UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de micro-organismos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Rita de Cássia Pessotti Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/12/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pessotti, Rita de Cássia

Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de microorganismos. Ribeirão Preto, 2016. 177 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos. Orientador: Pupo, Mônica Tallarico.

1. Produtos naturais 2. Compostos bioativos 3. Actinobactéria 4. Interações microbianas 5. Metagenômica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Rita de Cássia Pessotti

Título do trabalho: Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de micro-organismos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos. Orientador(a): Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Aprovado em:____/__/___

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, que desenvolveram em mim o gosto pela educação e conhecimento, além de terem sempre proporcionado o ambiente ideal para que eu pudesse focar no trabalho desenvolvido.

Agradecimento

À Universidade de São Paulo pelo ensino gratuito e de qualidade desde a minha graduação em Ciências Biológicas, e pelas excelentes oportunidades que me proporcionou.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial ao corpo docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas, pela formação multidisciplinar e de excelência.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e ao corpo docente do Departamento de Biologia, pela excelente formação proporcionada como bióloga.

Às agências de fomento à pesquisa que financiaram o presente trabalho: FAPESP (bolsa de doutorado direto processo 2011/12910-6), Ciências sem Fronteiras (bolsa CNPq processo 246937/2012-2), CNPq, CAPES, aos projetos multidisciplinares INCT-INBEQMeDI (processo 2008/57910-0), CEPID-CIBFAR (processo 2013/07600-3) e FAPESP/FIC-NIH (processo 2013/50954-0), e ao auxílio regular Biota-Micro-organismos (processo 2011/50869-8).

Aos meus pais, Sandra e José, os grandes responsáveis por chegar onde estou hoje. Por todo o apoio, cuidados e amor incondicionais. Por terem me proporcionado uma excelente educação e muitas oportunidades privilegiadas em minha vida.

À Profa. Mônica T. Pupo pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e me orientar desde a minha iniciação científica. Pela sua compreensão e respeito à minha formação em biologia, por me ensinar sempre com muita paciência e clareza a química de produtos naturais, e ter me proporcionado as melhores oportunidades acadêmicas e de crescimento profissional. Por ser um exemplo de como trabalhar com ética, seriedade, paixão e dedicação, sem deixar de lado a vida pessoal.

Ao Prof. Jon Clardy, por ter visto potencial em mim e ter me proporcionado a melhor oportunidade acadêmica de minha vida, e sempre estar disponível para me ajudar.

Ao Prof. Roberto Kolter por ter me aceitado e recebido de forma calorosa em seu grupo de pesquisa para que eu pudesse desenvolver parte do meu projeto. Por ter me mostrado que excelência acadêmica pode andar lado a lado com humildade, descontração, amizades e enriquecimento da vida pessoal. Por sempre valorizar e ensinar a verdadeira beleza da Ciência, estimulando o olhar curioso, amplo e crítico em meus experimentos. Por mostrar a importância do balanceamento entre a vida profissional e pessoal. *Being at his lab was a life-changing experience. I am very fortunate that I had the oportunity to met this unique person*!

Ao Prof. Matthew Traxler, por ter sido um mentor excepcional. Por ter me ensinado de forma descontraída e ao mesmo tempo com muita seriedade a como trabalhar e amar as temperamentais actinobactérias. Por reforçar em mim a importância de manter a biologia e a química andando lado a lado, e ser um exemplo claro de que biólogos podem e devem desbravar o mundo do metabolismo secundário microbiano.

À Profa. Denise Oliveira Guimarães, por ter me iniciado no mundo dos cultivos, extrações e análises químicas, sempre com muita clareza, dedicação, humildade e amizade.

À querida amiga Cláudia Castania de Macedo, por todo apoio oferecido não apenas com as técnicas dentro do laboratório, mas também em minha vida pessoal. Pelas inúmeras conversas e sorrisos diários que deixaram meu doutorado mais leve.

Aos queridos amigos do LQMo e agregados, pela excelente convivência, amizade, conversas, conselhos, desabafos. Pela paciência com minhas perguntas infinitas sobre o mundo da química. Por me ensinarem diversas técnicas e a manusear equipamentos que eu morria de medo. Vocês tornaram meu dia-a-dia muito melhor. Amo estar no laboratório com vocês, e isso fez toda diferença para o desenvolvimento deste projeto! Sentirei saudades eternas dos momentos compartilhados com vocês!

Aos amigos da 42^a turma de biologia da FFCLRP-USP por terem papel importante desde o início da minha vida acadêmica e pela amizade que levarei pela vida.

Esta tese não foi desenvolvida sozinha - é o resultado de muita aprendizagem com todos que convivi e tudo que vivenciei ao longo dos últimos cinco anos. Obrigada a todos que passaram em meu caminho, todos vocês tiveram uma contribuição direta ou indireta neste processo!



"Why am I willing to lose sleep over some of these painful facets intrinsic to the pursuit of science in the 21st century? Because in the end, there is nothing I would rather be doing than to have the opportunity to explore the unknown" (Kolter, 2012)

RESUMO

PESSOTTI, R. C. **Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de micro-organismos**. 2016. 177f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A crescente resistência dos micro-organismos patogênicos aos fármacos já existentes gera intensa demanda por novos agentes terapêuticos. Em contrapartida, a eficiência na descoberta de compostos com novas estruturas químicas diminuiu nos últimos anos. Tendo em vista a vasta biodiversidade existente de micro-organismos, a redução da eficiência na descoberta de novos produtos naturais não indica que todos compostos existentes já foram descritos, mas sim que as metodologias para isolamento dos mesmos devem ser aperfeiçoadas e diversificadas, e novos nichos devem ser explorados. Esta tese compreende três capítulos, que trazem abordagens que podem ser utilizadas na busca por produtos naturais. O capítulo 1 aborda a aplicação de conhecimentos de biologia molecular na pesquisa de produtos naturais, através da metagenômica. O capítulo 2 aborda o conceito de química ecológica para estimular o metabolismo secundário, através da utilização de interações microbianas. O capítulo 3 aborda o uso de genome mining para entender a capacidade metabólica de uma linhagem bacteriana, bem como o uso de variações nos parâmetros da cultura para alterar o metabolismo desta. Metagenômica: a triagem anti-parasitária das bibliotecas metagenômicas detectou clones bioativos contra Leishmania major. As análises químicas e biológicas das culturas destes clones não permitiram a identificação dos compostos responsáveis pelas atividades observadas. Esta abordagem apresenta grandes desafios técnicos e tem passado por ajustes envolvendo sequenciamento e bioinformática para aumentar a taxa de sucesso em seu uso. Interações microbianas: esta metodologia mostrou-se promissora para a busca por compostos bioativos, tendo em vista que diversos pares exibiram nova atividade antibiótica, corroborando a hipótese que interações microbianas podem levar à expressão diferenciada do metabolismo secundário. Foi escolhida para caracterização química e biológica a interação entre uma actinobactéria rara (Krasilnikovia sp. T082) e uma actinobactéria endossimbionte de besouro (Streptomyces sp. SPB78). Esta interação é robusta e estimula a biossíntese de um antibiótico polar capaz de inibir o crescimento de uma bactéria multirresistente. Diversas técnicas foram testadas para o isolamento do composto indutor e do antibiótico induzido. Este processo foi desafiador devido ao caráter polar de ambos compostos e pelo fato da atividade antibiótica ser instável. Foi demonstrado que o antibiótico induzido é capaz de inibir o crescimento do micro-organismo indutor, sugerindo importância ecológica deste composto. A utilização desta abordagem metodológica permitiu a identificação de uma linhagem pertencente a um gênero de actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo secundário estudado (Krasilnikovia). Isto foi realizado através da investigação de seu genoma e também através do isolamento de compostos produzidos por esta linhagem. Esta linhagem demonstrou potencial para a produção de metabólitos secundários, apresentando pelo menos 21 potenciais clusters gênicos biossintéticos detectados pelo antiSMASH em seu genoma. Esta linhagem foi cultivada em dois meios de cultura (ISP2 e TSB) e diferentes metodologias de extração foram empregadas. O metabolismo secundário desta linhagem é expresso de maneira diferente de acordo com a metodologia de cultivo, evidenciando a importância da variação da composição do meio de cultura para o acesso da real capacidade metabólica de microorganismos. Foram identificadas algumas dicetopiperazinas, que são conhecidas por seu amplo espectro de atividades biológicas, e três compostos pertencentes a uma classe de peptídeos nãoribossomais não usuais com atividade antibiótica, que possuem estrutura química complexa e incomum para produtos naturais.

Palavras-chave: Produtos naturais. Compostos bioativos. Actinobactéria. Interações microbianas. Metagenômica.

ABSTRACT

PESSOTTI, R. C. **Chemical-biological study of microbial secondary metabolism**. 2016. 177p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Increasing drug resistance among microbial pathogens is a public health threat; therefore, new antibiotics are needed. On the other hand, the rate of discovering new compounds has diminished. Considering the wide biodiversity of microorganisms, reduced efficiency on the discovery of new natural products does not indicate that all existing compounds have been described, but that methods for isolation should be improved and diversified and new niches should be explored. This thesis comprises three chapters that demonstrate approaches that can be used in the search for natural products. Chapter 1 demonstrates the application of molecular biology tools on the search for natural products through metagenomics. Chapter 2 discusses the concept of chemical ecology for the stimulation of secondary metabolism by the use of microbial interactions. Chapter 3 discusses the use of genome mining to understand the metabolic capacity of a bacterial strain as well as the use of different culture parameters to alter bacterial metabolism. The anti-parasitic metagenomic screening on metagenomic libraries detected bioactive clones against L. major. Chemical and biological analysis of cultures of these clones did not permit identifying the compounds responsible for the observed activities. This approach faces diverse technical challenges and is currently being improved by the use of sequencing and bioinformatics analysis in order to increase its hit rate. Microbial interactions: this approach has shown to be promising in the search for bioactive compounds, considering that several pairs exhibited new antibiotic activity, supporting the hypothesis that microbial interactions can stimulate differential expression of secondary metabolism. It was chosen for chemical and biological characterization the interaction between a rare actinobacteria (Krasilnikovia sp. T082), which belongs to a genus that its secondary metabolism has not yet been studied in the literature, and an endosymbiont actinobacteria of beetle (Streptomyces sp. SPB78). This interaction is robust and stimulates the biosynthesis of a polar antibiotic capable of inhibiting the growth of multi-resistant bacteria. Several techniques have been tested for the isolation process of the inducer compound and the induced antibiotic. This process has been particularly challenging due to the polar character of both compounds, and because the antibiotic activity is unstable. It has been shown that the induced antibiotic is capable of inhibiting the growth of the inducer microorganism, suggesting an ecological importance of this compound. The use of this co-culture approach led to the identification of a strain belonging to a rare actinobacteria genus whose secondary metabolism has never been studied before (Krasilnikovia). This was accomplished through sequencing and analysis of its genome and also by isolating compounds produced by this strain (chapter 3). This strain has shown great potential for the production of secondary metabolites, exhibiting at least 21 biosynthetic gene clusters detected by antiSMASH in its genome, and only four of them showed high similarity to any known gene cluster. This strain was cultured in two different culture media (ISP2 and TSB), and different methods of extraction were used. The secondary metabolism of this strain is expressed differently according to the method of cultivation, showing the importance of variation in the composition of the culture medium to access the actual metabolic capacity of microorganisms. Some diketopiperazine were isolated, which are known for their wide spectrum of biological activities, and also three compounds belonging to a class of non-ribosomal peptides known for their high bioactivity, which have complex and unusual chemical structures for natural products.

Keywords: Natural products. Bioactive compounds. Actinobacteria. Microbial interactions. Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de compostos bioativos que foram isolados empregando-s triagem fenotípica/funcional: aminas de cadeia longa N-aciladas, antibiótic
indólico, violaceina, índigo, nocardamina, patelamida D, metatricicloeno Figura 2: Mapa do cosmídeo selecionado para as bibliotecas metagenômica
deste trabalho
Figura 3: A: Exemplo de clones que não apresentaram atividade contra <i>L. majo</i> B: exemplo de um clone que apresentou halo de inibição contra <i>L. major</i> . C colônia sem atividade vista em microscópio (100 x). D: colônia com halo c inibição vista em microscópio (100 x), comprovando a ausência de parasita Clones em hospedeiro <i>E. coli</i> da biblioteca de Mata Atlântica
Figura 4: Fotos retiradas de CCDA feita com os extratos brutos de acetato o etila do controle (letra C nas placas) e três dos clones bioativos contra <i>L. majo</i> (23, 24 e 29). Fase móvel utilizada: Hex:AcOEt 1:1. A: análise sob luz UV de 254 nm. B: análise sob luz UV de 365 nm. C: análise após revelação com vanilir sulfúrica seguida de aquecimento
Figura 5 : Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extrato brutos de acetato de etila do controle (A) e dos seis clones bioativos contra <i>major</i> (B-G). Foi utilizada coluna de fase reversa C ₁₈ e gradiente de fase móve crescente de 10% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 30 min com vazã de 1 mL/min. Foram injetados 20 μ L de cada extrato (1 mg/mL) solubilizado em H ₂ O:ACN (1:1)
Figura 6: Cromatogramas dos extratos de acetato de etila do controle pJSS (A e do clone 24 (B), obtidos em análise pelo equipamento API 1200L <i>Quadrupo</i> MS/MS – Varian, utilizando gradiente de fase móvel crescente de 10% a 97% o metanol (MeOH) em água (suplementada com 10 mM de acetato de amônio) en 35 min com vazão de 1 mL/min, utilizando coluna Luna Phenomenex [®] C ₁₈ 250 4.6 mm 5 um
Figura 7: Espectro de massas dos extratos de acetato de etila do controle pJS (A) e do clone 24 (B), obtidos em análise pelo equipamento API 1200 <i>Quadrupole</i> MS/MS – Varian, utilizando inserção direta e ionização po eletrospray. A análise foi feita em modo positivo
Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extrato brutos de acetato de etila do controle (A, C) e clone 24 (B, D) ambos em pequer (A, B) e grande escala (C, D). Foi utilizada coluna de fase reversa C ₁₈ e gradiem de fase móvel crescente de 10% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 3
min (vazão de 1 mL/min). Foram injetados 20 μ L de cada extrato (1 mg/mI solubilizados em H ₂ O:ACN (1:1)
Figura 9: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extrato brutos de acetato de etila do controle (A) e clone 24 (B). Foi utilizada coluna o fase reversa C ₁₈ e fase móvel isocrática de 20% de acetronitrila em água (vaza de 1 mL/min). Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 mg/mL) solubilizado cm H O: A CN (1:1)
CIII 1120.ACIN (1.1).

Figura 10: Cromatogran extratos brutos dos culti acetato de etila (A) e de C ₆ –Fenil e gradiente de água em 34 min (vazão o mg/mL) solubilizados er	mas obtidos por HPLC-DAD (λ 220 nm) da análise dos vos em meio sólido do controle pJSS e do clone 24 de e MeOH+H ₂ O (B). Foi utilizada coluna de fase reversa fase móvel crescente de 5% a 100% de acetonitrila em de 1 mL/min). Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 m H ₂ O:ACN (1:1).
Figura 11 : Foto de gel etídio. Foram aplicados restrição HINDIII do co clones bioativos 23, 24, 2 gentilmente cedida pela	de eletroforese em agarose 1% corado com brometo de os produtos de digestão enzimática com a enzima de osmídeo controle pJSS e dos cosmídeos referentes aos 29, 30, 36 e 67. MW: padrão de peso molecular. *imagem Profa. Izaltina Silva-Jardim.
Figura 12: Resultado do de etila (A), metanol (B) Figura 13: Resultado do 24, 29 e controle pJSS	teste de atividade contra <i>L. major</i> dos extratos de acetato e n-butanol (C) dos clones 24, 29 e controle pJSS teste de atividade contra <i>L. major</i> dos fluidos dos clones
Figura 14: Estrutura qui	ímica da piplartina
Figura 15: Cromatogra acetato de etila dos seg controle <i>R. metalliduran</i> piplartina (meio LB/tetr utilizada: gradiente creso ambos com 1% de ácid Foram injetados 5 µL de (1:1)	mas obtidos por UHPLC -EM dos extratos brutos de guintes cultivos: A: clone R_CA20 com piplartina; B: ns/pJSS com piplartina; C: controle da estabilidade da caciclina + piplartina); D: clone R_CA20. Fase móvel cente de 10% a 100% em 4 min de acetonitrila em água, o acético (v/v), vazão de 0,3 mL/min, em coluna C ₁₈ . e cada extrato (0,1 mg/mL) solubilizados em H ₂ O:ACN
Figura 16: Espectros ol (A) e 3,10 min (B) na ar etila do cultivo do clor biotransformação da pi visualizado em 2,42 min	btidos por MS/MS dos picos visualizados em 2,84 min nálise por UHPLC-EM dos extratos brutos de acetato de ne R_CA20 com piplartina, sendo A e B produtos de plartina. O espectro C refere-se ao MS/MS do pico n (piplartina) no controle de estabilidade da piplartina
Figura 17: Fragmentaçã Figura 18: Gel de eletr isolado. A: marcador mo	oforese (1% agarose, corado com GelRed [®]) do e DNA plecular. B: e DNA purificado.
Figura 19: Diversidade	taxonômica presente no <i>e</i> DNA isolado e sequenciado
Figura 20: Exemplos de co-cultura.	e compostos que foram isolados utilizando a técnica de
Figura 21: Exemplos de	e compostos isolados de actinobactérias endofíticas
Figura 22: Árvore fil sequenciamento parcial sequências mais similare e, utilizando <i>Pseudomo</i> árvore foi construída uti modelo Jukes-Cantor co serem evolutivamente im 1000 análises) acima de	ogenética construída com as sequências obtidas no do gene 16S rRNA das linhagens endofíticas e com as es encontradas nos bancos de dados GenBank e EzTaxon- mas aeruginosa (KX548262) como grupo externo. A lizando o método de <i>Maximum Likelihoood</i> baseado no om distribuição discreta Gamma permitindo alguns sites relevantes (método JC+G+I). Valores de <i>bootstrap</i> (com 50% estão listados na árvore.
Figura 23: Interações er Quadrados vermelhos in	ntre as diversas linhagens de actinobactérias endofíticas. dicam que houve inibição do crescimento da colônia

Figura 24: Interações entre as diversas linhagens de actinobactérias endofíticas. Ouadrados vermelhos indicam que houve inibicão do crescimento de hifas aéreas da colônia. Quadrados verdes indicam que houve indução do crescimento de hifas aéreas da colônia. 57 Figura 25: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 1 = RTd 1). As linhagens RTd 1 e RTd 19 têm seu crescimento inibido por várias outras linhagens..... 57 Figura 26: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 4 = RTd 4). A linhagem RTd 4 inibe o crescimento e formação de hifas aéreas de várias outras linhagens. **58** Figura 27: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 11 = RTd 11). A linhagem RTd 11 estimula o crescimento de hifas aéreas nas linhagens RTd 7 e RTd 23, mas inibe o crescimento destas na linhagem RTd 15..... **58** Figura 28: Exemplo de interação em que o halo de inibição contra P. syringae é aumentado devido a presença de outra linhagem (A) e o controle negativo deste experimento (B). Os cortes no ágar foram feitos para evitar a interação entre colônias como controle negativo para o fenômeno observado. 61 Figura 29: Cultivos simples e co-cultura das linhagens RTd 5 e RTd 8 (R2YE+Fe, 30 °C, 8 dias). As três culturas foram sobrepostas no sétimo dia com uma camada de meio LB *soft*-ágar contendo *S. aureus*..... 62 Figura 30: Co-cultura das linhagens RTd 5 e RTd 8 (R2YE+Fe, 30 °C, 7 dias). O ágar foi cortado para evitar interação entre as colônias como controle negativo para o fenômeno observado. Pode-se notar a influência da presenca da linhagem RTd 5 na produção de pigmento escuro pela linhagem RTd 8..... 62 Figura 31: Rede molecular construída com dados obtidos da análise por nanoDESI das linhagens selecionadas cultivadas de maneira simples e pareadas (R2YE+Fe, 30 °C, 5 dias). Verde: exclusivo RTd 5 e inibido em co-cultura; Azul: exclusivo RTd 8 e inibido em co-cultura; Roxo: produzido por ambas linhagens; Vermelho: exclusivo RTd 5 e 8 em co-cultura; Rosa: produzido tanto em cultivo puro quanto em co-cultivo. Tamanho dos nodos (clusters) refletem o número de espectros adquiridos para o composto em questão. 63 Figura 32: Espectro de massas correspondente a um nodo (cluster) da rede molecular que representa um íon detectado apenas em co-cultura e em duplicata (*m*/*z* 285.94)..... 64 Figura 33: Linhagem Amycolatopsis sp. AA4 estimulou o crescimento da linhagem Asanoa sp. T033 (meio R2YE+ferro, 30 °C, 7 dias). A) Asanoa sp. T033 em cultivo puro. B) Co-cultura entre Asanoa sp. T033 e Amycolatopsis sp. AA4. C) Asanoa sp. T033 em cultivo puro crescendo em meio de cultura em que foi adicionado o sobrenadante filtrado de uma cultura em meio líquido de Amycolatopsis sp. AA4..... 66 Figura 34: Linhagem Krasilnikovia sp. T082 cultivada isoladamente (A) e em interação com a linhagem Streptomyces sp. SPB78 (B), em meio de cultura TSA 0.5x (7 dias, 30 °C). Em ambos os casos a cultura foi coberta com uma camada de LB soft-ágar inoculado com a linhagem Amycolatopsis sp. AA4 após 7 dias. (B) mostra o halo de inibição contra Amycolatopsis sp. AA4 nas colônias mais próximas de *Streptomyces* sp. SPB78..... **67**

Figura 35: A: Linhagem Krasilnikovia sp. T082 cultivada isoladamente por 6 dias, sobreposta com Amycolatopsis sp. AA4 e incubada por mais um dia. Não foi observado halo de inibição. B: Linhagem Krasilnikovia sp. T082 cultivada isoladamente por 4 dias, 40 µL de filtrado foram adicionados e a placa incubada por mais dois dias e então sobreposta com Amycolatopsis sp. AA4 e incubada por mais um dia. Amvcolatopsis sp AA4 não foi capaz de crescer, indicando a produção do composto antibiótico. C: Apenas filtrado adicionado ao meio de cultura, que foi incubado por 6 dias, sobreposto com Amycolatopsis sp. AA4 e incubado por mais um dia, como controle negativo para a atividade observada em (B). 68 Figura 36: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD da amostra com atividade indutora em coluna HILIC-Diol, após limpeza com resinas XAD-4 e XAD-16. As marcações no cromatograma indicam as frações coletadas. Vazão: 4mL/min. Gradiente (ACN:H₂O): 2 min em 90%, 90-85% em 3 min, 9 min em 85 %, 85-50% em 2 min, 4 min em 50%, 50-20% em 1 min, 5 min em 20%, 20-90% em 2 min, 5 min em 90%..... 69 Figura 37: Atividade contra Amycolatopsis sp. AA4 observada quando a fração F3 6 foi testada, com respectivos controles positivo (amostra pré-fracionamento) e negativo (apenas solvente foi adicionado à cultura). 70 **Figura 38:** Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD-ELSD (λ 190 nm) analítico da amostra com atividade indutora F3 6 em coluna HILIC-Diol (10 cm x 4,6mm, 2,6 µm). Vazão: 0,85 mL/min. Gradiente (ACN:H₂O): 85% por 2 70 minutos, 85-65% em 6 minutos, 65% por 6 minutos..... **Figura 39:** Espectro de RMN de ¹H (D_2O_2 , 500 MHz) da amostra F3 6, que apresenta atividade indutora da atividade antibiótica observada em Krasilnikovia 71 sp. T082..... Figura 40: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD (λ 190 nm) semipreparativo da amostra com atividade indutora F3 6 em coluna HILIC-Diol (250 mm x 10mm, 5 µm). Gradiente (ACN:H₂O): 85% por 2 minutos, 85-65% em 6 minutos, 65% por 10 minutos, 65-85% em 2 minutos, 85% por 5 minutos. Vazão: 72 4 mL/min. As marcações em vermelho indicam as frações coletadas..... Figura 41: Comparação de diferentes meios de cultura na indução de bioatividade contra Amycolatopsis sp. AA4 em Krasilnikovia sp. T082. A: controle negativo. B: TSB. C: M9. D: ISP4-modificado..... 73 Figura 42: Comparação da bioatividade contra Amycolatopsis sp. AA4 das frações F2 e F3 da Sephadex G-25 realizada com a cultura de Streptomyces sp. SPB78 em meio ISP4-modificado. 74 Figura 43: Espectros de RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) das amostras F2 (linha vermelha) e F3 (linha verde), que apresentam atividade indutora da atividade antibiótica observada em Krasilnikovia sp. T082..... 75 Figura 44: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD-ELSD analítico das frações com atividade indutora F2 e F3 em coluna HILIC-Diol (10 cm x 4,6 mm, 2,6 µm). Gradiente (ACN:H₂O): 90% por 3 minutos, 90-20% em 15 minutos, 20% por 3 minutos, 20-90% em 1 minuto, 90% por 4 minutos. Vazão: 0,85 mL/min. Linha azul: fração F2 (λ 200 nm). Linha preta: fração F3 (λ 200 75 nm).....

Figura 45: Cromatograma obtido por análise em HPLC-UV-RID da amostra com atividade indutora F2 (A) e F3 (B) em coluna Shodex Asahipak GS-310 20G. Modo isocrático com 5% MeOH:H ₂ O. Vazão: 3,0 mL/min. Linha rosa:	
detecção do RID. Linha preta: detecção em λ 200 nm.	76
Figura 46: Frações coletadas no fracionamento da fração F2, mostrando	77
Figure 47: Equation of the PMN de 1 L (D O 500 MHz) des emestres E2 Sh E1	11
Figura 47: Espectros de RMIN de H (D_2O_2 , 500 MHZ) das amostras F2_Sn_F1 (A) e F2 Sh F3 (B) que apresentam atividade indutora da atividade antibiótica	
observada em <i>Krasilnikovia</i> sp. T082. Integrais foram anotadas apenas para fins	
comparativos (não representam o número correto de hidrogênios)	78
Figura 48: Frações coletadas no fracionamento da fração F2 Sh F3, mostrando	
rendimento e atividade em ensaio biológico	79
Figura 49: Espectro de RMN de ¹ H (D ₂ O, 500 MHz) da amostra F2_Sh_F3_F2,	
que apresentou atividade indutora da atividade antibiótica observada em	
Krasilnikovia sp. T082. Integrais foram anotadas apenas para fins comparativos	
(não representam o número correto de hidrogênios).	80
Figura 50: Piramicina produzido por <i>Streptomyces griseus</i> IFO1335 que possui	
o fator PI como composto auto-indutor	81
Figura 51: Três co-culturas com <i>Krasilnikovia</i> sp. 1082 mostrando diferentes	
niveis de indução de biossintese do composto com atividade antibiotica contra	07
<i>Amycolalopsis</i> sp. AA4, sendo A o mais induzido e C nao induzido	82
rigura 52: A. Sirepiomyces sp. SPB/8 controle. B. Sirepiomyces sp. SPB/8	
<i>Krasilnikovia</i> sp. T082. C: Streptomyces sp. SPB78 pão foi capaz de crescer em	
meio de cultura contendo filtrado de cultivo liguido induzido de <i>Krasilnikovia</i>	
sp. T082	84
Figura 53: Co-cultivo em meio ISP2 sólido entre Krasilnikovia sp. T082 e	
Streptomyces sp. SPB78, depois de 10 e 20 dias, evidenciando a lise da face da	
colônia de SPB78 mais próxima de T082 após 20 dias de cultivo	84
Figura 54: Espectro de RMN de 1 H (500 MHz, D ₂ O) da amostra resultante da	
precipitação com sulfato de amônio, que apresenta atividade antibiótica	86
Figura 55: (A) placa contendo as culturas em meio sólido a serem analisadas por	
MALDI-TOF. (B-E) imagens geradas através do software <i>FlexImaging</i> 3.0	00
(Bruker Daltonics) durante a analise por MALDI-TOF em modo positivo.	88
Figura 56 : Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de actinobacterias	
(Micromonospora purpurea) vancomicina (Amycolatopsis orientalis)	
eritromicina (Saccharopolyspora erythraea) (TIWARL e GUPTA 2012)	94
Figura 57: Produtos naturais bioativos isolados de actinobactérias raras	
pertencentes ao gênero Actinoplanes	96
Figura 58: Composto A33853 isolado previamente de <i>Streptomyces</i> sp. NRRL	
12068 (MICHEL et al., 1984) que mostrou similaridade com os CGBs 1 e 21 do	
genoma de Krasilnikovia sp. 1082.	103
Figura 59: Compostos que mostraram similaridade com o <i>cluster</i> 5 do genoma	
de Krasilnikovia sp. T082: albachelina (KODANI et al., 2015) e eritrochelina	
(ROBBEL et al., 2010)	105
Figura 60: Estrutura química das alquil-O-diidrogeranil-metoxi-hidroquinonas	
(AWAKAWA et al., 2011).	106

Figura 61: Estrutura química da sioxanthina (RICHTER; HUGHES; MOORE, 2015).
Figura 62: Curva de crescimento de <i>Krasilnikovia</i> sp. T082 em dois meios de cultura: ISP2 e TSB. Condições de cultivo: agitação em 200 rpm e 30 °C
Figura 63: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (λ 220, 254 e 320 nm) da análise da fração de 30% MeOH, mostrando as frações coletadas
Figura 64: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (λ 220, 254 e 320 nm) da análise da fração de 40% MeOH, mostrando as frações coletadas
Figura 65: Estrutura da ciclo-isoleucina-prolina (1)
Figura 66: Estrutura da ciclo-leucina-prolina (2).
Figura 67: Estrutura da ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (3).
Figura 68: Estrutura da <i>rel-</i> (R,R)-ciclo-fenilalanina-prolina (4)
Figura 69: Esquema de fracionamento do extrato e acetato de etila obtido da partição do cultivo em ISP2 de <i>Krasilnikovia</i> sp. T082.
Figura 70: Cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD, sobrepostos para comparação da produção dos compostos 5-7 em diferentes condições de cultivo. Apesar da banda cromatográfica marcada com um asterisco apresentar tempo de retenção similar ao composto 7, essas bandas apresentam espectro de absorção no UV diferentes, não sendo, portanto, referentes ao mesmo composto. Espectros de absorção no UV demonstrados abaixo dos cromatogramas
Figura 71: Teste contra <i>S. aureus</i> dos três compostos isolados, comparado ao controle estreptomicina.
Figura 72: Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H dos compostos 6-7. A: região de hidrogênios de anéis aromáticos com multiplicidades que não são características de aminoácidos proteinogênicos (fenilalanina, triptofano, tirosina). B: região de hidrogênios ligados a carbono alfa de aminoácidos. C: hidrogênios de metilas ligadas a heteroátomos
Figura 73: Comparação visual entre os CGBs de Krasilnikovia sp. T082 identificado pelo antiSMASH e o CBG que apresentou maior similaridade com este. Cores iguais indicam similaridade. Setas brancas indicam genes que não tem correspondência com o outro CBG em comparação. Os genes estão em ordem numérica, e a função de cada um pode ser vista na tabela 17
Figura 74: Comparação entre os módulos NRP do CGB 3 (<i>genes 10, 11 e 12</i>) e do CGB do composto SW163 (genes <i>swb16</i> e <i>swb17</i>). C: domínio de condensação. A: domínio de adenilação. E: domínio de epimerização. nMT: domínio de N-metil-transferase. TE: domínio de terminação tioesterase
Figura 75: Estrutura química do composto 7 (SW-163D)
Figura 76: Estrutura do composto SW-163D destacando cada aminoácido que o
compoe. Figura 77: Diferença entre os compostos 5-7 nos deslocamentos químicos de ¹ H (A) $a^{13}C$ (B) na região do grupo tionectal
(A) $\varepsilon = C$ (D) ha regiao do grupo noacetal. Figuro 78 : Estrutura química do composto 6 (DK 1255A) (LIM et al. 2014)
Figura 70. Estrutura química do composto 5 (RK-1555A) (Envi et al., 2014) Figura 70: Estrutura química do composto 5 (Retimicina R)
Figura 77. Estudua química do composio 5 (Reuninema D)
em meio líquido ISP2, já apresentando suas possíveis configurações absolutas
Figura 81: Produção dos compostos 5-7 durante o crescimento de <i>Krasilnikovia</i>
sp. T082 em ISP2 líquido.

