na química de PN microbianos.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Neste trabalho buscou-se identificar, isolar e caracterizar compostos relacionados a atividade antimastítica empregando bioensaios de antagonismo e antibiose para triagem de actinobactérias e extratos brutos, respectivamente, utilizando técnicas em espectrometria de massas como principais ferramentas de monitoramento e caracterização estrutural.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Otimização de bioensaios de antagonismo e antibiose para avaliar a capacidade de produção de compostos com atividade antimicrobiana pelas actinobactérias estudadas;
- ❖ Realização de *screening* de atividade antimastítica de diferentes actinobactérias e seus extratos frente linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- ❖ Aplicação da estratégia de desreplicação para os extratos brutos ativos Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25;
- ❖ Estudar a regulação da produção de metabólitos secundários halogenados pela actinobactéria Caat 1-54 quando realizada fermentação com meio de cultivo suplementado com sais de bromo ou com água do mar;
- ❖ Caracterização estrutural das substâncias bioativas, presentes nos extratos brutos provenientes das actinobactérias Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25, empregando técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados

3.1. Desenvolvimento de bioensaio de antagonismo entre actinobactérias e bactérias causadoras de mastite

Para acelerar o processo de triagem de actinobactérias capazes de produzir compostos com ação antimicrobiana frente a diversas linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi aplicado um ensaio de antagonismo. Durante este trabalho 13 linhagens diferente de bactérias foram usadas como alvo biológico, sendo 6 delas linhagens isoladas de leite de vaca contaminada com mastite e 7 linhagens padrões adquiridas de coleções de cultura certificadas. As bactérias provenientes de leite contaminado serão então denominadas ao longo deste trabalho como linhagens isoladas, enquanto que as bactérias das coleções serão denominadas linhagens tipo. Na configuração do bioensaio de antagonismo (item 5.3.3, Figura 78) as linhagens isoladas foram ensaiadas em uma placa (Placa 1) e as linhagens tipo em outra placa (Placa 2).

Na primeira etapa do estudo de antagonismo frente as bactérias alvo alguns parâmetros do ensaio foram otimizados para garantir a confiabilidade dos resultados observados. Deste modo, iniciou-se uma triagem de diferentes meios de cultivo sólidos, a fim de avaliar aqueles que promoveriam o crescimento das bactérias alvo de modo satisfatório, visto que os meios de cultivo mais promissores para as actinobactérias já eram conhecidos pelo grupo de pesquisa. Assim, as bactérias foram cultivadas nos meios sólidos BDA, TSB, GYEA, MA3, ISP-2, ACA e Malte.

A partir de 1 dia de cultivo as 13 linhagens distintas de bactérias apresentaram um bom crescimento em TSBA, BDA, GYEA e ISP-2. Embora tenham demonstrado bom desenvolvimento nestes 4 meios de cultivo sólidos, as colônias cresceram mais rapidamente em TSBA, em especial a bactéria 270 (que apresentou um crescimento muito mais lento nos

demais meios quando comparada ao TSBA). A Figura 7 apresenta os resultados obtidos para as linhagens isoladas (Placa 1, Figura 78) nos meios de cultivo mais promissores.

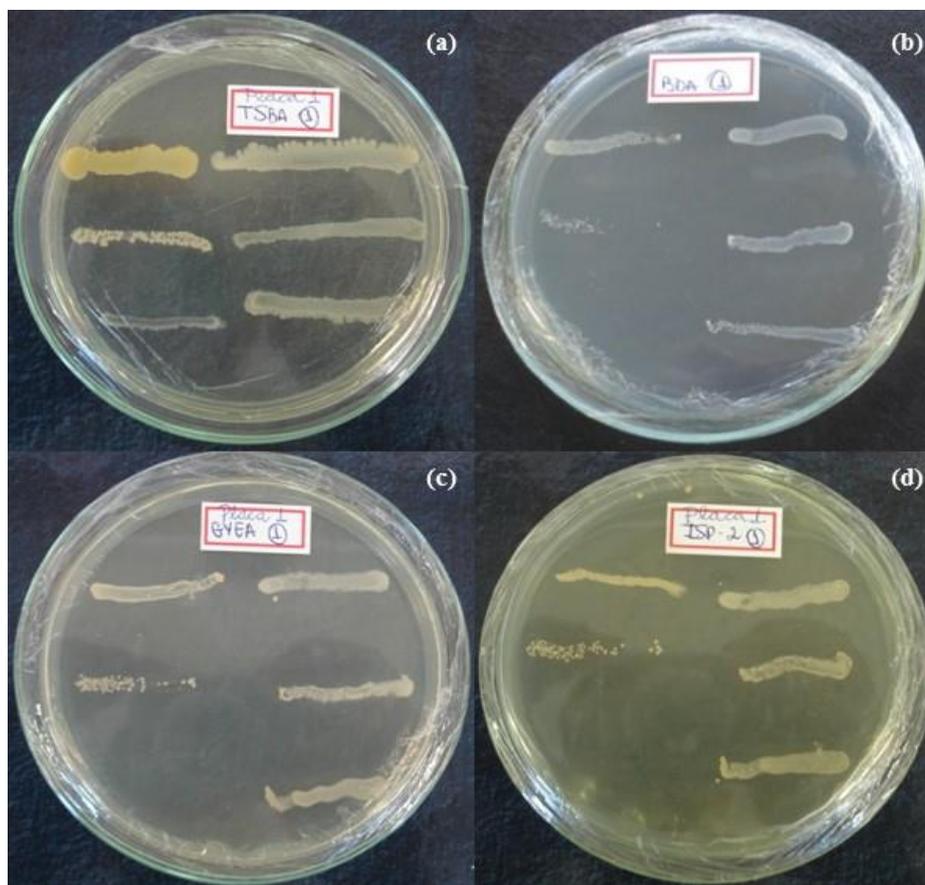


Figura 7. Colônias de bactérias da Placa 1 estriadas em (a) TSBA, (b) BDA, (c) GYEA e (d) ISP-2 após 24h de crescimento em estufa a 37°C.

Observando-se os resultados obtidos é possível concluir que o melhor meio de cultivo para o desenvolvimento bacteriano foi o meio TSBA, por se tratar de um meio rico em nutrientes capaz de promover o crescimento de diversos organismos, principalmente bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, por conter em sua composição dextrose como fonte de carbono, aminoácidos e outras fontes de nitrogênio complexas em abundância.⁷² Assim, considerando o TSBA como o melhor meio de cultivo para as bactérias alvo e BDA como um meio promissor para o cultivo de actinobactérias e apropriado para o crescimento dos

organismos teste, determinou-se que o ensaio de antagonismo seria procedido em ambos os meios.

Em uma segunda etapa foi avaliado qual o melhor período de crescimento da actinobactéria antes do estriamento das bactérias alvo nas placas de Petri. Como o crescimento das actinobactérias mostrou-se mais lento quando comparado ao das bactérias é necessário que haja um intervalo de tempo para que as actinobactérias ensaiadas possam produzir metabólitos secundários ativos e os mesmos sejam difundidos para o meio externo e possam, assim, agir como inibidores do crescimento bacteriano. Deste modo, utilizou-se a mesma actinobactéria para permitir a comparação entre a inibição do crescimento das linhagens de bactérias nos diferentes intervalos de tempo estudados. Foram monitorados os intervalos de 5, 7 e 10 dias entre o estriamento da actinobactéria e o das bactérias alvo na placa de Petri. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos para a actinobactéria AMC 23.

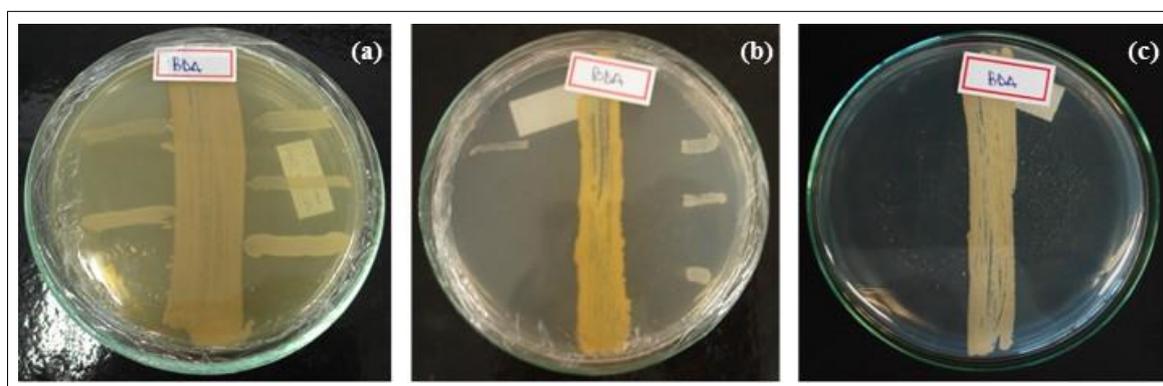


Figura 8. Bioensaio de antagonismo *in vitro* entre actinobactéria AMC 23 (centro da placa de Petri) contra bactérias causadoras de mastite (Placa 1), utilizando meio de cultivo sólido BDA. Em (a) as bactérias foram estriadas após 5 dias de crescimento da actinobactérias, enquanto em (b) o intervalo de tempo foi de 7 dias e em (c) de 10 dias.

Após o cultivo da actinobactéria AMC 23 e o estriamento das bactérias alvo notou-se que passados 5 dias de crescimento da actinobactéria não houve qualquer inibição do crescimento bacteriano. Já após 7 dias do estriamento da actinobactéria, percebeu-se a inibição do crescimento das bactérias, sendo possível ainda identificar colônias nas

proximidades da borda da placa de Petri. Porém com 10 dias de crescimento da actinobactéria, as bactérias tiveram seu crescimento totalmente inibido e, deste modo, não foi possível observar nenhuma colônia na placa de Petri.

Sendo assim, definiu-se que o intervalo de tempo apropriado entre o estriamento da actinobactéria e o inóculo das bactérias alvo nas placas era de 7 dias, o qual foi escolhido por ainda ser possível notar crescimento das colônias bacterianas, fato que deixa mais evidente a atividade biológica monitorada no ensaio. Como não houve inibição do crescimento bacteriano com 5 dias de crescimento da actinobactéria tal período foi descartado. O intervalo de 10 dias também não foi considerado promissor porque houve inibição completa do crescimento bacteriano, dificultando o monitoramento do bioensaio e a comparação da atividade antimicrobiana entre as actinobactérias estudadas. Logo, o bioensaio de antagonismo foi padronizado utilizando os meios de cultivo sólidos BDA e TSBA; e o estriamento das bactérias com 7 dias de crescimento da actinobactéria.

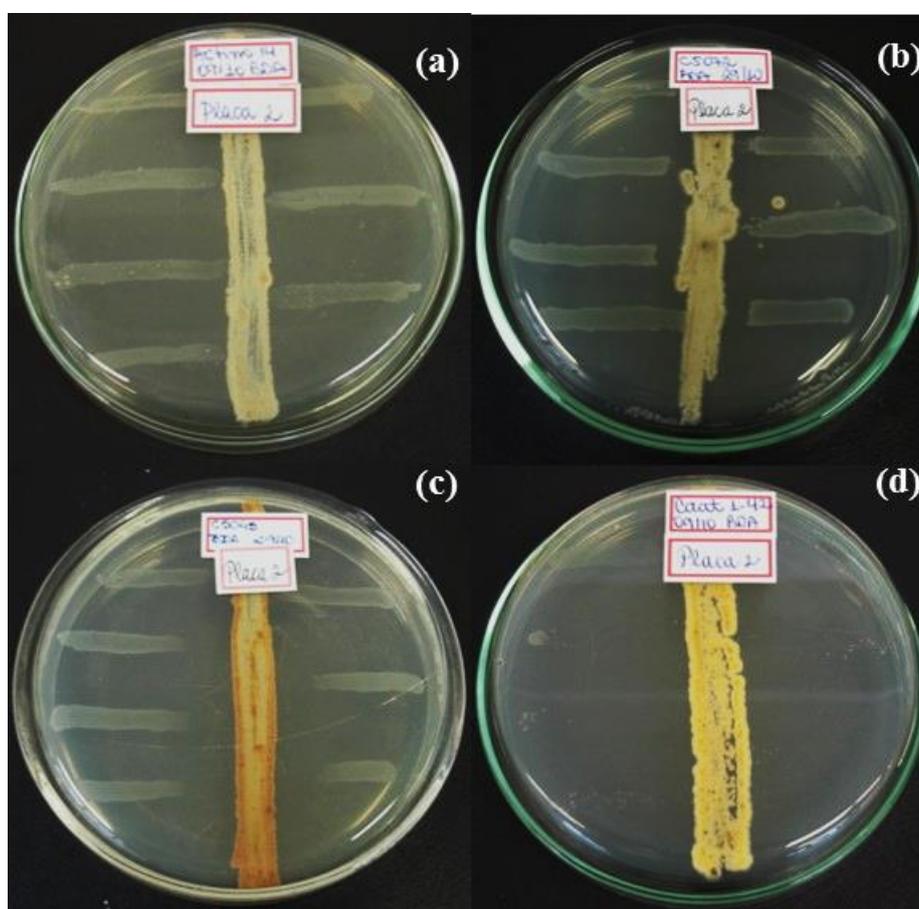
Após a padronização dos parâmetros envolvidos no bioensaio de antagonismo, 120 actinobactérias foram ensaiadas para avaliação como produtoras de compostos com atividade antimastítica. Para tal, utilizou-se como controle placas de Petri estriadas apenas com as bactérias, a fim de garantir que a inibição observada era proveniente da ação de compostos produzidos pela actinobactéria em estudo, não um problema de crescimento das colônias bacterianas.

A inibição do crescimento das bactérias pelas actinobactérias foi classificada em 4 níveis, de acordo com a Tabela 1, para facilitar a comparação da atividade inibitória em função da distância entre as colônias bactérias e a actinobactéria.

Tabela 1. Classificação da atividade biológica de acordo com a distância entre as colônias das bactérias alvo e a actinobactéria.

Classificação	Tamanho (mm)
Muito Ativo (++)	> 3,0
Ativo (+)	1,5 - 3,0
Pouco Ativo (+-)	0,5 - 1,5
Sem atividade (-)	< 0,5

A Figura 9 ilustra alguns dos resultados obtidos, mostrando os diferentes níveis de inibição do crescimento bacteriano observados

**Figura 9.** Bioensaio de antagonismo contra as linhagens tipo (Placa 2) em meio sólido BDA. Em (a) actinobactéria Actino-14 que não apresentou atividade, em (b) a actinobactéria CS072 que foi pouco ativa, em (c) a actinobactéria CS045 considerada como ativa e em (d) a actinobactéria Caat 1-42 como representante do grupo muito ativo.

Os resultados obtidos para o bioensaio das 120 actinobactérias nos meios BDA e TSBA estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio de antagonismo para as diferentes actinobactérias em meio BDA e TSBA.

Actinobactéria	BDA	TSBA	Actinobactéria	BDA	TSBA	Actinobactéria	BDA	TSBA
2C7-1	-	-	Caat 4-46	-	-	CS070	+-	+
2C7-11	-	-	Caat 4-53	+-	-	CS072	+-	-
2C7-12	-	-	Caat 4-54	-	-	CS075	-	-
2C7-15	-	-	Caat 4-55	+-	-	CS076	-	-
2C7-16	-	-	Caat 5-29	+-	-	CS091	++	-
2C7-2	-	-	Caat 5-38	-	-	CS098	-	-
2C7-5	-	-	Caat 5-3b	-	-	Eucal 24	+-	-
2C7-8	-	-	Caat 5-50	+	-	Eucal 26	++	-
2C7-9	-	-	Caat 5-7	+-	-	Eucal 30	+	-
Actino 14	-	+-	Caat 6-11	+	-	Eucal 48	+-	-
AMC 23	+	-	Caat 6-3	+-	-	IR006	-	-
AMC 39	+-	+-	Caat 7-60	-	-	IR036	-	-
Caat 1-34	+	-	Caat 7-48	+	-	P1-3-1	+-	-
Caat 1-35	-	-	Caat 8-20	+	-	P1-3-4	+-	-
Caat 1-37	+	-	Caat 8-23	-	-	P1-3-11	+-	-
Caat 1-42	++	-	Caat 8-3	+-	-	P1-3-5	+-	-
Caat 1-47	+-	-	Caat 8-45	-	-	P1-4-1	+-	-
Caat 1-50	++	-	Caat 8-6	+-	-	P1-4-2	+-	-
Caat 1-54	++	+-	Caat P5-8	+	-	P1-4-3	+-	-
Caat 1-56	-	-	Caat P5-14	+	-	P2-3Y-1	+	-
Caat 2-21	+-	-	Caat P5-21	+-	-	P4-4-2	+-	-
Caat 2-35	++	+-	Caat P5-30	-	-	P5-3-1	+-	-
Caat 2-37	-	-	Caat P5-104	-	-	P5-3-3	+-	-
Caat 2-38	-	-	Canv 1-32F	-	-	SB001	-	-
Caat 2-41	+-	-	Canv 3-27F	-	-	SB003	-	-
Caat 2-43	++	-	CS004	-	-	SB005	-	-
Caat 2-47	++	-	CS008	-	-	SB019	-	-
Caat 2-48	-	-	CS011	-	-	SB028	-	-
Caat 2-49	+-	-	CS013	-	-	SB034	-	-
Caat 2-54	-	-	CS019	-	-	SB035	-	-
Caat 2-56	+-	-	CS022	-	-	SB037	-	-
Caat 2-58	+-	-	CS029	-	-	SB041	-	-
Caat 2-61	++	-	CS041	++	-	SB042	-	-
Caat 2-62	+	-	CS044	-	-	SB043	+-	-
Caat 2-63	++	+	CS045	+	-	SB044	-	-
Caat 2-74	-	-	CS059	-	-	SB047	-	-
Caat 2-97	++	-	CS060	-	-	SB054	++	-
Caat 3-48+	+-	-	CS060	-	-	SB062	-	-
Caat 3-55	++	-	CS066	-	-	SB086	+-	-
Caat 4-44+	-	-	CS068	-	-	SB089	-	-

É importante ressaltar que o meio BDA levou a identificação de uma quantidade maior de actinobactérias produtoras de compostos com ação antimicrobiana quando comparado ao ensaio em meio TSBA, como demonstra o exemplo da actinobactéria Caat 1-37 na Figura 10.

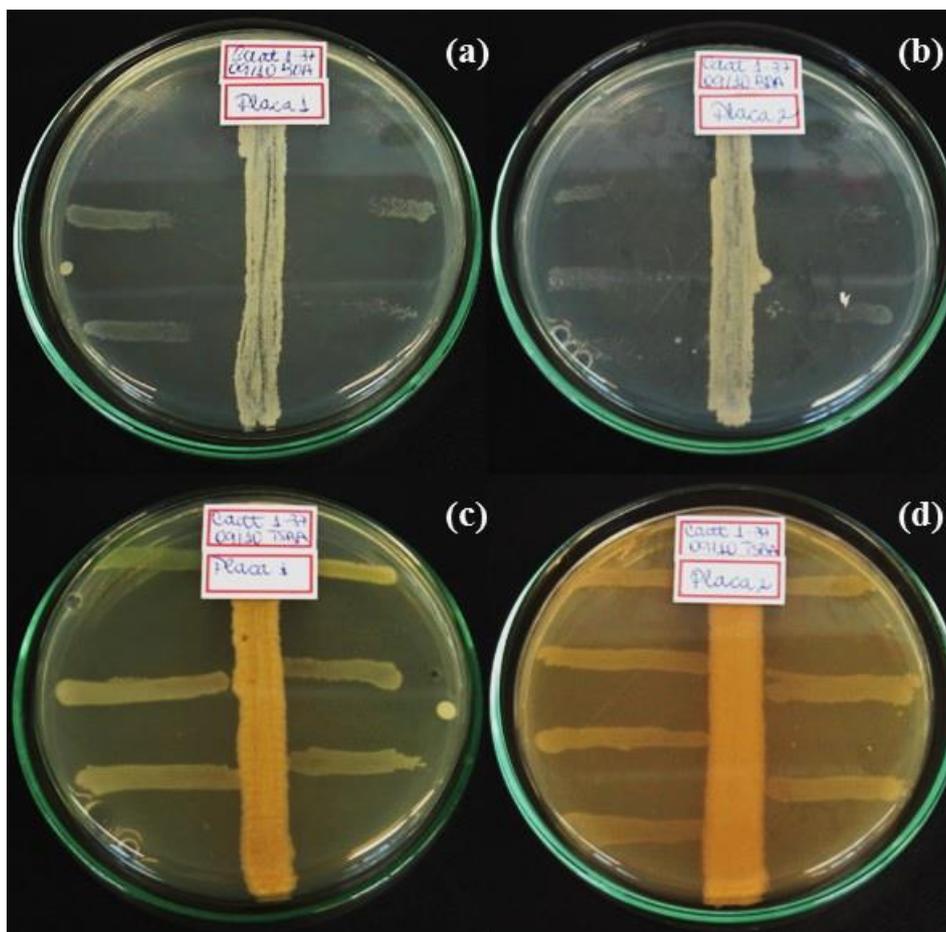


Figura 10. Bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 1-37, que se mostrou (a, b) ativa em meio BDA (c, d) e sem atividade biológica em meio TSBA.

Entretanto, algumas actinobactérias foram ativas somente em meio TSBA, como foi o caso da actinobactéria Actino-14 contra as linhagens tipo empregadas no bioensaio, representada na Figura 11.

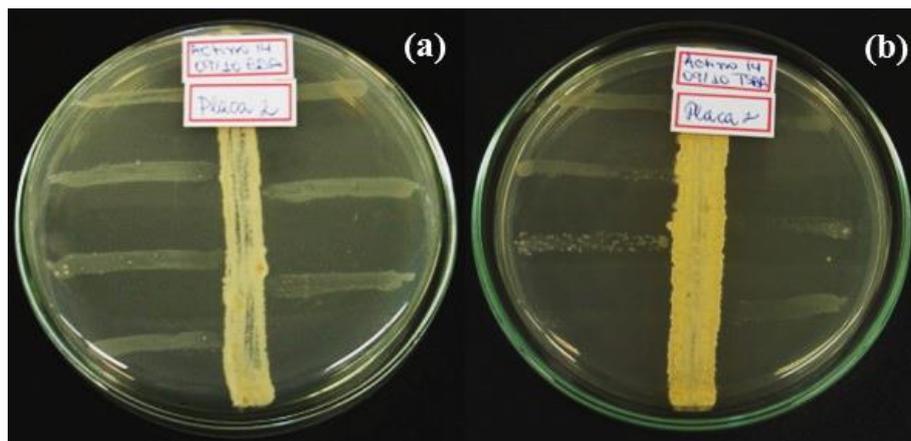


Figura 11. Bioensaio de antagonismo (Placa 2) da actinobactéria Actino-14, no qual é possível observar diferentes respostas biológicas para o ensaio dos mesmos micro-organismos empregando (a) meio BDA e (b) meio TSBA.

A partir dos resultados alcançados foi possível evidenciar a importância na escolha do meio de cultivo, pois a composição nutricional particular de cada um desses meios pode influenciar na produção de metabólitos secundários bioativos pelas actinobactérias. Sendo assim, um mesmo micro-organismo pode produzir diferentes compostos, como atividade biológica ou não, quando cultivados em meios de cultivo distintos.⁷³

A biossíntese de muitos metabólitos secundários é frequentemente iniciada quando a célula detecta uma condição estressante de esgotamento de nutrientes (por exemplo, glicose, nitrogênio ou fosfato) no ambiente extracelular, ou quando moléculas de sinalização específicas (como as γ -butirolactonas) são observadas.⁷⁴ De tal modo, diversas fontes de carbono e nitrogênio podem ser metabolizadas pelos micro-organismos para a produção de inúmeros metabólitos secundários distintos, entretanto em alguns casos a síntese de enzimas pode ser reprimida até que os metabólitos primários sejam consumidos, de acordo com a composição nutricional fornecida para o processo fermentativo. Deste modo, muitas vias metabólicas secundárias podem ser inibidas por fontes de carbono e nitrogênio que são favoráveis apenas ao crescimento do micro-organismo.⁷⁵

Não só as fontes de carbono e nitrogênio são importantes para definir as rotas metabólicas ativas, mas também micronutrientes tais como metais, que atuam como cofatores

ou inibidores enzimáticos.⁷⁶ As fontes de fosfato também podem facilmente reprimir vias biossintéticas de acordo com a concentração empregada, pois podem favorecer apenas o crescimento, diminuindo a produção de metabólitos secundários bioativos.⁷⁷

Ainda quanto aos resultados para o ensaio de antagonismo, foi observado que dentre as 13 bactérias alvo, as linhagens tipo (Placa 2) mostraram menor sensibilidade aos compostos bioativos produzidos pelas actinobactérias, pois foram menos inibidas que as bactérias isoladas do leite (Placa 1), como ilustrado na Figura 12. Para o grupo de linhagens isoladas de leite de vacas infectadas, as bactérias *Staphylococcus aureus* 211, 212 e 213 se mostraram mais sensíveis ao estudo realizado, demonstrando maior inibição do crescimento das colônias.

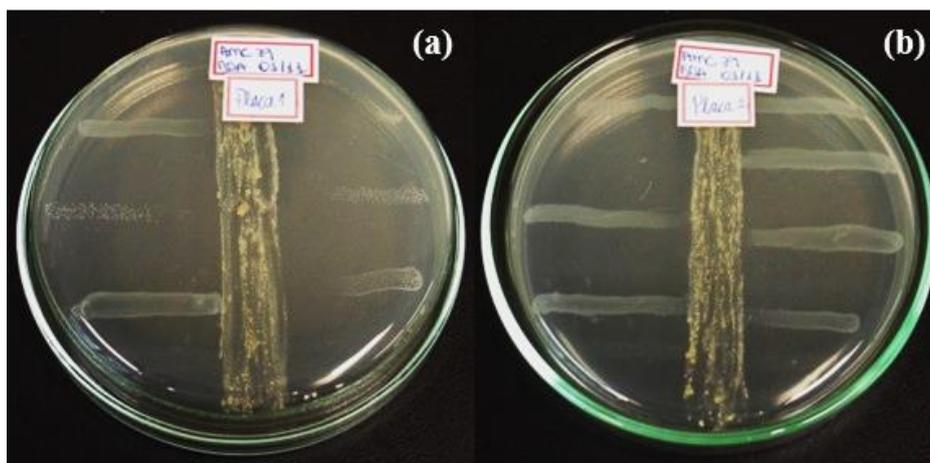


Figura 12. Comparação do potencial antimicrobiano da actinobactéria AMC 39 em meio BDA frente às bactérias da (a) Placa 1 e (b) Placa 2, ilustrando maior resistência das bactérias da Placa 2 aos compostos ativos.

O grupo de actinobactérias consideradas muito ativas (como classificado na Tabela 1) foi responsável pela inibição completa do crescimento das bactérias alvo, de forma que nenhuma colônia fosse observada nas placas de Petri contendo a actinobactérias, enquanto que nas placas controle (sem a actinobactéria) o crescimento das bactérias foi normal. Sendo assim, considerou-se que a inibição pudesse ter ocorrido de duas formas distintas: difusão de metabólitos secundários bioativos pelo meio de cultura sólido ou difusão de compostos orgânicos voláteis no interior da placa. Então, para confirmar qual destes mecanismo atuava

nestes casos, foi realizado um experimento no qual estas actinobactérias foram cultivadas em placas contendo uma barreira física entre os micro-organismos (item 5.3.4, Figura 79), como apresentado na Figura 13.

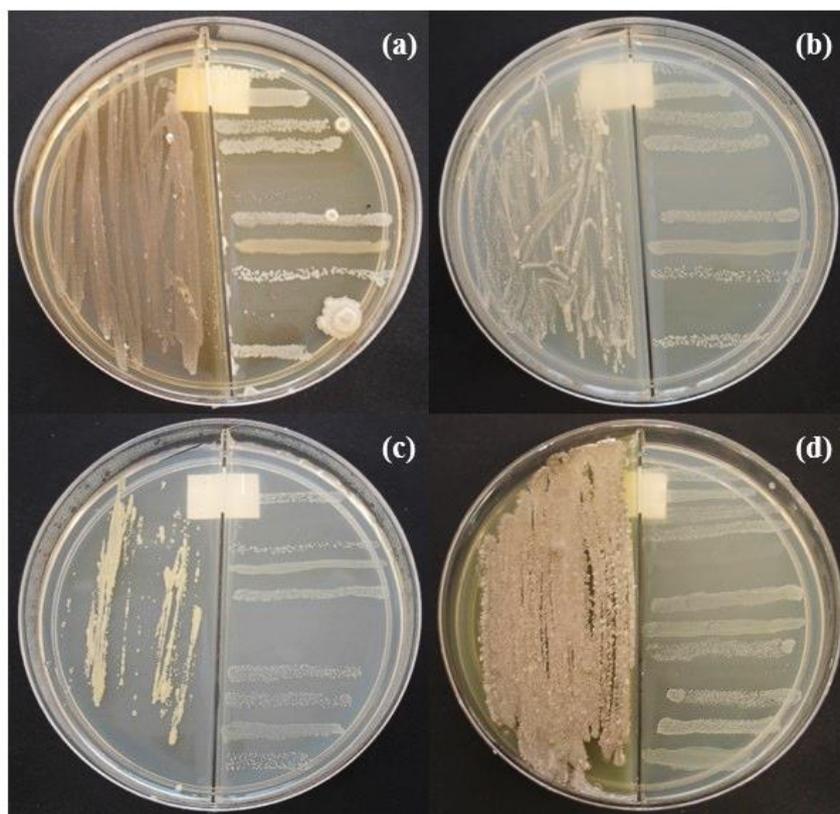


Figura 13. Resultados obtidos no bioensaio de antagonismo mediado por VOCs produzidos pelas actinobactérias (a) SB054, (b) SB035, (c) CS091 e (d) Caat 1-42.

A presença de uma barreira que separa as actinobactérias e as bactérias garante que não haja difusão de metabólitos entre dois organismos na mesma placa de Petri, exceto via aérea. Assim, se houvesse inibição do crescimento das colônias bacterianas, tal fato só poderia ser resultante da ação de VOCs produzidos pelas actinobactérias testadas. Entretanto, foi observado o crescimento normal de todas as bactérias (Figura 13). Desta forma, conclui-se que a completa inibição observada para as bactérias (como por exemplo a Figura 8d), nos ensaios de antagonismo, foi resultante da atividade de compostos secretados para o meio de cultivo e não de metabólitos voláteis.

Em resumo, através do ensaio de antagonismo frente bactérias causadoras de mastite 55% das actinobactérias foram consideradas como capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana, que foram secretados para o meio de cultivo sólido e, desta maneira, inibiram o crescimento das colônias bacterianas. As actinobactérias consideradas ativas foram listadas na Tabela 3.

Tabela 3. Actinobactérias consideradas mais promissoras no bioensaio de antagonismo contra bactérias envolvidas na mastite.

AMC 23	Caat 2-43	Caat 3-55	CS041
Caat 1-37	Caat 2-47	Caat 5-50	CS091
Caat 1-42	Caat 2-61	Caat 7-48	Eucal 26
Caat 1-50	Caat 2-62	Caat 8-20	Eucal 30
Caat 1-54	Caat 2-63	Caat P5-8	P2-3Y-1
Caat 2-35	Caat 2-97	Caat P5-14	SB054

3.2. Desenvolvimento de bioensaio de antibiose para avaliação dos extratos brutos produzidos por actinobactérias frente a bactérias causadoras de mastite

Para avaliar a atividade antimastítica dos extratos brutos (obtidos conforme descrito no item 5.3.5), ensaios de antibiose foram avaliados. Inicialmente, optou-se por testar o ensaio de bioautografia direta, no qual os extratos brutos são adicionados diretamente em placas contendo uma suspensão das bactérias alvo. Neste experimento foi avaliada a atividade antibiótica dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio líquido BD pela actinobactérias AMC 23, Caat 6-3 e Eucal 26, os quais já haviam sido estudados previamente em outros trabalhos do grupo de pesquisa que confirmaram sua atividade antimicrobiana.^{78,79}

Como resultado foi possível observar halos de inibição de crescimento das bactérias *Escherichia coli* K12 e *Staphylococcus aureus* 211 para todos os extratos brutos, bem como para o controle negativo (contendo apenas DMSO). Deste modo, a atividade biológica observada não pode ser atribuída única e exclusivamente ao extrato bruto. A Figura 14

apresenta os resultados obtidos para o ensaio de bioautografia direta empregando DMSO como solvente frente a bactéria *Staphylococcus aureus* 211.

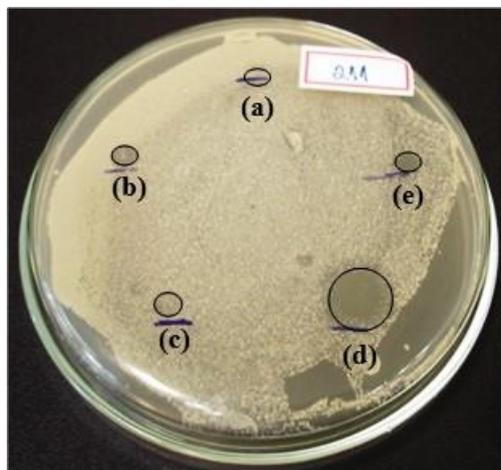


Figura 14. Resultados obtidos no ensaio de bioautografia direta contra *Staphylococcus aureus* 211 para (a) DMSO, (b) AMC 23, (c) Caat 6-3, (d) Eucal 26 e (e) controle positivo DMSO.

Como DMSO mostrou-se tóxico para algumas das linhagens bacterianas empregadas no bioensaio, outros solvente capazes de solubilizar os extratos brutos foram avaliados, sendo eles: metanol, etanol, acetona, *N,N*-dimetilacetamida, formamida, *N,N*-dimetilformamida. Os solventes foram então aplicados em placa de Petri incubada com as bactérias alvo, as quais se mostraram sensíveis ao DMSO. A Figura 15 apresenta parte dos resultados obtidos.

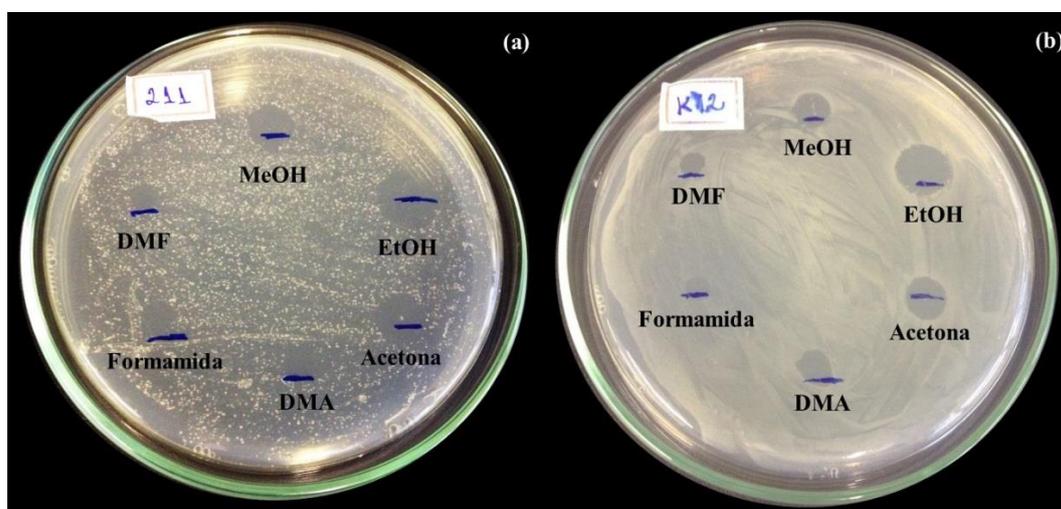


Figura 15. Avaliação da toxicidade dos solventes triados para realização de bioautografia direta frente a (a) *Staphylococcus aureus* 211 e (b) *Escherichia coli* K12.

Como pode ser observado na Figura 15, todos os solventes estudados promoveram inibição do crescimento bacteriano, impossibilitando sua utilização no bioensaio. Sendo assim, optou-se por empregar o ensaio de disco-difusão para eliminar a interferência do solvente na triagem dos extratos brutos.

Para o ensaio de disco-difusão alguns parâmetros foram otimizados, tais como volume de meio de cultivo usado no preparo das placas, intervalo de tempo entre a inserção dos discos no ágar e o plaqueamento das bactérias, bem como as concentrações dos extratos avaliados e do controle positivo (tetraciclina).

Na primeira etapa, foi estudada a concentração a ser empregada de tetraciclina, escolhida como controle positivo. Foram ensaiados discos impregnados com 5,0; 2,5; 1,2; 0,6 e 0,3 μg de tetraciclina contra todas as linhagens alvo. Parte dos resultados foi apresentado na Figura 16.

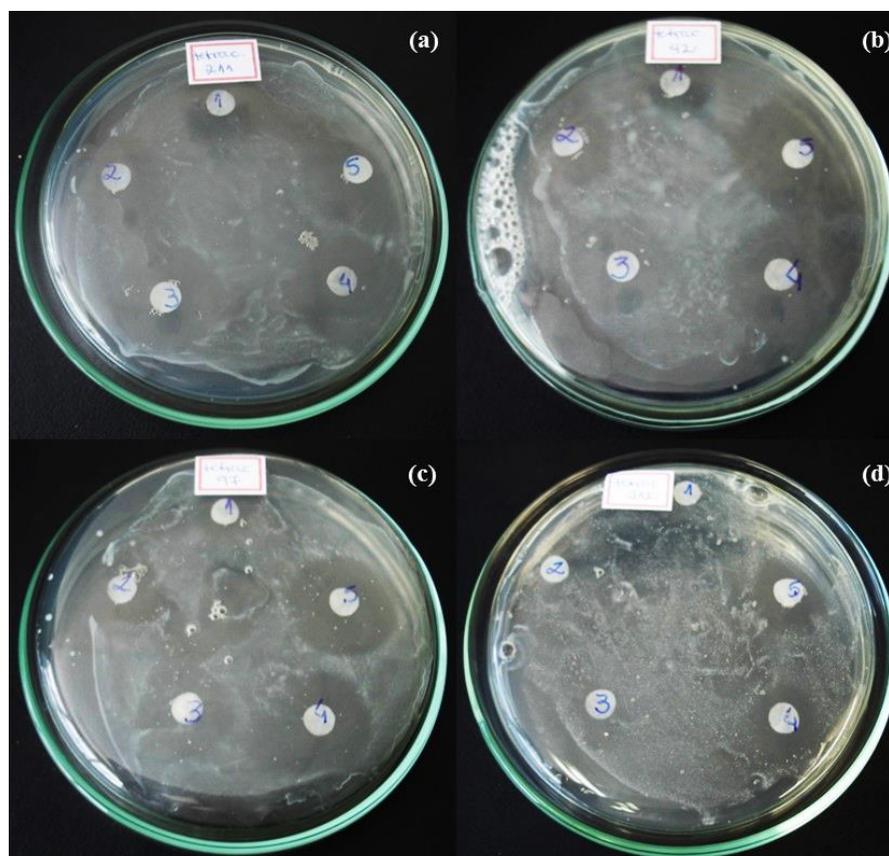


Figura 16. Bioensaio de disco-difusão empregando diferentes concentrações de tetraciclina frente as bactérias (a) *Staphylococcus aureus* 211, (b) SCN, (c) *Streptococcus agalactiae* e (d) *Staphylococcus aureus* 212.

