

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga

Lucas Henrique Fortaleza Silva

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP



Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga

Versão Corrigida

Lucas Henrique Fortaleza Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Lucas Henrique Fortaleza

Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga. Ribeirão Preto, 2015.

94 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Moraes, Luiz Alberto Beraldo.

1. Actinobactérias; 2. Fitotoxinas; 3. Espectrometria de massas sequencial; 4. Actinomicina D; 5. Griseorhodin A; 6. Terras raras.

Nome: SILVA, Lucas Henrique Fortaleza

Título: "Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga"

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr		_Instituição:
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr		_Instituição:
Julgamento:	Assinatura:	
Prof. Dr		_Instituição:
Julgamento:	Assinatura:	

"O sucesso, tal como a felicidade, não pode ser perseguido; deve acontecer... como se fosse um, efeito secundário da dedicação pessoal de alguém a uma causa maior do que o próprio."

Viktor Frankl

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Primeiramente a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos, me auxiliando nas decisões e me ensinando a lutar contra as adversidades que surgem na vida.

Aos meus pais, Francisco Ferreira Silva e Antônia Albanira Fortaleza Silva, por terem acreditado em mim todos esses anos e me incentivado em vários momentos para que eu pudesse concluir mais esta etapa. Sem vocês eu não teria conseguido alcançar os meus sonhos.

À minha namorada, de forma especial, pelo amor, atenção, incentivo, força, carinho e companheirismo em todos os momentos.

À minha tia Francisca Albani Fortaleza a quem considero como uma segunda mãe, por fazer todo o possível, mediante as inúmeras dificuldades, para tornar realidade meus sonhos, acreditando na minha capacidade mais do que eu mesmo.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, a quem me espelho, por suas ideias, sugestões, críticas e ensinamentos, que foram fundamentais para meu crescimento científico e pessoal. Obrigado por toda a dedicação e paciência ao longo destes anos;

Aos meus companheiros de laboratório pela ajuda, auxílio e contribuição, sobretudo nas etapas mais difíceis desta jornada. Foi uma enorme satisfação trabalhar com todos vocês.

À Embrapa Meio Ambiente em Jaguariúna-SP, especialmente ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo e ao Dr. Thiago Zucchi, pelos micro-organismos concedidos;

Ao Vinícius Palaretti, pelas análises de RMN;

Aos docentes, Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso e Prof. Dr. Leonardo Gobbo, pelas valiosas sugestões em minha banca de Qualificação;

À Jacqueline N. M. G. Silva e ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes, pelas análises de HRMS;

Ao corpo administrativo do Departamento de Química da FFCLRP-USP pela paciência e disponibilidade na resolução de questões burocráticas;

À Universidade Estadual de São Paulo e ao Programa de Mestrado em Ciências pela oportunidade;

À CAPES pela bolsa concedida.

V

Resumo

Silva, L. H. F. **Avaliação da produção de fitotoxinas por actinobactérias isoladas da Caatinga.** 2015. Tese de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Metabólitos secundários produzidos por actinobactérias são uma inesgotável fonte de compostos com potentes atividades biológicas e estruturas intrínsecas. O desenvolvimento em instrumentação analítica tem contribuído significantemente para acelerar o processo de identificação e caracterização desses metabólitos bioativos. Sem dúvida alguma, a espectrometria de massas (MS) e o seu acoplamento com técnicas de separação, especialmente a cromatografia líquida (UHPLC-MS), tem sido reconhecida como a técnica mais "eficiente" em análises de produtos naturais. Nesta dissertação foi explorado o potencial da espectrometria de massas como ferramenta analítica para a identificação e caracterização estrutural de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da caatinga. Foram produzidos noventa extratos de actinobactérias, dos quais quinze apresentaram alguma atividade para o bioensaio da Lemna minor e seis apresentaram atividade para o bioensaio da Chlorella vulgaris. Os extratos brutos ativos das actinobactérias Caat 7-38, Caat 8-6 e Caat 5-29 foram selecionados para caracterização dos compostos ativos, os quais foram isolados empregando o fracionamento guiado por bioensaios. No extrato bruto Caat 7-38, a actinomicina D foi identificada como fitotoxina, ao passo que para o extrato bruto Caat 8-6, foi possível inferir a atividade fitotóxica à presença do griseorhodin A. Já para o extrato bruto Caat 5-29, o composto identificado com atividade fitotóxica apresenta uma estrutura inédita, provavelmente pertencente à classe das anguciclinonas. Foi realizado ainda um estudo para avaliar o efeito da adição de terras raras ao meio de cultivo da actinobacteria Caat 7-38. Para os meios de cultivos contendo neodímio e, principalmente, lantânio ocorreu uma superprodução da actinomicina D, indicando assim, o grande potencial da aplicação das terras raras nos estudos de micro-organismos.

PALAVRAS-CHAVES: Actinobactérias, fitotoxinas, espectrometria de massas sequencial, actinomicina D, griseorhodin A e terras raras.

Abstract

Silva, L. H. F. **Phytotoxins production evaluation by actinomycetes isolated from the Caatinga biome.** 2015. Tese de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Secondary metabolites produced by actinomycetes are an inexhaustible source of compounds with potent biological activities and intrinsic structures. The development analytical instrumentation has contributed significantly to accelerate the identification and characterization of these bioactive metabolites. Undoubtedly, mass spectrometry (MS) and its coupling with separation techniques, especially liquid chromatography (UHPLC-MS) has been recognized as the most "efficient" technique in natural product analysis. In this work was explored the potential of mass spectrometry as an analytical tool for identification and structural characterization of phytotoxins produced by actinomycetes isolated from the rhizosphere of plants from the Caatinga biome. Ninety actinomycetes extracts were produced, of which fifteen showed some activity for the bioassay with Lemna minor and six showed activity for the bioassay with *Chlorella vulgaris*. The crude active extract of actinomycetes Caat 7-38, Caat 8-6 and Caat 5-29 were selected to characterize the active compounds, which were isolated using bioassay-guided fractionation. In the crude extract Caat 7-38, actinomycin D was identified as phytotoxin, while for crude extract Caat 8-6, it was possible to infer phytotoxic activity to the presence of griseorhodin A. For the crude extract Caat 5-29, the compound identified with phytotoxic activity presents a new structure, probably belonging to the class of anguciclinones. A study to evaluate the effect of addition of rare earths to the culture medium of actinobacteria Caat 7-38 was also carried out. To the culture medium containing neodymium and especially lanthanum occurred overproduction of actinomycin D, thus indicating the great potential of application of rare earths in the studies of microorganisms.

KEYWORDS: Actinomycetes, phytotoxins, tandem mass spectrometry, actinomycin D, griseorhodin A and rare earths.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos compostos bioativos descobertos de acordo com a sua origem biológica
Figura 2. Esquema simplificado destacando as estruturas da Fosfinotricina a partir do Bialafos, a qual inspirou a estrutura do herbicida Glifosato9
Figura 3. Fitotoxinas produzidas pelos fitopatógenos <i>Streptomyces scabeis</i> e <i>Streptomyces</i> <i>acidiscabies</i>
Figura 4. Anisomicina, (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-hidroxi-2-(4-metoxibenzil)-pirrolidin-3-il acetato, fitotoxina produzida por <i>Streptomyces spp</i> e o herbicida sintético NK-04911
Figura 5. Modos de varredura realizados por analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ). 14
Figura 6. Imagem da planta aquática <i>Lemna minor</i> (à esquerda) e microalga <i>Chlorella</i> vulgaris (à direita)
Figura 7. Metodologia do fracionamento guiado por bioensaios
Figura 8. Transição entre o período chuvoso (A) e seco (B) na Caatinga, um dos fenômenos
mais interessantes desse bioma. Fonte: Kavamura, V. N. Screening of Brazilian cacti
<i>rhizobacteria for plant growth promotion under drought</i> . Microbiological Research. 2012;168(4):183-191
Figura 9. Resultado do bioensaio da L. minor, em que foram testados os extratos brutos da
Caat 10-24, Caat 10-15 +(F) e Caat 7-52, respectivamente
Figura 10. Resultado do bioensaio da C. vulgaris, em que foram testados os extratos brutos
da Caat 2-43, Caat 4-55, Caat 8-18, Caat 5-29 e Caat 7-48, respectivamente
Figura 11. Diagrama de Venn, contendo os resultados obtidos nos bioensaios realizados. Em destaque, estão as actinobactérias selecionadas para posteriores estudos de desreplicação37
Figura 12. Espectros de DI-MS em modo positivo de alguns extratos, demonstrando a diversidade química dos extratos brutos produzidos

Figura 14. Estrutura da principal isoforma da surfactina. Fonte: Barros, F. F. C., et. al. *Surfactina: propriedades química, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos.* Quim. Nova. 2007;30(2):409-414.....40

Figura 15. Espectro de ESI-MS/MS em modo positivo dos sinais de m/z [M+H]+ a) 1008, b) 1022, c) 1036, ressaltando as sequências peptídicas e os fragmentos obtidos......43

Figura 18. Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de m/z 1255 da actinomicina D, utilizando uma energia de colisão de 50 eV......47

Figura 20. Espectros de massas do extrato bruto da Caat 7-38 extraído em diferentes condições. a) pH 2 (ácido), b) pH 10 (básico), c) SPE com HLB e d) SPE com C18......50

Figura 23. Esquema do Experimento de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas)......54

Figura 24. a) Cromatograma de UHPLC-MRM de um dos canais de MRM monitorados (1255>300) relativo à análise da actinomicina D padrão na concentração de 1 μ g/mL. **b**) Curva de calibração da actinomicina D. **c**) Monitoramento da produção da actinomicina D na fermentação da actinobactéria Caat 7-38 em meio BD em função das terras raras adicionadas.

Figura 29. a) Morfologia da actinobactéria Caat 8-6. **b**) Meio de cultivo da actinobactéria Caat 8-6 antes (à direita) e após a filtração para retirada dos micélios (à esquerda). **c**) Extração do meio liquído obtido da fermentação da Caat 8-6, utilizando acetato de etila......60

 6. b) Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de m/z 509, utilizando uma energia Figura 34. Espectro de DI-MS em modo a) negativo e b) positivo do extrato bruto da Caat 5-Figura 35. Cromatograma de UHPLC-MS, obtido do extrato bruto da actinobactéria Caat 5-29.....67 Figura 36. a) Cromatograma de HPLC-UV analítico do extrato bruto da Caat 5-29. b) Cromatograma de HPLC-UV preparativo do extrato bruto da Caat 5-29, contendo o resultado do bioensaio da *L. minor* da fração ativa......68 Figura 37. Espectro de DI-MS em modo positivo da fração Fr-9 do extrato bruto da Caat 5-**Figura 38.** Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de m/z 385 do extrato da Caat 5-29, utilizando uma energia de colisão de 35 eV......69 Figura 40. a) espectro de RMN¹³C e b) espectro de DEPT 135 da fração 9 (125 MHz em Figura 41. Espectro de correlação HMQC do composto ativo, enfatizando a região dos hidrogênios carbinólicos.....71 Figura 43. a) Estrutura proposta para a fitotoxina presente no extrato bruto da Caat 5-29 e b) atribuições de hidrogênio e carbono para o antibiótico PM07074772 Figura 44. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do Figura 45. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do

Figura 33. a) Espectro de DI-MS em modo positivo da fração 15 do extrato bruto da Caat 8-

Figura 46. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do
hidrogênio em δ_H 7,6274
Figura 47. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do
hidrogênio em δ_H 5,174
Figura 48. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do
hidrogênio em δ_H 4,6875
Figura 49. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do
hidrogênio em δ_H 9,1075
Figura 50. Ampliação do espectro de correlação homonuclear de hidrogenio COSY,
destacando as interações existentes76
Figura 51. Ampliação do espectro de ROESY, destacando as interações existentes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios alvos de ação de herbicidas e suas respectivas classes químicas4
Tabela 2. Alvos moleculares de algumas fitotoxinas produzidas por actinobactérias. 9
Tabela 3. Composição nutricional do meio SIS. 24
Tabela 4. Composição do meio de cultivo BBM para manutenção da Chlorella vulgaris26
Tabela 5. Distribuição das culturas fermentadas para a realização do experimento demonitoramento da produção da actinomicina D por MRM
Tabela 6. Atividade fitotóxica dos extratos brutos de actinobactérias frente à L. minor e C. vulgaris. 35
Tabela 7. Fragmentos obtidos dos espectros de ESI-MS/MS dos homólogos da surfactina42
Tabela 8. Composições moleculares propostas para os fragmentos do íon de m/z 1255 daactinomicina D.47
Tabela 9. Principais íons encontrados nas frações ativas 20 a 26 obtidas do extrato daactinobactéria Caat 8-6.65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila		
BBM	do inglês Bold´s Basal Medium		
BD	Batata-Dextrose		
CAS	do inglês Chemical Abstracts Service		
CD ₃ OD	Metanol Deuterado		
CID	(do inglês <i>Collision Induced Dissociation</i>) Dissociação Induzida por Colisão		
COSY	do inglês Correlation Spectroscopy		
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13		
δ	Deslocamento químico		
DEPT	do inglês Distortionless Enhancement by Polarization Transfer		
DI-MS	do inglês Direct Insertion - Mass Spectrometry		
DNA	(do inglês Deoxyribonucleic Acid) Ácido Desóxirribonucleico		
DNP	(do inglês Dictionary of Natural Products) Dicionário de Produtos Naturais		
DMSO	Dimetilsulfóxido		
ESI+/ESI-	(do inglês <i>Electrospray ionization</i>) Ionização por eletrospray nos modos positivo/negativo		
FSI	Fotossistema I		
GC-MS	(do inglês Gas Chromatography-Mass Spectrometry) Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas		
HIV-1	(do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>) Vírus da Imunodeficiência Humana		
HLB	do inglês Hydrophilic-Lipophilic Balanced		
HMBC	do inglês Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy		
HMQC	do inglês Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy		
HPLC	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatograph</i>) Cromatografia Líquida de Alta Efiência		

HPLC-MS(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ma Spectrometry) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada Espectrometry) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometry) Cromatografia Líquida de Alta Eficiênci acoplada à Espectrometria de Massas SequencialHPLC-MS(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Nucleu Magnetic Resonance) Cromatografia Líquida de Alta Eficiênci acoplada à Ressonância Magnética NuclearHPLC-UV(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviole Cromatografia Líquida de Alta Eficiênci acoplada à Ressonância Magnética NuclearHPLC-UV(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultravioleta'H RMNRessonância Magnética Nuclear de PrótonHTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alt DesempenhoJConstante de acoplamentoKVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS(do inglês Ribnucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Ribnucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ma Spectrometry) Espectrometria de Massas	HPLC-DAD	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatograph-Diode Array Detector</i>) Cromatografia Líquida de Alta Efiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-MS/MS(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Tande Mass Spectrometry) Cromatografia Líquida de Alta Eficiênc acoplada à Espectrometria de Massas SequencialHPLC-NMR(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Nuclee Magnetic Resonance) Cromatografia Líquida de Alta Eficiênc acoplada à Ressonância Magnética NuclearHPLC-UV(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviole Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detect Ultravioleta'H RMNRessonância Magnética Nuclear de PrótonHTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alt DesempenhoJConstante de acoplamentoKVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento de Reações MúltiplasMS(do inglês Ringh Tandem Mass Spectrometria de MassasMS/MS(do inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySIS(do inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid chromatography-Massas	HPLC-MS	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
HPLC-NMR(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Nuclea Magnetic Resonance) Cromatografia Líquida de Alta Eficiênci acoplada à Ressonância Magnética NuclearHPLC-UV(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviole Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detect Ultravioleta ¹ H RMNRessonância Magnética Nuclear de PrótonHTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alta DesempenhoJConstante de acoplamentoKVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento de Reações MúltiplasMS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ma Spectrometry) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	HPLC-MS/MS	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography-Tandem</i> <i>Mass Spectrometry</i>) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
HPLC-UV(do inglês High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detect Ultravioleta'H RMNRessonância Magnética Nuclear de PrótonHTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alt DesempenhoJConstante de acoplamentoKVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento de Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ma Spectrometria de Massas	HPLC-NMR	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance</i>) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ressonância Magnética Nuclear
¹ H RMNRessonância Magnética Nuclear de PrótonHTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Ali DesempenhoJConstante de acoplamentokVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento de Reações MúltiplasMS(do inglês Muss Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mat Spectrometria de Massas	HPLC-UV	(do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet</i>) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector Ultravioleta
HTS(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alt DesempenhoJConstante de acoplamentokVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento de Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySIS(do inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mat Spectrometria de Massas	¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
JConstante de acoplamentokVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento of Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mas Spectrometria de Massas	HTS	(do inglês High Throughput Screening) Monitoramento de Alto Desempenho
kVKilovoltMeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento of Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mats Spectrometria de Massas	J	Constante de acoplamento
MeOHMetanolMRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento or Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mats Spectrometria de Massas	kV	Kilovolt
MRM(do inglês Multiple Reaction Monitoring) Monitoramento of Reações MúltiplasMS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mat Spectrometria de Massas	MeOH	Metanol
MS(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de MassasMS/MS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mas Spectrometria de Massas	MRM	(do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>) Monitoramento de Reações Múltiplas
MS/MS(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massa SequencialRNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ma Spectrometry) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	MS	(do inglês Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas
RNA(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleicoROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mail Spectrometry) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	MS/MS	(do inglês Tandem Mass Spectrometry) Espectrometria de Massas Sequencial
ROESYdo inglês Rotating Frame Overhauser Effect SpectroscopySISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Max Spectrometry) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	RNA	(do inglês Ribonucleic Acid) Ácido ribonucleico
SISdo inglês Swedish StandardUHPLC-MS(do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Max Spectrometry) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	ROESY	do inglês Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
UHPLC-MS (do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Ma. Spectrometry</i>) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada Espectrometria de Massas	SIS	do inglês Swedish Standard
	UHPLC-MS	(do inglês <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>) Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
UV Ultravioleta	UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 A importância da busca de novos herbicidas naturais	2
1.2 Metabolismo secundário e processos fermentativos de micro-organismos	5
1.3 Actinobactérias	6
1.4 O papel da Espectrometria de Massas nos estudos de desreplicação	11
1.6 Versatilidade Analítica da Espectrometria de Massas	13
1.7 Bioensaios como guia no isolamento de fitotoxinas	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Reagentes e solventes	21
3.2 Esquema geral da metodologia utilizada nesta dissertação	22
3.3 Isolamento, caracterização e manutenção das actinobactérias	22
3.4 Preparo dos meios de cultivo, fermentação e extração	23
3.5 Bioensaios de fitotoxicidade com <i>Lemna minor</i>	23
3.6 Bioensaios de fitotoxicidade com <i>Chlorella vulgaris</i>	25
3.7 Fracionamento dos extratos brutos ativos	26
3.8 Análises por espectrometria de massas	27
3.9 Análises por Ressonância Magnética Nuclear	27
3.10 Estudo da influência das terras raras na produção da actinomicina D	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1 Micro-organismos avaliados nesta dissertação	

4.2 Preservação das actinobactérias estudadas
4.3 Geração dos extratos brutos
4.4 Bioensaios de fitotoxicidade com <i>Lemna minor</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>
4.5 Perfis químicos dos extratos brutos
4.6 Desreplicação do extrato bruto da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F40
4.7 Desreplicação do extrato bruto da Caat 7-38
4.7.1 Actinomicina D
4.7.3 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 7-384.7.4 Monitoramento da produção da actinomicina D por MRM52
4.8 Desreplicação do extrato bruto da Caat 8-657
4.8.1 Rubromicinas604.8.2 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 8-662
4.9 Desreplicação do extrato bruto da Caat 5-29
 4.9.1 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 5-29
5. CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 A importância da busca de novos herbicidas naturais

Os produtos naturais inspiraram a maioria dos princípios ativos na medicina, de modo que cerca de 80% dos medicamentos são derivados ou foram inspirados por um produto natural¹. Uma análise mais abrangente confirma ainda a importância contínua dos recursos naturais para a descoberta de novos medicamentos, principalmente devido à sua alta diversidade química e aos efeitos da pressão evolutiva para criar moléculas biologicamente ativas². Entretanto, é importante destacar que os produtos naturais, sobretudo o de origem microbiana, não têm sido utilizados apenas como medicamentos para a humanidade, mas também como agroquímicos para o combate de pragas nas lavouras^{3.}

O elevado aumento no rendimento das culturas foi possível, em parte, pela descoberta e utilização de produtos químicos para controle de pragas. O advento da monocultura extensiva e as práticas agrícolas intensivas do século XX foram acompanhadas por aumentos significativos nos rendimentos de produção. Novas culturas foram selecionadas com base exclusivamente em suas produtividades, não levando em consideração fatores ambientais e nem a menor resistência às pragas por grande parte dessas culturas⁴. O uso recorrente de determinados herbicidas ou mecanismos de ação na mesma área tem levado à seleção de ervas daninhas com resistência múltipla, bem como campos com misturas de espécies com resistência a diferentes herbicidas com distintos modos de ação. Este nível de resistência múltipla reduz significativamente as opções dos agricultores para uma gestão eficaz e econômica de plantas daninhas⁵. Desse modo, há uma necessidade iminente de classes verdadeiramente inovadoras de herbicidas que explorem espaços químicos e interajam com sítios moleculares não previamente explorados.