Figura 82: Repetições da curva de crescimento de <i>Krasilnikovia</i> sp. T082 em ISP2 líquido (200 rpm, 30 °C)
Figura 83: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, D ₂ O) da dicetopiperazina ciclo-
ile-pro (amostra 30_3_4, composto 1).
Figura 84: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da dicetopiperazina ciclo-leu-pro (amostra 30_4_1, composto 2)
Figura 85 : Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da dicetopiperazina ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (amostra 30_4_2 , composto 3).
Figura 86: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl ₃)) da dicetopiperazina ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (amostra 30_4_2, composto 3). A: <i>g</i> HSQC. B: <i>g</i> HMQC.
Figura 87: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) da dicetopiperazina <i>rel</i> - (R,R) -ciclo-fenilalanina-prolina (amostra 40_5_2, composto 4)
Figura 88: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Retimicina B (composto 5)
Figura 89: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl ₃) de Retimicina B (composto 5). A: gHSQC. B : gHMQC.
Figura 90: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, $CDCl_3$) de RK-1355A (composto 6).
Figura 91: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl ₃) de RK-1355A (composto 6). A: gHSQC. B: gHMQC
Figura 92: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, $CDCl_3$) de SW-163D (composto 7).
Figura 93: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl ₃) de SW-163D (composto 7). A: gHSQC. B: gHMQC
Figura 94: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_3_4, determinada como ciclo-ileucina-prolina (composto 1).
Figura 95: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_4_1, determinada como ciclo-leucina-prolina (composto 2).
Figura 96: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_4_2, determinada como ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (composto 3).
Figura 97: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 40_5_2, determinada como <i>rel-</i> (R,R)-ciclo-fenilalanina-prolina (composto 4).
Figura 98: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de Retimicina B (composto 5).
Figura 99: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de RK-1355A (composto 6).
Figura 100: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de SW-163D (composto 7)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens pertencentes aos bancos de dados GenBank e EzTaxon
que apresentaram maior similaridade (representada em porcentagem) com
linhagens endofíticas isoladas de <i>Tithonia diversifolia</i> utilizadas neste estud
(código RTd).
Tabela 2: Atividade antimicrobiana das linhagens endofíticas cultivadas e meio ISP2 líquido e sólido
Tabela 3 . Atividade contra <i>S aureus</i> dos cultivos puros e co-cultivo d
linhagens endofíticas selecionadas em meio R2VE+Fe. A tabela também most
o número de linhagens endofíticas que cada linhagem foi canaz que inibir quan
em co-cultivo
Tabela 4: Frações obtidas no fracionamento por HPLC da amostra F3 6
Tabela 5: Frações obtidas em fracionamento realizado com Sephadex G-25 (
cultura com atividade indutora.
Tabela 6: Comparação entre o genoma de Krasilnikovia sp. T082, A. friuliens
DSM7358 e S. coelicolor A(3).
Tabela 7: Resultado da análise por antiSMASH do genoma de Krasilnikovia s
T082, mostrando os potenciais CGBs encontrados e similaridades deles co
sequências depositadas no GenBank até Outubro de 2016
Tabela 8: Resultado da análise por antiSMASH do genoma de Krasilnikovia s
T082, mostrando os potenciais CGBs e similaridades destes com CGH
depositados no MIBiG até outubro de 2016.
Tabela 9: Compostos cujo CGB apresenta grande similaridade com o clust
número 3 do genoma de Krasilnikovia sp. T082 (dados de acordo com busca r
GenBank).
Tabela 10: Massa obtida de cada fração proveniente da SPE e do macerado de
células.
Tabela 11: Frações obtidas após purificação das frações coletadas do extra
30% MeOH.
Labela 12: Frações obtidas apos purificação das frações coletadas do extra
40% MeOH
1 abela 15: Dados oblidos em analise por RMIN de H (500 MHZ) da amost 30, 3, 4, e comparação deste com dados obtidos na literatura para o mesm
composto
Tabela 14: Dados obtidos em análise por RMN de 1H (500 MHz, D20) (
amostra 30 4 1 e comparação deste com dados obtidos na literatura para
mesmo composto
Tabela 15: Dados obtidos em análise por RMN de ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) (
amostra 30 4 2, e comparação deste com dados obtidos na literatura para
mesmo composto
Tabela 16: Dados obtidos em análise por RMN de ¹ H da amostra 40 5
comparando com dados obtidos na literatura para o mesmo composto
Tabela 17: Valores de CIM e CMB (μ g/mL) dos compostos 6 e 7 frente
linhagens multi-resistentes de S. aureus.
Tabela 18: Análise dos genes que compõem o CGB 3 comparando com os gene
que compõem o CGB do composto SW163 e possível função de cada um dent
do CGB (WATANABE et al., 2009)
Tabela 19: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto 7

Tabela 20: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto 6	131
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ , 500 MHz) do composto 5	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	American type culture collection
BuOH	Butanol
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CEM	Cromatografia por exclusão molecular
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CGB	Cluster gênico biossintético
CIM	Concentração inibitória mínima
CTBA	Brometo de cetil trimetil de amônia
gCOSY	Gradient correlation spectroscopy
d	Dupleto
D_2O	Água deuterada
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DKP	Dicetopiperazina
eDNA	Environmental deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtOH	Etanol
ESI-MS	Eletrospray ionization - mass spectrometry
gDNA	Genomic deoxyribonucleic acid
<i>g</i> HMBC	Gradient heteronuclear multiple bond coherence
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HQA	Ácido 3-hidroxi-quináldico
HPLC-DAD-ELSD	High performance liquid chromatography - diode array detection
	- evaporative light-scattering detector
HR-ESI-MS	High resolution - electrospray ionization - mass spectrometry
<i>g</i> HSQC	Gradient Heteronuclear single quantum coherence
GNPS	Global natural product social molecular networking
Ile	Isoleucina
ISP2	International Streptomyces project medium 2
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Liquid chromatography - mass spectrometry
Leu	Leucina
LQMo	Laboratório de química de micro-organismos

m	Multipleto
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight
МеОН	Metanol
MRSA	Methicillin resistant Staphylococcus aureus
nanoDESI	Nanospray desorption electrospray ionization
NCA	Ácido norcoronâmico
ND-MS	Nanospray desorption ionization - mass spectrometry
ORFs	Open reading frames
OSMAC	One Strain Many Compounds
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
qui	Quintupleto
RID	Refractive index detector
RMN	Ressonância magnética nuclear
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
rpm	rotação por minuto
S	Simpleto
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sl	Simpleto largo
SPE	Solid-phase extraction
t	Tripleto
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	X
Lista de abreviaturas e siglas	XII
Introdução Geral	1
Capítulo 1: Metagenômica de Produtos Naturais	5
1. Introdução	7
1.1. Triagem fenotípica/funcional de bibliotecas metagenômicas	7
1.2 Leishmaniose cutânea	8
2. Objetivos	9
3. Material e Métodos	9
3.1. Material	9
3.1.1. Reagentes e equipamentos	9
3.1.2. Bibliotecas metagenômicas	10
3.1.3. Linhagens microbianas	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Transferência das bibliotecas para os hospedeiros R. metallidurans CH34:	
preparação de células eletrocompetentes e eletrotransformação	11
3.2.2. Triagem antiparasitária	12
3.2.3. Cultivo dos clones bioativos e obtenção dos extratos brutos	13
3.2.3.1. Cultivo em meio líquido	13
3.2.3.2. Cultivo em meio sólido	13
3.2.4. Análise do perfil químico dos extratos dos clones bioativos	13
3.2.4.1. Extrato do cultivo líquido	13
3.2.4.2. Extrato do cultivo sólido	14
3.2.5. Análises biológicas dos clones bioativos	14
3.2.5.1. Análise dos extratos brutos frente a <i>L. major</i>	14
3.2.5.2. Análise do fluido das culturas frente a <i>L. major</i>	14
3.2.5.3. Antibiograma dos extratos brutos frente a <i>B. subtilis</i>	15
3.2.6. Analises moleculares dos cosmideos dos clones bioativos	15
3.2.6.1. Mapa de restrição dos clones bioativos e controle pJSS	15
3.2./. Biotransformação	15
3.2.8. Coleta de solo e isolamento de <i>e</i> DNA	l/
3.2.9. Purificação de eDNA para sequenciamento	1/
4. Resultados e Discussão	17
4.1. Ensaio antiparasitário frente a <i>L. major</i>	17
4.2. Cultivo e análises químicas e biológicas dos clones bioativos contra L. major	19

4.2.1. Análises químicas das culturas em meio líquido	19
4.2.2. Análises químicas das culturas em meio sólido	24
4.2.3. Análise do perfil biológico	25
4.2.3.1. Mapa de restrição enzimática	25
4.2.3.2. Teste dos extratos brutos frente a <i>L. major</i>	26
4.2.3.3. Teste dos fluidos das culturas frente a <i>L. major</i>	27
4.2.3.4. Teste dos extratos brutos frente a <i>B. subtilis</i> (antibiograma)	28
4.3. Biotransformação	28
4.4. Isolamento de <i>e</i> DNA de solo para sequenciamento	31
4.5. Análise do sequenciamento Roche 454 do <i>e</i> DNA isolado	31
4.6. Perspectivas para o uso de metagenômica no campo de pesquisa de produtos	
naturais	33
5. Conclusões	34
Capítulo 2: Aspectos biológicos e químicos no estudo de interações microbianas	37
1. Introdução	39
1.1. Interações interespecíficas: o uso da co-cultura	40
1.2. Táxon Actinobacteria e linhagens pouco exploradas: endofíticas e raras	41
1.2.1. Actinobactérias endofíticas	42
1.2.2 Actinobactérias raras	43
2. Objetivos	43
3. Material e Métodos	44
3.1. Linhagens microbianas:	44
3.2. Meios de cultura utilizados	44
3.3. Identificação das linhagens endofíticas e distância filogenética entre elas	45
3.4. Condições de cultivo	45
3.4.1. Cultivo em meio sólido	45
3.4.2. Cultivo líquido e análise do filtrado	46
3.5. Análises de atividade antibacteriana	46
3.5.1. Análise direta em cultivo sólido	46
3.5.2. Extração e análise do cultivo em meio sólido	46
3.5.3. Extração e análise do cultivo em meio líquido	47
3.6. Análises do perfil químico das amostras e isolamento do composto bioativo	47
3.7. Imageamento por espectrometria de massas (MALDI-TOF)	47
3.8. Análise direta das colônias em placa utilizando espectrometria de massas com	
fonte de ionização do tipo nanoDESI e análise dos dados gerados	48
4. Resultados e Discussão	48
4.1. Linhagens endofíticas	48
4.1.1. Identificação das linhagens	48
4.1.2. Potencial antimicrobiano das linhagens em estudo	53
4.1.3. Ensaio fenotípico das co-culturas entre linhagens endofíticas	54
4.1.4. Ensaios antibacterianos	59
4.1.5. Interação entre as linhagens Streptomyces sp. RTd 5 e Streptomyces sp. RTd 8	61
4.2. Actinobactérias raras de solo	65

4.2.1. Ensaios fenotípicos	65
4.2.2. Ensaios antibacterianos	66
4.2.3. Estudos químicos e biológicos	67
4.2.3.1. Investigação da atividade indutora	67
4.2.3.2. Especificidade da indução em Krasilnikovia sp. T082	82
4.2.3.3. Investigação da atividade antibiótica	83
4.2.3.4. Análise direta em placa de cultivo – Imageamento por espectrometria de	
massas	87
5. Conclusões	89

Capítulo 3: Estudo genômico e químico do metabolismo secundário de <i>Krasilniko</i> T082	<i>via</i> sp. 91
1. Introducão	93
1.1 Isolamento de actinobactérias raras	94
1.2 Krasilnikovia sp. T082	95
2. Objetivos	96
3. Material e Métodos	96
3.1. Linhagens microbianas	96
3.2. Meios de cultura utilizados	96
3.3. Material utilizado para isolamento de compostos orgânicos	97
3.4. Cultivo líquido de Krasilnikovia sp. T082	97
3.5. Obtenção dos extratos brutos e isolamento de compostos	97
3.6. Ensaios antimicrobianos	97
3.6.1. Punch-hole	98
3.6.2. CIM (Concentração inibitória mínima)	98
3.7. Elucidação estrutural	98
3.8. Sequenciamento e análise do genoma da linhagem Krasilnikovia sp. T082	98
4. Resultados e Discussão	99
4.1. Sequenciamento e análise do genoma da linhagem Krasilnikovia sp. T082	99
4.2. Estudo químico da linhagem <i>Krasilnikovia</i> sp. T082	106
4.2.1. Cultivo em TSB 0,5x	108
4.2.1.1. Ensaio antimicrobiano do cultivo em TSB 0,5x	108
4.2.1.2. Fracionamento do cultivo em TSB 0,5x	108
4.2.1.2.1. Fração de 30% MeOH	109
4.2.1.2.2. Fração de 40% MeOH	110
4.2.1.3. Dicetopiperazinas	112
4.2.1.3.1. Amostra 30_3_4: Ciclo-isoleucina-prolina (ciclo-ile-pro)	112
4.2.1.3.2. Amostra 30_4_1: Ciclo-leucina-prolina	113
4.2.1.3.3. Amostra 30_4_2	115
4.2.1.3.4. Amostra 40_5_2	116
4.2.2. Cultivo em ISP2 líquido	117
4.2.2.1. Ensaio antimicrobiano do cultivo em ISP2	118
4.2.2.2. Investigação da bioatividade detectada em cultivo líquido ISP2 de	
Krasilnokovia sp. T082	118

4.2.2.3. Elucidação estrutural dos compostos bioativos	
5. Conclusões	
Considerações Finais	137
Referências Bibliográficas	143
Anexo 1	155
Anexo 2	169

Introdução Geral

A crescente resistência aos fármacos em diversos organismos como bactérias, fungos e parasitas gera intensa demanda por novos agentes terapêuticos (BERENDONK et al., 2015; LAXMINARAYAN et al., 2016; TAUBES, 2008). Em contrapartida, a eficiência na descoberta de compostos com novas estruturas químicas diminuiu nos últimos anos, sendo a grande maioria dos novos compostos resultante de variações de elementos estruturais já conhecidos (BROWN e WRIGHT, 2016; WALSH e FISCHBACH, 2010).

Produtos naturais ainda representam importante papel na pesquisa de novos fármacos devido a sua grande diversidade de atividades biológicas (NEWMAN e CRAGG, 2016). Dentre todas fontes de produtos naturais, micro-organismos se destacam. Por exemplo, dentre todos os agentes antibacterianos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981-2014, 73% são derivados de micro-organismos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Tendo em vista a ampla biodiversidade existente deste grupo, a redução da eficiência na descoberta de novos produtos naturais não indica que todos compostos existentes já foram descritos, mas sim que as metodologias para isolamento dos mesmos devem ser aperfeiçoadas e diversificadas, e novos nichos devem ser explorados (QIN et al., 2011).

Análises independentes de cultura microbiana sugerem que ainda há muita biodiversidade a ser explorada. Métodos usados tradicionalmente na busca por esses metabólitos, baseados no isolamento e cultivo de micro-organismos, têm negligenciado a maioria dos micro-organismos existentes na natureza. Estima-se que cerca de 99% das bactérias e 95% dos fungos não crescem quando utilizadas metodologias clássicas de cultivo in vitro (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Além disso, conhecimentos advindos do progresso das técnicas de sequenciamento e anotação gênica para diversas linhagens microbianas têm evidenciado que há também uma grande perda da capacidade metabólica das próprias linhagens facilmente cultiváveis, limitando ainda mais a descoberta de novos metabólitos de origem microbiana (KATZ; HOVER; BRADY, 2016). O número de clusters gênico biossintéticos (CGB) encontrado nesses estudos é muito maior do que os metabólitos conhecidos para a respectiva linhagem, sugerindo que o potencial biossintético de produtos naturais microbianos tem sido sub-explorado pelos métodos tradicionais. Acredita-se que alguns CGB que codificam produtos naturais ficam silenciados ou pouco expressos em condições laboratoriais, necessitando talvez de influências ambientais para serem ativados, como por exemplo nutrientes específicos ou até mesmo interações microbianas (BERTRAND et al., 2014).

Esta tese compreende três capítulos, que trazem diferentes abordagens que podem ser utilizadas para diversificar a busca por produtos naturais. Na abordagem mais clássica, linhagens são isoladas do meio ambiente, comumente de solo, e cultivadas de forma axênica para a obtenção de produtos naturais. O capítulo 1 desta tese aborda a aplicação de conhecimentos de biologia molecular na pesquisa de produtos naturais, através da técnica conhecida como metagenômica. O capítulo 2 aborda o conceito de química ecológica para estimulação do metabolismo secundário, através da utilização de interações microbianas (co-cultura). O capítulo 3 aborda o uso de *genome mining* para entender a capacidade metabólica de uma linhagem bacteriana, bem como o uso de variações nos parâmetros da cultura para alterar o metabolismo desta.

É válido destacar que todos os capítulos trazem o estudo de linhagens que não são usualmente exploradas: metagenômica aborda micro-organismos de difícil cultivo, as interações microbianas foram realizadas entre linhagens endofíticas e linhagens de actinobactérias raras pertencentes a gêneros pouco estudados, e o capítulo 3 mostra o estudo mais aprofundado do metabolismo secundário de um gênero de actinobactéria rara nunca estudada química- ou geneticamente.

Capítulo 1

Metagenômica de Produtos Naturais

1. Introdução

A metagenômica apresenta-se como uma estratégia diferenciada na busca por produtos naturais por dispensar o isolamento de linhagens microbianas (SINGH e MACDONALD, 2010). Metagenômica é o estudo do metagenoma, nome dado ao conjunto dos genomas presente em uma amostra. Essa abordagem é baseada no isolamento de DNA diretamente de amostras ambientais, sendo este chamado de *e*DNA (do inglês "*environmental* DNA"). Ou seja, essa abordagem permite estudar e explorar micro-organismos sem passar pela etapa de cultivo destes, evitando assim a perda de biodiversidade que este passo impõe (HANDELSMAN et al., 1998).

Na abordagem metagenômica o *e*DNA pode ser expresso de forma heteróloga em hospedeiros facilmente cultiváveis como *Escherichia coli*, e assim os respectivos produtos naturais codificados pelo metagenoma de micro-organismos de difícil cultivo podem ser expressos, isolados, determinados e avaliados biologicamente (FENG; KALLIFIDAS; BRADY, 2011; KATZ; HOVER; BRADY, 2016). Ao contrário dos métodos dependentes de cultivo, em que apenas uma linhagem é analisada por vez, a metagenômica oferece ainda a vantagem de se investigar diversos genomas microbianos simultaneamente (BANIK e BRADY, 2010).

Uma das formas de analisar o metagenoma é através de triagem fenotípica/funcional, que visa a detecção de alterações fenotípicas e/ou atividades biológicas de interesse através do cultivo e análise dos clones que constituem a biblioteca metagenômica (EKKERS et al., 2012).

1.1. Triagem fenotípica/funcional de bibliotecas metagenômicas

Na triagem fenotípica buscam-se clones com características morfológicas diferentes do hospedeiro e na funcional são detectados clones com diferentes atividades biológicas, como antibiótica e enzimática. A probabilidade de isolar compostos utilizando-se triagem fenotípica/funcional depende de vários fatores como: sistema vetor-hospedeiro, tamanho do *e*DNA inserido, método de ensaio biológico para avaliação da atividade biológica e a eficiência da expressão heteróloga no hospedeiro de escolha (KATZ; HOVER; BRADY, 2016; UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009).

Um exemplo de um experimento simples de triagem funcional é a busca por metabólitos com atividade antimicrobiana. A biblioteca metagenômica a ser ensaiada é semeada em diversas placas de Petri contendo meio de cultura adequado (cerca de 1.500 clones são semeados simultaneamente em cada placa) e a bactéria indicadora de bioatividade é semeada sobre esta biblioteca na forma de *top*-ágar. Caso o clone tenha atividade contra esta bactéria,

um halo de inibição é formado em volta da respectiva colônia (BANIK e BRADY, 2010). Esta abordagem permitiu o isolamento e caracterização, por exemplo, de novas aminas de cadeia longa N-aciladas, bem como um antibiótico indólico (BRADY e CLARDY, 2000; BRADY e CLARDY, 2005), violaceína (BRADY et al., 2001), indigo (LIM et al., 2005), petídeos cíclicos como nocardamina (WANG et al., 2000) e patelamida D (LONG et al., 2005) (Figura 1), e o polieno metatricicloeno (IQBAL et al., 2016).



Figura 1: Exemplos de compostos bioativos que foram isolados empregando-se triagem fenotípica/funcional: aminas de cadeia longa N-aciladas, antibiótico indólico, violaceina, índigo, nocardamina, patelamida D, metatricicloeno.

1.2 Leishmaniose cutânea

Leishmaniose cutânea é uma doença parasitária que causa sérias lesões na pele, provocada por diferentes protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, como por exemplo *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania infantum* (EIRAS; KIRKMAN; MURRAY, 2015). O parasita é transmitido através do mosquito hematófago pertencente as espécies *Phlebotomys* spp. ou *Lutzomyia* spp.(ANDRADE-NETO et al., 2016). A incidência desta doença é de cerca de 0,7 - 1,3 milhões de novos casos a cada ano (ALVAR et al., 2012).

Atualmente são utilizados para o tratamento desta doença antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine (RATH et al., 2003). Entretanto, ainda não há disponível nenhum tratamento satisfatório para nenhuma forma de leishmaniose cutânea. Portanto, há grande necessidade de pesquisa por fármacos que possam combater este parasita. (MEARS et al., 2015). Este fato motivou o desenvolvimento de uma triagem antiparasitária utilizando a técnica metagenômica.

2. Objetivos

Testar a triagem funcional antiparasitária das bibliotecas metagenômicas pertencentes ao LQMo (de *e*DNA de solo de Mata Atlântica do *campus* da USP de Ribeirão Preto e de solo de Cerrado do estado de Goiás) como ferramenta para a busca por clones promissores para o isolamento e identificação de produtos naturais bioativos. Isolar *e*DNA de solo bioma Cerrado do estado de São Paulo (Parque Estadual de Vassununga – Santa Rita do Passa Quatro), sequenciá-lo e analisar seu potencial para a construção de biblioteca metagenômica para o estudo de produtos naturais microbianos.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Reagentes e equipamentos

Ágar. LB ágar. LB caldo. Caldo nutriente. Extrato de levedura. Brometo de cetil trimetil de amônia (CTBA). EDTA. Ácido bórico. Tris-HCl. SDS. Triptona. Alça de Platina. Palitos de madeira. Centrífuga Eppendorf[®] modelo 5810R. Etanol 70%. Eletroporador BioRad[®]. Espectrofotômetro OD₆₀₀ Ultrospec10 GE Healthcare[®]. NanoDrop[®]. Estereomicroscópio. Microscópio óptico. Microtubos de 1,5 mL. Tubos de 15 mL e 50 mL. Freezer -80 °C. Glicerol. Glicose. KCl. NaCl. MgCl. MgSO₄. *HiSpeed Plasmid Midi* e *Miniprep Kit* (Qiagen). Isopropanol. Incubadoras (30 °C e 37 °C) com controle de umidade Nova Ética[®]. Agitador orbital com controle de temperatura *Innova New Brunswick[®]*. Micropipetas. Placas de Petri 15 cm e 10 cm de diâmetro. Pipetas graduadas 5 mL e 10 mL descartáveis e estéreis. Pipetadores automáticos de 0,5-10 µl, 10-20 µL, 100-200 µL, 100-1000 µL. Ponteiras p10, p200 e p1000. Seringa de vidro de 50 mL. Tetraciclina. Irgasan. Gentamicina. Piplartina. Soro fetal bovino.
Meio de cultura M199 (Sigma-Aldrich). Eritrosina B. Câmara de Neubauer. Cubas de eletroforese com fonte. dNTP. Enzima de restrição HINDIII. Papel filtro. Filtro com membrana de poros com 0,2 µm. Placas de 96 poços. Dimetilsulfóxido. GelRed[™] (Biotium). FastDigest[®] ScaI (Fermentas). Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII (Fermentas). *FastAP[™] Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Fermentas). *GeneRuler[™] 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas). Tubo de diálise com grampos. Tubo concentrador do tipo Amicon (30.000 MWCO). Transiluminador. Metanol. Acetato de etila. *n*-butanol. Rotaevaporador acoplado a *chiller*.

3.1.2. Bibliotecas metagenômicas

Bibliotecas metagenômicas de solo de Mata Atlântica do *campus* da USP de Ribeirão Preto (250.000 clones) e do solo do Cerrado do estado de Goiás (500.000 clones) em hospedeiro *Escherichia coli* EC300, construídas durante o projeto de pós-doutorado da Dra. Denise Oliveira Guimarães (processo FAPESP 09/13861-9) em colaboração com o Prof. Dr. Sean F. Brady da Rockefeller *University*, New York, NY, EUA.

As bibliotecas utilizadas neste trabalho foram construídas utilizando o cosmídeo pJSS (figura 2). Este cosmídeo suporta inserção de DNA de até cerca de 40 Kb, e possui o sistema de plasmídeo RK2, que é capaz de se replicar e se manter estável em baixas cópias na maioria das espécies de bactérias gram-negativas e em algumas gram-positivas também, bem como leveduras e células de mamíferos (CRAIG et al., 2010). Portanto, apesar das bibliotecas aqui utilizadas terem sido construídas em hospedeiro *E. coli*, estas bibliotecas podem ser inseridas em outros hospedeiros para diferentes triagens.



Figura 2: Mapa do cosmídeo selecionado para as bibliotecas metagenômicas deste trabalho.

3.1.3. Linhagens microbianas

Escherichia coli EC300, *Ralstonia metallidurans* CH34, *Bacillus subtilis* 1E9 (resistente à tetraciclina), *Leishmania major* MHOM/IL/81/Friedlin.

3.2. Métodos

3.2.1. Transferência das bibliotecas para os hospedeiros *R. metallidurans* CH34: preparação de células eletrocompetentes e eletrotransformação

A biblioteca de solo de Cerrado pertencente ao LQMo estava em hospedeiro *E. coli* EC300. Para aumentar a chance de expressão heteróloga do *e*DNA essas bibliotecas foram transferidas para hospedeiro *R. metalidurans* CH34. Foram preparadas células eletrocompetentes de *R. metallidurans* CH34 de acordo com o protocolo de SHARMA & SCHIMKE (1996) (SHARMA e SCHIMKE, 1996). Para realizar a eletroporação, foram adicionados cerca de 500 ng de DNA do estoque de cosmídeos purificados contendo o *e*DNA a 80 μ L de células eletrocompetentes. Esta mistura foi resfriada em gelo por alguns minutos e transferida para uma cuveta de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad[®]) também resfriada. Após um pulso de 1,8 V por 6 ms, foi adicionado imediatamente 1 mL de SOC (triptona 2%, extrato de

levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄, glicose 20 mM). Esta suspensão celular foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e a 30 °C por 3 h. Para calcular a eficiência do processo, uma diluição seriada desta suspensão celular foi plaqueada em placas de Petri contendo meio LB-ágar com tetraciclina 20 ng/mL para seleção das bactérias contendo os cosmídeos. Estas foram incubadas nas respectivas temperaturas, e no dia seguinte foram contadas as colônias para estimar a eficiência da eletrotransformação para garantir que todos os clones fossem de fato inseridos nos novos hospedeiros.

3.2.2. Triagem antiparasitária

O ensaio antiparasitário *in vitro* com as bibliotecas foi realizado no IFSC-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Otávio H. Thiemann e Profa. Dra. Izaltina Silva Jardim Cavalli, como parte das atividades do INCT-INBEQMeDI (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal de Doenças Infecciosas).

Foram plaqueados aproximadamente 1.500 clones por placa de Petri contendo meio LBágar com tetraciclina 20 ng/mL, que foram incubadas a 30 °C por 1 dia, e depois transferidas para 24 °C por 4 dias. Após esse período de incubação, foi feito o *overlay* das colônias com *soft*-ágar contendo promastigotas de *Leishmania major* (cepa MHOM/IL/81/Friedlin). As placas foram então incubadas a 24 °C por 48h e analisadas em busca de halos de inibição ao redor das colônias. As colônias que apresentaram halo foram isoladas com auxílio de um palito de madeira, previamente esterilizado, e transferidas para placas de Petri contendo meio LBágar suplementado com tetraciclina 20 ng/mL. Essas placas foram incubadas à 30 °C (*R. metallidurans*) ou 37 °C (*E. coli*) por 1 dia e 4 dias a 24 °C, e foi feito o re-teste antiparasitário para confirmar a atividade. Os clones com atividade comprovada foram estocados em glicerol 15% em freezer -80 °C.

<u>Preparação do *soft*-ágar contendo o parasita</u>: as formas promastigotas de *L. major* foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina e incubadas em estufa a 24 °C por 5 dias. Para a determinação do número de parasitas, uma alíquota da cultura em fase estacionária de crescimento foi diluída em eritrosina B 0,04% e contada em câmara de Neubauer espelhada utilizando microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. Para o cálculo do número de parasitas em 1 mL de cultura foi utilizada a fórmula:

n° de parasitas = n° de parasitas vivos x fator da diluição x 10^4

Uma solução contendo 3 x 10^7 parasitas/mL foi adicionada a uma solução estéril de agarose 1%, na proporção de 1:1 e adicionadas às placas contendo as colônias de bactérias já crescidas na forma de *top*-ágar.

3.2.3. Cultivo dos clones bioativos e obtenção dos extratos brutos

3.2.3.1. Cultivo em meio líquido

Os clones bioativos obtidos nas triagens das bibliotecas metagenômicas foram cultivados em duas etapas: primeiro em pré-inóculo 16 h, 37 °C, 300 rpm e depois fermentação em meio LB-líquido por 48 horas, 37 °C, 300 rpm. Após este tempo de incubação as culturas foram centrifugadas (4.000 g, 15 min). As células foram extraídas por maceração em metanol e o fluído da cultura foi particionado com acetato de etila e *n*-butanol. As diferentes fases, bem como a água restante, foram secas para obtenção do extrato bruto para testes posteriores.

3.2.3.2. Cultivo em meio sólido

Os clones bioativos obtidos nas triagens das bibliotecas metagenômicas foram também cultivados em placa de Petri contendo meio LB-ágar suplementado com tetraciclina 20 ng/mL, que foram incubadas a 30 °C por 1 dia, e depois transferidas para 24°C por 4 dias. Após esse período de incubação o meio de cultura foi macerado de duas formas diferentes: em acetato de etila por 1 hora ou e MeOH/H₂O (1:1) também por 1 hora. O macerado foi então filtrado e o solvente rota-evaporado para obtenção do extrato bruto.

3.2.4. Análise do perfil químico dos extratos dos clones bioativos

3.2.4.1. Extrato do cultivo líquido

Os extratos obtidos foram analisados em cromatografía em camada delgada analítica (CCDA) em fase normal com revelação sob luz UV (254 nm e 365 nm) e em vanilina sulfúrica seguida de aquecimento. Cada extrato foi analisado utilizando três fases móveis diferentes: Hex: AcOEt 7:3, Hex:AcOEt 1:1. Foi realizada também CCDA em fase reversa, utilizando como fase móvel MeOH:H₂O 7:3 e MeOH 100%.

Foram realizadas também análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detector DAD (HPLC-DAD: Shimadzu[®] Shim-Pak com detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10AVP Shimadzu[®]) em coluna analítica de fase reversa C₁₈. Foi utilizado gradiente de

fase móvel crescente de 10% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 30 min (vazão: 1 mL/min). Foram injetados 20 μ L de cada extrato (1 mg/mL) solubilizado em H₂O:ACN (1:1). Algumas amostras selecionadas foram também analisadas por HPLC com detector de massas (HPLC-MS) (API 1200L *Quadrupole* MS/MS - Varian), utilizando gradiente de fase móvel crescente de 10% a 97% de metanol (MeOH) em água (suplementada com 10mM de acetato de amônio) em 35 min com vazão de 1 mL/min, utilizando coluna Luna Phenomenex[®] C₁₈ 250 x 4.6 mm, 5 μ m e ionização por eletrospray. As análises foram feitas em modo positivo e negativo.