As concentrações mais altas ensaiadas foram ativas contra a maioria das bactérias. Deste modo, foi determinado que o controle com tetraciclina seria de 5 µg, uma vez que algumas bactérias não apresentaram halos de inibição superiores ao diâmetro do disco de papel nas concentrações mais baixas frente a algumas linhagens de bactérias.

Em sequência, a quantidade de meio sólido BDA na placa foi avaliada. Foram testados 8 e 12 mL de meio por placa. Escolheu-se utilizar 12 mL, uma vez que não houve diferença significativa nos halos de inibição, mas com o volume maior a cobertura de meio sobre os discos foi mais uniforme, além de que o meio não apresentou nenhum ressecamento após o período do bioensaio.

O tempo entre a inserção dos discos no meio de cultivo e o plaqueamento das bactérias também foi estudado. Avaliou-se o inóculo das bactérias imediatamente e decorridas 24h da solidificação meio de cultivo após inserção dos disco nas placas. Observou-se que o plaqueamento imediato da bactéria não era eficiente, pois a formação dos halos de inibição foi prejudicada. Entretanto, com o intervalo de 24 h, halos maiores e mais fáceis de serem visualizados foram formados, como mostra a Figura 17.

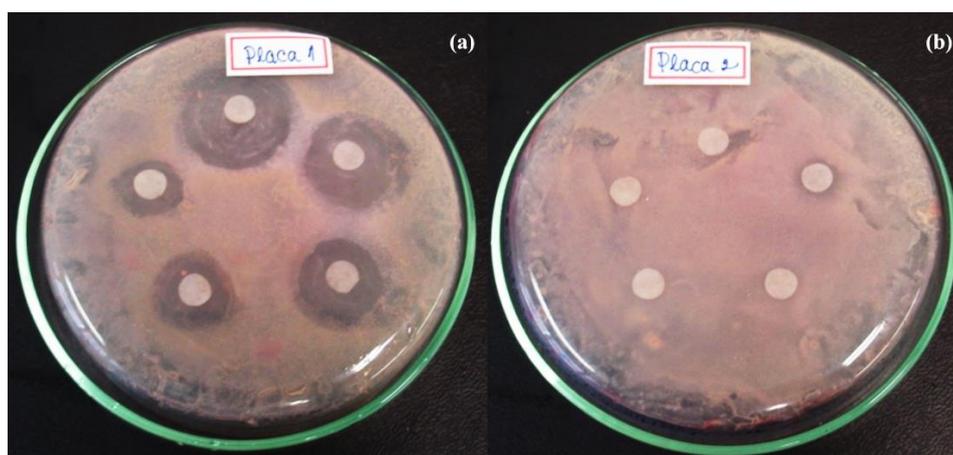


Figura 17. Bioensaio de disco-difusão com diferentes concentrações de tetraciclina frente a bactéria *Staphylococcus aureus* 211. A bactéria foi plaqueada (a) após 24 h a inserção dos discos e (b) logo em seguida a solidificação do meio de cultivo.

Para finalizar a otimização do bioensaio, a concentração de extrato bruto a ser utilizada foi avaliada. Para isto, diluições dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio BD pelas actinobactérias AMC 23, Caat 6-3 e Eucal 26 foram realizadas e os discos de papel de filtro foram impregnados com 50, 25, 12, 6 e 3 μg de cada um deles. A Figura 18 ilustra os halos de inibição para linhagens de *Staphylococcus aureus*.

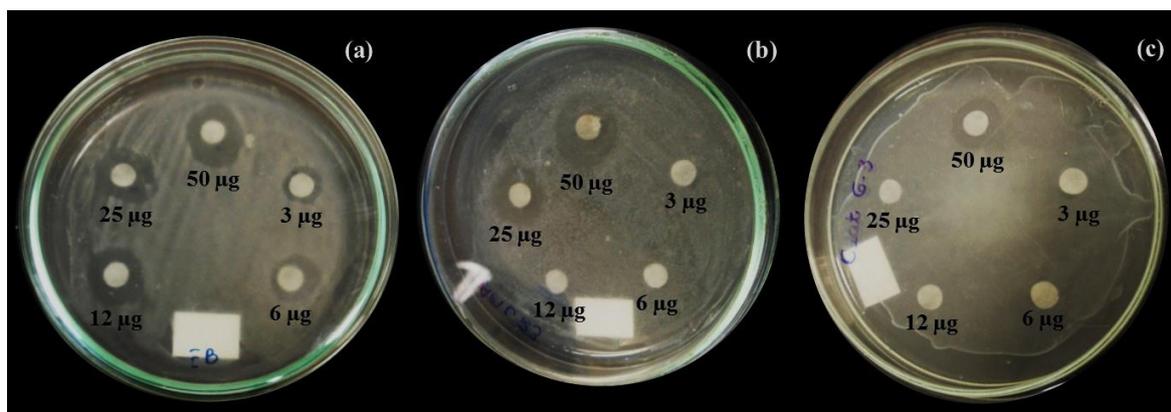


Figura 18. Bioensaio de disco difusão para determinação da concentração ideal de extrato bruto. Em (a) diluições do extrato Eucal 26 contra *Staphylococcus aureus* 211, em (b) diluições do extrato AMC 23 contra *Staphylococcus aureus* 212 e em (c) extrato Caat 6-3 contra SCN.

Os extratos brutos apresentaram respostas biológicas variadas, mas foi possível notar que as concentrações mais altas foram responsáveis pela formação de halos de inibição de diâmetro adequado. Sendo assim, utilizar a concentração de 50 μg de extratos brutos permitiria que um maior número de extratos ativos pudesse ser identificado. Isto acontece porque cada espécie de actinobactéria apresenta características únicas e, por consequência, algumas delas são capazes de produzir apenas um determinado metabólito, enquanto outras podem sintetizar uma gama de compostos das mais variadas classes químicas. Logo, os extratos brutos podem apresentar concentrações diferentes do metabólito ativo, isto é, alguns extratos podem conter maior quantidade do composto bioativo em detrimento a outros.^{80,81}

Diante de todas as informações coletadas, o bioensaio de disco-difusão foi padronizado utilizando discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro, 12 mL de meio BDA, 5 μg de

tetraciclina como controle positivo, 50 µg de extrato bruto e plaqueamento das bactérias alvo após 24 h da inserção dos discos nas placas de Petri.

Através deste ensaio, os extratos brutos puderam ser avaliados quanto a sua ação antimicrobiana frente as 13 linhagens de bactérias alvo, sendo classificados em 4 níveis de resposta, como indicado na Tabela 4.

Tabela 4. Classificação da atividade biológica de acordo com diâmetro dos halos de inibição do crescimento das colônias das bactérias alvo.

Classificação	Tamanho (cm)
Muito Ativo (++)	> 2,0
Ativo (+)	2,0 - 1,0
Pouco Ativo (+-)	1,0 - 0,6
Sem atividade (-)	< 0,6

Tais níveis de inibição podem ser observados na Figura 19.

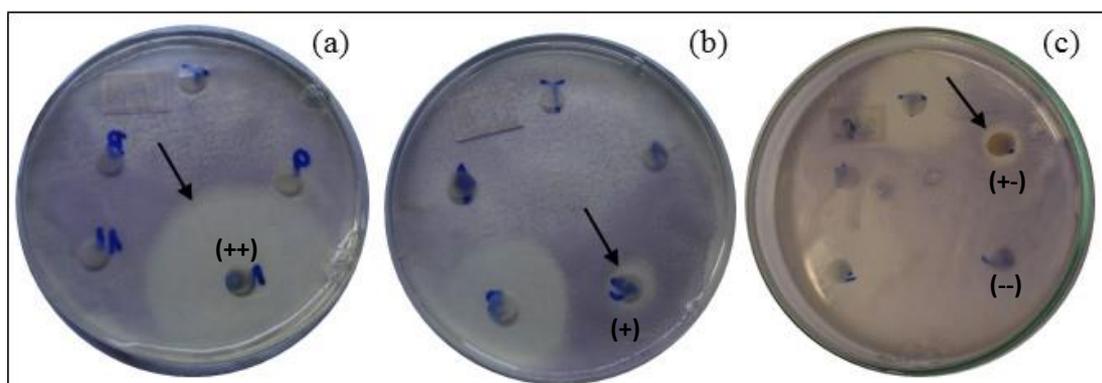


Figura 19. Bioensaio de disco difusão indicando os níveis de atividade antimicrobiana. Em (a) o extrato bruto Caat 5-29, considerado muito ativo, em (b) o extrato ativo Caat 1-42, em (c) o extrato pouco ativo Caat 8-18.

Assim, 70 extratos brutos foram triados empregando esta metodologia e a Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para cada um deles.

Dentre os 70 extratos brutos ensaiados 60% foram considerados ativos, sendo alguns deles ativos contra várias linhagens distintas e outros, mostrando especificidade para uma ou outra espécie bacteriana. De maneira geral, os extratos brutos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, com exceção do extrato bruto Caat 8-25, que mostrou halos de inibição com diâmetro acima de 2 cm para as bactérias Gram-negativas teste, além do mesmo também inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como mostra a Figura 78. Deste modo, o extrato Caat 8-25 foi considerado um extrato muito ativo, de acordo com o tamanho do halo de inibição observado e a definição estabelecida na Tabela 4.

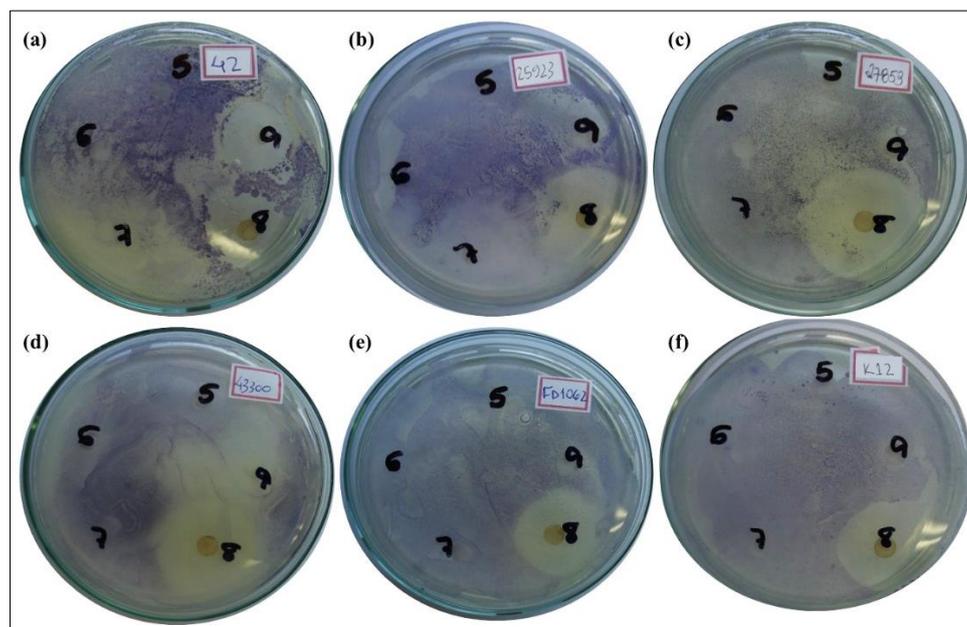


Figura 20. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25 contra as bactérias: (a) SCN, (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, (c) *Pseudomonas aeruginosa*, (d) *Staphylococcus aureus* ATCC 43.300, (e) *Escherichia coli* FD 1062 e (f) *Escherichia coli* K 12.

Outro extrato bruto bastante promissor foi produzido pela actinobactéria Caat 1-54, ativo contra as linhagens de bactérias Gram-positivas. Os halos de inibição observados foram os maiores dentre todos os extratos avaliados no ensaio de disco-difusão. A Figura 21 mostra os resultados obtidos.

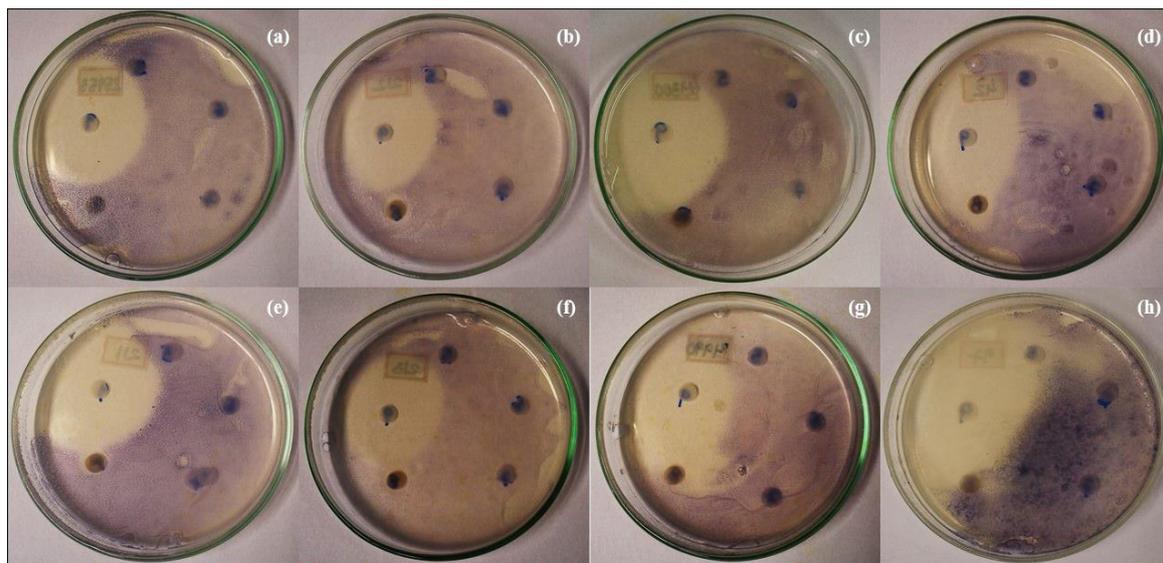


Figura 21. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 1-54 contra as bactérias: (a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, (b) *Staphylococcus aureus* 212, (c) *Staphylococcus aureus* ATCC 43.300, (d) SCN, (e) *Staphylococcus aureus* 211, (f) *Staphylococcus aureus* 213, (g) *Staphylococcus epidermis* e (h) *Streptococcus agalictae*.

A atividade do extrato bruto Caat 2-63 também foi muito pronunciada, com halos de inibição de diâmetro acima de 2,0 cm. Assim, este extrato também foi considerado muito ativo de acordo com o diâmetro dos halos observados no ensaio. A Figura 22 apresenta os resultados obtidos.

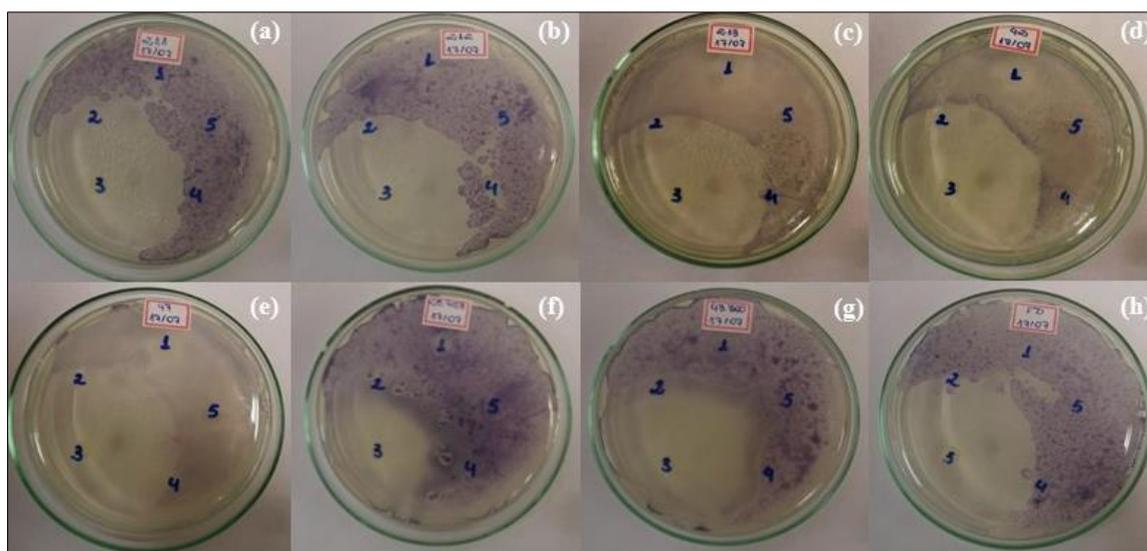


Figura 22. Bioensaio de disco difusão para o extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63 contra as bactérias: (a) *Staphylococcus aureus* 211, (b) *Staphylococcus aureus* 212, (c) *Staphylococcus aureus* 213, (d) SCN (e) *Streptococcus agalictae*, (f) *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, (g) *Staphylococcus aureus* ATCC 43.300 e (h) *Escherichia coli* FD 1062.

Conforme nota-se nos resultados apresentados, o ensaio de disco-difusão foi eficiente para triar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos. Contudo, nem sempre os extratos brutos provenientes de actinobactérias ativas no ensaio de disco-difusão mostraram atividade biológica, como a exemplo das actinobactérias Eucal 30, CS072 e AMC 39. Também ocorreu que algumas actinobactérias consideradas muito ativas (Tabela 1) no ensaio de antagonismo mostram discreta atividade para seus extratos brutos (diâmetro do halo de inibição próximos ao do disco de papel, 6 mm), como foi o caso das actinobactérias AMC 23 e Caat 6-3. Essas diferenças de atividade antimicrobiana entre os ensaios podem ser explicadas pela diferença na forma de cultivo das actinobactérias em cada um deles. No ensaio de antagonismo, os micro-organismos são cultivados em meio sólido por 7 dias, enquanto que para a obtenção dos extratos brutos foram realizadas fermentações em meio líquido sob agitação durante 10 dias.

A fermentação em fase sólida é um bioprocessamento que não precisa de um excesso de água livre e apresenta aeração completamente diferente de cultivos líquidos. Além disso, mudanças no processo de fermentação são fundamentais para estimular ou inibir a produção de um composto específico, podendo ocorrer perfis químicos completamente distintos.⁸² Tais considerações aliadas ao fato de que parâmetros como agitação e composição do meio de cultivo são fatores críticos na produção de metabólitos secundários em micro-organismo, a metodologia escolhida para os bioensaios de triagem das actinobactérias pode levar a diferentes resultados, uma vez que a mudança de cultivo em meio sólido para meio líquido pode influenciar não somente nas proporções entre os compostos produzidos, como também nas classes químicas biossintetizadas.

Outro fator que deve ser considerado para explicar a diferença de atividade encontrada pelos ensaios é a eficiência do procedimento de extração dos compostos ativos do meio de

cultivo líquido. No ensaio de antagonismo as bactérias alvo foram cultivadas sobre o mesmo meio de cultivo que a actinobactéria, ficando expostas a todos os metabólitos difundidos no meio sólido. Já no ensaio de disco-difusão as bactérias foram testadas frente a extratos brutos, provenientes de um processo de extração líquido-líquido. Se o procedimento não for efetivo para extrair todos os compostos ativos produzidos pela actinobactéria, o extrato bruto não apresentará atividade biológica, mesmo que o micro-organismo tenha produzidos compostos com atividade antimicrobiana.

3.3. Estudo do perfil metabólico de extratos brutos produzidos por actinobactérias

Os extratos brutos gerados para realização do ensaio de disco-difusão foram analisados quanto ao perfil metabólico produzido empregando a MS, evidenciando o potencial das actinobactérias, cuja biossíntese de compostos pode levar aos mais variados conjuntos de moléculas. Isto confirma a capacidade de tais micro-organismos como fonte de prospecção de compostos com distintas aplicações, uma vez que uma vasta diversidade de estruturas químicas pode ser encontrada nas misturas complexas que geralmente constituem os extratos brutos gerados.

Nesta etapa do estudo, os extratos brutos solubilizados em metanol foram analisados por DI-PDA-MS (conforme descrito no item 5.2) e a Figura 23 apresenta parte dos resultados obtidos.

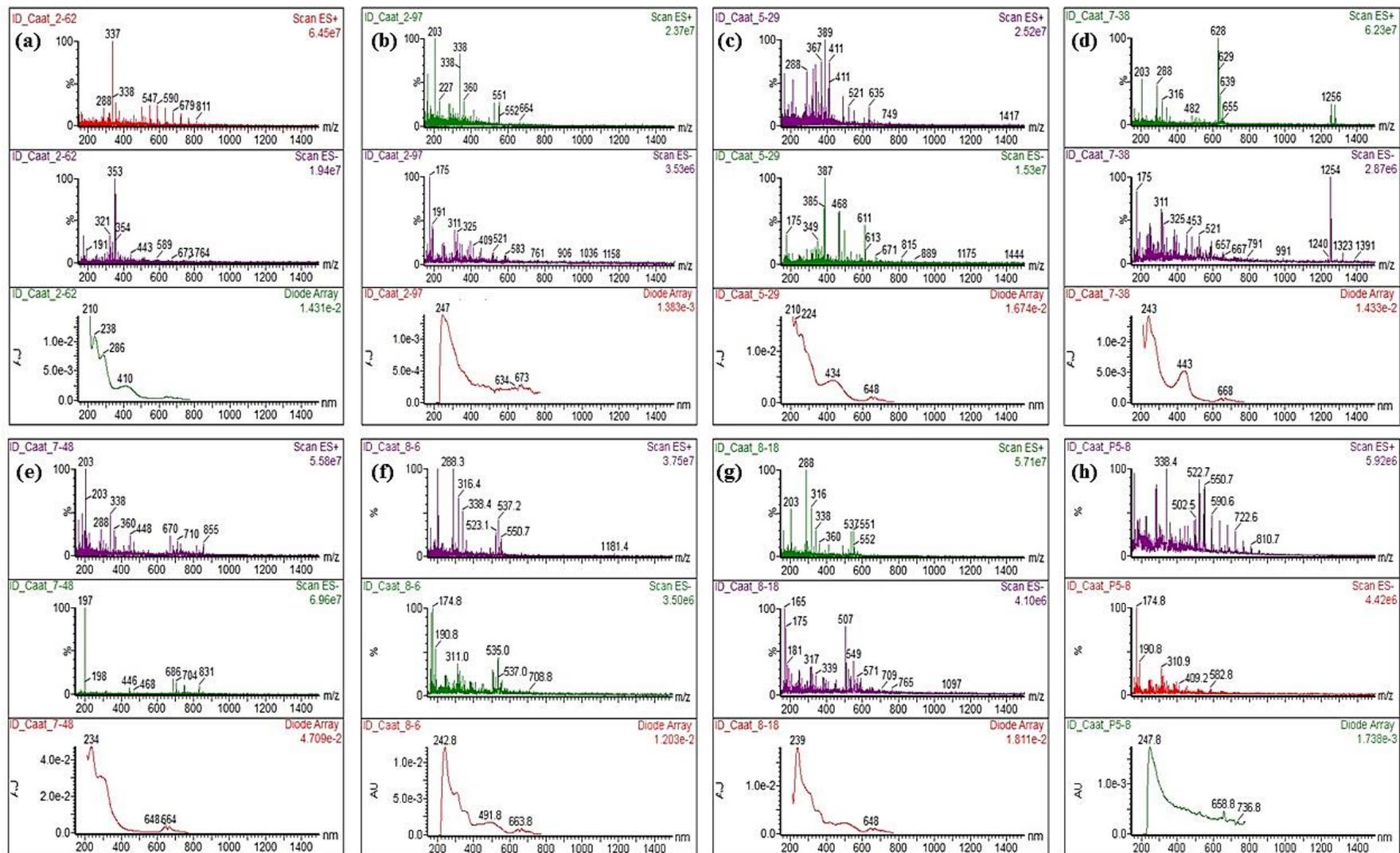


Figura 23. Espectros de DI-PDA-MS dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio BD pelas actinobactérias (a) Caat 2-62, (b) Caat 2-97, (c) Caat 5-29, (d) Caat 7-38, (e) Caat 7-48, (f) Caat 8-6, (g) Caat 8-18 e (h) Caat P5-8. Acima o espectro de MS em modo positivo, seguido da análise em modo negativo e abaixo o espectro de absorção UV-Vís.

A grande maioria dos espectros de MS obtidos apresentam uma grande diversidade de sinais, que muitas vezes representam as diversas moléculas que constituem o extrato bruto. Entretanto, algumas actinobactérias apresentaram a capacidade de produzir apenas um composto, como pode ser observado na Figura 23d, na qual os sinais presentes no espectro são referentes apenas a um único composto. Na análise em modo positivo é possível observar o as espécies, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ referentes aos valores de m/z 1256, 1278 e 628, respectivamente. Em modo negativo o sinal de m/z 1254 é relativo a espécie desprotonada $[M-H]^-$. No espectro de PDA observa-se que os picos de absorção encontram-se na regiões de 243, 443 e 668 nm.

A partir da análise cuidadosa dos dados obtido, acompanhada de dados de espectrometria de massas sequencial e busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products*, o grupo de pesquisa realizou a desreplicação de parte extratos brutos, permitindo a identificação de algumas moléculas com diferentes atividades biológicas.

Para os extratos Caat 8-6 e 8-18 foram encontradas algumas rubromicinas e, para o extrato Caat 5-29, foi possível observar a presença de uma angluciclina inédita (Figura 24). Já o extrato Caat 7-38 apresenta apenas actinomicina D (Figura 57).⁸³

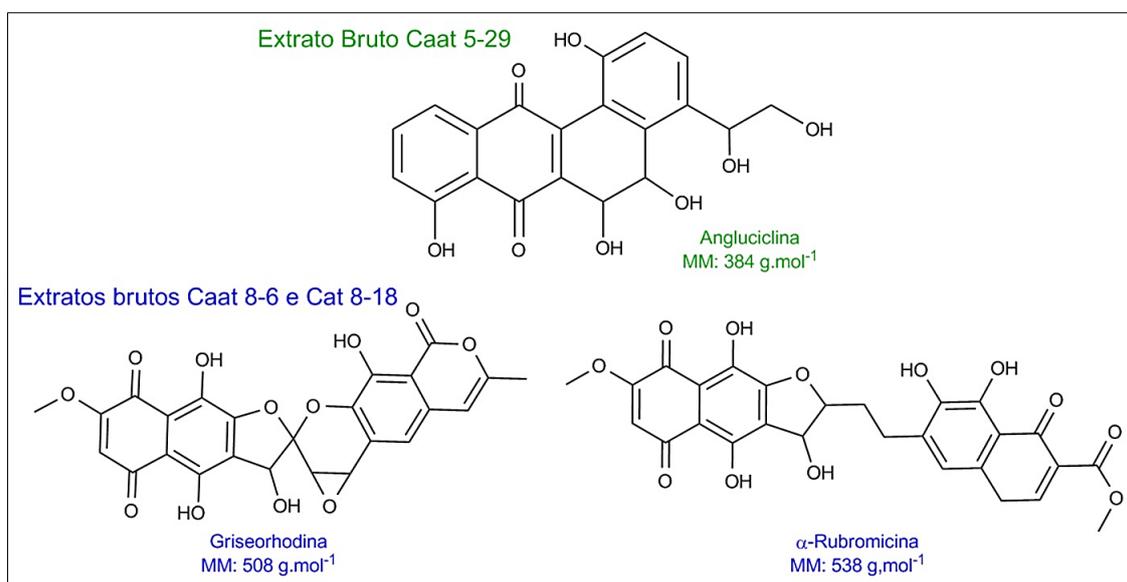


Figura 24. Estrutura química dos compostos identificados nos extratos brutos Caat 5-29, Caat 8-6 e Caat 8-18.

3.4. Desrepliação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 1-54

Dentre as actinobactérias estudadas nesta tese a actinobactéria Caat 1-54 foi aquela que apresentou o maior halo de inibição no ensaio de disco-difusão (principalmente frente as linhagens Gram-positivas), como ilustrado na Figura 21. Além disso, este micro-organismo mostrou excelente atividade antimicrobiana no bioensaio de antagonismo, inibindo completamente o crescimento das 13 linhagens de bactérias alvo (linhagens Gram-Positivas e Gram-negativas) quando cultivada em meio BDA e impedindo parcialmente o desenvolvimento das colônias bacterianas em meio TSBA, como ilustra a Figura 25.

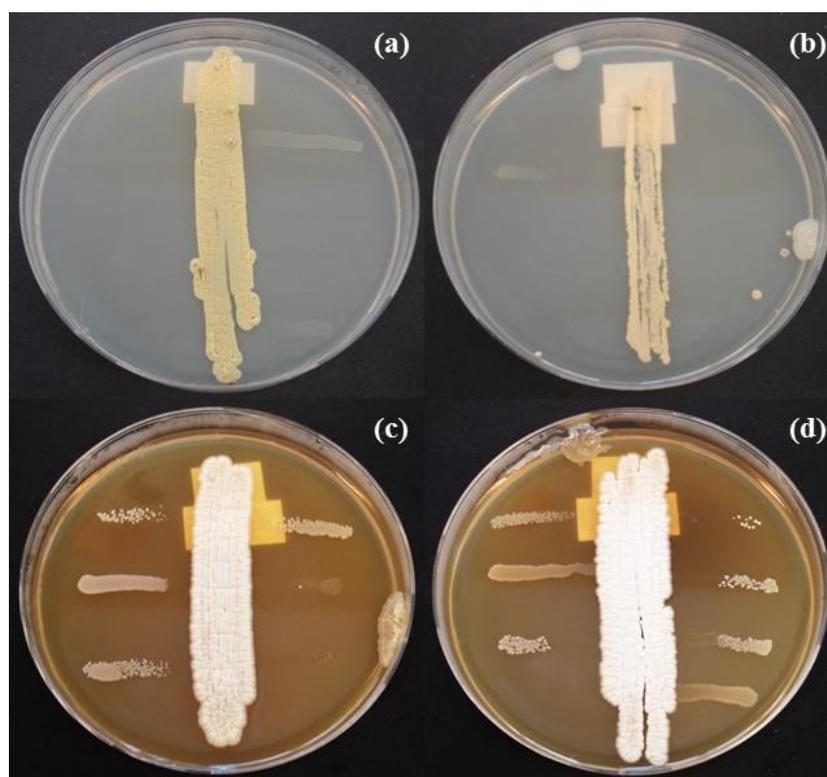


Figura 25. Resultado do bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 1-54 frente as linhagens isoladas (Placa 1) em (a) meio BDA e (c) TSBA e contra as linhagens tipo (Placa 2) em (b) meio BDA e (d) TSBA.

Sendo assim, para proceder com a identificação dos compostos ativos, valendo-se da estratégia de fracionamento guiado por bioensaio, foi realizada a fermentação de maior

volume de meio líquido BD para obtenção de uma maior quantidade de extrato bruto. Posteriormente, foi então desenvolvida uma metodologia de LC-UV para realizar o fracionamento. A Figura 26 apresenta o cromatograma referente a melhor condição cromatográfica obtida para o monitoramento do extrato bruto nos comprimentos de onda de 280 e 310 nm, escolhidos de acordo com as análises de DI-PDA-MS.

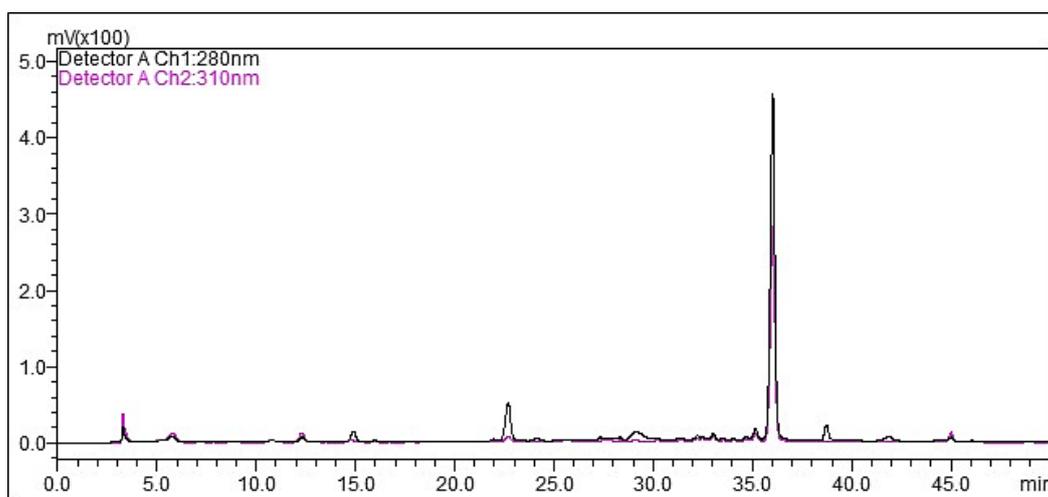


Figura 26. Cromatograma de LC-UV do extrato bruto Caat 1-54, obtido a partir da fermentação de meio BD.

A partir do método otimizado em escala analítica, aproximadamente 100 mg do extrato bruto Caat 1-54 foram fracionados, utilizando a escala preparativa, e durante todo o desenvolvimento cromatográfico frações foram coletadas a cada minuto, totalizando 48 frações. Em seguida, cada uma delas foi ensaiada contra a bactéria *Staphylococcus aureus* 211 para identificar a presença de compostos ativos. Os resultados obtidos estão esquematizados na Figura 27.

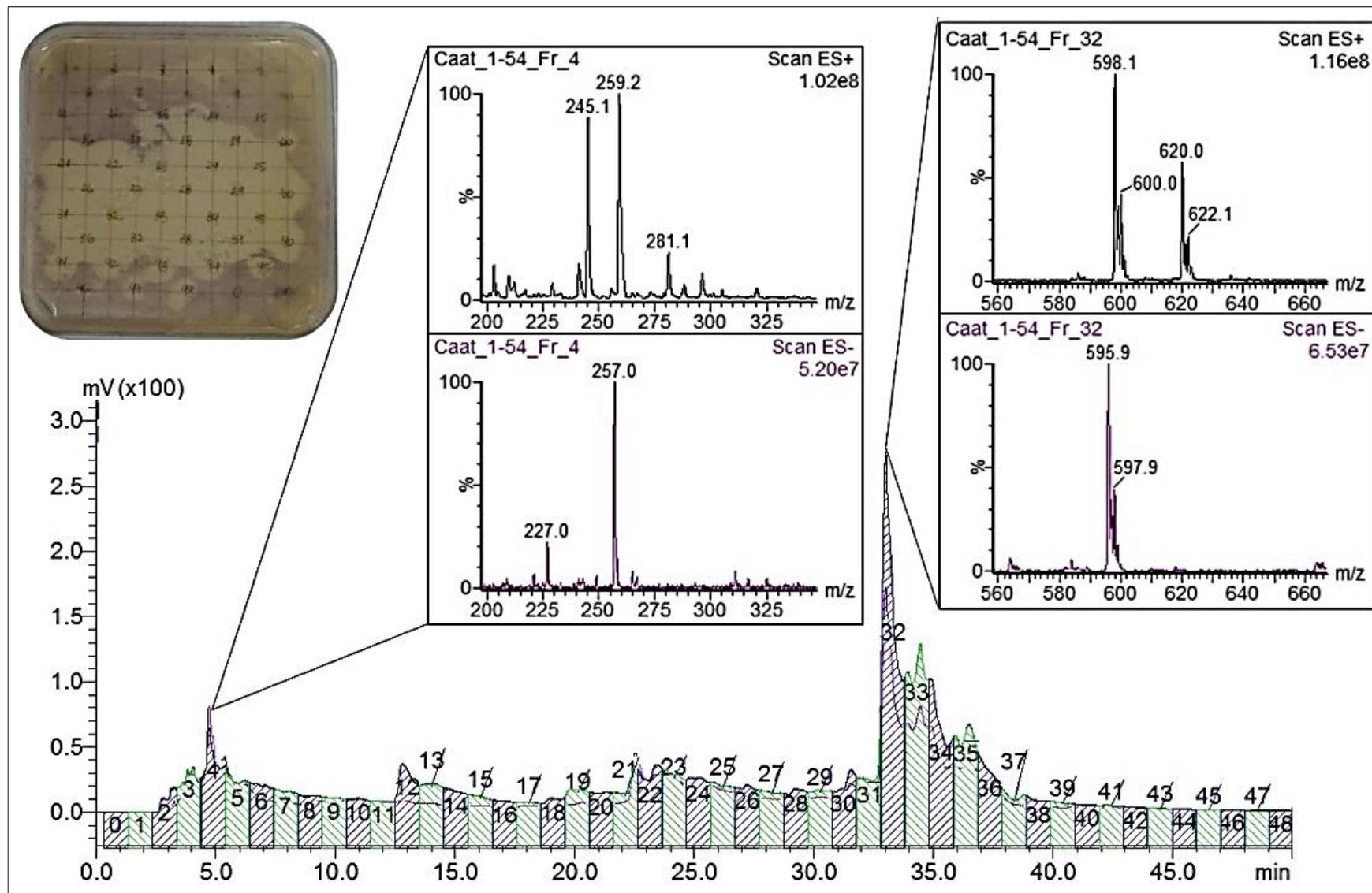


Figura 27. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto Caat 1-54 obtido a partir da fermentação de meio BD

Para este extrato foi necessário realizar uma maior diluição para o *screening* biológico das frações coletas, pois quando realizado o mesmo procedimento padrão aplicado pelo grupo de pesquisa houve a inibição completa do crescimento da bactéria alvo. Apenas quando as frações foram diluídas 20x foi possível monitorar a atividade antimicrobiana. Observou-se, assim, um único conjunto de frações ativas, que se estendeu da fração Fr17 até a Fr45. Entretanto nem todas elas apresentaram as mesmas características de absorção nos comprimentos de onda monitorados, pois apenas um pico cromatográfico pronunciado foi registrado.