Existem dezenas de milhares de variedades de ervas daninhas distribuídas ao redor do planeta⁶. Ervas daninhas são plantas que crescem em localidades indesejáveis, competindo com a cultura principal por água, luz e nutrientes. O seu controle representa o principal fator de elevação dos custos da produção de alimentos na agricultura moderna, uma vez que os gastos com herbicidas correspondem a praticamente metade dos gastos com pesticidas em lavouras ao redor do mundo⁷. A cada ano, a perda líquida causada por essas plantas soma quase 10% da produção mundial total, correspondendo a perdas de quase 1 bilhão de toneladas de alimentos⁸. Embora seja considerado eficaz no controle de um número considerável de ervas daninhas, o uso de herbicidas sintéticos tem sido questionado quanto ao

seu impacto ambiental, já que a probabilidade de contaminação de alimentos, do solo e da água é menor com os herbicidas naturais do que com os sintéticos. Por este motivo, a busca por herbicidas naturais que não apresentem os efeitos nocivos dos herbicidas sintéticos é de fundamental importância, visando principalmente, minimizar o impacto ambiental causado por essas atividades. Além dos problemas ambientais, alguns problemas relacionados à saúde humana também são descritos como alergias, problemas relacionados com a reprodução e redução de crescimento⁹.

As pesquisas aplicadas ao desenvolvimento de herbicidas de fontes naturais podem fornecer novas estruturas, modos de ação e alvos moleculares contra ervas daninhas, especialmente àquelas que já apresentam algum grau de resistência aos herbicidas atualmente utilizados¹⁰, o que é altamente necessário já que pouco avanço nessa área tem sido observado nas últimas duas décadas. Nenhum herbicida com um novo mecanismo de ação foi comercializado em quase vinte anos, sendo que antes deste período, aproximadamente a cada três anos, um novo herbicida com um mecanismo de ação diferente era introduzido no mercado, o que totaliza hoje um total de cerca de 20 modos de ação conhecidos. Alguns exemplos destes modos de ação estão contidos na Tabela 1. Os poucos herbicidas derivados de produtos naturais existentes hoje (tricetonas, bialafos e glufosinato) representam alvos moleculares até então inexplorados⁵. Quando comparados aos herbicidas sintéticos, herbicidas provenientes de fontes naturais geralmente apresentam toxicidades mais baixas a mamíferos (por serem nocivos a estruturas e enzimas exclusivas de plantas não presentes em animais de maior porte); por não terem estruturas sintéticas, são biodegradáveis; e são mais seletivos, uma vez que possuem alvos enzimáticos específicos e, portanto, podem apresentar maior resposta biológica a menores concentrações¹¹.

Um relatório recente examinando a diversidade estrutural de todos os compostos disponíveis no registo CAS confirmou que a maioria dos 24 milhões de compostos orgânicos existentes na base de dados podem ser classificados em tão poucos como 143 grupos estruturais básicos¹². Por outro lado, um estudo sobre a complementaridade entre farmacóforos sintéticos e naturais indicou que os produtos naturais têm geralmente uma elevada diversidade estrutural, possuindo mais centros quirais, átomos de carbono com hibridização sp³ e anéis que os compostos sintéticos¹³. Além disso, poucos produtos naturais contêm halogênios (Cl, F e Br), mas eles tendem a ser ricos em oxigênio e nitrogênio, e podem conter grupos sulfato ou fosfato². Essa complexidade estrutural dos produtos naturais é o resultado de inúmeras permutações que foram sintetizadas pelos variados organismos em

um tempo extremamente longo para selecionar compostos com atividade biológica apropriada. Além disso, uma vez que estes produtos são derivados quase que exclusivamente a partir de vias associadas com o metabolismo secundário, há uma alta probabilidade destes compostos possuírem alguma atividade biológica contra outros organismos, frequentemente através de novos mecanismos de ação¹⁴.

Sítio alvo de ação do herbicida	Processo inibido	Classe química
Proteína Q _B	Transporte de elétrons fotossintético	triazinas, feniluréias, uracilas
Aceptor de elétrons no FSI	Transporte de elétrons fotossintético	bipiridílios
Fitoeno desaturase	Biossíntese dos carotenóides	vários grupos
Protoporfirinogênio oxidase	Biossíntese da porfirina	nitro-difeniléteres, oxadiazonas
Acetolactato sintase	Biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada	sulfoniluréias, imidazolinonas, triazolopirimidinas
Enol-piruvilchiquimato-3- fosfato sintase	Biossíntese dos aminoácidos aromáticos	glifosato
Glutamina sintase	Biossíntese da glutamina	glufosinato
Acetil-CoA carboxilase	Biossíntese dos ácidos graxos	ciclohexanedionas, arilóxifenóxipropionatos
Complexo 'elongase'	Elongação da cadeia dos ácidos graxos	tiocarbamatos
α-,β-Tubulina	Divisão celular	dinitroanilinas, carbamatos
Proteína de ligação da auxina		ácidos fenóxiacéticos, ácidos benzóicos
Hidróxifenilpiruvato dioxigenase	Biossíntese da homogentisato oxidase	isoxazols

Tabela 1. Sítios alvos de ação de herbicidas e	suas respectivas classes químicas.
--	------------------------------------

1.2 Metabolismo secundário e processos fermentativos de micro-organismos

Todos os organismos vivos crescem e se reproduzem utilizando rotas metabólicas muito semelhantes, ou até idênticas, para a geração de energia. Essas reações fazem parte do metabolismo primário. Os metabólitos essenciais para o crescimento, manutenção da vida e reprodução dos seres vivos são pertencentes a este metabolismo, como os aminoácidos, açúcares, ácidos nucleicos e ácidos graxos, estando presentes em toda forma de vida. No entanto, existem outras rotas metabólicas que possibilitam os organismos a produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. Essas rotas constituem o metabolismo secundário, que desempenha um papel fundamental na sinalização, proteção e interação do ser vivo com o ambiente em que se encontra e com os outros organismos à sua volta¹⁵.

Os produtos naturais microbianos derivados do metabolismo secundário representam uma importante via para a descoberta de novos produtos utilizados em aplicações agrícolas e terapias clínicas. Em geral, a biossíntese desses metabólitos é ativada na fase final do crescimento logarítmico ou já na fase estacionária da fermentação, quando a divisão celular e a produção celular de biomassa ocorrem em níveis muito baixos¹⁶. Metabólitos secundários produzidos por micro-organismos podem ser obtidos em grandes quantidades por processos fermentativos, uma vez que há a possibilidade do controle sobre as condições dos meios de cultivo para a produção desses metabólitos. A seleção do meio de fermentação, a concentração de seus constituintes, transferência de oxigênio, temperatura de incubação, tempo de fermentação e pós-tratamentos requerem intensa investigação para determinar as condições ótimas que proporcionam uma grande população microbiana, estável e eficaz¹¹.

As fermentações microbianas em laboratório são geralmente realizadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo meio líquido com ou sem agitação, ou em culturas estáticas de meios sólidos ou semissólidos. No entanto, tais fermentações, na maioria dos casos, não correspondem fielmente à realidade do ambiente de onde o micro-organismo foi isolado, o que normalmente gera discrepâncias entre a conhecida capacidade genômica do microorganismo para produzir determinados metabólitos e a acessibilidade relativamente pequena a esses compostos¹⁷. Além disso, existem outras dificuldades potenciais na utilização de microorganismos em laboratório, uma vez que até mesmo dentro de uma espécie ou linhagem, os organismos podem variar consideravelmente, independentemente do ambiente, sua capacidade de produzir seus metabólitos¹⁸. Novos metabólitos secundários para avaliação da bioatividade podem ser conseguidos por meio de uma análise mais profunda na diversidade biológica, utilizando, por exemplo, uma triagem com fontes previamente inexploradas, tais como micro-organismos de linhagens raras e habitats "exóticos"¹⁹. Estes micro-organismos podem ser encontrados nas condições mais extremas de temperatura, pressão, salinidade e pH. Estima-se que menos de 1% da biota microbiana do planeta tenha sido explorada²⁰. Isso significa que ainda existe um grande número de metabólitos secundários desconhecidos provenientes de novas rotas biossintéticas de espécies de micro-organismos ainda não descobertas. Ao mesmo tempo, a diversidade química proporcionada pelas fontes biológicas atualmente empregadas também merece uma análise mais criteriosa, já que as técnicas de triagem e isolamento apresentam o problema frequente da "redescoberta" de compostos já descritos na literatura, deixando assim, um número significativo de novos compostos a serem descobertos através de uma melhoria nas estratégias de isolamento e detecção²¹.

Além das limitações nas tecnologias analíticas empregadas, deve-se tomar cuidado com os organismos utilizados nos estudos. Novos antibióticos foram isolados de actinobactérias, particularmente a partir do gênero *Streptomyces*, entre o final dos anos 1940 e 1960, um período que veio a ser conhecido como a Idade de Ouro da descoberta de antibióticos. No entanto, a taxa de novas descobertas despencou depois disso, devido em grande parte à redescoberta frequente de compostos altamente abundantes existentes. Desse modo, é possível sugerir que a distribuição das espécies microbianas é provavelmente similar à de outros organismos, ou seja, há um pequeno número de espécies muito ricas e essas espécies podem também ser aqueles que são facilmente cultivadas, representando então, uma pequena fração de toda a diversidade disponível²².

1.3 Actinobactérias

Atualmente, uma grande variedade dos metabólitos utilizados em aplicações agrícolas e terapias clínicas são produzidas por fermentação microbiana ou derivados obtidos por modificação química. Neste contexto, as actinobactérias são os procariontes mais econômica e biotecnologicamente viáveis e mantêm uma posição de destaque devido a sua diversidade e capacidade comprovada para produzir novos compostos com atividade biológica²³. Dos cerca de 200.000 a 250.000 metabólitos que mostram alguma atividade biológica, mais de 22.000 são produzidos por micro-organismos. Dos 22.500 metabólitos microbianos, cerca de 17%

(3.800) são metabólitos de bactérias unicelulares (especialmente *Bacillus* e *Pseudomonas* spp.); 45% (10.100) são produzidos pela fermentação de actinobactérias; e cerca de 38% (8.600) são de origem fúngica. Entre as actinobactérias, cerca de 75% (7.600) dos metabólitos são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces*²⁴.



Figura 1. Distribuição dos compostos bioativos descobertos de acordo com a sua origem biológica.

As actinobactérias são bactérias gram-positivas, que possuem alto conteúdo de guanina e citosina (g+C) em seu DNA²⁵, sendo encontradas em muitos habitats. No solo, são numericamente menos dominantes do que outras populações bacterianas, porém mais numerosos do que populações fúngicas. Normalmente, 10 a 50% da comunidade microbiana do solo é constituída por populações destes micro-organismos²⁶. No entanto, elas podem estar presentes nos mais diversos ambientes, como águas, plantas e, até mesmo, em associação com liquens²⁷. Essas bactérias são muito versáteis metabolicamente, o que possibilita a utilização de diferentes fontes de carbono. Ao contrário do que foi observado em fungos filamentosos, nos quais os metabólitos podem ser associados com famílias características, a produção dos compostos que ocorrem em várias famílias de actinobactérias é generalizada, não estando relacionada com uma linhagem específica²⁸. A grande importância das actinobactérias no ambiente é o seu papel na degradação de matéria orgânica, além de possuírem atividade proteolítica, função na decomposição de queratinas, quitinas, celulose, amido e também participação no ciclo de aminoácidos e nitrogênio²⁹.

As actinobactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentam uma alta proporção de grupos de genes encontrados em seu metabolismo secundário, o que demonstra assim, a sua especificidade na produção dos mais variados metabólitos. São normalmente encontradas no solo, com filamentos semelhantes aos fungos (eucariotos), diferenciando-se morfologicamente deles pela formação de uma camada de hifas que podem se diferenciar em uma cadeia de esporos³⁰. As *Streptomyces* spp. são produtoras de praticamente metade dos antibióticos e agentes anticâncer comercializados³¹, além de muitos outros compostos com potentes atividades biológicas, como antifúngicos³², imunossupressores³³ e pesticidas³⁴, o que torna esse gênero muito interessante biotecnologicamente e alvo de muitos grupos de pesquisa ao redor de todo o mundo.

Fitotoxinas de actinobactérias são especialmente atraentes devido à grande diversidade de seus modos de ação, como mostra a Tabela 2, adaptada de uma revisão sobre fitotoxinas de fontes naturais, publicada por Duke e Dayan (2014).³⁵ A atividade herbicida dos metabólitos secundários produzidos por espécies de *Streptomyces* ou *Actinomyces* são certamente o centro das atenções da pesquisa agroquímica, em especial após a descoberta do bialafos, isolado de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridochromogenes*. Na realidade, o Bialafos (um tripeptídeo constituído por dois resíduos de alanina e por um análogo do ácido glutâmico chamado fosfinotricina) não é a substância ativa. Dentro da planta, o composto é convertido em fosfinotricina (Figura 2), que inibe a enzima glutamina sintase, responsável pela assimilação de nitrogênio, fotorrespiração e o balanço de carbono nas plantas. A inibição desta enzima resulta numa redução da concentração celular de glutamina e um aumento de amônia a níveis tóxicos, interrompendo a fotossíntese e levando o organismo à morte dentro de poucos dias³⁶.

Modo/Sítio de ação	Molécula	Fonte biológica
Síntese de aminoácidos		
		S. hygroscopicus e S.
Giutamina sintase	Fostinotricina	viridochromogenes ³⁷
	Fosalactina	Streptomyces sp. ³⁸
Aspartato transaminase	Gostatina	S. sumanensis ³⁹
Transferência de energia		
Fotofosforilação	Nigericina	S. hygroscopicus ⁴⁰
Transferência de elétrons no	Dividage of dive	Strantonnog og 41
fotossistema I	Pindazocidina	Streptomyces sp.
Síntese de Clorofila		
Deoxixilulose-5-fosfato redutase	Fosmidocina	S. lavendulae ⁴²
Glutamato 1-semialdeído	Gabaculina	S topgaganis ⁴³
aminotransferase	Gabacuinia	5. loyacuents
Ácido aminolevilínico desidratase	Gabaculina	S. toyacaenis ⁴⁴
Síntese de lipídios		
β-cetoacil-ACP-sintase	Tiolactomicina	Nocardia sp. e Streptomyces sp.45
Expressão e regulação de genes		
Adenilsuccinato sintase	Hidantocidina	S. hygroscopicus ⁴⁶
Peptídeo deformilase	Actinonina	Actinomyces MG848-hF647
Aminopeptidase	Bestatina	Actinomyces sp.48
Macroestrutura		
Síntese de celulose	Taxtomina A	S. scabies ⁴⁹
	Ciclo celular	
Interferência proteassômica	Lactacistina	Streptomyces spp. ⁵⁰

 Tabela 2. Alvos moleculares de algumas fitotoxinas produzidas por actinobactérias.



Figura 2. Esquema simplificado destacando as estruturas da Fosfinotricina a partir do Bialafos, a qual inspirou a estrutura do herbicida Glifosato.

O bialafos e a fosfinotricina são herbicidas pós-emergentes de largo espectro que podem ser usados para o controle total da vegetação em muitos ambientes agrícolas ou em áreas não cultivadas e para dessecação de culturas antes da colheita⁵¹. A fosfinotricina foi o composto modelo que inspirou a síntese de um dos herbicidas mais utilizados ao redor do mundo, o glifosato que, diferentemente do composto que o inspirou, tem modo de ação inibindo a síntese de aminoácidos aromáticos, essenciais para a vida da planta³⁴. Por ser um herbicida de largo espectro (pouca ou nenhuma selectividade), o glifosato é muitas vezes comercializado juntamente com culturas resistentes geneticamente modificadas (soja, milho e algodão).

Importantes fitotoxinas consideradas como promissores herbicidas são as taxtominas (Figura 3), dipeptídeos cíclicos produzidos por *Streptomyces scabeis* e *Streptomyces acidiscabies*, os agentes causadores de lesões em batatas⁵². Estudos de atividade-estrutura demonstraram que a presença do grupo 4-nitroindol é fundamental para a manutenção da fitotoxidade desses metabólitos. Bioquimicamente, as taxtominas inibem a síntese de celulose, sendo que as respostas fenotípicas típicas de plantas expostas a esses compostos incluem a redução do crescimento das mudas, inchaço das células e lignificação das paredes celulares¹⁰.



Figura 3. Fitotoxinas produzidas pelos fitopatógenos Streptomyces scabeis e Streptomyces acidiscabies.

Outro exemplo é a anisomicina, um composto também isolado de *Streptomyces* spp, que apesar de possuir atividade fitotóxica, não é empregado diretamente como herbicida. Entretanto, alterações sintéticas resultaram no herbicida NK-049, (3,3'-dimetil-4-metoxibenzofenona), o qual é comercializado e amplamente utilizado em plantações de arroz (Figura 4)⁹. Sendo assim, com base nesses e outros exemplos, percebe-se claramente que as actinobactérias possuem uma capacidade comprovada para a produção de metabólitos

secundários com atividade fitotóxica e potencial para serem usados diretamente como herbicidas, ou como protótipos para a descoberta de novos herbicidas sintéticos⁵³.



Figura 4. Anisomicina, (2*R*,3*S*,4*S*)-4-hidroxi-2-(4-metoxibenzil)-pirrolidin-3-il acetato, fitotoxina produzida por *Streptomyces spp* e o herbicida sintético NK-049.

1.4 O papel da Espectrometria de Massas nos estudos de desreplicação

Os avanços tecnológicos na instrumentação analítica tornaram possível o acoplamento das técnicas de separação com os métodos espectroscópicos, possibilitando assim, uma melhora significativa na velocidade com que os produtos naturais são descobertos e avaliados para as atividades biológicas. É fato que uma única técnica analítica não é capaz de cobrir sozinha toda a variedade molecular produzida pelo metabolismo secundário dos seres vivos, de modo que a quantificação e caracterização desses compostos contam com uma variedade de técnicas analíticas que auxiliam nesses estudos. Nos dias atuais, há alguns métodos de primeira escolha para a identificação de metabólitos em extratos brutos de micro-organismos e plantas, tais como GC-MS para compostos voláteis e termicamente estáveis, HPLC-DAD, HPLC-NMR e HPLC-MS para outros compostos que não são voláteis e termicamente instáveis⁵⁴. Neste contexto, a Espectrometria de Massas tem um papel importante na aceleração da elucidação estrutural dos compostos ativos, seja fornecendo resultados relevantes para buscas em bancos de dados, ou complementando as informações obtidas através de outras técnicas para que se realize a completa caracterização do ativo.

A aplicação da MS em análises e caracterização de produtos naturais tem ganhado destaque ao longo das últimas décadas devido principalmente à sua alta sensibilidade e seletividade, o que torna esta técnica uma importante ferramenta para análise de metabólitos em matrizes biológicas complexas^{55,56}. Dada à complexidade dos extratos metabólicos microbianos, em algumas situações há necessidade de uma separação cromatográfica para reduzir os interferentes que causam a supressão de íons (espécies mais facilmente ionizáveis mascarando a presença de espécies menos ionizáveis)⁵⁷. Desse modo, o acoplamento da MS

com técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida (HPLC-MS e HPLC-MS/MS), permite a identificação e a quantificação de metabólitos secundários, até mesmo quando tais compostos estão presentes em concentrações relativamente baixas em uma amostra⁵⁵. As informações das massas moleculares dos analitos obtidos em equipamentos de alta e baixa resolução, bem como as informações estruturais que são deduzidas a partir dos padrões de fragmentação dos compostos⁵⁸ são utilizadas como ponto de partida no processo de desreplicação, acelerando o estágio de descoberta de novas substâncias, como também de compostos já caracterizados, mas que não apresentam todas as suas atividades biológicas descritas na literatura⁵⁹.

Um problema custoso do processo de isolamento e caracterização advém da "redescoberta" de compostos já descritos na literatura. Depois de caros e demorados processos de isolamento e elucidação estrutural, encontrar uma estrutura com atividade biológica já descrita pode ser comum e indesejado. Desse modo, na pesquisa voltada para produtos naturais, a identificação de novos metabólitos e os compostos conhecidos são objetivos igualmente importantes, sendo o último fator um pré-requisito fundamental para a desreplicação bem-sucedida⁶⁰.

A desreplicação consiste em um processo de reconhecimento e eliminação prévia de substâncias isoladas presentes em um extrato com a finalidade de economizar tempo de pesquisa e dinheiro e tem sido um consenso na química de produtos naturais deste o início da pesquisa de antibióticos⁵⁹. Esta metodologia é um passo crucial na busca de metabólitos secundários bioativos inéditos ou para a confirmação de uma atividade biológica não caracterizada. O processo de desreplicação é também importante porque ajuda a priorizar extratos para isolamento químico, além de possibilitar o agrupamento de amostras que contêm componentes ativos desconhecidos com perfis de desreplicação similares. Assim que o componente ativo do extrato é identificado, o perfil obtido por MS/MS pode ser utilizado para estabelecer a presença do composto em outros extratos⁶¹.