3.2.4.2. Extrato do cultivo sólido

Os extratos obtidos foram analisados por HPLC-DAD em coluna analítica de fase reversa C₆-Fenil. Foi utilizado gradiente de fase móvel crescente de 5% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 34 min (vazão: 1 mL/min). Foram injetados 20 μ L de cada extrato (1 mg/mL) solubilizados em H₂O:ACN (1:1).

3.2.5. Análises biológicas dos clones bioativos

3.2.5.1. Análise dos extratos brutos frente a L. major

Os extratos brutos provenientes do cultivo líquido dos clones bioativos e controle pJSS (bactéria contendo o cosmídeo sem *e*DNA) foram testados quanto à sua citotoxidade frente à cultura de *L. major* através do teste colorimétrico com MTS, utilizando para isso o *kit* da Promega *CellTiter 96*® *AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, de acordo com o protocolo do fabricante. Os extratos foram solubilizados em DMSO na concentração de 10 mg/mL e depois diluídos para 1 mg/mL em meio de cultura LB-líquido. Desta solução final, 50 μ L foram adicionados a 50 μ L de cultura prévia de *L. major* (24 °C por 5 dias em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, contendo 50 μ g/mL de gentamicina) em placas de 96 poços para realização do teste. Como controle positivo foi utilizado o medicamento pentamidina. Este teste foi feito em triplicata.

3.2.5.2. Análise do fluido das culturas frente a L. major

Além dos extratos brutos foram também testados diretamente os fluidos das culturas. Os seis clones bioativos e o controle pJSS foram cultivados por cinco dias (1 dia a 37 °C e 4 dias a 24 °C, ambos a 200 rpm) em meio LB-líquido suplementado com tetraciclina. Após esse período de incubação, a cultura foi centrifugada por 15 min a 3000 rpm, o sobrenadante coletado e filtrado em membrana estéril (poro de 0,2 μ m) para eliminar as células. Em placas de 96 poços foram adicionados em cada poço 50 μ L do sobrenadante da cultura do clone e 50 μ L da cultura de *L. major* (cultura: 24 °C por 5 dias em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 μ g/mL de gentamicina). Após 72 h foi realizado teste colorimétrico de citotoxicidade com MTS, utilizando para isso o *kit* da Promega *CellTiter 96*® *AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, de acordo com o protocolo do fabricante. Este teste foi feito em triplicata.

3.2.5.3. Antibiograma dos extratos brutos frente a B. subtilis

Os extratos brutos dos cultivos líquidos dos seis clones bioativos obtidos no ensaio antiparasitário e do controle pJSS foram submetidos ao ensaio antibiograma frente a *B. subtilis* para ver se apresentariam também atividade antibacteriana. Os extratos foram testados na concentração de 400 μ g/mL (solubilizados em metanol). Esta solução foi aplicada em discos de papel de filtro (0,5 cm de diâmetro, 10 μ L). Após secagem dos discos, estes foram dispostos em placa de Petri contendo cultura fresca de *B. subtilis* em meio LB-ágar. As placas foram incubadas por 16-24 h a 30 °C e então analisadas quanto à presença ou não de halo de inibição.

<u>Placas de Petri contendo cultura fresca de *B. subtilis* em meio LB-ágar: *B. subtilis* foi cultivado em meio LB-líquido/tetraciclina por 16 h a 30 °C 120 rpm. Após este período de incubação, 5 mL deste cultivo foram inoculados em 50 mL de LB-líquidol e incubado a 30 °C, 120 rpm, até que atingisse OD_{600} 0,5 (aproximadamente 4 h). Esta solução de bactérias foi diluída em *soft*-agar LB/tetraciclina (1:100) e plaqueada.</u>

3.2.6. Análises moleculares dos cosmídeos dos clones bioativos

3.2.6.1. Mapa de restrição dos clones bioativos e controle pJSS

A restrição enzimática dos cosmídeos isolados dos clones bioativos foi feita com a enzima de restrição HindIII (*New England BioLabs*[®]). A reação de restrição foi feita em microtubo de 1,5 mL de acordo com o protocolo do fabricante. As reações foram analisadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.2.7. Biotransformação

Um dos clones bioativos contra *B. subtilis* em hospedeiro *R. metallidurans* CH34 pertencente à coleção do LQMo (R_CA20) foi cultivado em meio LB-líquido suplementado

com tetraciclina contendo o produto natural piplartina para ver sua capacidade de biotransformação deste composto.

O clone R_CA20 foi cultivado em 50 mL de LB/tetraciclina como pré-inóculo por 16 h, 30 °C, 250 rpm. Deste pré-inóculo, 16 x 1 mL foram inoculados em 16 tubos com 20 mL de meio LB/tetraciclina cada. Estes foram incubados novamente por 16 h, 30 °C, 250 rpm. Após este período, foram feitos 4 grupos de 4 tubos cada, em que foi adicionado:

<u>Grupo 1)</u> 1 mL de piplartina (2 mg/mL em DMSO): para análise da biotransformação; Grupo 2) Duplicata do grupo 1

<u>Grupo 3)</u> 1 mL de LB/tetraciclina: para diferenciar os produtos de biotransformação dos compostos produzidos naturalmente pelo clone R_CA20;

<u>Grupo 4)</u> 1 mL de LB/tetraciclina com 1% de DMSO: para controle do efeito do DMSO na cultura.

Como controle para saber se os compostos eventualmente observados não são produto do hospedeiro e/ou cosmídeo pJSS, a bactéria *R. metallidurans* CH34 contendo o cosmídeo pJSS sem *e*DNA também foi cultivada nas mesmas condições que o grupo 1. Como controle da estabilidade da piplartina, um tubo contendo apenas meio LB/tetraciclina foi incubado nas mesmas condições que o grupo 1, entretanto não foi inoculada nenhuma bactéria.

Os cultivos dos grupos 1, 2, 3 e 4 e o do controle do hospedeiro foram feitos em quadruplicata para análise após quatro tempos diferentes: após 3 h de cultivo, após 12 h, após 24 h e após 48 h. O cultivo para controle da estabilidade da piplartina foi realizado em apenas uma unidade que foi retirada após 48 h.

Os fluidos das culturas (obtidos após centrifugação a 4.000 g por 15 min) foram submetidos a partição líquido-líquido com acetato de etila (2 x 11 mL) e esta fase foi posteriormente concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida. Os extratos brutos obtidos foram analisados por UHPLC-DAD-MS (ACQUITY UPLC-MS Waters), utilizando coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 μ m BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) de 2,1 x 50 mm. Como fase móvel foi utilizado um gradiente crescente de 10% a 100% em 4 min de acetonitrila em água, ambos com 1% de ácido acético (v/v), com vazão de 0,3 mL/min. Foram injetados 5 μ L de cada extrato (0,1 mg/mL) solubilizado em H₂O:ACN (1:1). A análise por espectrometria de massas foi realizada utilizando fonte de ionização por eletrospray e detector triplo quadrupolo no modo positivo e negativo (TQ Detector, Waters).

3.2.8. Coleta de solo e isolamento de eDNA

A coleta do solo do bioma Cerrado foi realizada no Parque Estadual de Vassununga (na gleba Pé-de-Gigante), localizado no Km 245 da Rodovia Anhanguera (SP-330). Para amostragem foi escolhido um ponto afastado de trilhas e da rodovia (localização: 21° 36' 35.7" S, 47° 37' 22.4" O). Foram amostrados 12 pontos separados a dois metros entre si, totalizando uma área de 24 m². Estes pontos foram separados em dois subtipos: próximos a árvore e afastado de árvores. Foram amostradas duas faixas de profundidades: 0-10 cm e 10-20 cm. Ao final, o solo coletado de todos os pontos foi misturado de maneira a obter uma amostra homogênea. Em seguida a amostra de solo foi levada para o laboratório para isolamento do *e*DNA, seguindo o protocolo descrito por BRADY (2007) (BRADY, 2007). Resumidamente, as células são rompidas através do uso de detergente e aquecimento, seguido de posterior purificação do *e*DNA obtido utilizando a técnica de precipitação com isopropanol. Para seleção de *e*DNA de alto peso molecular e melhor purificação, o *e*DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose, seguido corte do gel região de interesse e eletroeluição deste para obtenção do *e*DNA. Para concentração do *e*DNA a amostra obtida é filtrada em tubo do tipo Amicon[®].

3.2.9. Purificação de eDNA para sequenciamento

O eDNA obtido foi purificado utilizando o *kit PureLink*® *Genomic DNA* (*Life Technologies*) e sequenciado utilizando a plataforma Roche 454 GS Junior, de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, primeiro foi construída uma biblioteca do tipo *shotgun* de eDNA utilizando o *GS Titanium Rapid Library Prep Kit* (Roche[®]), com 500 ng de eDNA purificado. Em seguida foi preparada a emulsão para PCR utilizando o *GS Junior Titanium emPCR Kit* (Roche[®]). O produto obtido foi então submetido ao sequenciamento, utilizando o *GS Junior Titanium Sequencing Kit* (Roche[®]).

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio antiparasitário frente a L. major

Este ensaio foi realizado em dois hospedeiros: *E. coli* EC300 e *R. metallidurans* CH34. Como havia em estoque apenas a biblioteca em *E. coli*, foi necessária a eletrotransformação da biblioteca para *R. metallidurans*. Para ensaios funcionais é de extrema importância utilizar diferentes hospedeiros, pois cada um tem uma determinada capacidade metabólica que pode levar tanto a expressão gênica diferencial do *e*DNA inserido quanto a modificações póstranscricionais de seu produto gênico original. Neste caso específico, *E. coli* é uma gamaproteobactéria e *R. metallidurans* é uma beta-proteobactéria. Portanto, espera-se que *R. metallidurans* seja capaz de expressar diferencialmente a biblioteca metagenômica (CRAIG; CHANG; BRADY, 2009).

O ensaio antiparasitário foi realizado em parceria com o colaborador Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann (IFSC-USP), com auxílio da então pós-doutoranda Dra. Izaltina Silva-Jardim, como parte das atividades do INCT-INBEQMeDI. Para a biblioteca de Mata Atlântica foram encontrados 45 clones com halo de inibição no ensaio com a biblioteca em *E. coli* e *R. metallidurans*, como exemplificado na figura 3. Entretanto, nenhum clone repetiu a atividade observada. Para a biblioteca do Cerrado foram encontrados 84 clones com halo de inibição no ensaio com a biblioteca em *E. coli* e *R. metallidurans* cH34. Em re-teste, seis clones (em hospedeiro *E. coli*) mantiveram a atividade observada.



Figura 3: A: Exemplo de clones que não apresentaram atividade contra *L. major*. B: exemplo de um clone que apresentou halo de inibição contra *L. major*. C: colônia sem atividade vista em microscópio (100 x). D: colônia com halo de inibição vista em microscópio (100 x), comprovando a ausência de parasitas. Clones em hospedeiro *E. coli* da biblioteca de Mata Atlântica.

Um dos fatores determinantes para o sucesso em triagens de bibliotecas metagenômicas é o tamanho destas. Quanto maior a biblioteca, mais representativa ela será do ambiente (DANIEL, 2004) e maiores as chances de ocorrerem fragmentos de *e*DNA com *clusters* gênicos completos, aumentando as chances de encontrar/expressar compostos de interesse. Comparando os resultados das duas bibliotecas testadas contra *L. major* foi possível demonstrar esta influência do tamanho da biblioteca no sucesso da triagem: a biblioteca maior (500.000 clones) apresentou mais clones bioativos que a outra biblioteca com a metade deste tamanho, sendo que apenas para a biblioteca maior alguns clones positivos tiveram sua bioatividade confirmada em posterior re-teste.

Em um trabalho realizado por BRADY e colaboradores (2004), um em cada 10.000-20.000 clones apresentaram resultado positivo em ensaios funcionais contra *B. subtillis* (BRADY; CHAO; CLARDY, 2004). CHUNG e colaboradores em 2008 realizaram ensaio antifúngico em uma biblioteca com 110.000 fosmídeos, obtendo apenas um clone com resultado positivo (CHUNG et al., 2008). CRAIG e colaboradores (2010) analisaram três bibliotecas (totalizando 750.000 clones) em cinco hospedeiros diferentes, e apenas oito clones apresentaram halo de inibição contra *B. subtilis*, sendo que apenas dois mantiveram a atividade em re-teste (CRAIG et al., 2010). Portanto, o baixo número de clones com atividade confirmada no presente trabalho está de acordo com a literatura.

O baixo número de clones bioativos geralmente encontrado em triagens funcionais de bibliotecas metagenômicas pode ser explicado por uma série de fatores envolvendo a questão da expressão do *e*DNA inserido. Alguns destes fatores são: diferenças do uso preferencial de certos códons entre o hospedeiro e o organismo de origem do *e*DNA, problemas com o reconhecimento de regiões promotoras da expressão gênica e/ou ausência dos fatores de iniciação e co-fatores necessários, ausência de precursores, modificações pós-traducionais inadequadas, degradação do produto gênico, toxicidade do composto para o hospedeiro, inabilidade de exportar o composto, entre outros (EKKERS et al., 2012). Por isso a utilização de diferentes hospedeiros aumenta o sucesso das triagens funcionais.

4.2. Cultivo e análises químicas e biológicas dos clones bioativos contra *L. major*4.2.1. Análises químicas das culturas em meio líquido

Em estudos de metagenômica o interesse está voltado apenas para os compostos biossintetizados exclusivamente pelos clones bioativos. Portanto, a análise do perfil químico sempre é feita de maneira comparativa entre os clones bioativos e respectivo controle (hospedeiro contendo o cosmídeo utilizado sem *e*DNA inserido). No caso de análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) busca-se por manchas exclusivas dos clones, em análises por cromatografia líquida e espectrometria de massas busca-se por bandas cromatográficas exclusivas dos clones.

Inicialmente foi realizado cultivo em pequena escala (50 mL de cada clone) para verificar se era possível visualizar alguma diferença química entre os clones e o controle. As análises feitas por CCDA (em luz UV de 254 e 365 nm e após revelação em vanilina sulfúrica seguida de aquecimento) não evidenciaram nenhuma diferença entre os clones, como ilustrado na figura 4.



Figura 4: Fotos retiradas de CCDA feita com os extratos brutos de acetato de etila do controle (letra C nas placas) e três dos clones bioativos contra *L. major* (23, 24 e 29). Fase móvel utilizada: Hex:AcOEt 1:1. A: análise sob luz UV de 254 nm. B: análise sob luz UV de 365 nm. C: análise após revelação com vanilina sulfúrica seguida de aquecimento.

Os extratos foram então analisados por uma técnica mais sensível, o HPLC-DAD. Nesta análise, os seis clones exibiram uma discreta banda cromatográfica exclusiva no extrato de acetato de etila com tempo de retenção de 12,20 min (figura 5).

Como todos os clones apresentaram a mesma banda, foi escolhido o clone que exibiu banda mais intensa, o clone 24 (figura 5C), para prosseguir as análises. Na tentativa de caracterizar esta banda exclusiva, os extratos de acetato de etila do clone 24 e do controle pJSS foram enviados para análise por HPLC-MS, em que a banda cromatográfica exclusiva seria então selecionada para análise por espectrometria de massas (MS). Entretanto, neste outro equipamento não foi possível visualizar nenhuma banda exclusiva no cromatograma obtido, conforme mostra a figura 6. Decidiu-se então analisar esses mesmos extratos por MS por inserção direta (ionização por eletrospray e analisando em modo positivo e negativo). Entretanto, como pode ser visto nos espectros de MS da figura 7, novamente não foi possível observar diferença significativa entre o clone e controle.



Figura 5: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extratos brutos de acetato de etila do controle (A) e dos seis clones bioativos contra *L. major* (B-G). Foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ e gradiente de fase móvel crescente de 10% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 30 min com vazão de 1 mL/min. Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 mg/mL) solubilizado em H₂O:ACN (1:1).



Figura 6: Cromatogramas dos extratos de acetato de etila do controle pJSS (A) e do clone 24 (B), obtidos em análise pelo equipamento API 1200L Quadrupole MS/MS – Varian, utilizando gradiente de fase móvel crescente de 10% a 97% de metanol (MeOH) em água (suplementada com 10 mM de acetato de amônio) em 35 min com vazão de 1 mL/min, utilizando coluna Luna Phenomenex[®] C₁₈ 250 x 4.6 mm, 5 μ m.



Figura 7: Espectro de massas dos extratos de acetato de etila do controle pJSS (A) e do clone 24 (B), obtidos em análise pelo equipamento API 1200L *Quadrupole* MS/MS – Varian, utilizando inserção direta e ionização por eletrospray. A análise foi feita em modo positivo.

Decidiu-se então realizar um novo cultivo do controle pJSS e clone 24 para analisar novamente seus extratos brutos de acetato de etila por HPLC-DAD, para ver se a banda diferencial era reprodutível. Foi realizado novamente cultivo em pequena escala sob as mesmas condições e também em escala ampliada (3 x 150 mL) para fins comparativos. Os extratos obtidos foram analisados por HPLC-DAD sob as mesmas condições utilizadas na análise do primeiro cultivo. Entretanto, neste momento, o pico exclusivo observado inicialmente foi também visualizado no controle, tanto nos extratos do cultivo em pequena escala como nos cultivos em grande escala (figura 8). Portanto, nesta segunda etapa de cultivo não foi mais possível observar diferenças entre o clone 24 e controle.



Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extratos brutos de acetato de etila do controle (A, C) e clone 24 (B, D) ambos em pequena (A, B) e grande escala (C, D). Foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ e gradiente de fase móvel crescente de 10% a 100% de acetonitrila (ACN) em água em 30 min (vazão de 1 mL/min). Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 mg/mL) solubilizados em H₂O:ACN (1:1).

Na tentativa de visualizar alguma diferença foi realizada uma nova análise por HPLC-DAD para esses mesmos extratos do controle pJSS e clone 24, desta vez utilizando método isocrático 20% de ACN:H₂O na tentativa de separar melhor os picos da região em que foi observada inicialmente a banda exclusiva. Como pode ser observado nos cromatogramas da figura 9, novamente não foi observada nenhuma diferença significativa.



Figura 9: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 198 nm) dos extratos brutos de acetato de etila do controle (A) e clone 24 (B). Foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ e fase móvel isocrática de 20% de acetronitrila em água (vazão de 1 mL/min). Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 mg/mL) solubilizado em H₂O:ACN (1:1).

4.2.2. Análises químicas das culturas em meio sólido

Tendo em vista que não foi possível obter compostos produzidos exclusivamente pelos clones bioativos, o clone 24 foi selecionado para cultivo em meio sólido na tentativa de submete-lo a uma condição de cultivo mais próxima àquela realizada durante os ensaios (o controle pJSS também foi cultivado nas mesmas condições para fins comparativos). Os extratos obtidos foram submetidos a HPLC-DAD. Novamente, não foi obtida nenhuma banda cromatográfica exclusiva do clone bioativo (figura 10).

Portanto, não foi possível isolar o composto responsável pela atividade antiparasitária observada nas triagens funcionais realizadas. Isto demonstra que este processo não é algo trivial. Vários pontos podem ser destacados nesta problemática. Em termos químicos, talvez o composto não apresente as características que permitam sua revelação em vanilina sulfúrica e não possua cromóforos (impedindo sua visualização por luz UV). Além disso, há a questão das metodologias de cultivo e extração, talvez as utilizadas não sejam as mais adequadas para obtenção do composto bioativo. Em termos biológicos, é válido lembrar que o processo de expressão gênica dos clones é complexo, e questões como interações entre os clones cultivados na mesma placa e interações entre os clones e parasitas podem interferir na expressão gênica do *e*DNA inserido (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). A atividade antiparasitária foi inicialmente visualizada em co-cultivo com *L. major* e com diferentes clones em uma mesma placa, já para obtenção dos extratos foi utilizado cultivo puro dos clones, sem a presença do parasita e de outros clones. Portanto, é plausível propor que as condições utilizadas para obtenção dos extratos brutos não tenham sido propícias para a biossíntese adequada do composto bioativo.



Figura 10: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (λ 220 nm) da análise dos extratos brutos dos cultivos em meio sólido do controle pJSS e do clone 24 de acetato de etila (A) e de MeOH+H₂O (B). Foi utilizada coluna de fase reversa C₆–Fenil e gradiente de fase móvel crescente de 5% a 100% de acetonitrila em água em 34 min (vazão de 1 mL/min). Foram injetados 20 µL de cada extrato (1 mg/mL) solubilizados em H₂O:ACN (1:1).

4.2.3. Análise do perfil biológico

4.2.3.1. Mapa de restrição enzimática

Para analisar se os clones bioativos são diferentes entre si ou cópias de um mesmo clone, os cosmídeos extraídos dos clones foram digeridos com a enzima de restrição HINDIII e analisados em eletroforese em gel. Conforme pode ser visto na figura 11, aparentemente tratase de clones diferentes entre si. Entretanto, eles apresentam algumas bandas semelhantes entre

В

si, o que pode indicar que, apesar dos fragmentos inseridos não serem idênticos, talvez haja algum(ns) gene(s) que seja(m) coincidente(s) entre eles. Ou seja, pode-se propor que o(s) gene(s) responsável(is) pela bioatividade observada sejam os mesmos entre os clones, o que varia é o tamanho do fragmento de *e*DNA inserido em cada um deles.



Figura 11 : Foto de gel de eletroforese em agarose 1% corado com brometo de etídio. Foram aplicados os produtos de digestão enzimática com a enzima de restrição HINDIII do cosmídeo controle pJSS e dos cosmídeos referentes aos clones bioativos 23, 24, 29, 30, 36 e 67. MW: padrão de peso molecular. *imagem gentilmente cedida pela Profa. Izaltina Silva-Jardim.

4.2.3.2. Teste dos extratos brutos frente a L. major

Os extratos brutos de acetato de etila, *n*-butanol e metanol dos clones bioativos 24 e 29 e controle pJSS foram testados contra *L. major*. Como pode ser visto nos gráficos da figura 12, nenhum extrato apresentou atividade significante em relação ao controle.



Figura 12: Resultado do teste de atividade contra *L. major* dos extratos de acetato de etila (A), metanol (B) e *n*-butanol (C) dos clones 24, 29 e controle pJSS.

4.2.3.3. Teste dos fluidos das culturas frente a L. major

Após a constatação de que os extratos brutos dos clones bioativos 24 e 29 e do controle pJSS não apresentam atividade relevante contra *L. major*, levantou-se a hipótese de que talvez a metodologia de extração não seja a mais adequada para obter o(s) composto(s) bioativos contra *L. major*. Portanto, decidiu-se testar diretamente os fluidos das culturas contra *L. major*. Como pode ser observado na figura 13, novamente nenhum clone apresentou atividade significante. Portanto, este resultado corrobora a discussão de que a metodologia de cultivo talvez não propicie as condições necessárias para a biossíntese adequada do(s) composto(s) bioativo(s) responsáveis pela atividade observada no ensaio antiparasitário em placa de Petri.



Figura 13: Resultado do teste de atividade contra *L. major* dos fluidos dos clones 24, 29 e controle pJSS.

4.2.3.4. Teste dos extratos brutos frente a *B. subtilis* (antibiograma)

Os extratos de acetato de etila dos clones bioativos contra *L. major* foram testados através do ensaio de antibiograma contra *B. subtilis*. Entretanto, nenhuma atividade foi detectada.

4.3. Biotransformação

O LQMo possui em sua coleção de clones bioativos contra *B. subtilis* um clone proveniente de ensaio funcional da biblioteca de *e*DNA de solo de Cerrado que apresentou uma região correspondente a sintetases de peptídeos não-ribossomais, de aproximadamente 27 kb, codificado como R_CA20. Este clone, obtido pela pesquisadora Dra. Denise O. Guimarães durante seu pós-doutoramento no laboratório, foi utilizado no presente trabalho em um ensaio de biotransformação do produto natural piplartina (figura 14), para verificar se essas enzimas codificadas pelo *e*DNA seriam capazes de realizar modificações estruturais nessa molécula. A piplartina é um alcalóide isolado de *Piper tuberculatum* que apresenta diversas atividades biológicas, como citotóxica, antifúngica, antitumoral, antileishmanicida e ansiolítica (BEZERRA et al., 2012).



Piplartina

Figura 14: Estrutura química da piplartina.

A figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos na análise por UHPLC-MS dos extratos de acetato de etila dos diferentes cultivos realizados. Não foi possível identificar nenhum produto de biotransformação da piplartina que fosse exclusivo do clone em questão. Entretanto, foi observado dois produtos de biotransformação com m/z 366 que estava presente em todos os extratos de biotransformação, o que indica que o hospedeiro *R.metallidurans* CH34 pode biotransformar outras substâncias.



Figura 15: Cromatogramas obtidos por UHPLC -EM dos extratos brutos de acetato de etila dos seguintes cultivos: A: clone R_CA20 com piplartina; B: controle *R. metallidurans*/pJSS com piplartina; C: controle da estabilidade da piplartina (meio LB/tetraciclina + piplartina); D: clone R_CA20. Fase móvel utilizada: gradiente crescente de 10% a 100% em 4 min de acetonitrila em água, ambos com 1% de ácido acético (v/v), vazão de 0,3 mL/min, em coluna C₁₈. Foram injetados 5 µL de cada extrato (0,1 mg/mL) solubilizados em H₂O:ACN (1:1).

A fragmentação do íon de m/z 366 formou o íon acílio com m/z 221 (figuras 16 e 17). Essa fragmentação permite a proposição das posições da molécula onde as alterações estruturais ocorreram. A presença do íon de m/z 221 no espectro do UHPLC-MS/MS (figura 17) indica que a diferença de 48 Da observada é devida a alguma alteração estrutural no anel lactâmico da piplartina. Isso porque quando a ligação amida que une o anel lactâmico e a parte derivada do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico da piplartina protonada (m/z 318) é rompida é formando o íon acílio de m/z 221 (figura 17), que é observado como pico base no espectro de ESI-MS/MS obtido, evidenciando que esta parte da piplartina não foi alterada. Tendo em vista que este produto não foi derivado do clone, não foi realizada investigação da estrutura deste.



Figura 16: Espectros obtidos por MS/MS dos picos visualizados em 2,84 min (A) e 3,10 min (B) na análise por UHPLC-EM dos extratos brutos de acetato de etila do cultivo do clone R_CA20 com piplartina, sendo A e B produtos de biotransformação da piplartina. O espectro C refere-se ao MS/MS do pico visualizado em 2,42 min (piplartina) no controle de estabilidade da piplartina.



íon acílio

Figura 17: Fragmentação da piplartina formando o íon acílio (m/z 221).

Apesar do clone selecionado não ter sido capaz de biotransformar a piplartina, este trabalho ilustrou um novo tipo de aplicação para a metagenômica, que é a utilização de enzimas codificadas no *e*DNA visando a diversificação de produtos naturais via biotransformação.

4.4. Isolamento de eDNA de solo para sequenciamento

Foi obtido com sucesso *e*DNA com fragmentos de alto peso molecular (acima de 23 Kb). A concentração obtida foi de 82,0 ng/ μ L, em um volume final de 1 mL. A razão 260/280, que indica contaminação por proteínas, ficou em 1,65 e a razão 260/230, que indica contaminação por ácido húmico, em 0,57. Idealmente, ambos valores deveriam ficar por volta de 1,80. Portanto, apesar de ter sido obtido grande quantidade *e*DNA de alto peso molecular, este apresenta grande quantidade de contaminantes. Após diversos protocolos de purificação testados e uma etapa final de precipitação por gravidade, conseguiu-se melhorar a qualidade do *e*DNA, obtendo valores finais de 1,72 para a razão 260/280 e 1,51 para a razão 260/230, em concentração final de 71 ng/ μ L de DNA de alto peso molecular (figura 18).



Figura 18: Gel de eletroforese (1% agarose, corado com $\text{GelRed}^{\text{(8)}}$) do *e*DNA isolado. A: marcador molecular. B: *e*DNA purificado.

4.5. Análise do sequenciamento Roche 454 do eDNA isolado

O sequenciamento realizado obteve ótima qualidade. Foram obtidos cerca de 45 Mb contendo 98954 sequências de tamanho médio de 450 pb, resultados que estão acima da qualidade oferecida pelo equipamento, indicando a boa qualidade do *e*DNA obtido. Os dados

obtidos foram analisados através na ferramenta livre *online* MG-RAST, que fornece uma ampla visão dos dados tanto em termos taxonômicos quanto funcionais (MEYER et al., 2008). A distribuição taxonômica mostra que a maioria das sequências obtidas são de origem bacteriana, sendo que proteobactérias, actinobactérias e acidobactérias predominam nesta população (figura 19).



Figura 19: Diversidade taxonômica presente no eDNA isolado e sequenciado.

Em uma pesquisa feita com 31 diferentes solos essas três classes também foram as mais abundantes (JANSSEN, 2006), evidenciando que a metodologia para extração de *e*DNA utilizada provavelmente não apresentou viés para algum táxon específico. Estes dados são promissores, tendo em vista que bactérias possuem em seu genoma um grande número de *clusters* gênicos biossintéticos (CGBs) dedicados ao metabolismo secundário. Actinobactérias em específico são conhecidas por sua grande capacidade metabólica, sendo produtora de diversos compostos bioativos (GUNATILAKA, 2006).

Esta ferramenta *online* também permite a busca por genes específicos. Foi realizada uma rápida busca por genes relacionados a policetídeos (PKS) e peptídeos não-ribossomais (NRP) para ter uma visão geral do potencial desta amostra de *e*DNA para construção de biblioteca metagenômica para estudo de produtos naturais. Nestas buscas foram encontrados diversos genes relacionados a domínios de PKS e NRPS, como aciltransferases, metiltransferases e adenilases, indicando que esta amostra é rica em CGBs relacionados a metabolismo secundário.

Tendo em vista que CGBs de compostos com atividade antibiótica possuem geralmente genes de resistência a estes para evitar auto-intoxicação (HOPWOOD, 2007), foi também realizada uma busca por genes relacionados a resistência a antibióticos por ser indicativo de

presença de CGBs que codificam compostos bioativos. Foram encontrados diversos genes relacionados a resistência a antibióticos, como polimixina, acriflavina, meticilina e tetraciclina, indicando a possível presença destes antibióticos no *e*DNA sequenciado.

Portanto, os resultados de análises preliminares do *e*DNA coletado evidenciaram que esta amostra é promissora para a busca por produtos naturais, evidenciando a relevância de utilizar solos de Cerrado em estudos metagenômicos dedicados à busca por produtos naturais. A continuidade dos estudos com este material (análise mais aprofundada dos CGBs por bioinformática e construção de biblioteca metagenômica) foi dada pelo aluno de doutorado direto Ulysses A. de Frias (processo FAPESP 2012/16139-5).

4.6. Perspectivas para o uso de metagenômica no campo de pesquisa de produtos naturais

Como visto e discutido neste capítulo, chegar a um composto utilizando a metagenômica funcional não é algo trivial. Há ainda poucos compostos relatados na literatura que foram isolados utilizando esta técnica. Além disso, as referências destes são antigas (entre 2000-2005). Isso se dá pelo fato de que a comunidade científica percebeu estes desafios e começou a desenvolver na última década outras metodologias mais modernas, envolvendo a parte de engenharia genética, sequenciamento e bioinformática mais intensamente, o que está sendo atualmente desenvolvido em nosso laboratório pelo aluno de doutorado Ulysses A. de Frias (Processo FAPESP 2012/16139-5) em colaboração com o Dr. Sean Brady (*Rockefeller University*).