Além da triagem biológica, todas as frações foram analisadas por DI-MS para que o processo de desreplicação pudesse ser realizado. A Figura 28 apresenta os espectros de massas da fração ativa cujo sinal cromatográfico foi registrado, Fr32.

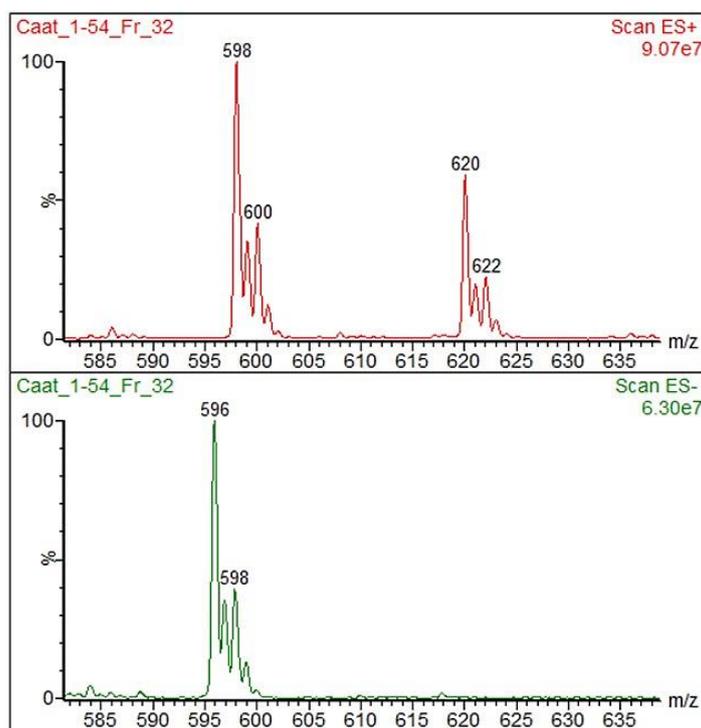


Figura 28. Espectros de massas, ESI+ e ESI-, da fração ativa Fr32 proveniente do fracionamento do extrato bruto Caat 1-54.

A fração Fr32 contém apenas íons referentes a um único composto, entretanto o espectro de massas desta fração revela importantes informações estruturais. Como a razão m/z referente ao íon $[M+H]^+$ é par, o composto apresenta massa molecular ímpar, indicando a presença de um número ímpar de nitrogênio em sua fórmula molecular. Também pode-se afirmar que este é um composto clorado, uma vez que é nítido o padrão isotópico encontrado, sendo este a presença de sinal correspondente ao $[M+H+2]^+$ com intensidade relativa de 1/3 ao $[M+H]^+$. Pode-se inferir que o composto referente a atividade antimicrobiana possui massa molecular de 597 u, uma vez que os espectros de massas apresentam os íons de m/z 596, 598 e 620, referentes as espécies $[M-H]^-$, $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$.

Diante da intensa atividade de um grande número de frações uma análise mais cuidadosa dos espectros de DI-MS foi realizada, a fim de tentar compreender o fator que causou este resultado. A Figura 29 apresenta alguns dos espectros das demais frações ativas.

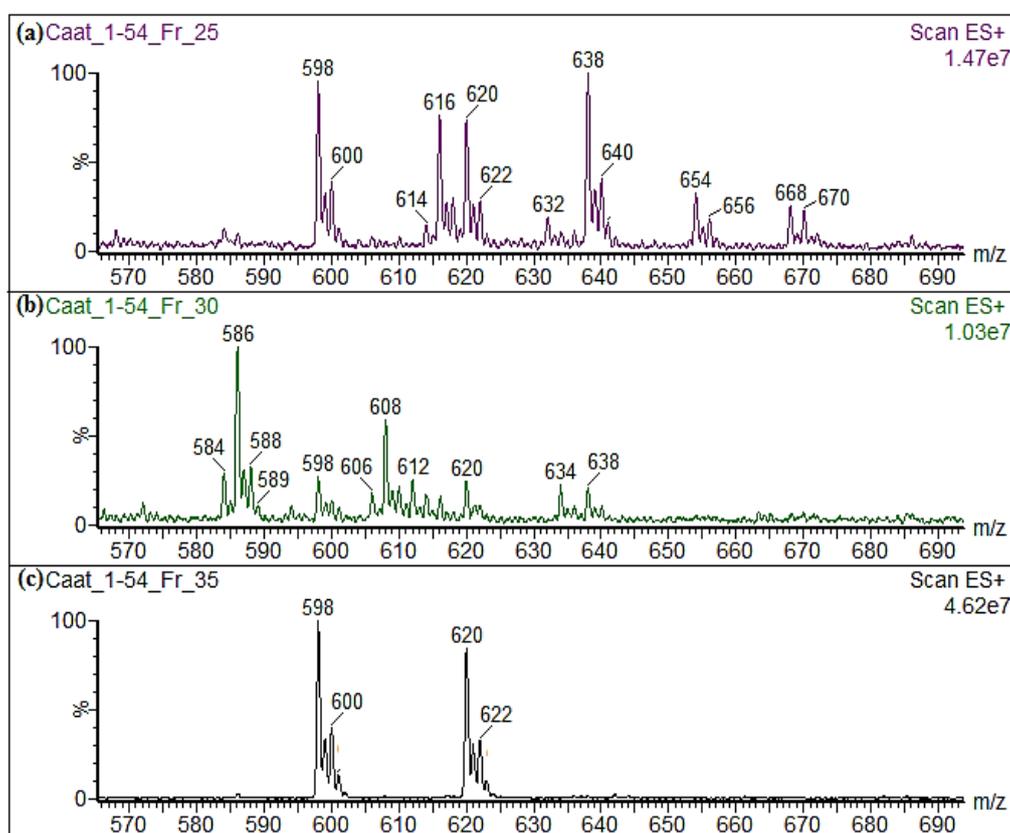


Figura 29. Espectros de massas em modo positivo (ESI+) para as frações ativas (a) Fr25; (b) Fr30 e (c) Fr35 provenientes da fermentação de meio BD.

Assim como que para a Fr32, observa-se a presença de compostos clorados em todas as frações que apresentaram atividade. Desta forma, espera-se que todas as frações ativas tenham compostos pertencentes a uma mesma classe química, uma vez que eles apresentam padrão isotópico de moléculas cloradas, bem como diferentes tempos de retenção e massa molecular.

Assim, para proceder com a identificação do composto ativo presente na Fr32 foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products* utilizando como filtro de busca a presença de um átomo de cloro e a massa molecular. Como resultado, 2 moléculas foram sugeridas, entretanto uma delas apresentava bromo e, portanto, foi descartada. Assim, apenas um composto, a lisolipina I, apresentava as características encontradas previamente. A Figura 30 mostra a estrutura química deste composto.

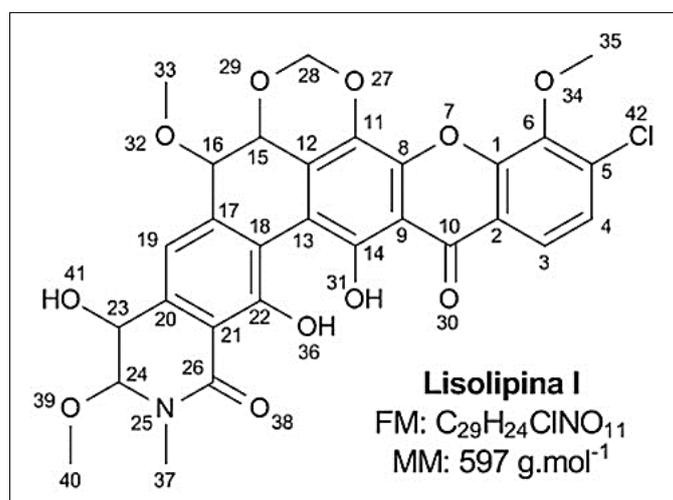


Figura 30. Estrutura química da lisolipina I.

Assim, para confirmar se o composto ativo era realmente lisolipina I foram realizadas análises de RMN 1D e 2D da reunião das frações Fr32-35. O espectro de ¹H RMN obtido foi ilustrado na Figura 31.

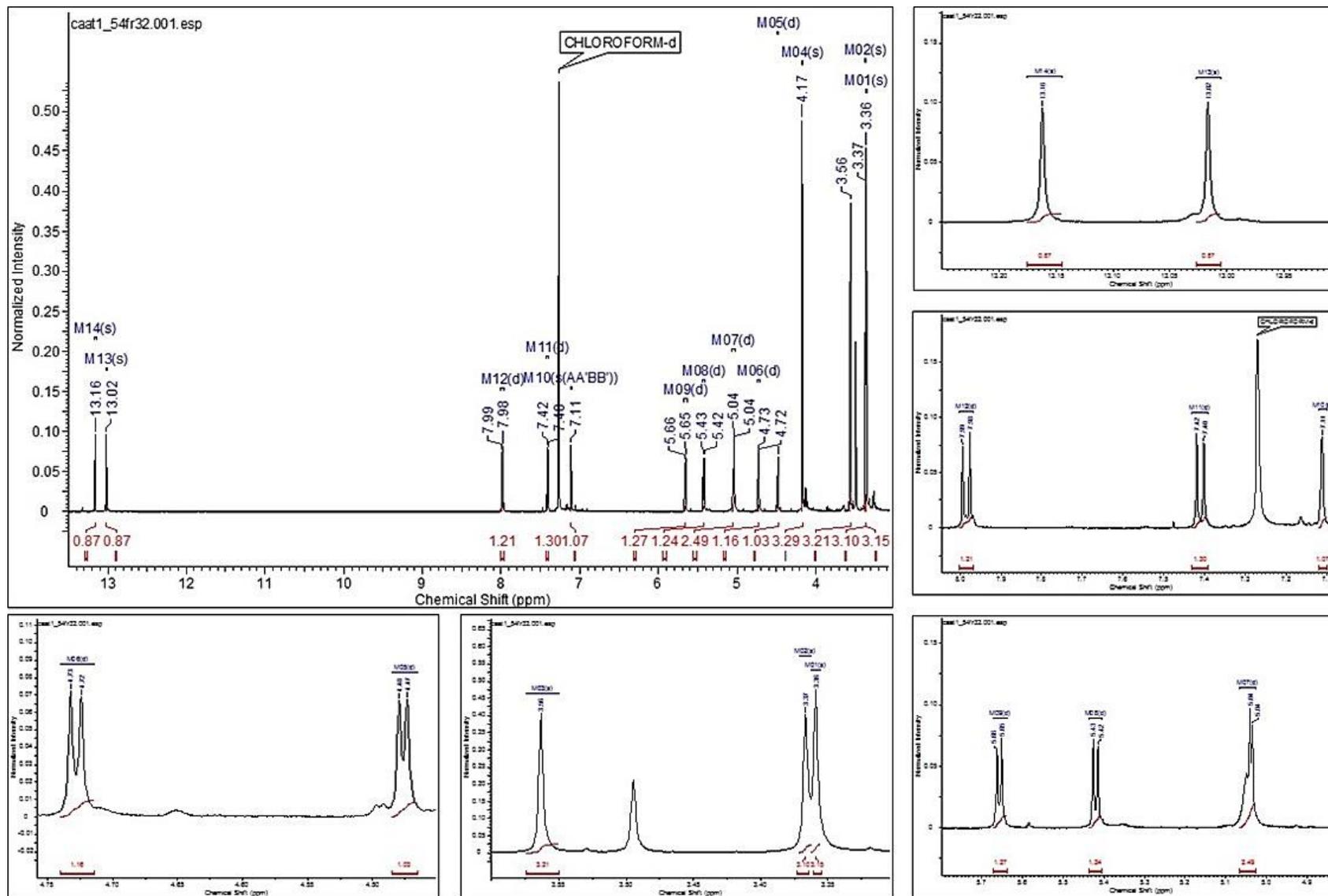


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) das Fr32-35 provenientes do extrato bruto Caat 1-54 obtido da fermentação de meio BD.

As Figura 32-33 mostram os resultados obtidos nas análises de RMN 2D.

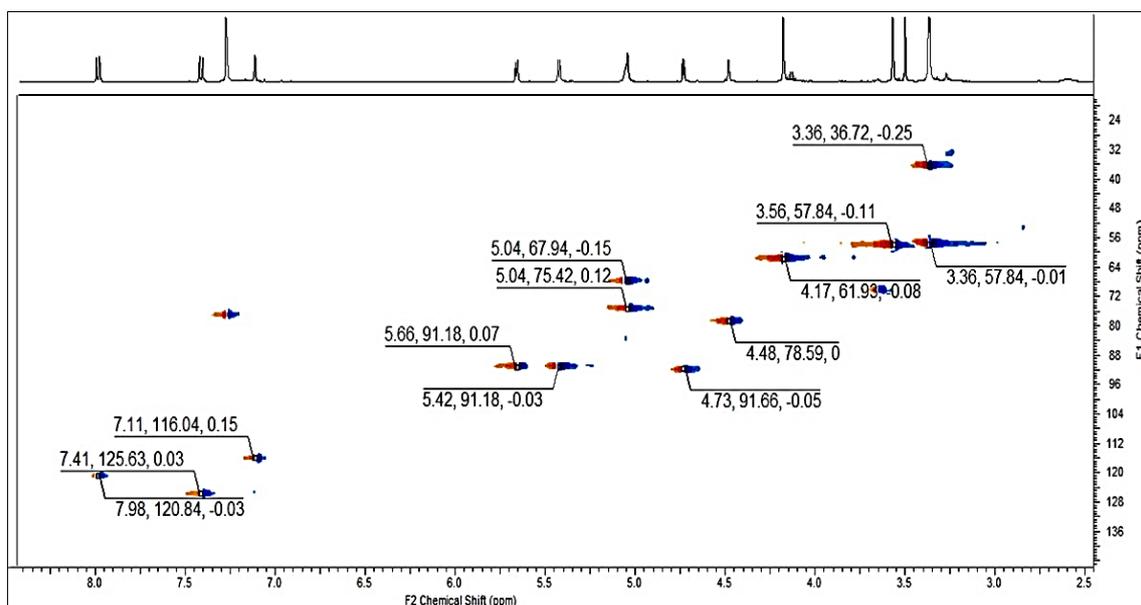


Figura 32. Espectro de HMQC (CD_3OD , 500 MHz) das Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.

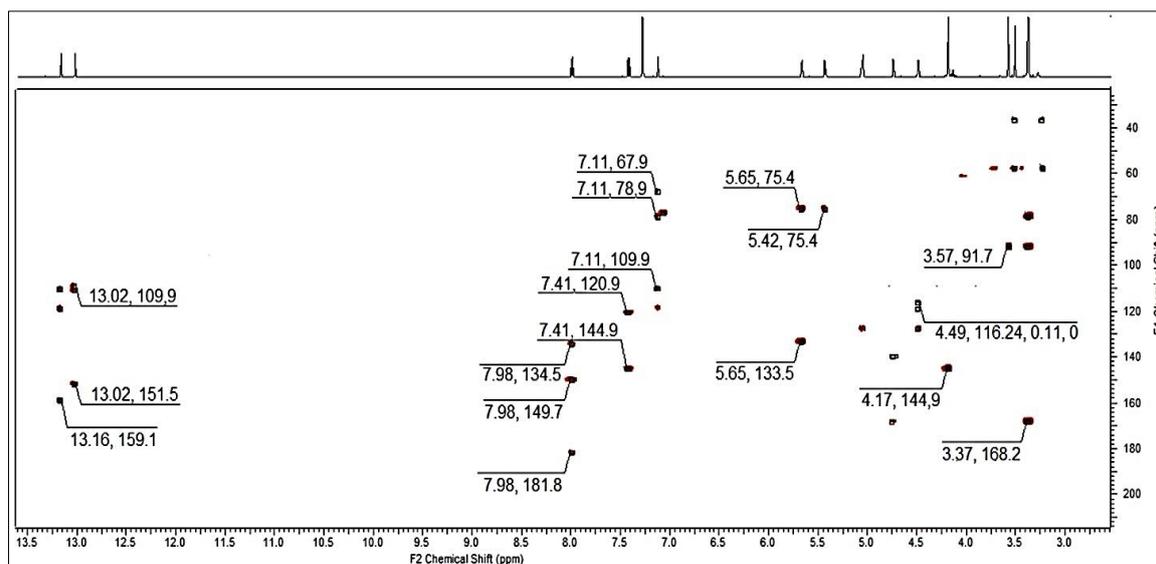


Figura 33. Espectro de HMBC (CD_3OD , 500 MHz) das Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.

A Tabela 6 sumariza todos os resultados tanto do experimento 1D, quanto dos 2D, mostrando as correlações e deslocamentos químicos observados, que estão de acordo com o observado na literatura.^{84,85}

Tabela 6. Dados de RMN para Fr32-35 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 1-54.

<i>Posição</i>	¹ H δ (ppm), m (J, Hz)	¹³ C δ (ppm)	HMBC Correlação (ppm)	HMQC Correlação (ppm)
1	-	134,5	-	-
2	-	120,8	-	-
3	7,98 d (8,6)	120,9	149,7	120,9
4	7,41 d (8,6)	125,6	144,9; 120,9	125,6
5	-	149,7	-	-
9	-	109,9	-	-
10	-	181,8	-	-
11	-	151,5	-	-
12	-	127,5	-	-
13	-	133,2	-	-
14	-	151,5	-	-
15	5,0-5,1 m	75,4	-	67,9; 75,4
16	4,47 d (3,1)	78,6	127,5	78,6
18	-	118,9	-	-
19	7,11 s	116,0	118,9; 109,9; 78,6	116,0
21	-	109,9	-	-
22	-	159,1	-	-
23	5,0-5,1 m	-	-	67,9; 75,4
24	4,72 d (4,2)	91,7	-	91,7
26	-	168,2	-	-
28	5,42 d (5,7) 5,65 d (5,7)	91,2	75,4 133,2; 75,4	91,2
31	13,02 s	-	151,5; 109,9	-
33	3,36 s	57,8	78,6	57,8
35	4,17 s	61,9	144,9	61,9
36	13,16 s	-	159,1; 118,9; 109,9	-
37	3,37 s	36,7	168,2; 91,7	36,7
40	3,56 s	57,8	91,7	57,8

*s = singleto; d = dubleto; m = sem multiplicidade definida.

A Figura 34 apresenta algumas correlações na molécula de lisopina I observadas no espectro de HMBC.

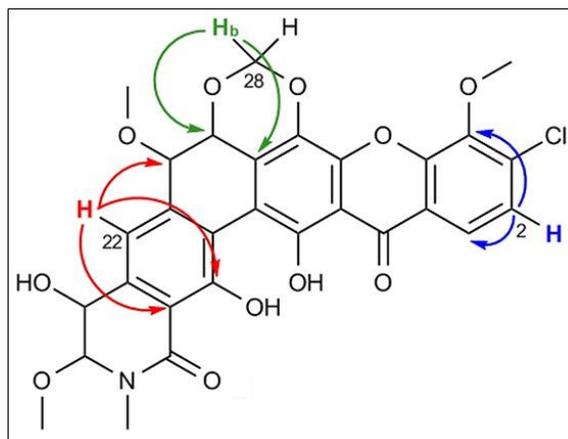


Figura 34. Correlações entre os núcleos de ^1H e ^{13}C observadas no espectro de HMBC da lisolipina I, produzida pela actinobactéria Caat 1-54.

Diante dos resultados obtidos, o composto ativo presente nas Fr32-35 do extrato bruto produzido pela fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 1-54 foi identificado como sendo a lisolipina I.

Foi realizado também o estudo de fragmentação da lisolipina I através de experimentos de CID. Para tal, os íons de m/z 598 e 600 foram fragmentados, sendo o íon de m/z 598 referente à molécula substituída com o isótopo ^{35}Cl e o íon de m/z 600 do isótopo ^{37}Cl . Os espectros de massas obtidos são apresentados na Figura 45.

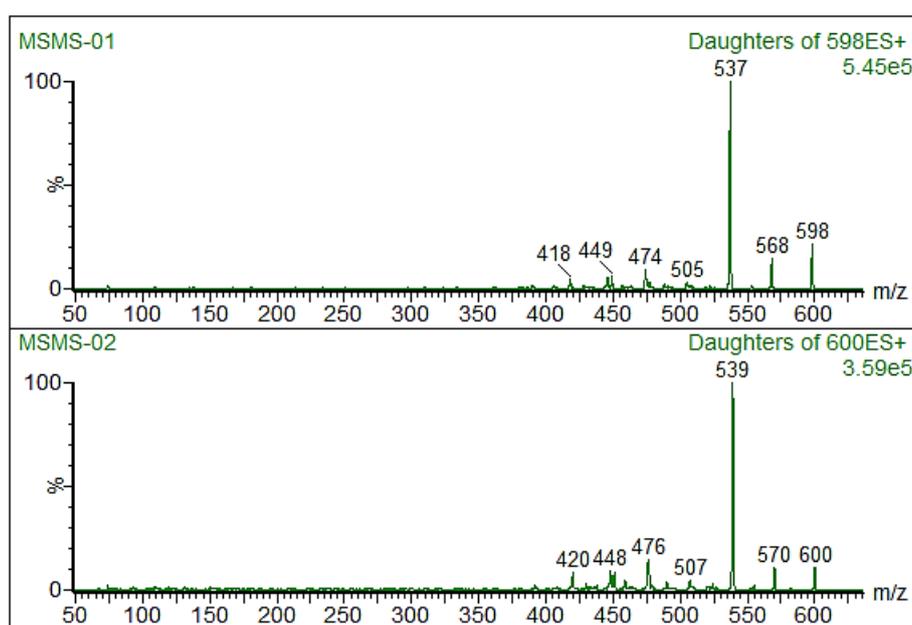


Figura 35. Espectros de CID da lisolipina I substituída com os isótopos ^{35}Cl (m/z 598) e ^{37}Cl (m/z 600), respectivamente.

Nota-se nos que há uma diferença de 2 Da entre os fragmentos formados em cada um dos espectros, o que corresponde a diferença de massa entre os isótopos de cloro. Além disso, observa-se a formação de poucos fragmentos, devido a porção central aromática da molécula, sendo assim as principais perdas neutras que ocorrem são de 30 e 61 Da em relação a molécula protonada. A perda de 61 Da pode resultante da perda de 31 Da sequencial a perda de 30 Da. Com base nestas duas principais perdas neutras foi feita uma proposta de fragmentação para a lisopilina I, ilustrada na Figura 36.

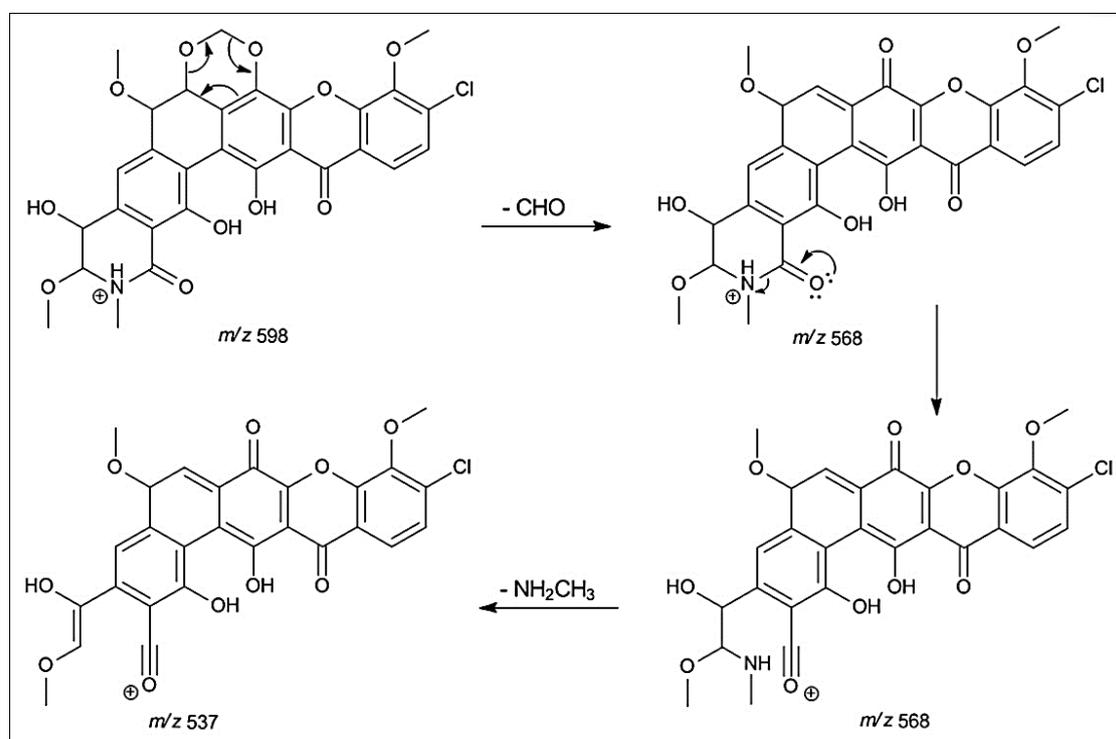


Figura 36. Proposta de fragmentação para a lisopilina I.

Portanto, a atividade biológica do extrato bruto Caat 1-54 está relacionada a presença de compostos da classe das lisopilinas, especialmente lisopilina I. As lisopilinas são xantonas policíclicas antibióticas com atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Como tais moléculas apresentam alta afinidade por lipídeos, sugere-se que seu mecanismo de ação esteja envolvido com a biossíntese de parede celular. Sendo assim, tais

compostos surgem como uma nova alternativa para o tratamento de doenças infecciosas diante de seu potencial de ação antibiótico.^{84,86}

3.5. Estudo do perfil metabólico da actinobactéria Caat 1-54 cultivada na presença de sais de bromo e água do mar

3.5.1. Avaliação da influência do cultivo empregando água do mar no perfil metabólico da actinobactéria Caat 1-54

As lisolipinas tem uma forte atividade biológica contra uma variedade de patógenos resistentes e, por isso, são importantes policetídeos antimicrobianos que podem servir de modelo para o desenvolvimento de fármacos contra diversas doenças infecciosas. A biossíntese desta classe de compostos é baseada na via de síntese dos policetídeos (PKS, do inglês *Polyketide Synthase*) do tipo II. Uma característica estrutural importante da lisolipina é a presença de uma amida cíclica (anel F), o é raramente observada em policetídeos aromáticos. Além disto têm-se a presença de um átomo de cloro no anel A e uma ponte dioximetileno que forma o anel G.⁸⁷

Com relação as vias biossintéticas que levam a formação a lisolipina I há duas possibilidades; uma se inicia a partir da condensação de 11 unidades de malonil-CoA a uma molécula de malonamida, e outra na qual 12 moléculas de malonil-CoA são condensadas e a adição do grupo amino ocorre posteriormente. Após estas etapas a via torna-se única, ocorrendo ciclização e redução do policetídeo precursor. O intermediário formado é então halogenado e metilado, formando Lisolipina X, que após sofrer uma eliminação espontânea de água seguida da aromatização do anel C forma a lisolipina I.⁸⁶ A Figura 37 representa estas possíveis vias biossintéticas.

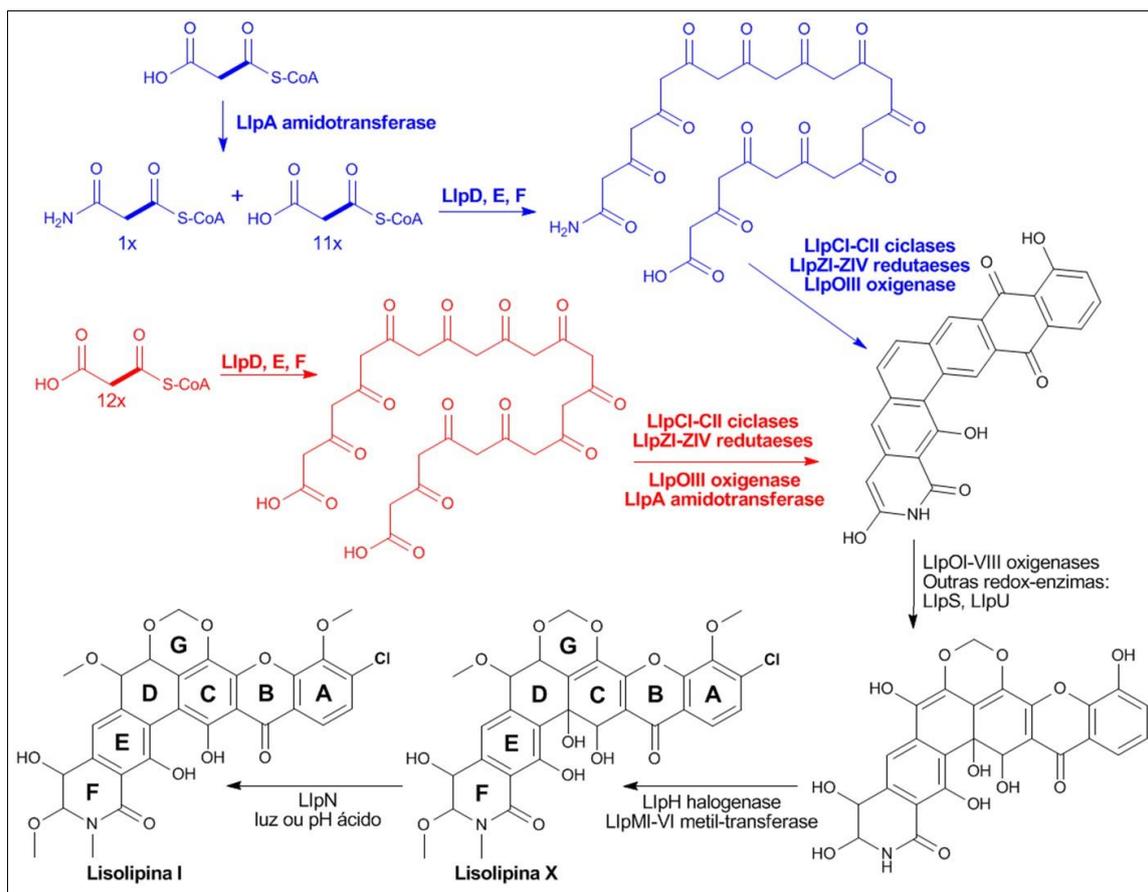


Figura 37. Via hipotética para a biossíntese das lisolipinas. A via em azul representa a formação da cadeia do policetídeo a partir de malonamida e malonil-CoA. Alternativamente, a via em vermelho inicia-se pela condensação de malonil-CoA.

Deste modo, considerando que a inserção de cloro na lisolipina I é mediada por uma halogenase, o cultivo da actinobactéria Caat 1-54 na presença de sais de halogênio ou cofatores enzimáticos pode resultar na formação de diferentes lisolipinas.

Como a grande maioria dos metabólitos secundários microbianos halogenados é proveniente do ambiente marinho,⁸⁸ a influência da água do mar no cultivo da actinobactéria Caat 1-54 foi avaliada, de forma a serem testados meios de cultivo contendo 0, 25, 50, 75 e 100% de água do mar na composição final. O experimento realizado mostrou que com a adição de água do mar no meio de cultura líquido BD nenhuma alteração visual entre os diferentes meios de cultivo fermentados, no entanto, a quantidade de micélio produzida diminuiu com o aumento da concentração de água do mar, de forma que não foi possível

observar a crescimento da actinobactéria Caat 1-54 em 100% de água do mar, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Massa seca obtida na fermentação de meio BD com diferentes porcentagens de água do mar pela actinobactéria Caat 1-54.

% de Água do Mar	Massa Seca (g)
0	0,0400
25	0,0305
50	0,0258
75	0,0289
100	-

Os perfis químicos dos extratos brutos obtidos na fermentação com água do mar foram avaliados por LC-PDA-MS e DI-MS. A Figura 38 apresenta os cromatogramas de LC-PDA obtidos.

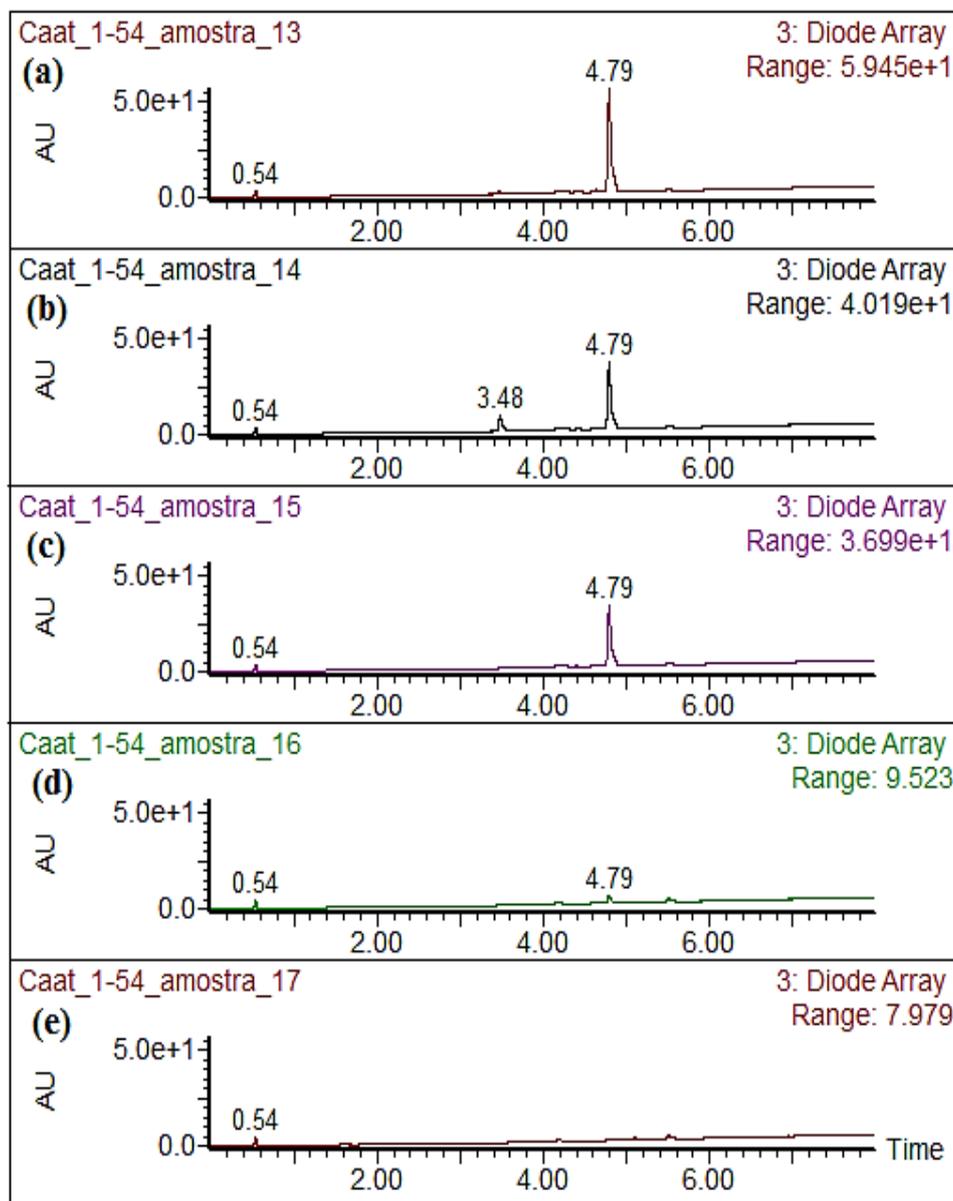


Figura 38. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos provenientes da fermentação de meio líquido BD contendo água do mar nas concentrações de (a) 0%, (b) 25%, (c) 50%, (d) 75%, (e) 100% pela actinobactéria Caat 1-54.

A partir dos espectros de massas obtidos foi possível observar que mesmo na presença de água do mar a actinobactéria Caat 1-54 continua a produzir o composto lisolipina I. Entretanto, com o aumento da concentração de água do mar verifica-se uma diminuição na área do pico referente a este composto ($t_r = 4,79$), indicando que a água do mar não leva a produção de outras lisolipinas pela actinobactéria Caat 1-54.

3.5.2. Estudo da influência dos sais NaBr e KBr no perfil químico da actinobactéria Caat 1-54

A actinobactéria Caat 1-54 é capaz de produzir lisolipina I, e tal composto halogenado apresenta propriedades antimicrobianas pronunciadas, tornando-o muito atrativo. A halogenação é uma característica importante para a atividade biológica de um grande número de produtos naturais, sendo a cloração mais frequentemente encontrada, seguida por bromação, enquanto que iodação e fluoração são mais raras na natureza. A maioria destes compostos tem sido relatados como provenientes de organismos marinhos, por exemplo, algas, esponjas, invertebrados, cianobactérias e briófitas.⁸⁹

A halogenação pode ocorrer via enzimática ou não-enzimática, através incorporação de ânions haleto presentes no meio de cultivo.⁹⁰ E, embora um grande número de metabólitos secundários halogenados já tenham sido isolados, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais os átomos de bromo, cloro, iodo ou flúor são incorporados nestas moléculas. Entretanto, algumas vias são catalisadas por enzimas com especificidade para o substrato e regioselectividade, como ocorre para a formação de clorotetraciclina.⁹¹

Como a incorporação de átomos de halogénio em fármacos é uma estratégia comum para modificar moléculas com a finalidade de se obter melhor eficácia dos mesmos é de grande interesse investigar a capacidade de um micro-organismo em produzir metabólitos halogenados, uma vez que as reações de halogenação vias não-enzimáticas requerem condições severas e resultam na formação de produtos indesejados.⁹²

A substituição do átomo de cloro através da suplementação do meio de cultivo com outros ânions haleto é uma estratégia comum para tentar aumentar a diversidade estrutural dos compostos halogenados, e estudos desta natureza levam principalmente a biossíntese de bromo-derivados.⁹³ Deste modo, foram procedidos estudos com adição de sais de bromo ao

meio de cultivo BD para avaliar a influência destes no perfil metabólico apresentado pela actinobactéria Caat 1-54.