Para uma desreplicação eficiente é altamente desejável identificar não apenas os compostos conhecidos, mas também os seus parentes próximos desconhecidos. Notavelmente, os organismos responsáveis pela produção de muitos metabólitos secundários microbianos normalmente produzem uma gama de produtos muito semelhantes, obtidos por modificações posteriores efetuadas por enzimas com seletividade variável. No entanto, a desreplicação de compostos estruturalmente semelhantes usando somente espectros de MS^n não é simples, podendo-se obter resultados enganosos, já que pequenas mudanças na estrutura podem

acarretar mudanças significativas no padrão de fragmentação. Além disso, a fragmentação depende do tipo de espectrômetro de massa e os parâmetros instrumentais utilizados. Desse modo, novos métodos que possibilitem uma robusta comparação de um elevado número de espectros de MS^{*n*}, a fim de avaliar a semelhança estrutural dos compostos analisados, são urgentemente necessários¹⁷.

1.6 Versatilidade Analítica da Espectrometria de Massas

Em estudos de desreplicação, os espectrômetros de massas com analisadores do tipo Triplo Quadrupolo são os mais interessantes, por se tratar de uma técnica altamente seletiva e sensível. Valendo-se de dois analisadores quadrupolares em linha (Q1 e Q3), interligados por uma cela de colisão (q2), os equipamentos com analisadores do tipo Triplo Quadrupolo (Q"q"Q) apresentam uma maior versatilidade analítica, pois possuem a capacidade de realizar diferentes modos de varreduras que restringem o tipo de íons a serem detectadas, graças a uma variação dos valores de RF e DC dos quadrupolos Q1 e Q3. Nestes equipamentos, a cela de colisão (q2) propicia a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), através da colisão com um gás inerte (geralmente argônio), com energia controlada. Esta colisão usualmente produz fragmentos que são analisados no quadrupolo (Q3), processo identificado como dissociação induzida por colisão CID (do inglês "Collision - induced dissociation"). Essas qualidades auxiliam no aumento da sensibilidade da análise, tornando esse equipamento adequado para realizar a detecção e também quantificação de analitos em concentrações tão pequenas quanto fmol L⁻¹. Os principais modos de varredura com um equipamento Triplo Quadrupolo são: Íon Precursor, Íons Produto, Perda Neutra e Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM)⁶². A Figura a seguir mostra um esquema desses modos de varredura.

Nos experimentos de íons produtos (CID), o primeiro quadrupolo é programado para que apenas um íon de relação m/z específica atinja a cela de colisão, filtrando-se os demais íons presentes. Desta forma, os íons fragmentos podem ser analisados no terceiro quadrupolo, possibilitando a caracterização estrutural do íon selecionado. Nos experimentos de íons precursores, por sua vez, o terceiro quadrupolo é focalizado em um íon fragmento selecionado enquanto ocorre uma varredura de massas no primeiro quadrupolo. Dessa maneira, todos os íons que produzem como fragmento o íon selecionado são detectados. No modo de análise empregando o monitoramento de reações múltiplas (MRM – do inglês "*Multiple-reaction*

monitoring"), um íon precursor é selecionado no primeiro analisador de massas (Q1) para ser fragmentado por CID. Para cada íon precursor apenas um único íon produto é selecionado em Q3 e irá para o próximo estágio de detecção. A combinação da seleção dos dois eventos confere a alta seletividade, bem como a excelente sensibilidade do método. Por fim, os experimentos envolvendo perda neutra são empregados na identificação de perdas de moléculas conhecidas e também apresentam uma excelente seletividade. Esta técnica pode ser empregada na análise de variados extratos brutos, através da fragmentação específica de uma determinada classe química. Neste modo, o primeiro e o terceiro quadrupolo fazem a varredura simultaneamente, com uma diferença de massa constante entre eles. Assim, para uma diferença em massa de *a*, quando um íon de massa *m* atinge o primeiro quadrupolo, a detecção ocorre se este íon produzir um íon fragmento de massa (*m*–*a*) quando deixar a célula de colisão⁶².



Figura 5. Modos de varredura realizados por analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ).

1.7 Bioensaios como guia no isolamento de fitotoxinas

As estratégias utilizadas na descoberta de novas fitotoxinas, independente da classe a que pertencem, não são diferentes das usadas na descoberta de outras moléculas bioativas como fármacos e pesticidas. A estratégia dominante é, sem dúvidas, um "*screening*" sistemático de um grande número de moléculas¹⁸. Em grandes programas de descobertas de novos compostos com atividades de interesse biotecnológico há necessidade crucial de que os "*screenings*" sejam eficientes, rápidos e, preferencialmente, que tenham baixo custo de execução. O processo pelo qual um grande número de amostras é testado, até mesmo de forma totalmente automatizada, é chamado de Monitoramento de Alto Desempenho (HTS, do inglês *High Throughput Screening*)⁶³.

Por muitos anos, os químicos de produtos naturais se preocuparam em isolar e elucidar as estruturas dos metabólitos secundários sem se interessarem por suas atividades biológicas. Mas, com os modernos avanços em técnicas espectroscópicas, espectrométricas e de separação, que produziram ferramentas para purificação e análises estruturais com níveis extraordinários de sensibilidade e sofisticação, os mesmos químicos se aventuraram nos isolamentos guiados por bioensaios⁶³, os quais passaram a ter papel de destaque em todo *"screening"* e estratégia de isolamento e desreplicação. Tais estratégias de isolamento conectam as informações dos perfis químicos dos extratos e frações com as atividades observadas nos bioensaios realizados em microescala, com o objetivo de obter respostas rápidas e de alta capacidade, reduzindo significativamente o tempo para a descoberta de compostos ativos⁶⁴. O tipo de bioensaio utilizado para realizar os *"screenings"* de diferentes extratos ou frações dependerá, obviamente, da atividade biológica desejada pelo estudo e, principalmente, do número de extratos a serem testados, da quantidade de extrato disponível para o ensaio e dos recursos do laboratório para arcar com os custos do mesmo, uma vez que existem bioensaios com diversos níveis de sofisticação e custos⁶³.

Os bioensaios detectam compostos com atividades biológicas especificas e por isso devem ser específicos, sensíveis, simples de operar, robustos, rápidos, de baixo custo, com boa reprodução e preferencialmente passivos de automação⁶⁵. Através de ensaios biológicos é possível avaliar a potencialidade da amostra testada, mesmo antes de se obter qualquer informação sobre a sua composição. Isso é muito importante, principalmente quando se procura atividade biológica em matrizes complexas, como extratos brutos de fermentações microbianas. Entretanto, alguns fatores podem complicar a realização dos bioensaios. O mais

comum está relacionado com a solubilidade limitada de alguns extratos brutos ou frações, fazendo com que a alíquota da amostra não represente o extrato original. Podem ocorrer também mudanças químicas durante a extração e a manipulação dos extratos, além de efeitos de sinergia ou antagonismo⁶³.

Os bioensaios de fitotoxicidade consistem em ensaios que determinam a atividade fitotóxica dos compostos testados e têm ganhado bastante destaque ultimamente, principalmente devido à evolução crescente da resistência de plantas daninhas à herbicidas comerciais existentes e a necessidade inerente de novas fitotoxinas. Tais bioensaios avaliam se um determinado extrato pode inibir o crescimento, causar murchamento, necroses totais ou parciais, cloroses ou matar a planta utilizada como alvo, apresentando potencialidade para ser usado como herbicidas⁶⁶. Os bioensaios mais comumente utilizados são aqueles que envolvem germinação de sementes e/ou crescimento de mudas⁶⁷. As espécies-modelo geralmente testadas em ensaios de germinação são sementes de alface (*Lactuca sativa*) e de erva-fina (*Agrostis stolonifera* L.), representando dicotiledôneas e monocotiledôneas, respectivamente, para detectar uma possível seletividade dos compostos ativos⁶³. Outras sementes utilizadas em "screenings" para herbicidas são de agrião-da-índia (*Lepidium sativum*), capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*) e pepino (*Cucumis sativum*)⁶⁸.

Outros bioensaios de fitotoxidade frequentemente utilizados por agências reguladoras federais, por industrias e por laboratórios empregam espécies de pequenas plantas aquáticas (*Lenna minor*) e microalgas (*Chlorella vulgaris*). A *Lemna minor* é uma espécie de planta flutuante com alta capacidade adaptativa pertencente à família *Lemnacea*e, presentes em vários ambientes aquáticos, como lagos, rios, efluentes e sedimentos. As plantas são coloniais e formam agregados de duas ou mais pétalas, sendo estas pequenas e de rápido crescimento. A *Lemna minor* é sensível a contaminantes orgânicos tóxicos e por esse motivo é utilizada para testes de herbicidas e monitoramento de efluentes⁶⁹. Por sua vez, a *Chlorella vulgaris* é uma microalga verde pertencente à família Oocystaceae de tamanho entre 2 a 4 µm. Possuem um papel significante como produtores primários nos ecossistemas aquáticos e por esta razão, são usadas em estudos ambientais para avaliar a toxicidade de vários produtos químicos e descargas de resíduos^{70,71}. Devido à sua simplicidade estrutural, abundância na natureza e alta sensibilidade a pequenas quantidades de amostra⁷², suspensões de células de microalgas são cada vez mais usadas na pesquisa agroquímica para triagem de herbicidas⁷³, principalmente em estudos relacionados a herbicidas inibidores de fotossíntese^{74,75,76,77,78,79,80}.



Figura 6. Imagem da planta aquática Lemna minor (à esquerda) e microalga Chlorella vulgaris (à direita).
2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo principal identificar e caracterizar fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da rizosfera de plantas da caatinga, realizando a identificação dos compostos ativos por meio do isolamento guiado pelos bioensaios de fitotoxicidade com *Lemna minor* e microalga *Chlorella vulgaris*.

2.2 Objetivos Específicos

- Preservar e manter as actinobactérias estudadas em glicerol;
- Produzir um banco de extratos de actinobactérias, utilizando o meio de cultivo BD;
- Realizar o *"screening"* biológico dos diferentes extratos produzidos frente à *Lemna minor* e *Chlorella vulgaris*;
- Aplicar a estratégia de desreplicação para os extratos brutos gerados;
- Isolar, identificar e/ou elucidar estruturalmente os compostos bioativos provenientes das actinobactérias Caat 7-38, Caat 8-6 e Caat 5-29;
- Avaliar o efeito da adição de algumas terras raras (lantânio, escândio e neodímio) ao meio de cultivo da actinobactéria Caat 7-38.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e solventes

- Dextrose (Difco) para preparação do meio de cultivo BD;
- Acetato de etila PA (Synth) para as extrações líquido-líquido;
- Sulfato de sódio (Synth) como agente secante da fase orgânica após a extração;

• Metanol HPLC (Panreac) como eluente em coluna Sephadex e como fase móvel em HPLC-UV;

- Acetonitrila (Panreac) como fase móvel em HPLC-UV;
- Metanol e acetonitrila grau HPLC (Merck ou J.T. Baker) para as análises em espectrômetro de massas (inserções diretas e LC-MS);

• Água ultrapurificada em sistema Milli-Q da Millipore para as análises em espectrômetro de massas;

• Ácido fórmico e acetato de amônio (ambos Sigma-Aldrich) como aditivos da fase móvel em espectrometria de massas;

• Glicerol (Synth) para preservação dos micro-organismos;

• Hidróxido de amônio PA (Synth) e ácido fosfórico PA (Synth) para alterar o pH dos meios de cultivo para extração em diferentes pHs;

• Todos os sais utilizados para o preparo de meio SIS e BBM são da marca Synth;

• Dimetilsulfóxido (Synth) para solubilizar os extratos para os bioensaios;

 Metanol e acetona deuterados (ambos Sigma-Aldrich) para obtenção dos espectros de RMN.

• Atrazina (Sigma-Aldrich) como controle positivo para os bioensaios da *Lemna minor* e *Chlorella Vulgaris*.



3.2 Esquema geral da metodologia utilizada nesta dissertação

Figura 7. Metodologia do fracionamento guiado por bioensaios.

3.3 Isolamento, caracterização e manutenção das actinobactérias

As actinobactérias estudadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Dr. Itamar Soares de Melo da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP). A grande maioria das actinobactérias utilizadas foi isolada da rizosfera de cactáceas pertencentes ao bioma Caatinga do semiárido nordestino, de modo que os sítios de coleta dos microorganismos foram distribuídos ao longo dos estados da Bahia (BA), Ceará (CE), Paraíba (PB), Piauí (PI) e Rio Grande do Norte (RN). A determinação dos gêneros e espécies da maior parte desses micro-organismos foi realizada através do método do gene 16S do rDNA.

Cento e oito cepas foram repicadas e preservadas em tubos criogênicos (Axygen) contendo 1 mL de solução de glicerol 20% (v/v em água). Inicialmente, a solução e os microtubos foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 150) a 120°C e alta pressão por 20 minutos. Uma alça de platina foi utilizada para transferir o micélio dos meios semissólidos para os tubos criogênicos, os quais foram devidamente fechados, etiquetados e vedados com filme PVC. As caixas contendo os microtubos com micélios preservados em glicerol 20% foram armazenadas em freezer a -20°C. Deve-se ressaltar que as actinobactérias foram preservadas em triplicata. Todo o manuseio de micro-organismos foi

realizado dentro de capela de fluxo laminar (Esco SC2 Class II Biological Safety Cabinets) e a alça de platina esterilizada em esterilizador infravermelho (Biothec).

3.4 Preparo dos meios de cultivo, fermentação e extração

Os extratos brutos gerados neste trabalho foram obtidos da fermentação das actinobactérias em meio líquido BD (Batata-Dextrose). Para a preparação de 1000 mL desse meio, utilizou-se 800 mL de água destilada, 200 mL de caldo de batata e 20 g de dextrose. Para a preparação do caldo de batata usado no meio BD, foram utilizadas 400 g de batata sem casca picadas em cubos pequenos. As batatas foram cozidas em 1 litro de água por aproximadamente 15 minutos, sendo o volume de água evaporado durante o cozimento completado no final.

As fermentações para o "*screening*" inicial dos micro-organismos foram realizadas adicionando 30 mL do meio de cultivo BD em Erlenmeyers de 125 mL. Desse modo, a proporção máxima de 1/3 (um terço) de meio de cultura em relação ao volume total do Erlenmeyer foi sempre obedecida. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 150) a 120°C e alta pressão por aproximadamente 20 minutos antes de serem inoculados os micro-organismos. As fermentações foram mantidas por um período de 10 dias em shaker Marconi (Incubadora refrigerada MA 830) com agitação de 150 rpm à temperatura de 30°C.

Após a fermentação, o meio líquido foi filtrado a vácuo para remoção dos micélios e extraído com igual volume de acetato de etila por 3 vezes. Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida (BÜCHI Rotavapor R-114, equipado com banho BÜCHI Waterbath B-480). Deve-se ressaltar que uma vez verificada a atividade biológica de interesse, os micro-organismos selecionados foram fermentados novamente em escala ampliada, utilizando frascos Erlenmeyer de 500 ou 1000 mL de capacidade ou fermentador New Brunswick (Bioflo/Celligen 115).

3.5 Bioensaios de fitotoxicidade com Lemna minor

No laboratório, as plantas aquáticas para utilização nos bioensaios foram mantidas em meio rico em sais denominado SIS⁸¹ (Swedish Standard), cuja composição está apresentada na Tabela a seguir. O meio SIS foi preparado pela adição de 20 mL de cada uma das soluções

estoque nº 1, 2, 3, 4 e 6 e 2 ml da solução estoque nº 5, sendo o volume de 1 litro completado com água destilada. O meio foi mantido sob agitação para a completa mistura das soluções e, em seguida, mantido sob-refrigeração a 10 °C. As soluções estoque possuem validade de 6 meses, com exceção da solução nº 5 que apresenta validade de apenas 1 mês. As pétalas eram lavadas a cada 15 dias com intuito de garantir as boas condições nutricionais para crescimento e manutenção das plantas. Para isso, as pétalas visualmente sadias eram cuidadosamente transferidas, com o auxílio de espátulas, para placas de Petri (20 cm) contendo água destilada, onde permaneceram em repouso por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, eram transferidas para outra placa de Petri (20 cm) contendo meio de cultura recentemente preparado.

	Soluções estoque	Massa de reagente (mg)
1)	NaNO ₃	4250 mg
	KH_2PO_4	670 mg
2)	MgSO ₄ .7 H ₂ 0	3750 mg
3)	CaCl _{2.} 2 H ₂ O	1800 mg
4)	Na ₂ CO ₃	1000 mg
5)	H ₃ BO ₃	500 mg
	MnCl ₂ .2 H ₂ O	100 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	5 mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	25 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg
	CoCl ₂	5 mg
6)	FeCl ₃ .6 H ₂ O	42,5 mg
	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	70 mg

Tabela 3. Composição nutricional do meio SIS.

Os bioensaios com *Lemna minor* foram realizados em placas de polipropileno com 12 poços (3x4), de modo que cada extrato ou controle foi bioensaiado em triplicata, em um volume final estabelecido de 3 mL por poço. Foram empregados como controles negativos de inibição o meio SIS (3000 μ L de meio SIS) e o meio SIS + DMSO 1% (2970 μ L de meio SIS + 30 μ L de DMSO), já que este é o solvente utilizado para solubilização dos extratos. Para o controle positivo foi preparada inicialmente uma solução estoque do herbicida atrazina, um inibidor de fotossíntese, na concentração de 10 mg mL⁻¹ em DMSO. Assim, em cada poço da triplicata referente a esse controle foi adicionado 30 μ L da solução estoque preparada + 2970 μ L de meio

SIS, de forma que a concentração final do herbicida foi de $100 \ \mu g \ mL^{-1}$. Foram preparadas também 100 μ L das soluções dos extratos ou frações na concentração de $10 \ mg \ mL^{-1} \ em$ DMSO, as quais foram posteriormente bioensaiadas mediante procedimento análogo ao controle positivo utilizado.

Por último, em cada poço foi adicionado um par de pétalas da *Lemna minor*, procurando manter sempre a uniformidade no tamanho e na coloração. Após um período de sete dias incubadas em estufa de fotoperíodo a temperatura controlada em $28 \pm 2^{\circ}$ C e ciclos de iluminação claro/escuro 16/8h de 80 µmol m² s⁻¹, provenientes de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, foi realizada uma análise visual comparando os resultados dos extratos testados com os controles positivo e negativo, observando a ocorrência de necrose (tecidos mortos), clorose (ausência de clorofila), quebra de colônia, destruição da raiz e a capacidade da fitotoxina em inibir a multiplicação das pétalas ou matá-las.

3.6 Bioensaios de fitotoxicidade com Chlorella vulgaris

A microalga *C. vulgaris* utilizada neste experimento foi cultivada em meio BBM (Bold's Basal Medium), segundo composição de Cañizares-Villanueva e colaboradores⁸². A composição do meio BBM se encontra na Tabela 4. A cada 10 dias, a cultura de algas foi repicada de forma asséptica, através da diluição de 1 mL de cultura em 30 mL de meio BBM recém preparado, em frascos Erlenmeyers de 125mL, sendo posteriormente incubadas em estufa, sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas acima.

Os bioensaios com as microalgas foram realizados em placas de ELISA de 24 poços (6x4), de forma que cada extrato ou controle foi bioensaiado em triplicata, em um volume final estabelecido de 1 mL por poço. Foram empregados como controles negativos de inibição o meio BBM (900 μ L de meio BBM + 100 μ L da suspensão de *C. vulgaris*) e o meio BBM + DMSO 1% (890 μ L de meio BBM + 100 μ L da suspensão de *C. vulgaris* por poço + 10 μ L DMSO), já que este é o solvente utilizado para solubilização dos extratos. Para o controle positivo foi preparada inicialmente uma solução estoque do herbicida atrazina na concentração de 1 mg mL⁻¹ em DMSO. Assim, em cada poço da triplicata referente a esse controle foi adicionado 10 μ L da solução estoque preparada, 100 μ L da suspensão de *C. vulgaris* e 890 μ L do meio de cultivo BBM, de forma que a concentração final do herbicida foi de 10 μ g mL⁻¹. Foram preparadas também 100 μ L das soluções restantes utilizadas no bioensaio da *L. minor*, sendo

posteriormente bioensaiadas mediante procedimento análogo ao controle positivo utilizado. Por fim, as placas foram incubadas por cinco dias em estufa e a confirmação de inibição de crescimento foi feita visualmente comparando aos controles.

Nutrientes	Quantidades (mg L ⁻¹)		
NaNO ₃	250,00		
KH2PO4	175,00		
CaCl ₂ . 2H ₂ O	25,00		
MgSO ₄ . 7H ₂ O	75,00		
K ₂ HPO ₄	75,00		
NaCl	25,00		
EDTA	50,00		
FeSO4. 7H2O	4,98		
H ₃ BO ₃	11,42		
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82		
Na2MoO4. 2H2O	0,72		
CoCl. 6H2O	0,38		
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,44		
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57		

Tabela 4. Composição do meio de cultivo BBM para manutenção da Chlorella vulgaris.

3.7 Fracionamento dos extratos brutos ativos

Os extratos brutos ativos no "*screening*" inicial foram fermentados em escala ampliada para obtenção de maior massa a fim de realizar o fracionamento e isolar os compostos ativos. As separações por HPLC foram feitas utilizando um cromatógrafo Shimadzu com controladora CBM-20A, duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector UV-Vis SPD-20A, injetor manual Rheodyne e coletor automático de frações. Foi utilizada a coluna preparativa C₁₈ Shim-Pack Shimadzu (250 x1 9 mm, 5 μ m) e a coluna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB C₁₈ Agilent (250 x 9,4 mm, 5 μ m). Para cada extrato fracionado foi previamente desenvolvido um método de separação com coluna analítica C₁₈ Shim-Pack Shimadzu (250 x 4,6 mm, 5 μ m), que foi em seguida transposto para a coluna de maior diâmetro⁸³. O fracionamento em coluna aberta foi feito utilizando a resina Sephadex LH20 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e o metanol como eluente, para a simplificação dos extratos.