Com o avanço do sequenciamento de DNA, aliado ao seu preço cada vez mais reduzido, a metagenômica de produtos naturais entrou em uma era de busca guiada por genes específicos para aumentar a probabilidade de encontrar compostos de interesse (CHARLOP-POWERS; MILSHTEYN; BRADY, 2014; CHARLOP-POWERS et al., 2015; KATZ; HOVER; BRADY, 2016; TRINDADE et al., 2015). Por exemplo, compostos da classe dos policetídeos têm sido um alvo comum. Isto se dá devido a sua facilidade em prever genes de acordo com sua estrutura, bem como presença de áreas conservadas em seus *clusters* gênicos, o que facilita sua busca em metagenomas (CHARLOP-POWERS et al., 2015). Além disso, pesquisas têm sido desenvolvidas para utilização de hospedeiros e vetores mais eficazes (GAIDA et al., 2015; IQBAL et al., 2016; XU et al., 2016) e engenharia genética tem sido utilizada para construção de clones contendo todos os genes necessários para a permitir e facilitar a expressão correta dos *clusters* biossintéticos encontrados (KALLIFIDAS e BRADY, 2012).

Portanto, a abordagem moderna em metagenômica de produtos naturais consiste em procurar clones pertencentes a bibliotecas metagenômicas que possuam genes conservados da

classe de compostos de interesse, sequenciar o clone, caracterizar o seu *e*DNA e, se preciso, utilizar engenharia genética para montar o CGB completo a partir de dois ou mais clones, e expressá-lo em vetores e hospedeiros mais adequados de acordo com o CGB de interesse.

É possível também realizar estudos exploratórios acerca da diversidade de classes de produtos naturais presentes em uma amostra ambiental, sem necessidade de isolamento químico de composto ou de construção de bibliotecas metagenômicas. Neste caso a bioinformática representa papel principal no estudo. Um exemplo é o trabalho publicado em 2015 pelo grupo do nosso colaborador Dr. Sean Brady, com co-autoria da Profa. Mônica T. Pupo, Profa. Denise Oliveira Guimarães (ex-pós-doutoranda do grupo) e atual aluno de doutorado do grupo Ulysses A. de Frias (CHARLOP-POWERS et al., 2015). Neste estudo foram processados solos de diversas partes do mundo e realizada amplificação de genes conservados de policetídeos (referente ao domínio cetosintase) e peptídeos não-ribossomais (referente ao domínio de adenilação). Os dados obtidos no sequenciamento desses domínios foram analisados e comparados entre si, de forma que foi possível analisar e comparar a diversidade de policetídeos e peptídeos não-ribossomais presentes em diferentes biomas ao redor do mundo. Esta metodologia, além de trazer um conhecimento global da capacidade metabólica de um lugar específico, também é valiosa para ajudar na priorização de locais para estudos metagenômicos visando o isolamento de produtos naturais de interesse (CHARLOP-POWERS et al., 2015).

5. Conclusões

O ensaio funcional realizado com as bibliotecas metagenômicas pertencentes à coleção do laboratório foi capaz de detectar clones bioativos contra *L. major*, através de um ensaio inovativo ainda não descrito na literatura para a abordagem metagenômica (ensaio antiparasitário). Contudo, a análise química dos extratos brutos obtidos das culturas destes clones não permitiu a identificação do(s) composto(s) responsável(is) pelas atividades observadas. Talvez a metodologia utilizada para cultivo e obtenção dos extratos não tenha propiciado a biossíntese do(s) composto(s) bioativo(s). As análises biológicas corroboraram esta hipótese, pois não foi possível detectar a mesma atividade antiparasitária nem nos extratos nem no filtrado das culturas. Portanto, o ensaio funcional mostrou-se promissor na busca por clones bioativos contra *L. major*; entretanto, não foi possível obter o composto ativo.

O sequenciamento e análise do *e*DNA isolado de solo de Cerrado evidenciou a qualidade do protocolo utilizado em termos de quantidade de sequências bacterianas obtidas, bem como a quantidade de genes relacionados à produtos naturais e resistência a antibióticos. Portanto, o

*e*DNA isolado de solo de Cerrado pode ser considerado promissor para a construção de novas bibliotecas metagenômicas visando a busca por produtos naturais.

Para um maior sucesso na utilização desta abordagem na busca por novos produtos naturais é preciso utilizar técnicas mais modernas envolvendo engenharia genética, sequenciamento e bioinformática. A metagenômica está adentrando uma era em que é possível realizar buscas guiadas por genes conservados de classes específicas de produtos naturais, montar CGBs completos a partir de diferentes clones de uma biblioteca metagenômica, construir vetores e hospedeiros mais eficazes na expressão do CGB de interesse, o que está revolucionando a utilização desta abordagem.

Capítulo 2

Aspectos biológicos e químicos no estudo de interações microbianas

1. Introdução

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e da bioinformática diversos genomas de micro-organismos estão sendo sequenciados e analisados em relação ao metabolismo secundário. Estes dados têm evidenciado o vasto potencial metabólico ainda desconhecido até mesmo de linhagens já bem estudadas (BALTZ, 2008; SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016). Para a maioria dos CGBs identificados nos genomas não se sabe o que eles codificam, apesar da análise dos genes permitir a proposição das classes desses compostos. Isso porque estes compostos não são detectados nas culturas laboratoriais – seja pela sua baixa expressão e, portanto, baixa quantidade produzida, prejudicando assim sua identificação, ou pelo fato destes CGBs de fato não estarem sendo expressos nestas condições de cultivo (ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014). O entendimento da regulação e função destes compostos para os micro-organismos pode ajudar a estimular sua expressão gênica, sendo, portanto, de grande valia no estudo de produtos naturais (BIBB, 2013; SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016; ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

Produtos naturais de origem microbiana são originados do metabolismo secundário destes organismos, que, ao contrário do metabolismo primário, não é considerado vital para o organismo. Considera-se que compostos originários do metabolismo secundário aumentam o *fitness* do organismo no ambiente no qual este está vivendo (JENKE-KODAMA; MÜLLER; DITTMANN, 2008). Estes compostos estão codificados em complexos CGBs presentes no DNA ou em plasmídeos, e sua expressão envolve diversas enzimas e reações químicas com grande gasto energético e de precursores. Portanto, estes CGBs não são expressos constitutivamente e estão sob regulação de mecanismos ainda pouco conhecidos, mas que devem estar relacionados a fatores presentes no meio ambiente em que as linhagens evoluíram tendo em vista a função destes compostos (ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

Condições laboratoriais clássicas de cultivo para obtenção de produtos naturais são diferentes das condições existentes no ambiente natural dos micro-organismos, sendo menos desafiadoras e mais propensas ao bom e rápido desenvolvimento do micro-organismo (DAVIES e RYAN, 2012). Em seu nicho natural, os micro-organismos estão imersos em um ambiente complexo com parâmetros abióticos variáveis e em constante relação com os demais seres vivos circundantes através de interações antagônicas, sinérgicas, regulatórias e modulatórias (BERDY, 2005; BERTRAND et al., 2014). Tendo em vista as atividades biológicas evidenciadas em diversos estudos, produtos naturais podem ter papel importante nessas interações, representando uma estratégia importante na sobrevivência dos indivíduos. Assim sendo, essas interações são possivelmente necessárias para ativar certas rotas

metabólicas que não são vitais ao indivíduo (BERTRAND et al., 2014; SCHERLACH e HERTWECK, 2009).

Quando duas ou mais linhagens microbianas dividem o mesmo micro-ambiente estas podem competir por nutriente e espaço, gerando um estresse no crescimento dos indivíduos. Esta interação pode ser mediada por produtos naturais que, por exemplo, podem agir inibindo o crescimento do competidor como forma de eliminá-lo. Assim sendo, a presença de outros organismos em um mesmo meio de cultivo (co-cultura) pode aumentar ou até mesmo ativar a expressão de CGBs que permanecem silenciosos quando a linhagem cresce em um ambiente de baixo estresse como o seu respectivo cultivo puro, levando ao isolamento de diferentes produtos naturais (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014; PETTIT, 2009; ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

1.1. Interações interespecíficas: o uso da co-cultura

Um recente estudo desenvolvido por TRAXLER e colaboradores (2013) evidenciou a relevância da utilização de interações microbianas como ferramenta para acessar a capacidade metabólica de micro-organismos. Isto foi demostrado através do estudo metabolômico por nanoDESI e redes moleculares (*molecular networking*) da actinobactéria *Streptomyces coelicolor* quando co-cultivada aos pares com outras linhagens. Apesar de *S. coelicolor* já ter sido vastamente estudada e ser bem caracterizada na literatura, TRAXLER e colaboradores mostraram que o seu co-cultivo com outras actinobactérias é capaz de estimular a biossíntese de diversos compostos que ainda não haviam sido descritos para esta linhagem, como um grupo de acil-desferroxaminas (figura 20), sendo que cada par apresentou compostos exclusivos decorrentes da interação específica, além de diversos outros compostos ainda não descritos na literatura (TRAXLER et al., 2013). Portanto, esse estudo mostra que mesmo linhagens já conhecidas e caracterizadas podem ser fonte de novos compostos através do uso de ferramentas que sejam capazes de ativar rotas metabólicas silenciadas no clássico cultivo simples, evidenciando o potencial deste tipo de abordagem para o estudo de produtos naturais.

Outros exemplos de compostos obtidos utilizando esta metodologia são: alchivemicina A (figura 20), composto antibacteriano e antifúngico produzido pelo fungo *Tsukamurella pulmonis* quando em co-cultura com *Streptomyces lividans* ou *Streptomyces endus* (ONAKA et al., 2011); os compostos fumiformamida e N,N'- ((1Z,3Z)-1,4-bis(4-metoxifenil)buta-1,3-dieno-2,3-dilil)di-formamida (figura 20), produzidos quando o fungo *Aspergillus fumigatus* é co-cultivado com *Streptomyces peucetius* (ZUCK; SHIPLEY; NEWMAN, 2011); e o compostos N-demetilofiosetina, pallidorosetina A e pallidorosetina B (figura 20), produzidos

quando o fungo *Fusarium pallidoroseum* é co-cultivado com a actinobactéria *Saccharopolyspora erythrae* (WHITT et al., 2014).



N,N'- ((1Z,3Z)-1,4-bis(4-metoxifenil)buta-1,3-dieno-2,3-dilil)di-formamida: $R = CH_3$

Figura 20: Exemplos de compostos que foram isolados utilizando a técnica de co-cultura.

1.2. Táxon Actinobacteria e linhagens pouco exploradas: endofíticas e raras

O sucesso do estudo de produtos naturais, principalmente quando se busca por bioatividade e novidade estrutural, depende em parte da escolha adequada dos organismos a serem explorados. O táxon Actinobacteria é conhecido por sua ampla capacidade metabólica (GUNATILAKA, 2006), sendo responsável por cerca da metade de todos os antibióticos já descobertos, como por exemplo a estreptomicina, tetraciclina e neomicina (BERDY, 2005;

ZERIKLY e CHALLIS, 2009), representando, assim, uma importante fonte de produtos naturais. Portanto, o estudo de linhagens de actinobactérias ainda pouco exploradas, como, por exemplo, aquelas de origem endofítica e de gêneros considerados raros, pode ser considerado como promissor para o isolamento de novas substâncias bioativas.

1.2.1. Actinobactérias endofíticas

Endofíticos podem ser definidos como micro-organismos simbiontes que passam toda ou parte de sua vida colonizando tecidos da planta inter- ou intracelularmente de forma harmônica (SCHNEIDER; MISIEK; HOFFMEISTER, 2008). Nesta simbiose a planta oferece nutrientes, proteção e substrato; os micro-organismos, por sua vez, apresentam um metabolismo secundário diverso, podendo conferir proteção contra patógenos e herbivoria, e até mesmo influenciar no desenvolvimento, crescimento e produtividade de seu hospedeiro, aumentando, assim, sua adaptabilidade e competitividade no meio ambiente (GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; TAN e ZOU, 2001). Considerando esta hipótese como verdadeira, espera-se que ao longo da evolução haja uma seleção para micro-organismos endofíticos que tenham uma grande produção de metabólitos secundários biativos (SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016), tornando este ambiente de grande interesse para produtos naturais com potencial terapêutico.

De fato, estudos de micro-organismos endofíticos têm levado à caracterização química de um grande número de metabólitos secundários pertencentes a diversas classes, como por exemplo, terpenoides, alcaloides, esteroides, flavonoides, lactonas, lignanas, fenilpropanoides, entre outros, com diversas atividades biológicas: antibióticas, antitumoral, anti-viral, antioxidantes, imunossupressores, anti-helmínticos, inseticidas etc. (BRADER et al., 2014; GUO et al., 2008; NEWMAN e CRAGG, 2015; STROBEL e DAISY, 2003; ZHANG; WEI; TAN, 2015). Fungos endofíticos têm sido estudados mais frequentemente, entretanto, bactérias endofíticas ainda permanecem pouco exploradas.

Alguns exemplos de compostos isolados de actinobactérias endofíticas são: o composto antifúngico saadamicina, produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. Hedaya48 isolada de *Aplysina fistularis* (EL-GENDY e EL-BONDKLY, 2010); o terpenoide com atividade antibacteriana kandenol A (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. HKI0595 isolada de *Kandelia candel* (DING et al., 2012); o composto com atividade antibacteriana heraclemicina D (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. Y3111 isolada de *Heracleum souliei* (LIU et al., 2014); a antraciclina com atividade antibacteriana e citotóxica misamicina (figura 21), produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. YIM66403 (LI et al., 2015);

e o composto com atividade antibacteriana e citotóxica 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)quinazolinona (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. RLe 8 isolada de *Lychnophora ericoides* (CONTI et al., 2016).



2,3-diiidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona

Figura 21: Exemplos de compostos isolados de actinobactérias endofíticas.

1.2.2. Actinobactérias raras

São consideradas actinobactérias raras aquelas de gêneros diferentes de *Streptomyces*, que possuem frequências menores de isolamento quando utilizadas metodologias clássicas (TIWARI e GUPTA, 2013). Alguns exemplos são os gêneros *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Kutzneria* e *Krasilnikovia*. Estudos de actinobactérias raras também têm levado à caracterização química e biológica de vários metabólitos bioativos de diversas classes. Exemplos e mais detalhes sobre este grupo estão presentes no capitulo 3 desta tese.

2. Objetivos

Analisar a diversidade e possíveis relações ecológicas presentes na comunidade de actinobactérias endofíticas da raiz da planta medicinal *Tithonia diversifolia*. Estudar ambientes

pouco explorados como fontes produtos naturais bioativos: actinobactéria endofíticas e raras. Testar interações microbianas como metodologia para alteração do metabolismo de actinobactérias. Descrever sob aspectos químicos e biológicos a interação que se mostrar mais interessante e promissora em relação a biossíntese de compostos antibacterianos.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens microbianas:

Foram estudadas 27 linhagens de actinobactérias endofíticas isoladas da raiz de *Tithonia diversifolia* pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Foram também usadas trinta e oito linhagens de actinobactérias raras de solo (envolvendo gêneros como *Krasilnikovia, Asanoa* e *Actinoplanes*, dentre outros) e seis linhagens de actinobactérias com genoma completamente sequenciado pertencentes à coleção de micro-organismos do laboratório do Dr. Roberto Kolter (*Harvard Medical School*): *Amycolatopsis* sp. AA4, *Streptomyces coelicolor, Streptomyces albus, Streptomyces* sp. E14, *Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces* sp. SPB78. Para indicação de bioatividade foram utilizadas duas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B728a, duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus subtilis* ATCC 6051, e uma levedura: *Candida albicans* MYA-2876.

3.2. Meios de cultura utilizados

Foram utilizados os meios de cultura:

- ISP2-líquido: 10 g extrato de malte, 4 g dextrose, 4 g extrato de levedura para 1 L de água Milli-Q;
- 2) ISP2-sólido: ISP2 líquido adicionado de 1,8% de ágar bacteriológico;
- 3) TSB 0,5x: 15 g de caldo tríptico de soja para 1 L de água Milli-Q;
- 4) TSA 0,5x: TSB 0,5x adicionado de 0,9% de ágar bacteriológico;
- 5) LB-líquidor: 25 g de LB (Himedia[®]) em 1 L de água Milli-Q,
- 6) LB-soft-ágar: 25 g de LB (Himedia[®]) em 1 L de água Milli-Q, 0,7 % ágar bacteriológico;
- 7) M9: para 1 L de água Milli-Q: 6,78 g de Na₂HPO₄.7 H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl; após autoclavar adicionar: 4 g de dextrose, 2 mL de solução 1M MgSO₄, 100 μL de solução 1M de CaCl₂, 1 mg de FeSO₄.7 H₂O, 1 mg de MnCl₂.4 H₂O, 1 mg de ZnSO₄.7 H₂O;
- 8) ISP4-modificado: para 1 L de meio de cultura: 1 g de K₂HPO₄, 1 g de NaCl, 2 g de (NH₄)₂SO₄,
 2 g de CaCO₃; após autoclavar adicionar: 10 g de dextrose, 1 g de MgSO₄, 100 μL de solução

1M de CaCl₂, 1 mg de FeSO₄ .7 H₂O, 1 mg de MnCl₂ .4 H₂O, 1 mg de ZnSO₄ .7 H₂O 10 g de dextrose.

- 9) R2YE+Fe-líquido: 103 g sacarose; 0,25 g K₂SO₄; 10,12 g MgCl₂ .6 H₂O; 10 g glicose; 0,1 g casaminoácidos; 5 g extrato de levedura, 800 mL água Milli-Q. Depois de autoclavar adicionar: 10 mL KH₂PO₄ 0,5 %; 80 mL CaCl₂ .2 H₂O 3,68 %; 15 mL L-prolina 20 %; 100 mL TES 5,73 %, pH 7,2; 2 mL de solução de elementos traço sem ferro; 5 mL NaOH 1 M; 1,5 mM FeCl₃ .6 H₂O), ambos líquido e sólido.
- 10) R2YE+Fe-sólido: R2YE+Fe líquido adicionado de 2,2% de ágar bacteriológico.

3.3. Identificação das linhagens endofíticas e distância filogenética entre elas

A identificação foi feita por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A extração do DNA genômico foi feita utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região de interesse utilizando o conjunto de primers 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') e 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). O produto de PCR foi purificado utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. Este foi enviado para sequenciamento utilizando o primer 27F, e a sequência obtida analisada utilizando os bancos de dados GenBank (http:// blast.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL et al., 1997) e EzTaxon-e (http://ez-taxone.ezbiocloud.net/ezt identify) (KIM et al., 2012).

Para análise da distância evolutiva entre as linhagens as sequências gênicas obtidas foram primeiramente alinhadas utilizando o *software* BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999). A árvore filogenética foi construída utilizando o *software* MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Foram utilizadas as sequências obtidas no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das linhagens endofíticas e as sequências mais similares a estas encontradas nos bancos de dados GenBank e EzTaxon-e, e *Pseudomonas aeruginosa* (KX548262) como grupo externo. A árvore foi construída utilizando o método de *Maximum Likelihoood* baseado no modelo Jukes-Cantor com distribuição discreta Gamma permitindo alguns sites serem evolutivamente irrelevantes (método JC+G+I), e *bootstrap* de 1000 repetições.

3.4. Condições de cultivo

3.4.1. Cultivo em meio sólido

As linhagens foram plaqueadas isoladamente e aos pares (1 µL do estoque de esporos em glicerol), utilizando meio ISP2, R2YE+ferro, TSA 0,5x em placas de 12 poços. Quando aos
pares, as linhagens foram aplicadas a 1 cm de distância entre si. As placas foram incubadas por sete dias a 30 °C. Pares realizados: 1) todos possíveis entre as linhagens endofíticas, 2) actinobactérias raras *versus* seis actinobactérias que possuem seu genoma completamente sequenciado (*Streptomyces albus, Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces* sp. E14, *Streptomyces* sp. SPB78, *Amycolatopsis* sp. AA4, *Streptomyces coelicolor*). O total de combinações foi de 418 (190 entre linhagens endofíticas e 228 entre actinobactérias raras e actinobactérias com genoma sequenciado).

3.4.2. Cultivo líquido e análise do filtrado

As interações selecionadas foram cultivadas em meio líquido para testar se a mesma atividade seria observada. Inicialmente foi feito cultivo em pequena escala (10 mL), testandose diferentes metodologias. Após o tempo de cultivo as culturas foram filtradas para obtenção do meio de cultura livre de células para posterior teste de bioatividade do filtrado de acordo com a atividade originalmente observada. As condições que apresentaram boa atividade foram ampliadas para estudos posteriores.

3.5. Análises de atividade antibacteriana

3.5.1. Análise direta em cultivo sólido

Após sete dias de cultivo as culturas foram cobertas com uma camada de LB *soft*-agar inoculado com cultura de *Staphylococcus aureus* (1:500), *Pseudomonas syringae* (1:400), *Escherichia coli* (1:1000), *Bacillus subtilis* (1:1000), *Candida albicans* (1:1000) ou *Amycolatopsis* sp. AA4 (1:500) (cultura em meio líquido, 16 h, 30 °C, 230 rpm) para a análise de bioatividade decorrente do co-cultivo. Após o tempo de incubação, as placas foram analisadas em busca de halos de inibição que são observados apenas quando a linhagem é cultivada com outra linhagem.

3.5.2. Extração e análise do cultivo em meio sólido

A zona de inibição foi cortada da placa de cultivo, macerada e extraída utilizando ou metanol ou acetato de etila (agitando por 3 h, 130 rpm). O solvente orgânico foi filtrado e seco para obtenção do extrato bruto. O extrato foi re-solubilizado em metanol:água (1:3) para testes de verificação da atividade antibacteriana.

3.5.3. Extração e análise do cultivo em meio líquido

O cultivo líquido das linhagens endofíticas (15 mL) foi extraído com 2 volumes de acetato de etila, que foi evaporado para obtenção do extrato bruto. Este foi solubilizado em 15 μ L de DMSO, e 1 μ L foi adicionado a 9 μ L de água e aplicado sobre uma camada de *soft*-ágar contendo o organismo bioindicador (ensaio de *spot-on-lawn*). A placa foi então incubada por 16 h a 30 °C e analisada em busca de halos de inibição.

3.6. Análises do perfil químico das amostras e isolamento do composto bioativo

Foi realizado fracionamento guiado por atividade biológica. Os extratos dos cultivos que exibiram a atividade esperada foram fracionados através de diversas metodologias na tentativa de purificação: extração em fase sólida, cromatografia em coluna clássica e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida: C₁₈ (Waters[®]), tC2 (Waters[®]), Accell Plus CM (Waters), DSC-NH2 (Supelco[®]) e HILIC (Chromabond[®]). Também foram utilizadas resinas XAD-4 e XAD-16.

Na cromatografía em coluna clássica foi utilizada resina de exclusão molecular Sephadex G-25. Na cromatografía líquida de alta eficiência (HPLC) foram utilizadas colunas analíticas, semi-preparativas e preparativa. Detectores utilizados: luz UV, *ligth-scattering* (ELSD) e de índice de refração (RID). Colunas utilizadas: colunas analíticas C6-Fenil (Ascentis[®], 250 x 10 mm, 2,7 μ m) e HILIC-Diol (Phenomenex[®] 250 x 10 mm, 3 μ m), colunas semi-preparativas C6-Fenil e HILIC-Diol (Phenomenex[®] 250 x 10 mm, 5 μ m), e coluna preparativa Shodex Asahipak GS-310 20G (500 x 20 mm). Foram utilizados ACN ou MeOH como fase móvel em sistema binário com água.

3.7. Imageamento por espectrometria de massas (MALDI-TOF)

As linhagens foram cultivadas em meio sólido isoladamente e aos pares por seis dias (30 °C). Para o imageamento destas colônias bacterianas foi utilizado o protocolo descrito por YANG e colaboradores (2012). Resumidamente, as regiões de interesse foram cortadas e dispostas em uma placa de aço (MSP 96 *target ground steel* BC, Bruker Daltonics), e cobertas com uma matriz composta de 1:1 ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB) e ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (*Universal* MALDI *Matrix*, Sigma-Aldrich) Após incubação de 16 horas a 37 °C para desidratação da amostra, a placa foi inserida no equipamento para análise utilizando os *softwares* FlexControl 3.0 e FlexImaging 3.0 (Bruker Daltonics) (YANG et al., 2012). Para calibração do equipamento foi utilizado *Peptide Calibration Standard* (Bruker

Daltonics). Foram realizadas análises em modo positivo e negativo, na faixa de *m/z* entre 200 e 3000. Estas análises foram realizadas no laboratório do Dr. Pieter Dorrestein (*University of California*, San Diego).

3.8. Análise direta das colônias em placa utilizando espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo nanoDESI e análise dos dados gerados

As análises por espectrometria de massas foram realizadas diretamente da placa de cultivo, utilizando a fonte de ionização nanoDESI (ND-MS). Após o respectivo tempo de cultivo, as placas foram colocadas no equipamento de ND-MS e sua posição foi ajustada manualmente para início das análises. Foram obtidos diversos espectros (MS e MS/MS para os íons mais abundantes) em diferentes posições da colônia e seus arredores. Foram feitas análises das culturas simples e aos pares para realizar a caracterização da influência que uma linhagem exerce sobre o perfil metabólico da outra. Estas análises foram realizadas no laboratório do Dr. Pieter Dorrestein (*University of California*, San Diego).

As centenas de espectros gerados foram analisados através de uma metodologia computacional descrita por WATROUS e colaboradores (2012). Brevemente, os espectros foram submetidos a uma série de comandos computacionais que os compila de acordo com sua similaridade, gerando espectros consenso. Esses espectros compilados foram então submetidos a comandos no software MATLAB que os compara e gera ligações entre grupos de espectros consenso semelhantes (considerando o padrão de fragmentação e massa do íon precursor dos respectivos espectros de MS/MS), gerando ao final uma rede molecular que é visualizada através do software *Cytoscape*. O gráfico gerado demonstra os resultados na forma de uma rede de moléculas que representa o perfil químico da amostra analisada (WATROUS et al., 2012). Esta metodologia é automatizada e está disponível *online* através da plataforma *Global Natural Products Social molecular networking* (GNPS) (https://gnps.ucsd.edu/).

4. Resultados e Discussão

4.1. Linhagens endofíticas

4.1.1. Identificação das linhagens

As sequências obtidas no sequenciamento do gene 16S rRNA foram analisadas em dois bancos de dados disponíveis *online*: GenBank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) e EzTaxon-e (http://ez- taxon-e.ezbiocloud.net/ezt_identify). As linhagens mais similares em cada banco de dados, juntamente com a porcentagem de similaridade com as linhagens em estudo (código

RTd) podem ser vistas da tabela 1. Esta tabela também indica de qual individuo cada linhagem foi isolada (planta 1 = P1, planta 2 = P2, planta 4 = P4 e planta 5 = P5).

Hospedeiro	Linhagem	Tamanho do <i>read</i> analisado (pb)	GenBank	%	EzTaxon-e	%
Р2	RTd 1	155	Streptomyces cacaoi subsp. asoensis (NR_043492)	97	Streptomyces neopeptinius (EU258679)	97
P2	RTd 2	147	Streptomyces chartreusis (NR_041216)	97	Streptomyces chartreusis (AB184839)	97
P1	RTd 4	957	Streptomyces arenae (NR_112609)	99	Streptomyces arenae (AB249977)	99
P1	RTd 5	623	Streptomyces shaanxiensis (NR_116681)	98	Streptomyces shaanxiensis (FJ465151)	99
P1	RTd 7	173	Streptomyces shaanxiensis (NR_116681)	88	Streptomyces kebangsaanensis (HM449824)	90
P1	RTd 8	1033	Streptomyces ciscaucasicus (NR_041085)	98	Streptomyces shaanxiensis (FJ465151)	99
P1	RTd 9	871	<i>Streptomyces</i> <i>arenae</i> strain (NR 112609)	99	Streptomyces arenae (AB249977)	99
P1	RTd 10	911	Streptomyces shaanxiensis (NR 116681)	97	Streptomyces shaanxiensis (FJ465151)	98
P1	RTd 11	895	Streptomyces malachitospinus (NR 041423)	99	Streptomyces malachitospinus (AB249954)	99
P1	RTd 12	882	Streptomyces aureofaciens (NR_119261)	95	Streptomyces aburaviensis (AY999779)	97
P1	RTd 13	835	Streptomyces shaanxiensis (NR_116681)	98	Streptomyces shaanxiensis (FJ465151)	99
P1	RTd 14	792	Streptomyces bottropensis (NR_115571)	98	Streptomyces bottropensis (KB911681)	99
P2	RTd 15	775	Streptomyces bottropensis (NR 115571)	98	Streptomyces bottropensis (KB911681)	99

Tabela 1: Linhagens pertencentes aos bancos de dados GenBank e EzTaxon-e que apresentaram maior similaridade (representada em porcentagem) com as linhagens endofíticas isoladas de *Tithonia diversifolia* utilizadas neste estudo (código RTd).

P4			Streptomyces		Streptomyces	
	RTd 16	808	shaanxiensis	99	shaanxiensis	99
			(NR_116681)		(FJ465151)	
			Streptomyces		Streptomyces	
P4	RTd 17	955	cyaneofuscatus	95	pratensis	98
			(NR_115383)		(JQ806215)	
			Streptomyces		Streptomyces	
P4	RTd 18	774	cyaneofuscatus	96	pratensis	99
			(NR_115383)		(JQ806215)	
			Streptomyces		Streptomyces	99
P4	RTd 19	804	lincolnensis	97	lincolnensis	
			(NR_041104)		(X79854)	
		774	Streptomyces	95	Streptomyces	98
P4	RTd 22		ramulosus		ramulosus	
			(NR_043503)		(DQ026662)	
			Streptomyces		Streptomyces	
P4	RTd 23	848	shaanxiensis	97	shaanxiensis	98
			(NR_116681)		(FJ465151)	
		374	Streptomyces	97	Streptomyces	99
P4	RTd 24		pratensis		pratensis	
			(NR_125621)		(JQ806215)	
		881	Streptomyces	98	Streptomyces	98
P4	RTd 25		shaanxiensis		shaanxiensis	
			(NR_116681)		(FJ465151)	
P5			Streptomyces	98	Streptomyces	99
	RTd 26	852	shaanxiensis		shaanxiensis	
			(NR_116681)		(FJ465151)	
		767	Streptomyces	96	Streptomyces	98
P5	RTd 27		shaanxiensis		shaanxiensis	
			(NR_116681)		(FJ465151)	
			Streptomyces	a -	Streptomyces	<i>.</i> -
P5	RTd 28	813	shaanxiensis	98	shaanxiensis	99
			(NR_116681)		(FJ465151)	
D5	рта 2 0	100	nada	_	nada	
r J	K1u 23	100	llaua	-	llaua	-
Р5	RTd 30	190	Streptomyces		Streptomyces	97
			shaanxiensis	90	shaanxiensis	
			(NR_116681)		(FJ465151)	
Р5	RTd 31	830	Streptomyces	97	Streptomyces	99
			neyagawaensis		ossamyceticus	
			(NR_112498)		(JN566029)	

Como pode ser visto, todas linhagens são pertencentes ao gênero *Streptomyces*; entretanto, estudos mais específicos de fenótipo e outros genes são necessários para chegar a uma conclusão mais precisa a respeito da espécie. Portanto, todas essas linhagens devem ser identificadas como *Streptomyces* sp. seguido do código da linhagem (exemplo: *Streptomyces* sp. RTd 1). A única exceção é a linhagem RTd 29, pois o sequenciamento do DNA obtido não

ficou bom, apresentando apenas 100 pb, o que não permitiu sua identificação. Entretanto, esta linhagem é morfologicamente muito semelhante às linhagens que foram identificadas como sendo *Streptomyces shaanxiensis*, portanto, provavelmente esta linhagem também pertence ao gênero *Streptomyces*.

Nota-se que várias linhagens (44,4%) foram mais similares à espécie *Streptomyces shaanxiensis*. Portanto, pode-se inferir que linhagens desta espécie possam ter alguma importância ecológica/evolutiva para a planta hospedeira (*T. diversifolia*), ou talvez tenha vantagem ao colonizar as raízes da planta em questão. Buscas na literatura mostraram que de fato esta linhagem está relacionada a efeitos positivos em rizosferas. Esta espécie foi descrita em 2012 e recebeu este nome por ter sido isolada de solo da cidade de Shaanxi (China) (LIN et al., 2012). Uma pesquisa realizada em 2013 por Lopes e colaboradores demonstrou a dominância desta linhagem em microbiotas de solo capazes de biodegradar molinato, um tiocarbamato utilizado como herbicida (LOPES et al., 2013). Esta linhagem também foi isolada de solubilização de potássio (YUFENG et al., 2015). Micro-organismos capazes de solubilizar potássio são de grande relevância na rizosfera por aumentar a disponibilidade deste nutriente para a planta, causando, portanto, efeitos positivos em seu crescimento (MEENA; MAURYA; VERMA, 2014).