Para avaliar a influência da adição de sais de bromo no perfil metabólico produzido pela actinobactéria Caat 1-54, um estudo foi realizado adicionando-se NaBr ou KBr, nas concentrações de 50 ou 100 mM, ao meio de cultivo líquido BD. A adição do brometo foi realizada de dois modos distintos: a) no momento de inóculo da actinobactéria ($t=0$) ou b) após 5 dias de crescimento da actinobactéria ($t=5$). Além dessas variáveis, o processo fermentativo foi monitorado em diferentes intervalos de tempo: 7, 12 e 20 dias, empregando LC-PDA-MS e DI-MS para a análise dos perfis químicos dos extratos brutos obtidos. As Figura 39 e 40 apresentam os resultados obtidos para o processo de fermentação mantido por 7 dias.

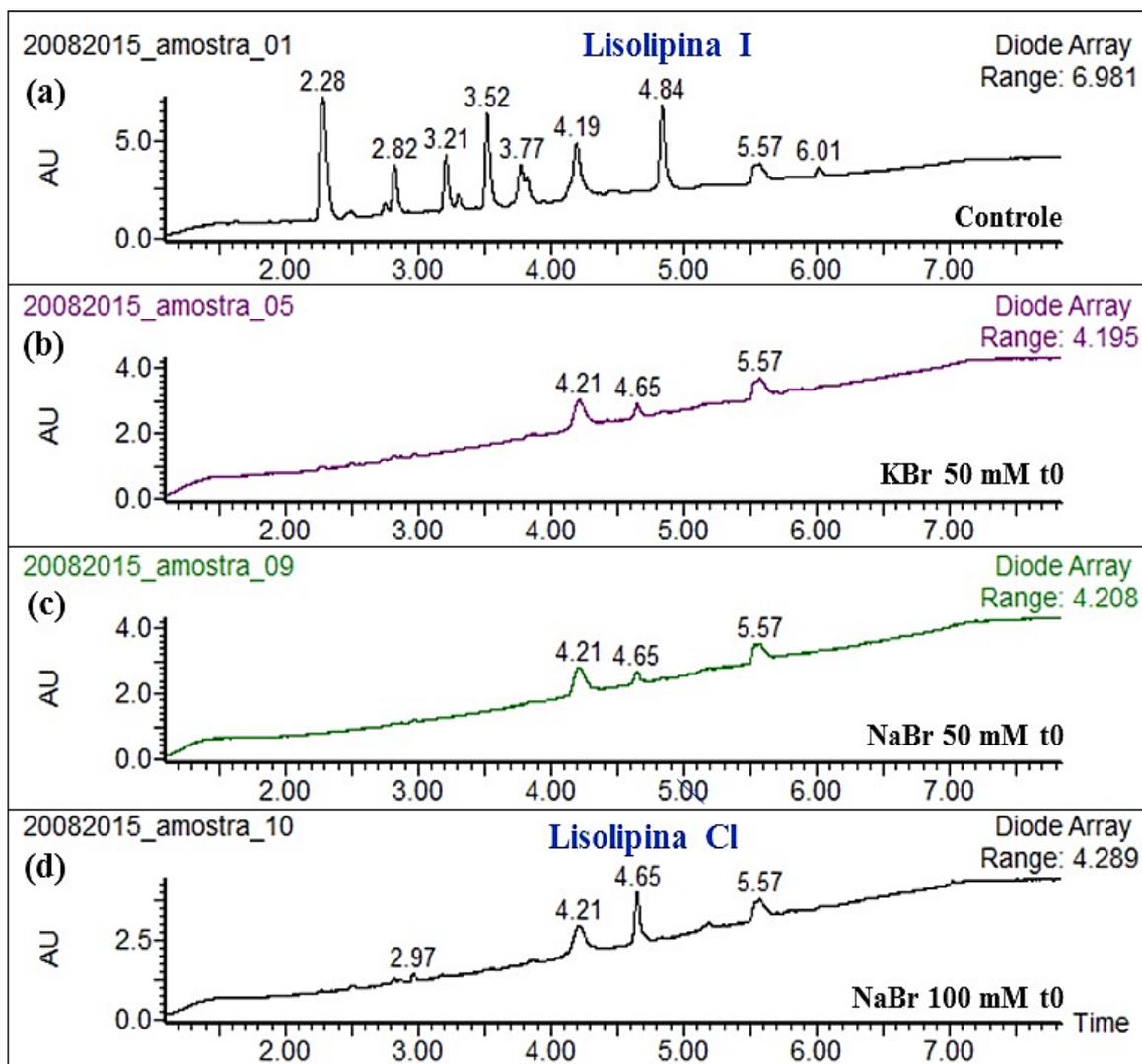


Figura 39. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 7 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com (b) KBr 50 mM t=0, (c) NaBr 50 mM t=0 e (d) NaBr 100 mM t=0.

Baseados nos cromatogramas obtidos pode-se notar que a presença dos sais de bromo no meio de cultivo inibiu a formação da lisolipina I ($t_r = 4,84$) e levou a produção de um perfil químico diferente daquele observado para o controle (Figura 39a).

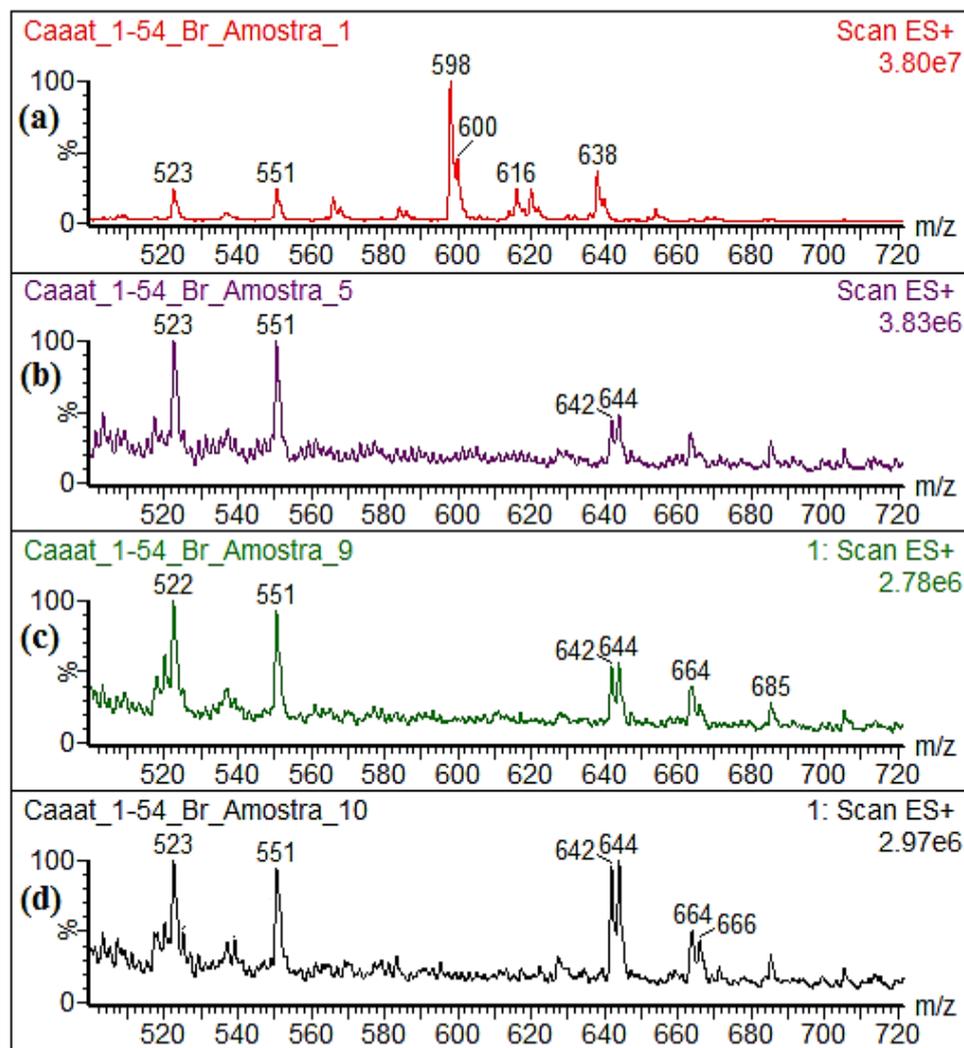


Figura 40. Espectros de DI-MS (ESI+) dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 7 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com (b) KBr 50 mM t=0, (c) NaBr 50 mM t=0 e (d) NaBr 100 mM t=0.

A partir dos resultados observados nos espectros de DI-MS nota-se, diante do padrão isotópico, a formação de compostos bromados, que de acordo com as razões m/z 642 e 644 correspondem a substituição do cloro na lisolipina I por bromo, correspondente a massa molecular esperada.

Ainda sobre a fermentação de 7 dias (Figura 39 e 40) é possível inferir que a troca do cloro por bromo na estrutura da lisolipina I ocorreu para todas as concentrações do sal avaliadas, quando o inóculo foi concomitante a adição do sal. Entretanto a produção dos compostos bromados foi inferior a do composto clorado (presente no controle), de acordo com as áreas dos picos observadas nos cromatogramas, cujo tempo de retenção da lisolipina I

é $t_r = 4,84$ min e da lisolipina bromada $t_r = 4,65$ min. A produção da lisolipina bromada foi maior para a fermentação empregando 100 mM de NaBr (Figura 39d).

Após 12 dias de fermentação novos extratos brutos foram gerados e a Figura 41 apresenta os resultados de LC-PDA obtidos para adição dos sais de bromo no momento do inóculo da actinobactéria.

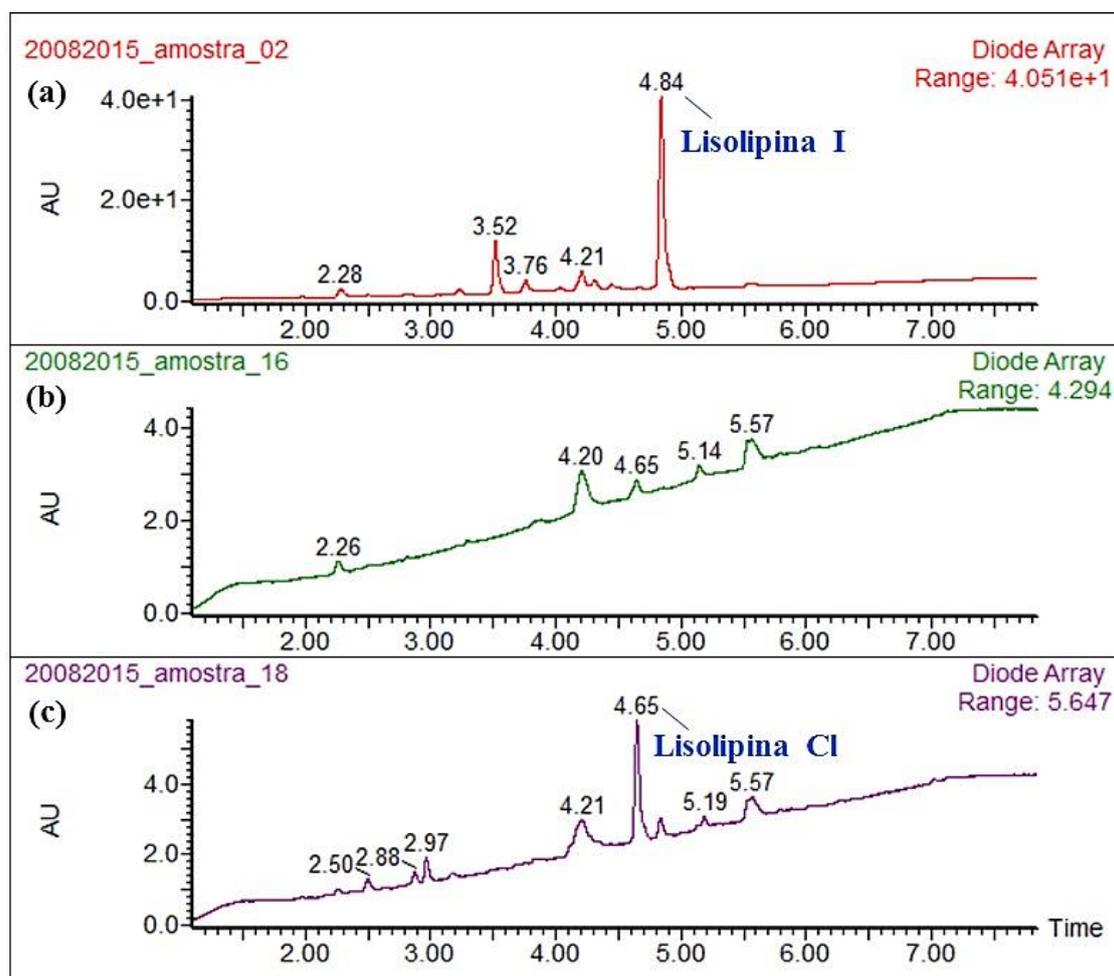


Figura 41. Cromatogramas de LC-PDA para os extratos brutos produzidos pela actinobactérias Caat 1-54 a partir da fermentação em 12 dias de (a) meio BD (controle) meio BD com adição de NaBr nas concentrações de (b) 50 mM e 100 mM, ambos inoculados simultaneamente a adição do sal ($t=0$).

Observa-se neste caso que a adição do sal inibiu a formação da lisolipina I, mas favoreceu a produção de um novo composto, a lisolipina bromada, com $t_r = 4.65$. A condição empregando 100 mM de NaBr foi aquela responsável pela maior produção da lisolipina

bromada entre as avaliadas para 12 dias de fermentação com adição do sal juntamente ao inóculo da actinobactéria no meio de cultivo.

Também foi estudada a influência da adição dos sais de bromo após 5 dias de crescimento da actinobactérias Caat 1-54. A Figura 42 apresenta os resultados obtidos.

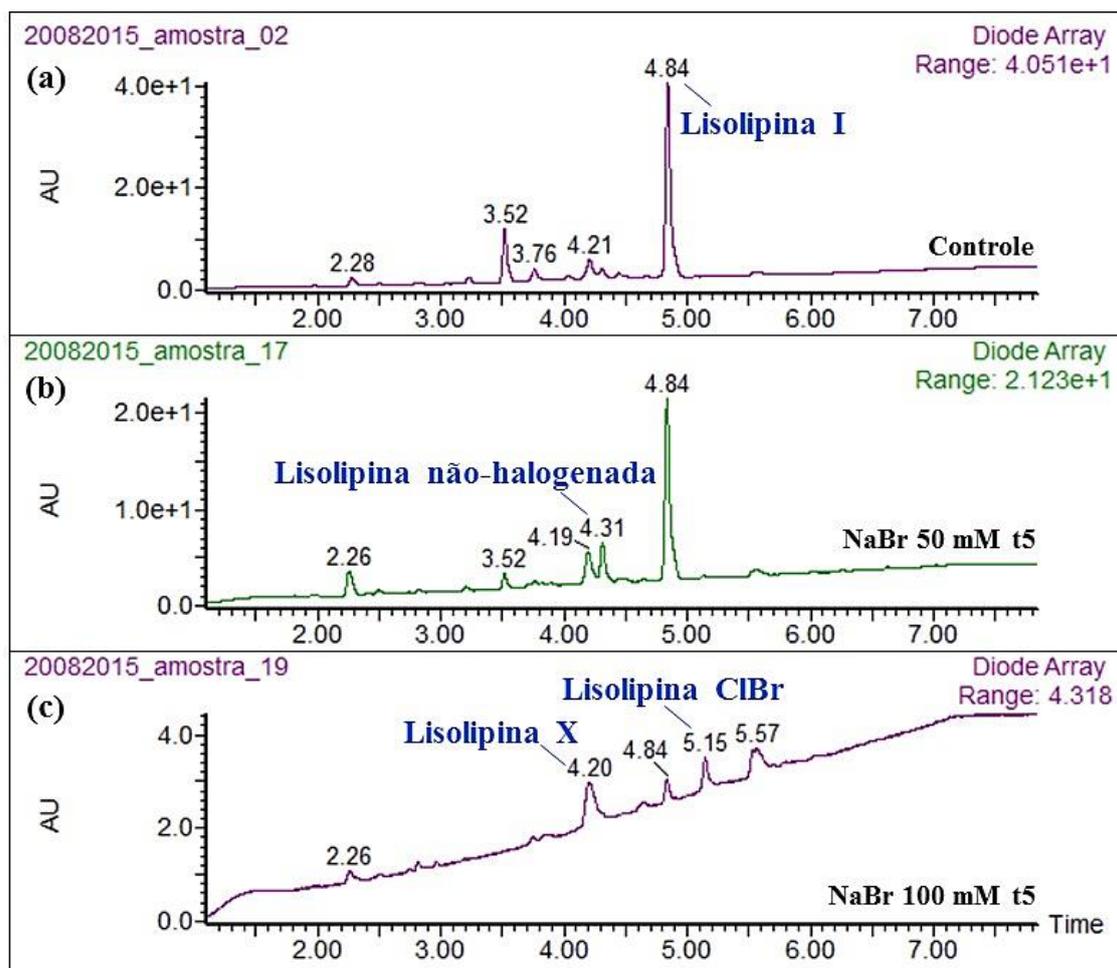


Figura 42. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 12 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com NaBr nas concentrações de (b) 50 mM e (c) 100 mM, sendo o sal adicionado após 5 dias do inóculo da actinobactéria ($t=5$).

Para este estudo foi vista a produção lisolipina X (m/z 616) e da lisolipina não-halogenada (m/z 564), além de um composto de m/z 677 que corresponde a molécula de lisolipina I adicionada de um bromo, com tempo de retenção de $t_r = 5,15$ min. Tal molécula foi sugerida a partir do perfil isotópico observado, apresentado na Figura 43.

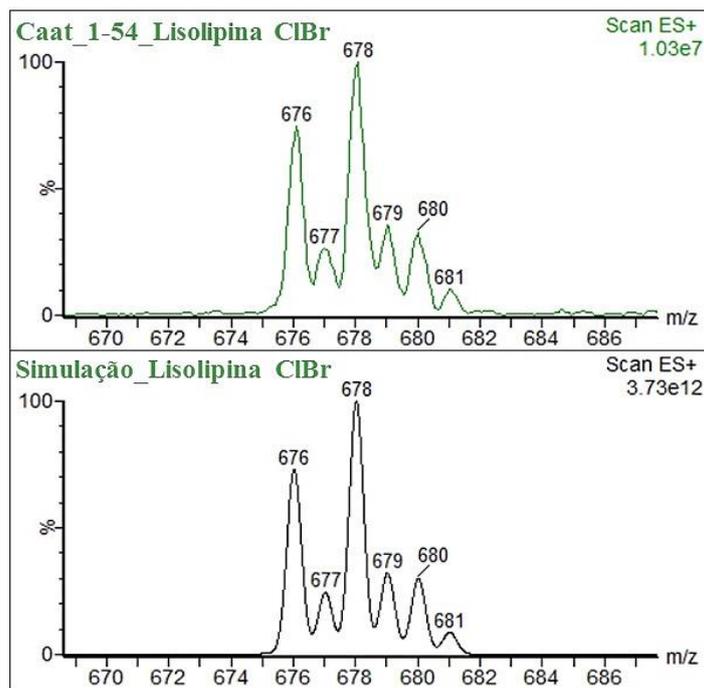


Figura 43. Ampliação dos espectros de (a) *full scan* do extrato bruto que contém a lisolipina clorada e bromada (m/z 677) e (b) simulação da lisolipina I substituída também com um bromo.

Baseado no padrão isotópico teórico e no perfil de fragmentação (Figura 48) observado para este composto conclui-se que o mesmo corresponde a lisolipina I substituída por átomo de bromo.

O terceiro intervalo de tempo de fermentação monitorado foi de 20 dias. A Figura 44 apresenta os resultados obtidos para a adição dos sais simultaneamente ao inóculo da actinobactéria no meio de cultivo.

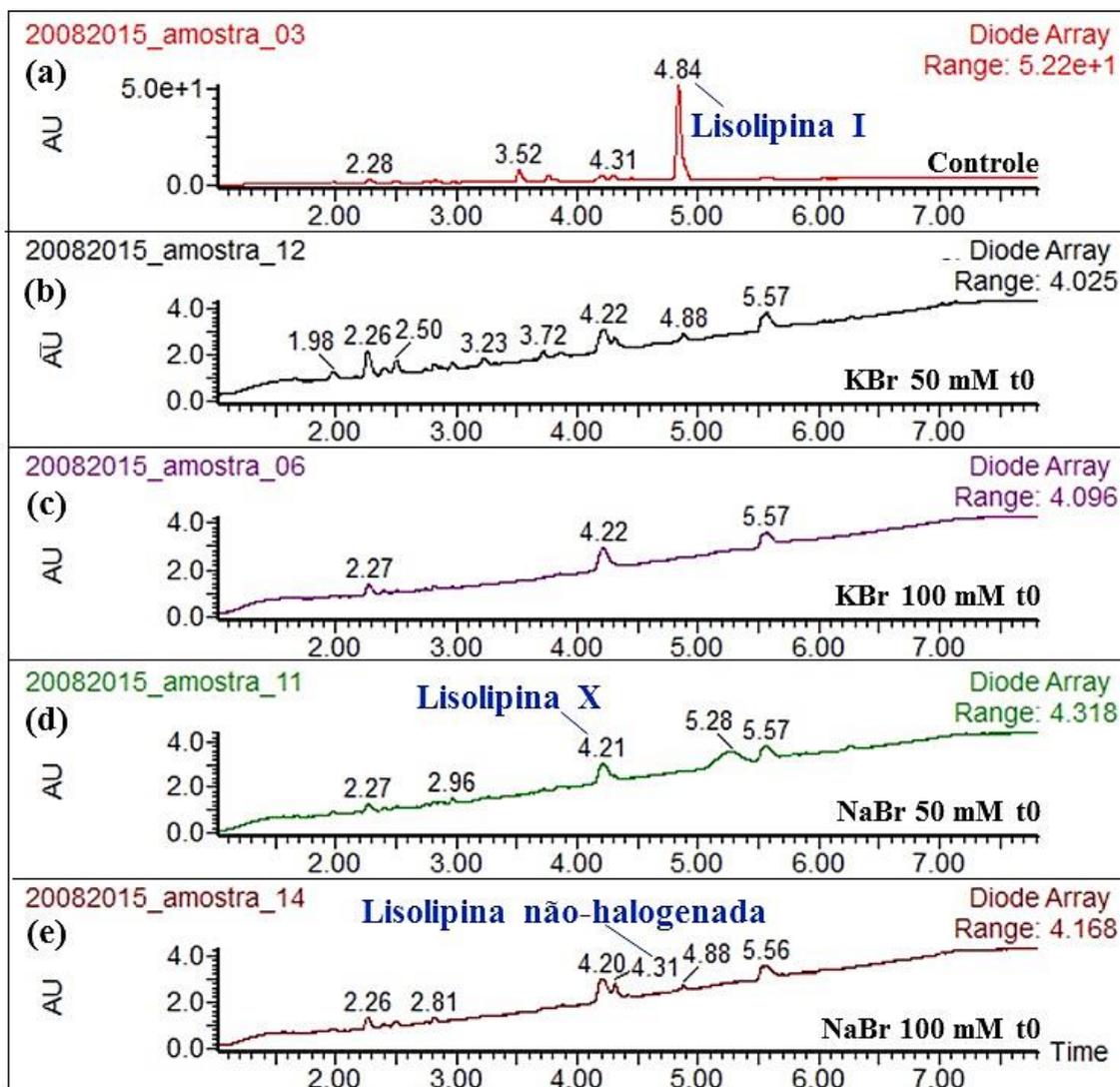


Figura 44. Cromatogramas dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 20 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com KBr nas concentrações de (b) 50 mM (c) 100 mM e suplementado com NaBr nas concentrações de (d) 50 mM e (e) 100 mM, sendo os sais adicionados simultaneamente ao inóculo da actinobactéria.

A partir da fermentação durante 20 dias com a adição dos sais de bromo concomitantemente ao inóculo dos meios de cultivo foi possível notar que lisolipina I ($t_r = 4,84$ min) não foi produzida e que houve a formação da lisolipina não-halogenada de m/z 564 ($t_r = 4,22$ min).

Para a fermentação em 20 dias com adição dos sais de bromo decorridos 5 dias do processo fermentativo têm-se os resultados apresentados na Figura 45.

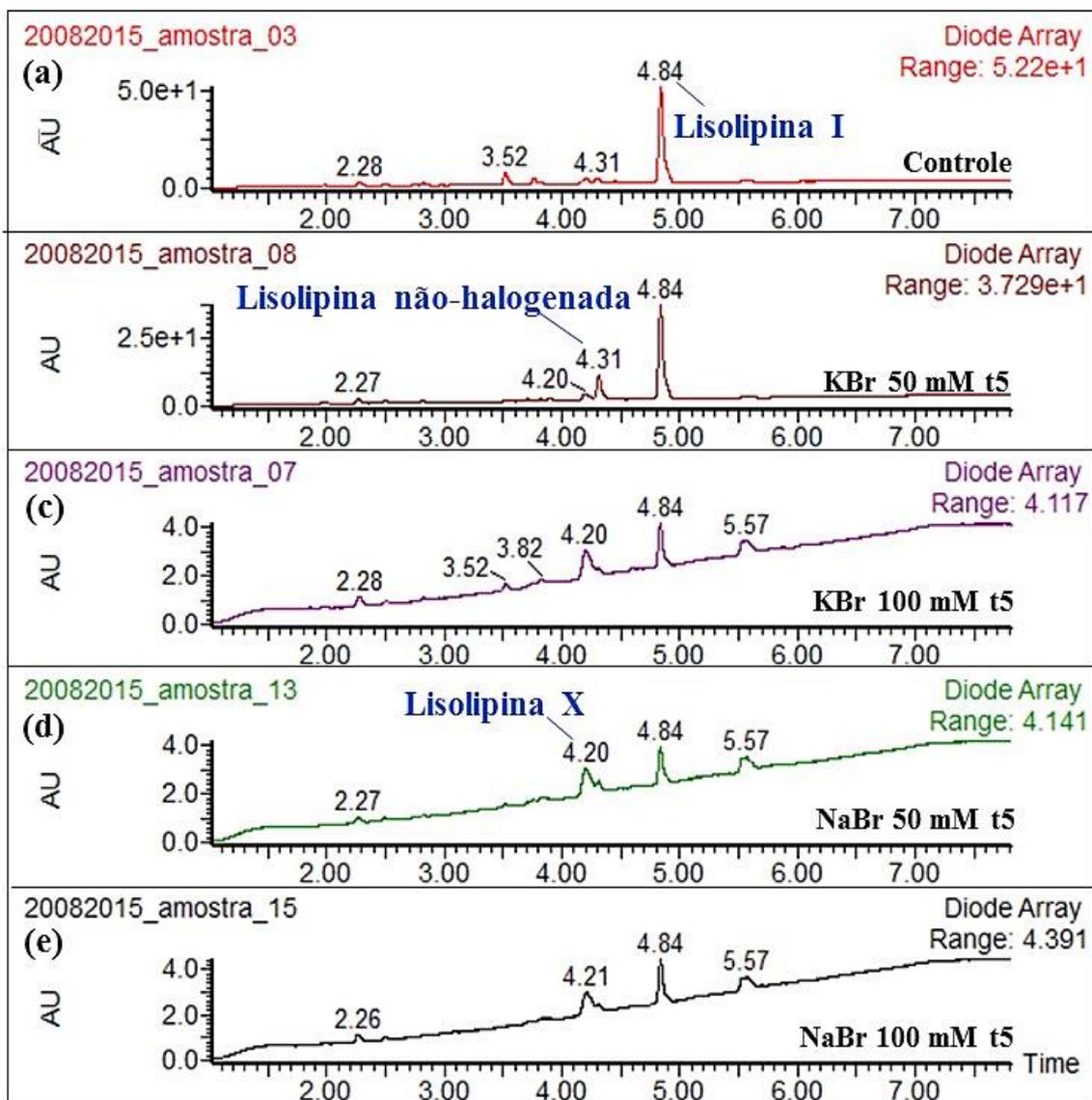


Figura 45. Cromatogramas dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação em 20 dias de (a) meio líquido BD e meio BD suplementado com KBr nas concentrações de (b) 50 mM (c) 100 mM e suplementado com NaBr nas concentrações de (d) 50 mM e (e) 100 mM, sendo os sais adicionados após 5 dias do inóculo da actinobactéria.

Nota-se que com a adição do sal decorridos 5 dias do processo fermentativo a produção de lisolinina I diminuiu com o aumento da concentração do sal, tanto para NaBr quanto para KBr. Não se observa a formação da lisolinina clorada e bromada, como ocorreu na fermentação em 12 dias, e nem mesmo da lisolinina bromada.

As massas secas dos micélios de cada fermentação foram medidas e não houve variação significativa. Assim, pode-se garantir que todos os dados obtidos fossem resultantes apenas

das variações metabólicas induzidas pela composição do meio de cultivo e período de fermentação.

De maneira geral, os resultados obtidos permitiram concluir que a formação da lisolipina bromada (m/z 642) é favorecida pela adição de NaBr no momento do inóculo da actinobactéria Caat 1-54 em meio de cultivo empregando a concentração de 100 mM e mantendo-se o processo de fermentação por 12 dias. A formação da lisolipina clorada e bromada (m/z 676) é favorecida pela adição de 100 mM de NaBr após 5 dias do inóculo da actinobactéria no meio de cultivo, mantendo-se o processo fermentativo por 12 dias.

Para confirmar a caracterização das outras lisolipinas encontradas nos extratos brutos foram feitos experimentos de CID e realizada a comparação com o perfil de fragmentação da lisolipina I. Assim, foram avaliados quatro compostos, sendo estes a hidroxilipina (m/z 616) e a lisolipina bromada (m/z 642), além da lisolipina não-halogenada (m/z 564) e contendo cloro e bromo (m/z 616).

No caso da lisolipina bromada, os íons referentes aos dois isótopos de bromo foram fragmentados (m/z 642 e 644) e para a lisolipina não-halogenada o íon de m/z 564 foi analisado. A Figura 46 apresenta os resultados obtidos.

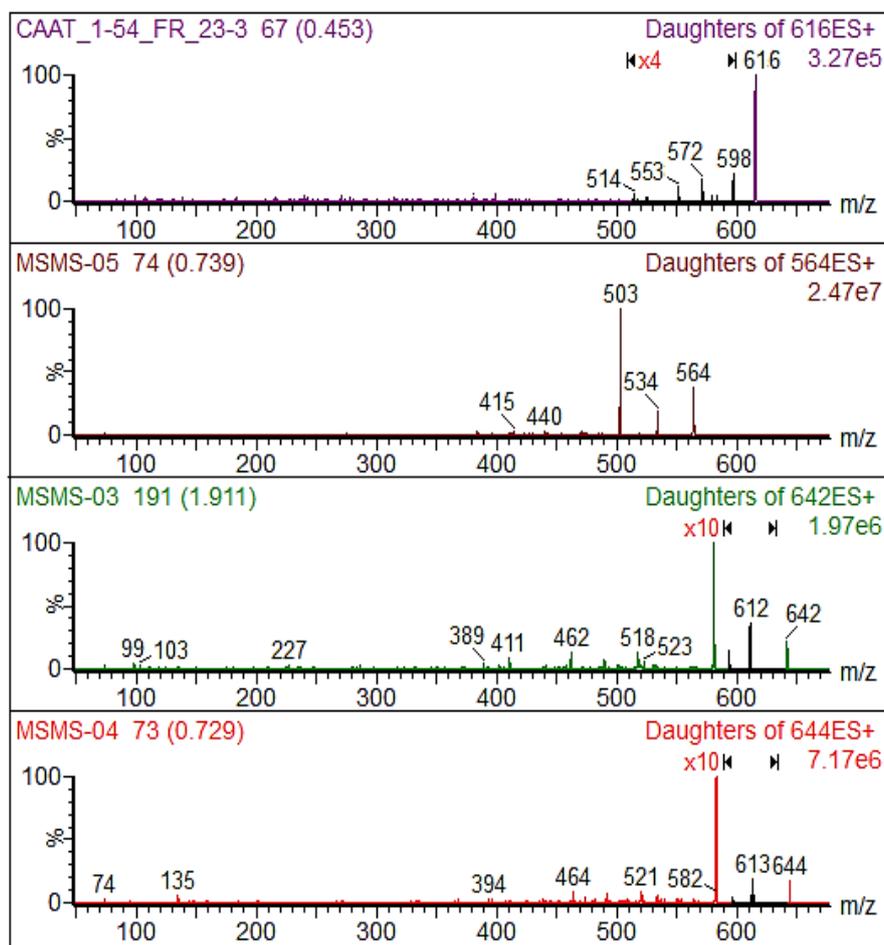


Figura 46. Espectros de CID dos íons de m/z 616 (hidroxi-lisolipina), m/z 564 (lisolipina não-halogenada), m/z 642 (lisolipina substituída com ^{79}Br) e m/z 644 (lisolipina substituída com ^{81}Br) presentes nos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54.

Foram identificadas as mesmas perdas neutras, de 30 e 61 Da, para as lisolipina bromada e não-halogenada, bem como a formação de poucos fragmentos, uma vez que tratam-se de estruturas policíclicas aromáticas, como ocorre para o perfil de fragmentação da lisolipina I. Assim foi possível caracterizar duas outras xantonas antibióticas, a lisolipina bromada, a qual corresponde troca do cloro da lisolipina I por bromo, e a lisolipina não-halogenada, tanto pela da razão isotópica do substituinte halogenado, quanto pelo perfil de fragmentação da classe química. A hidroxi-lisolipina foi caracterizada como lisolipina X, um dos precursores biossintéticos da lisolipina I. As estruturas destes compostos são apresentadas na Figura 47.

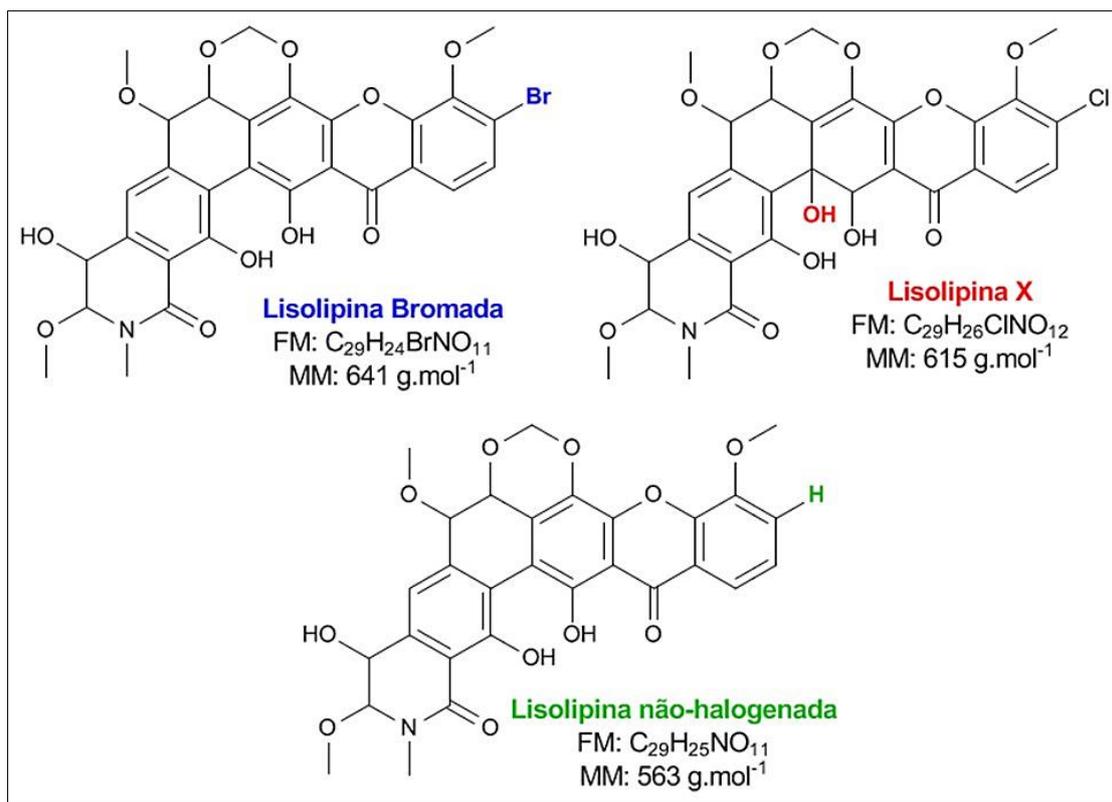


Figura 47. Estrutura química da lisolipina X e das lisolipinas bromada e não-halogenada.

Para a outra lisolipina contendo bromado e clorado. Também foram realizados experimentos de CID. De acordo perfil de fragmentação observado, o qual apresentou as mesmas perdas neutras de 30 e 61 Da, o composto foi identificado. O espectro de CID desta molécula para a uma energia de colisão de 35 eV é apresentado na Figura 48.