3.8 Análises por espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas de duas maneiras, uma acoplada a separação cromatográfica (LC-MS, do inglês *liquid chromatography – mass spectrometry*) e a outra por meio da inserção direta da amostra no equipamento (DI-MS, do inglês *direct insertion – mass spectrometry*). Assim, os extratos brutos na concentração de 50 µg/mL foram solubilizados em metanol e injetados em um sistema de LC-MS Acquity UPLC[®] Xevo TQ-S equipado com bomba quaternária, auto injetor e fonte de ionização por *eletrospray* operada em modo positivo e negativo. Os espectros foram analisados através do software Masslynx versão 4.1.

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 V, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de desolvatação de 350°C e faixa de m/z de 150-1400. Nos experimentos de espectrometria de massas sequencial a melhor energia de colisão foi determinada para cada experimento. Na DI-MS, a fase móvel empregada foi uma mistura de metanol:água (7:3) acidificada com 0,1% de ácido fórmico.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido utilizando um equipamento micrOTOF-Q II - ESI-TOF, Bruker Daltonics. A calibração interna foi feita com uma solução 10 mg mL⁻¹ de Na-TFA. Os parâmetros do equipamento foram: end plate 500 V; capilar - 3500 V; saída do capilar 120 V; skimmer 1 50V; skimmer 2 22 V; transfer 57 μ s; temperatura do gás secante 180 °C a 4,0 L min-1 (N₂); e gás de nebulização N₂ a 0,4 Bar.

3.9 Análises por Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, COSY, ROESY, HMQC e HMBC foram adquiridos em equipamentos Bruker DPX 300 e DRX 500 nas frequências de 500 MHz (¹H) e 125 MHz (¹³C), utilizando o tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os solventes deuterados utilizados para solubilizar as amostras foram metanol e acetona.

3.10 Estudo da influência das terras raras na produção da actinomicina D

Para a realização do experimento, a actinobactéria Caat 7-38 foi inicialmente fermentada durante três dias em 100 mL de meio BD, sendo esta cultura utilizada como pré-

inóculo. As culturas para análise, por sua vez, foram cultivadas em alíquotas de 20 mL de meio BD, presentes em Erlenmeyers de 50 mL. Para a inoculação da actinobactéria, foi adicionado 1 mL do pré-inóculo em cada frasco. Com base nos melhores resultados apresentados na literatura, decidiu-se avaliar o efeito do escândio, neodímio e lantânio, sendo então fermentadas sessenta culturas, distribuídas de acordo com a Tabela abaixo. A concentração final das terras raras empregadas foi de 100 mM. O ensaio foi monitorado a cada dois dias, de modo que era retirado, filtrado e congelado um Erlenmeyer de cada grupo, para posterior análise.

Os cultivos foram descongelados e extraídos. Para isso, foi retirado uma alíquota de 500 μ L de cada meio de cultura, a qual foi transferida para um microtubo, juntamente com 1 mL de acetato de etila. Os microtubos foram agitados por 15 segundos e centrifugados por 1 minuto. Após a centrifugação, a fase orgânica foi transferida para outro microtubo, seca, ressuspendida em metanol e injetada no espectrômetro de massas. É importante ressaltar que foi necessário diluir as amostras em duas vezes, uma vez que os valores obtidos estavam fora dos utilizados para construir a curva de calibração. O experimento foi monitorado por espectrometria de massas operando no modo MRM.

	Quantidade	[] final - Terras
Grupos	Erlenmeyers	Raras (mM)
1-Controle	15	0
2-Lantânio (La)	15	100
3-Escâncio (Sc)	15	100
4-Neodímio (Nd)	15	100

Tabela 5. Distribuição das culturas fermentadas para a realização do experimento de monitoramento da produção da actinomicina D por MRM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussões

4.1 Micro-organismos avaliados nesta dissertação

As actinobactérias estudadas nesta dissertação foram isoladas e gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Dr. Itamar Soares de Melo do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa-Jaguariúna em trabalho de colaboração. Tais micro-organismos foram obtidos, em sua maioria, da rizosfera de cactáceas do bioma caatinga. A rizosfera é a região do solo onde as raízes das plantas crescem e conseguem água, sais minerais e nutrientes e também estabelecem relações com as raízes de outros vegetais e micro-organismos⁸⁴. O seu estudo é de extrema importância, pois é uma região do solo caracterizada por possuir uma intensa atividade microbiana, graças à secreção de compostos denominados de exsudatos pelas raízes, como íons, enzimas, e diversos outros metabólitos⁸⁵.

A Caatinga, por sua vez, é um bioma singular que se concentra na região semiárida do nordeste brasileiro. As altas temperaturas associadas à alta intensidade luminosa provocam uma grande demanda evaporativa e, consequentemente, a dessecação do solo, o que justifica o déficit hídrico dessa região⁸⁶. Devido à sua extensão e ao sistema de ventos provenientes do Nordeste e Sudeste, apresenta uma instabilidade nos padrões de chuva, a qual é concentrada em alguns poucos meses do ano. Por esses motivos, a Caatinga é constituída de uma floresta sazonalmente seca composta de arbustos espinhosos, gramíneas e por pequenas árvores, que perdem a folhagem em época de seca, voltando a brotar e ficar verde nos curtos períodos de chuvas (Figura 8).

Assim como as plantas, os micro-organismos deste bioma se encontram bem adaptados às condições impostas pelo clima, desenvolvendo uma série de características e mecanismos de proteção celular, sobretudo contra o estresse hídrico, que os tornam únicos. Sendo assim, pode-se dizer que tais condições ambientais extremas fazem a investigação da biodiversidade microbiana do solo deste bioma ser altamente promissora e por ser pouco explorada, constitui uma grande oportunidade para a descoberta de actinobactérias produtoras de metabólitos secundários de importância biotecnológica.



Figura 8. Transição entre o período chuvoso (A) e seco (B) na Caatinga, um dos fenômenos mais interessantes desse bioma. Fonte: Kavamura, V. N. *Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought.* Microbiological Research. 2012;168(4):183-191.

4.2 Preservação das actinobactérias estudadas

As atividades de rotina e pesquisa aplicadas às linhagens resultam em uma quantidade significativa de informações. Saber como preservar culturas bacterianas e dispor de técnicas simples e eficientes para tanto se reveste da mais conspícua importância em qualquer laboratório onde se desenvolvem atividades de pesquisa. A importância de se preservarem culturas bacterianas advém da necessidade de se dispor do organismo ou espécime a qualquer momento, quer para fins experimentais, quer para trabalhos de rotina ou para atendimento a solicitações de outros pesquisadores, para fins didáticos, para estudos comparativos, etc⁸⁷.

Desse modo, a primeira etapa deste trabalho consistiu na preservação de cento e oito actinobactérias em tubos criogênicos contendo solução de glicerol 20%, os quais foram congelados e mantidos em freezer de -20°C. O objetivo de qualquer método de preservação é garantir a sobrevivência das culturas pelo maior tempo possível, bem como proporcionar estabilidade aos micro-organismos, evitando assim, a formação excessiva de mutações que alterem suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas⁸⁸. Deve-se ter em mente que quando se inicia a preparação de uma nova linhagem celular que será estocada, a cultura deve ser minuciosamente examinada para verificação da correta identidade do micro-organismo, como também da existência de algum tipo de contaminação, de modo que esta análise deve ser repetida após o descongelamento e cada vez que um novo lote de cultura for preparado⁸⁹.

Diferentes processos têm sido utilizados para preservação de micro-organismos, de forma que a escolha do método depende das disponibilidades do laboratório, longevidade da preservação e estabilidade genética das culturas. Dentre os processos comumente utilizados, destacam-se: repiques periódicos em meios sólidos, preservação em óleo mineral e água destilada e congelamento em glicerol. O método de preservação em glicerol, hoje universalmente usado em quase todos os laboratórios de Microbiologia e Bacteriologia do mundo, foi escolhido por reunir quase todas as características desejáveis de um bom método de preservação, já que é simples, barato e pouco oneroso, além de oferecer uma boa segurança para o armazenamento dos micro-organismos por períodos de um a dois anos⁹⁰. O glicerol, por ser bioquimicamente compatível com as estruturas celulares, é utilizado para proteger as células durante o congelamento, diminuindo assim, os danos provocados pela formação dos cristais de gelo e a chance de ruptura da parede celular. Deve-se destacar que o metabolismo celular dos micro-organismos cessa quando a água de todo sistema é convertida em gelo, recuperando suas funções normais quando a cultura for devidamente descongelada.

4.3 Geração dos extratos brutos

Depois de concluída a etapa de preservação, noventa actinobactérias, isoladas principalmente da caatinga, foram selecionadas para fermentação, com intuito de gerar os extratos que futuramente iriam ser utilizados nesse estudo. Em programas de "*screening*" em larga escala, como o desenvolvido nesse trabalho, é aconselhável a utilização de um único meio de cultivo que seja abrangente a um número razoável de metabólitos⁹¹, bem como a utilização de somente um solvente para a realização das extrações líquido-líquido. Mediante trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa ^{92,93,94}, as fermentações utilizando o meio BD, o qual é composto essencialmente por caldo de batata e dextrose, tem demonstrado ser de grande eficiência na indução da produção de metabólitos ativos de actinobactérias e por este motivo, foi o escolhido para as fermentações e produções dos extratos.

Conforme previamente discutido, sabe-se que os metabólitos secundários dos microorganismos possuem as mais diversas estruturas e propriedades físico-químicas. Desse modo, a extração líquido-líquido com acetato de etila foi utilizada por este ser um solvente orgânico capaz de solubilizar compostos de polaridades intermediárias de maneira muito eficiente, além de ser o solvente que, na maioria dos casos, apresentou os melhores resultados em estudos prévios realizados em nossos laboratórios. Porem, é importante destacar que em um programa de *"screening"* em larga escala é inevitável o risco de perdas de alguns compostos com atividades biológicas interessantes, quer seja pela sua pequena abundância no extrato bruto ou pela não eficiência do método de extração escolhido. Com relação a este último fato, pode-se citar como exemplo os compostos com propriedades ácido-base que, dependendo do pH final do meio, por estarem ionizados em fase aquosa, acabam não sendo extraídos pela fase orgânica e consequentemente, passam despercebidos no "screening" biológico. Sendo assim, em alguns casos específicos, foi realizado um estudo sobre a influência da variação do pH nas extrações.

4.4 Bioensaios de fitotoxicidade com Lemna minor e Chlorella vulgaris

Nessa etapa do trabalho, foi realizado um "*screening*" biológico da atividade fitotóxica de todos os extratos orgânicos de actinobactérias anteriormente obtidos, empregando os bioensaios com *L. minor* e *C. vulgaris*. Estes bioensaios foram selecionados por serem miniaturizados, rápidos, sensíveis a pequenas quantidades de amostra e de baixo custo. Conforme descrito na parte experimental, é necessário apenas 1 mg de extrato bruto para a realização de ambos bioensaios. Tal fato é de extrema importância quando se trabalha com micro-organismos, já que, na maioria dos casos, a quantidade de extrato obtido após a fermentação em escala reduzida é pequena, o que permite, portanto, a eficiência da estratégia de "*screening*" biológico utilizada.

Após a realização dos ensaios de fitotoxidade, quinze extratos apresentaram atividade para o bioensaio da *L. minor*, sendo eles provenientes da Caat 1-50, Caat 1-54, Caat 2-21, Caat 2-48, Caat 2-57, Caat 2-58, Caat 2-59, Caat 2-62, Caat 2-64, Caat 5-29, Caat 7-38, Caat 7-48, Caat 7-51, Caat 7-52 e Caat 10-15 +(F). Como exemplo, a Figura abaixo apresenta os resultados obtidos para três diferentes extratos bioensaidos. As três primeiras colunas da placa à esquerda são os controles, os quais já foram mencionados na parte experimental (Seção 3.5). Por meio da comparação visual, tendo principalmente as pétalas em meio contendo atrazina (controle positivo) e DMSO (controle negativo) como referência, percebe-se claramente que o extrato da Caat 10-24 não apresentou nenhuma atividade fitotóxica, uma vez que o crescimento da *L. minor* pôde ser comparado ao controle negativo DMSO (coluna 2). Já o extrato da Caat 10-15 +(F) exibiu atividade fitotóxica moderada por apresentar um leve amarelamento, redução de crescimento e menor número de pétalas que o controle, ao passo que, o extrato da Caat 7-52 apresentou uma excelente atividade, já que causou uma diminuição do crescimento da planta, amarelamento, diminuição no número de pétalas e necrose. Desse modo, pode-se concluir que os extratos testados apresentaram fitotoxidades distintas, o que demonstra o potencial do bioensaio para a descoberta de fitotoxinas.



Figura 9. Resultado do bioensaio da *L. minor*, em que foram testados os extratos brutos da Caat 10-24, Caat 10-15 +(F) e Caat 7-52, respectivamente.

Por sua vez, dentre os noventa extratos brutos analisados, seis extratos apresentaram resultados promissores quanto à inibição do crescimento da *C. vulgaris*, sendo eles produzidos pela Caat 7-38, Caat 7-52, Caat 8-6, Caat 8-12, Caat 8-18 e Caat 10-15 +(F). A Figura abaixo apresenta um exemplo do resultado desse bioensaio, no qual foram testados cinco extratos brutos diferentes. Após análise da placa, fica evidente que apenas o extrato proveniente da Caat 8-18 apresentou atividade, sendo sua fitotoxidade bastante pronunciada e comparada com o controle positivo utilizado, no caso, a atrazina. No bioensaio em questão, a detecção da atividade fitotóxica é um pouco mais difícil de ser visualizada nos casos em que a fitotoxidade é moderada. Nesses casos, para a visualização da atividade, deve-se observar cuidadosamente a parte inferior da placa do bioensaio contraluz, observando se houve ou não crescimento da microalga nas paredes inferiores de cada poço.



Figura 10. Resultado do bioensaio da *C. vulgaris*, em que foram testados os extratos brutos da Caat 2-43, Caat 4-55, Caat 8-18, Caat 5-29 e Caat 7-48, respectivamente.

Os resultados obtidos no "screening" inicial para ambos os bioensaios foram resumidos na Tabela abaixo, de forma que, das noventa actinobactérias estudadas, aproximadamente 20% delas foram consideradas ativas para pelo menos um dos bioensaios testados. Todas as actinobactérias ativas foram isoladas do solo da caatinga, resultado este que indica o grande potencial dos micro-organismos isolados de tal habitat na produção de metabólitos secundários com atividade fitotóxica. Na construção dessa Tabela 6, não foi levado em consideração o grau de fitotoxidade dos extratos bioensaidos, de modo que foi indicado apenas se houve ou não atividade. Conforme mencionado anteriormente, a atividade foi basicamente atribuída por meio de comparações visuais entre os controles negativo e positivo de ambos os bioensaios, podendo apresentar então, algumas variações de acordo com os critérios utilizados por cada observador. Além disso, é importante ressaltar que o conceito de maior ou menor fitotoxidade é relativo, uma vez que a concentração das fitotoxinas em cada extrato é variável, fato este que impede uma correlação inequívoca com a atividade.

Extratos Actinobactérias	Atividade L. Minor	Atividade C. Vulgaris	Extratos Actinobactérias	Atividade L. Minor	Atividade C. Vulgaris
CAAT 1-32	-	-	CAAT 7-38	+	+
CAAT 1-34	-	-	CAAT 7-43	-	-
CAAT 1-35	-	-	CAAT 7-46	-	-
CAAT 1-37	-	-	CAAT 7-48	+	-
CAAT 1-45	-	-	CAAT 7-49	_	-

Tabela 6. Atividade fitotóxica dos extratos brutos de actinobactérias frente à L. minor e C. vulgaris.

CAAT 1-46	-	-	CAAT 7-51	+	-
CAAT 1-47	-	-	CAAT 7-52	+	+
CAAT 1-50	+	-	CAAT 7-60	-	-
CAAT 1-53	-	-	CAAT 8-2	-	-
CAAT 1-54	+	-	CAAT 8-3	-	-
CAAT 1-55	-	-	CAAT 8-4	-	-
CAAT 2-21	+	-	CAAT 8-5	-	-
CAAT 2-35	-	-	CAAT 8-6	-	+
CAAT 2-37	-	-	CAAT 8-12	-	+
CAAT 2-38	-	-	CAAT 8-16+	-	-
CAAT 2-40	-	-	CAAT 8-18	-	+
CAAT 2-41	-	-	CAAT 8-22	-	-
CAAT 2-43	-	-	CAAT 8-25	-	-
CAAT 2-48	+	-	CAAT 9-4	-	-
CAAT 2-54	-	-	CAAT 10-14+(F)	-	-
CAAT 2-56	-	-	CAAT 10-15+(F)	+	+
CAAT 2-57	+	-	CAAT 10-24	-	-
CAAT 2-58	+	-	SB005	-	-
CAAT 2-59	+	-	SB024	-	-
CAAT 2-61	-	-	SB034	-	-
CAAT 2-62	+	-	SB035	-	-
CAAT 2-64	+	-	SB037	-	-
CAAT 2-66	-	-	SB063	-	-
CAAT 2-67	-	-	SB099	-	-
CAAT 2-74	-	-	SB102	-	-
CAAT 3-40	-	-	SB103	-	-
CAAT 3-48+	-	-	SB104	-	-
CAAT 3-49	-	-	CS039	-	-
CAAT 3-55	-	-	CS044	-	-
CAAT 3-85	-	-	CS045	-	-
CAAT 4-46	-	-	CS060	-	-
CAAT 4-55	-	-	CS066	-	-
CAAT 5-29	+	-	CS072	-	-
CAAT 5-38	-	-	CS075	-	-
CAAT 5-40	-	-	CS083	-	-
CAAT 5-50	-	-	CS099	-	-
CAAT 6-4	-	-	IR004	-	-
CAAT 6-8	-	-	IR036	-	-
CAAT 6-7	-	-	CANV1-32F	-	-
CAAT 6-11	-	-	CANV3-08F	-	-
+ = ativo.					

- = inativo.

Outra forma de expressar os resultados obtidos no "screening" inicial é ilustrada na Figura 11. Nesse gráfico de conjuntos, percebe-se claramente que apenas três extratos apresentaram atividade simultânea para os bioensaios da *L. minor* e *C. vulgaris*, sendo eles provenientes da Caat 7-38, Caat 7-52 e Caat 10-15+(F). Também é possível observar que o número de extratos ativos para o bioensaio da Lemna foi consideravelmente maior, apresentando uma frequência de atividade 40% superior quando comparado com o bioensaio da microalga. Conforme consta na literatura, a *C. vulgaris* é mais susceptível a herbicidas inibidores de fotossíntese, sendo por esse motivo, utilizada como organismo teste para triagem de composto fitotóxicos com este mecanismo de ação. Aliás, também é relatada na literatura a habilidade da microalga em adaptar-se e resistir ao efeito inibitório após o contato com determinados herbicidas⁹⁵.



Figura 11. Diagrama de Venn, contendo os resultados obtidos nos bioensaios realizados. Em destaque, estão as actinobactérias selecionadas para posteriores estudos de desreplicação.

4.5 Perfis químicos dos extratos brutos

Após o "*screening*" biológico inicial, todos os extratos brutos (ativos e inativos) foram analisados por espectrometria de massas por inserção direta, através de análises de *full scan*, no qual foi utilizada a fonte de ionização de electrospray (ESI) para a determinação do perfil químico dos extratos. As aquisições foram realizadas no modo positivo e negativo. O objetivo desta etapa foi determinar através de uma ferramenta rápida e abrangente as massas moleculares dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias, com intuito de submetê-los a um estudo de desreplicação e também realizar uma comparação entre os perfis e a diversidade metabólica desses extratos.

ESI é considerada uma técnica branda de ionização, possuindo como principal característica a produção da molécula protonada $[M+H]^+$ ou desprotonada $[M-H]^-$ sem que ocorra a fragmentação da mesma. Tal fato possibilita a identificação dos compostos baseada em suas respectivas massas moleculares, uma vez que a detecção é dada a partir da razão massa/carga (*m/z*). O fator que determina a eficiência da ionização é, principalmente, a estrutura química dos analitos. Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas em modo positivo, dadas à relativa facilidade de protonação desses grupos funcionais. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotanadas e, consequentemente, são analisadas em modo negativo. A natureza do solvente utilizado e o pH da fase móvel são igualmente importantes na geração de íons positivos e negativos⁹⁶.

De acordo com os sinais de massas observados nos espectros, foi possível observar a quimiodiversidade dos compostos produzidos pelas diferentes actinobactérias estudadas, visto que diversos íons foram detectados em cada espectro. Os espectros de ESI+ e ESI- foram analisados cuidadosamente para que, de acordo com as diferenças de m/z entre os sinais detectados, pudessem ser determinadas as espécies iônicas encontradas, isto é, se eles correspondiam a moléculas protonadas, desprotonadas ou até mesmo coordenadas com cátions como Na⁺, K⁺ e NH₄⁺. De modo geral, cada actinobactéria foi responsável pela produção de metabólitos distintos e os espectros de massas obtidos mostraram-se característicos para cada extrato bruto analisado. Tal diversidade metabólica pode ser verificada através da análise da Figura abaixo, o qual apresenta os espectros de massas em

modo positivo de alguns extratos que apresentaram atividade fitotóxica para pelo menos um dos bioensaios realizados.