As sequências gênicas obtidas para cada linhagem endofítica, bem como as sequências mais similares depositadas nos bancos de dados acessados foram utilizadas para montar a árvore filogenética para analisar a distância evolutiva entre as linhagens em estudo (figura 21). A árvore obtida corrobora as similaridades fenotípicas observadas bem como a análise por similaridade nos bancos de dados acessados. Pode-se observar proximidade entre certas linhagens, como por exemplo: RTd 17, 18 e 24; RTd 5, 10 e 13; RTd 4 e 9; RTd 14 e 15; e RTd 2 e 11, sendo que na maioria dos casos essa proximidade também é corroborada por similaridade fenotípica entre essas linhagens. Dentre todas as linhagens, a RTd 19 foi a única que não apresentou grande proximidade com alguma outra linhagem endofítica.



Figura 22: Árvore filogenética construída com as sequências obtidas no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA das linhagens endofíticas e com as sequências mais similares encontradas nos bancos de dados GenBank e EzTaxon-e, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (KX548262) como grupo externo. A árvore foi construída utilizando o método de *Maximum Likelihoood* baseado no modelo Jukes-Cantor com distribuição discreta Gamma permitindo alguns sites serem evolutivamente irrelevantes (método JC+G+I). Valores de *bootstrap* (com 1000 análises) acima de 50% estão listados na árvore.

4.1.2. Potencial antimicrobiano das linhagens em estudo

Visando conhecer melhor as linhagens endofíticas foram realizadas triagens qualitativas de atividade antimicrobiana (contra levedura, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas) das linhagens. Para isso, utilizou-se o meio de cultura mais comum para *Streptomyces*, o ISP2, e foram feitos testes em meio de cultivo líquido e sólido para acessar de maneira mais abrangente o potencial de cada linhagem. Os cultivos líquidos foram extraídos com acetato de etila e extrato bruto obtido foi submetido ao ensaio. No caso do cultivo em meio sólido as colônias foram ensaiadas diretamente quanto à produção de compostos bioativos, sem passar por etapa de extração de metabólitos. Ambos cultivos foram testados contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. syringae* e *C. albicans*.

Os resultados obtidos (tabela 2) mostram que de fato micro-organismos endofíticos são boas fontes de produtos naturais bioativos, já que 85,2% das linhagens exibiram atividade contra pelo menos uma das linhagens microbianas testadas em pelo menos uma condição de cultivo. Apenas as linhagens RTd 4, RTd 5, RTd 7 e RTd 12 não apresentaram nenhuma atividade em nenhuma condição testada.

Foi observada maior atividade contra bactérias Gram-negativas. É importante ressaltar que *P. syringae* pode trazer ao ensaio um contexto ecológico com relação à simbiose com a planta hospedeira. *P. syringae* é uma bactéria Gram-negativa amplamente estudada como um fitopatógeno de diversas espécies de plantas, causando diversos sintomas (FEIL et al., 2005; O'BRIEN e WRIGHT, 2011). Curiosamente, esta foi a linhagem que foi mais inibida pelas linhagens endofíticas: 70,4% das linhagens inibiram *P. syringae* em pelo menos uma condição de cultivo.

						ISP2				
Linhagem		L	íquido)				Sólie	do	
	B.S.	S.A.	E.C.	P.S.	C.A.	В.	S. S.A.	E.C.	P.S.	C.A.
RTd 1									+	
RTd 2				+				+		
RTd 4										
RTd 5										
RTd 7										
RTd 8		+	+			+	· +		+	+
RTd 9	+	+		+				+		
RTd 10		+				+	· +	+		+
RTd 11			+						+	
RTd 12										
RTd 13						+				
RTd 14	+	+								
RTd 15				+						
RTd 16		+	+			+	· +		+	
RTd 17			+	+	+			+	+	
RTd 18	+	+	+	+	+			+	+	
RTd 19		+						+	+	
RTd 22	+	+			+					
RTd 23			+			+	· +	+	+	
RTd 24	+	+	+	+	+			+	+	
RTd 25							+		+	
RTd 26			+			+	· +		+	
RTd 27			+			+	· +		+	
RTd 28		+	+			+	· +	+	+	
RTd 29		+	+			+	+	+	+	
RTd 30			+			+	· +		+	
RTd 31	+			+	+			+		
%	22,2	40,7	44,4	25,9	18,5	37	.0 37.0	40,7	55,5	7,4

Tabela 2: Atividade antimicrobiana das linhagens endofíticas cultivadas em meio ISP2 liquido e sólido.

S.A.: Staphylococcus aureus ATCC 6538; B.S.: Bacillus subtilis ATCC 6051; E. coli ATCC 25922; P.S.: Pseudomonas syringae pv syringae; C.A.: Candida albicans MYA-2876.

+: linhagem apresentou atividade.

%: porcentagem de linhagens que apresentaram atividade.

4.1.3. Ensaio fenotípico das co-culturas entre linhagens endofíticas

Para realização deste ensaio foi escolhido um meio rico em nutrientes, o R2YE+Fe, para eliminar ao máximo a competição passiva por influência da depleção de nutrientes no fenótipo

analisado (competição exploradora) e tentar atribuir o resultado obtido à competição ativa entre as linhagens devido a interações químicas entre as estas através da produção de compostos antimicrobianos (competição por interferência) (GHOUL e MITRI, 2016). Foram selecionadas 20 linhagens para realização desses ensaios de acordo com uma desreplicação fenotípica realizada em diversos meios de cultura.

Houve um grande número de casos de inibição no crescimento das colônias, e algumas interações também inibiram ou estimularam o crescimento de hifas aéreas. As figuras 23 e 24 mostram estes dados. As linhagens exibiram alta taxa de interação, sendo a maioria delas negativas para o desenvolvimento da linhagem pareada. Observou-se que 85% das linhagens são capazes de inibir o crescimento de 95% das linhagens, enquanto 35% das linhagens são capazes de inibir o desenvolvimento de hifas aéreas de 35% das linhagens. No caso de interação positiva, apenas 15% das linhagens teve seu desenvolvimento de hifas aéreas estimulado por 25% das linhagens. Isto pode ser um indicativo que em de seu hospedeiro original possa haver algum controle populacional, o que talvez seja importante para manter o equilíbrio da relação positiva entre o hospedeiro e os organismos endofíticos.



Figura 23: Interações entre as diversas linhagens de actinobactérias endofíticas. Quadrados vermelhos indicam que houve inibição do crescimento da colônia.

Algumas linhagens tiveram uma resposta mais constante diante dos diversos pareamentos. Por exemplo, as linhagens RTd 1 e RTd 19 tiveram seu crescimento inibido por diversas linhagens (alguns exemplos podem ser vistos na figura 25). A linhagem RTd 4, por sua vez, inibiu o crescimento e formação de hifas aéreas de várias linhagens (alguns exemplos podem ser vistos na figura 26). A linhagem RTd 11 também inibiu o crescimento de diversas linhagens e também foi capaz de estimular o crescimento de hifas aéreas em algumas linhagens e inibir em outras, como ilustrado na figura 27 (no caso dos exemplos aqui mostrados, as hifas aéreas são brancas). Já as linhagens RTd 12, RTd 15, RTd 19 e RTd 31 não inibiram nenhuma linhagem.



Figura 24: Interações entre as diversas linhagens de actinobactérias endofíticas. Quadrados vermelhos indicam que houve inibição do crescimento de hifas aéreas da colônia. Quadrados verdes indicam que houve indução do crescimento de hifas aéreas da colônia.



Figura 25: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 1 = RTd 1). As linhagens RTd 1 e RTd 19 têm seu crescimento inibido por várias outras linhagens.



Figura 26: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 4 = RTd 4). A linhagem RTd 4 inibe o crescimento e formação de hifas aéreas de várias outras linhagens.



Figura 27: Interações entre linhagens endofíticas. Os números se referem ao código das linhagens (ex: 11 = RTd 11). A linhagem RTd 11 estimula o crescimento de hifas aéreas nas linhagens RTd 7 e RTd 23, mas inibe o crescimento destas na linhagem RTd 15.

Esses dados são interessantes pois, além de indicarem uma possível relação ecológica entre as linhagens, ainda permitem a inferência de que os pares estão de fato tendo seu metabolismo alterado devido ao co-cultivo. Em especial quando a interação interfere no crescimento de hifas aéreas, pois isto pode ser considerado como uma alteração no metabolismo secundário, tendo em vista que a regulação deste está relacionada a regulação do desenvolvimento de hifas aéreas (ambos os casos são controlados pelo regulador global DasR) (RIGALI, 2008). Além disso, a condição de estresse de inibição de crescimento pode ser considerada como um desafio ambiental para o organismo, podendo levar à ativação de CGBs silenciados sob condições ótimas de cultivo. Portanto, os dados obtidos corroboram a hipótese de que interações microbianas influenciam no metabolismo das linhagens em co-cultura.

4.1.4. Ensaios antibacterianos

Tendo em vista a grande taxa de inibição observada entre as linhagens endofíticas, suspeitou-se que a maioria das linhagens já estivessem produzindo intrinsicamente antibióticos contra bactérias Gram-positivas no meio utilizado (e por isso estariam inibindo as demais linhagens, que são todas *Streptomyces*), sem precisar de um estímulo proveniente da co-cultura. Para avaliar isto, as linhagens foram triadas em cultivo puro em R2YE+Fe para atividade contra *S. aureus*, por ser também uma bactéria Gram-positiva.

A tabela 3 mostra os resultados deste ensaio, juntamente com o resultado do ensaio contra *S. aureus* das co-culturas, mostrando para estas apenas os casos em que houve indução na produção de antibióticos. Esta tabela também mostra o número de linhagens endofíticas que cada uma das linhagens inibiu o crescimento quando em co-cultura. Como pode ser visto, apenas 20% das linhagens apresentou atividade contra *S. aureus*, sendo que 85% das linhagens foi capaz de inibir o crescimento de outra linhagem endofítica. A partir desta observação podese inferir que os antibióticos que inibem o crescimento do par em co-cultura não seriam de amplo espectro, mas sim específicos contra *Streptomyces*, revelando uma interação mais íntima entre as linhagens endofíticas, corroborando um *status* simbiótico entre estas linhagens. É válido salientar que a grande maioria dos fitopatógenos Gram-positivos descritos são do táxon Actinobacteria, portanto esse resultado mostra também um potencial destas linhagens na proteção de seu hospedeiro (FRANCIS; HOLSTERS; VEREECKE, 2010).

	Atividade co	ntra <i>S. aureus</i>	Número de linhagens	
Linhagem	Cultura pura	Co-cultura*	endofíticas inibidas em co- cultura	
RTd 1			7	
RTd 2			9	
RTd 4		induzida (3)	15	
RTd 5			2	
RTd 7			2	
RTd 8		induzida (1)	2	
RTd 11	+		18	
RTd 12			0	
RTd 14		induzida (6)	2	
RTd 15		induzida (1)	2	
RTd 16			2	
RTd 17	+		9	
RTd 18	+		6	
RTd 19		induzida (6)	0	
RTd 22	+		8	
RTd 23			1	
RTd 26			2	
RTd 27			2	
RTd 30			2	
RTd 31			0	

Tabela 3: Atividade contra *S. aureus* dos cultivos puros e co-cultivo das linhagens endofíticas selecionadas em meio R2YE+Fe. A tabela também mostra o número de linhagens endofíticas que cada linhagem foi capaz que inibir quando em co-cultivo.

* números em parênteses indicam quantas linhagens foram capazes de induzir a atividade observada. +: linhagem apresentou atividade.

Os co-cultivos também foram triados em busca de pares que estimulassem atividade inibitória contra *P. syringae*. Alguns pares exibiram nova atividade antibiótica devido a co-cultura, e foram também observados diversos casos em que a interação entre linhagens endofíticas aumentou consideravelmente o tamanho do halo de inibição (exemplo mostrado na figura 28). Este é um dado interessante já que *P. syringae* é descrita como fitopatógeno para algumas plantas (O'BRIEN e WRIGHT, 2011), podendo, portanto, ter alguma importância ecológica para este fenômeno observado.



Figura 28: Exemplo de interação em que o halo de inibição contra *P. syringae* é aumentado devido a presença de outra linhagem (A) e o controle negativo deste experimento (B). Os cortes no ágar foram feitos para evitar a interação entre colônias como controle negativo para o fenômeno observado.

Para esta abordagem de co-cultura foram encontradas dificuldades com relação à reprodutibilidade dos resultados. Provavelmente a falta de reprodutibilidade dos resultados observada é devida ao fato do meio de cultura utilizado ser complexo (R2YE+Fe tem muitos componentes), o que gera muita variabilidade durante seu preparo. Após diferentes repetições em diferentes meios de cultura de cada uma das interações que estimulam uma nova bioatividade, foi escolhida uma interação que apresentou reprodutibilidade do resultado: *Streptomyces* sp. RTd 5 x *Streptomyces* sp. RTd 8.

4.1.5. Interação entre as linhagens Streptomyces sp. RTd 5 e Streptomyces sp. RTd 8

Essa interação foi escolhida devido ao fato de a) RTd 5 estimular atividade inibitória contra *S. aureus* em RTd 8, b) RTd 5 inibir a produção de um pigmento escuro em RTd 8, c) RTd 8 inibir o crescimento da linhagem RTd 5 (Figura 29, 30).



Figura 29: Cultivos simples e co-cultura das linhagens *Streptomyces* sp. RTd 5 e *Streptomyces* sp. RTd 8 (R2YE+Fe, 30 °C, 8 dias). As três culturas foram sobrepostas no sétimo dia com uma camada de meio LB *soft*-ágar contendo *S. aureus*.



Figura 30: Co-cultura das linhagens *Streptomyces* sp. RTd 5 e *Streptomyces* sp. RTd 8 (R2YE+Fe, 30 °C, 7 dias). O ágar foi cortado para evitar interação entre as colônias como controle negativo para o fenômeno observado. Pode-se notar a influência da presença da linhagem *Streptomyces* sp. RTd 5 na produção de pigmento escuro pela linhagem *Streptomyces* sp. RTd 8.

Inicialmente foram testadas algumas metodologias na tentativa de obter o composto com atividade antibiótica em meio líquido: inoculando ambas linhagens ao mesmo tempo, adicionando esporos da linhagem indutora ao cultivo da linhagem induzida, adicionando diferentes concentrações do sobrenadante da cultura da linhagem indutora no cultivo da linhagem induzida. Como não foi obtido sucesso nessa abordagem, testou-se a extração do composto bioativo da cultura em meio sólido, entretanto não foi obtido sucesso novamente. Provavelmente a metodologia utilizada não foi adequada para isolar o composto bioativo. Apesar de não ter sido possível identificar o composto bioativo induzido em co-cultura, o fato de haver indução deste composto, bem como a produção diferenciada de pigmentos por uma das linhagens corrobora mais uma vez a influência do co-cultivo no metabolismo secundário microbiano. Na tentativa de identificar o composto induzido sem passar pela etapa de purificação, foi realizada uma análise metabolômica desta interação por espectrometria de massas utilizando fonte de ionização do tipo nanoDESI com posterior construção de uma rede molecular baseada nos espectros de MS/MS obtidos (figura 31). Esta fonte de ionização permite análise direta das interações ainda em placa de cultura, o que possibilita ter uma visão global e rápida da alteração do metabolismo secundário devido à interação.



Figura 31: Rede molecular construída com dados obtidos da análise por nanoDESI das linhagens selecionadas cultivadas de maneira simples e pareadas (R2YE+Fe, 30 °C, 5 dias). Verde: exclusivo RTd 5 e inibido em co-cultura; Azul: exclusivo RTd 8 e inibido em co-cultura; Roxo: produzido por ambas linhagens; Vermelho: exclusivo RTd 5 e 8 em co-cultura; Rosa: produzido tanto em cultivo puro quanto em co-cultivo. Tamanho dos nodos (*clusters*) refletem o número de espectros adquiridos para o composto em questão.

A interação entre *Streptomyces* sp. RTd 5 e *Streptomyces* sp. RTd 8 foi então analisada diretamente em placa de Petri após cinco dias de cultivo em meio R2YE+Fe. Os espectros de massas coletados foram analisados e compilados utilizando a plataforma GNPS a fim de gerar a rede molecular observada na figura 31. Nodos (*clusters*) em cinza representam compostos que compõem o meio de cultura utilizado apresentando grande prevalência na análise realizada, evidenciando a complexidade deste meio de cultura. Demais nodos coloridos representam

compostos produzidos pelas bactérias. Redes que interligam o meio de cultura aos compostos microbianos podem indicar compostos metabolizados parcialmente pelos micro-organismos, ou que os compostos microbianos em questão apresentam similaridades com os compostos do meio de cultura, como por exemplo compostos que apresentam cadeias glicosiladas.

De todos os compostos induzidos em co-cultura (nodos em vermelho) apenas um deles foi detectado em duplicata, sendo este, portanto, um candidato ao composto antibiótico induzido. Foi realizada uma busca manual do íon de *m/z* 285,94 referente a este composto utilizando os bancos de dados *online Dictionary of Natural Products* (<u>http://dnp.chemnetbase.com</u>) e o software *Antibase*, mas nenhum composto encontrado foi compatível com o espectro obtido (figura 32).



Figura 32: Espectro de massas correspondente a um nodo (*cluster*) da rede molecular que representa um íon detectado apenas em co-cultura e em duplicata (m/z 285,94).

A análise visual da rede gerada mostra a complexidade desta interação. Foram observados casos de compostos que foram inibidos em co-cultura (nodos em verde e azul), compostos que foram exclusivamente produzidos em co-cultura (nodos em vermelho), e compostos que foram produzidos em ambas condições (nodos em rosa). Nodos isolados que não formaram nenhuma rede molecular representam potenciais compostos novos, por não terem similaridade com nenhum outro composto analisado. O GNPS conta com um banco de dados com cerca de 18 mil compostos depositados (WANG et al., 2016), e, durante a montagem da rede molecular esse banco de dados foi acessado. Nenhum dos compostos representados pelos nodos apresentou similaridade com os compostos depositados neste banco de dados, evidenciando a grande chance desses micro-organismos biossintetizarem novos compostos.

4.2. Actinobactérias raras de solo

4.2.1. Ensaios fenotípicos

As linhagens de actinobactérias de solo raras foram também cultivadas em ISP2 e R2YE+Fe e testadas aos pares com seis diferentes actinobactérias que possuem seu genoma sequenciado (*Amycolatopsis* sp. AA4, *Streptomyces coelicolor, Streptomyces albus, Streptomyces* sp. E14, *Streptomyces viridochromogenes, Streptomyces* sp. SPB78). Não foram observadas muitas interações neste caso. Este é um dado interessante, pois sugere que linhagens isoladas de um mesmo ambiente (no caso, endofíticos de uma mesma planta), são mais propensas a interagir entre si.

Houve poucos casos em que uma linhagem interferiu no desenvolvimento da outra: somente uma linhagem teve seu crescimento inibido e duas linhagens tiveram desenvolvimento de hifas aéreas alterado. É interessante comparar este resultado com o resultado obtido no ensaio de antagonismo entre as linhagens endofíticas. Como descrito anteriormente, houve uma grande taxa de inibição de crescimento estre estas linhagens que habitam a mesma espécie de planta. No caso das linhagens de actinobactérias raras, elas são provenientes de solos de diversos locais do mundo e diferentes biomas, portanto, jamais teriam se encontrado em seu ambiente natural, ao contrário das linhagens endofíticas, em que há uma possibilidade delas co-habitarem a rizosfera em seu ambiente natural. Isto pode corroborar a hipótese sugerida de que a alta taxa de antagonismo tenha um papel ecológico neste sistema simbiótico, talvez como controle populacional para manter uma relação harmônica com a planta.

Um resultado interessante, que não foi observado no caso de interações entre linhagens endofíticas, foi o estímulo de crescimento da colônia: a linhagem *Amycolatopsis* sp. AA4 estimulou o crescimento da linhagem *Asanoa* sp. T033 (figura 33). O fluido filtrado da cultura em meio líquido de *Amycolatopsis* sp. AA4 quando adicionado ao meio de cultura também é capaz de estimular este crescimento (figura 33C). Este fluido foi particionado com acetato de etila, e esta atividade foi observada na fração aquosa, indicando a natureza polar do composto responsável por este fenômeno observado.

66



Figura 33: Linhagem *Amycolatopsis* sp. AA4 estimulou o crescimento da linhagem *Asanoa* sp. T033 (meio R2YE+ferro, 30 °C, 7 dias). A) *Asanoa* sp. T033 em cultivo puro. B) Co-cultura entre *Asanoa* sp. T033 e *Amycolatopsis* sp. AA4. C) *Asanoa* sp. T033 em cultivo puro crescendo em meio de cultura em que foi adicionado o sobrenadante filtrado de uma cultura em meio líquido de *Amycolatopsis* sp. AA4.

4.2.2. Ensaios antibacterianos

Foi observada apenas uma interação que exibiu nova atividade antibacteriana, que se mostrou robusta (alta reprodutibilidade): entre a linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 isolada de solo e *Streptomyces* sp. SPB78, linhagem que possui genoma sequenciado que foi isolada de um besouro (figura 34).

O gênero *Krasilnikovia*, pertencente à família Micromonosporaceae, foi descrito pela primeira vez em 2007 (ARA e KUDO, 2007), e não há na literatura nenhum estudo químico ou biológico deste gênero. A interação entre esta linhagem e *Streptomyces* sp. SPB78 estimula em *Krasilnikovia* sp. T082 a biossíntese de um antibiótico capaz de inibir o crescimento de *Amycolaptosis* sp. AA4 (figura 34), linhagem conhecida por ser resistente a pelo menos 15 antibióticos com diferentes mecanismos de ação e pertencentes a classes distintas (D'COSTA et al., 2006). Esta interação foi também testada contra *E. coli*, *P. syringae*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans*, tendo sido observado halo de inibição apenas contra bactérias Gram-positivas.

Inicialmente esta interação foi observada em meio R2YE+Fe, entretanto, após testar diferentes meios de cultura, decidiu-se estudar essa interação em meio TSA 0,5x 0,9% ágar por exibir maior halo de inibição. Como pode ser visto na figura 34, o composto indutor secretado por *Streptomyces* sp. SPB78 é difusível, alcançando até a segunda colônia de *Krasilnikovia* sp. T082 (cerca de 2 cm de distância de *Streptomyces* sp. SPB78). O fato da segunda colônia de *Krasilnikovia* sp. T082 apresentar halo menor que a primeira mostra que nesta zona a concentração do composto indutor é menor, o que é esperado de um composto que esteja sendo secretado pela colônia indutora *Streptomyces* sp. SPB78.



Figura 34: Linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 cultivada isoladamente (A) e em interação com a linhagem *Streptomyces* sp. SPB78 (B), em meio de cultura TSA 0,5x (8 dias, 30 °C). Em ambos os casos a cultura foi coberta com uma camada de LB *soft-ágar* inoculado com a linhagem *Amycolatopsis* sp. AA4 após sete dias de cultivo. (B) mostra o halo de inibição contra *Amycolatopsis* sp. AA4 nas colônias mais próximas de *Streptomyces* sp. SPB78.

4.2.3. Estudos químicos e biológicos

Ao selecionar esta interação para posterior estudo foram levantadas duas perguntas principais: qual o mecanismo de indução e qual antibiótico *Krasilnikovia* sp. T082 está biossintetizando.

4.2.3.1. Investigação da atividade indutora

As primeiras perguntas feitas para começar a desvendar o mecanismo de indução da nova atividade foram se esta seria mesmo devido a algum composto secretado por *Streptomyces* sp. SPB78 ou aconteceria devido a depleção de nutrientes, e, caso a primeira hipótese fosse a correta, se a presença de *Krasilnikovia* sp. T082 seria necessária para que *Streptomyces* sp. SPB78 secrete este composto indutor. Para testar estas hipóteses, *Streptomyces* sp. SPB78 foi cultivado em meio líquido e seu filtrado (livre de células) foi adicionado próximo a uma colônia de *Krasilnikovia* sp. T082 e incubado. Como pode ser visto na figura 35, apenas o filtrado já é capaz de induzir esta atividade (o menor volume capaz de estimular esta bioatividade foi 10 µL de filtrado). Portanto, a indução acontece via um composto que é intrinsecamente biossintetizado por *Streptomyces* sp. SPB78, sem a necessidade da interação.

Para entender um pouco mais acerca das características de estabilidade deste composto indutor foram realizados alguns testes com o extrato: em pH extremos (1 e 14, por 3 horas) e em alta e baixa temperaturas (85 °C e -80 °C, por 3 horas). O composto foi estável sob pH extremos e a baixas temperaturas, entretanto perdeu a atividade quando submetido a alta temperatura.



Figura 35: A: Linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 cultivada isoladamente por 6 dias, sobreposta com *Amycolatopsis* sp. AA4 e incubada por mais um dia. Não foi observado halo de inibição. B: Linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 cultivada isoladamente por 4 dias, 40 μ L de filtrado foram adicionados e a placa incubada por mais dois dias e então sobreposta com *Amycolatopsis* sp. AA4 e incubada por mais um dia. *Amycolatopsis* sp. AA4 não foi capaz de crescer, indicando a produção do composto antibiótico. C: Apenas filtrado adicionado ao meio de cultura, que foi incubado por 6 dias, sobreposto com *Amycolatopsis* sp. AA4 e incubado por mais um dia, como controle negativo para a atividade observada em (B).

Tendo em vista que a cultura líquida de *Streptomyces* sp. SPB78 foi capaz de induzir a bioatividade observada, foi realizado cultivo em escala ampliada para iniciar os fracionamentos para isolamento do(s) composto(s) responsável(is) por este estímulo. Inicialmente foi realizada partição líquido-líquido com acetato de etila, e a atividade foi observada apenas na fase aquosa. Na tentativa de obter a atividade na fase orgânica, foi também testada extração com este mesmo solvente em diferentes pH (3 e 11), mas o composto permaneceu na fase aquosa.

Foi testada também extração em fase sólida, utilizando cartuchos C₁₈, HILIC e DSC-NH₂, bem como coluna clássica com resina XAD-4 e XAD-16, utilizando gradiente crescente de MeOH:H₂O. Para todos os casos, exceto DSC–NH₂, o composto não interagiu com a fase estacionária, tendo sido recuperado na primeira fração. Para DSC–NH₂ o composto bioativo interagiu fracamente com a fase estacionária, tendo sido observada atividade na fração proveniente primeira lavagem do cartucho com água (segunda fração). Apesar de não permitir fracionamento com solvente orgânico, essas técnicas ajudaram a reduzir a complexidade da amostra para passos posteriores. Para prosseguir com o isolamento foram escolhidas as resinas XAD, por ser um processo mais rápido e por permitir reutilização da resina.

Após limpeza com as resinas XAD-4 e XAD-16, a amostra foi fracionada em HPLC-DAD utilizando coluna C₆-Fenil, em gradiente de ACN:H₂O (Vazão: 4mL/min. Gradiente: 6 min em 5%, 5-100% em 5 min, 10 min em 100%, 100-5% em 2 min, 7 min em 5%). O fracionamento foi feito de acordo com o tempo, em intervalos de 5 em 5 minutos, e todas frações obtidas foram concentradas e testadas. A fração com atividade foi a primeira, evidenciando a natureza polar deste composto. Outro fracionamento foi então realizado, coletando cada minuto separadamente, e o minuto 4 mostrou a atividade (mostrando que o composto com bioatividade não foi retido na fase estacionária). Esta fração bioativa apresentou 60% da massa total do extrato, contendo, portanto, muitos compostos ainda em mistura.

Tendo em vista a natureza polar deste composto e impossibilidade de fracioná-lo em coluna C₆-Fenil, foi realizado fracionamento em coluna HILIC (Phenomenex®, 25 cm x 10 mm, 5 μ m) do extrato após limpeza com as resinas XAD. Foi realizado um gradiente de ACN:H₂O (vazão: 4mL/min. Gradiente: 2 min em 90%, 90-85% em 3 min, 9 min em 85 %, 85-50% em 2 min, 4 min em 50%, 50-20% em 1 min, 5 min em 20%, 20-90% em 2 min, 5 min em 90%) e o fracionamento foi feito como mostrado na figura 36, que apresentaram massa mais regularmente distribuída entre as frações, evidenciando que esta coluna é mais adequada para o fracionamento desta amostra. As frações Ind-4 e Ind-5 mostraram atividade, e a combinação das frações Ind-2 e Ind-3 também exibiu uma fraca atividade. Este resultado revelou que a atividade indutora é devido a um conjunto de compostos.



Figura 36: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD da amostra com atividade indutora em coluna HILIC-Diol, após limpeza com resinas XAD-4 e XAD-16. As marcações no cromatograma indicam as frações coletadas. Vazão: 4mL/min. Gradiente (ACN:H₂O): 2 min em 90%, 90-85% em 3 min, 9 min em 85 %, 85-50% em 2 min, 4 min em 50%, 50-20% em 1 min, 5 min em 20%, 20-90% em 2 min, 5 min em 90%.

Durante as realizações destas análises o laboratório adquiriu a resina Sephadex G-25, que permite a realização de cromatografia por exclusão molecular (CEM) com baixa influência de polaridade na separação, tendo capacidade de fracionar moléculas entre 1-5 kDa. Testou-se então a utilização desta resina para pré-purificação da amostra antes de submeter à HPLC-DAD, para diminuir o gasto de horas de equipamento e acetonitrila (esta cromatografia é realizada em água). No primeiro teste realizado foram coletadas apenas três frações: uma de compostos maiores que 5 kDa, outra de compostos entre 1-5 kDa e outra de compostos menores que 1 kDa.

As duas últimas frações apresentaram atividade, mostrando que os compostos responsáveis pela bioatividade têm tamanhos diversos. Foi escolhida a fração de 1-5 kDa para dar continuidade. Esta fração foi novamente submetida a fracionamento em Sephadex G-25. Desta vez foi utilizada uma coluna maior e de menor diâmetro, a fim de aumentar a capacidade de fracionamento. Foram coletadas 12 frações, que foram analisadas por HPLC-DAD-ELSD, combinadas de acordo com a semelhança entre os cromatogramas e testadas. A fração F3_6 (total obtido de 31,8 mg proveniente de 1 litro de meio de cultura) exibiu atividade quando foram testados 4 mg desta (figura 37). O perfil cromatográfico desta amostra pode ser visto na figura 38.



Figura 37: Atividade contra *Amycolatopsis* sp. AA4 observada quando a fração F3_6 foi testada, com respectivos controles positivo (amostra pré-fracionamento) e negativo (apenas solvente foi adicionado



Figura 38: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD-ELSD (λ 190 nm) analítico da amostra com atividade indutora F3_6 em coluna HILIC-Diol (10 cm x 4,6mm, 2,6 µm). Vazão: 0,85 mL/min. Gradiente (ACN:H₂O): 85% por 2 minutos, 85-65% em 6 minutos, 65% por 6 minutos.

à cultura).

Apesar de ainda apresentar certa complexidade, esta amostra foi enviada para análise por RMN de ¹H (500 MHz) para ter ideia da composição da mesma. Os dados obtidos (figura 39) mostram que esta amostra é de natureza glicosídica devido aos sinais presentes na região entre δ 3,4-4,2 e a presença de um sinal referente a hidrogênio anomérico de açúcares em δ 5,35.



Figura 39: Espectro de RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) da amostra F3_6, que apresenta atividade indutora da atividade antibiótica observada em *Krasilnikovia* sp. T082.

Esta amostra bioativa foi submetida a fracionamento em coluna HILIC semipreparativa, que exibiu um perfil diferente da análise analítica (figura 40). Cinco frações foram coletadas para teste, como mostrado na figura 40. Como as massas obtidas foram muito baixas (tabela 4), não foi possível testar todas as frações. Foi testada apenas a fração F3_6_5, que não exibiu atividade.