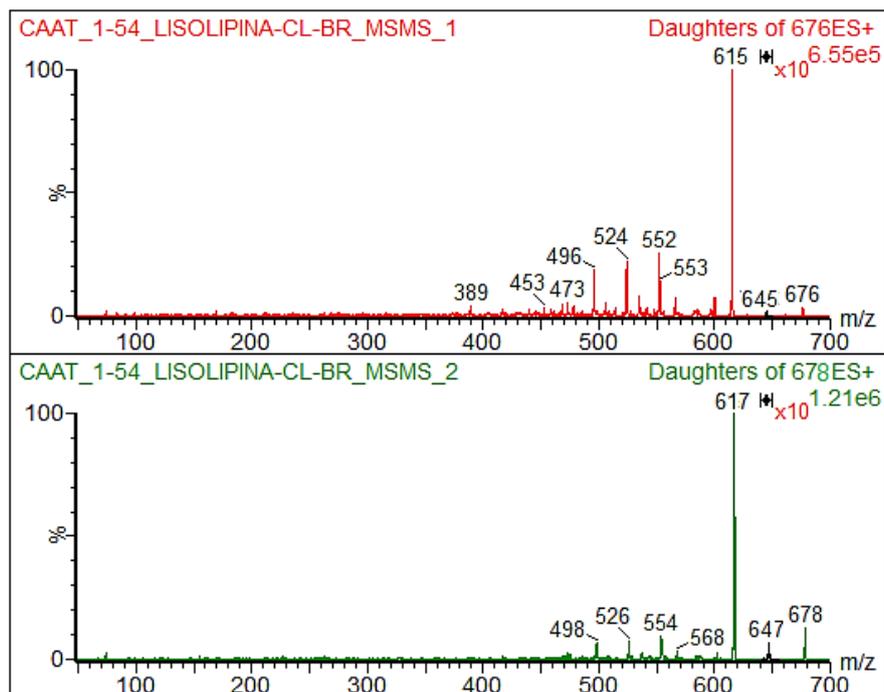


Figura 48. Espectros de CID (energia de colisão de 35 eV) para os íons de m/z 676 e 678, referentes a uma lisolipina clorada e bromada produzida pela actinobactéria Caat 1-54.

Assim, através dos perfis de fragmentação foi possível determinar as estruturas químicas das lisolipinas encontradas.

3.5.3. Estudo da influência de diferentes concentrações de NaBr no perfil químico da actinobactéria Caat 1-54

A partir dos resultados apresentados no item 4.8.2, um novo experimento foi realizado, no qual foram testadas as concentrações de 100, 200 e 300 mM de NaBr (adicionado no momento do inóculo da actinobactéria) e intervalos de tempos variados para a fermentação: 7, 12 e 20 dias. A fim de avaliar os perfis metabólicos obtidos e, principalmente, comparar a produção das lisolipinas, bromadas e não-halogenadas, todos os extratos brutos obtidos foram analisados por DI-MS e LC-PDA-MS. As Figura 49 a 51 apresentam os resultados obtidos.

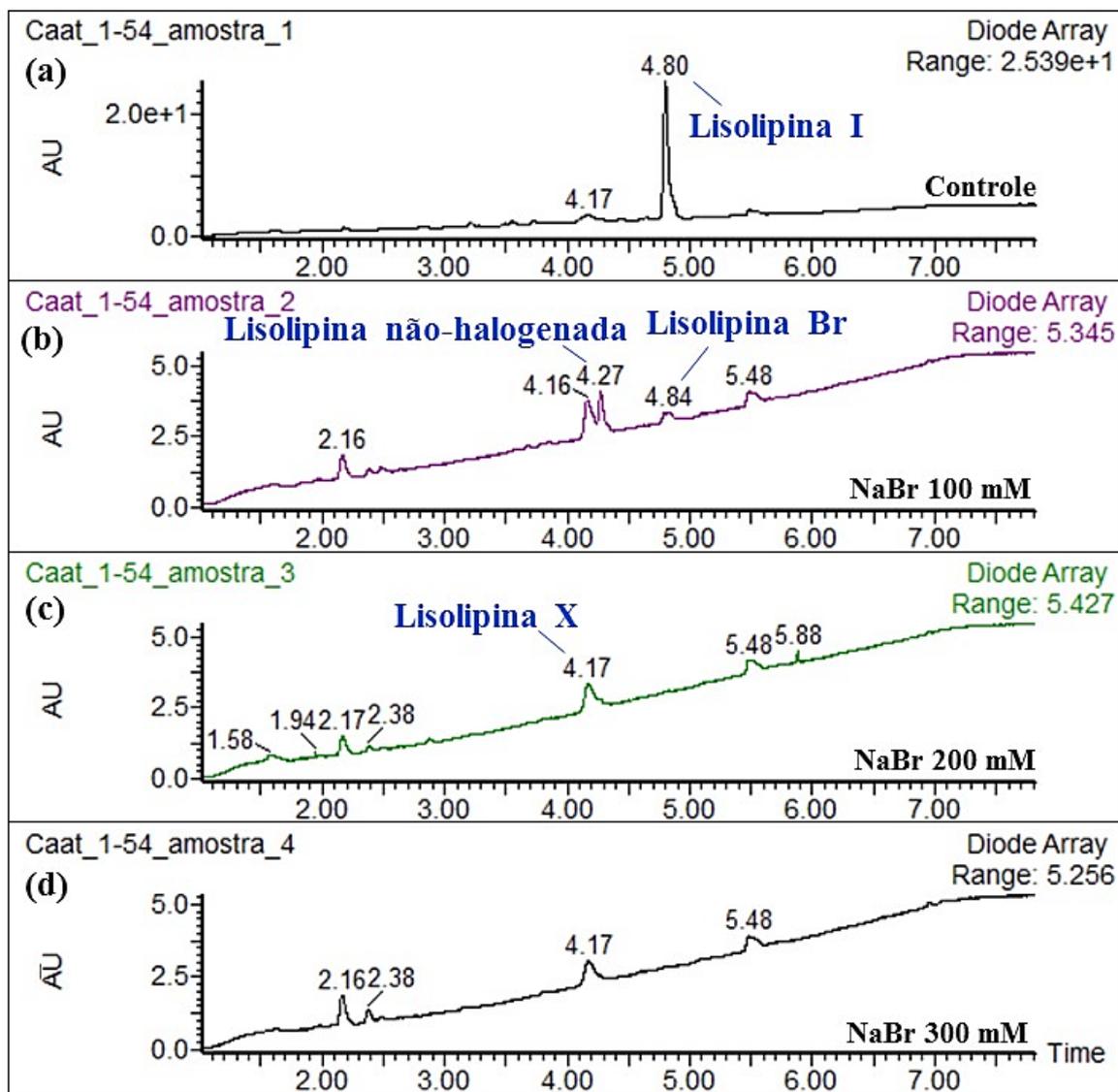


Figura 49. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 7 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.

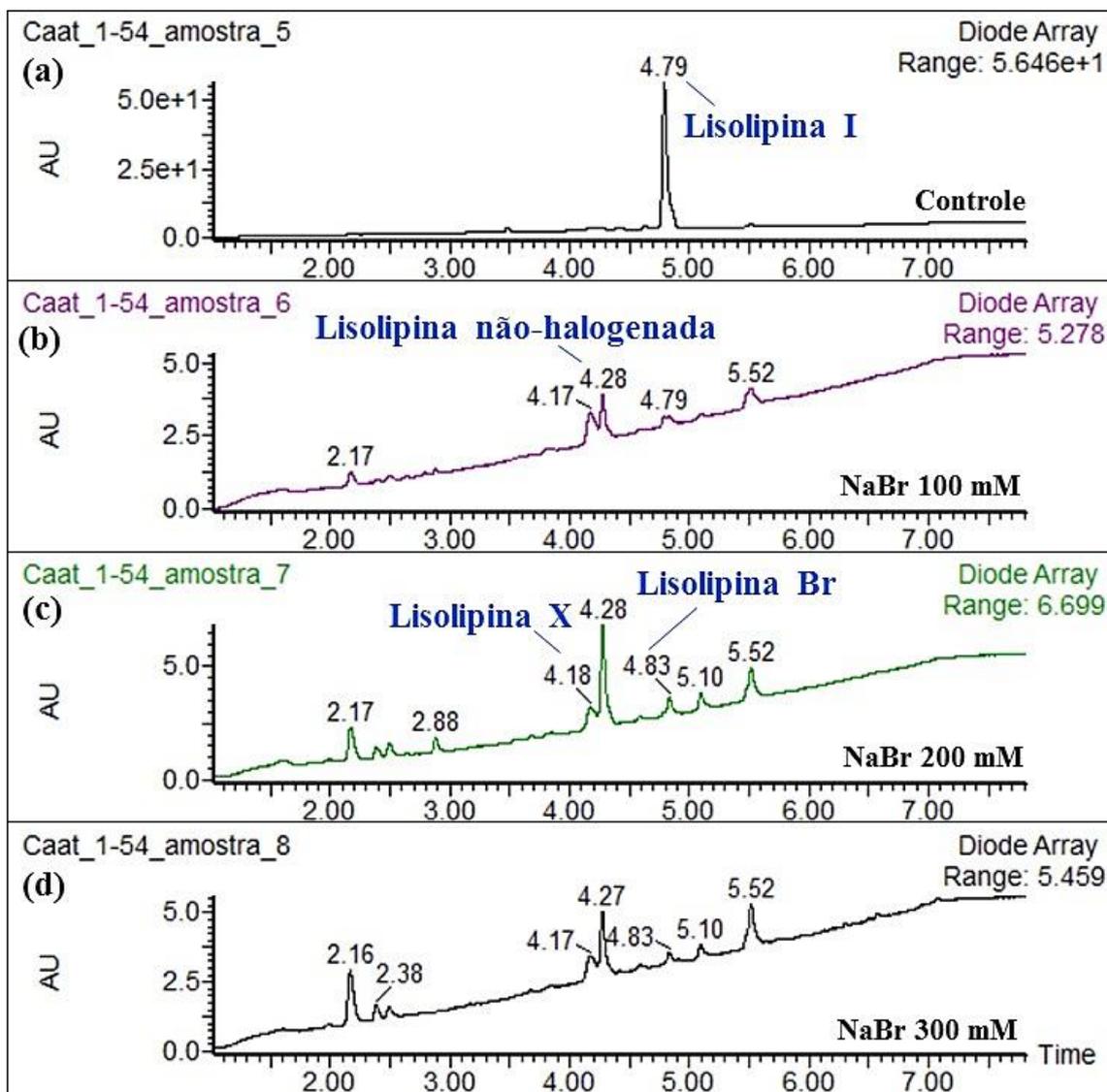


Figura 50. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 12 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.

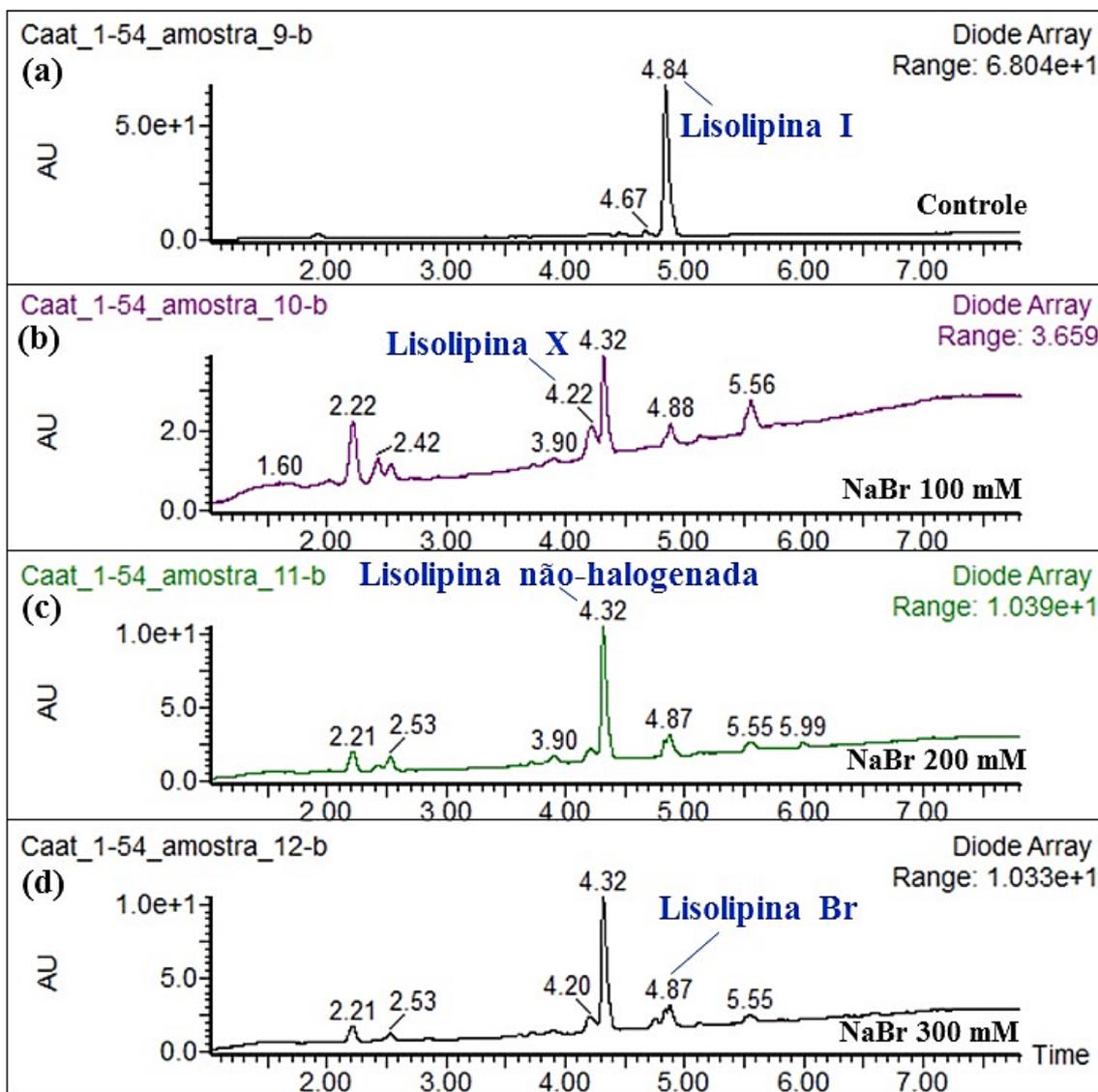


Figura 51. Cromatogramas de LC-PDA dos extratos brutos da actinobactéria Caat 1-54 provenientes da fermentação por 20 dias de (a) meio BD e meio BD suplementado com (b) 100 mM, (c) 200 mM e (d) 300 mM de NaBr.

A partir da análise dos cromatogramas de LC-PDA é possível notar que, para a fermentação mantida por 7 dias, o aumento da concentração de NaBr diminuem a biossíntese da lisolipina bromada (m/z 642) e da lisolipina não-halogenada (m/z 564). Já para a fermentação em 12 dias, a produção da lisolipina não-halogenada (m/z 564) e da lisolipina bromada (m/z 642) são mais favorecidas na concentração de 200 mM. No caso da fermentação por 20 dias, as concentrações de 200 e 300 mM favorecem a formação da lisolipina não-halogenada (m/z 564) e da lisolipina bromada (m/z 642), não diferindo

significativamente nas áreas dos picos encontradas para cada uma das concentrações. Entretanto, em todas as concentrações e períodos testados a produção de lisolipina I é inibida.

Todas as alterações observadas para os extratos brutos gerados são resultantes apenas de variações metabólicas induzidas pela composição do meio de cultivo, uma vez que as massas secas dos micélios foram medidas e mantiveram-se próximas, indicando que não houve diferença no crescimento da actinobactéria entre os meios estudados.

Desta forma, a adição de sais para a produção das lisolipinas bromada (m/z 642) é preferencialmente favorecida quando utiliza-se 200 mM NaBr e o mesmo é adicionado no momento de inóculo da actinobactéria Caat 1-54 no meio de cultivo BD, sendo o processo fermentativo mantido por 12 dias. Para 20 dias de fermentação tem-se também produção da lisolipina bromada, entretanto há maior formação da lisolipina não-halogenada (m/z 564).

3.6. Desreplicação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63

A actinobactéria Caat 2-63 mostrou-se muito ativa (de acordo com a Tabela 1) quando cultivada em meio BDA e também em meio TSBA. Este micro-organismo foi capaz de inibir o crescimento por completo de muitas das linhagens de bactérias alvo, como pode ser observada na Figura 52.

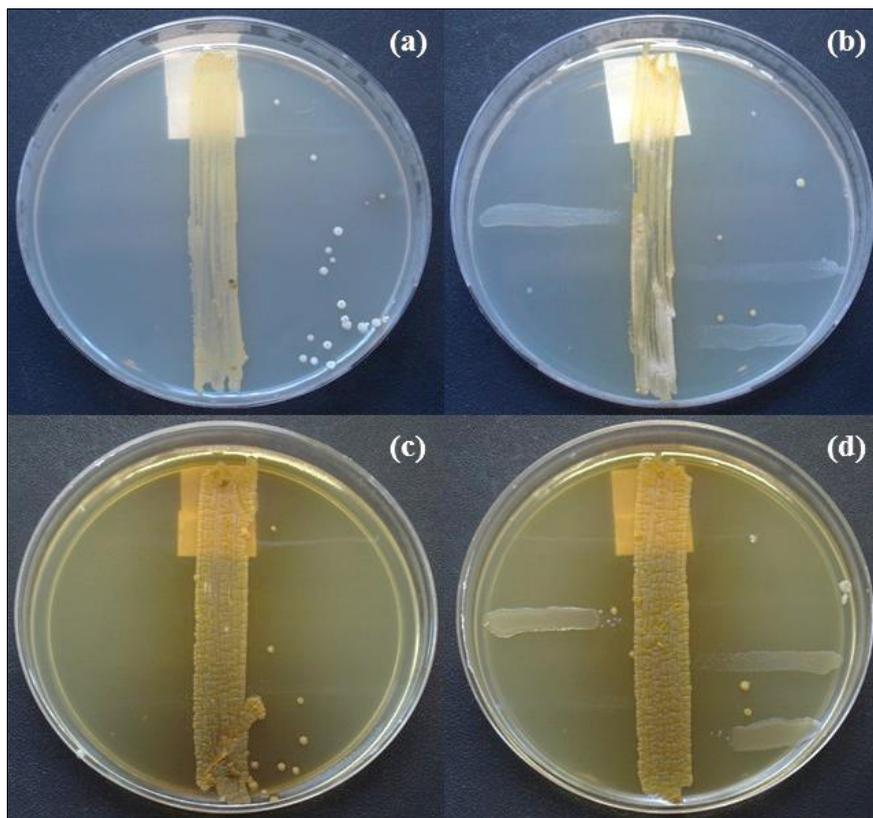


Figura 52. Resultado do bioensaio de antagonismo da actinobactéria Caat 2-63 frente as bactérias isoladas do leite de vacas contaminadas (Placa 1) em (a) meio BDA e (c) TSBA e contra as linhagens tipo (Placa 2) em (b) meio BDA e (d) TSBA.

O extrato bruto produzido a partir de fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 2-63 também foi considerado muito ativo (segunda a Tabela 4) contra as bactérias alvo Gram-positivas, como demonstrado na Figura 22.

Desta forma, para proceder com o fracionamento guiado por bioensaio e a identificação foi realizada uma fermentação em escala ampliada de 3 L de meio de cultivo e, após extração do meio de cultivo (315 mg), desenvolveu-se uma metodologia de LC-UV em escala analítica monitorando os comprimentos de onda de 240 e 350 nm. O cromatograma de LC-UV obtido para o extrato está representado na Figura 53.

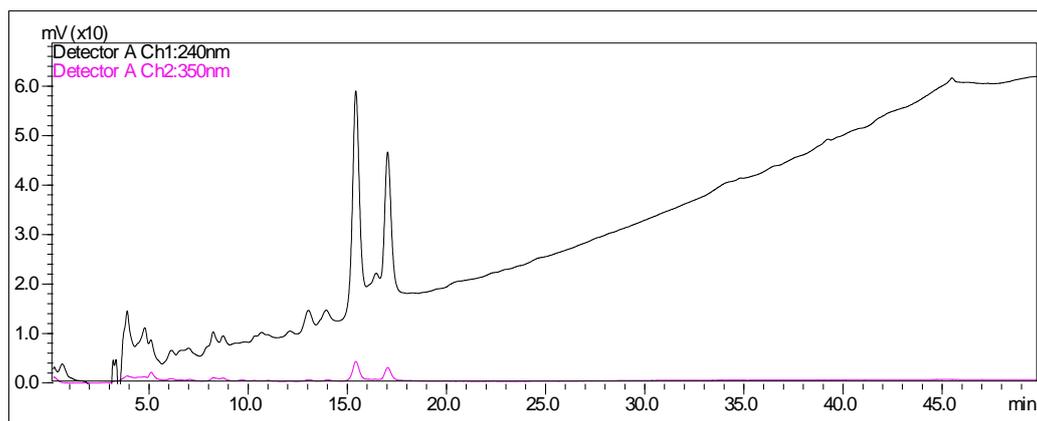


Figura 53. Cromatograma de LC-UV para o extrato bruto obtido a partir da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63.

Com base na metodologia desenvolvida por LC-UV em modo analítico, o fracionamento de aproximadamente 100 mg do extrato bruto Caat 2-63 foi realizado em escala preparativa. Foram coletadas frações a cada minuto do desenvolvimento cromatográfico, totalizando 48 frações. Em sequência, cada fração foi ensaiada contra a bactéria *Staphylococcus aureus* 211 para identificar a presença ou não de compostos ativos em cada uma delas. A Figura 54 mostra o resultado do fracionamento e *screening* das frações coletadas.

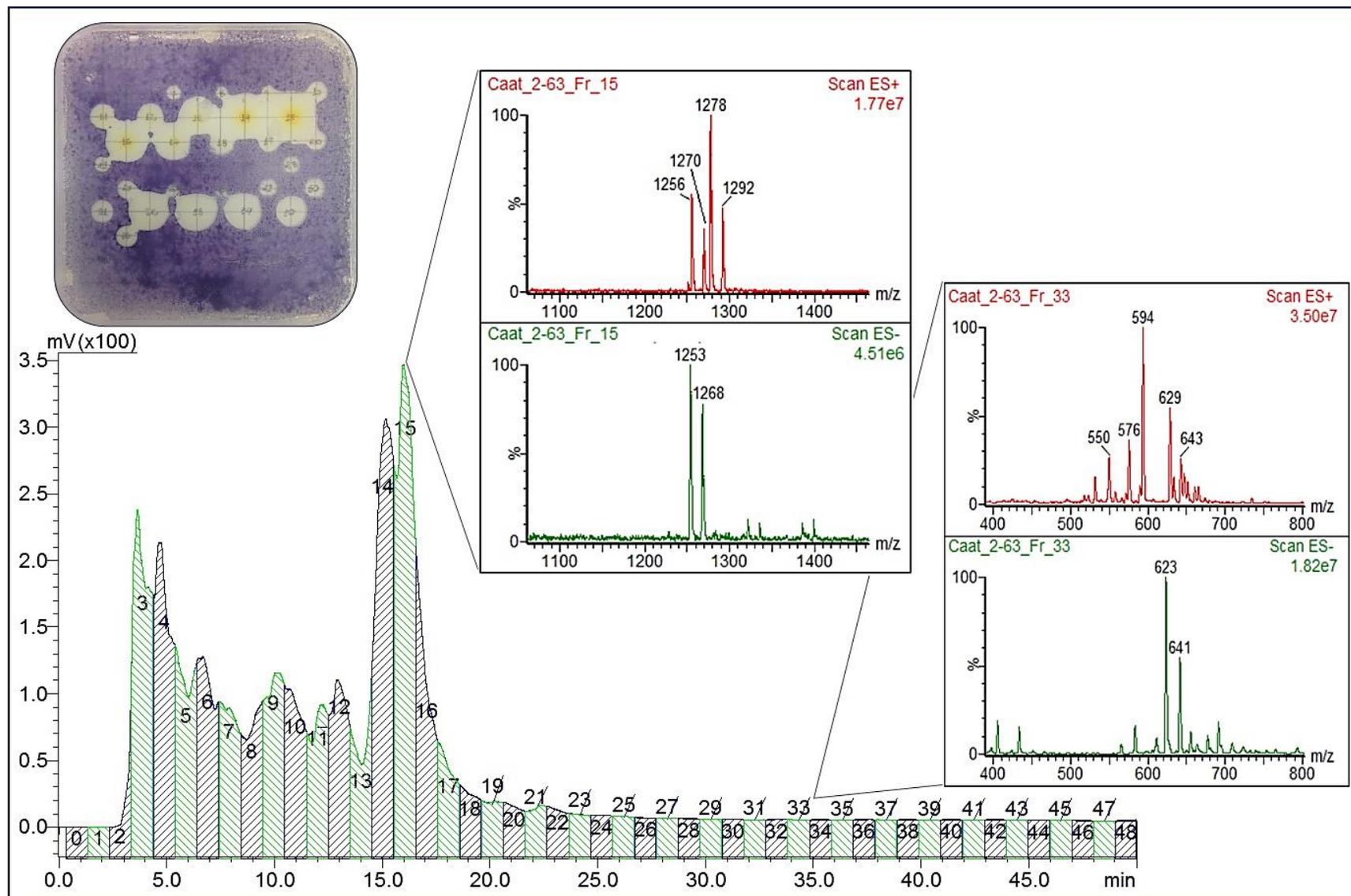


Figura 54. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio para extrato bruto produzido pela actinobactéria *Caat 2-63*

Para este extrato foi possível observar 2 conjuntos de frações com atividade antimicrobiana com características químicas bem distintas quanto a polaridade, uma vez que os tempos de retenção são diferentes, além da absorção de luz diferente para os comprimentos de onda monitorados no fracionamento, indicando a presença de grupos cromóforos para apenas uma delas.

Além da triagem biológica, todas as frações foram analisadas por DI-MS para auxiliar no processo de identificação dos compostos ativos. A Figura 55 apresenta os espectros de massas por ESI das frações ativas Fr14 e Fr15, em modo positivo e negativo.

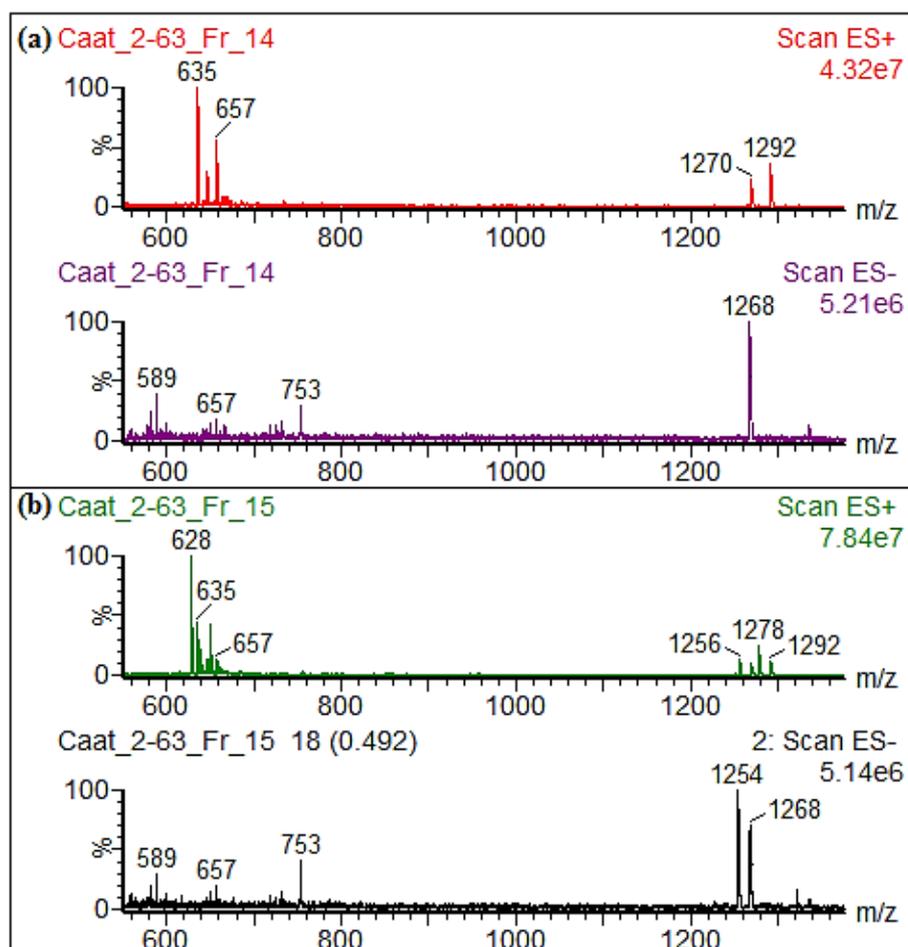


Figura 55. Espectros de massas (ESI+ e ESI-) das frações ativas (a) Fr14 e (b) Fr15 do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 2-63.

A análise dos espectros de massas permite inferir que a fração Fr14 apresenta um composto de massa molecular 1269 u, pois nos espectros de ESI+ observam-se os íons de m/z 1270 e 1292, referentes as espécies $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, enquanto que no modo ESI- tem-se a espécie $[M-H]^-$, de m/z 1268. A partir destes íons pode-se observar também a formação das espécies $[M+2H]^{2+}$ e $[M+H+Na]^{2+}$, com m/z de 635 e 657. Na Fr15 nota-se uma mistura de compostos, sendo um de massa molecular 1269 u (presente na Fr14) e outro 1255 u, uma vez que estão presente no espectro de ESI+ e ESI- as espécies, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-H]^-$, de m/z 1256, 1278 e 1254, respectivamente, as quais permitiram identificar as espécies $[M+2H]^{2+}$ e $[M+H+Na]^{2+}$, com m/z de 628 e 650.

Para obter mais informações estruturais acerca dos compostos ativos presentes nas frações Fr14-15, experimentos de CID foram realizados. A Figura 56 apresenta os perfis de fragmentação obtidos para os dois íons, de m/z 1256 e 1270.

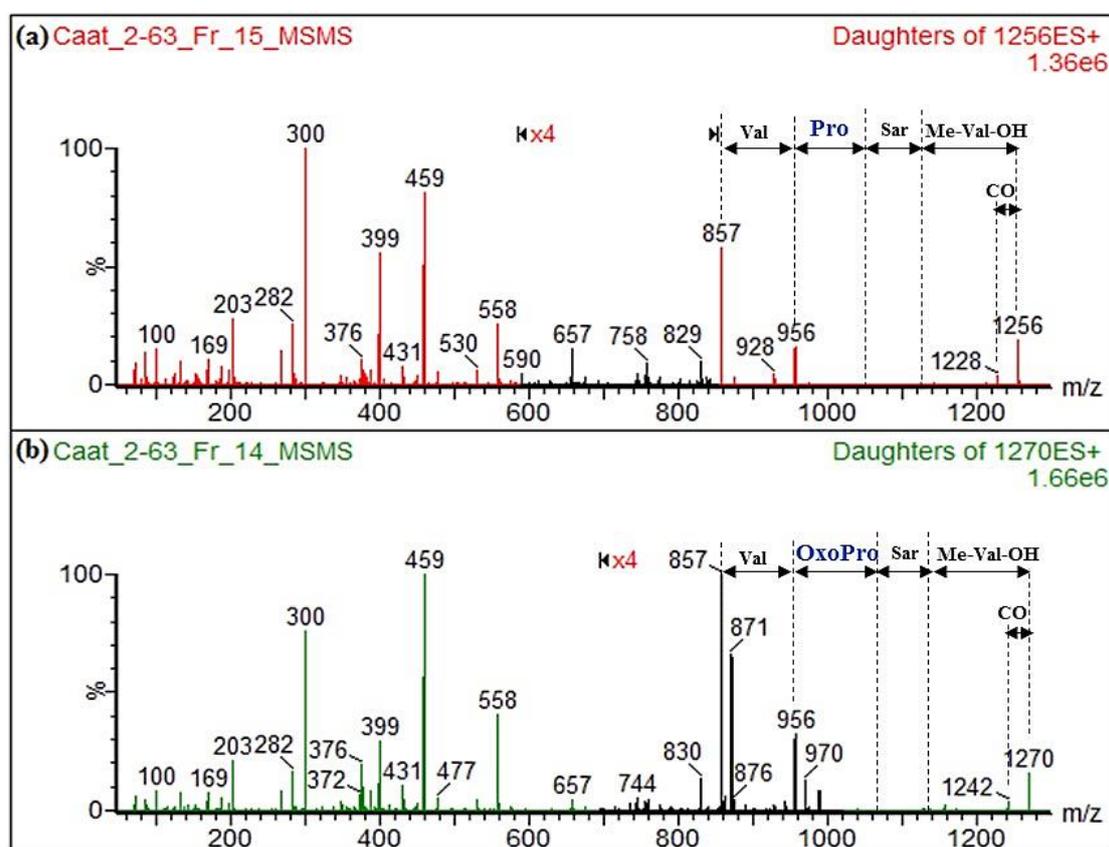


Figura 56. Espectro de CID, empregando energia de colisão de 40 eV, para os íons de m/z 1256 e 1270.

Baseado nas informações sobre a massa molecular e comprimentos de onda de absorção, bem como fonte biológica (*Streptomyces* sp.) foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products*, a qual resultou em dois compostos da classe das actinomicinas como candidatos mais prováveis. Deste modo, realizou-se uma busca na literatura e segundo Liu e colaboradores os perfis de fragmentação apresentados pelos íons de m/z 1256 e 1270 são os mesmos apresentados para actinomicina D e actinomicina V, respectivamente, corroborando com os resultados da busca no banco de dados de produtos naturais.

Assim, os compostos presentes nas frações ativas Fr14 e Fr15 foram identificados como sendo actinomicina D e actinomicina V. As estruturas químicas destas moléculas está representada na Figura 57.

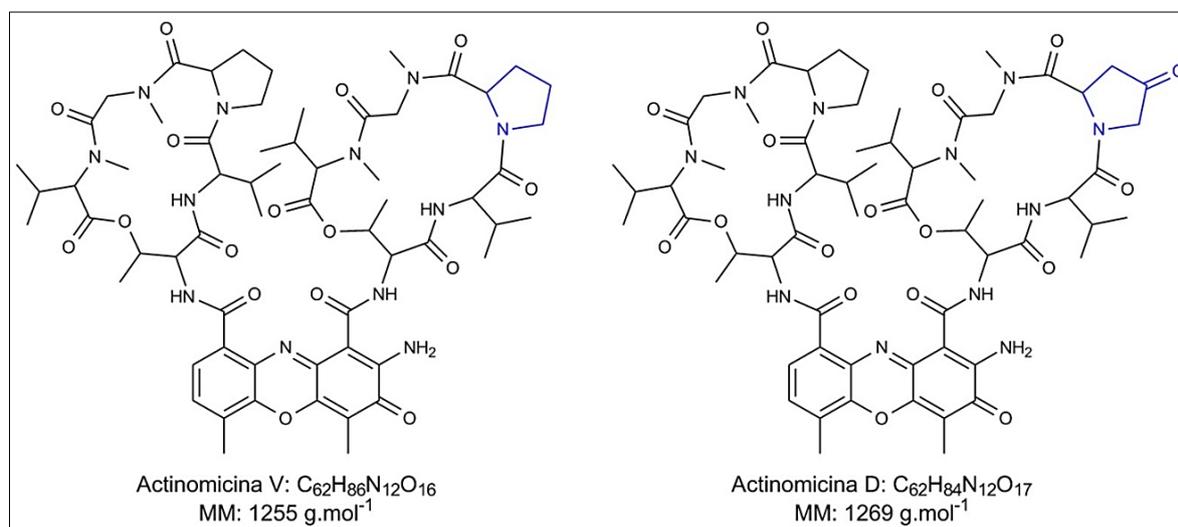


Figura 57. Estrutura química das actinomicinas D e V, presentes nas frações ativas Fr14-15 do extrato bruto produzido pela actinobactéria Caat 2-63.

As actinomicinas são cromopeptídeos antibióticos conhecidos por suas atividades tanto antimicrobiana como antitumoral, e apresentam em sua estrutura base um anel fenoxazona, que é o grupo cromóforo, ligado a dois depsipentapeptídeos lactônicos cíclicos. As modificações nos aminoácidos destas cadeias peptídicas resultam na formação das diferentes

moléculas que compõem esta classe química. Tais compostos são de grande interesse na área da saúde e por este motivo são muitos estudados por diversos grupos de pesquisa, o que comprova sua importância.^{94,95} As actinomicinas ligam-se fortemente ao DNA, através da intercalação do anel de fenoxazona entre pares de bases guanina-citosina, inibindo a síntese de RNA, sendo a formação de RNA ribossômico a mais sensível à ação do fármaco. Desta forma, a replicação do DNA não é fortemente reduzida, porém a síntese de proteínas é bloqueada.⁹⁶ Como estes antibióticos antitumorais possuem anéis insaturados eles também podem atuar na produção de radicais livres reativos, além de atuarem também como inibidores enzimáticos.⁹⁷

Com base nos espectros de CID apresentados na Figura 56, foi traçada uma proposta de fragmentação para explicar a formação de alguns dos principais íons produtos observados, representada na Figura 58.