Figura 12. Espectros de DI-MS em modo positivo de alguns extratos, demonstrando a diversidade química dos extratos brutos produzidos.

Através das análises por DI-MS, foi observado também que determinados extratos possuíam o mesmo perfil metabólico, como nos casos dos extratos obtidos da Caat 8-6 e 8-18. As actinobactérias Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F também apresentaram os mesmos sinais em seus espectros de massas. Tais informações foram extremamente relevantes, visto que elas impediram que actinobactérias com extratos similares fossem fermentadas em grande quantidade com o mesmo intuito. Com base nisso e devido aos seus perfis metabólicos característicos, bem como aos resultados promissores frente aos bioensaios realizados, as actinobactérias Caat 7-38, Caat 8-6 e Caat 5-29 foram selecionadas para estudos posteriores de fermentação em escala ampliada, desreplicação, isolamento e caracterização estrutural das substâncias com atividades fitotóxicas. Também foi realizado um estudo de desreplicação do extrato da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F, no qual foi evidenciado o papel fundamental da espectrometria de massas na identificação rápida de compostos já conhecidos.

4.6 Desreplicação do extrato bruto da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F

Através da imediata análise do espectro obtido em modo positivo e negativo da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F, actinobactérias estas que apresentaram atividade para pelo menos um dos bioensaios realizados, foi possível notar um conjunto de sinais característicos na faixa de massas de m/z 1008 a 1060. Mediante pesquisa na biblioteca de produtos naturais, bem como por conhecimentos prévios do nosso grupo de pesquisa, foi possível atribuir tais sinais a presença de surfactinas. O espectro de massas obtido em modo positivo dos extratos dessas actinobactérias consta na Figura abaixo.



Figura 13. Espectro de DI-MS obtido em modo positivo do extrato da actinobactéria Caat 10-15+(F). Deve-se ressaltar que os íons de *m/z* 203, 304, 326, 338, 360, 419 e 647 representam contaminações.



Figura 14. Estrutura da principal isoforma da surfactina. Fonte: Barros, F. F. C., et. al. *Surfactina: propriedades química, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos.* Quim. Nova. 2007;30(2):409-414.

A surfactina é produzida por diferentes micro-organismos e sua estrutura geral é a de um lipopeptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de treze a quinze átomos de carbono, o que permite assim, a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros^{97,98,99}. A estrutura típica da surfactina, demonstrada na Figura 14, consiste de um heptapeptídeo de sequência Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu ligado por meio de uma ligação lactônica entre o grupo –COO da Leu⁷ e o grupo β -hidróxi do ácido graxo, ao passo que o grupo –COO do ácido graxo está ligado ao grupo α -NH₂ da Glu¹ por meio de uma ligação peptídica. A surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido às variações no tamanho da cadeia, à ligação do seu componente ácido graxo e às substituições dos aminoácidos componentes do anel¹⁵.

O espectro de ESI em modo positivo do extrato da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F apresentaram os íons de m/z 1008, 1022 e 1036, os quais foram atribuídos aos homólogos da surfactina protonados [M+H]⁺, apresentando entre eles uma diferença em massa de 14 Da. É possível também verificar a presença dos íons de m/z 1030, 1044 e 1058 que correspondem aos adutos de sódio dos homólogos anteriormente citados [M+Na]⁺. Os adutos iônicos de metais alcalinos têm sido uma característica comum nos espectros de massas das surfactinas, sendo os adutos de sódio e de potássio mais frequentemente observados, uma vez que estes íons metálicos são ubíquos na natureza. O íon do metal alcalino se liga na surfactina por meio do grupamento ácido carboxílico, e conforme pode-se verificar na Figura 13, possui, na maioria dos casos, uma intensidade menor do que comparado aos análogos protonados¹⁰⁰.

Posteriormente, os íons de m/z 1008, 1022 e 1036 foram selecionados e caracterizados por meio da aplicação da espectrometria de massas sequencial, no qual foi utilizado o processo de dissociação induzida por colisão (CID). Neste processo, os lipopeptídeos ionizados foram acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (argônio), proporcionando, assim, a colisão com essas moléculas. Como resultado, a energia translacional transferida foi convertida em energia interna, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íons-fragmentos, que são classificados como íons que retêm a carga residual no lado Nterminal (gerando fragmentos -*a*, -*b* e -*c*, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retém a carga residual na região C-terminal (gerando os fragmentos -*x*, -*y* e -*z*, dependendo da ligação que é fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por RoepstorffFohlmann–Biemann. Nessa nomenclatura, os pares de íons -a/-x, -b/-y e -c/-z serão sempre correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas de menor energia, espera-se que a formação do par de fragmentos -b/-y seja mais freqüente que os demais, o que facilita muito a interpretação dos resultados¹⁰¹. Os espectros de CID dos três íons selecionados, bem como a Tabela que resume os fragmentos obtidos estão logo abaixo.

	Homólogos (m/z)			
Fragmentações	1008 (C13)	1022 (C14)	1036 (C15)	
(M+H-H ₂ O) ⁺	990	1004	1018	
(M+H-CO) ⁺	980	994	1008	
<i>y</i> 1	114	114	114	
<i>y</i> 2	227	227	227	
<i>y</i> 3	342	342	342	
<i>y</i> 4	441	441	441	
y 5	554	554	554	
<i>y</i> 6	667	667	667	
b ₁ (-H ₂ O)	342 (324)	356 (338)	370 (352)	
b ₂ (-H ₂ O)	455 (437)	469 (451)	483 (465)	
b ₃ (-H ₂ O)	568 (550)	582 (564)	596 (578)	
<i>b</i> ₄ (-H ₂ O)	667 (649)	681 (663)	695 (677)	
<i>b</i> ₅ (-H ₂ O)	782 (764)	796 (778)	810 (792)	
$b_6(-H_2O)$	895 (877)	909 (891)	923 (905)	

 Tabela 7. Fragmentos obtidos dos espectros de ESI-MS/MS dos homólogos da surfactina.



Figura 15. Espectro de ESI-MS/MS em modo positivo dos sinais de *m/z* [M+H]+ a) 1008, b) 1022, c) 1036, ressaltando as sequências peptídicas e os fragmentos obtidos.

Conforme pode-se observar, o padrão de fragmentação dos íons selecionados é similar e dominado pelo íon comum de m/z 685. Tal íon, o qual é atribuído ao fragmento interno protonado da cadeia peptídica [(H)Leu²-Leu³-Val⁴-Asp⁵-Leu⁶-Leu⁷(OH)+H]⁺, é onipresente nos espectros de CID de todos os homólogos protonados das surfactinas, sendo, portanto, o íon diagnóstico para a identificação dessa classe de compostos. Além disso, a presença deste íon também indica a abertura preferencial do anel peptídico na porção éster, conforme esquema contido na Figura abaixo. Em todos os espectros de CID, nota-se a presença de fragmentos atribuídos a perda de H₂O (M+H-H₂O)⁺ e CO (M+H-CO)⁺ da molécula protonada, além do íon de m/z 86 correspondente ao íon imônio da Leu. É possível também observar a presença de fragmentos correspondentes à perda de H₂O pelos íons *b*, fato este condizente com resultados contidos na literatura. A presença do grupo OH nesses íons sugere a ocorrência de um mecanismo de fragmentação diferente do que foi apresentado. Nesses casos, após a protonação das moléculas na porção éster, ocorre uma simples clivagem heterolítica guiada pela carga, resultando então, na formação do íon formalmente análogo ao b^7 do heptapeptídeo¹⁰⁰.



Figura 16. Mecanismo proposto para a abertura preferencial do anel da surfactina na porção éster em condições de CID-MS/MS.

Por meio da análise da Tabela 7 que contém os principais fragmentos obtidos nos espectros de CID, fica evidente que os íons *b* correspondentes aos diferentes homólogos exibem uma diferença em massa de 14 Da, enquanto os íons *y* gerados pela fragmentação dos homólogos da surfactina protonados apresentam massas similares. Tal fato sugere que estes metabólitos apresentam a mesma composição e sequência de aminoácidos na porção peptídica e diferem unicamente no comprimento da cadeia do ácido graxo. Desse modo, os íons precursores protonados de m/z 1008, 1022 e 1036 podem ser atribuídos aos homólogos da surfactina com 13, 14 e 15 átomos de carbonos na cadeia do ácido graxo β -OH, respectivamente. Mediante as perdas de massas características dos aminoácidos contidos nos íons *y*, pode-se ainda comprovar a sequência peptídica das surfactinas presentes neste extrato (ácido graxo β -OH-Glu¹-Leu²-Leu³-Val⁴-Asp⁵-Leu⁶-Leu⁷).

A identificação rápida de compostos pertencentes a esta classe em extratos microbianos com auxílio da espectrometria de massas é extremamente importante, já que além da sua excepcional ação surfactante, baixa toxidade e demasiada estabilidade a elevada temperatura e pH¹⁰², a surfactina apresenta diversas outras atividades biológicas altamente atraentes. Experimentos realizados in vitro mostraram que a surfactina inativou eficazmente uma larga gama de vírus¹⁰³, inibindo também a formação de biofilmes de várias bactérias, até mesmo da patógena Salmonella enterica¹⁰⁴. Aliás, o efeito letal da surfactina foi demonstrado contra as fases de larva e pupa de Anopheles stephensi, Culex quinquefasciatus e Aedes *aegypti*, o que sugere que ela seja uma ferramenta promissora para aplicação em programas de controle de mosquitos. Mostrou ainda atividade antitumoral contra células com carcinoma de Ehrlich¹⁰⁵; atividade antiproliferativa em experimentos com células dos cânceres de ovário, renal, de próstata, de cólon, de pulmão, de mama, de mama residente e melanoma; atividade citostática e citotóxica a todos os carcinomas investigados¹⁰⁶. Apesar dos mecanismos de ação da surfactina não estarem plenamente elucidados, presume-se que essas características sejam devido à direta interação com a membrana celular, resultando na alteração das propriedades de bicamada. Mais especificamente, parece claro que essas propriedades da surfactina estão principalmente relacionadas à sua capacidade de alterar a integridade da membrana, como consequência do estabelecimento de fortes interações com os seus constituintes fosfolipídicos¹⁰⁷.

O extrato bruto da actinobactéria Caat 7-38 foi submetido a análise por DI-MS. Como foi observado na Figura 17, seu espectro de massas em modo positivo apresentou dois conjuntos de sinais. Os íons de m/z 1255 e 1277 com uma diferença de 22 Da entre os sinais são relativos às espécies iônicas $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. Também foi observado um sinal de m/z em 628, que corresponde à espécie iônica com dupla carga do íon de m/z1255, $[M+2H]^{2+}$, ao passo que os íons de m/z em 639 e 650 foram atribuídos às espécies iônicas $[M+H+Na]^{2+}$ e $[M+2Na]^{2+}$, respectivamente. Com base nos sinais de m/z obtidos no espectro de ESI e a possível fonte biológica, foi realizado então um estudo de desreplicação. Comparando os resultados obtidos com as possibilidades sugeridas pelo banco de dados de produtos naturais (DNP), foi identificada a possível presença de um composto chamado actinomicina D (C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆), um potente antibiótico produzido por algumas espécies de actinobactérias como *Streptomyces chrysomallus* e *Streptomyces antibioticus*¹⁰⁸.



Figura 17. Espectro de DI-MS obtido em modo positivo do extrato da actinobactéria Caat 7-38.

Para a caracterização final do composto, foi realizado um experimento de fragmentação (CID) (Figura 18), de modo que o espectro obtido foi comparado com o relatado na literatura¹⁰⁹. O íon de m/z 1255 foi selecionado como precursor para obtenção dos espectros de CID. A perda de 28 Da foi atribuída à perda neutra de CO ([M+H-CO]⁺). As sucessivas perdas de 202, 97 e 99 Da, geraram os íons produtos de m/z 1053, 956 e 857, indicando a existência de uma cadeia de Val-Pro-Sar-MeVal (398 Da). Os íons produtos de m/z 657 e 558 indicaram a ocorrência de outro resíduo Pro-Sar-MeVal, os quais foram obtidos por fragmentação secundária dos íons de m/z 857, gerou o íon produto de m/z 459. Por fim, os íons de m/z 399, 300 e 203 também foram detectados, correspondendo as cadeias de aminoácidos

fragmentadas dos íons $[(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH) + H]^+$, $[(H-Pro-Sar-MeVal-OH) + H]^+$ e $[(H-MeVal-Sar-OH) + H]^+$ (Tabela 8).



Figura 18. Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de *m/z* 1255 da actinomicina D, utilizando uma energia de colisão de 50 eV.

Composição	Íons Propostos	(<i>m/z</i>)
C ₆₂ H ₈₇ N ₁₂ O ₁₆	[M+H]⁺	1255
$C_{61}H_{87}N_{12}O_{15}$	[M+H-CO]⁺	1228
$C_{53}H_{69}N_{10}O_{13}$	[M+H-(H-Sar-MeVal-OH)] ⁺	1053
$C_{48}H_{62}N_9O_{12}$	[M+H-(H-Pro-Sar-MeVal-OH)]⁺	956
C ₄₇ H ₆₂ N ₉ O ₁₁	[M+H-(H-Pro-Sar-MeVal -OH)-CO]⁺	928
C ₄₃ H ₅₃ N ₈ O ₁₁	[M+H-(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)]*	857
C ₄₂ H ₅₃ N ₈ O ₁₀	[M+H-(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)-CO]⁺	829
C ₃₄ H ₃₇ N ₆ O ₈	[M+H-(H-Pro-Sar-MeVal-OH)- (H-Pro-Sar-MeVal-OH)]⁺	657
C ₃₃ H ₃₇ N ₆ O ₇	[M+H-(H-Pro-Sar-MeVal-OH)- (H-Pro-Sar-MeVal-OH)-CO]*	629
$C_{29}H_{28}N_5O_7$	[M+H-(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)- (H-Pro-Sar-MeVal-OH)]⁺	558
$C_{24}H_{19}N_4O_6$	[M+H-(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)- (H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH)]⁺	459
$C_{19}H_{35}N_4O_5$	[(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH) + H]⁺	399
$C_{19}H_{33}N_4O_4$	[(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH) + H-H₂O]⁺	381
$C_{18}H_{32}N_3O_4$	[(H-Val-Pro-Sar-MeVal-OH) + H-CO-NH₃]⁺	354
$C_{14}H_{26}N_3O_4$	[(H-Pro-Sar-MeVal-OH) + H]⁺	300
$C_{14}H_{24}N_3O_3$	[(H-Pro-Sar-MeVal-OH) + H- H₂O]⁺	282
$C_{13}H_{22}N_3O_3$	[(Val-Pro-Sar) + H]⁺	268
$C_9H_{19}N_2O_3$	[(H-MeVal-Sar-OH) + H]⁺	203
$C_{10}H_{17}N_2O_2$	[(Pro-Val) + H] ⁺	197
$C_8H_{13}N_2O_2$	[(Pro-Sar) + H]⁺	169
C ₆ H ₁₄ NO ₂	[(H-MeVal-OH) + H] ⁺	132
C ₄ H ₆ NO ₂	[Thr + H]⁺	100

Tabela 8. Composições	s moleculares propostas pa	ara os fragmentos de	o íon de <i>m/z</i>	1255 da actinomicina D.
-----------------------	----------------------------	----------------------	---------------------	-------------------------

4.7.1 Actinomicina D



Figura 19. Estrutura tridimensional do complexo formado entre a actinomicina D (estrutura química à esquerda) e o DNA. Fonte: www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions.

A actinomicina D é um alcaloide, derivado do ácido 3-hidroxiantranílico, um metabólito da via degradativa do aminoácido triptofano²⁵. A sua estrutura química contém dois anéis peptídicos cíclicos com cinco aminoácidos ligados ao cromóforo fenoxazinona, sendo por este motivo, classificada como cromopeptídeo¹¹⁰ (Figura 19). Todas as actinomicinas naturais compartilham desse mesmo cromóforo, variando apenas o conteúdo de aminoácidos dos anéis depsipentapeptídeos. A actinomicina D é parte integrante da terapia multimodal para muitos tumores pediátricos, particularmente o Tumor de Wilms, Rabdomiossarcoma e Sarcoma de Ewing, em que ela é usada em combinação com radioterapia e outros agentes anticânceres, tais como vincristina e doxorrubicina¹¹¹. Embora raramente usada, a actinomicina D também é eficaz em alguns tipos de câncer em adultos, tais como a Doença Trofoblástica Gestacional¹¹².

A actinomicina D atua na inibição da síntese do DNA e RNA por meio do bloqueio do alongamento da cadeia. Ela interage com os pares de bases nitrogenadas C-G, uma vez que requere o grupo 2-amino da guanina para a ligação. A análise das estruturas obtidas pela ligação da actinomicina D ao DNA revelam que o anel fenoxazona intercala-se entre a dupla hélice, enquanto as cadeias laterais do depsipentapeptídeo interagem com o sulco menor do DNA através da formação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, o que garante assim, a formação de um completo bastante estável¹¹³ (Figura 19). Tal ligação provoca uma distorção estrutural que altera severamente a interação DNA-proteína fundamental para a

sobrevivência das células, ocasionando como consequência, o bloqueio da transcrição e da replicação. Além disso, a actinomicina D também é conhecida por ser um potencial inibidor da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), graças à sua capacidade comprovada em inibir a transcrição reversa¹¹⁴.

4.7.2 Determinação do melhor método de extração da Actinomicina D do meio líquido

Após a confirmação da presença da actinomicina D, a actinobactéria Caat 7-38 foi fermentada em escala ampliada a fim de obter uma massa maior de extrato bruto para realizar o fracionamento guiado por bioensaio, e consequentemente, comprovar se a atividade atribuída no "*screening*" biológico inicial era realmente devido ao referido composto. Para tal, foram fermentados dez Erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL de meio BD cada, em um total de 3 L. Decorrido o período de fermentação de 10 dias, foi feito um estudo para determinar o melhor método de extração da actinomicina D do meio líquido. Dessa maneira, foram realizadas extrações líquido-líquido com acetato de etila em meio ácido (pH 2), através da adição de ácido fosfórico e básico (pH 10), através da adição de hidróxido de amônio. Também foram realizadas extrações em fase sólida, utilizando C₁₈ e HLB como adsorventes. Posteriormente, as frações extraídas foram analisadas no espectrômetro de massas.

Através da análise dos perfis de metabólitos das diferentes extrações (Figura 20), percebe-se claramente que as extrações líquido-líquido em meio ácido e básico foram mais restringentes do que ambas as extrações em fase sólida, visto que uma menor quantidade de íons foi observada nos seus espectros de ESI. Após realizada uma análise comparativa de cromatografia em camada delgada (Figura 21), no qual foi utilizado ainda um padrão disponível no laboratório, foi verificado que a fração extraída do meio básico apresentou um perfil de separação semelhante ao padrão. Para as demais extrações foram observados uma mancha na origem da placa. Desta forma, a extração em meio básico foi mais seletiva para a actinomicina D, sendo, portanto, o método escolhido para o prosseguimento das atividades. Tal resultado obtido pode ser explicado analisando a estrutura química do composto (Figura 19), o qual é caracterizada pela existência de diversos sítios básicos na molécula. Em meio ácido, tais sítios estão protonados e por isso, o composto apresenta uma maior afinidade pela fase aquosa, ocasionando assim, uma menor eficiência da extração nessas condições. Após a extração dos 3 L de meio, foi obtido aproximadamente 700 mg de extrato bruto.



Figura 20. Espectros de massas do extrato bruto da Caat 7-38 extraído em diferentes condições. a) pH 2 (ácido), b) pH 10 (básico), c) SPE com HLB e d) SPE com C18.



Figura 21. Placa de TLC, mostrando os perfis de separação das frações após aplicação dos diferentes métodos de extração mencionados, em que foi utilizado o revelador à base de vanilina sulfúrica.

4.7.3 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 7-38

Posteriormente, foi realizada uma separação cromatográfica do extrato bruto, utilizando o HPLC-UV em modo analítico. Dentre as diversas condições testadas, a que apresentou o melhor resultado foi aquela em que se empregou um gradiente de eluição com metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 60 a 98% de MeOH em 40 min e manutenção de 98% de MeOH até 60 min) em coluna C₁₈ Shim-Pack Shimadzu (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fluxo de 1 mL/min e detecção em 240 e 350 nm. De acordo com o cromatograma obtido (Figura 22), constatou-se que a actinobactéria Caat 7-38 foi bastante seletiva na produção da actinomicina D, diferentemente de outros casos relatados na literatura, nos quais são observados a produção simultânea de diferentes actinomicinas, visto que elas são originadas da mesma rota biossintética. Tal informação é bastante relevante, já que levando em consideração a grande importância da actinomicina D em terapias anti-câncer, o menor esforço necessário para sua purificação, bem como a relativa grande quantidade produzida de extrato, faz da actinobactéria Caat 7-38 uma fonte potencial extremamente atrativa e promissora para a aplicação biotecnológica.