Fração	Massa obtida (mg)	
F1	0,8	
F2	0,4	
F3	1	
F4	1	
F5	6,7	

Tabela 4: Frações obtidas no fracionamento por HPLC da amostra F3 6.



Figura 40: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD (λ 190 nm) semi-preparativo da amostra com atividade indutora F3_6 em coluna HILIC-Diol (250 mm x 10mm, 5 µm). Gradiente (ACN:H₂O): 85% por 2 minutos, 85-65% em 6 minutos, 65% por 10 minutos, 65-85% em 2 minutos, 85% por 5 minutos. Vazão: 4 mL/min. As marcações em vermelho indicam as frações coletadas.

Uma grande dificuldade ao lidar com compostos polares é que a massa para iniciar a purificação é muito grande devido ao fato de não ser possível fazer uma limpeza inicial considerável para retirar os componentes do meio de cultura (por exemplo, partição líquido-líquido). Isso limita a quantidade de meio utilizada durante o fracionamento. Os fracionamentos citados acima se referem a apenas um litro de cultura, o que é pouco parar isolar compostos produzidos por micro-organismos, que muitas vezes são produzidos na ordem de microgramas ou até nanogramas por litro. Portanto, iniciar fracionamento com apenas um litro de cultura torna inviável a purificação de compostos em quantidade suficiente para ensaios biológicos, o que impossibilita continuar o fracionamento guiado por bioatividade. Tendo isso em mente, decidiu-se testar dois meios de cultura mínimos e definidos a fim de se reduzir a massa obtida por litro de cultura, bem como delimitar qual açúcar é proveniente do meio de cultura e da bactéria, tendo em vista que a fração bioativas exibiu característica glicosídica.

Foram testados dois meios de cultura: M9 e ISP4-modificado. Após cultivo de sete dias (200 rpm, 30 °C) as culturas foram filtradas e o filtrado foi testado para atividade indutora. Conforme mostrado na figura 41, ambos meios de cultura apresentaram atividade semelhante ao meio TSB. O filtrado da cultura de M9 gerou um extrato bruto de 13 g/L, e o de ISP4-modificado de 4,2 g/L. Portanto, o meio ISP4-modificado foi escolhido para cultivo ampliado e posterior fracionamento para purificação do composto indutor.



Figura 41: Comparação de diferentes meios de cultura na indução de bioatividade contra *Amycolatopsis* sp. AA4 em *Krasilnikovia* sp. T082. A: controle negativo. B: TSB. C: M9. D: ISP4-modificado.

Foram cultivados 4 L de *Streptomyces* sp. SPB78, que foi filtrado, seco e submetido a separação em Sephadex G-25 (62 cm de altura, 2,3 cm de diâmetro, volume de 260 mL, vazão de 1 mL/min). Foram coletadas 5 frações conforme indicado na tabela 5.

indutoru.		
Fração	Volume coletado (mL)	Massa obtida (g)
F1	90 mL	0,057
F2	55 mL	0,317
F3	55 mL	2,689
F4	50 mL	21,9
F5	50 mL	8,8

Tabela 5: Frações obtidas em fracionamento realizado com Sephadex G-25 da cultura com atividade indutora.

As frações de 2-5 foram analisadas em HPLC-DAD-ELSD analítico (utilizando coluna HILIC-Diol) e testadas em diferentes concentrações:

- 1) F2: 0,025 mg, 0,25 mg, 0,5 mg
- 2) F3: 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg
- 3) F4: 1 mg
- 4) F5: 1 mg

A análise em HPLC analítico evidenciou que a dextrose adicionada ao meio foi eluída em F4 e F5. Como se trata de cromatografia por exclusão molecular, pode-se inferir que todos os componentes do meio foram eluidos após a dextrose (devido ao menor peso molecular). Portanto, a massa obtida em F1-F3 é de compostos produzidos pela bactéria. O bioensaio mostrou que as frações F2 e F3 são ativas, sendo que a maior atividade foi obtida para F2, conforme mostrado na figura 42.



Figura 42: Comparação da bioatividade contra *Amycolatopsis* sp. AA4 das frações F2 e F3 da Sephadex G-25 realizada com a cultura de *Streptomyces* sp. SPB78 em meio ISP4-modificado.

As frações F2 e F3 foram enviadas para análise por RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) para ter ideia da composição da mesma. Os dados obtidos (figura 43) mostram que estas amostras tem composição parecida e apresentam natureza glicosídica devido aos sinais intensos presentes na região entre δ 3-4,5. Como pode ser visto, se trata ainda de amostras complexas.



Figura 43: Espectros de RMN de ¹H (D_2O , 500 MHz) das amostras F2 (linha vermelha) e F3 (linha verde), que apresentam atividade indutora da atividade antibiótica observada em *Krasilnikovia* sp. T082.

A análise em HPLC-DAD-ELSD analítico utilizando coluna HILIC-Diol não exibiu boa separação de compostos para a fração F2, como pode ser visto no cromatograma da figura 44.



Figura 44: Cromatograma obtido por análise em HPLC-DAD-ELSD analítico das frações com atividade indutora F2 e F3 em coluna HILIC-Diol (10 cm x 4,6 mm, 2,6 μ m). Gradiente (ACN:H₂O): 90% por 3 minutos, 90-20% em 15 minutos, 20% por 3 minutos, 20-90% em 1 minuto, 90% por 4 minutos. Vazão: 0,85 mL/min. Linha azul: fração F2 (λ 200 nm). Linha preta: fração F3 (λ 200 nm).

Este motivo, aliado ao fato das frações F2 e F3 apresentarem muita massa para fracionamento em HPLC semi-preparativo (o laboratório não possui coluna HILIC preparativa), decidiu-se fazer outra etapa de purificação utilizando CEM em HPLC preparativo, utilizando a coluna Shodex Asahipak GS-310 20G (50 cm de altura, 2 cm de diâmetro, vazão: 3 mL/min). A primeira análise realizada evidenciou a necessidade de otimizar o fracionamento em modo reciclante para separação dos compostos, tendo em vista que todos os compostos foram eluidos em tempos próximos sem resolução de bandas cromatográficas. A figura 45 mostra as análises realizadas neste modo reciclante das frações F2 (figura 45A) e F3 (figura 45B), já mostrando as frações coletadas.



Figura 45: Cromatograma obtido por análise em HPLC-UV-RID da amostra com atividade indutora F2 (**A**) e F3 (**B**) em coluna Shodex Asahipak GS-310 20G. Modo isocrático com 5% MeOH:H₂O. Vazão: 3,0 mL/min. Linha rosa: detecção do RID. Linha preta: detecção em λ 200 nm.

A figura 46 mostra o rendimento e atividade das frações coletadas para a fração F2. As frações obtidas no fracionamento de F3 não exibiram bioatividade. Como pode ser observado, todas frações de F2 apresentaram atividade, corroborando a hipótese de que vários compostos são capazes de estimular a atividade observada. As frações foram analisadas em HPLC-DAD-ELSD em coluna HILIC-Diol e C8, que evidenciaram que estas frações ainda apresentam certa complexidade.



Figura 46: Frações coletadas no fracionamento da fração F2, mostrando rendimento e atividade em ensaio biológico contra *Amycolatopsis* sp. AA4.

Mesmo assim, as frações F2_Sh_F1 e F2_Sh_F3 foram enviadas para análise de RMN de ¹H para verificar a natureza destes compostos. Os espectros obtidos (figura 47) mostraram mais uma vez sinais na região dos açúcares (δ 3-4,5), entretanto as integrais mostram uma grande falta de proporção entre esses sinais e os sinais de possíveis hidrogênios de carbonos anoméricos (por volta de δ 5-5,5), indicando que talvez essas frações não sejam apenas de natureza glicosídica, mas também peptídica. Foram também observados sinais de um sistema aromático (δ 6-7,5) na fração F2_Sh_F1e a fração F2_Sh_F3 mostra também vários outros sinais de hidrogênios alifáticos na região de δ 0,8-2,4. Portanto, essas frações evidenciam que a atividade de indução é algo complexo, em que possivelmente compostos de diversas naturezas possam estar envolvidos.



Figura 47: Espectros de RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) das amostras F2_Sh_F1 (**A**) e F2_Sh_F3 (**B**), que apresentam atividade indutora da atividade antibiótica observada em *Krasilnikovia* sp. T082. Integrais foram anotadas apenas para fins comparativos (não representam o número correto de hidrogênios).

A fração F2_Sh_F1 foi submetida a mais um fracionamento em coluna semi-preparativa C8, que foi separado em 3 frações. Estas foram testadas, mas nenhuma exibiu a atividade esperada.

A fração F2_Sh_F3 foi submetida a mais um fracionamento em coluna semi-preparativa HILIC-Diol, sendo separada em 3 frações que foram submetidas a teste de bioatividade. A figura 48 mostra o rendimento e atividade das frações coletadas. A fração F2_Sh_F3_F2

apresentou maior atividade e foi analisada em HPLC-analítico, que demonstrou que esta fração ainda apresenta complexidade. Devido a complexidade de separação e baixo rendimento de massa, não foi continuado o fracionamento desta amostra. Esta fração foi enviada para análise de RMN de ¹H para verificar a natureza destes compostos. O espectro obtido (figura 49) evidenciou mais uma vez grande complexidade de sinais. Não há evidências de um composto de natureza glicosídica como no espectro de RMN de ¹H mostrado na figura 39. Neste caso pode haver uma mistura de compostos de natureza glicosídica e peptídica.



Figura 48: Frações coletadas no fracionamento da fração F2_Sh_F3, mostrando rendimento e atividade em ensaio biológico.



Figura 49: Espectro de RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) da amostra F2_Sh_F3_F2, que apresentou atividade indutora da atividade antibiótica observada em *Krasilnikovia* sp. T082. Integrais foram anotadas apenas para fins comparativos (não representam o número correto de hidrogênios).

Apesar do uso de meio mínimo para diminuir a complexidade dos extratos e aumentar a capacidade de processamento destes, ainda assim encontrou-se dificuldades para trabalhar com o fracionamento guiado por bioatividade do composto indutor de atividade antibiótica em cultura de *Krasilnikovia* sp. T082. Trata-se de extratos muito complexos mesmo após diferentes rodadas de fracionamentos utilizando exclusão molecular e adsorção, sendo de difícil separação pelas metodologias utilizadas por se tratar de compostos similares. Apesar de não ter sido possível chegar a compostos puros, os diversos espectros de RMN de ¹H obtidos de diferentes frações bioativas indicam que estes compostos podem ter natureza glicosídica e/ou peptídica. Devido ao tamanho destes compostos (provavelmente acima de 1000 Da de acordo com estimativa do primeiro fracionamento realizado em Sephadex G-25) e ao fato de várias frações provenientes de fracionamento por exclusão molecular apresentarem atividade, sugere-se que diferentes compostos estejam envolvidos nesse fenômeno de indução, que é, portanto, complexo.

Há relatos na literatura sobre diferentes oligossacarídeos atuando como eliciadores em culturas de células de plantas e micro-organismos (ARIYO et al., 1998; MURPHY et al., 2007; VANHULLE et al., 2007). Ariyo e colaboradores demonstraram em 1998 que a adição de oligomanuronato, oligoguluronato e oligossacarídeos de manana aumentou a produção de penicilina G 47%, 49% e 69% respectivamente (ARIYO et al., 1998).

Apesar de haver diversos trabalhos na literatura mostrando que o co-cultivo é uma técnica promissora para estimular a biossíntese de novos compostos, o grande foco tem sido as novas moléculas; portanto, os mecanismos de indução permanecem pouco estudados. A maioria dos trabalhos geralmente relata apenas se a indução é obtida no filtrado ou extratos da linhagem indutora ou se o contato físico é necessário (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014). Alguns estudos podem ser destacados nesta área de indução de metabolismo secundário campo e mostram a diversidade de mecanismos indutores.

O caso que mais se assemelha ao descrito nesta tese foi descrito em 2004 por Recio e colaboradores, em que foi demostrado que a produção do polieno glicosilado piramicina (figura 50) é induzida por um composto auto-indutor de *Streptomyces griseus* IFO1335, que foi chamado de fator PI, e, assim como as butirolactonas, este composto atua como um fator de *quorum-sensing* (RECIO et al., 2004). É produzido tanto em meio de cultivo complexo quanto definido e é um composto hidrofílico, características similares ao composto indutor deste trabalho. Neste caso, a bactéria já produz piramicina em condições normais, mas o estudo feito por Recio e colaboradores utilizando linhagens mutantes demonstrou que o fator PI é o componente regulatório da expressão deste composto.



Figura 50: Piramicina produzido por *Streptomyces griseus* IFO1335 que possui o fator PI como composto auto-indutor.
ONAKA e colaboradores (2001) descreveram um oligopeptídeo (goadsporina) biossintetizado por uma linhagem de *Streptomyces* como sendo indutor de síntese de pigmentos e de esporulação em diversos estreptomicetos (ONAKA et al., 2001). KUROSAWA e colabolarores (2008) descreveram um caso em que houve possível transferência horizontal de genes entre as bactérias co-cultivadas, o que culminou na biossíntese de dois novos compostos (rhodostreptomicina A e B) (KUROSAWA et al., 2008). Em 2011 ONAKA e colaboradores demonstraram que a presença de ácido micólico na parede celular é um dos fatores envolvidos na indução de biossíntese de pigmentos em *S. lividans* (ONAKA et al., 2011). KÖNIG e colaboradores (2013) demonstraram que a adição de um modulador epigenético foi capaz de induzir a biossíntese do mesmo composto (fumiciclina A) em *Aspergillus fumigatus* quando em co-cultivo com uma bactéria, porém não foi comprovado se o mecanismo de indução em co-cultura é o mesmo (KONIG et al., 2013). Estes exemplos demostram a diversidade de mecanismos/compostos indutores de metabolismo secundário.

4.2.3.2. Especificidade da indução em Krasilnikovia sp. T082

Para testar a especificidade da atividade indutora em *Krasilnikovia* sp. T082 foram testadas culturas de organismos de grupos distantes: *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa), *Bacillus subtilis* (bactéria gram-postivia) e *Candida albicans* (levedura). Nenhum foi capaz de induzir a bioatividade. Foram testadas então 20 linhagens pertencentes a diversos grupos dentro do táxon Actinobacteria. Dentre estas, 12 foram capazes de induzir a bioatividade, em diferentes intensidades, exemplificado na figura 51. Não foi observado nenhum padrão entre esses grupos com atividade, sugerindo que a atividade indutora seja devido a diferentes compostos que talvez sejam específicos deste táxon. Esta observação também sugere que a indução não seja devido a compostos comuns do metabolismo primário bacteriano por não estar presente em todos os grupos do táxon Actinobacteria.



Figura 51: Três co-culturas com *Krasilnikovia* sp. T082 mostrando diferentes níveis de indução de biossíntese do composto com atividade antibiótica contra *Amycolatopsis* sp. AA4, sendo A o mais induzido e C não induzido.

4.2.3.3. Investigação da atividade antibiótica

A primeira questão levantada para iniciar o processo de isolamento do composto antibiótico foi se o mesmo seria também biossintetizado como resultado de interação em meio líquido, por ser mais facilmente realizado em escala ampliada. Inicialmente foi realizado cultivo em pequena escala (200 mL) de *Krasilnikovia* sp. T082 inoculado em meio TSB e de *Krasilnikovia* sp. T082 inoculado em meio TSB + filtrado de *Streptomyces* sp. SPB78. Novamente, a bioatividade foi apenas detectada na segunda condição (o filtrado de *Streptomyces* sp. SPB78 também foi testado e não apresentou bioatividade). O próximo passo foi testar diversas condições de cultivo (diferentes tamanhos de frascos com diferentes volumes; diferentes velocidades de agitação; frascos com e sem ranhuras; diferentes tempos de incubação).

A condição selecionada para escala ampliada foi: pré-inoculo de *Krasilnikovia* sp. T082 em TSB por sete dias, seguido de inóculo por quatro dias em frascos de 500 mL contendo 180 mL de meio de cultura fresco + 20 mL de pré-inóculo + 10 mL de filtrado de *Streptomyces* sp. SPB78 concentrado 8 x. Foram cultivados 10 frascos, obtendo ao total após filtragem cerca de 2 L de filtrado com atividade antibiótica.

Uma das hipóteses que fundamentam o uso do co-cultivo é que o micro-organismo produza compostos antibióticos como mecanismo para eliminar o potencial competidor por nutrientes ou como um mecanismo de defesa tendo em vista que o outro micro-organismo poderia biossintetizar antibióticos. Entretanto, esta hipótese não tem sido corroborada, tendo em vista que a maioria dos compostos induzidos em diversos trabalhos de co-cultivo não são capazes inibir o crescimento do micro-organismo co-cultivado (MARMANN et al., 2014). Para testar esta hipótese, o filtrado de *Krasilnikovia* sp. T082 + indutor contendo a atividade antibiótica, bem como o filtrado do cultivo puro de *Krasilnikovia* sp. T082 que não possui atividade antibiótica contra *Amycolatopsis* sp. AA4 foram testados contra o micro-organismo indutor *Streptomyces* sp. SPB78. Foi demonstrado que composto o antibiótico induzido é capaz de inibir o crescimento do organismo indutor, sugerindo relevância ecológica deste antibiótico biossintetizado devido ao co-cultivo (figura 52).



Figura 52: A: *Streptomyces* sp. SPB78 controle. B: *Streptomyces* sp. SPB78 crescendo em meio de cultura contendo filtrado de cultivo líquido puro de *Krasilnikovia* sp. T082. C: *Streptomyces* sp. SPB78 não foi capaz de crescer em meio de cultura contendo filtrado de cultivo líquido induzido de *Krasilnikovia* sp. T082.

Os procedimentos seguintes foram similares aos descritos para atividade indutora. Foram realizados testes de estabilidade do composto ativo: pH extremos (1 e 14, por 3 horas) e alta e baixa temperaturas (85 °C e -80 °C, por 3 horas). O composto foi estável sob todas condições, perdendo um pouco da atividade apenas quando exposto a pH 14. Para estimar o tamanho do composto, a amostra foi filtrada em tubos do tipo Amicon com poros de 3 kDa. Após filtragem e lavagem da membrana, a atividade foi observada na amostra correspondente a > 3 kDa, levantando a hipótese de se tratar de um composto de origem peptídica. A amostra também foi então tratada com proteinase K, e a atividade antibiótica foi perdida com este tratamento, corroborando a hipótese anterior. O tratamento da amostra com o agente redutor DTT (ditiotreitol) levou à diminuição da bioatividade, o que pode ser indicativo de pontes de dissulfeto no composto, que são mais comuns em peptídeos. Outra característica do composto antibiótico é que ele apresenta atividade bacteriolítica, como demonstrado na figura 53.



Figura 53: Co-cultivo em meio ISP2 sólido entre *Krasilnikovia* sp. T082 e *Streptomyces* sp. SPB78, depois de 10 e 20 dias, evidenciando a lise da face da colônia de SPB78 mais próxima de T082 após 20 dias de cultivo.

Para iniciar o processo de fracionamento para obtenção do composto bioativo foi inicialmente realizada extração com acetato de etila sob diferentes pH (3 e 11), mas o composto permaneceu na fase aquosa, evidenciando se tratar de um composto polar. Foi então testada extração com diferentes solventes, começando com hexano, seguido de clorofórmio e *n*-butanol. Após partição com hexano a atividade foi detectada na fase aquosa, entretanto, a atividade não foi mais detectada em nenhuma outra fração (em nenhum dos solventes orgânicos ou fases aquosas). Foi levantada a hipótese de se tratar de um sistema com dois componentes, e esta série de extração tivesse os separado. Entretanto, a junção das frações não recuperou a atividade. Foi então levantada a hipótese de que o(s) composto(s) fosse(m) instável(is) a alguma condição utilizada.

Resolveu-se então testar fracionamento utilizando cartuchos C_{18} (Waters), t C_2 (Waters), Accell Plus CM (Waters), DSC-NH₂ (Supelco), DSC-Ph (Phenomenex), DSC-Si (Phenomenex) e coluna clássica com resina XAD-4 e XAD-16, utilizando gradiente crescente de água:metanol. Para XAD-4, XAD-16, C_{18} , DSC-Ph e DSC-Si a atividade novamente não foi recuperada em nenhuma fração ou junção destas. Para os demais materiais testados o composto bioativo não interagiu com a matriz, tendo sido observado na primeira fração, sendo que foi observada atividade antibiótica menos intensa em comparação ao filtrado original, evidenciando perda de atividade.

Tendo em mãos a hipótese de que se trata de um composto de natureza peptídica, decidiu-se realizar uma etapa de purificação e concentração clássica para compostos deste tipo: precipitação em sulfato de amônio. Foram testadas diferentes concentrações (entre 15% e 80%) em pH neutro e ácido (pH 3). A condição que mostrou melhor recuperação da atividade no precipitado foi utilizando 25% de sulfato de amônio em pH 3.

Este precipitado foi então ressuspendido em água e submetido a análise de RMN de ¹H (figura 54), que revelou poucos sinais, sendo os principais referentes a amostras de natureza glicosídica (entre δ 3,50-3,75). Tendo em vista que dados anteriores evidenciam que o composto tem natureza peptídica e tamanho próximo a 3 kDa, provavelmente estes sinais mais intensos representam ainda açúcares do meio e não o composto antibiótico.



Figura 54: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, D_2O) da amostra resultante da precipitação com sulfato de amônio, que apresenta atividade antibiótica.

O precipitado foi submetido a fracionamento em HPLC-DAD semi-preparativo utilizando colunas C_{18} , C_6 -Fenil e HILIC-Diol, utilizando gradientes de ACN:H₂O. As amostras foram fracionadas de acordo com o tempo de eluição (cada fração sendo equivalente a 5 minutos da análise). Entretanto, nenhuma fração foi ativa, nem a combinação destas. Um dado relevante é que a amostra antes do fracionamento (após a precipitação) apresenta cor escura, e as frações obtidas apresentaram tonalidade mais clara, evidenciando que parte da amostra não está sendo eluída das colunas utilizadas. Para evitar eventuais danos às colunas esta amostra não foi mais submetida a análise por HPLC-DAD.

Tendo em vista as dificuldades observadas utilizando técnicas que envolvem a utilização de solventes orgânicos e utilizam polaridade como princípio de fracionamento, decidiu-se testar cromatografia por exclusão molecular utilizando Sephadex G-25 e água como fase móvel. Novamente as frações obtidas foram testadas isoladamente e em combinação, porém a atividade não foi detectada em nenhum caso. É possível que o fracionamento da amostra esteja separando permanentemente componentes que atuam de forma sinérgica para que seja observada a atividade, de forma que mesmo após recombinar as amostras, esta não volta a apresentar atividade.

4.2.3.4. Análise direta em placa de cultivo - Imageamento por espectrometria de massas

Adicionalmente aos ensaios em meio líquido, foi realizada análise direta em meio sólido, através da técnica de imageamento por espectrometria de massas (IMS). Esta técnica permite a visualização da distribuição espacial dos compostos microbianos diretamente na placa de cultivo, sendo, portanto, valiosa para estudos de interações (YANG et al., 2009). Objetivou-se buscar nas imagens obtidas íons que apresentassem distribuição de acordo com a bioatividade observada (em forma de halo nas duas primeiras colônias, sendo o halo da primeira colônia maior), e, assim, auxiliar na identificação do composto antibiótico.

Para esta técnica a interação foi analisada em meio ISP2, pois o meio TSA apresentou um intenso número de sinais, impossibilitando a análise da imagem obtida. Apesar de não ter sido encontrado nenhum íon com a distribuição esperada para o antibiótico, a figura 55 mostra alguns sinais observados que apresentaram distribuição espacial interessante, evidenciando a influência da co-cultura no metabolismo secundário de ambas linhagens. Por exemplo, a figura 55B mostra um sinal observado para a linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 apenas para a colônia mais próxima à linhagem *Streptomyces* sp. SPB78. Já a figura 55C mostra um sinal observado para a linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 apenas para as outras três colônias mais distantes da linhagem *Streptomyces* sp. SPB78. A figura 55D mostra um sinal que deixa de ser observado em *Streptomyces* sp. SPB78 quando em co-cultura, e a figura 55E mostra um sinal observado em *Streptomyces* sp. SPB78 apenas quando está interagindo com *Krasilnikovia* sp. T082.



Figura 55: (A) placa contendo as culturas em meio sólido a serem analisadas por MALDI-TOF. (B-E) imagens geradas através do software *FlexImaging* 3.0 (Bruker Daltonics) durante a análise por MALDI-TOF em modo positivo.

Os resultados obtidos revelam detalhes que dificilmente seriam observados através da análise do cultivo líquido, e evidenciam o quão complexa é a interação entre estas linhagens, abrindo um leque de novas perguntas a respeito desta interação. Estes íons não foram encontrados em análises por LC/MS realizadas no cultivo em meio líquido, e a baixa resolução do equipamento impede fazer afirmativas a respeito da identificação dos íons observados. Vale lembrar que o cultivo em meio líquido, além de ter sido realizado em meio de cultura diferente, apresenta condições completamente diferentes do cultivo em meio sólido, como por exemplo diferente aeração, diferente capacidade de interação entre as linhagens e diferente disponibilidade de nutrientes.

5. Conclusões

A comunidade estudada de actinobactérias endofíticas da raiz de *T. diversifolia* não apresentou grande diversidade taxonômica, sendo todas as linhagens isoladas pertencentes ao gênero *Streptomyces* e quase metade similares a uma mesma espécie descrita na literatura como exercendo potencial influência positiva em rizosferas, evidenciando então uma possível relação positiva entre as linhagens endofíticas e a planta hospedeira, estando de acordo com a teoria da simbiose endofítica.

Ensaios biológicos de cultivos em meio sólido e líquido demonstraram grande potencial das linhagens endofíticas para produção de compostos bioativos. Vale destacar a elevada bioatividade observada contra *P. syringae*, um fitopatógeno Gram-negativo, reforçando uma possível relação positiva entre as linhagens isoladas e a planta hospedeira.

Os resultados aqui obtidos demonstram que interações microbianas são capazes de alterar o metabolismo de micro-organismos. Interações entre as linhagens endofíticas sugerem que linhagens relacionadas entre si são mais propensas a interagir entre si e ter seu desenvolvimento alterado devido ao co-cultivo, comprovando a relevância de se estudar este ambiente. Foram observadas muitas relações antagônicas, o que pode representar um possível controle populacional que poderia ser relevante para manter o *status* endofítico destas linhagens dentro do hospedeiro. Além disso, a maioria dos fitopatógenos Gram-positivos descritos são do táxon Actinobacteria, portanto este antagonismo entre actinobactérias endofíticas poderia também proteger a planta contra estes fitopatógenos. Portanto, as metodologias utilizadas permitiram a realização de algumas inferências ecológicas da comunidade de actinobactérias endofíticas isoladas da raiz de *T. diversifolia*.

A metodologia de co-cultivo mostrou-se promissora para a busca por compostos bioativos. Entretanto, apesar de apresentar grande potencial para o estudo de metabolismo secundário de micro-organismos, principalmente pela capacidade de estimular a expressão de *clusters* biossintéticos crípticos, esta técnica apresentou resultados não-reprodutíveis com as linhagens em estudo e condições utilizadas, provavelmente devido a variações naturais do metabolismo bacteriano frente a parâmetros bióticos e abióticos.

Foi escolhida para caracterização química e biológica a interação entre uma actinobactéria rara, pertencente a um gênero que ainda não apresenta nenhum estudo na literatura (*Krasilnikovia* sp. T082) e uma actinobactéria endossimbionte de besouro (*Streptomyces* sp. SPB78). Análises por imageamento por espectrometria de massas revelaram que esta interação é complexa, representando, portanto, um rico material de estudo para compreensão de interações interespecíficas. Foram selecionados dois compostos para

isolamento: o antibiótico e o composto que induz sua biossíntese. Diversas técnicas foram testadas para o processo de isolamento destes. Este processo apresentou grande complexidade devido ao caráter polar de ambos compostos, e pelo fato da atividade antibiótica ser instável. Apesar de não ter sido possível elucidar a estrutura dos compostos propostos foi possível realizar diversas caracterizações químicas e biológicas acerca do fenômeno observado. Análises biológicas demonstraram que o antibiótico induzido tem atividade bacteriolítica e é capaz de inibir o crescimento do micro-organismo indutor, sugerindo importância ecológica deste composto, o que também não tem sido demonstrado com frequência em estudos de interações interespecífica no campo de produtos naturais. Com relação ao composto indutor, os dados obtidos sugerem natureza diversa deste, provavelmente sendo alguns compostos de natureza glicosídica e/ou peptídica, e que não se trata de um único composto específico já que diversas outras linhagens de actinobactérias foram capazes de induzir o mesmo fenômeno e diversas frações apresentaram atividade durante o fracionamento guiado por bioatividade.

Vale ressaltar que o uso da metodologia de co-cultivo permitiu neste estudo a seleção de uma linhagem pertencente a um gênero de actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo secundário estudado (*Krasilnikovia*). Isto foi realizado através da investigação de seu genoma e também através do isolamento de compostos produzidos por esta linhagem, dados que estão descritos no capitulo 3 desta tese.

Capítulo 3

Estudo genômico e químico do metabolismo secundário de *Krasilnikovia sp.* T082

1. Introdução

Grande parte da pesquisa em produtos naturais de micro-organismos tem sido realizada com linhagens do gênero *Streptomyces*, dando origem a compostos pertencentes a diversas classes de antibióticos: macrolídeos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, polienos dentre outros (KATZ e BALTZ, 2016). O gênero *Streptomyces* tem dominado o cenário de produtos naturais devido ao fato de ser mais facilmente isolado e cultivado dentre os gêneros pertencentes ao táxon Actinobacteria (TIWARI e GUPTA, 2013). Cerca de 76% dos compostos bioativos isolados deste táxon entre os anos de 1940-2010 são provenientes deste único gênero, sendo o restante isolado de linhagens pertencentes ao grupo das chamadas "actinobactérias raras" (actinobactérias de outros gêneros de isolamento mais difícil), que, apesar de ainda pouco representadas na pesquisa de produtos naturais, compreendem uma vasta diversidade biológica (BERDY, 2012; TIWARI e GUPTA, 2012).

O sequenciamento do genoma de diversas linhagens de actinobactérias raras tem demonstrado que sua capacidade de metabolismo secundário é tão surpreendente quanto a de actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Portanto, este grupo representa uma importante fonte de produtos bioativos (CHOI et al., 2015; TIWARI e GUPTA, 2012, 2013). Estudos de actinobactérias raras têm levado à caracterização química e biológica de vários metabólitos bioativos de diversas classes, como lactonas, macrolídeos, aminoglicosídeos, piperidinas, terpenoides, quinonas entre outros. Alguns exemplos de importantes compostos bioativos isolados de actinobactérias raras são: teicoplanina (*Actinoplanes teichomyceticus*), gentamicina (*Micromonospora purpurea*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*) e eritromicina (*Saccharopolyspora erythraea*) (figura 56) (TIWARI e GUPTA, 2012).





Figura 56: Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de actinobactérias raras: teicoplanina (*Actinoplanes teichomyceticus*), gentamicina (*Micromonospora purpurea*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*) e eritromicina (*Saccharopolyspora erythraea*) (TIWARI e GUPTA, 2012).

1.1 Isolamento de actinobactérias raras

Tendo em vista que actinobactérias do gênero *Streptomyces* possuem crescimento mais rápido, há uma necessidade em utilizar métodos específicos para evitar o crescimento destes e facilitar o crescimento/isolamento de actinobactérias raras (JOSE e JEBAKUMAR, 2013). Esses métodos levam em consideração características específicas dos diferentes gêneros de actinobactérias, como resistência a altas temperaturas, a exposição em luz UV e outros tipos de irradiações, uso de fontes de carboidrato e nitrogênio especificas, antibióticos, etc (TIWARI e GUPTA, 2013).