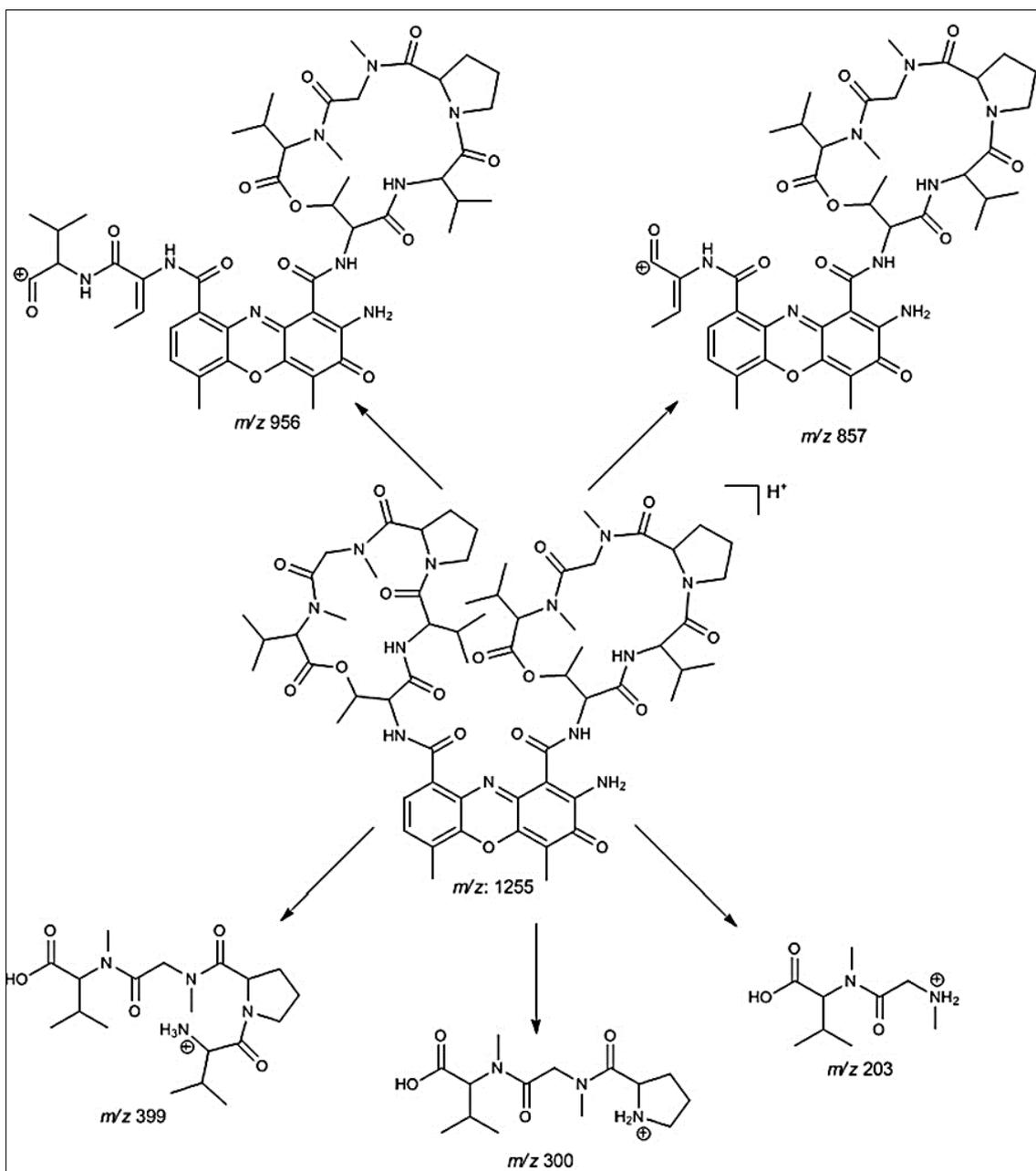


Figura 58. Proposta de fragmentação para a actinomicina D.

O íon produto de m/z 956 foi atribuído a perda dos aminoácidos Pro-Sar-MeVal (299 Da), o íon de m/z 857 foi atribuído a perda dos aminoácidos Val-Pro-Sar-MeVal (398 Da). Consequentemente, também foram observados os íons produtos referentes a estes aminoácidos ionizados com m/z 300 e m/z 399. O íon de m/z 558 é formado pelas perdas consecutivas dos aminoácidos Val-Pro-Sar-MeVal e Pro-Sar-MeVal das duas cadeias

peptídicas. Enquanto que o íon de m/z 459 é formado pela perda de Val-Pro-Sar-MeVal das duas cadeias peptídicas.

Para o espectro de CID da actinomicina V foi observado o mesmo padrão de fragmentação da actinomicina D, com a formação dos íons de m/z 970 e 871, referentes as perdas dos aminoácidos contendo oxo-prolina.

As actinomicinas são uma importante classe química formada pela via peptídeo não ribossomal (NRPS), com a ciclização ocorrendo através da formação de uma lactona utilizando a hidroxila do resíduo de treonina, e a formação do anel fenoxazinona por meio da fusão de duas unidades de derivados de ácido antranílico.^{98,99}

Uma análise mais detalhada dos íons observados nos espectros de ESI+, mostrou a presença de íons de m/z na região de 550 a 800. Como a biossíntese da actinomicina D (Figura 59) envolve uma série de peptídeos precursores ligados ao ácido 3-hidroxi-4-metil-antrnílico, esses íons podem estar relacionados com algum intermediário biossintético das actinomicinas.

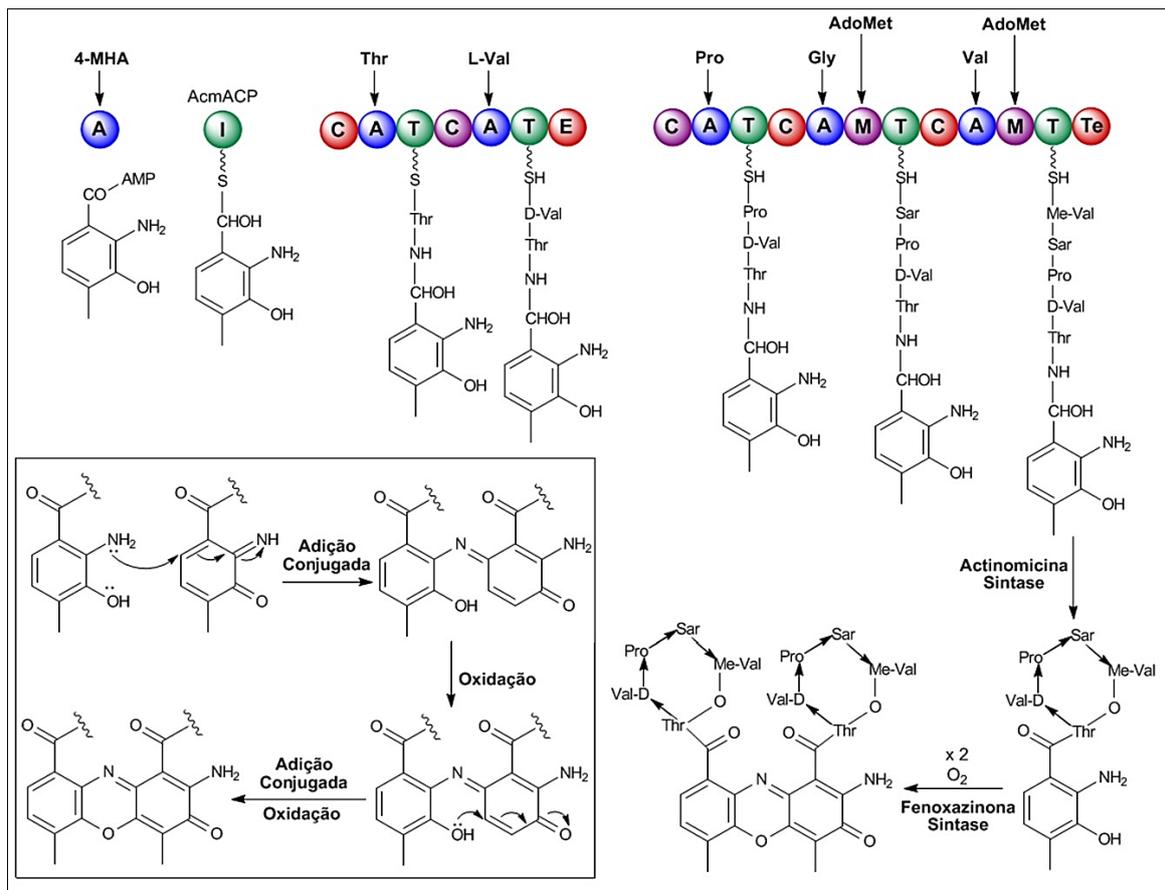


Figura 59. Via biossintética da actinomicina D.

A Figura 60 apresenta os espectros de massas das frações Fr7 e Fr8, que contém estes possíveis intermediários.

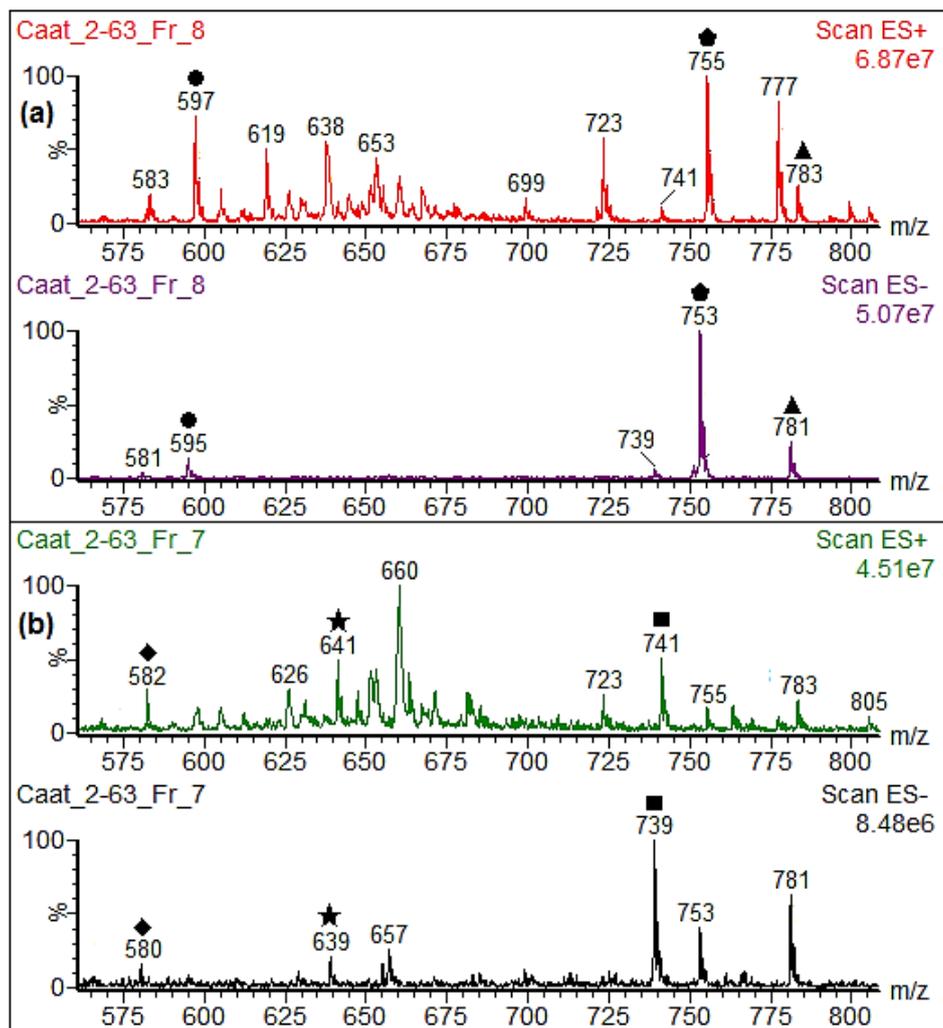


Figura 60. Espectros de DI-MS das frações (a) Fr8 e (b) Fr 7, provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 2-63.

Os íons assinalados foram submetidos a estudos de fragmentação e os espectros de CID para energia de colisão de 30 eV são apresentados na Figura 61.

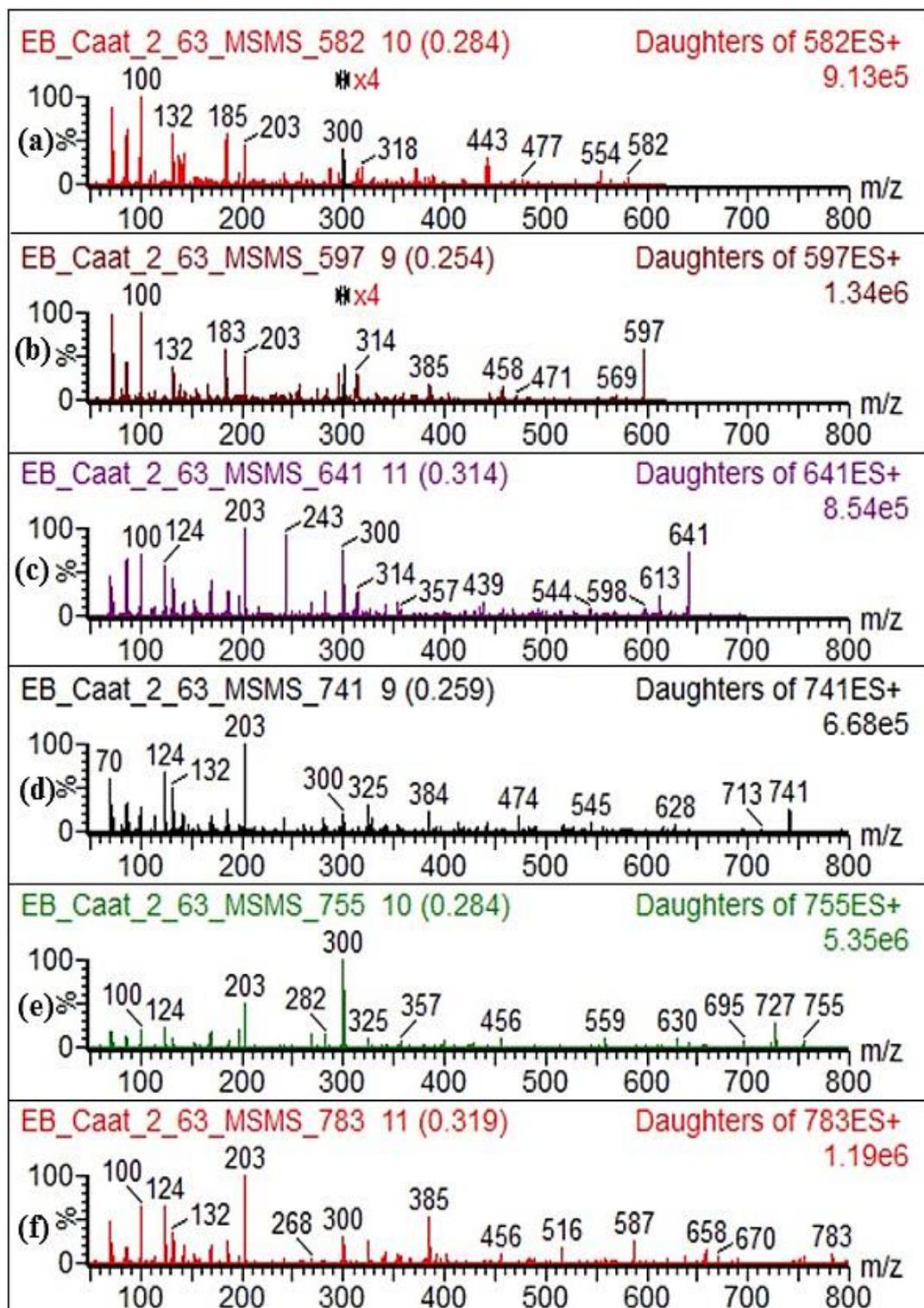


Figura 61. Espectros de CID (energia de colisão de 30 eV) para os íons de (a) m/z 582, (b) m/z 597, (c) m/z 641, (d) m/z 741, (e) m/z 755 e (f) m/z 783.

A partir dos resultados obtidos, nota-se que os íons analisados apresentaram em seu perfil de fragmentação alguns íons observados no espectro de CID da actinomicina D (Figura 55), especialmente os íons de m/z 203 e 300, além da perda neutra de 398 Da.

Tal fato indica que estes compostos são possíveis intermediários da via NRPS da síntese da actinomicina D, uma vez que apresenta em sua estrutura uma parte conservada da cadeia peptídica Pro-Sar-MeVal (398 Da).

O outro conjunto de frações ativas (Fr 30 a 36) presente no extrato bruto Caat 2-63 não pode ainda ser identificado, pois uma pequena quantidade em massas foi obtida, de forma que serão necessários experimentos posteriores para proceder com a caracterização.

3.7. Estudo empregando DESI-TLC-MS e bioautografia em TLC para avaliação do extrato bruto Caat 2-63

Com a finalidade de acelerar o processo de identificação de substâncias ativas presentes em extratos brutos produzidos por actinobactérias, um ensaio de DESI-TLC-MS associado a bioautografia em TLC foi realizado. Desta forma, um halo de inibição identificado por meio do ensaio de bioautografia poderia ser avaliado por MS através da análise *in situ* da placa de TLC na qual o extrato está fracionado.

Através dessa metodologia o extrato bruto proveniente da fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 2-63 foi estudado. Inicialmente foi realizado o ensaio de bioautografia em TLC frente as linhagens isoladas SCN, *Staphylococcus aureus* 211, *Streptococcus agalactiae*, além das linhagens tipo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* como descrito no item 5.3.8. A Figura 62 apresenta os resultados obtidos.

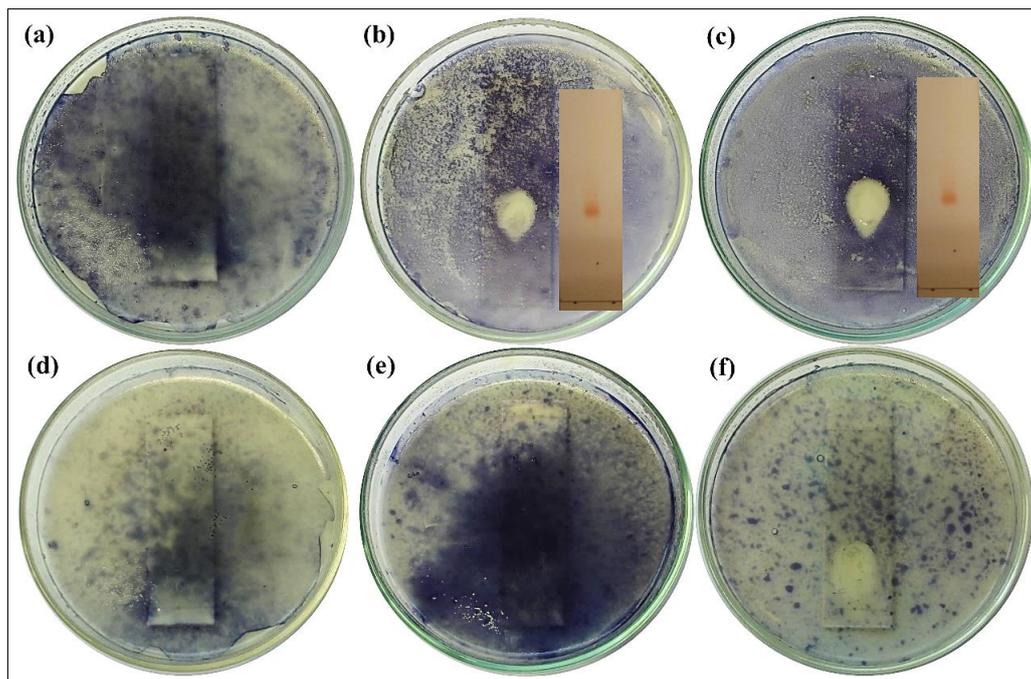


Figura 62. Bioautografia em TLC do extrato bruto Caat 2-63 frente as linhagens (a) SCN, (b) *Staphylococcus aureus* 211, (c) *Streptococcus agalactiae*, (d) *Staphylococcus aureus*, (e) *Pseudomonas aeruginosa* e (f) *Escherichia coli*.

O extrato bruto apresentou apenas um halo de inibição contra as bactérias *Staphylococcus aureus* 211, *Streptococcus agalactiae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Então, para identificar os compostos presentes no extrato bruto responsáveis pela atividade antimicrobiana observada, uma placa de TLC referência (preparada com a mesma quantidade de extrato bruto e eluída nas mesmas condições da placa utilizada na bioautografia) foi analisada por DESI-MS. A análise direta da região correspondente ao halo de inibição observado apresentou o espectro de massas da Figura 63.

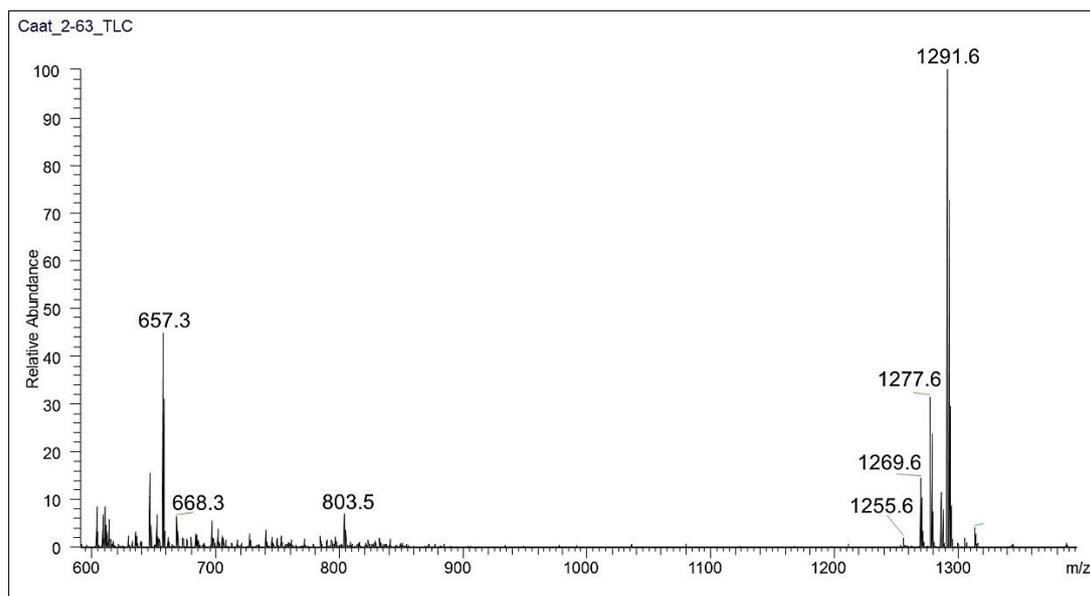


Figura 63. Espectro de DESI-TLC-MS para região da placa de TLC correspondente ao halo de inibição observado no ensaio de bioautografia do extrato bruto Caat 2-63.

Pode-se observar a presença de actinomicina D e V no espectro de massas obtido, de acordo com os sinais de m/z 1255-1277 e 1269-1291 referentes às espécies $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ de cada um dos compostos, respectivamente.

As regiões da placa de TLC próximas ao halo de inibição observado no ensaio de bioautografia também foram analisadas e foi possível observar os demais peptídeos provenientes da biossíntese da actinomicina D, encontrados nas Fr7 e Fr8, como mostram os espectros da Figura 64.

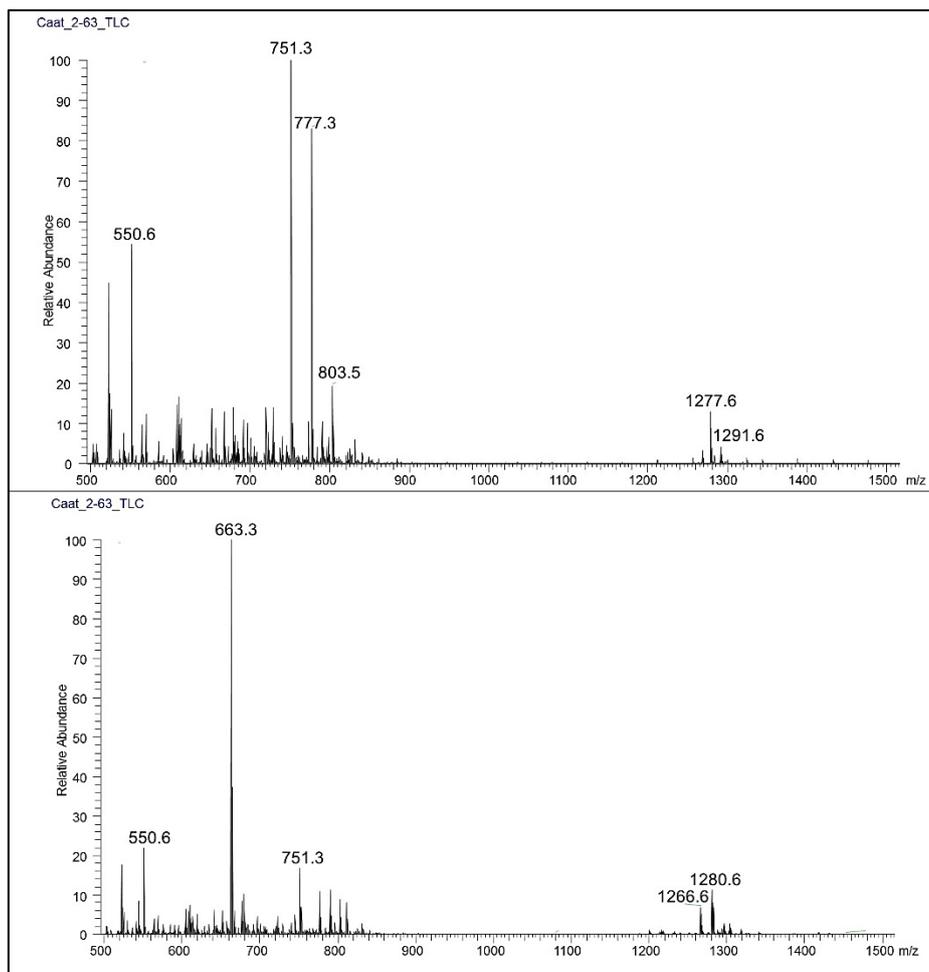


Figura 64. Espectros de DESI-TCL-MS de regiões próximas ao halo de inibição identificado no ensaio de bioautografia para o extrato bruto Caat 2-63.

Os resultados obtidos permitiram relacionar rapidamente quais compostos presentes no extrato bruto eram responsáveis pela atividade antimicrobiana observada. Assim, a metodologia empregada mostrou-se eficiente, demonstrando a potencialidade das análises por DESI-TCL-MS aliadas a bioautografia em TLC no processo de desreplificação, uma vez que tal protocolo atuou como uma importante ferramenta para acelerar a identificação de moléculas bioativas em misturas complexas, como são os extratos brutos.

3.8. Desreplicação do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25

O extrato bruto produzido pela fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 8-25 foi considerado promissor dentre os extratos avaliados pelo bioensaio de disco-difusão por apresentar uma atividade pronunciada com as linhagens de bactérias Gram-negativas, e ainda possuir atividade moderada contra bactérias Gram-positivas (Figura 20). Tal atividade biológica torna o extrato bruto promissor diante do cenário atual, no qual há uma busca incessante por antibióticos capazes de combater linhagens de bactérias Gram-positivas, entretanto o apelo maior reside em encontrar antibióticos capazes de tratar eficazmente doenças infecciosas provocadas por bactérias Gram-negativas.^{100,101}

O perfil metabólico obtido para este extrato mostrou a presença de alguns íons, como mostra o espectro de DI-MS, apresentado na Figura 65.

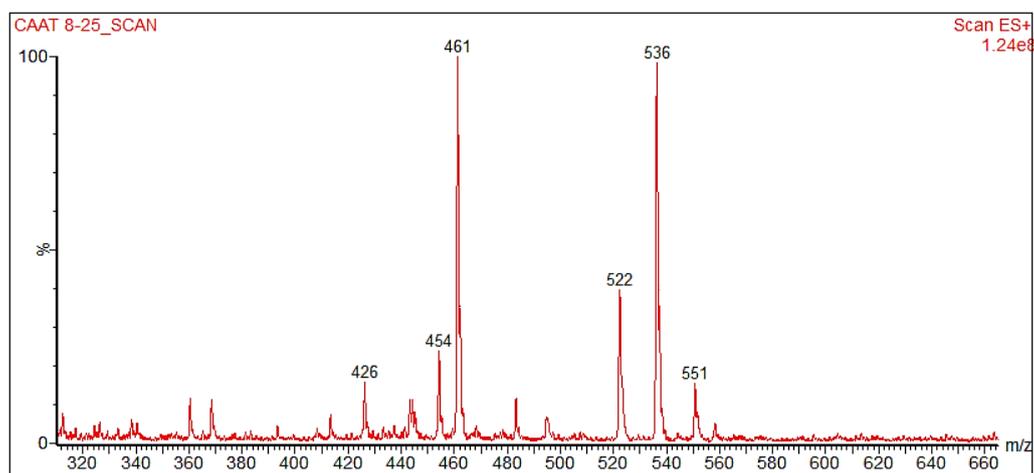


Figura 65. Ampliação do espectro de DI-MS (ESI+) do extrato bruto proveniente da fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 8-25.

Sendo assim, meio BD foi fermentado em maior volume para produção de mais extrato bruto, a fim de fracioná-lo para identificar os compostos ativos. Após a extração do meio de cultivo e obtenção do extrato, foi desenvolvida a metodologia de LC-UV a ser empregada no

fracionamento. Para tal, primeiramente foram realizadas análises em escala analítica empregando os comprimentos de onda máximo identificados nas análises de DI-PDA-MS, 260 e 370 nm. A Figura 66 apresenta o cromatograma de LC-UV obtido

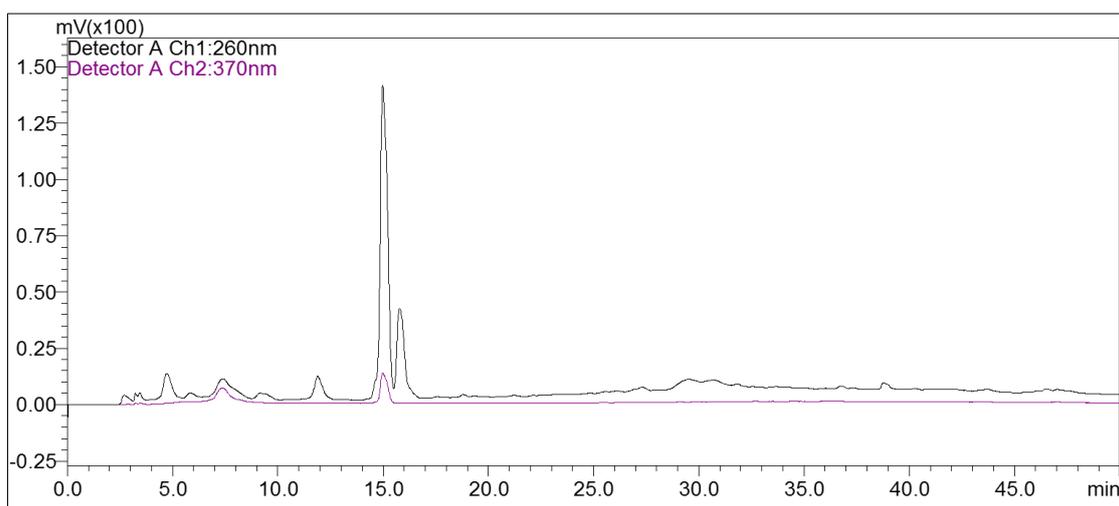


Figura 66. Cromatograma de LC-UV para o extrato bruto Caat 8-25 obtido a partir da fermentação de meio BD.

Utilizando a metodologia de LC-UV desenvolvida, o extrato bruto Caat 8-25 foi fracionado em escala preparativa. Coletando-se frações minuto a minuto, durante todo o desenvolvimento cromatográfico, sendo um total de 48 frações. Em seguida, cada uma delas foi ensaiada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* 211 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.859 para identificar a presença ou não de compostos ativos.

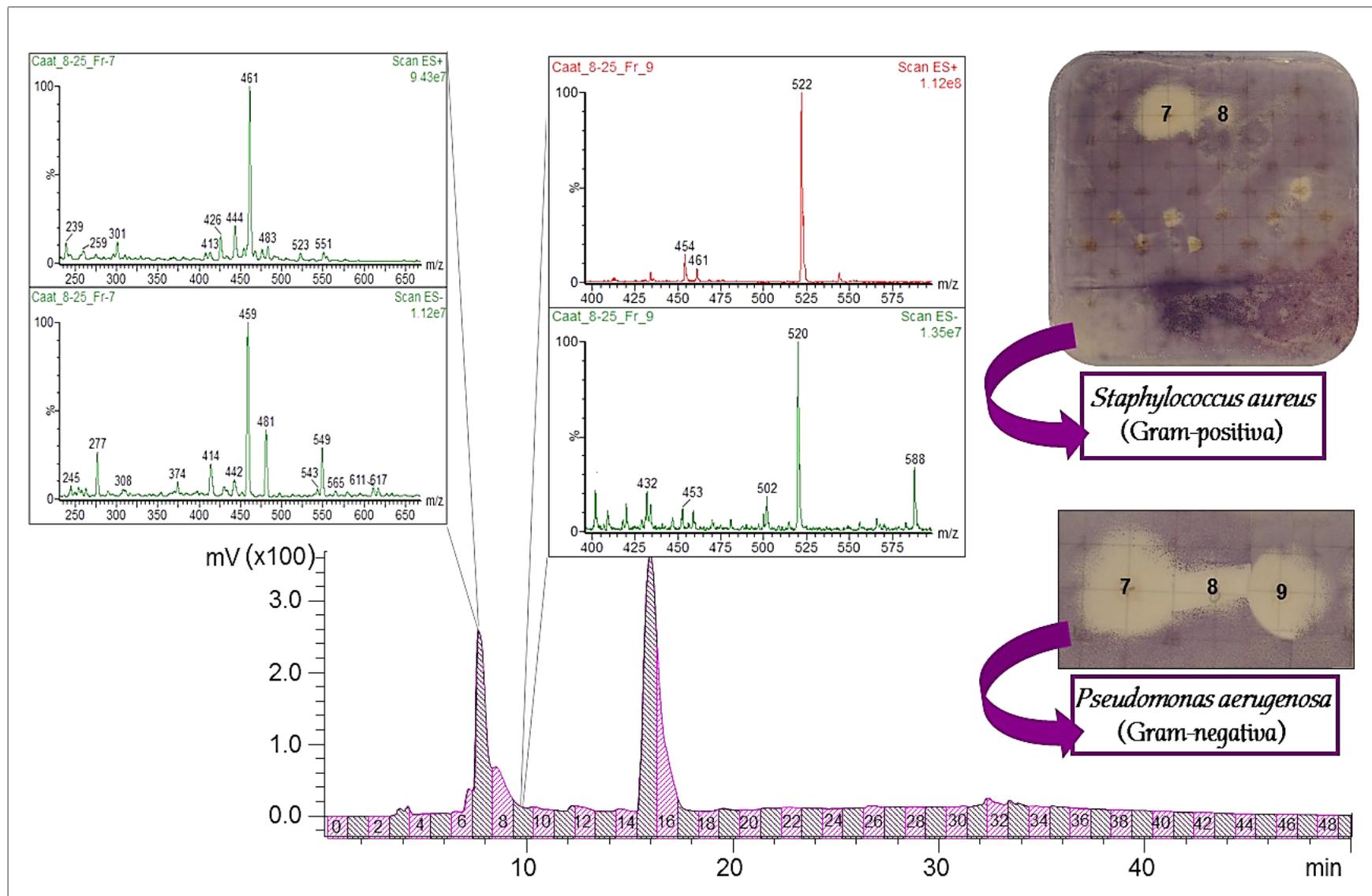


Figura 67. Esquema dos resultados obtidos para o fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto Caat 8-25 obtido a partir da fermentação de meio BD.

Para este extrato foi possível notar a atividade antimicrobiana das frações através de halos de inibição de pequeno diâmetro quando comparado aos demais extratos brutos triados por meio do fracionamento guiado por bioensaio. Observou-se que as frações Fr7 e Fr8 apresentaram atividade contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* 211 e bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.859, enquanto que a fração Fr9 foi ativa somente contra a bactéria Gram-negativa.

Além da triagem biológica, todas as frações foram analisadas por DI-MS para que o processo de desreplicação pudesse ser realizado. Os espectros de massas obtidos para as frações ativas encontram-se na Figura 68.

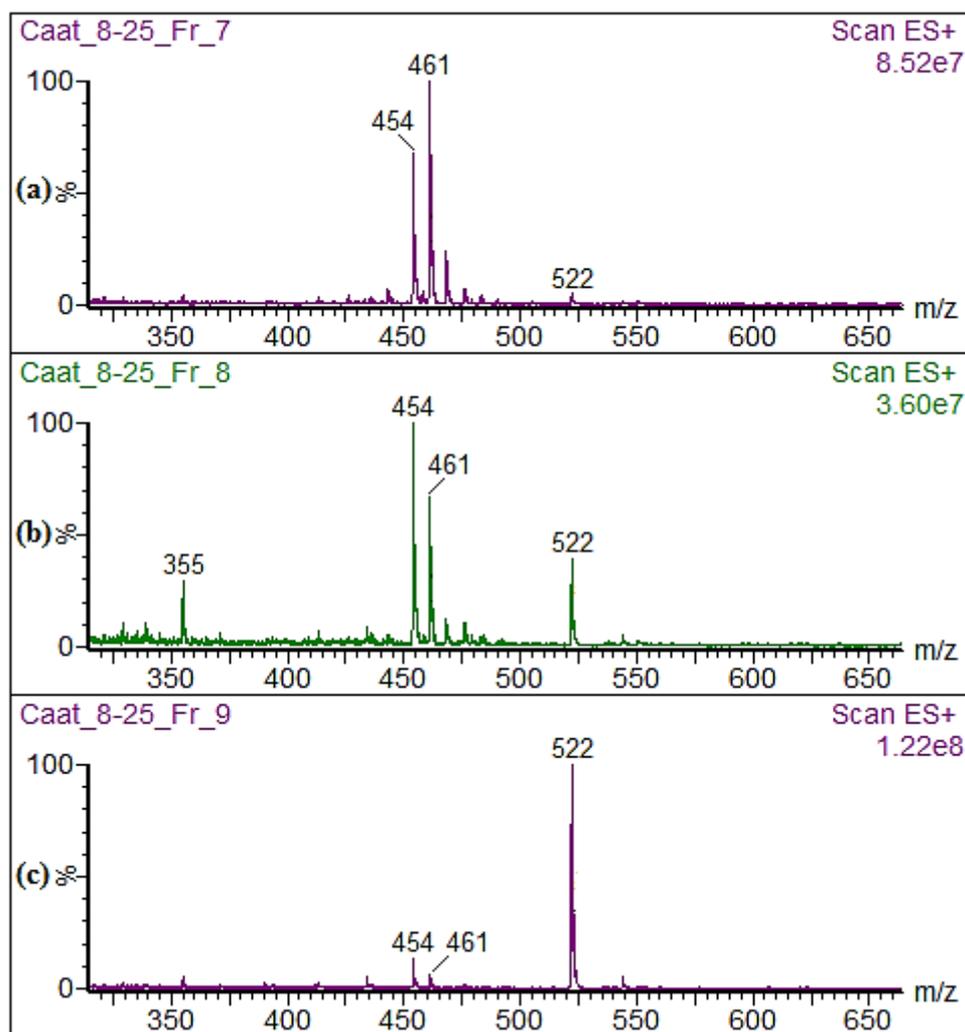


Figura 68. Espectros de massas (ESI+) obtidos para as frações ativas (a) Fr7, (b) Fr8 e (c) Fr 9, provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 8-25.