A partir da metodologia desenvolvida em modo analítico, foi possível o fracionamento do extrato bruto utilizando HPLC-UV em escala preparativa. Para tal, foi utilizado a coluna C_{18} Shim-Pack Shimadzu (250x19 mm, 5 µm) e fluxo de 13 mL/min. As demais condições empregadas foram as mesmas do modo analítico. Foram coletadas um total de 59 frações, minuto a minuto, durante todo o desenvolvimento cromatográfico, de forma que cada fração obtida foi submetida ao bioensaio da *L. minor*. Além da triagem biológica, todas as frações foram analisadas por DI-MS para que o processo de desreplicação pudesse ser finalizado, sendo desse modo possível inferir os compostos responsáveis pela atividade fitotóxica. A Figura abaixo contém o cromatograma do fracionamento, o espectro da fração ativa 28 e o resultado obtido do bioensaio da Lemna. Após análise dos espectros das frações ativas, ficou evidente que a atividade observada no extrato bruto da Caat 7-38 foi realmente devida à presença da actinomicina D.



Figura 22. a) Cromatograma de HPLC-UV analítico do extrato bruto Caat 7-38, extraído em meio básico. b) Cromatograma de HPLC-UV preparativo do extrato bruto Caat 7-38, extraído em meio básico, juntamente com o espectro de DI-MS da fração 28. Além disso, também é mostrado o resultado do bioensaio da *L. minor* das frações ativas do extrato bruto da Caat 7-38.

4.7.4 Monitoramento da produção da actinomicina D por MRM

A biossíntese de metabólitos secundários frequentemente está relacionada a algum tipo de carência nutricional e ocorre na fase final do crescimento microbiano. Diversos estudos indicam que a manipulação nutricional das fermentações de micro-organismos possui grande influência na diversidade de metabólitos secundários excretados¹¹⁵, de modo que determinados componentes do meio de cultura podem atuar diretamente como cofatores enzimáticos ou intermediários de síntese, promovendo a ativação e/ou desativação de determinadas vias metabólicas e orientando o tipo e a quantidade dos metabólitos gerados. Neste contexto, estudos inovadores realizados recentemente indicaram que a adição de terras

raras aos meios de culturas constitui uma nova alternativa no estudo dos eventos regulatórios associados à produção de metabólitos secundários por micro-organismos.

O grupo das terras raras é composto por dezessete elementos químicos, dos quais quinze são lantanídeos, além do escândio e o do ítrio. Embora sejam abundantes, as terras raras recebem esse nome por serem de difícil extração, devido, em parte, às suas características semelhantes. Suas propriedades químicas e físicas são utilizadas em uma incorporadas grande variedade de aplicações tecnológicas e estão em supercondutores, magnetos, catalisadores, computadores, televisores, entre outros¹¹⁶. Apesar da importância desse grupo de compostos na indústria química em geral, pouco se sabe sobre seus efeitos biológicos em células vivas. No entanto, estudos recentes mostraram que tais elementos estão diretamente envolvidos na produção excessiva de determinados antibióticos, bem como na ativação de genes silenciosos, especialmente em actinobactérias¹¹⁷.

Segundo Kawai e colaboradores¹¹⁸, a utilização do escândio, mesmo quando adicionado em uma baixa concentração (10-100 mM) a culturas de *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces antibioticus* e *Streptomyces griseus*, possibilitou uma superprodução dos antibióticos produzidos por essas linhagens (actinorodina, actinomicina e estreptomicina, respectivamente), sendo esta produção aumentada até por um fator de vinte e cinco vezes. Uma provável explicação desses resultados reside no fato das terras raras estarem onipresentes em todo o mundo, sendo assim concebível que os micro-organismos tenham adquirido a capacidade de responder aos baixos níveis desses elementos ao longo de sua história evolutiva, possivelmente como forma de adaptar suas fisiologias às condições pré-existentes.

Com base nesses exemplos relatos na literatura, decidiu-se então realizar um estudo com intuito de avaliar a influência de algumas terras raras (La, Nd e Sc) sobre a cultura da actinobactéria Caat 7-38, o qual, conforme visto anteriormente, é responsável pela produção da actinomicina D, analisando ainda a influência do tempo de fermentação na produção deste composto. Para isso, foi utilizada a técnica de UHPLC-MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). O objetivo de aplicar essa metodologia foi monitorar a produção do composto fitotóxico de uma forma rápida, robusta, sensível e seletiva sem a necessidade de isolar o analito. Neste modo de varredura, o íon precursor de interesse foi selecionado no quadrupolo Q1, fragmentado em q2 com argônio, e um único íon fragmento foi selecionado em Q3 para cada canal analisado, conforme mostra a Figura 23.


Figura 23. Esquema do Experimento de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

O experimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita na parte experimental (Seção 3.10). O método de UHPLC-MRM foi desenvolvido empregando um gradiente de eluição com metanol e acetato de amônio 0.1% (v/v) (gradiente de 90 a 100% de MeOH em 1 min e manutenção de 100% de MeOH até 2 min) em coluna Variant Polaris C_{18} (50 x 2 mm, 2,7 µm) e fluxo de 0,5 mL/min. As transições monitoradas foram 1255>459 e 1255>300, sendo a energia de colisão empregada de 35 eV para ambos canais. Os parâmetros de m/z dos íons-produtos monitorados nos canais e as energias de colisões haviam sido previamente otimizados em experimentos de Infusão Direta no Espectrômetro de Massas, de modo que os sinais de m/z 300 e 459 foram selecionados por apresentarem uma maior intensidade relativa nessas condições. Os dados do experimento foram analisados através de uma curva construída a partir das áreas dos cromatogramas obtidos para os canais selecionados em função do período de fermentação. Com intuito de relacionar tais áreas com a concentração, foi construída ainda uma curva de calibração, no qual foi utilizado um padrão de actinomicina D obtido por meio da separação do extrato bruto da Caat 7-38 em Sephadex LH-20. Para a construção da curva de calibração, foram feitas soluções de actinomicina D nas concentrações de 1, 10, 50, 75 e 100 µL/mL, sendo cada medida realizada em triplicata. Um exemplo de cromatograma de UHPLC-MRM obtido, bem como a curva de calibração construída e o gráfico do monitoramento da actinomicina D ao longo dos dias estão expressos na Figura abaixo.



Figura 24. a) Cromatograma de UHPLC-MRM de um dos canais de MRM monitorados (1255>300) relativo à análise da actinomicina D padrão na concentração de 1 µg/mL. b) Curva de calibração da actinomicina D. c) Monitoramento da produção da actinomicina D na fermentação da actinobactéria Caat 7-38 em meio BD em função das terras raras adicionadas.

Diferentemente das outras terras raras estudadas, a concentração final de 100 mM de escândio foi quase letal para actinobactéria Caat 7-38, o que culminou como consequência, na produção muito baixa de actinomicina D ao longo dos dias. As curvas correspondentes ao controle, lantânio e neodímio, em contrapartida, apresentaram comportamento crescente, sendo que até aproximadamente o décimo sexto dia, não foi possível notar uma diferença muito significativa entre tais curvas. Entretanto, conforme aumento do periodo da fermentação, foi possível observar que as culturas que continham neodímio e, em especial, o lantânio, apresentaram um aumento na produção de actinomicina D em comparação ao controle. De modo que, no último dia de fermentação (35 dias), a concentração de actinomicina D na cultura contendo o lantânio foi mais de três vezes superior à observada no controle.

A última etapa do experimento consistiu na comparação do perfil metabólico obtido entre os grupos do estudo com diferentes terras raras. Para tal, foi utilizada a técnica de UHPLC-PDA-MS, em que foram analisadas as amostras com 6, 18 e 35 dias de fermentação para cada grupo. Nesta análise, foi empregado um gradiente de eluição com metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 30 a 100% de MeOH em 10 min e manutenção de 100% de MeOH até 17 min) em coluna C₁₈ Ascentis (10x4,6 mm, 2,7 µm) e fluxo de 0,5 mL/min. De um modo geral, não houve mudanças significativas nos compostos produzidos pela actinobactéria Caat 7-38 quando na presença das diferentes terras raras, uma vez que os cromatogramas obtidos foram muito similares. Conforme mencionado anteriormente, a concentração utilizada de escândio foi praticamente letal para actinobactéria e por essa razão não é observado em seu cromatograma o pico referente à actinomicina D com tempo de retenção em aproximadamente 11 min. Apesar de não alterar o perfil metabólico, pode-se concluir que as terras empregadas tiveram efeitos expressivos na cultura da Caat 7-38, constituindo, portanto, uma alternativa interessante para o aumento da produção da actinomicina D.



Figura 25. Cromatogramas de UHPLC-PDA dos extratos obtidos dos meios de cultivos contendo a) neodímio, b) escândio, c) lantânio e d) sem terras raras (controle), respectivamente. Deve-se ressaltar que tais cromatogramas são referentes ao décimo oitavo dia de fermentação da actinobactéria Caat 7-38.

4.8 Desreplicação do extrato bruto da Caat 8-6

Para a desreplicação do extrato bruto da Caat 8-6, foi aplicada a mesma metodologia descrita para a desreplicação do extrato bruto da Caat 7-38. Este extrato bruto apresentou uma coloração vermelha característica com uma atividade bastante pronunciada para o bioensaio da *C. vulgaris*, possuindo uma fitotoxidade comparada com a atrazina, o controle positivo utilizado. Como foi verificado na Figura 26, seu espectro de massas em modo positivo apresentou os íons de m/z 523, 537 e 551, de modo que a diferença de massas de 14 Da entre os sinais observados sugere que tais íons pertençam a uma série homóloga. Através da busca no banco de dados de produtos naturais (DNP), utilizando a massa molecular, origem biológica,

coloração, bem como os espectros de fragmentações dos íons em questão, foi possível inferir que tais compostos pertenciam à família das rubromicinas.



Figura 26. Espectro de DI-MS obtido em modo positivo do extrato da actinobactéria Caat 8-6. Deve-se ressaltar que os íons de *m/z* 203, 304, 326, 338, 360, 419 e 647 representam contaminações.

A confirmação da presença de rubromicinas neste extrato se deu através da análise do espectro de massas obtido da fragmentação do íon de m/z 537 (Figura 27), já que por meio de uma proposta de fragmentação para β -Rubromicina, foi possível atribuir os íons fragmentos de maior intensidade relativa. Observando a proposta de fragmentação (Figura 28), percebe-se que através de uma reação de Retro Diels-Alder, o íon precursor pode formar os íons de m/z 249 e 289. Além disso, mediante a perda de H₂O (18 Da) e C₂H₄O₂ (60 Da), o íon precursor forma os íons-produtos de m/z 519 e 477, respectivamente. Outro indicativo da estrutura proposta é a pouca incidência de fragmentos na faixa baixa de m/z, fato este característico de moléculas que apresentam uma grande aromaticidade, como no caso em questão.



Figura 27. Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de *m/z* 537, utilizando uma energia de colisão de 30 eV.



Figura 28. Proposta de fragmentação para β -Rubromicina (*m/z* 537).

Posteriormente, a actinobactéria Caat 8-6 foi fermentada em escala ampliada, com a finalidade de comprovar a existência das rubromicinas, e em caso positivo, verificar quais componentes dessa classe eram responsáveis pela atividade fitotóxica observada no bioensaio da *C. vulgaris*. Para tal, foram fermentados inicialmente cinco Erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL de meio BD cada, em um total de 1,5 L. A quantidade de extrato bruto obtido nessa primeira etapa foi de apenas 70 mg, de forma que decidiu-se realizar outra fermentação, no qual foi utilizado um fermentador contendo 8 L de meio BD. Somado as duas etapas, foi obtido

então aproximadamente 860 mg de extrato de bruto. Nesse caso, não houve a necessidade de um estudo para determinar o melhor método de extração das rubromicinas do meio líquido, pois, conforme apresentado na Figura 29, percebe-se a grande afinidade de seus constituintes pela fase contendo acetato de etila.



Figura 29. a) Morfologia da actinobactéria Caat 8-6. b) Meio de cultivo da actinobactéria Caat 8-6 antes (à direita) e após a filtração para retirada dos micélios (à esquerda). c) Extração do meio liquído obtido da fermentação da Caat 8-6, utilizando acetato de etila.

4.8.1 Rubromicinas

As rubromicinas são uma família de compostos estruturalmente relacionados com características únicas isoladas de determinadas linhagens de actinobactérias. Tais compostos, em sua grande maioria, são caracterizados por apresentar uma estrutura molecular diferenciada, que consiste de uma unidade central de espirocetal fundido a porções de naftoquinona e isocumarina. Uma exceção é a α -Rubromicina, que exibe uma estrutura baseada no anel furânico e é o análogo de cadeia aberta da β -Rubromicina. Cada composto é distinguido por apresentar diferentes estados de oxidação no C-3['], C-3, C-4, e funcionalidade no C-7¹¹⁹ (Figura 30). Os membros mais conhecidos dessa classe são mostrados na Figura 31.



Figura 30. Estrutura geral das rubromicinas.



Figura 31. Policetídeos aromáticos representativos da família das rubromicinas. Fonte: Atkinson, D. J.; Brimble, M. A. *Isolation, biological activity, biosynthesis and synthetic studies towards the rubromycin family of natural products.* Nat. Prod. Rep. 2015;32(6):811-40.

Os griseorhodins são um pequeno subgrupo de compostos isolados dos meios de culturas de várias linhagems de *Streptomyces* de diferentes partes do mundo. Eles são um subconjunto único das rubromicinas, já que não possuem a funcionalidade metil éster no C-7 da porção isocumarina, diferentemente dos outros membros dessa família. Tal subconjunto é distinguido também pela densa funcionalidade de oxigênio localizada na porção espirocetal. Os compostos DK, por sua vez, são outro subconjunto dessa família, sendo isolados da bactéria *Dactylosporangium purpureum sp.* Interessantemente, tais compostos compartilham do mesmo padrão de funcionalidade de oxigênio no núcleo espirocetal que os griseorhodins, mas assim como as outras rubromicinas, apresentam o grupo metil éster na porção isocumarina.

Embora conhecida há mais de 50 anos, a família das rubromicinas ainda constitui uma classe fascinante de antibióticos antitumorais, possuindo propriedades biológicas altamente atraentes¹²⁰. As rubromicinas são potentes agentes antimicrobianos, de modo que inibem o crescimento de várias bactérias e fungos até mesmo em concentrações nanomolares, com marcante atividade para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*¹²¹. Apresentam também propriedades citotóxicas únicas, sendo ativas contra células cancerígenas de estômago, colón, mama e fígado, mesmo em baixas concentrações¹²². Alguns membros dessa família apresentam ainda propriedades inibitórias enzimáticas e citostáticas, com destaque para as enzimas telomerase humana¹²³ e DNA polimerase de mamíferos¹²⁴. As diversas atividades biológicas exibidas pelas rubromicinas têm estimulado um grande interesse no desenvolvimento de suas sínteses químicas, fato este que confirma ainda mais a relevância dessa classe de compostos nas pesquisas medicinais.

4.8.2 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 8-6

Depois de desenvolvido o método no HPLC-UV em modo analítico, foi realizado o fracionamento do extrato bruto da Caat 8-6 utilizando o HPLC-UV em escala semipreparativa (Figura 32). A melhor condição para separação cromatográfica foi aquela em que se utilizou um gradiente de eluição com acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 20 a 98% de ACN em 40 min e manutenção de 98% de ACN até 50 min), fluxo de 1 mL/min (modo analítico) ou 4 mL/min (modo semipreparativo), detecção em 315 e 350 nm, empregando a coluna Shim-Pack C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μ m) para o modo analítico e a coluna Zorbax Eclipse XDB C₁₈ Agilent (250 x 9,4 mm, 5 μ m) para o modo semipreparativo. Cada uma das 49

frações obtidas foi submetida somente ao bioensaio da *C. vulgaris*, pois tal extrato não foi ativo para o bioensaio da *L. minor*.

Como pode ser observado na Figura 32, fica claro que as frações 14, 15, 20 a 26 apresentaram fitotoxidade bastante acentuada frente à *C. vulgaris*. Através da análise de UHPLC-PDA-MS, em que foi empregado uma coluna C_{18} Ascentis (10 x 4,6 mm, 2,7 µm) com um gradiente de eluição utilizando acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 20 a 98% de ACN em 10 min e manutenção de 98% de ACN até 15 min) e fluxo de 0,5 mL/min, concluiu-se que as frações ativas 14, 15 e 26 se encontravam praticamente puras, ao passo que as frações ativas 20 a 25 apresentavam um perfil metabólico diverso, com alguns sinais característicos das rubromicinas, existindo ainda na forma de mistura. Esta última observação é de extrema importância, pois dificulta a possível identificação dos compostos responsáveis pela atividade fitotóxica nessas frações em mistura.



Figura 32. a) Cromatograma de HPLC-UV analítico. b) Cromatograma de HPLC-UV preparativo. c) Resultado do bioensaio frente à *C. vulgaris* das frações ativas do extrato bruto da Caat 8-6.

Analisando o espectro de massas em modo positivo das frações 14 e 15 (Figura 33), foi possível observar os íons de m/z 473, 491, 509 e 531. Mediante a diferença de 18 e 22 Da entre os sinais, esses íons foram atribuídos as espécies iônicas [M+H-2H₂O]⁺, [M+H-H₂O]⁺, [M+H]⁺ e [M+Na]⁺, respectivamente. Desse modo, concluiu-se que todos os sinais observados no espectro da fração se referiam ao mesmo composto de massa molecular 508 Da, o que indicou assim, a ocorrência de fragmentação na fonte de ionização. Após analisar as possibilidades sugeridas pelo banco de dados de produtos naturais (DNP), juntamente com a provável presença de outras rubromicinas no extrato e com os espectros de CID e UV (Figura 33), foi possível atribuir a presença do griseorhodin A nessas frações ativas 14 e 15.



Figura 33. a) Espectro de DI-MS em modo positivo da fração 15 do extrato bruto da Caat 8-6. b) Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de *m/z* 509, utilizando uma energia de colisão de 30 eV. c) Espectro de UV da fração 15 do extrato bruto da Caat 8-6.

Conforme mencionado anteriormente, o griseorhodin A se difere das outras rubromicinas no substituinte do carbono C-7 da porção isocumarina, já que é ligado ao metil ao invés de um grupo metil éster (Figura 31), apresentando ainda um grupo hidróxido no C-3' e um epóxido unindo os C-3 e C-4. Analisando o espectro de CID do íon de m/z 508, foi possível observar, além do conjunto de sinais anteriormente citado, os íons fragmentos de m/z 455 e 427 com uma maior intensidade relativa, espécies iônicas estas atribuídas a [M+H-3H₂O]⁺ e [M+H-3H₂O-CO]⁺, respectivamente. O espectro de CID em questão apresentou poucos fragmentos, indicando assim, uma grande estabilidade do íon precursor. O último indício da presença do griseorhodin A nessas frações se deu por meio da visualização do espectro de UV do composto (Figura 33), visto que os valores obtidos de UV máximo são similares com os relatados na literatura¹²⁵.

Por fim, a Tabela 9 apresenta os principais íons identificados nas demais frações ativas, bem como algumas sugestões dos possíveis compostos pertencentes à classe de rubromicinas para esses íons, as quais foram inferidas exclusivamente por meio das informações das massas moleculares obtidas nos espectros, bem como pelos seus espectros de fragmentações. Como podemos observar na Tabela, alguns membros das rubromicinas possuem a mesma massa molecular, circunstância esta que indica a complexidade estrutural dessa classe de compostos, como também do extrato bruto em questão.

Fração	20	21	22	23	24	25	26
Íons							
Principais	551,	537, 539	Idem	573	537	Idem	523
(m/z)	587		21			24	
		537→ α-Rubromicina					
Sugestões	-	β-Rubromicina	Idem	-	α-Rubromicina	Idem	γ-Rubromicina
			21		β-Rubromicina	24	γ-Isorubromicina
		539→ Purporomicina					

Tabela 9. Principais íons encontrados nas frações ativas 20 a 26 obtidas do extrato da actinobactéria Caat 8-6.

4.9 Desreplicação do extrato bruto da Caat 5-29

A última etapa dessa dissertação consistiu no estudo para determinar os compostos presentes no extrato da actinobactéria Caat 5-29 responsáveis pela atividade fitotóxica perante o bioensaio da *L. minor*. Por meio da análise dos espectros de DI-MS em modo positivo e negativo deste extrato, foram observados diversos íons com variadas razões m/z (Figura 34). Diferentemente dos outros dois casos, não foi possível a identificação rápida de nenhum composto utilizando apenas a espectrometria de massas, de forma que foi realizada uma fermentação em escala ampliada a fim de obter uma massa maior de extrato para a realização do fracionamento guiado por bioensaio e, posteriormente, a análise de RMN das frações ativas. Para tal, foi fermentado 1,5 L de meio BD, obtendo-se ao final do processo de extração, um total de 250 mg de extrato bruto.



Figura 34. Espectro de DI-MS em modo a) negativo e b) positivo do extrato bruto da Caat 5-29.

Anteriormente ao desenvolvimento dos métodos analítico e preparativo, foi realizada uma análise de UHPLC-PDA-MS, visando avaliar a quimiodiversidade do extrato bruto da Caat 5-29. Para tal, foi utilizado um gradiente de eluição com metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 40 a 100% de MeOH em 10 min e manutenção de 100% de MeOH até 15 min) em coluna C₁₈ Ascentis (10 x 4,6 mm, 2,7 μ m) e fluxo de 0,5 mL/min. Conforme podese observar no cromatograma da Figura abaixo, existem diversos picos nos mais variados

tempos de retenção, indicando desse modo, a grande capacidade dessa actinobactéria na produção de compostos com propriedades químicas diferentes.