Alguns grupos de actinobactérias apresentam esporos móveis, sendo este um fenótipo útil no isolamento específico de actinobactérias raras, tendo em vista que *Streptomyces* não possuem esta característica. Alguns exemplos são *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Actinokineospora*, *Actinosynnema* e *Kineosporia* (HAYAKAWA et al., 2000). Hayakawa e colaboradores desenvolveram em 2000 um método de isolamento considerando esta característica, que foi chamado de "Reidratação-Centrifugação" (RC). Este método também leva em consideração o fato de que alguns grupos possuem esporos resistentes a desidratação. Em linhas gerais, este método consiste em desidratar a amostra de interesse e depois reidratar para facilitar a liberação dos esporos móveis. Em seguida, esta solução contendo esporos passa por uma série de centrifugações consecutivas em que apenas o sobrenadante é coletado. Desta forma, espera-se que a amostra final esteja enriquecida com esporos móveis, ou seja, com linhagens de actinobactérias raras (HAYAKAWA et al., 2000).

1.2 Krasilnikovia sp. T082

No ano de 2011 o pós-doutorando Dr. Matthew Traxler (atual professor da *University of California*, Berkeley) realizou um grande isolamento de actinobactérias raras de solo de várias partes do mundo no laboratório do Prof. Roberto Kolter (*Harvard Medical School*), utilizando a técnica RC descrita no tópico anterior.

As linhagens pertencentes a esta coleção foram cultivadas aos pares, experimento no qual a linhagem T082 se destacou (capítulo 2 desta tese). Esta linhagem interagiu com diversas outras linhagens, produzindo um composto com atividade antibiótica que foi somente detectado durante essas interações (resultado descrito no capitulo 2 desta tese). Esta resposta evidenciou que esta linhagem é capaz de sentir seu micro-ambiente e responder a mudanças ajustando seu metabolismo secundário.

A linhagem T082 foi isolada de solo do estado de Oklahoma, EUA. Análise da sequência do gene do 16S rRNA evidenciou similaridade de 99% com a linhagem *Krasilnikovia cinnamonea*, uma linhagem isolada de solo de Bangladesh (ARA e KUDO, 2007). Como a linhagem T082 não exibiu produção de esporos em meio de cultura em que foi relatado produção de esporos no artigo de descrição de *Krasilnikovia cinnamonea* (ARA e KUDO, 2007), decidiu-se denominar a linhagem T082 de *Krasilnikovia* sp. T082.

O gênero *Krasilnikovia* foi descrito pela primeira vez em 2007 e pertence à família Micromonosporaceae, sendo mais próximo filogeneticamente aos gêneros *Couchioplanes* e *Actinoplanes* (ARA e KUDO, 2007). Esta família é descrita na literatura como importante fonte de produtos naturais, tendo sido relatado o isolamento de compostos variados, como macrolídeos, lactonas, peptídeos cíclicos, ribonuclueosídeos, dentre outros. Dentro desta família destaca-se o gênero *Micromonospora* para produção de produtos naturais. Também há diversos metabólitos bioativos descritos para o gênero *Actinoplanes*, como a já citada teicoplanina (figura 56) a naftoquinona purpuromicina (figura 57, *Actinoplanes* sp. SCC 1906) (COOPER et al., 1974).



Sch 42137

Figura 57: Produtos naturais bioativos isolados de actinobactérias raras pertencentes ao gênero *Actinoplanes*.

Até o momento há apenas uma espécie descrita para este gênero *Krasilnikovia*: *Krasilnikovia cinnamonea* (ARA e KUDO, 2007). Esta é a única publicação a respeito deste gênero. Portanto, ainda não há nenhum estudo químico ou genômico a respeito do metabolismo secundário deste gênero, o que desperta interesse no estudo deste.

2. Objetivos

Explorar a capacidade do metabolismo secundário de *Krasilnikovia* sp. T082 através de análise do genoma, isolamento e elucidação estrutural de compostos produzidos em cultivo em meio líquido.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens microbianas

Para estudo químico: *Krasilnikovia* sp. T082 (isolada de solo nos EUA) pertencente à coleção de actinobactérias raras do laboratório do Prof. Roberto Kolter (*Harvard Medical School*).

Para indicação de bioatividade foram utilizadas bactérias Gram-negativa: *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e uma levedura: *Candida albicans* MYA-2876.

3.2. Meios de cultura utilizados

Foram utilizados os meios de cultura ISP2 (10 g extrato de malte, 4 g dextrose, 4 g extrato de levedura para 1 L de água Milli-Q, pH 7,2), TSB 0,5x (15 g caldo tríptico de soja para 1 L de água Milli-Q), e Luria-Bertani (LB, Novagen[®]) líquido e *soft*-ágar (0,7% ágar).

3.3. Material utilizado para isolamento de compostos orgânicos

Solventes: Acetato de etila, metanol, acetonitrila, clorofórmio deuterado, água deuterada, metanol deuterado.

Equipamentos: Rotaevaporadores acoplados a banhos quentes e a resfriador; bomba de vácuo; sonicador Branson1200 (Branson Ultrasonics Corporation[®]). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência semi-preparativo/preparativo acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência analítico acoplado a detector de arranjo de diodos e detector de espalhamento de luz evaporativo (HPLC-DAD-ELSD).

Outros: Colunas para HPLC: C₆–Fenil analítica (Phenomenex[®] 5 μ m, 250 x 4,6 mm) e semi-preparativa (Phenomenex[®] 5 μ m, 250 x 10 mm). Cartuchos C₁₈ (Supelco[®]) para extração em fase sólida (SPE). Tubos para RMN. Tubos do tipo Shigemi[®].

3.4. Cultivo líquido de Krasilnikovia sp. T082

Krasilnikovia sp. T082 foi cultivada em meio ISP2 e TSB 0,5x. Para ambos meios de cultura esta actinobactéria foi primeiramente cultivada em meio sólido por sete dias (em ISP2 e TSB 0,5x), 30 °C. O pré-inoculo em meio líquido (em ISP2 e TSB 0,5x) foi iniciado com plugues retirados destas placas (de 0,5 cm de diâmetro), sendo utilizado um plugue para cada 10 mL de pré-inóculo. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C, 200 rpm, por sete dias. O cultivo fermentativo foi então iniciado a partir deste pré-inoculo, inoculando 20 mL deste em 200 mL de meio de cultura líquido estéril (em ISP2 e TSB 0,5x) em erlenmeyers de 500 mL, que foram incubados a 30 °C, 200 rpm por 10 dias.

3.5. Obtenção dos extratos brutos e isolamento de compostos

Após o tempo de cultivo as culturas foram filtradas para obtenção do meio de cultura livre de células. O filtrado foi submetido a partições em meio liquido, utilizando acetato de etila (com o mesmo volume da amostra a ser particionada, sendo que este volume foi dividido em 3 partições) e/ou extração em fase sólida (SPE, cartucho: C_{18} , eluição com gradiente de MeOH).

3.6. Ensaios antimicrobianos

Os extratos/compostos foram testados em meio sólido (método *punch-hole*) e extratos ativos foram testados pelo método de diluição em meio líquido para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

3.6.1. Punch-hole

Para as análises em meio sólido, poços de placas de 12 poços foram preenchidos com 1 mL de LB *soft*-agar inoculado com cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (1:500), *Escherichia coli* ATCC 25922 (1:1000), *Candida albicans* MYA-2876 (1:1000) ou *Amycolatopsis* sp. AA4 (1:500) (cultura em meio líquido, 16 h, 30 °C, 230 rpm). Após solidificação, foi feito um pequeno poço de 5 mm de diâmetro para adição da amostra a ser testada (solubilizada em água ou 1:1 MeOH:H₂O dependendo da solubilidade). A placa foi então incubada a 30 °C e analisada em busca de halos de inibição.

3.6.2. CIM (Concentração inibitória mínima)

A determinação da CIM foi realizada em triplicata utilizando o método de diluição em meio líquido de acordo com o protocolo recomendado pela CLSI (CLSI, 2012), utilizando resazurina para revelação do resultado.

O ensaio de CIM contra linhagens clínicas multi-resistentes foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo (IFSC-USP), colaboradora do CEPID-CIBFar, também pela metodologia de diluição em meio líquido de acordo com o protocolo recomendado pela CLSI de 2013 (CLSI, 2013). Foram utilizadas as linhagens *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* SA16 ST5-SCCmecII MRSA (origem clínica), *S. aureus* SA33 ST105- SCCmecII MRSA + TIG R (origem clínica), *S. aureus* SA88 ST5-SCCmecII MRSA + DAP R (origem clínica), *S. aureus* SA90 ST5-SCCmecII MRSA DAP S (origem clínica) e *S. aureus* Mu50 ST5, VISA.

3.7. Elucidação estrutural

Foi utilizada ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H, análises bidimensionais (gHMBC, gHSQC e gCOSY) e espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo eletrospray com analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo.

3.8. Sequenciamento e análise do genoma da linhagem Krasilnikovia sp. T082

O DNA genômico (gDNA) foi extraído da linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 de acordo com o seguinte protocolo: 20 mL de cultura líquida de *Krasilnikovia* sp. T082 foram macerados em nitrogênio líquido. O pó obtido foi ressuspendido em 500 µL de tampão de lise contendo lisozima (20 mg/mL lisozima, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100) e 25 µL de proteinase K (Qiagen). Esta solução foi incubada por 15 minutos a 60 °C. Foi então adicionado 1V de solução PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 pH 7,8-8,2), misturado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. A fase superior aquosa foi transferida para um novo microtubo. Este procedimento com solução PCI foi repetido até obter

fases claras. Foi então adicionado 1V de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. A fase superior aquosa foi transferida para um novo microtubo. Foi adicionado 1/10 V de acetato de sódio 3 M pH 5,2, 2 V de etanol a 8 °C, e misturado por inversão. Esta solução foi colocada a -20 °C por 1 h e então centrifugada por 10 min a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido gentilmente em 500 uL de etanol gelado 80% e então centrifugado por 10 min a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado por 10 min a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi ressuspendido gentilmente em 500 uL de etanol gelado 80% e então centrifugado por 10 min a 8000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o etanol residual foi removido com ponteira. O DNA obtido foi secado em temperatura ambiente por 2 minutos e resusspendido em 100 uL de água. A qualidade e concentração do DNA genômico extraído foram medidos por nanodrop.

O gDNA obtido foi enviado para sequenciamento na *Duke University* (http://sites.duke.edu/sequencingatduke/pacbio-2/), onde foi realizado o sequenciamento pela plataforma PacBio, utilizando a química P4-C2. A montagem do genoma foi também realizada por esta universidade, utilizando a *pipeline* HGAP3 desenvolvida pela PacBio. O genoma foi anotado através das ferramentas disponíveis *online*: RAST (AZIZ et al., 2008) (disponível *online*: http://rast.nmpdr.org/) e antiSMASH 3.0 A (WEBER et al., 2015) (disponível *online*: http://www.antismash.secondarymetabolites.org).

4. Resultados e Discussão

4.1. Sequenciamento e análise do genoma da linhagem Krasilnikovia sp. T082

O sequenciamento do genoma da linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 e subsequente montagem obtiveram alta qualidade, sendo o genoma fechado em apenas um *contig* de 7,7 Mb com cobertura de 106x. O genoma apresenta 71,5% de citosina e guanina, de acordo com o esperado para o genoma de uma actinobactéria. A análise do genoma com a ferramenta *online* BLAST mostrou que o genoma de maior similaridade com *Krasilnikovia* sp. T082 é o de *Actinoplanes friuliensis* DSM7358 (GenBank CP006272.1), com 35% de cobertura do genoma e 90% de identidade dentro desta cobertura.

O genoma montado foi anotado utilizando duas ferramentas disponíveis na internet: RAST e antiSMASH 3.0. O mesmo foi realizado com duas outras actinobactérias para fins comparativos: *Actinoplanes friuliensis* DSM7358, por ser o genoma mais similar, e *Streptomyces coelicolor* A(3), por ser organismo modelo do táxon Actinobacteria e ser conhecido por sua alta diversidade de metabolismo secundário, sendo um dos mais estudados e compreendidos dentre as actinobactérias (tabela 6).

A tabela 6 mostra que apesar do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 ser considerado grande para uma bactéria, não é tão grande quando comparado a *S. coelicolor* e *A. friuliensis*.

Apesar de alta similaridade com *A. friuliensis* DSM7358, aparentemente *Krasilnikovia* sp. T082 apresenta metabolismo secundário mais diverso, pois apresenta 21 potenciais CGBs de acordo com análise pelo antiSMASH (10,61% do genoma), sendo que *A. fruiliensis* apresenta apenas 12 (5,53% do genoma), apesar deste ter um maior genoma e maior número de sequências codificantes. Já quando comparado a *S. coelicolor* A(3), este apresenta maior diversidade metabólica, com 27 CGBs. Entretanto, *Krasilnikovia* sp. T082 apresenta maior porcentagem de seu genoma dedicada ao metabolismo secundário de acordo com dados do antiSMASH (tabela 6).

Organismo	<i>Krasilnikovia</i> sp. T082	A. friuliensis DSM7358	S. coelicolor A(3)
Tamanho do genoma	7,70 Mb	9,38 Mb	9,05 Mb
Conteúdo C+G	71,5%	70,4%	71,1%
Número de sequências codificantes (de acordo com RAST)	7358	8687	8154
Tamanho médio das sequências codificantes (de acordo com RAST)	932 pb	986 pb	974 pb
Densidade codificante (de acordo com RAST)	89,05%	90,03%	88,86%
Número de potenciais CGBs relacionados ao metabolismo secundário (de acordo com antiSMASH)	21	12	27
Porcentagem do genoma relacionado ao metabolismo secundário (de acordo com antiSMASH)	10,61%	5,53%	9,88%

Tabela 6: Comparação entre o genoma de *Krasilnikovia* sp. T082, *A. friuliensis DSM7358* e *S. coelicolor* A(3).

A tabela 7 mostra os potenciais CGBs relacionados ao metabolismo secundário de acordo com a análise por antiSMASH. Cada *cluster* identificado teve sua sequência de nucleotídeos extraída para posterior análise no banco de dados GenBank, e a sequência de maior similaridade está indicada na mesma tabela. Pode-se observar que a maioria dos *clusters* possui maior similaridade com o genoma de bactérias do gênero *Actinoplanes*.

Número do <i>cluster</i>	Classe	Tamanho do <i>cluster</i>	Maior similaridade (GenBank)	Cobertura da sequência	Identidade com a sequência
1	Não identificado	25,0 Mb	Streptomyces sp. SirexAA-E (CP002993.1)	16%	74%
2	Bacteriocina	10,9 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	61%	83%
3	NRPS	65,3 Mb	Streptomyces sp. SNA15896 DNA, cluster gênico de SW- 163 (AB375771.1)	51%	80%
4	Não identificado	43,9 Mb	Actinoplanes missouriensis 431 (AP012319.1)	38%	82%
5	NRPS	55,3 Mb	<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712 (FR845719.1)	21%	75%
6	Não identificado	43,0 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	23%	81%
7	Sideróforo	13,3 Mb	Actinoplanes sp. N902-109, (CP005929.1)	58%	80%
8	NRPS	55,7 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	30%	81%
9	t2PKS- butirolactona	45,8 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	21%	77%
10	Aminoglicosídeo	21,2 Mb	Streptomyces albus DSM 41398, (CP010519.1)	19%	75%
11	NRPS – sideróforo	50,7 Mb	Actinoplanes missouriensis 431 (AP012319.1)	13%	80%
12	Não identificado	43,0 Mb	Micromonospora purpureochromogenes DSM 43821 (LT607410.1)	8%	94%
13	Melanina	10,4 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	57%	84%
14	NRPS-t1PKS	64,5 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	15%	91%
15	T1 PKS	51,9 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	73%	85%
16	T3 PKS	41,1 Mb	Actinoplanes friuliensis DSM 7358 (CP006272.1)	70%	88%
17	Terpeno	20,9 Mb	Micromonospora rifamycinica DSM 44983 (LT607752.1)	45%	94%
18	t3PKS	41,1 Mb	Streptomyces davawensis JCM 4913 (HE971709.1)	19%	79%
19	Butirolactona- Lantipeptídeo	88,7 Mb	Actinoplanes missouriensis 431 DNA (HM193369.1)	12%	88%
20	NRPS – bacteriocina	50,2 Mb	Micromonospora echinofusca DSM 43913 (LT607733.1)	20%	85%
21	Não identificado	33,3 Mb	Streptomyces sp. SirexAA-E (CP002993.1)	50%	74%

Tabela 7: Resultado da análise por antiSMASH do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082, mostrando os potenciais CGBs encontrados e similaridades deles com sequências depositadas no GenBank até Outubro de 2016.

A tabela 8 mostra uma análise realizada pelo antiSMASH em que os CGBs identificados são buscados no banco de dados MIBiG (*Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*), que é um banco de dados de CGBs cujo compostos por eles codificados já foi identificado.

Número			Similaridade entre os	
do	Classe	Maior similaridade (MIBiG)		
cluster			genes	
1	Não identificado	A33853	30%	
2	Bacteriocina	Limfostina	25%	
3	NRPS	SW-163	71%	
4	Não identificado	Nanchangmicina	6 %	
5	NRPS	Albachelina	90%	
6	Não identificado	Lipstatina	28%	
7	Sideróforo			
8	NRPS	Sch47554 / Sch47555	3%	
9	t2PKS-butirolactona	Pristinamicina	3%	
10	Aminoglicosídeo	Acarbose	17%	
11	NRPS	BE-7585A	4%	
12	Não identificado			
13	Melanina			
14	NRPS-t1PKS	Tubulisina	9%	
15	T1 PKS	Azinomicina B	4%	
16	T3 PKS	Alquil-O-diidrogeranil- metoxihidroquinonas	71%	
17	Terpeno	Sioxanthina	80%	
18	t3PKS			
19	Butirolactona- Lantipeptídeo	Fluostatin	20%	
20	NRPS –bacteriocina			
21	Não identificado	A33853	13%	

Tabela 8: Resultado da análise por antiSMASH do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082, mostrando os potenciais CGBs e similaridades destes com CGBs depositados no MIBiG até outubro de 2016.

O fato dos CGBs 1 e 21 apresentarem similaridade com o mesmo CGB depositado no MIBig, que codifica o composto A33853 (figura 58), evidencia que se trata de um genoma ser circular, pois estes dois CGBs identificados provavelmente são apenas um que foi separado durante a montagem do genoma. Estes *clusters* foram agrupados manualmente e analisados novamente no antiSMASH, apresentando 30% de similaridade com os genes do CGB do composto A33853. Este CBG foi novamente analisado através da ferramenta *Blast* (banco de

dados GenBank), que confirmou a maior similaridade com *Streptomyces* sp. SirexAA-E, apresentando 36% de cobertura e 74% de identidade com a sequência analisada.



Figura 58: Composto A33853 isolado previamente de *Streptomyces* sp. NRRL 12068 (MICHEL et al., 1984) que mostrou similaridade com os CGBs 1 e 21 do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082.

Dentre todos os CGBs identificados, apenas quatro apresentaram alta similaridade com algum CGB depositado no MIBiG (*clusters* 3, 5, 16 e 17, descritos a seguir), indicando que esta linhagem tem elevadas chances de ter codificado em seu genoma novos compostos, aumentando as chances do antibiótico estimulado em co-cultura ser de fato um novo composto (fenômeno descrito no capítulo 2 desta tese na página 66).

O CGB número 3 codifica um composto que pertence à classe dos peptídeos nãoribossomais (NRP) do tipo depsipeptídeos com atividade intercalante de DNA. A tabela 9 mostra a similaridade deste CGB com CGBs de diferentes compostos pertencentes a esta classe, já com as respectivas estruturas químicas. Este grupo de compostos é conhecido por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas, como antiviral, antibiótica e anticancerígena (ZOLOVA; MADY; GARNEAU-TSODIKOVA, 2010), indicando que este CGB potencialmente codifica um produto natural bioativo.

Composto	Estrutura do composto	Número de acesso no GenBank	Cobertura da sequência	Identidade com a sequência
Grupo SW-163 (FERNÁNDEZ et al., 2014)	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} $	AB375771	51%	80%
Triostina A (OTSUKA et al., 1976)	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \\$	AB366635	26%	77%
Equino- micina (DELL et al., 1975)	$ \begin{array}{c} \begin{array}{c} \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \end{array} \\ \begin{array}{c} \end{array} \\ \end{array} $	AB211309	26%	75%
Tiocoralina (PEREZ BAZ et al., 1997)	$ \begin{array}{c c} -S & 0 & & 0 & H0 \\ 0 & N & V & N & H & 0 \\ S & V & S & 0 & H & 0 \\ 0 & S & V & S & 0 \\ 0 & H & 0 & N & 0 \\ 0 & H & 0 & 0 & S \\ 0 & H & 0 & 0 & S \\ 0 & 0 & 0 & S \\ 0 & 0 & 0 & S \\ \end{array} $	AM11347 2	11%	71%

Tabela 9: Compostos cujo CGB apresenta grande similaridade com o *cluster* número 3 do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 (dados de acordo com busca no *GenBank*).

A análise do CGB 5 evidenciou que os genes que compõem este *cluster* possuem alta similaridade com genes de vários CGBs de NRPs que são descritos na literatura como sideróforos, dentre eles os compostos albachelina (90% de similaridade entre os genes) e eritrochelina (60% de similaridade entre os genes) (figura 59). A análise manual dos genes e módulos de NRP que compõem esses diferentes *clusters* evidenciou que o composto codificado no genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 possui a mesma sequência de módulos que eritrochelina, e, portanto, incorpora os mesmos aminoácidos na mesma sequência, mas apresenta genes diferentes fora desses módulos, que estão presentes no *cluster* da albachelina. Um desses genes é de modificação dos aminoácidos incorporados: se trata de uma formiltransferase, que é responsável pela modificação do aminoácido não-proteinogênico ornitina em hidroxi-formilornitina na biossíntese da albachelina (KODANI et al., 2015). Portanto, espera-se que esta linhagem seja capaz de biossintetizar um sideróforo com estrutura intermediária a estes dois compostos.



Figura 59: Compostos que mostraram similaridade com o *cluster* 5 do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082: albachelina (KODANI et al., 2015) e eritrochelina (ROBBEL et al., 2010).

O CGB número 16 codifica um composto provavelmente similar aos lipídios fenólicos alquil-O-diidrogeranil-metoxi-hidroquinonas descritos em 2011 por AWAKAUA e

colaboradores (figura 60), apresentando 71% de similaridade com o CGB destes compostos (AWAKAWA et al., 2011).



R= C₁₆, C₁₇ ou C₁₈

Figura 60: Estrutura química das alquil-O-diidrogeranil-metoxi-hidroquinonas (AWAKAWA et al., 2011).

O *cluster* número 17 codifica um composto provavelmente similar ao carotenóide glicosilado sioxanthina, descrito em 2015 por Richter e colaboradores (figura 61) como um caroteno não-usual em actinobactérias, apresentando 80% de similaridade com o CGB deste composto. Este *cluster* provavelmente está relacionado ao pigmento que dá coloração às células de *Krasilnikovia* sp. T082, que são alaranjados, tendo em vista que a sioxanthina foi descrita como responsável pela pigmentação alaranjada típica de *Salinispora tropica* (RICHTER; HUGHES; MOORE, 2015).



Figura 61: Estrutura química da sioxanthina (RICHTER; HUGHES; MOORE, 2015).

4.2. Estudo químico da linhagem Krasilnikovia sp. T082

Tendo em vista o interessante genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 relacionado ao metabolismo secundário descrito nos tópicos anteriores, e o fato de não haver nenhum estudo

químico relatado para este gênero de actinobactéria rara, decidiu-se cultivar esta linhagem em cultura pura e analisar os compostos produzidos por ela.

Foram escolhidos dois meios de cultura para cultivo: TSB 0,5x por ser o meio em que foi estudada atividade indutora descrita no capítulo 2, e o meio ISP2 por ser o meio melhor estabelecido na literatura para cultivo de actinobactérias. Antes de iniciar os cultivos foi estudada a curva de crescimento nestes dois meios de cultura. Foram analisados 10 pontos: de um a sete dias (a cada 24 h) e depois com 10, 15 e 20 dias. Em cada ponto analisado a cultura foi filtrada com membrana 0,22 μ m, e a massa celular obtida secada em estufa para medição do peso seco e construir a curva de crescimento.

As curvas obtidas podem ser vistas no gráfico da figura 62. A linhagem se desenvolveu melhor em ISP2, tendo inclusive atingido uma segunda fase de crescimento a partir do quinto dia. Em 2008 Manteca e colaboradores demonstraram que durante o cultivo líquido da actinobactéria *Streptomyces coelicolor* também é observada uma segunda fase de crescimento. Foi demonstrado que durante esta fase um outro tipo de micélio é formado, e é nesta fase de crescimento que os antibióticos undecilprodigiosina e actinorhodina são produzidos (MANTECA et al., 2008).



Figura 62: Curva de crescimento de *Krasilnikovia* sp. T082 em dois meios de cultura: ISP2 e TSB. Condições de cultivo: agitação em 200 rpm e 30 °C.

4.2.1. Cultivo em TSB 0,5x

A linhagem foi cultivada em 1,75 L de meio TSB por 10 dias a 30 °C, 200 rpm. A cultura foi então filtrada. Como a linhagem cresce menos neste meio de cultura, decidiu-se utilizar SPE para obtenção de extratos com maior rendimento de massa. O sobrenadante livre de células foi concentrado e extraído utilizando cartucho C_{18} (Supelco[®], 10 g) em um gradiente de MeOH:H₂O para eluição dos compostos: 10, 20, 30, 40, 50 e 100% MeOH. As frações obtidas foram secadas sob pressão reduzida em rotaevaporador e a massa obtida foi pesada (tabela 10). O meio de cultura TSB também foi submetido ao mesmo fracionamento para fins comparativos.

Fração	Massa obtida (mg)
10% MeOH	994
20% MeOH	736
30% MeOH	195
40% MeOH	106
50% MeOH	74
100% MeOH	70

Tabela 10: Massa obtida de cada fração proveniente da SPE e do macerado das células.

4.2.1.1. Ensaio antimicrobiano do cultivo em TSB 0,5x

Todos extratos obtidos foram testados frente a bactérias Gram-negativas, Grampositivas e levedura na concentração de 100 µg/mL pelo método de *punch-hole*. Nenhum apresentou atividade.

4.2.1.2. Fracionamento do cultivo em TSB 0,5x

As frações obtidas foram analisadas em HPLC-DAD-ELSD analítico utilizando coluna C₆-Fenil (Phenomenex®, 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m) em um gradiente de ACN:H₂O (Vazão: 1 mL/min. Gradiente: 4 min 5%, 5-100 % em 20 min, 10 min em 100%, 100-5% em 2 minutos e 5 min a 10%). Os cromatogramas obtidos foram analisados em λ 220 nm, 254 nm e 320 nm e comparados com o meio de cultura utilizado. Os extratos escolhidos para purificação de compostos foram as frações da SPE de 30% e 40% MeOH por apresentarem mais bandas cromatográficas diferentes quando comparados à respectiva fração do meio de cultura.

4.2.1.2.1. Fração de 30% MeOH

O cromatrograma mostrado na figura 63 mostra as frações coletadas para posterior purificação. Esta análise foi feita em HPLC-DAD semi-preparativo com coluna C₆-Fenil (Phenomenex[®], 25 cm x 10mm, 5 μ m) e gradiente ACN:H₂O, com um programa ajustado para melhor separação entre os compostos (Vazão: 4 mL/min. Gradiente: 3 min em 10%, 10-20% em 1 min, 2 min em 20%, 20-30% em 5 min, 2 min em 30%, 30-45% em 4 min, 45-100% em 1 min, 4 min em 100%, 100-10% em 1 min e 5 min em 10%).



Figura 63: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (λ 220, 254 e 320 nm) da análise da fração de 30% MeOH, mostrando as frações coletadas.

As frações obtidas foram submetidas a mais uma série de purificações em HPLC-DAD semi-preparativo. A tabela 11 mostra as sub-frações obtidas a partir desta nova série de purificações.

Fração	Sub-frações	Massa (mg)
30 1	30 1 1	0,5
_	30_1_2	0,4
	30_1_3	0,8
30_2	descartada	
30_3	30_3_1	0,3
	30_3_2	0,2
	30_3_3	0,7
	30_3_4	1,3*
	30_3_5	0,6
30_4	30_4_1	3,0*
	30_4_2	1,5*
30_5	30_5_1	0,25
	30_5_2	0,5
	30_5_3	0,3
	30_5_4	0,3
30_6	30_6_1	0,2
	30_6_2	0,3
	30_6_3	0,2
30_7	30_7_1	0,3

Tabela 11: Frações obtidas após purificação das frações coletadas do extrato 30% MeOH.

*frações selecionadas para determinação estrutural

4.2.1.2.2. Fração de 40% MeOH

O cromatograma mostrado na figura 64 mostra as frações coletadas para posterior purificação. Esta análise foi feita em HPLC-DAD semi-preparativo, com coluna C₆-Fenil (25 cm x 10 mm, 5 μ m) e gradiente ACN:H₂O, com um programa ajustado para melhor separação entre os compostos (Vazão: 4 mL/min. Gradiente: 3 min em 10%, 10-20% em 1 min, 2 min em 20%, 20-30 % em 10 min, 30-100% em 1 min, 6 min em 100%, 100-10% em 1 min e 4 min em 10%).

As frações obtidas foram submetidas a mais uma série de purificações em HPLC-DAD semi-preparativo. A tabela 12 mostra as sub-frações obtidas a partir desta nova série de purificações.



Figura 64: Cromatograma obtido por HPLC-DAD (λ 220, 254 e 320 nm) da análise da fração de 40% MeOH, mostrando as frações coletadas.

Fração	Sub-frações	Massa obtida (mg)
40_1	n/a	3,7
40_3	n/a	17,5
40_4	40_4_1	0,6
	40_4_2	0,1
	40_4_3	0,5
40_5	40_5_1	0,3
	40_5_2	6,1*
40_6	n/a	0,9
40_7	n/a	0,8
40_8	n/a	0,9
40_9	n/a	0,8

Tabela 12: Frações obtidas após purificação das frações coletadas do extrato 40% MeOH.

*composto selecionado para elucidação estrutural

n/a: não se aplica

Foi observado um baixo rendimento para as frações obtidas nos fracionamentos dos extratos de 30% e 40% MeOH. Um detalhe observado é que esta linhagem produz muitos pigmentos escuros, que eluem ao longo de todas as frações dificultando a purificação e prejudicando o rendimento (maior parte da massa do extrato está relacionada a este pigmento). Foram escolhidas algumas amostras de maior rendimento para determinação estrutural, todas determinadas como pertencentes à classe das dicetopiperazinas.

4.2.1.3. Dicetopiperazinas

Os compostos isolados, descritos nos tópicos seguintes, apresentaram sinais característicos de compostos da classe das dicetopiperazinas (DKPs) devido à sinais característicos de hidrogênio do carbono alfa de aminoácidos na região entre δ 4,5-3,5, além de sinais de hidrogênios metilênicos e metílicos na região entre δ 3,5-1,0 e presença de sinais de hidrogênios aromáticos entre δ 8,0-7,0, que caracterizam as cadeias laterais de aminoácidos apolares. Todas as DKPs aqui isoladas já estão descritas na literatura, portanto, a determinação estrutural foi realizada comparativamente com dados disponíveis na literatura de RMN e MS.

Dicetopiperazinas formam uma ampla classe de metabólitos secundários que apresentam várias atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e imunossupressiva (BELIN et al., 2012). Ainda faltam estudos a respeito do papel biológico destes compostos para seus organismos produtores. Acredita-se que estejam envolvidas em comunicação entre os micro-organismos (tanto intra como inter-espécies), como por exemplo em *quorum-sensing* (BELIN et al., 2012).

4.2.1.3.1. Amostra 30_3_4: Ciclo-isoleucina-prolina (ciclo-ile-pro)

A amostra 30_3_4 (composto 1) apresentou os sinais característicos mencionados de DKPs. A presença de seis hidrogênios metilênicos relativamente mais desblindados (δ 3,7-1,8) indicaram a presença de uma prolina. A presença de mais dois hidrogênios metilênicos mais blindados (δ 1,6-1,1) e dois sinais distintos de hidrogênios metílicos, sendo um tripleto e um dupleto, indicaram que o outro aminoácido é uma isoleucina. A análise por HR-ESI-MS mostrou um íon de *m/z* 233,1255 (figura 94 do anexo 2), referente a este composto sodiado com erro calculado de 4,7 ppm. O espectro de RMN de ¹H pode ser visto no anexo 1 figura 83.