A análise dos espectros de massas das frações ativas Fr7 a 9 permitiu identificar a uma mistura de compostos, demonstrando que a metodologia de LC-UV empregada não foi eficiente para a separação cromatográfica das moléculas ativas. Para as frações Fr7 e 8 pode-se notar um íon de m/z 461 com grande intensidade, além dos sinais de m/z 454 e 522, todos os 3 referentes as espécies $[M+H]^+$. Diante da diminuição da intensidade do sinal de m/z 461 ao longo das Fr7 a 9 e da diminuição do halo de inibição para estas frações no ensaio contra a bactéria Gram-positiva, inferiu-se a atividade antimicrobiana contra linhagens Gram-positivas está relacionada ao composto de massa molecular 460 u.

Para o composto de m/z 461 foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products* e um dos resultados sugeridos foi o antibiótico oxitetraciclina. Para confirmar a identidade da molécula foram então realizados experimentos de CID para o íon presente na Fr7 e para o composto padrão. A Figura 69 mostra os resultados obtido para energia de colisão de 20 eV.

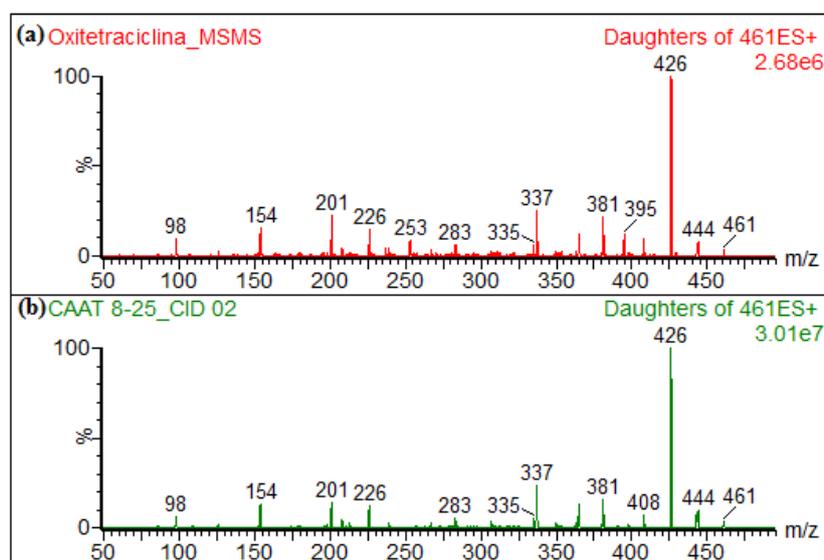


Figura 69. Espectros de CID (energia de colisão de 20 eV) do íon de m/z 461 do (a) composto padrão e (b) presente nas frações ativas do extrato bruto Caat 8-25.

O íon de m/z 461, presente nas frações ativas do extrato bruto Caat 8-25, apresentou o mesmo perfil de fragmentação da oxitetraciclina, confirmando assim a proposta do banco de

dados. Para identificar qual dos picos cromatográficos do extrato bruto eram referentes a oxitetraciclina, foi realizada a análise por LC-UV do composto padrão e extrato bruto, como mostra a Figura 70.

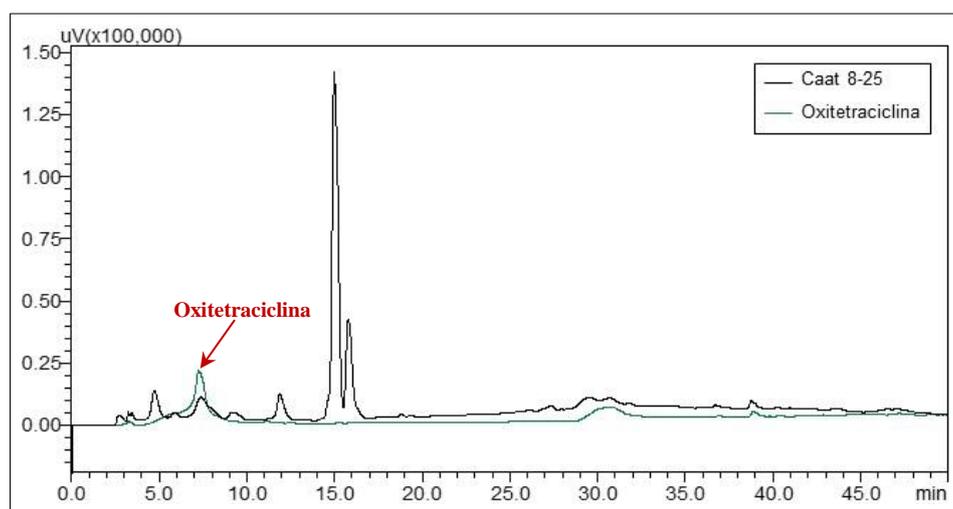


Figura 70. Cromatograma de LC-UV ($\lambda = 370$ nm) para o (■) extrato bruto Caat 8-25 e (■) oxitetraciclina.

Diante da coincidência dos tempos de retenção entre o extrato e oxitetraciclina padrão, bem como o mesmo perfil de fragmentação para ambos o composto de massa molecular 460 u presente nas frações ativas foi identificado como oxitetraciclina. A Figura 71 apresenta a estrutura química da deste composto.

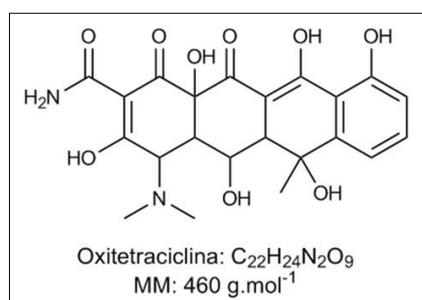


Figura 71. Estrutura química da oxitetraciclina.

A oxitetraciclina é um antibiótico pertencente a classe das tetraciclina, que apresentam atividade especialmente contra bactérias Gram-positivas, mas também contra algumas linhagens Gram-negativas. Tal classe é caracterizada por um núcleo base de quatro anéis

fundidos, substituídos com os mais diversos grupos funcionais. As tetraciclina são utilizadas em larga escala mundialmente e foram os primeiros antibióticos a serem empregados na agropecuária, sua eficácia comprovada, baixo custo e alta solubilidade em água favoreceram o uso destes compostos, tornando-os muito atrativos para a indústria farmacêutica.^{102,103}

Para confirmar a atividade antimicrobiana da oxitetraciclina contra as bactérias alvo deste trabalho foi realizado o bioensaio de disco-difusão, sendo o disco impregnado com 30 µg deste composto. Assim, foram observados halos de inibição para as linhagens Gram-positivas SCN, *Staphylococcus aureus* 211 e 213, além de *Staphylococcus epidermis*. Entretanto, nenhum halo de inibição foi observado para linhagens Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.859 e *Escherichia coli* FD2062 como mostra a Figura 72.

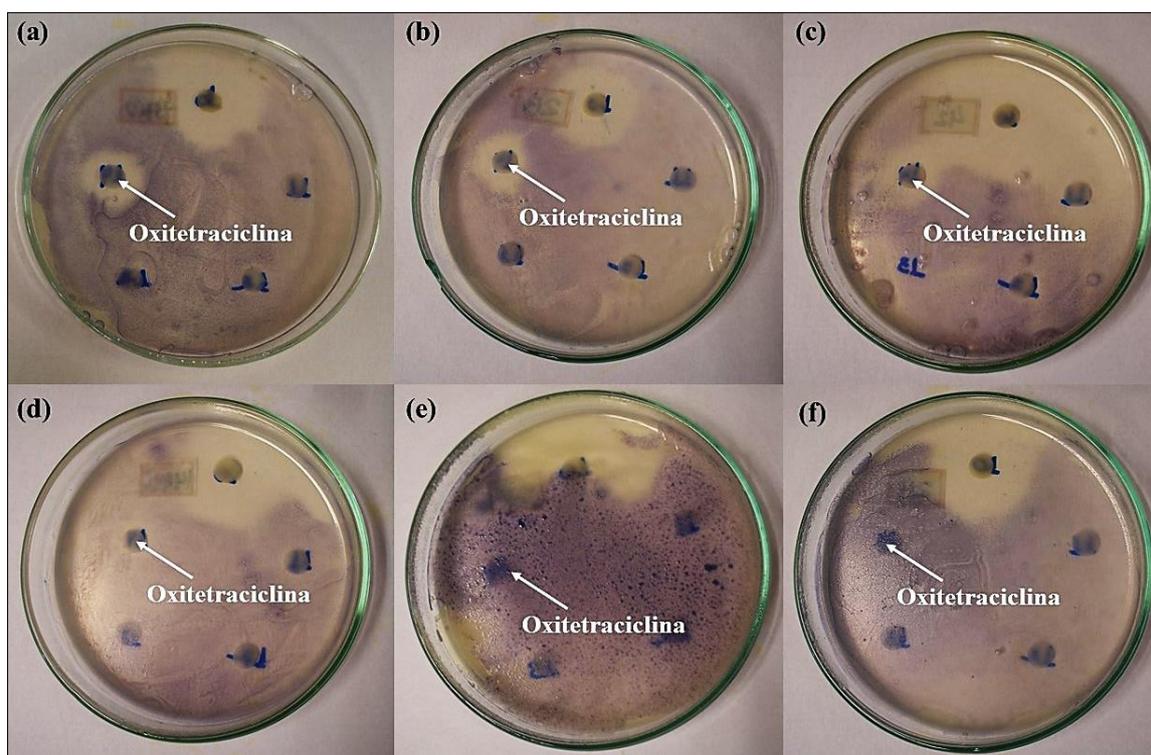


Figura 72. Bioensaio de disco-difusão para oxitetraciclina contra as bactérias Gram-positivas (a) SCN, (b) *Staphylococcus aureus* 211, (c) *Staphylococcus aureus* 213, (d) *Staphylococcus epidermis*, (e) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.859 e (f) *Escherichia coli* FD2062

A partir dos resultados obtidos ficou evidente que a oxitetraciclina (íon de m/z 461) não é responsável pela atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-negativas

observadas para as frações ativas do extrato bruto Caat 8-25, uma vez o ensaio com o composto padrão inibiu somente o crescimento de colônias Gram-positivas.

Desta forma, concluí-se que no extrato bruto Caat 8-25 há uma mistura de compostos nas frações ativas Fr7 a Fr9, sendo um deles ativo contra bactérias do tipo Gram-positivas e outro(s) capaz(es) de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas.

Como as Fr7 e Fr8 foram ativas tanto contra a bactéria Gram-positiva, quanto para a Gram-negativa, e a Fr9 foi ativa apenas contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853, a atividade biológica contra as bactérias Gram-negativas pode estar relacionada aos compostos de m/z 454 e 522 ($[M+H]^+$), uma vez estão presentes nas três frações. Nota-se na Figura 68 que o composto de m/z 454 está presente em maior intensidade no espectro da Fr7, enquanto que o íon de m/z 522 é predominante no espectro da Fr9. Isto justifica os halos de inibição serem maiores para a Fr 7 e Fr9 em relação a Fr8.

Para obtenção de maiores informações a respeito da estrutura química dos compostos presentes nas ativas experimentos de CID foram realizados. Além disso, o íon de m/z 536, também teve seu perfil de fragmentação avaliado pois, embora não esteja presente nas frações ativas ele foi o sinal de maior intensidade no espectro de DI-MS do extrato bruto Caat 8-25 (Figura 65). A Figura 73 mostra os resultados obtidos quando empregada energia de colisão de 30 eV.

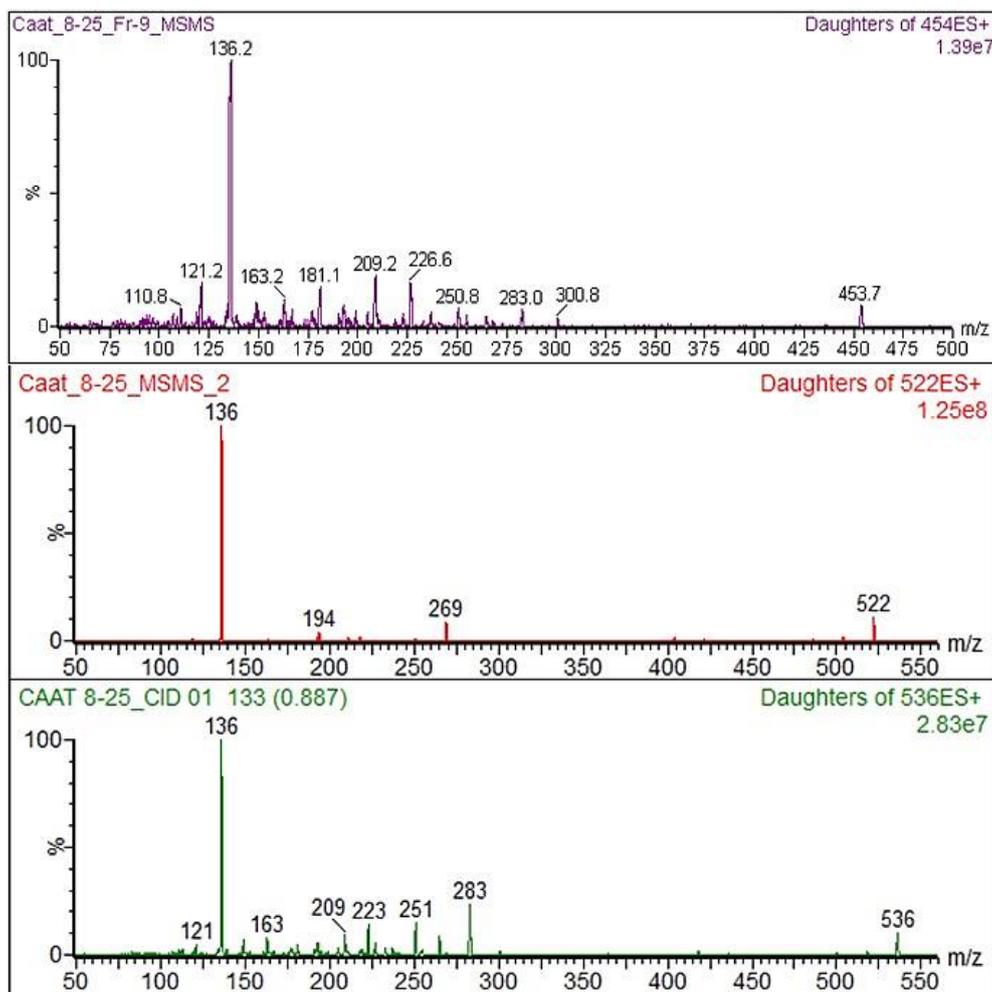


Figura 73. Espectro de CID dos íons de (a) m/z 454, (b) m/z 522 e de m/z 536, presentes no extrato bruto Caat 8-25.

Os espectros de CID dos três íons monitorados apresentaram o mesmo perfil de fragmentação, que mostra a formação de um fragmento de m/z 136 com grande intensidade, sugerindo que eles pertençam a mesma classe química. De acordo com a literatura, vários adenina-nucleosídeos antibióticos com diferentes massas moleculares produzem adenina protonada ($m/z = 136$)¹⁰⁴ como fragmento principal dos espectros de CID.¹⁰⁵ Zong e colaboradores mostraram que metodologias de LC-MS/MS para o monitoramento de adenina-derivados pode ser realizado por meio do monitoramento da formação do íon de m/z 136, pois neste trabalho são analisadas uma mistura de adenina, adenosina e cordicepina através da transição $[M+H]^+ \rightarrow 136$.¹⁰⁶ Os trabalhos de Magana e colaboradores também confirmam que

compostos de adenina apresentam em seu perfil de fragmentação a intensa formação do íon de m/z 136.¹⁰⁷

As frações ativas foram analisadas por LC-PDA-MS e a Figura 74 apresenta os resultados obtidos.

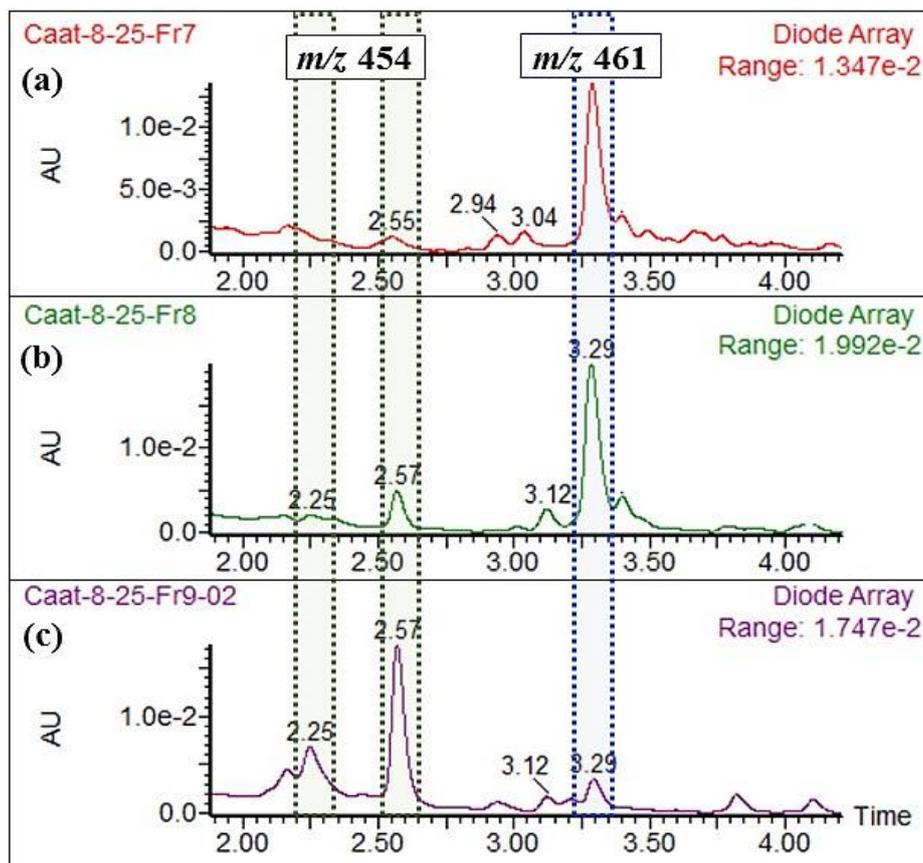


Figura 74. Espectros de LC-PDA das frações ativas (a) Fr 7, (b) Fr8 e (c) Fr9 provenientes do fracionamento do extrato bruto Caat 8-25.

A partir dos cromatogramas de LC-PDA-MS obtidos pode-se inferir que a Fr7 está enriquecida com oxitetraciclina (m/z 461) e a Fr 9 enriquecida do composto de m/z 454. Desta forma, a atividade contra bactérias Gram-negativas foi associada ao composto de m/z 454. Como dois sinais no cromatograma apresentaram m/z 454, uma análise por LC-MS/MS foi realizada e os resultados são apresentados na Figura 75.

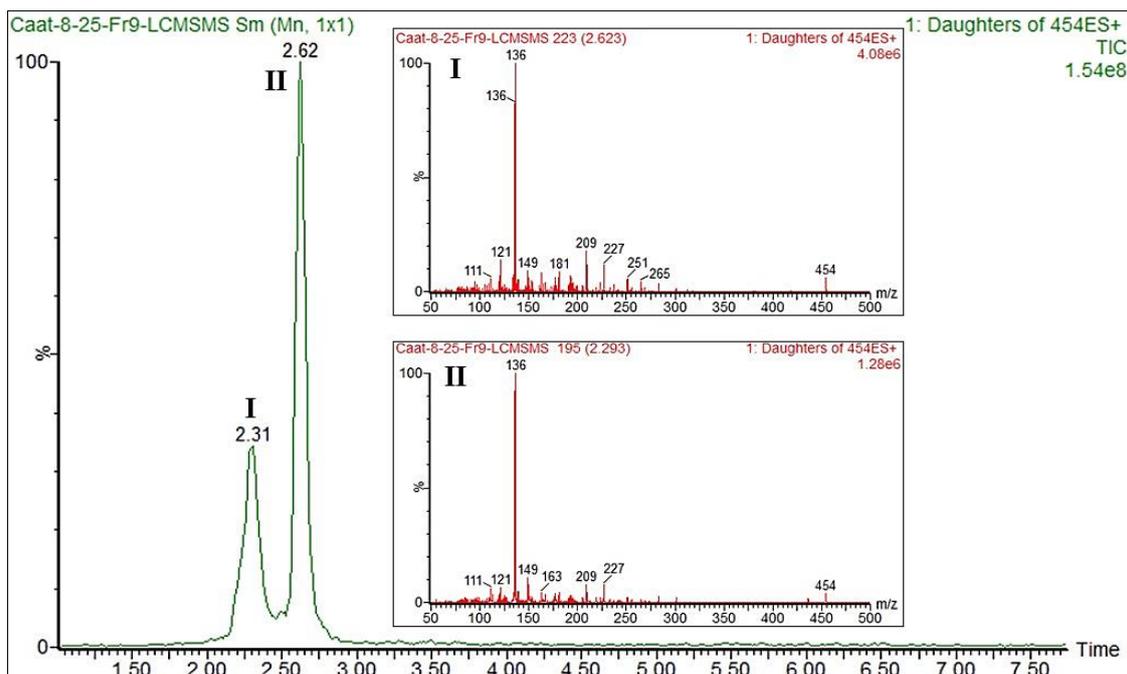


Figura 75. Cromatograma de LC-MS/MS para o íon de m/z 454, presente na fração ativa Fr9 proveniente do extrato bruto Caat 8'25.

Os dois sinais de m/z 454 observados na Fr9 apresentam o mesmo perfil de fragmentação, caracterizados pela formação do íon produto de m/z 136, indicando a presença de dois isômeros na fração ativa pertencentes a mesma classe dos íons de m/z 522 e 536.

Assim, para a identificação dos compostos também foi realizada análise de espectrometria de alta resolução. O espectro de HRMS do extrato bruto (do inglês *High Resolution - Mass Spectrometry*) é apresentado na Figura 76.

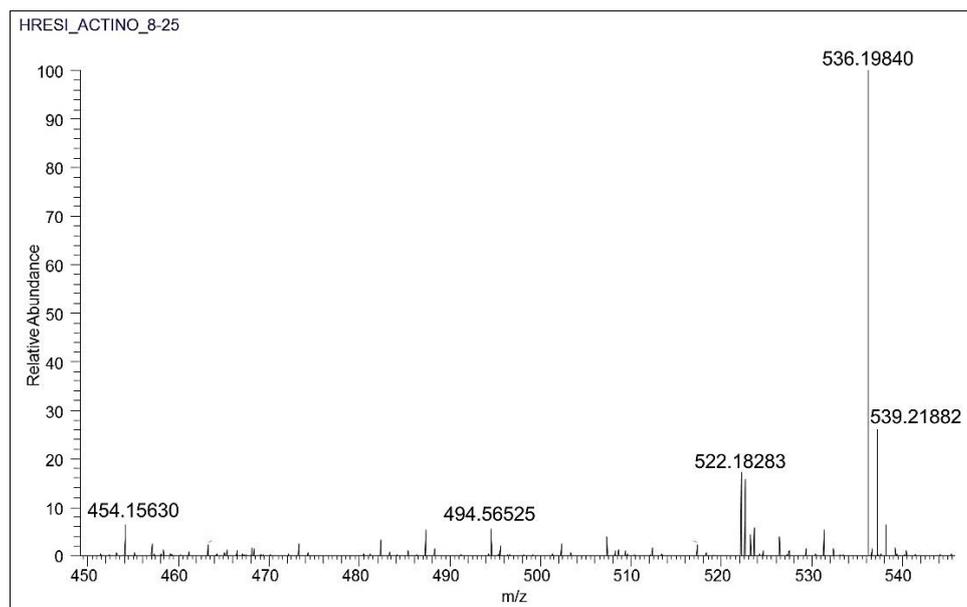


Figura 76. Espectro de HRMS em modo positivo (ampliação da faixa de m/z 450-550) do extrato bruto proveniente da fermentação de meio BD pela actinobactéria Caat 8-25.

A partir da massa experimental obtida foram geradas algumas fórmulas moleculares, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8. Massas e fórmulas moleculares obtidas nas análises de HRMS para os compostos presentes no extrato bruto Caat 8-25

Fórmula Molecular	m/z experimental	m/z teórico	Delta (ppm)
$C_{18}H_{24}O_9N_5$	454,15630	454,15748	1,22
$C_{22}H_{28}O_{10}N_5$	522,18283	522,1836	0,46
$C_{23}H_{29}O_{10}N_5$	536,19840	536,19935	0,59

A partir dos resultados de HRMS e MS/MS foi realizada uma busca no banco de dados *Dictionary of Natural Products* para os três compostos, a qual sugeriu herbicidina B para o íon de m/z 454 e herbicidina F para o íon de m/z 536, enquanto que para o íon de m/z 522 nenhum composto foi encontrado. Entretanto, a busca na literatura permitiu a identificação do composto de m/z 522 como 2'-*O*-Demetil-herbicidina F, de acordo com os trabalhos de Chai e colaboradores.¹⁰⁸ A Figura 77 apresenta a estrutura química dos compostos identificados.

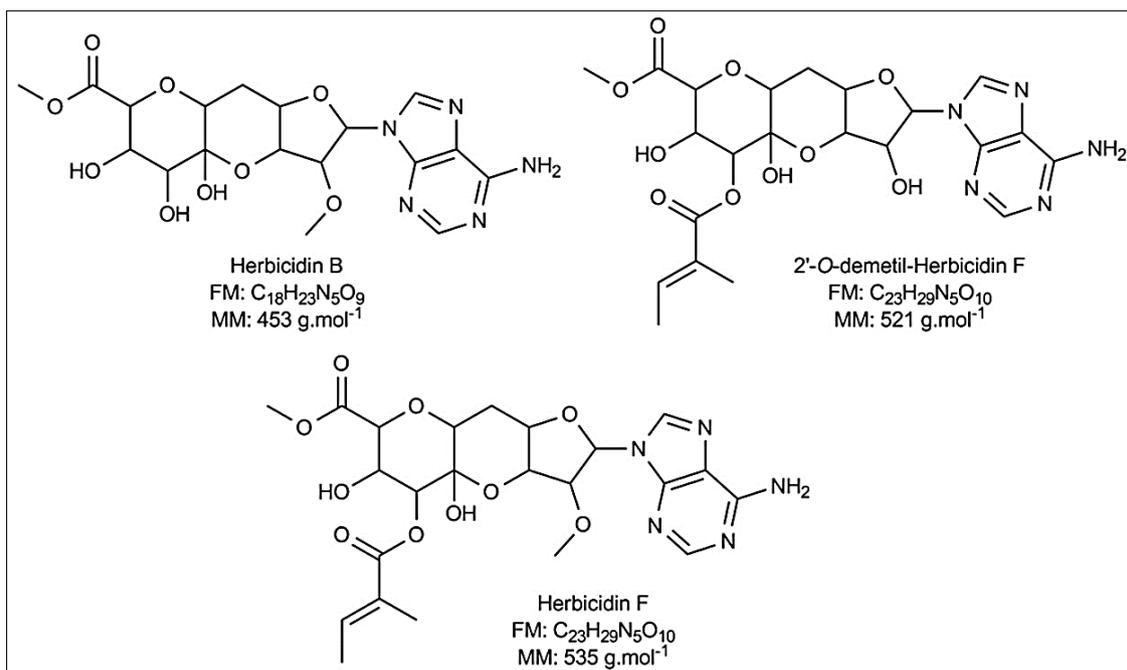


Figura 77. Estrutura química das herbicidina B, 2'-O-Demetil-herbicidina F e herbicidina F, identificadas no extrato bruto Caat 8-25.

Assim, a atividade contra bactérias Gram-negativas do extrato bruto Caat 8-25 foi atribuída a presença de herbicidina B. As herbicidinas são nucleosídeos antibióticos, cuja estrutura consiste num esqueleto tricíclico furano-pirano-pirano substituído com adenina na posição 1β -furano. Esta classe de compostos possui grande importância na medicina não só como fármacos, mas também como ferramentas de biologia molecular, além de demonstrarem atividade herbicida.^{109,110}

Portanto, no extrato bruto produzidos pela actinobactéria Caat 8-25 foram identificados mais de um composto com ação antibiótica, oxitetraciclina e herbicidina B. Além dos compostos bioativos foram identificadas a presença de Herbicidina F e 2'-O-Demetil-herbicidina F no extrato bruto.

4. Conclusões

4. Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesta tese podemos concluir que as actinobactérias são uma fonte extremamente viável para a busca de compostos com atividade antimicrobiana, e que as estratégias de *screening* e desrepliação foram desenvolvidas com sucesso, pois possibilitaram a identificação rápida dos compostos ativos presentes nos extratos brutos.

Assim, para o ensaio de antagonismo foram triadas aproximadamente 120 actinobactérias contra 13 linhagens distintas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde 55% das actinobactérias estudadas foram consideradas ativas. Para este ensaio o meio de cultivo BDA mostrou-se mais efetivo para a produção de moléculas bioativas quando comparado ao meio TSBA.

Para o bioensaio de disco-difusão (antibiograma) 70 extratos brutos produzidos a partir da fermentação de meio líquido BD, foram triados e 60% deles apresentaram algum tipo de inibição de crescimento das bactérias testadas. Em relação aos dois bioensaios empregados, houve uma diferença entre a resposta de atividade antimicrobiana entre os ensaios de antagonismo e o ensaio de disco-difusão para uma mesma actinobactéria. Tal fato pode ser explicado pela diferença nas condições de cultivos dos micro-organismos, uma vez que no ensaio de antagonismo a actinobactéria é crescida em meio sólido e para o ensaio de disco-difusão a fermentação é realizada em meio líquido. Outra hipótese para explicar esta diferença é a de que os compostos bioativos não foram extraídos com eficiência do meio de cultivo líquido.

Dentre todos os extratos brutos triados, aqueles considerados mais promissores foram produzidos pelas actinobactérias Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25. Para o extrato bruto Caat 1-54 foi observada a maior atividade contra as linhagens de bactérias Gram-positivas dentre todos os extratos estudados nesta tese. A atividade biológica do extrato foi atribuída à presença de lisolipina I. Estudos empregando fermentação de meio BD com adição de sais de

bromo e água do mar foram realizados em busca de encontrar a produção de diferentes perfis químicos. A adição de NaBr na concentração de 200 mM induziu a formação de uma lisolipina bromada. A adição de NaBr após 5 dias de cultivo da actinobactéria Caat 1-54 resultou na formação de uma lisolipina clorada e bromada. Este extrato foi considerado muito promissor devido a excelente atividade observada nos bioensaios e a possibilidade de formação de outras lisolipinas com a adição de sais de bromo no meio de cultivo.

Para a actinobactéria Caat 2-63 extrato bruto também foi ativo contra todas as linhagens Gram-positivas, apresentando halos de inibição superiores a 2 cm de diâmetro. A atividade antimicrobiana foi associada a presença de actinomicina D e V no extrato. Através do perfil de fragmentação por CID, outros peptídeos presentes no extrato bruto foram identificados como correlatos da biossíntese das actinomicinas.

Análises de DESI-TLC-MS associadas ao ensaio de bioautografia foram empregadas com eficiência para análise do extrato bruto Caat 2-63 e revelaram a potencialidade desta metodologia em acelerar a identificação do composto ativo em misturas complexas.

A actinobactéria Caat 8-25 também apresentou atividade no ensaio de antagonismo e o extrato bruto produzido foi ativo nos ensaios de disco-difusão. Diferente dos extratos anteriores, foi observada uma atividade contra ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A atividade antimicrobiana contra as linhagens Gram-positivas foi associada a presença de oxitetraciclina e a atividade contra bactérias Gram-negativas foi correlacionada a presença de herbicidinas. Estudos de desreplicação também possibilitaram a identificação da herbicina B, herbicina F e 2'-O-Demetil-herbicidina F. Desta forma, o extrato bruto da actinobactéria 8-25 mostrou-se bastante interessante, com grande potencial de aplicação, pois contém compostos antimicrobianos capazes de inibir linhagens bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas.

5. Parte Experimental

5. Parte Experimental

5.1. Materiais utilizados

5.1.1. Equipamentos

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ❖ Balança analítica FA2104N;
- ❖ Capela de Fluxo Laminar Esco Class II BSC Lobov[®] Modelo SC2;
- ❖ Incubadora com controle de temperatura Fanem 502 modelo A;
- ❖ Incubadora refrigerada Marconi modelo MA 830;
- ❖ Sistema de purificação de água Milli-Q Reference Merck[®];
- ❖ Cromatógrafo líquido Acquity-UPLC[™] acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S Waters equipado com fonte de ionização por *eletrospray* operada em modo positivo e negativo e detector PDA para as análises de DI-MS e LC-MS;
- ❖ Cromatógrafo líquido preparativo de alta eficiência LC Shimadzu equipado com sistema de controle CBM-20A, bomba LC-6AD, degaseificador DGU-20A5 e detector UV-Vis SPD-20A;
- ❖ Espectrômetro de Massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap Q Exactive[™] Thermo Scientific acoplado a fonte de DESI Prosólia modelo OS-3201;
- ❖ Espectrômetro de Ressonância Magnética Bruker[®] Avance DRX-500
- ❖ Evaporador rotativo Waterbath B-840 Buchi;
- ❖ Evaporador centrífugo Speed-Vac 100 ECH Univapo;

5.1.2 Solventes e reagentes

Foram utilizados os solventes acetato de etila, metanol e hexano grau analítico comprados da Synth para extração dos meios de cultivo e análises por TLC; metanol grau

HLPC Merck[®] nos experimentos empregando LC-MS, bem como o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) da Sigma Aldrich[®]. Nos ensaios biológicos.

5.2. Metodologias cromatográficas e espectrométricas

- ❖ Nas análises de TLC foram usadas cromatoplasmas de Silica Gel 60 F₂₅₄, 0,25 mm de espessura, obtidas comercialmente da Merck[®];
- ❖ As análises por inserção direta em espectrômetro de massas foram realizadas através de introdução da amostra, em um sistema LC sem coluna cromatográfica, em fluxo de 0,15 mL min⁻¹ ou via infusão por bomba de seringa com fluxo de 5,0 µL min⁻¹. A fase móvel empregada consistiu de uma mistura de metanol e água (8:2) acidificada com 0,1% de ácido fórmico. Os parâmetros empregados no espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar de 3,2 kV para o modo positivo e 2,0 kV para o modo negativo; voltagem do cone de 40 kV, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de desolvatação de 350°C e faixa de m/z de 150-1500. Nos experimentos de espectrometria de massas sequencial a melhor energia de colisão foi determinada para cada íon fragmentado. Para o detector PDA foi utilizada varredura na faixa de comprimento de onda de 210 a 780 nm. Os espectros foram analisados através do software MassLynx versão 4.1.
- ❖ As análises por espectrometria de massas de alta resolução empregaram foram realizadas empregando varredura para a faixa de m/z 200-1500. Para a fonte de DESI as configurações foram setadas em: altura da saída do *spray* de 2,5 mm; altura da entrada do MS de 0,1 mm; distância da saída do *spray* a entrada do MS de 3,8 mm; ângulo do *spray* de 58°; voltagem do *spray* de 5.0 kV; temperatura da entrada do MS

de 320°C, voltagem *S-lens* de 100 V; pressão do gás nebulizador (N₂) de 160 psi e fluxo do solvente (MeOH) de 3,0 μL·min⁻¹.

5.2.1. Fracionamento Guiado por Bioensaio

Para desenvolvimento da metodologia de LC-UV foram utilizados: gradiente de eluição em fase reversa com metanol (%B) e água (%A) contendo ácido fórmico 0,1% de acordo com a Tabela 9; fluxo de 1 mL·min⁻¹ e coluna Shim-Pack C18 (4,6×250 mm, 5 μm). Para o fracionamento dos extratos foi empregado fluxo de 16 mL·min⁻¹ coluna Shim-Pack C18 (19×250 mm, 5 μm) e o mesmo gradiente empregado no modo analítico.

Tabela 9. Gradiente de eluição usados nas análises de LC-UV dos extratos brutos.

Caat 1-54		Caat 2-63		Caat 8-25	
T(min)	%B	T(min)	%B	T(min)	%B
0	30	0	70	0	70
40	98	40	98	40	98
50	98	50	98	50	98
λ (nm)	280, 310	λ (nm)	240, 350	λ (nm)	260, 370

Após o fracionamento, todas as frações coletadas foram ensaiados por bioautografia direta.

5.2.2. Metodologia de LC-PDA-MS

Para as análises de LC-PDA-MS foi utilizada coluna Ascentis[®] Express F5 pentafluorofenilpropil, (100 x 2,1 mm, 2,7 μm). Foram empregadas como fase móvel (A) e acetonitrila (B) aditivadas com 0,1% de ácido fórmico, como fluxo de 0,5 mL·min⁻¹. O gradiente de eluição em fase reversa usado foi descrito na Tabela 10.

Tabela 10. Gradiente de eluição usados nas análises de LC-PDA-MS dos extratos brutos Caat 1-54.

T (min)	% B
0	10
6	80
8	80
10	95
12	95

5.3. Metodologias empregadas nos ensaios biológicos

5.3.1. Bactérias alvos utilizadas em screening biológico

Os ensaios biológicos utilizados neste trabalho foram realizados empregando como alvo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo algumas linhagens causadoras de mastite, as quais foram cedidas em trabalho de colaboração com Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite QUALILEITE-FMVZ-USP, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos da USP *campus* Pirassununga. As demais, foram linhagens tipo cedidas pela Dra. Andresa Beretta da empresa Apis Flora[®], totalizando 13 bactérias, listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Descrição das linhagens de bactérias utilizadas nos bioensaios, indicando os códigos referente a cada uma delas.

	Identificação da Bactéria	Descrição da Espécie
Linhagens Isoladas (Placa 1)	42	SCN (<i>Staphylococcus chromogenes</i> por MALDI)
	97	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	211	<i>Staphylococcus aureus</i>
	212	<i>Staphylococcus aureus</i>
	213	<i>Staphylococcus aureus</i>
	270	<i>Streptococcus uberis</i>
	14.990	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Linhagens Tipo (Placa 2)	25.922	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25.922
	25.923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923
	27.853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27.859
	43.300	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43.300
	FD1062	<i>Escherichia coli</i> resistente a Kanamicina
	K12	<i>Escherichia coli</i> linhagem selva

As bactérias foram preservadas em solução de glicerol 20% mantidas em freezer -70°C e, para proceder com os bioensaios, era realizado o cultivo em meio líquido TSB¹¹¹ (Caldo Trípico de Soja) por 1 dia. Após este período, as bactérias eram diluídas até a contagem de aproximadamente $1.5 \cdot 10^8$ UFC (0,5 escala McFarland) e então estriadas a suspensão plaqueada no meio de cultivo sólido.