4.9.1 Fracionamento guiado por bioensaio para o extrato bruto da Caat 5-29

O método de UHPLC-PDA-MS desenvolvido foi então transferido ao HPLC-UV analítico, e em seguida, adaptado para a coluna preparativa equivalente. O método de separação em coluna preparativa utilizou um gradiente de eluição com metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (gradiente de 40 a 100% de MeOH em 40 min e manutenção de 100% de MeOH até 50 min), fluxo de 20 mL/min, detecção em 380 e 450 nm, empregando a coluna C_{18} Shim-Pack Shimadzu (250 x 19 mm, 5 µm). As frações foram coletadas a cada minuto de análise, sendo todas posteriormente submetidas ao bioensaio com *L. minor*.



Figura 36. a) Cromatograma de HPLC-UV analítico do extrato bruto da Caat 5-29. b) Cromatograma de HPLC-UV preparativo do extrato bruto da Caat 5-29, contendo o resultado do bioensaio da *L. minor* da fração ativa.

Conforme ilustra a Figura 36, todas as frações foram bioensaidas e apenas a Fr-9 apresentou atividade fitotóxica. Após realizada uma análise de UHPLC-PDA-MS, foi verificado que a fração 9 apresenta um alto grau de pureza. Por meio da visualização de seu espectro de massas obtido em modo positivo, foi possível visualizar um conjunto de íons de m/z 349, 367, 385, 407 e 791, os quais, devido à diferença característica de massa entre os sinais, foram atribuídos às espécies iônicas [M+H-2H₂O]⁺, [M+H-H₂O]⁺, [M+H]⁺, [M+Na]⁺ e [2M+Na]⁺, respectivamente. Com base nessa atribuição e similarmente ao caso do griseorhodin A, foi constatada a ocorrência de fragmentação na fonte de ionização, sendo todos os sinais obtidos referentes ao mesmo composto de massa molecular 384 Da. Outra informação extremamente relevante foi a ionização da fitotoxina também em modo negativo, o que indicou, portanto, a provável presença de hidrogênios ácidos em sua estrutura.



Em seguida, foi realizada a fragmentação do íon precursor protonado de m/z 385, a fim de se obter maiores informações estruturais do composto. De acordo com o espectro de CID obtido (Figura 38), verificou-se o aparecimento de um conjunto de fragmentos caracterizados pela diferença em massa de 18 ou 28 Da. O espectro em questão apresentou poucos fragmentos, mesmo quando se utilizou uma alta energia de colisão (60 eV). Tal perfil químico é, geralmente, uma consequência direta da estabilidade do composto decorrente de uma estrutura altamente aromática e conjugada.



Figura 38. Espectro de massas obtido da fragmentação do íon de *m/z* 385 do extrato da Caat 5-29, utilizando uma energia de colisão de 35 eV.

4.9.2 Caracterização estrutural da fitotoxina presente no extrato bruto da Caat 5-29

O primeiro passo foi a submissão da fração 9 ativa a uma análise por espectrometria de massas de alta resolução (Q-ToF) por inserção direta. O espectro obtido apresentou como sinal o íon de m/z 385.0910 como [M+H]⁺, o qual corresponde a fórmula molecular C₂₀H₁₆O₈ com um erro de 2,0 ppm. Esta formula molecular apresenta uma estrutura com 13 insaturações. Por sua vez, o espectro de ultravioleta obtido da análise de UHPLC-DAD-MS exibiu as seguintes bandas de absorção: 256, 285 e 448 cm⁻¹.

As analises de RMN¹H foram realizadas em dois solventes diferentes, CD₃OD e Acetona- d_6 . Desta forma, o espectro de RMN de ¹H em 500 MHz (Figura 39) apresentou dois sinais em δ 12,10 e 9,08, os quais foram atribuídos à presença de duas hidroxilas fenólicas. Também foi observado um conjunto de sinais na região de aromáticos que sugere a presença de dois sistemas: ABC e AB. O sistema ABC foi caracterizado pela formação de um tripleto em δ 7,76 (*J*= 8,3 Hz) e dois dubletos em δ 7,61 (*J*= 8,3 Hz) e 7,31 (*J*= 8,3 Hz), todos integrando para 1 hidrogênio. O sistema AB foi caracterizado pela presença de dois dupletos em δ 7,04 e 7,00 (*J*= 7,3 Hz).



Figura 39. Espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em acetona-d6).

O espectro de RMN¹³C apresentou a formação de 21 sinais, os quais foram atribuídos com o auxilio do DEPT 135 (Figura 40). Foi observado um carbono metilênico (CH₂) em δ_C

68,5, dez carbonos metínicos (CH) e dez carbonos quaternários (C₀), sendo os carbonos em 189,9 e 186,3 atribuídos à carbonos de carbonilas.



Figura 40. a) espectro de RMN¹³C e b) espectro de DEPT 135 da fração 9 (125 MHz em acetona-*d*₆).

A análise do espectro de correlação heteronuclear HMQC possibilitou a identificação de quatro carbonos ligados ao oxigênio na região entre δ_C 80 e 60, sendo três carbonos metínicos em δ_C 74,15; 71,34 e 63,08 e um carbono metilênico em δ_C 68,5.





Com base nestas informações preliminares de HRMS, UV e RMN, foi realizada uma busca no banco de dados de Produtos Naturais (DNP) para identificar algum esqueleto básico que pudesse satisfazer os dados espectroscópicos identificados até o momento. Assim, dois esqueletos da classe das angluciclinas foram encontrados. (Figura 42)



Figura 42. Esqueleto básico de duas angluciclinas.

O composto ocramicinona satisfaz os dois sistemas aromáticos ABC e AB observados no espectro de RMN¹H. No entanto, apresenta apenas uma hidroxila fenólica, enquanto que duas hidroxilas fenólicas foram observadas no espectro de RMN¹H (Figura 39). Da mesma forma, o antibiótico PM070747 apresenta um sistema ABC aromático, uma hidroxila aromática (e uma metoxila aromática) e dois carbonos carbinólicos, porém não apresenta o segundo sistema AB aromático. Posteriormente, com base em estudos comparativos de deslocamento químicos de carbono e hidrogênio do antibiótico PM070747, foi proposta uma estrutura para o composto ativo isolado da fração 9 (Figura 43).

7,00 9,08 a) HO HO 3,68 120.0 68.5 48.8 3,57 137.4 7.76 ЮH 134,9 , 141,2 144,8 74,8 OH 72, 5 OH 4.68 OH 1 15.5 142.2 124.6 7,3 ЮН Ю . 189,9 161,8 64,6 5,14 OH 0 OH 0 ÔН 12,10 OH Fitotoxina da fração 9 29,7 6,76 118,5 2,64 b) 150.4 1.26 HO HO Ö С 15,6 7.69 120.2 187.5 123,2 6.86 7,7 136,2 . 137,6 140,2 . 143,0 4.59 120,8 141,88 72,8 7.50 1 19, ЮH ЮН 184.32 64,7 5,12 160.7 0 ÔН 0 ÔН -Ο 0 4,00 56.8

Antibiótico PM070747

Figura 43. a) Estrutura proposta para a fitotoxina presente no extrato bruto da Caat 5-29 e b) atribuições de hidrogênio e carbono para o antibiótico PM070747

A estrutura proposta na Figura acima foi baseada nas seguintes atribuições. Para o espectro de correlação de longa distância (HMBC), o hidrogênio em δ_H 12,10 atribuído à hidroxila fenólica está correlacionando com o carbono quaternário em δ_C 115,5, o qual foi atribuído ao carbono C-7a; com o carbono em δ_C 124,5, atribuído ao carbono C-9 e com o carbono quaternário δ_C 161,8, atribuído ao carbono C-8 (Figura 44).



Figura 44. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_{H} 12,10.

O hidrogênio em δ_H 7,32 (C-9, δ_C 124,5) acopla com os carbonos em δ_C 115,5 (C-7a); 120,0 (C-11); 134,9 (C-11a); 137,4 (C-10); 161,4 (C-8) e 189,7 (C-7). Estas correlações sugerem a presença de um sistema aromático ABC para a estrutura proposta.



Figura 45. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,32.

Para o dupleto em δ_H 7,62 (C-11, δ_C 120,1) foram observadas correlações HMBC com os carbonos em δ_C 115,5 (C-7a); 124,5 (C-9); 137,4 (C-10) e 186,4 (C-12). Todas estas correlações confirmam o sistema aromático ABC para a estrutura proposta.



Figura 46. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,62.

Com base nos deslocamentos químicos observados para o antibiótico PM070747, o sinal de hidrogênio em $\delta_{\rm H}$ 5,1 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-6 ($\delta_{\rm C}$ 64,6). As correlações a longa distancia corroboram com esta atribuição. Assim, este hidrogênio em $\delta_{\rm H}$ 5,1 se correlaciona com os carbonos em $\delta_{\rm C}$ 72,7 (C-5); 141,2 (C-12a); 144,8 (C-4a) e 189,9 (C-7).



Figura 47. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 5,1.

O sinal em $\delta_{\rm H}$ 4,68 foi atribuído ao carbono carbinólico do diol vicinal em C-5 ($\delta_{\rm C}$ 72,4). Este hidrogênio se correlaciona com os carbonos em $\delta_{\rm C}$ 64,5 (C-6); 115,2 (C-12b); 121,1 (C-3) e 142,8 (C-6a).



Figura 48. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 4,68.

Nesta mesma Figura, também é possível observar a correlação do hidrogênio em δ_H 4,72, o qual foi atribuído ao carbono carbinólico benzílico C-13 em δ_C 74,8, o qual se correlaciona com o único carbono metilênico em δ_C 68,6 (C-14) e com o carbono quaternário aromático em δ_C 148,8 (C-4).

O hidrogênio em $\delta_{\rm H}$ 9,10 foi atribuído à segunda hidroxila fenólica da molécula. Este hidrogênio se correlaciona com os carbonos em $\delta_{\rm C}$ 115,2 (C-12b); 117,2 (C-2) e 156,8 (C-1).



Figura 49. Ampliação do espectro de correlação HMBC, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 9,10.

O espectro de correlação homonuclear COSY apresentado na Figura abaixo mostra uma correlação entre os hidrogênicos carbinólicos em δ_H 5,1 com 4,68, atribuídos ao diol vicinal das posições C-5 e C-6. Também foi observada a correlação entre os hidrogênios do outro sistema diol nas posições C-13 e C-14 em δ_H 4,7 com 3,6 e as correlações dos hidrogênios aromáticos do sistema ABC. Sendo assim, estas interações reforçam ainda mais a estrutura proposta.



Figura 50. Ampliação do espectro de correlação homonuclear de hidrogênio COSY, destacando as interações existentes.

Também foi realizado um experimento de ROESY e o espectro obtido apresenta um efeito nuclear Overhauser entre os hidrogênios do diol C-13 e C-14 com o hidrogênio em δ_H 7,05 do sistema aromático AB.



Figura 51. Ampliação do espectro de ROESY, destacando as interações existentes.

As anguciclinonas são uma classe de compostos pertencentes à família das anguciclinas que têm atraído à atenção de inúmeros pesquisadores devido às suas atividades antitumorais, antibacterianas e de inibição enzimática¹²⁶. As anguciclinas, de modo geral, são antibióticos policetídeos produzidos por actinobactérias que apresentam um esqueleto com quatro anéis fundidos constituindo sua parte aglicona¹²⁷. Estruturalmente, consistem de uma porção benzantraquinona, o qual é usualmente C- ou O-glicosilada com açúcares de variados comprimentos de cadeia¹²⁸.

Um fato interessante observado é que as angluciclinas apresentam uma rota biossintética característica, com um padrão de substituição 1,3 no anel A (Figura 42), no entanto, este padrão biossintético não foi observado na atribuição realizada para a fitotoxina da actinobactéria Caat 5-29. Desta forma, acreditamos que o composto ativo apresenta um padrão de substituição em sua estrutura diferente dos padrões biossintéticos observados para as angluciclinas. Deve-se ressaltar que compostos com padrões de glicosilação também foram observados no espectro de massas do extrato da actinobactéria 5-29, mais necessitam de uma análise mais detalhada para as suas atribuições.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusão

Neste trabalho, o estudo de fitotoxinas provenientes de actinobactérias foi realizado empregando os bioensaios de fitotoxidade com *L. minor* e *C. vulgaris*. Tais bioensaios foram selecionados por serem miniaturizados, simples, rápidos e sensíveis a pequena quantidade de amostra. Das noventa actinobactérias submetidas ao "*screening*" inicial, aproximadamente 20% delas foram consideradas ativas para pelo menos um dos bioensaios testados. Apenas três extratos apresentaram atividade fitotóxica simultânea para ambos os bioensaios, o que demonstrou assim, a especificidade de ação das fitotoxinas encontradas. Todas as actinobactérias ativas foram isoladas do solo da caatinga, resultado este que indica o grande potencial dos micro-organismos isolados desse habitat na produção de metabólitos secundários com atividade fitotóxica.

As análises por DI-MS dos extratos brutos obtidos demonstraram a diversidade dos compostos produzidos pelas actinobactérias, uma vez que diferentes perfis químicos puderam ser observados para cada espectro de massas analisado. A utilização da espectrometria de massas foi essencial na rápida caracterização dos compostos ativos, especialmente quando acoplada à cromatografia líquida de alta e de ultra eficiência (HPLC-MS, UHPLC-MS) e através de experimentos de fragmentação induzida por colisão (CID). Esta metodologia foi utilizada para a desreplicação dos extratos brutos e mostrou-se bastante eficiente e rápida, uma vez que possibilitou a inequívoca identificação de surfactinas nos extratos da Caat 2-21, Caat 2-64 e Caat 10-15(+)F, sem a necessidade de fracionamento ou purificação por técnicas clássicas de separação.

O extrato bruto da Caat 7-38 foi submetido ao fracionamento guiado por bioensaio, utilizando uma metodologia de HPLC-UV em escala preparativa. Nas frações ativas Fr-28 a 32, foi identificado e isolado o composto actinomicina D, um potente antibiótico antitumoral produzido por algumas espécies de actinobactérias. Esse composto elucidado, embora já descrito na literatura, não tinha sua ação fitotóxica relatada. Foi realizado ainda um estudo empregando o modo de varredura MRM com o objetivo de determinar a influência de algumas terras na produção dos metabólitos secundários. Nesta técnica, foi possível monitorar a produção de actinomicina D em função dos dias de fermentação sem uma laboriosa extração dos meios de cultura, demonstrando, portanto, a versatilidade analítica da espectrometria de massas. Coerentemente com os resultados descritos na literatura, foi observado um aumento da produção da actinomicina D na presença de terras raras, sobretudo o lantânio. Este

resultado é de extrema relevância, uma vez que demonstra a importância das terras raras, até então pouco utilizadas, nos estudos de metabolômica.

A mesma estratégia de isolamento e caracterização foi também aplicada para o extrato bruto proveniente da Caat 8-6, sendo possível atribuir a atividade obtida nas Fr-14 e 15 devido à presença do griseorhodin A, um membro da família das rubromicinas. Por sua vez, não foi possível a atribuição inequívoca dos compostos responsáveis pelas atividades nas demais frações ativas (20 a 26), em virtude da existência de mistura complexa ou isômeros nessas frações.

Por fim, com relação ao extrato da Caat 5-29, foi identificada uma fitotoxina inédita, provavelmente pertencente à classe das anguciclinas, por meio de variadas análises de RMN. Este composto apresenta algumas características únicas quando comparado às outras anguciclinas, sendo, portanto, necessária uma investigação mais completa a cerca de suas propriedades biológicas e estruturais.

ANEXO

Normalized Intensity

caat5_29.001.esp







Figura S1. Espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em CD₃OD).



Figura S2. Ampliação do espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em CD₃OD), enfatizando os hidrogênios aromáticos.



Figura S3. Ampliação do espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em CD₃OD), enfatizando os hidrogênios carbinólicos.







Figura S5. Ampliação do espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em acetona-d6), enfatizando os hidrogênios fenólicos.



Figura S6. Ampliação do espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em acetona-d6), enfatizando os hidrogênios aromáticos.



Figura S7. Ampliação do espectro de RMN¹H da fração 9 (500 MHz em acetona-d6), enfatizando os hidrogênios carbinólicos.



Figura S8. Espectro de RMN¹³C da fração 9 (125 MHz em acetona-*d*₆).



Figura S9. Espectro de DEPT 135 da fração 9 (125 MHz em acetona-d₆).



Figura S10. Espectro de correlação homonuclear de hidrogênio COSY da fração 9 obtido em acetona-d6.



Figura S11. Ampliação do espectro de correlação homonuclear de hidrogênio COSY da fração 9 obtido em acetona-*d*₆, enfatizando as interações existentes entre os hidrogênios aromáticos.



Figura S12. Ampliação do espectro de correlação homonuclear de hidrogênio COSY da fração 9 obtido em acetona-*d*₆, enfatizando as interações existentes entre os hidrogênios carbinólicos.



Figura S13. Espectro de correlação HMQC do composto ativo obtido em acetona-d6.



Figura S14. Ampliação do espectro de correlação HMQC do composto ativo obtido em acetona-*d*₆, enfatizando a região dos hidrogênios aromáticos.



Figura S15. Ampliação do espectro de correlação HMQC do composto ativo obtido em acetona-*d*₆, enfatizando a região dos hidrogênios carbinólicos.


Figura S16. Espectro de correlação HMBC do composto ativo obtido em acetona-d₆.



Figura S17. Espectro de correlação HMBC do composto ativo obtido em CD₃OD.



Figura S18. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 12,10.



Figura S19. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 9,08.



Figura S20. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,76.



Figura S21. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,76.



Figura S22. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,62.



Figura S23. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,62.



Figura S24. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,31.



Figura S25. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 7,31.



Figura S26. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_H 7,00 e 7,04.



Figura S27. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 7,00 e 7,04.



Figura S28. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 5,14.



Figura S29. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações do hidrogênio em δ_H 5,14.



Figura S30. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 4,68 e 4,70.



Figura S31. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 4,68 e 4,70.



Figura S32. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em acetona- d_6 , enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_H 3,57 e 3,68.



Figura S33. Ampliação do espectro de correlação HMBC obtido em CD₃OD, enfatizando as correlações dos hidrogênios em δ_{H} 3,57 e 3,68.



Figura S34. Ampliação do espectro de ROESY, destacando as interações existentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. Journal of Natural Products. 2007;70:461–477.

² Harvey, A. L. *Natural products as a screening resource*. Current Opinion in Chemical Biology. 2007;11(5):480-4.

³ Copping, L. G.; Duke, S. O. *Natural products that have been used commercially as crop protection agents.* Pest Management Science. 2007;63:524-554.

⁴ Dayan, F.E.; Cantrell, C.L.; Duke, S. O. *Natural products in crop protection*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009; 17(12):4022-34.

⁵ Duke, S. O. *Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?* Pest Management Science. 2012;68(4):505-12.

⁶ Melo, I. S.; Azevedo, J. L. Controle Biológico - Volume 2. Ed. Embrapa. 2000.

⁷ Zhang, W. J.; Jiang, F. B.; Ou, J. F. *Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus.* Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. 2011;1(2):125-144.

⁸ Geohive. *World Crop Production*. Disponível em: http://www.geohive.com/charts/ag_crops.aspx. Acesso em: 21 de fev. 2015.

⁹ Saxena, S.; Pandey, A. K. *Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001;55:395–403.

¹⁰ Dayan, F. E.; Owends, D. K.; Duke, S. O. *Rationale for a natural products approach to herbicide discovery*. Pest Management Science. 2012;68(4):519-528.

¹¹ Hynes, R. K.; Boyetchko, S. M. *Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations*. Soil Biology and Biochemistry.2006;38(4):845-849.

¹² Lipkus, A. H.; Yuan, Q.; Lucas, K. A.; Funk, S. A.; Bartelt, W. F., III; Schenck, R. J.; Trippe, A. J. *Structural diversity of organic chemistry. A scaffold analysis of the CAS Registry.* The Journal of Organic Chemistry. 2008;73(12):4443-51.

¹³ Henkel, T.; Brunne, R. M.; Muller, H.; Reichel, F. *Statistical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds*. Angewandte Chemie International Edition. 1999;38:643.

¹⁴ Quinn, R. J.; Carroll, A. R.; Pham, N. B.; Baron, P.; Palframan, M. E.; Suraweera, L.; Pierens, G. K.; Muresan, S. *Developing a drug-like natural product library*. Journal of Natural Products. 2008;71(3):464-8.

¹⁵ Vining, L. C. Secondary Metabolism. In: Rehm, H. J.; Reed, G. Biotechnology: A comprehensive treatise in 8 volumes. Weinhein:VCH. 1986:4;19-38.

¹⁶ Takahashi, J. A.; Lucas, E. M. F. *Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica*. Química Nova. 2008;31(7):1807-1813.

¹⁷ Krug, D.; Müller, R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. Natural Product Reports. 2014;31(6):768-783.

¹⁸ Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Romagni, J. G.; Rimando, A. M. *Natural products as sources of herbicides, current status and future trends.* Weed Research. 2000;40:99-111.