A escala McFarland consiste em um padrão de turvação baseado na dispersão da luz pelas bactérias em meio líquido, de forma que quanto maior o número de bactérias, maior a opacidade do meio de cultura. Tal escala consiste de uma série de 11 tubos numerados de 0,5 a 10, com diferentes proporções de BaCl₂ 1% e H₂SO₄ 1% de modo a formar suspensões turvas de BaSO₄.¹¹² Desta forma, o número de células bacterianas pode ser determinado em aproximação, por comparação com os padrões da escala.

5.3.2. Meios de cultivo empregados nos estudos biológicos

Foram avaliados os meios de cultivo: Meio Antibiótico N° 3¹¹³ (MA3), Agar Malte-Extrato de Levedura¹¹⁴ (ISP-2), Agar Glicose-Extrato de Levedura¹¹⁵ (GYEA), Agar Batata-Dextrose¹¹⁶ (BDA), Agar Amido-Caseína¹¹⁷ (ACA), Agar Malte¹¹⁸ (Malte) e Ágar Caldo Trípico de Soja (TSBA), cujas composições estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12. Composição dos meios de cultivo avaliados para o melhor crescimento bacteriano.

Nutrientes	ACA	BDA	GYEA	ISP-2	MA3	Malte	TSBA
Agar	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Amido de Milho	1,0	-	-	-	-	-	-
Amido de Batata (Infusão)	-	4,0	-	-	-	-	-
Caseína Hidrolisada	0,03	-	-	-	-	-	1,7
Dextrose	-	2,0	2,0	0,4	0,1	-	0,25
Digestão Papaica de Soja	-	-	-	-	-	-	0,3
Extrato de Carne	-	-	-	-	0,15	-	-
Extrato de Levedura	-	-	2,0	0,4	0,15	-	-
Extrato de Malte	-	-	-	1,0	-	3,0	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	0,2	-	-	-	0,37	-	0,25
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	0,13	-	-
KNO ₃	0,2	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,005	-	-	-	-	-	-
NaCl	0,2	-	-	-	0,35	-	0,5
Peptona	-	-	-	-	0,5	-	-

*quantidades em g/100 mL de água destilada; **meios BDA, MA3 e TSBA adquiridos comercialmente da Difco®.

Já o meio líquido BD é composto de uma solução aquosa com 20% (v/v) de caldo de batata e 2% (m/v) de dextrose. O caldo de batata é feito a partir do cozimento de 400 g de batatas picadas em 1,0 L de água destilada durante 30 minutos, seguido de filtragem em gaze.¹¹⁶

5.3.3. Desenvolvimento de bioensaio de antagonismo entre actinobactérias e bactérias causadoras de mastite

Um ensaio de antagonismo entre actinobactérias e as bactérias alvo foi otimizado para avaliar as actinobactérias como potenciais produtores de compostos com ação antimicrobiana, baseado nos trabalhos de Lingakumar e colaboradores.¹¹⁹ Para tal, um modelo de estriamento dos micro-organismo foi desenvolvido, de forma a dispor a actinobactéria no centro da placa de Petri e, perpendicularmente a elas, as bactérias causadoras de mastite. Como 13 diferentes linhagens bacterianas foram testadas, as mesmas foram dispostas em duas placas de Petri

distintas, denominadas como Placa 1 (linhagens isoladas) e Placa 2 (linhagens tipo), como ilustrado na Figura 78.

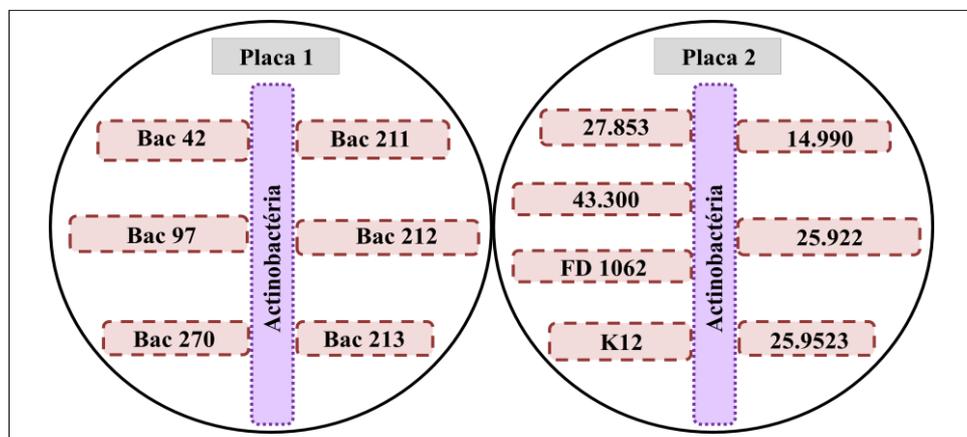


Figura 78. Representação esquemática do bioensaio de antagonismo e disposição das linhagens de bactérias nas diferentes placas que compõem o *screening* biológico. A Placa 1 (a esquerda) contém as linhagens isoladas, enquanto que a Placa 2 (a direita), as linhagens tipo.

Os parâmetros avaliados para a padronização do ensaio foram: meio de cultivo e intervalo de tempo entre o inóculo da actinobactéria e as bactérias alvo. Determinadas as melhores condições para proceder com o bioensaio, o potencial antimicrobiano de 120 actinobactérias foi estudado, sendo todas elas isoladas no laboratório de Microbiologia Ambiental - Embrapa Jaguariúna sob coordenação do Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, com o qual o grupo de pesquisa mantém colaboração.

5.3.4. Bioensaio de antagonismo mediado por compostos orgânicos voláteis

O ensaio de antagonismo também foi realizado um experimento com placas de Petri contendo uma divisão física. Assim, um lado foi plaqueado com a actinobactéria (a esquerda) e, após 7 dias, as bactérias alvo foram crescidas na outra metade da placa (a direita), como exemplificado na Figura 79. Após 24h de incubação das placas a 37°C o crescimento das colônias foi monitorado.

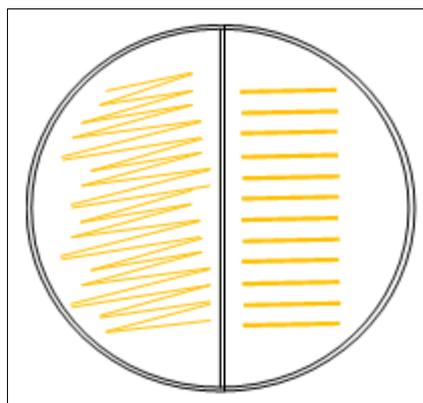


Figura 79. Esquema do bioensaio de antagonismo mediado por VOCs.

5.3.5. Obtenção dos extratos brutos

Para obtenção dos extratos brutos empregados neste trabalho, meio de cultivo líquido Batata-Dextrose (BD) foi fermentado com cada uma das actinobactérias de interesse, durante 12 dias a temperatura (30°C) e agitação (150 rpm) controladas. A proporção entre o volume de meio de cultivo e o volume do frasco Erlenmeyer no qual a fermentação foi realizada manteve-se em 1:2.

Após o período de fermentação, o meio de cultivo foi filtrado e extraído por meio de extração líquido-líquido. Neste experimento, o meio de cultivo foi extraído com igual volume de acetato de etila (AcOEt) por 3 vezes. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotativo. A Figura 80 mostra uma representação esquemática deste processo.

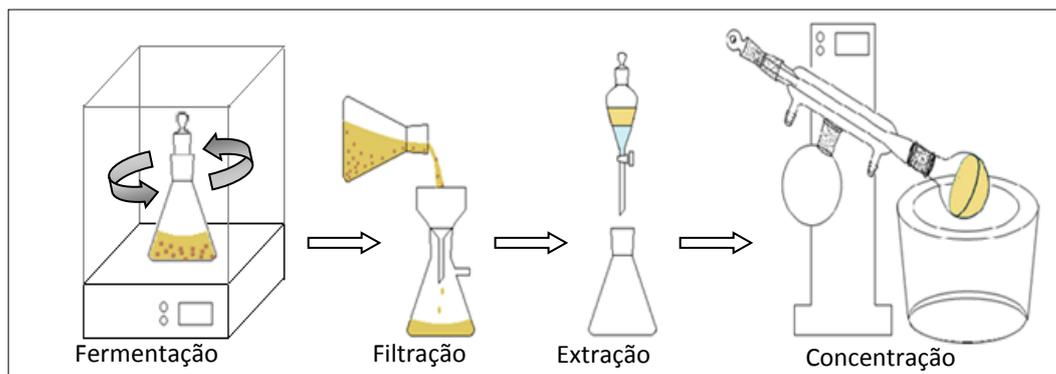


Figura 80. Representação esquemática do processo de obtenção do extrato bruto.

5.3.6. Bioautografia direta

Com o intuito de avaliar a capacidade de inibição dos extratos brutos produzidos pelas actinobactérias consideradas ativas no bioensaio de antagonismo realizou-se o ensaio de bioautografia direta.⁷⁹ Assim, os extratos foram ensaiados na concentração de 1 mg·mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo aplicado 5 µL da solução nas placas de Petri contendo meio sólido BDA, totalizando 5µg de extrato bruto. Como o controle negativo do experimento foi feita uma placa para cada bactéria contendo o solvente DMSO. As placas foram inoculadas com 200 µL de uma suspensão 0,5 McFarland de cada uma das 13 bactérias alvo e, posteriormente a secagem da suspensão, o extrato bruto foi adicionado na superfície do meio sólido, na forma de uma gota. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas para avaliação da atividade por meio da formação de halos de inibição.

Além de DMSO, outros solventes foram testados neste ensaio, para avaliar sua toxicidade frente a cada bactéria alvo, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13. Solventes testados na solubilização dos extratos brutos.

Posição na Placa de Petri	Solventes
1	Etanol
2	Acetona
3	<i>N,N</i> -DimetilAcetamida
4	Formamida
5	<i>N,N</i> -DimetilFormamida

O ensaio de bioautografia direta empregado no fracionamento guiado por bioensaio foi realizado por meio da secagem de 2 mL das frações coletadas em HPLC preparativo para cada um dos extratos brutos fracionados. As frações secas foram então ressuspensas em 10 µL de MeOH, exceto para as frações do extrato Caat 1-54, que foram ressuspensas em 200 µL. Então, uma alíquota de 5 µL de cada fração foi aplicada em uma placa de TLC, a qual não foi submetida a eluição cromatográfica. Após evaporação do solvente, a placa de TLC foi

recoberta com 40 mL de meio de cultivo BDA e após 24h, foi incubada com uma suspensão de bactéria (0,5 escala McFarland). Os halos de inibição foram visualizados, por meio de revelação com MTT, após 24h da incubação da bactéria.

5.3.7. Bioensaio de Disco-Difusão contra bactérias causadoras de mastite

A triagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos frente as 13 bactérias alvo foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Bauer e Kirby.¹²⁰ Neste ensaio, cada disco de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foi impregnado com 50µg de extrato bruto solubilizado em metanol (MeOH). Tetraciclina (5 µg por disco) foi utilizada como controle positivo e MeOH (5 µL por disco) como controle negativo. Os discos foram adicionados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo 12 mL de meio BDA. Após 24h da inserção dos discos de papel, uma suspensão de bactérias (0,5 escala McFarland) foi incubada. A revelação das placas para visualização dos halos de inibição foi feita usando MTT, um sal de tetrazólio, decorridas 24h da inoculação das bactérias.

A Figura 81 apresenta a disposição dos discos de papel nas placas de Petri, representando um esquema geral do bioensaio.

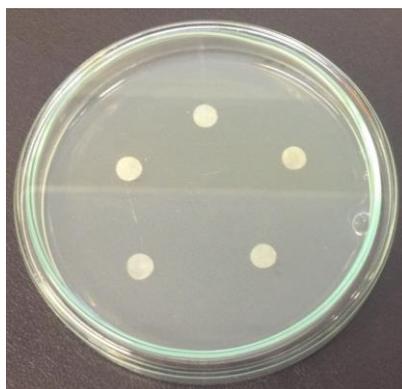


Figura 81. Representação esquemática do ensaio de disco-difusão

5.3.8. Bioautografia em TLC e DESI-TLC-MS para o extrato bruto Caat 2-63

O extrato bruto proveniente da fermentação de meio líquido BD pela actinobactéria Caat 2-63 foi avaliado empregando-se bioautografia em TLC de acordo com protocolo previamente estabelecido no nosso grupo de pesquisa.¹²¹ Desta forma, 2,0 µg do extrato bruto foram cromatografados em placas de TLC (15 x 70 mm), utilizando-se como eluente acetato de etila (AcOEt). Após a eluição da fase móvel e a sua evaporação da placa de sílica, a mesma foi colocada em uma placa de Petri (90 x 15 mm) e sobre ela foram vertidos cerca de 12,0 mL de meio BDA. Posteriormente a solidificação do meio de cultivo, 300 µL de uma suspensão 0,5 padrão McFarland das linhagens SCN, *Staphylococcus aureus* 211, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli* foram plaqueadas. As placas foram incubadas a 37°C e, após o crescimento das bactérias em 24 horas, estas foram reveladas com MTT.

Além das placas de TLC empregadas no bioensaio, outras duas placas do extrato bruto cromatografado foram preparadas, a qual uma foi revelada com vanilina e a outra foi submetida a análise por DESI-MS.

No estudo de TLC-DESI-MS empregou-se varredura manual da placa. Os demais parâmetros espectrométricos estão descritos no item 5.2.

5.3.9. Estudo do metabolismo da actinobactérias Caat 1-54 cultivada em meio com adição de sais de bromo

Para avaliar a influência de halogênios no meio de cultivo, realizou-se a fermentação de meio BD suplementado com dois diferentes sais de bromo, NaBr e KBr, sendo estes adicionados em dois tempos diferentes durante o processo fermentativo: no momento do inóculo da actinobactéria Catt 1-54 (t = 0) e também após 5 dias de crescimento da mesma (t = 5). As concentrações dos sais utilizadas foram de 50 e 100 mM (sendo estas baseadas no

trabalho de Nenkep e colaboradores¹²²) e os períodos de fermentação foram monitorados por 7, 12 e 20 dias.

Um segundo experimento foi realizado adicionando-se diferentes concentrações de NaBr ao meio BD e mantendo-se a fermentação por 3 intervalos de tempo distintos (7, 12 e 20 dias). Neste estudo foram empregadas as concentrações de 100, 200 e 300 mM de NaBr.

Todos os meios foram inoculados a partir da adição de 200 µL de uma suspensão da actinobactéria Caat 1-54. A fermentação foi realizada em condições de temperatura e agitação controladas, mantendo-se a proporção de 1:2 entre o volume de meio líquido e o volume do frasco Erlenmeyer. Os extratos brutos foram obtidos como descrito no item 5.3.5.

5.3.10. Cultivo com água do mar para Caat 1-54

Neste estudo foram feitos 5 meios de cultivo líquido BD contendo diferentes concentrações de água do mar: 0, 25, 50, 75 e 100%. A água do mar foi adicionada para substituir os correspondentes volumes de água destilada na preparação dos meios de cultivo. Os meios foram inoculados a partir da adição de 200 µL de uma suspensão da actinobactéria Caat 1-54 e a fermentação foi mantida por 12 dias. Os extratos brutos foram obtidos como descritos no item 5.3.5.

5. Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Zhao, X.; Lacasse, P. *Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control*. **J Anim Sci** 86:13, 57-65, 2008.
2. Contreras, G. A.; Rodriguez, J. M. *Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 16:4, 339-356, 2011.
3. Bradley, A. J. *Bovine Mastitis: An Evolving Disease*. **Vet J** 164:2, 116-128, 2002.
4. Watts, J. L. *Etiological Agents of Bovine Mastitis*. **Vet Microbiol** 16:1, 41-66, 1988.
5. Modi, C. M.; Patel, Hitesh.B.; Patel, H. B. Mody, S. K. *A Comprehensive review on pharmacotherapeutics of bovine mastitis*. **Mol Microbiol Res** 2:1, 1-9, 2012.
6. Kulkarni, A. G. Kaliwal, B. B. *Bovine Mastitis: a review*. **Int J Rec Sci Res** 4:5, 542-548, 2013.
7. Coentrão, C. N.; Souza, G.N.; Brito, J.R.F.; Paiva e Brito, M.A.V; Lilenbaum. W. *Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec** 60:2, 283-288, 2008.
8. Peters, M. D. P.; Silveira, I. D. B.; Fischer, V. *Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows*. **Animal** 9:12, 2024-2028, 2015.
9. Pyörälä, S. *Treatment of mastitis during lactation*. **Irish Vet J.** **62:Suppl 4**, S40-S44, 2009. doi: 10.1186/2046-0481-62-S4-S40
10. Pol, M.; Ruegg, P. L. *Treatment Practices and Quantification of Antimicrobial Drug Usage in Conventional and Organic Dairy Farms in Wisconsin*. **J. Dairy Sci** 90:1, 249-261, 2007.
11. Wilson, D. J.; Gonzales, R. N.; Case, K. L.; Garrison, L. L.; Grönh, Y. T. *Comparison of Seven Antibiotic Treatments with No Treatment for Bacteriological Efficacy Against Bovine Mastitis Pathogens*. **J Dairy Sci** 82:8, 1664-1670, 1999.
12. Tenhagen, B. A.; Köster, G.; Wallmann, J.; Heuwieser, W. *Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany*. **J. Dairy Sci** 89:7, 2542-2551, 2006.
13. Arif, A.; Rehman, M. U.; Bhat, S. A.; Mir, B. A.; Bhat, R. R.; Mir, M. R.; Bilal, S.; Hussain, I. *Scenario of Genetic Selection and Its Impact on Bovine Mastitis*. **IJAVMS**. 9:6, 3-14, 2015.
14. Sordillo, L. M. *New Concepts in the Causes and Control of Mastitis*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 16:4, 271-273, 2011.
15. Halasa, T.; Huijps, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review*, **Vet Q** 29:1, 18-31, 2007.
16. Pitkälä, A.; Haveri, M.; Pyörälä, S.; Myllys, V.; Honkanen-Buzalski. T. *Bovine Mastitis in Finland 2001 - Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance*. **J. Dairy Sci** 87:8, 2433-2441, 2004.
17. Donadio S.; Monciardini P.; Alduina R.; Mazza P.; Chiocchini C.; Cavaletti L.; Sosio M.; Puglia A. M. *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*. **J. Biotechnol.**, 99:3, 187-198, 2002.
18. Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H. P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev** 80:1, 1-43, 2016.
19. Weber, T.; Charusanti, P.; Musiol-Kroll, E. M.; Jiang, X.; Tong, Y.; Kim, H. U.; Lee, S. Y. *Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes*. **Trends in Biotechnol** 33:1, 15-26, 2015.

20. Zarins-Tutt, J. S.; Barberi, T. T.; Gao, H.; Mearns-Spragg, A.; Zhang, L.; Newman, D. J.; Goss, R. J. M. *Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products*. **Nat. Prod. Rep** 33:1, 54-72, 2016.
21. Davies, J.; Davies, D. *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*. **Microbiol Mol Biol Rev** 74:3, 417-433, 2010.
22. Waksman, S. A. *What is an antibiotic or an antibiotic substance?* **Mycologia** 39:5, 565-569, 1947.
23. Kumar, N.; Singh, R. K.; Mishra, S. K.; Singh, A. K.; Pachouri, U. C. *Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria*. **Int J Microbiol Res** 2:2, 12-16, 2010.
24. Chater, K.; Biró, K.; Lee, K. J.; Palmer, T.; Schrempf, H. *The complex extracellular biology of Streptomyces*. **FEMS Microbiol Rev** 34:2, 171-198, 2010.
25. Procópio, R. E. L.; da Silva, I. R.; Martins, M. K.; de Azevedo, J. L.; de Araújo, J. M. *Antibiotics produced by Streptomyces*. **Braz J Infect Dis** 16:5, 466-471, 2012.
26. Kumbhar, C.; Watve, M. *Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis*. **Nat Sci** 5:4, 26-40, 2013.
27. Demain, A. L. *Microbial biotechnology*. **Trends Biotechnol** 18:1, 26-31, 2000.
28. Demain, A. L. *Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 41:2, 185-201, 2014.
29. Strömstedt, A. A.; Felth, J.; Bohlin, L. *Bioassay in natural products research - strategies and methods in the search for anti-inflammatory and antimicrobial activity*. **Phytochem Anal** 25:1, 13-28, 2014.
30. Demain, A. L. *Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 2013, doi:10.1007/s10295-013-1325-z.
31. Silver, L. L.; *Natural products as a source of drug leads to overcome drug resistance*. **Future Microbiol** 10:11, 1711-1718, 2015.
32. Brown, E. D.; Wright, G. D. *Antibacterial drug discovery in the resistance era*. **Nature**. 529:21 336-343, 2016.
33. Genilloud, O. *The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery*. **Anton Leeuw** 106:1, 173-188, 2014.
34. Hwang K-S, Kima, H. U.; Charusanti, P.; Palsson, B. Ø.; Lee, S. Y. *Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites*. **Biotechnol Adv** 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008.
35. Gupta, C.; Prakash, D.; Gupta, S. *Natural Useful Therapeutic Products from Microbes*. **J Microbiol Exp** 1:1, 6-14, 2014.
36. Jose, P. A.; Jebakumar, S. R. D. *Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery*. **Front Microbiol**. 4:240, 1-3, 2013.
37. Tiwari, K.; Gupta, R. K. *Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics*. **Crit Rev Biotechnol** 32:2, 108-132, 2012.
38. Pii, Y.; Borruso, L.; Brusetti, L.; Crecchio, C.; Cesco, S.; Mimmo, T. *The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome*. **Plant Physiol Biochem** 99, 39-48, 2016.
39. Turner, R. T.; James, E. K.; Poole, P. S. *The plant microbiome*. **Genome Biology** 2013, 14:6, 209-219.
40. Berendsen, R. L.; Pieterse, C. M. J.; Bakker, P. A. H. M. *The rhizosphere microbiome and plant health*. **Trends Plant Sci** 17:8, 478-486, 2012.
41. Venturi, V.; Keel, C. *Signaling in the Rhizosphere*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.005.

42. van Dam, N. M.; Bouwmeester, H. J. *Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.008.
43. Mommer, L.; Kirkegaard, J.; Ruijven, J. *Root-Root Interactions: Towards a Rhizosphere Framework*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.009.
44. Pettit, R. K. *Mar Biotechnol* **2011**, 13, 1-11. Pettit, R. K. *Culturability and Secondary Metabolite Diversity of Extreme Microbes: Expanding Contribution of Deep Sea and Deep-Sea Vent Microbes to Natural Product Discovery* **Mar Biotechnol**, 13:1, 1-11, 2011.
45. Jose, P. A.; Jebakumar, S. R. D. *Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes*. **Front Microbiol** 5:242, 1-3, 2014.
46. Giddings, L.; Newman, D. J. *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*. **SpringerBriefs in Microbiology** 1-75, 2015.
47. Rothschild, L. J.; Mancinelli, R. L. *Life in extreme environments*. **Nature** 409:6823, 1092-1101, 2001.
48. Seufferheld, M. J. Alvarez, H. M.; Farias, M. E. *Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments*. **Appl Env Microbiol** 74:19, 5867-5874, 2008.
49. Mirete, S.; Morgante, V.; González-Pastor, J. E. *Functional metagenomics of extreme environments*. **Curr Opin Biotechnol** 38, 143-149, 2016.
50. Zhao, L.; Huang, S. X.; Tang, S.; Jiang, C.; Duan, Y.; Beutler, J. A.; Henrich, C. J.; McMahon, J. B.; Schmid, T.; Bles, J. S.; Colburn, N. H.; Rajski, S. R.; Shen, B. *Actinopolysporins A-C and Tubercidin as a Pdc4 Stabilizer from the Halophilic Actinomycete Actinopolyspora erythraea YIM 90600*. **J. Nat. Prod** 74:9, 1990-1995, 2011.
51. Mohammadipanah, F.; Wink, J. *Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity*. **Front. Microbiol** 6, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2015.01541.
52. Weller, M. G. *A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques*. **Sensors** 12:7, 9181-9209, 2012.
53. Prince, E. K.; Pohnert, G. *Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology*. **Anal. Bioanal. Chem** 396:1, 193-197, 2010.
54. Sharma, S. B.; Gupta, R. *Drug Development from Natural Resource: A Systematic Approach*. **Mini-Rev Med Chem** 15:1, 52-57, 2015.
55. Strömstedt, A. A.; Felth, J.; Bohlin, L. *Bioassays in Natural Product Research - Strategies and Methods in the Search for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity*. **Phytochem Anal** 25:1, 13-28, 2014.
56. Henrich, C. J.; Beutler, J. A. *Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products*. **Nat. Prod. Rep** 30:10, 1284-1298, 2013.
57. Kellogg, J. J.; Todd, D. A.; Egan, J. M.; Raja, H. A.; Oberlies, N. H.; Kvalheim, O. M.; Cech, N. B. *Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and Application to Identification of Bioactive Compounds*. **J. Nat. Prod** 79:2, 376-386, 2016.
58. Simon, E.; Lamoree, M. H.; Hamers, T.; de Boer, J. *Challenges in effect-directed analysis with a focus on biological samples*. **Trends Anal Chem** 67:,179-191, 2015.
59. Baltz, R. H. *Antimicrobials from actinomycetes: back to the future*. **Microbe** 2, 125-131, 2007.
60. Prince, E. K.; Pohnert, G. *Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology*. **Anal Bioanal Chem** 396:1, 193-197, 2010.
61. Wu, C.; Kim, H. K.; van Wezel, G. P.; Choi, Y. H. *Metabolomics in the natural products field - a gateway to novel antibiotics*. **Drug Discov Today** 13, 11-17, 2015.

62. Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Goodacre, R.; Neumann, S.; Kopka, J.; Viant, M. R. *Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics*. **Metabolomics** 9, S44-S66, 2013.
63. Krug, D.; Müller, R. *Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products*. **Nat Prod Rep** 31:6, 768-783, 2014.
64. Kleigrewe, K.; Almaliti, J.; Tian, I. Y.; Kinnel, R. B.; Korobeynikov, A.; Monroe, E. A.; Duggan, B. M.; Di Marzo, V.; Sherman, D. H.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, L.; Gerwick, H. W. *Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria*. **J Nat Prod** 78:7, 1671-1682, 2015.
65. Bouslimani, A.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Dorrestein, P. C. *Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies*. **Nat Prod Rep** 31:6, 718-729, 2014.
66. Venter, A.; Nefliu, M.; Cooks, R. G. *Ambient desorption ionization mass spectrometry*. **Trends Anal Chem** 27:4, 284-290, 2008.
67. Fang, J.; Dorrestein, P. C. *Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies*. **Curr Opin Microbiol** 19, 120-129, 2014.
68. Lang, G.; Mayudin, N. A.; Mi, M. I.; Sun, L.; Van der Sar, S.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Ellis, G.; Laatsch, H.; Munro, M. H. G. *Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts*. **J Nat Prod** 71:9, 1595-1599, 2008.
69. Garcia, D. E.; Baidoo, E. E.; Benke, P. I.; Pingitore, F.; Tang, Y. J.; Villa, S.; Keasling, J. D. *Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics*. **Curr Opin Microbiol** 11:3, 233-239, 2008.
70. Annesley, T. M. *Ion Suppression in Mass Spectrometry*. **Clin Chem** 49:7, 1041-1044, 2003.
71. Krug, D.; Muller, R. *Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products*. **Nat Prod Rep** 2014, doi: 10.1039/c3np70127a.
72. United States Pharmacopeial Convention. 2007. *The United States pharmacopeia*, 31st ed., Amended Chapters 61, 62, 111. **The United States Pharmacopeial Convention**, Rockville, MD.
73. Bibb, M. J. *Regulation of secondary metabolism in Streptomyces*. **Curr Opin Microbiol** 8:2, 208-215, 2005.
74. Hwang, K-S.; Kim, H. U.; Charusanti, P.; Palsson, B. Ø.; Lee, S. Y. *Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites*. **Biotechnol Adv** 32:2, 255-268, 2014.
75. Sanchez, S.; Demain, A. L. *Metabolic regulation of fermentation processes*. **Enzyme Microb Tech** 31:7, 895-90, 2002.
76. Weinberg, E. D.; *Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism*. **Biol Metals** 2:4, 191-196, 1990.
77. Zhu, H.; Sandiford, S. K.; van Wezel, G. P. *Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 41:2, 371-386. 2014.
78. Crevelin, E. J.; Crotti, A. E. M.; Zucchi, T. D.; Melo, I. S.; Moraes, L. A. B. *Dereplication of Streptomyces sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry*. **J Mass Spectrom** 49:11, 1117-1126, 2014.
79. Peti, A. P. F; *Aplicação da espectrometria de massas na identificação de compostos antituberculose produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera*. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós-graduação da FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, 2012.
80. Katz, L.; Baltz, R. H. *Natural Products Discovery: Past, Present and Future*. **J Ind Microbiol Biotechnol** Doi 10.1007/s10295-015-1723-5.

81. Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*. **Microbiol Mol Biol Rev** 80:1, 1-43, 2016.
82. Cadircia, B. H.; Yasab. I.; Kocyigit, A. *Streptomyces sp. TEM 33 Possess High Lipolytic Activity in Solid State Fermentation in Comparison with Submerged Fermentation*. **Prep Biochem Biotechnol** 46: 1, 23-29, 2016.
83. Silva, L. H. F; *Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga*. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós-graduação da FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, 2015
84. Bockholt, H.; Udvarnoki, G.; Rohr, J. *Biosynthetic studies on the xanthone antibiotics lysolipins X and I*. **J. Org. Chem** 59:8, 2064-2069, 1994.
85. Drautz, H.; Keller-Schierlein, W.; Zahner, H. *Metabolic Products of Microorganisms: 149. Lysolipin I, a New Antibiotic from Streptomyces violaceonige*. *Arch. Microbiol.* (1975) 106: 175-190.
86. Lopez, P.; Hornung, A.; Welzel, K.; Unsin, C.; Wohlleben, W.; Weber, T.; Pelzer, S. *Isolation of the lysolipin gene cluster of Streptomyces tendae Tü 4042*. **Gene** 461:1, 5-14, 2010.
87. Winter, D. K.; Sloman, D. L.; Porco Jr, J. A. *Polycyclic xanthone natural products: structure, biological activity and chemical synthesis*. **Nat Prod Rep** 30:3, 382-391, 2013.
88. Wagner, C.; König, G. M. *Mechanisms of Halogenation of Marine Secondary Metabolites*. Doi 10.1007/978-90-481-3834-0_19, 2012
89. Gribble, G. W. *Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products*. **Mar. Drugs** 13:7, 4044-4136, 2015.
90. Neumann, C. S.; Fujimori, D. G.; Walsh, C. T. *Halogenation strategies in natural product biosynthesis*. **Chem & Biol** 15:2, 99-109, 2008.
91. van Pée, K-H.; Unversucht, S. *Biological dehalogenation and halogenation reactions*. **Chemosphere** 52:2, 299-312, 2003.
92. Wagner, C.; El Omari, M. König, G. M. *Biohalogenation: Nature's Way to Synthesize Halogenated Metabolites*. **J Nat Prod** 72:3, 540-553, 2009.
93. Preisitsch, M.; Heiden, S. E.; Beerbaum, M.; Niedermeyer, T. H. J.; Schneefeld, M.; Herrmann, J.; Kumpfmüller, J.; Thürmer, A. Neidhardt, I.; Wiesner, C.; Daniel, R.; Müller, R.; Bange, F. C.; Schmieder, P.; Schweder, T.; Mundt, S. *Effects of Halide Ions on the Carbamidocyclophane Biosynthesis in Nostoc sp. CAVN2*. **Mar. Drugs** 14:1, 2016, doi:10.3390/md14010021.
94. Khairtdinova, M. M.; Vekshin, N. L. *Energy of interaction in actinomycin-nucleotide complexes*. **Russ J Bioorg Chem** 40:1, 56-60, 2014.
95. Hamza, A. A.; Ali, H. A.; Clark, B. R.; Murphy, C. D.; Elobaid, E. A. *Isolation and characterisation of actinomycin D producing Streptomyces spp. from Sudanese soil*. **Afr. J. Biotechnol.** 12:19, 2624-2632, 2013.
96. Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. *Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução*. **Quím. Nova** 28:1, 118-129, 2005.
97. Schulze, M. M. *Tratamento Quimioterápico em Pacientes Oncológicos*. **Rev Bras Onc Clín** 4:12, 17-23, 2007.
98. Keller, U.; Lang, M.; Crnovcic, I.; Pfennig, F.; Schauwecker, F. *The Actinomycin Biosynthetic Gene Cluster of Streptomyces chrysomallus: a Genetic Hall of Mirrors for Synthesis of a Molecule with Mirror Symmetry*. *J Bacteriol.* 2010; 192:10, 2583-2595.
99. Dewick, P. M. *Chapter 7: Peptides, proteins, and other amino acid derivatives - Non-Ribosomal Peptide Biosynthesis*. In: **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd edition, Wiley, 2009.

100. Winklera, M. L.; Papp-Wallaceb, K. M.; Hujerb, A. M.; Domitrovic, T. N.; Hujerb, K. M.; Hurlessb, K. N.; Tuohyd, M.; Halld, G.; Bonomo R. A. *Unexpected Challenges in Treating Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Resistance to Ceftazidime-Avibactam in Archived Isolates of Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother** 59:2, 1020-1029, 2015.
101. Steinbuch, K. B.; Fridman, M. *Mechanisms of resistance to membrane-disrupting antibiotics in Gram-positive and Gram-negative bacteria*. **Med Chem Commun** 7:1, 86-102, 2016.
102. Pastor-Navarro, N.; Maquieira, Á.; Puchades, R. *Immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products: a review*. **Anal Bioanal Chem** 395, 907-920, 2009.
103. Daghrrir R.; Droguí, P. *Tetracycline antibiotics in the environment: a review*. **Environ Chem Lett** 11:3, 209-227, 2013.
104. Nelson, C. C.; McCloskey, J. A. *Collision-Induced Dissociation of Adenine*. **J. Am. Chem Soc** 114, 3661-3668, 1992.
105. Fredenhagen, A.; Derrien, C.; Gassmann, E. *An MS/MS Library on an Ion-Trap Instrument for Efficient Dereplication of Natural Products. Different Fragmentation Patterns for $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ Ions*. **J Nat Prod** 68:3, 385-391, 2005.
106. Zong, S-H.; Han, H.; Wang, B.; Li, N.; Dong, T. T-X.; Zhang, T.; Tsim, K. W. K. *Fast Simultaneous Determination of 13 Nucleosides and Nucleobases in Cordyceps sinensis by UHPLC-ESI-MS/MS*. **Molecules** 20:12, 21826-21825, 2015.
107. Magana, A. A.; Wrobel, K.; Escobosa, A. R. C.; Wrobel, K. *Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles*. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 30:1, 209-220, 2016.
108. Chai, X.; Youn, U. J.; Sun, D.; Dai, J.; Williams, P.; Kondratyuk, T. P.; Borris, R. P.; Davies, J.; Villanueva, I. G.; Pezzuto, J. M.; Chang, L. C. *Herbicidin Congeners, Undecose Nucleosides from an Organic Extract of Streptomyces sp. L-9-10*. **J Nat Prod** 77:2, 227-233, 2014.
109. Ichikawa, S.; Shuto, S.; Matsuda, A. *The First Synthesis of Herbicidin B. Stereoselective Construction of the Tricyclic Undecose Moiety by a Conformational Restriction Strategy Using Steric Repulsion between Adjacent Bulky Silyl Protecting Groups on a Pyranose Ring*. **J Am Chem Soc** 121:44, 10270-10280, 1999.
110. Hager, D.; Mayer, P.; Paulitz, C.; Tiebes, J.; Trauner D. *Stereoselective Total Syntheses of Herbicidin C and Aureonuclemycin through Late-Stage Glycosylation*. **Angew Chem Int Ed.** 51:26, 6525 -6528, 2012.
111. Schmidt, W. H.; Moyer, A. J. *Penicillin: I. Methods of assay*. **J Bact** 47:2, 199-208, 1944.
112. Koch, A. L. *Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments*. **Anal Biochem** 38:1, 252-259, 1970.
113. Atlas, R.M. *Handbook of Microbiological Media*, 2nd ed., L.C. Parks, ed. **CRC Press**, Inc. Boca Raton, 1997.
114. Shirling, R.; Gottlieb, D. *Cooperative description of type cultures of Streptomyces. 11. Species descriptions from first study*. **Int J Syst Bacteriol** 18:4, 69-189, 1968.
115. Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith and Struhl. *Current protocols in molecular biology*, **Current Protocols**, Brooklyn, 1994.
116. Gachon, P.; Kergomard, A. *Grisorixin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group. I. Fermentation, isolation, biological properties and structure*. **J Antibiot** 28:5, 345-350, 1975.
117. Küster, E.; Williams, S. T. *Selection of Media for Isolation of Streptomyces*. **Nature** 202, 928-929, 1964.
118. Thom and Church. *The aspergilli*. **Williams & Wilkins**, Baltimore, 1926.

119. Lingakumar, K.; Thangapandian, V.; Prabhu, D.; Ruban, P. *Isolation and characterization of antibiotics producing actinomycetes from soil samples of Senbagadaruvi in Western Ghats*. **Biores Bull** 1:4, 1-5, 2011.
120. Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. **Am J Clin Pathol** 45:4, 493-496, 1966.
121. Fontanari, C. *Bioautografia - TLC - EASI - MS: uma nova abordagem na desreplicação e identificação de compostos com atividade antimicobacteriana*. **Dissertação** (Mestrado) - Programa de Pós-graduação da FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, **2010**
122. Nenkep, V.; Yun, K.; Zhang, D.; Choi, H. D.; Kang, J. S.; Son, B, W. *Induced Production of Bromomethylchlamydosporols A and B from the Marine-Derived Fungus *Fusarium tricinctum**. **J Nat Prod** 73:12, 2061-2063, 2010.