¹⁹ Müller, R.; Wink, J. *Future potential for anti-infectives from bacteria - how to exploit biodiversity and genomic potential*. International Journal of Medical Microbiology. 2014;304(1):3-13.

²⁰ Molinari, G. *Impact of microbial natural products on antibacterial drug discovery*. In: Gualerzi, C. O.; Brandi, L.; Fabretti, A.; Pon, C. L. (Ed.). *Antibiotics: targets, mechanisms and resistance*. John Wiley & Sons, 2013.

²¹ Winter, J. M.; Behnken, S.; Hertweck, C. *Genomics-inspired discovery of natural products*. Current Opinion in Chemical Biology. 2011;15(1):22-31.

²² Subramani, R.; Aalbersberg, W. *Culturable rare Actinomycetes: diversity, isolation and marine natural product discovery.* Applied Microbiology and Biotechnology. 2013;97(21):9291-321.

²³ Subramani, R.; Aalbersberg, W. *Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites.* Microbiological Research. 2012;167(10):571-80.

²⁴ Solecka, J.; Zajko, J.; Postek, M.; Rajnisz, A. *Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes*. Central European Journal of Biology. 2012;7(3):373-90.

²⁵ Goodfellow, M. Suprageneric classification of actinomycetes. In: Williams, S. T.; Sharpe, M. E.; Holt, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. New York: Williams & Wilkins. 1989;4.

²⁶ Melo, F. M. P. *Bioprospecção de actinobactérias da rizosfera de milho (Zea mays L.) com atividade antifúngica.* 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

²⁷ González, I.; Ayuso-Sacido. A.; Anderson, A.; Genilloud, O. *Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences.* FEMS Microbiology Ecology. 2005;54(3):401-15.

²⁸ Genilloud. O.; González, I.; Salazar, O.; Martín, J.; Tormo, J. R.; Vicente, F. *Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products.* Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2011;38(3):375-89.

²⁹ Chater, K. F. *Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2006;361(1469):761-8.

³⁰ Procópio, R. E. L.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L.; Araújo, J. M. *Antibiotics produced by Streptomyces*. The Brazilian Journal of infectious diseases. 2012;16(5):466-471.

³¹ Gang, L.; Keith, F. C.; Govind, C.; Guoqing, N.; Huarong, T. *Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in Streptomyces*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2013;77(1):112-143.

³² Grotr, R.; Chen, Y.; Zeeck, A.; Chen, Z.; Zhaner, H.; Mischnick-Lubbecke, P.; Konig, W. A. *Metabolic products of microorganisms. 243. Pyridazomycin, a new antifungal antibiotic produced by Streptomyces violaceoniger.* The Journal of antibiotics. 1988;41(5):595-601.

³³ Razumoviskii, P. N.; Kovalchunk, L. P.; Burtseva, S. A.; Yadivina, V. N. *Biological effect of lipid fractions of Actinomycetes*. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia. 1977:14(3);383-388.

³⁴ Tanaka, Y.; Omura, S. *Agroactive compounds of microbial origin*. Annual Reviews in Microbiology. 1993;47(1)57-87.

³⁵ Dayan, F. E.; Duke, S. O. *Natural Compounds as Next-Generation Herbicides*. Plant physiology. 2014;166(3):1090-1105.

³⁶ Lyndon, J.; Duke, S. O. *Inhibitors of glutamine biosynthesis*. In: Singh, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. CRC Press. 1998.

³⁷ Murakami, T.; Anzai, H.; Imai, S.; Satoh, A.; Nagaoka, K.; Thompson, C. J. *The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hygroscopicus: Molecular cloning and characterization of the gene cluster*. Molecular and General Genetics MGG.1986;205(1):42-53.

³⁸ Omura, S.; Murata, M.; Hanaki, H.; Hinitozawa, K.; Oiwa, R.; Tanaka, H. *Phosalacine, a new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin. Fermentation, isolation, biological activity and mechanism of action.* The Journal of Antibiotics. 1984;37(8):829-835.

³⁹ Nishino, T.; Murao, S.; Hiroshi, W. A. D. A. *Mechanism of inactivation of pyridoxal phosphate-linked aspartate transaminase by gostatin*. Journal of Biochemistry. 1984;95(5):1283-1288.

⁴⁰ Shavit, N.; San Pietro, A. *K*⁺-dependent uncoupling of photophosphorylation by nigericin.
Biochimica et Biophysica Acta. 1987;28:277-283.

⁴¹ Gerwick, B. C.; Fields, S. S.; Graupner, P. R.; Gray, J. A.; Chapin, E. L.; Cleveland, J. A.; Heim, D. R. *Pyridazocidin, a new microbial phytotoxin with activity in the Mehler reaction.* Weed Science. 1997:654-657.

⁴² Kuzuyama, T.; Shimizu, T.; Takahashi, S.; Seto, H. *Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis.* Tetrahedron Letters. 1998;39(43):7913-7916.

⁴³ Kahn, A.; Kannangara, C. G. *Gabaculine-resistant mutants of Chlamydomonas reinhardtii* with elevated glutamate 1-semialdehyde aminotransferase activity. Carlsberg Research Communications. 1987;52(1):73-81.

⁴⁴ Kedy, P.; Bruyant, P.; Balangé, A. P. *Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity by gabaculine*. Phytochemistry. 1994:36(5);1169-1175.

⁴⁵ Price, A. C.; Choi, K. H.; Heath, R. J.; Li, Z.; White, S. W.; Rock, C. O. *Inhibition of* β *ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin structure and mechanism.* Journal of Biological Chemistry. 2001;276(9):6551-6559.

⁴⁶ Siehl, D. L.; Subramanian, M. V.; Walters, E. W.; Lee, S. F.; Anderson, R. J.; Toshi, A. G. *Adenylosuccinate synthetase: site of action of hydantocidin, a microbial phytotoxin.* Plant Physiology. 1996;110(3):753-758.

⁴⁷ Hou, C. X.; Dirk, L. M. A.; Pattanaik, S.; Das, N. C.; Maiti, I. B.; Houtz, R. L.; Williams, M. A. *Plant peptide deformylase: a novel selectable marker and herbicide target based on essential cotranslational chloroplast protein processing*. Plant Biotechnology Journal. 2007;5(2):275-281.

⁴⁸ Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M.; Takeuchi, T. *Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes.* The Journal of Antibiotics. 1976;29(1):97-99.

⁴⁹ Scheible, W. R.; Fry, B.; Kochevenko, A.; Schindelasch, D.; Zimmerli, L.; Somerville, S.; Loria, R.; Somerville, C. R. *An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from Streptomyces species.* The Plant Cell Online. 2003;15(8):1781-1794.

⁵⁰ Planchais, S.; Glab, N.; Inzé, D.; Bergounioux, C. *Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies*. Febs Letters. 2000;476(1):78-83.

⁵¹ Duke, S. O. *Taking stock of herbicide-resistant crops ten years after introduction*. Pest Management Science. 2005;61(3):211-8.

⁵² Mcfadyen, R. E. C. *Biological control of weeds*. Annual Review of Entomology. 1998;43:369-93.

⁵³ Greaves, M. P. *Microbial herbicides - Factors in development*, In Copping, L.G. *Crop protection agents from nature*. 1996:444–467.

⁵⁴ Wolf, D.; Siems, K. Burning the hay to find the needle - data mining strategies in natural product dereplication. CHIMIA. 2007;61(6):339-345.

⁵⁵ Villas-Bôas, S. G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. *Mass spectrometry in metabolome analysis*. Mass Spectrometry Reviews. 2005;24:613-646.

⁵⁶ Cristoni, S.; Bernardi, L. R. *Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules*. Mass Spectrometry Reviews. 2003;22(6):369-406.

⁵⁷ 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*. Current Opinion in Microbiology. 2008;11:233-239.

⁵⁸ Konishi, Y.; Kiyota, T.; Draghici, C.; Gao, J. M.; Yeboah, F.; Acoca, S.; Jarussophon, S.; Purisima, E. *Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products*. Analytical Chemistry. 2007;79:1187-1197.

⁵⁹ Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M.; Constant, H. L.; Chai, H. B.; Fang, L.; Seo, E. K.; Long, L.; Cui, B.; Barillas, K. S. *The dereplication of plantderives natural products*, In Atta – ur – Rahman, Studies in Natural Products Chemistry. 1997;19:749–791.

⁶⁰ Constant, H. L.; Beecher, C. W. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. Natural Product Letters. 1995;6:193–196.

⁶¹ Buss, A. D.; Butler, M. S. *A New Model for Utilising Chemical Diversity from Natural Source*. Drug Development Reserch. 2004;62:362–370.

⁶² Hoffmann, E. *Tandem mass spectrometry: a primer*. Journal of Mass Spectrometry. 1996;31(2):129-137.

⁶³ Ghisalberti, E. L. *Detection and isolation of bioactive natural products*. In: Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. (Ed.). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. CRC press, 2008:11-76.

⁶⁴ Bucar, F.; Wube, A.; Schmid, M. *Natural product isolation-how to get from biological material to pure compounds*. Natural Product Reports. 2013;30(4):525-45.

⁶⁵ Dinan, L. *Dereplication and Partial Identification of Compound*, In: Sarker, S. D.; Latif, Z.; Gray, A. I. *Natural Products Isolation*. Humana Press. 2000:297–322.

⁶⁶ Strobel, G. A. *Bacterial phytotoxins*. Annual Review of Microbiology. 1977;31:205–224.

⁶⁷ Vyvyan, J. R. *Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals*. Tetrahedron. 2002;58(9):1631-1646.

⁶⁸ Heisey, R. M.; Mishira, S. K.; Putnam, A. R.; Miller, J. R.; Whitenack, C. J.; Keller, J. E.; Huang, J. *Production of herbicidal and insecticidal metabolites from soil microorganisms*. In: CUTLER, H. G. (Ed.). *Biologically active natural products: potential use in agriculture*. Washington, DC: American Chemical Society, 1988.

⁶⁹ Wang, W. *Literature Review on Duckweed Toxicity Testing*. Environmental Research. 1990;52:7–22.

⁷⁰ Kovacevic, G.; Jelencic, B.; Kalafatic, M.; Ijubesic, N. *Chlorella test*. Periodicum Biologorum. 2008;110(4):373-374.

⁷¹ Fortún, S. S.; Marvá, F.; D'ors, A. Inhibition of growth and photosynthesis of selected green microalgae as tools to evaluate toxicity of dodecylethyldimethyl-ammonium bromide. Ecotoxicology. 2008;17:229-234.

⁷² Nicolas, G. G.; Hiroyuki, N. *Growth and photosynthesis inhibition by agricultural pesticides in three freshwater microalgae*. Fisheries Science. 2002;68:144-151.

⁷³ Ma, J.; Xu, L.; Wang, S.; Zheng, R. Z.; Jin, S.; Huang, S.; Huang, Y. *Toxicity of 40 herbicides to the green alga chlorella vulgaris*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2002;51:128-132.

⁷⁴ Murkowski, A.; Skórska, E. *Effect of* $(c_6h_5)_3pbcl$ and $(c_6h_5)_3sncl$ on delayed luminescence intensity, evolving oxygen and electron transport rate in photosystem ii of chlorella vulgaris. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2010;84:157-160.

⁷⁵ Magnusson, M.; Heimman, K.; Negri, A. P. *Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae*. Marine Pollution Bulletin. 2008;56:1545-1552.

⁷⁶ Jansen, M. S.; Altenburger, R. *The use of pulse-amplitude modulated (pam) fluorescencebased methods to evaluate effects of herbicides in microalgal systems of different complexity.* Toxicological & Environmental Chemistry. 2007;89:665-681. ⁷⁷ Stefano, S.; Giancarlo, A.; Anna, P. C.; Christopher, D. S.; Heathcote, P.; Felix, B.; Michael, C. W. E.; Robert C. J.; Donatella, C. *Clorophyll triplet states associated with photosystem i and photosystem ii in thylakoids of the green alga chlamydomonas reinhardtii.* Biochimica et Biophysica Acta. 2007;1767:88-105.

⁷⁸ Trebst, A.; Depka, B.; Johannes, J.; Oettmeier, W. *Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in chlamydomonas reinhardtii.* Pest Management Science. 2004;60:669-674.

⁷⁹ Guanson, N. G.; Nakahara, H. *Growth and photosynthesis inhibition by agricultural pesticides in three freshwater microalgae.* Fisheries Science. 2002;68:144-151.

⁸⁰ Bonilla, S.; Conde, D.; Blanck, H. *The photosynthetic responses of marine phytoplankton, periphyton and epipsammon to the herbicides paraquat and simazine*. Ecotoxicology. 1998;7:99-105.

⁸¹ American Society for Testing and Materials (1993) "Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba*". In: Annual Book of ASTM Standards: American Society for Testing and Materials, Philasdephia, PA, p. 1232.

⁸² Cañizares-Villanueva, R. O.; Martínez-Jerónimo, F.; Espinoza-Chávez, F. *Environmental Toxicology*. 2000;15:160-164.

⁸³ Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*.
John Wiley & Sons, 2011.

⁸⁴ *Efeito rizosfera: Simbiose entre raízes de plantas e bactérias*. Disponível em:<http://www.educacaopublica.rj.gov.br/biblioteca/biologia/0026.html/>. Acesso em: 15 jun. 2015.

⁸⁵ Bais, H. P.; Weir, T. L.; Perry, L. G.; Gilroy, S.; Vivanco, J. M. *The role of root exudates in rhizosphere interations with plants and other organisms*. Annual Review of Plant Biology. 2006;57:233-266.

⁸⁶ Gorlach-Lira, K.; Coutinho, HDM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2007;38:135-141.

⁸⁷ Romeiro, R. S. *Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas*. Mimeografado.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia – UFV. 1996:11.

⁸⁸ Abreu, M. M. V.; Tutunji, V. L. *Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB*. Universitas: Ciências da Saúde. 2004;02(02):236.

⁸⁹ Simione, F. P. Cryopreservation Manual. Nalge Nunc International Coorp. 1998.

⁹⁰ Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. In *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed. 2012;964.

⁹¹ Vandermolen, K. M.; Raja, H. A.; El-Elimat, T.; Oberlies, N. H. *Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program.* AMB Express. 2013;3:71-77.

⁹² Martinez, A. F. C. Aplicação da espectrometria de massas na desreplicação de extratos brutos produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera do milho (Zea mays L.). 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

⁹³ Petta, T. Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

⁹⁴ Peti, A. P. F. Aplicação da espectrometria de massas na identificação de compostos antituberculose produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

⁹⁵ Rioboo, C.; González, O.; Herrero, C.; Cid, A. *Physiological response of freshwater microalga (Chlorella vulgaris) to triazine and phenylurea herbicides.* Aquatic Toxicology. 2002;59:225-235.

⁹⁶ Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. *Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular*. Química Nova. 2008;29:287-292.

⁹⁷ Lang, S. *Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2002;7:12–20.

⁹⁸ Kowall, M.; Vater, J.; Kluge, B.; Stein, T.; Franke, P.; Ziessow, D. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by Bacillus subtilis OKB 105. Journal of Colloid and Interface Science. 1998;204(1):1-8.

⁹⁹ Kluge, B.; Vater, J.; Salnikow, J.; Eckart, K. *Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis ATCC 21332.* FEBS Letters. 1988;231(1):107-10.

¹⁰⁰ Hue, N.; Serani, L.; Laprevote, O. *Structural investigation of cyclic peptidolipids from Bacillus subtilis by high energy tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2001;15:203–209.

¹⁰¹ Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S. *Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático*. Química Nova. 2008;31(3):669-675.

¹⁰² Barros, F. F. C., et. al. Surfactina: propriedades química, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Química Nova. 2007;30(2):409-414.

¹⁰³ Vollenbroich, D.; Özel, M.; Vater, J.; Kamp, R. M.; Pauli, G. *Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from Bacillus subtilis.* Biologicals. 1997;25(3):289-97.

¹⁰⁴ Stein, T. *Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions.* Molecular Microbiology. 2005;56(4):845-57.

¹⁰⁵ Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.V.; Eberlin, M.N.; Höehr, N.F.; Pastore, G.M. *Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by Bacillus subtilis on cassava wastewater medium.* Food Science and Biotechnology. 2004;13(5),591-596.

¹⁰⁶ Costa, G. A. N. *Produção biotecnológica de surfactante de Bacillus subtilis em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.* Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

¹⁰⁷ Hussain, A.; Arnold, J. J.; Khan, M. A.; Ahsan, F. *Absorption enhancers in pulmonary protein delivery*. Journal of Controlled Release. 2004;94(1):15-24.

¹⁰⁸ Actinomicina D. Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciências e Tecnologia.
 Disponível em:<http://www2.dq.fct.unl.pt/cadeiras/qpn1/molweb/2003/ActinomicinaD/>.
 Acesso em: 20 set. 2014.

¹⁰⁹ Liu, W. C.; Lu, Y. Y.; Yang, Z. Z.; Xing, Y. Y.; Xi, T. *Rapid screening and characterization of metabolites from a marine-derived actinomycete by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2010;24:3413–3418.

¹¹⁰ Waksman, S. A. *Actinomycin-nature, formation and activities*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1968.

¹¹¹ Metzger, M. L.; Dome, J. S. *Current therapy for Wilms' tumor*. Oncologist. 2005;10(10):815-26.

¹¹² Turan, T.; Karacay, O.; Tulunay, G.; Boran, N.; Koc, S.; Bozok, S.; Kose, M. F. *Results with EMA/CO (etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, vincristine) chemotherapy in gestational trophoblastic neoplasia.* International Journal of Gynecological Cancer. 2006;16(3):1432-8.

113NucleicAcid-DrugInteractions.Disponívelem:<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions/>.Acessoem: 12 dez.2014.

¹¹⁴ Imamichi, T.; Murphy, M. A.; Adelsberger, J. W.; Yang, J.; Watkins, C. M.; Berg, S. C.; Baseler, M. W.; Lempicki, R. A.; Guo, J.; Levin, J. G.; Lane, H. C. *Actinomycin D induces high-level resistance to thymidine analogs in replication of human immunodeficiency virus type 1 by interfering with host cell thymidine kinase expression*. Journal of Virology. 2003;77(2):1011-20.

¹¹⁵ Kavitha, A.; Vijayalakshmi, M. *Influence of cultural conditions on the production of bioactive metabolites by Streptomyces tendae TK-VL_333*. Research Journal of Biotechnology. 2009;4(4):56-64.

¹¹⁶ *O que são as terras raras*? Disponível em:<http: www.ecycle.com.br/component/content/article/63-meio-ambiente/1912-o-que-sao-as-terrasraras-e-o-porque-do-interesse-do-brasil-nelas.html>. Acesso em: 27 jun. 2015. ¹¹⁷ Ochi, K.; Tanaka, Y.; Tojo, S. Activating the expression of bacterial cryptic genes by rpoB mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2014;41(2):403-14.

¹¹⁸ Kawai, K.; Wang, G.; Okamoto, S.; Ochi, K. *The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in Streptomyces spp.* FEMS Microbiology Letters. 2007;274(2):311-5.

¹¹⁹ Atkinson, D. J.; Brimble, M. A. *Isolation, biological activity, biosynthesis and synthetic studies towards the rubromycin family of natural products.* Natural Product Reports. 2015;32(6):811-40.

¹²⁰ Brasholz, M.; Sörgel, S.; Azap, C.; Reissig, H.-U. *Rubromycins: Structurally Intriguing, Biologically Valuable, Synthetically Challenging Antitumour Antibiotics*. European Journal of Organic Chemistry. 2007:3801–3814.

¹²¹ Brockmann, H.; Lenk, W.; Schwantje, G.; Zeeck, A. Tetrahedron Lett. 1966;7:3525–3530.

¹²² Puder, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Zeeck, A. *Structural and Biosynthetic Investigations of the Rubromycins*. European Journal of Organic Chemistry. 2000;5:729–735.

¹²³ Ueno, T.; Takahashi, H.; Oda, M.; Mizunuma, M.; Yokoyama, A.; Goto, Y.; Mizushina, Y.; Sakaguchi, K.; Hayashi, H. *Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety*. Biochemistry. 2000;39(20):5995-6002.

¹²⁴ Goldman, M. E.; Salituro, G. S.; Bowen, J. A.; Williamson, J. M.; Zink, D. L.; Schleif, W. A.; Emini, E. A. *Inhibition of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase activity by rubromycins: competitive interaction at the template. primer site.* Molecular Pharmacology. 1990;38(1):20-5.

¹²⁵ Griseorhodin A. Dictionary of natural products. Disponível em:<http://dnp.chemnetbase.com/AAA00.entry?parentCHNumber=CJV06&exno=CJV06/>.
Acesso em: 10 out. 2014.

¹²⁶ Shaaban, K. A.; Stamatkin, C.; Damodaran, C.; Rohr, J. *11-Deoxylandomycinone and landomycins X-Z, new cytotoxic angucyclin(on)es from a Streptomyces cyanogenus K62 mutant strain.* The Journal of Antibiotics. 2011;64:141–150.

¹²⁷ Kharel, M. K.; Pahari, P.; Shepherd, M. D.; Tibrewal, N.; Nybo, S. E.; Shaaban, K. A.; Rohr, J. *Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis.* Natural Product Reports. 2012;29:264–325.

¹²⁸ Shaaban, K. A.; Srinivasan, S.; Kumar, R.; Damodaran, C.; Rohr, J. Landomycins, P.-W. Cytotoxic angucyclines from Streptomyces cyanogenus S-136. Journal of Natural Products. 2011,74, 2–11.