Portanto, a amostra 30_2_4 foi determinada como sendo uma ciclo-isoleucina-prolina (figura 65). Os dados obtidos de RMN de ¹H foram comparados com dados publicados na literatura (tabela 13) (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995). As diferenças observadas de deslocamento químico entre os sinais dos mesmos hidrogênios se devem ao fato dos espectros terem sido obtidos em solventes diferentes.



Figura 65: Estrutura da ciclo-isoleucina-prolina (1).

RMN de ¹ H (500 MHz, D ₂ O)		RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995)		
δ^{I} H (ppm) (<i>mult.</i> ; J(Hz); int)	Posição	δ^{I} H (ppm) (<i>mult.</i> ; J(Hz) int)	Posição	
4,41-4,34 (<i>m</i> ; 1H)	H _{2'} (Pro)	4,07 (<i>t</i> ; 7,5; 1H)	$H_{2'}$ (Pro)	
3,85 (<i>d</i> ; 5,4; 1H)	H_2 (Ile)	3,96 (<i>sl</i> ; 1H)	H ₂ (Ile)	
3,64-3,56 (<i>m</i> ; 1H)	H _{5'} (Pro)	3,6-3,5 (<i>m</i> ; 2H)	H ₅ , (Pro), H ₅ , (Pro)	
3,56-3,49 (<i>m</i> ; 1H)	H _{5'} (Pro)			
2,39-2,30 (<i>m</i> ; 1H)	H_{3a} (Ile)	2,4-2,3 (<i>m</i> ; 1H)	H_{3a} (Ile)	
2,11-2,01 (<i>m</i> ; 1H)	H _{3'} (Pro)	2,3-2,2 (<i>m</i> ; 1H)	${ m H}_{3'}$ (Pro)	
2,00-1,84 (<i>m</i> ; 3H)	H ₄ , (Pro), H ₄ , (Pro), H ₃ , (Pro)	2,1-2,0 (<i>m</i> ; 1H)	H ₃ , (Pro)	
		2,0-1,9 (<i>m</i> ; 1H)	H ₄ , (Pro)	
		1,9-1,8 (<i>m</i> ; 1H)	$H_{4^{\prime}}$ (Pro)	
1,55-1,45 (<i>m</i> ; 1H)	H ₄ (Ile)	1,5-1,4 (<i>m</i> ; 1H)	H ₄ (Ile)	
1,26-1,15 (<i>m</i> ; 1H)	H ₄ (Ile)	1,3-1,1 (<i>m</i> ; 1H)	H ₄ (Ile)	
0,98 (<i>d</i> ; 6,8; 3H)	H_{3b} (Ile)	1,05 (<i>d</i> ; 7,2; 3H)	H_{3b} (Ile)	
0,90 (<i>t</i> ; 7,3; 3H)	H_5 (Ile)	0,92 (<i>t</i> ; 7,4; 3H)	H ₅ (Ile)	

Tabela 13: Dados obtidos em análise por RMN de ¹H (500 MHz) da amostra 30_3_4 , e comparação deste com dados obtidos na literatura para o mesmo composto.

Está relatado na literatura que este composto foi isolado de diferentes bactérias e fungos, e apresenta atividade contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli* (EL-GENDY BEL e RATEB, 2015). Um estudo realizado por ABED e colaboradores (2013) mostrou que a ciclo-L-Pro-L-Ile também apresenta atividade inibitória de *quorum sensing* (ABED et al., 2013).

4.2.1.3.2. Amostra 30_4_1: Ciclo-leucina-prolina

A amostra 30_4_1 (composto 2) apresentou os sinais característicos mencionados de DKPs. A presença de seis hidrogênios metilênicos entre δ 3,6 - 1,8 indicou a presença de uma

prolina. A presença de mais dois hidrogênios metilênicos, um hidrogênio metínico e dois sinais de hidrogênios metílicos com deslocamento muito próximos, sendo dois dupletos, indicaram que o outro aminoácido é uma leucina. A análise por HR-ESI-MS mostrou um íon de m/z 233,1255 (figura 95 do anexo 2), referente a este composto sodiado com erro calculado de 2,4 ppm. O espectro de RMN de ¹H pode ser visto no anexo 1 figura 84.

Portanto, a amostra 30_4_1 foi determinada como sendo a ciclo-leucina-prolina (figura 66). Os dados obtidos de RMN de ¹H foram comparados com dados publicados na literatura (tabela 14) (WANG et al., 2016).



Figura 66: Estrutura da ciclo-leucina-prolina (2).

RMN de ¹H (500 MHz)				
D ₂ O CDCl ₃ (WANG et al., 2016)				
δ ^I H (ppm) (mult.; <i>J</i> (Hz); int)	Posição	δ ¹ Η (ppm) (mult.; <i>J</i> (Hz); int)	Posição	
4,29-4,23 (t; 7,7; 1H)	H _{2'} (Pro)	4,13 (t; 8,3; 1H)	H _{2'} (Pro)	
4,15-4,10 (m; 1H)	H_2 (Leu)	4,02 (dd; 3,9 , 9,3; 1H)	H_2 (Leu)	
3,54-3,47 (m; 2H)	H _{5'} (Pro)	3,64-3,52 (m, 2H)	H _{5'} (Pro)	
2,34-2,25 (m, 1H)	H ₃ , (Pro)	2,39-2,32 (m, 2H)	H _{3'} (Pro)	
2,07-1,97 (m; 2H)	H _{3'} (Pro), H _{4'} (Pro)	2,18-2,0 (m, 2H)	H _{4'} (Pro)	
2,07-1,82 (m; 3H)	H ₄ , (Pro), H ₄ (Leu), H ₃ (Leu)	1,94-1,87 (m, 1H) 1,75 (m, 1H)	H ₄ (Leu) H ₃ (Leu)	
1,56-1,47 (m; 1H)	H ₃ (Leu)	1,53 (m, 1H)	H ₃ (Leu)	
0,96 (d; 6,0; 3H) 0,95 (d; 6,0; 3H)	H _{5a} (Leu)* H _{5b} (Leu)*	1,00 (d; 6,6; 3H) 0,95 (d; 6,6; 3H)	H5 (Leu) H5 (Leu)	

Tabela 14: Dados obtidos em análise por RMN de 1 H (500 MHz, D₂O) da amostra 30_4_1, e comparação deste com dados obtidos na literatura para o mesmo composto.

* os valores destes hidrogênios podem ser intercambiáveis

4.2.1.3.3. Amostra 30_4_2

A amostra 30_4_2 (composto **3**) apresentou os sinais característicos mencionados de DKPs. A presença de dois dupletos referentes a hidrogênios metilênicos em δ 3,18 e δ 2,98 e sinais de cinco hidrogênios de anel aromático característicos de anel benzênico monossubstituído indicaram a presença de uma fenilalanina (δ 7,31-7,14). Os demais sinais observados totalizam sete hidrogênios, sendo nenhum destes referentes a hidrogênio metílico, sugerindo que o outro aminoácido seja uma prolina.

A análise por HR-ESI-MS mostrou um íon de m/z 267,1108 (figura 96 do anexo 2), que apresenta um erro calculado de 1,5 ppm quando comparado ao composto ciclo-fenilalaninaprolina. Entretanto, os deslocamentos químicos observados dos hidrogênios metilênicos não condizem com os valores esperados para uma prolina. Esta amostra foi então enviada para análise por gHSQC e gHSBC (figura 86 do anexo 1). O gHSQC indicou que o hidrogênio ligado ao carbono alfa do aminoácido (que possui caracteristicamente deslocamento químico por volta de δ 60 por estar ligado a um nitrogênio) que seria uma prolina é um duplo dupleto com deslocamento químico de 8 2,59, o que é considerado um valor muito blindado para um hidrogênio alfa de aminoácido. Buscas na literatura mostraram que a configuração absoluta da fenilalanina e prolina influencia no deslocamento químico do hidrogênio alfa da prolina. Wang e colaboradores (2010) demonstraram essa influência ao analisar e comparar espectros de RMN de ¹H da ciclo-S-fenilalanina-S-prolina e ciclo-S-fenilalanina-R-prolina. No caso da configuração trans (ciclo-S-fenilalanina-R-prolina) o hidrogênio alfa da prolina fica mais blindado como observado para o composto 3 devido ao efeito anisotrópico exercido pelo anel benzênico da fenilalanina nesta configuração. Este efeito é comum em dicetopiperazinas em que um dos aminoácidos apresenta anel aromático (GUIMARÃES et al., 2010).

Portanto, a amostra 30_4_2 foi determinada como sendo uma ciclo-S-fenilalanina-Rprolina (figura 67). Os dados obtidos de RMN de ¹H (figura 85) foram comparados com dados publicados na literatura (tabela 15) (WANG et al., 2010). Este trabalho de WANG e colaboradores (2010) isolou a ciclo-S-fenilalanina-R-prolina de *B. subtilis*, e reporta como sendo a primeira vez que este composto nesta configuração foi isolado de uma fonte natural.



Figura 67: Estrutura da ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (3).

Tabela 15: Dados obtidos em análise por RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) da amostra 30_4_2, e comparação deste com dados obtidos na literatura para o mesmo composto.

RIVIN de H (SUU MHZ)				
CD ₃ OD		CDCl ₃ (WANG et al., 2010)		
δ^{I} H (ppm) (mult.; <i>J</i> (Hz); int)	Posição	δ ^I H (ppm) (mult.; J(Hz); int)	Posição	
7,31-7,26 (m; 3H)	H _{arom} (Phe)	7,33-7,20 (5H)	Harom (Phe)	
7,20-7,14 (m; 2H)	Harom (Phe)			
4,21-4,14 (m; 1H)	H_2 (Phe)	4,22 (m; 1H)	H_2 (Phe)	
3,57-3,54 (m; 1H)	$H_{5'}$ (Pro)	3,65-3,59 (m; 1H)	$H_{5'}$ (Pro)	
3,35-3,32 (m, 1H)	${ m H}_{5'}$ (Pro)	3,41-3,36 (1H)	H _{5'} (Pro)	
3,22-3,14 (m, 3H)	H ₃ (Phe)	3,15 (dd; 6,5 , 13,5; 1H)	H ₃ (Phe)	
3,01-2,94 (m, 2H)	H ₃ (Phe)	3,06 (dd; 4,0 , 13,5; 1H)	H ₃ (Phe)	
2,63-2,56 (m, 1H)	H _{2'} (Pro)	2,94-2,91 (dd, 6,5 , 10,5; 1H)	H _{2'} (Pro)	
2,07-1,96 (m, 1H)	H _{3'} (Pro)	2,20-2,15 (m; 1H)	H _{3'} (Pro)	
1,94-1,83 (m, 1H)	$H_{4^{\prime}}$ (Pro)	1,96-1,90 (m; 1H)	$H_{4^{\prime}}$ (Pro)	
1.71.1.55 (m. 2H)	H _{3'} (Pro),	1.85.1.64 (m· 2H)	H _{3'} (Pro),	
1,71-1,33 (111, 211)	H _{4'} (Pro)	1,05-1,04 (111, 211)	H ₄ , (Pro)	

4.2.1.3.4. Amostra 40_5_2

A amostra 40_5_2 (composto 4) apresentou os sinais característicos mencionados de DKPs. A presença de oito hidrogênios metilênicos na região de δ 3,7-1,2 e ausência de metilas indicaram a presença de uma prolina, restando dois hidrogênios para o outro aminoácido. Estes dois hidrogênios metilênicos restantes e sinais de cinco hidrogênios de anel aromático característicos de anel benzênico monossubstituído indicaram a presença de uma fenilalanina (δ 7,23-7,19). A análise por HR-ESI-MS mostrou um íon de *m/z* 267,1088 (figura 97 do anexo 2), referente a este composto sodiado com erro calculado de 5,99 ppm.

Portanto, a amostra 40_5_2 foi determinada como sendo uma ciclo-fenilalanina-prolina (figura 68). Os dados obtidos de RMN de ¹H (figura 87) foram comparados com dados publicados na literatura (tabela 16) (STRÖM et al., 2002). Neste caso, os sinais observados para

a prolina possuem deslocamentos químicos característicos para este aminoácido, indicando que o composto 4 possui conformação cis, sendo, portanto, ou ciclo-S-fenilalanina-S-prolina ou ciclo-R-fenilalanina-R-prolina.

Esta dicetopiperazina foi isolada pela primeira vez de *Lactobacillus plantarum* (STRÖM et al., 2002), tendo sido também isolada posteriormente de actinobactérias. Está descrita na literatura como tendo atividade antitumoral moderada (FERREIRA et al., 2016).



Figura 68: Estrutura da *rel-*(R,R)-ciclo-fenilalanina-prolina (4).

RMN de ¹ H (CD ₃ OD)				
500 MHz	600 MHz (STR	ÖM et al., 2002)		
δ^{I} H (ppm) (mult.; <i>J</i> (Hz); int)	Posição	$\delta^{I}\mathrm{H}\left(\mathrm{ppm} ight)$ (int)	Posição	
7,23-7,19 (m; 5H)	Harom (Phe)	7,27 (2H)	$H_6 e H_8 (Phe)$	
		7,24 (2H)	H ₅ e H ₉ (Phe)	
		7,22 (1H)	H ₇ (Phe)	
4,46-4,40 (m; 1H)	H ₂ (Phe)	4,44 (1H)	H ₂ (Phe)	
4,07 (ddd; 6,3, 1,2, 10,0; 1H)	$\mathrm{H}_{2^{\prime}}(\mathrm{Pro})$	4,07 (1H)	H ₂ , (Pro)	
3,57-3,48 (m, 1H)	H _{5'} (Pro)	3,55 (1H)	H ₅ , (Pro)	
3,39-3,32 (m, 3H)	H _{5'} (Pro)	3,37 (1H)	H ₅ , (Pro)	
3,20-3,10 (m, 2H)	H ₃ (Phe)	3,17 (2H)	H ₃ (Phe)	
2,11-2,04 (m, 1H)	H _{3'} (Pro)	2,10 (1H)	H _{3'} (Pro)	
1,84-1,74 (m, 2H)	H _{4'} (Pro)	1,81 (2H)	H _{4'} (Pro)	
1,25-1,14 (qui, 1H)	H _{3'} (Pro)	1,25 (1H)	H _{3'} (Pro)	

Tabela 16: Dados obtidos em análise por RMN de ¹H da amostra 40_5_2 comparando com dados obtidos na literatura para o mesmo composto.

4.2.2. Cultivo em ISP2 líquido

A linhagem foi cultivada em 3 L de meio ISP2 por 10 dias a 30 °C, 200 rpm. A cultura foi então filtrada. Como o modo de extração realizado para o cultivo em TSB apresentou muito arraste de pigmentos escuros que dificultaram a purificação, decidiu-se extrair o cultivo em
ISP2 com partição em acetato de etila para minimizar a interferência deste pigmento nos fracionamentos. Após partição a amostra foi seca para obtenção do extrato bruto.

4.2.2.1. Ensaio antimicrobiano do cultivo em ISP2

O extrato de acetato de etila obtido do cultivo em ISP2 foi testado frente a bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e levedura na concentração de 100 μ g/mL pelo método de punch-hole. Foi observada atividade contra bactérias Gram-positivas. Portanto, para o estudo químico deste extrato foi dada prioridade ao estudo do composto responsável por esta atividade.

4.2.2.2. Investigação da bioatividade detectada em cultivo líquido ISP2 de *Krasilnokovia* sp. T082

O extrato de acetato de etila proveniente da partição do cultivo líquido desta linhagem em ISP2 foi fracionado em cartucho SPE com fase estacionária C_{18} . O esquema da figura 69 mostra o rendimento de cada fração coletada.



Figura 69: Esquema de fracionamento do extrato e acetato de etila obtido da partição do cultivo em ISP2 de *Krasilnikovia* sp. T082.

A fração 100% MeOH exibiu atividade contra *S. aureus*. Portanto, este extrato foi priorizado para o isolamento de compostos. Conforme pode ser visto no cromatograma na figura 70, este extrato apresentou três bandas cromatográficas majoritárias diferentes do controle do meio de cultura (comparar o cromatograma "82 ISP2 – bioativo" com o cromatograma "ISP2"). Estas três bandas cromatográficas exibiram mesmo espectro de absorção no UV, sugerindo que elas tenham alguma similaridade estrutural (figura 70).



Figura 70: Cromatogramas obtidos por HPLC-ELSD, sobrepostos para comparação da produção dos compostos **5-7** em diferentes condições de cultivo. Apesar da banda cromatográfica marcada com um asterisco apresentar tempo de retenção similar ao composto **7**, essas bandas apresentam espectro de absorção no UV diferentes, não sendo, portanto, referentes ao mesmo composto. Espectros de absorção no UV demonstrados abaixo dos cromatogramas.

Inferiu-se que estes três compostos (5-7) fossem responsáveis pela atividade. Estes foram então purificados e testados. Como pode ser visto na figura 71, estes compostos são de fato responsáveis pela atividade antibacteriana observada previamente contra *S. aureus*, sendo que o composto 7 é mais ativo que os demais (1,56 μ m/mL exibiu mesma atividade que o controle estreptomicina 400 μ g/mL) (figura 71).



Figura 71: Teste contra *S. aureus* dos três compostos isolados, comparado ao controle estreptomicina. Os três compostos foram submetidos ao ensaio de CIM, que confirmou que o composto

7 é o mais ativo, com CIM < 3 ng/mL, sendo que os compostos **5** e **6** apresentaram CIM de 1,56 μ g/mL. Como os valores de CIM foram baixos apesar de se tratar de compostos de alto peso molecular, decidiu-se enviar esses compostos para teste contra linhagens multi-resistentes de *S. aureus* (MRSA) e inclusive alguns isolados clínicos (laboratório da Prof. Ilana Camargo do Instituto de Física de São Carlos – USP). Foram enviados os compostos **6** e **7**, os resultados podem ser vistos na tabela 17. O composto **7** apresentou atividade contra todas as linhagens testadas, que incluem linhagens resistentes a meticilina (MRSA), daptomicina (DAP), tigeciclina (TIG) e vancomicina (VISA). Foi também medida a concentração bactericida mínima (CBM) (tabela 17), que evidenciou que o composto **7** apresenta atividade bactericida. O composto **6** apresentou apenas uma atividade fraca contra uma das linhagens (*S. aureus* ATCC 25923).

	CIM (µg/mL)		CBM (µg/mL)		
Linhagens bacterianas	Compostos				
	6	7	6	7	
S. aureus ATCC 25923	128	32	>128	64	
<i>S. aureus</i> SA16 ST5-SCCmecII MRSA, origem clínica	>128	32	n/d	64	
<i>S. aureus</i> SA33 ST105- SCCmecII MRSA + TIG R, origem clínica	>128	32/64	n/d	64	
<i>S. aureus</i> SA88 ST5-SCCmecII MRSA + DAP R, origem clínica	>128	32	n/d	64	
<i>S. aureus</i> SA90 ST5-SCCmecII MRSA DAP S, origem clínica	>128	32	n/d	64	
<i>S. aureus</i> Mu50 ST5, VISA	>128	128	n/d	>128	

Tabela 17: Valores de CIM e CMB (μ g/mL) dos compostos 6 e 7 frente a linhagens multi-resistentes de *S. aureus*.

n/d: não determinado

4.2.2.3. Elucidação estrutural dos compostos bioativos

Análises preliminares de RMN de ¹H evidenciaram que de fato os três compostos bioativos possuem grande similaridade estrutural (figura 72). Análise dos sinais sugeriu que

estes compostos provavelmente pertencem a classe dos peptídeos não-ribossomais (NRP): há presença de diversos sinais na região de hidrogênios de carbono alfa de aminoácidos (δ 5,5-4,5) indicando natureza peptídica; entretanto, há sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos (δ 8,0-7,0) que não possuem multiplicidades características de aminoácidos proteinogênicos (fenilalanina, triptofano, tirosina) e sinais de hidrogênios de metilas ligadas a heteroátomos (δ 4,0-2,5, integrando para 3 hidrogênios), indicando que se estes compostos forem de natureza peptídica, os aminoácidos que os compõem são modificados, e, portanto, estes compostos seriam então NRPs.



Figura 72: Comparação entre os espectros de RMN de ¹H dos compostos 6-7. A: região de hidrogênios de anéis aromáticos com multiplicidades que não são características de aminoácidos proteinogênicos (fenilalanina, triptofano, tirosina). B: região de hidrogênios ligados a carbono alfa de aminoácidos. C: hidrogênios de metilas ligadas a heteroátomos.

Foi realizada então análise de todos os CGB identificados no genoma de *Krasilnokovia* sp. T082 que possivelmente codificam NRP. Dentre deles, o *cluster* 3 foi identificado pelo antiSMASH como sendo responsável pela síntese de um grupo de compostos chamados de SW163, que são NRPs com atividade antibacteriana e citotóxica.

Buscas na literatura pelos dados químicos destes compostos (espectros de RMN de ¹H, espectro de absorção no UV, espectrometria de massas) comprovou que os compostos **5-7** são

de fato codificados por este CGB, sendo similares aos compostos SW163 (tabela 9). Uma característica marcante destes compostos é a presença do cromóforo ácido 3-hidroxiquináldico, que dá o espectro de absorção no UV característico observado (figura 70). A figura 73 ilustra a comparação entre o CBG depositado no MIBig (SW163) e o CGB 3 encontrado no genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 através de análise no antiSMASH. A tabela 18 compara gene a gene, mostrando a cobertura e similaridade entre os genes e a possível função de cada um. Os genes do CGB 3 estão numerados de acordo com sua ordem no CGB, da esquerda para a direita. Os genes que compõem o CGB do composto SW163 são codificados como "Swb".



Figura 73: Comparação visual entre os CGBs de *Krasilnikovia* sp. T082 identificado pelo antiSMASH e o CBG que apresentou maior similaridade com este. Cores iguais indicam similaridade. Setas brancas indicam genes que não tem correspondência com o outro CBG em comparação. Os genes estão em ordem numérica, e a função de cada um pode ser vista na tabela 17.

Conos do CCD 3	Genes de CGB – Cobertura		Dossíval função	
Genes de CGD 5	SW163	/Similaridade	r ussivel luliçau	
Gene 1	swb6	99% / 83%	Biossíntese do NCA	
Gene 2	swb7	75% / 84%	Biossíntese do NCA	
Gene 3	swb8	100% / 67%	Formação do grupo tioacetal	
Gene 4	swb10	99% / 78%	Biossíntese do HQA	
Gene 5	swb11	97% / 81%	Biossíntese do HQA	
Gene 6	swb12	100% / 77%	Ativação do HQA	
Gene 7	swb13	98% / 79%	Biossíntese do HQA	
Gene 8	swb14	97% / 74%	Biossíntese do HQA	
Gene 9	swb15	99% / 84%	Resistência	
Gene 10	swb16	100% / 74%	Módulo 1 e 2 do NRP	
Gene 11	swb17	90% / 79%	Módulo 3 e 4 do NRP	
Gene 12	swb17	89% / 78%	Módulo 3 e 4 do NRP	
Gene 13	swb18	98% / 80%	mbtH-like	
Gene 14	swb19	100% / 81%	Regulação	
Gene 15	swb20	95% / 78%	Formação da ponte de dissulfeto	
Gene 16	orf6	104% / 76%	Não descrita	
Gene 17	swb5	100% / 80%	Transportador ABC	
Gene 18	swb4	93% / 83%	Transportador ABC	
Gene 19	swb3	99% / 80%	Regulação	
Gene 20	s/c	s/c	Não descrita	
Gene 21	s/c	s/c	Isoprenil-transferase	
Gene 22	swb2	100% / 79%	Biossíntese do HQA	
Gene 23	swb1	99% / 77%	Biossíntese do HQA	
Gene 24	s/c	s/c	Resistência a bleomicina	
Gene 25	s/c	s/c	Regulador	
s/c	swb9	s/c	Alquilação da S- metila	

Tabela 18: Análise dos genes que compõem o CGB 3 comparando com os genes que compõem o CGB do composto SW163 e possível função de cada um dentro do CGB (WATANABE et al., 2009).

*s/c: sem gene correspondente

A análise do CGB 3 evidenciou que este possui quase todos os genes que compõe o CGB do grupo de compostos produzidos por *Streptomyces* sp. SNA 15896, chamado de SW-163 (tabela 18). Só não está presente o gene *swb9*, que codifica uma metiltransferase que provavelmente tenha fun7ção de alquilação da S-metila, sendo assim possivelmente responsável por alguns análogos pertencentes a este grupo de compostos (WATANABE et al., 2009). Portanto, provavelmente a linhagem em estudo não é capaz de biossintetizar análogos de SW163 com a S-metila alquilada.

Como pode ser visto na figura 74 os módulos que compõem as NRPS (peptídeo nãoribossomal sintetases), que são as enzimas responsáveis pela montagem da sequência de aminoácidos do composto, são os mesmos para o CBG 3 e CBG do composto SW163, inclusive a epimerase (domínio 'E'). Análises disponíveis no antiSMASH mostraram que as quatro adenilases (domínios 'A') que compõem essas NRPS incorporam os mesmos aminoácidos nesses dois CGBs. Estes dados indicam que a sequência peptídica é a mesma entre estes dois compostos e provavelmente eles possuem a mesma configuração absoluta.



Figura 74: Comparação entre os módulos NRP do CGB 3 (genes 10, 11 e 12) e do CGB do composto SW163 (genes swb16 e swb17). C: domínio de condensação. A: domínio de adenilação. E: domínio de epimerização. nMT: domínio de N-metil-transferase. TE: domínio de terminação tioesterase.

Os três compostos isolados estão descritos a seguir. Possuem características incomuns para produtos naturais como a ligação tioacetal, o aminoácido não-proteinogênico ácido norcoronâmico e alguns apresentam grupo sulfóxido. Portanto, trata-se de um grupo de compostos com um padrão estrutural interessante, diferenciado e com alta complexidade estrutural. Tendo em vista a complexidade destes compostos e dos espectros de RMN de ¹H obtidos, o conhecimento prévio da possível estrutura química destes compostos de acordo com os dados do CGB foi de extrema importância na determinação das estruturas dos compostos **5**-7, que foi comparativa com os espectros disponíveis na literatura.

Os genes que compõem o CGB são quase todos os mesmos que os presentes no CGB de SW163, sendo que os domínios que compõem as NRPSs são os mesmos e as adenilases incorporam os mesmos aminoácidos. Portanto, já era esperado que todos compostos fossem estruturalmente muito similares ao grupo de compostos SW-163. Os três compostos devem possuir o biciclo aromático ácido 3-hidroxi-quináldico (também confirmado pelo espectro de absorção no UV), oito aminoácidos (duas serinas, duas alaninas, duas N-metil-cisteínas e dois ácidos norcoronâmicos), e as N-metil-cisteínas devem ser interligadas através de um grupo tioacetal. Tendo em vista os análogos presentes na literatura, já era esperado que as diferenças entre os três compostos aqui isolados seriam na região de ligação entre as duas N-metil-cisteínas. De fato, as maiores diferenças entre os deslocamentos químicos dos três compostos foram observadas nesta região, como será apresentado a seguir (veja figura 77). A ausência do gene *swb9* no CGB já deu indícios que este composto possui uma S-metila, ou seja, esta região não possui alquilação como em alguns análogos, pois esta é a função putativa deste gene (WATANABE et al., 2009).

O primeiro composto que teve sua estrutura determinada foi o composto 7. Análise por inserção direta em HR-ESI-MS detectou os íons: $m/z [M+H]^+$ 1127,3963 e $m/z [M+Na]^+$ 1149,3755 (figura 100 do anexo 2). Busca no banco de dados *online Dictionary of Natural Products* (http://dnp.chemnetbase.com) detectou o composto UK 63598, que foi o primeiro nome dado ao composto SW-163D (erro de 0,17 ppm para o íon protonado).



Figura 75: Estrutura química do composto 7 (SW-163D).

Análises dos dados obtidos por RMN de ¹H (figura 92 do anexo 1), gHSQC e gHMBC (figura 93 do anexo 2) e comparação destes com dados disponíveis na literatura confirmaram que este de fato é o composto SW-163D (figura 75) (NAKAYA et al., 2007; RANCE et al., 1989). Foram observados sinais na região dos hidrogênios de anéis aromáticos (δ 7,8-7,5) que integraram para 10 hidrogênios, indicando a presença dos dois anéis aromáticos quinolínicos HQA. Cinco sinais na região entre δ 3,6-2,0 integrando para três hidrogênios cada indicaram a presença de metilas ligadas a heteroátomos, representando as N-metilas das duas N-metil cisteínas, as N-metilas dos dois ácidos norcoronâmicos e a S-metila do grupo tioacetal. São observados ainda quatro sinais referentes a hidrogênios metílicos (dupletos, δ 1,4-1,0) que apresentam acoplamentos com hidrogênios metínicos. Estas metilas referem-se às duas alaninas e aos dois ácidos norcoronâmicos observados para estes sinais indicaram que estes são correspondentes as amidas presentes na ligação entre as serinas-alaninas e serinas-HQA.

A tabela 19 mostra a atribuição dos sinais observados nas análises de RMN (dados de ¹³C foram anotados por análise dos dados de gHSQC e gHSQC). Foram obtidos 7,5 mg do composto 7.

Posição	$\delta^1 H^*$	δ ¹³ C	Posição	$\delta^{1}H^{*}$	δ ¹³ C
3'-ОН	11.34 (1H; s)		30	3,39 (3H; s)	35,9
3'-ОН	11.31 (1H; s)		31	4,98 (1H; m)	47,9
5	6,42 (1H; d; 8,1)	60,4	33 a	2,73 (1H, m)	26,0
8	4,97 (1H; m)	45,7	33b	3,57 (1H; dd, 10,1, 11,4)	26,0
9-NH	6,42 (1H; s)		35	2,07 (3H; s)	15,0
11	4,97 (1H; m)	50,8	37	2,84 (3H; s)	31,8
12a	4,84 (1H; m)	63,8	38	1,34 (3H)	16,8
12b	4,66 (1H; m)	63,8	39-NH	8.92 (1H; d; 8,1)	
18	6,15 (1H; dd; 10,1, 11,2)	54,4	41a	1,83 (1H; dd; 6,4, 7,8)	26,5
21	4,85 (1H; m)	46,2	41b	1,30 (1H; dd; 6,4, 7,8)	26,5
22-NH	6,77 (1H; d; 8,1)		42	1,68 (1H)**	25,0
24	4,86 (1H; m)	51,7	43	1,04 (3H; d; 6,1)	11,5
25a	4,75 (1H;m)	64,3	44	3,51 (3H; s)	36,6
25b	4,68 (1H; m)	64,3	45	2,88 (3H; s)	29,7
27a	1,88 (1H; dd; 6,2, 7,9)	26,5	46	1,39 (3H; d; 6,8)	17,9
27b	1,27 (1H; dd; 6,2, 7,9)	26,5	47-NH	8,92 (1H; d; 9,4)	
28	1,74 (1H)**	25,0	H _{arom}	7.67-7,78 (6H; m)	121,2; 126,8; 128,6
29	1,20 (3H; d; 6,1)	11,9	\mathbf{H}_{arom}	7,47-7,57 (4H; m)	128,4

Tabela 19: Dados de RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) do composto 7.

* em parênteses: número de hidrogênios, multiplicidade do sinal, J em Hz.

** sinal encoberto pelo solvente.

A figura 76 mostra a estrutura do composto SW-163D marcando cada aminoácido de uma cor diferente para melhor entendimento da composição de sua estrutura peculiar para produtos naturais. Como pode ser visto, é um composto quase simétrico em que cadeias iguais compostas de quatro aminoácidos formam um macrociclo interligado através de um grupo tioacetal.



Figura 76: Estrutura do composto SW-163D destacando cada aminoácido que o compõe.

O composto SW-163D foi descrito pela primeira vez em 1989, quando foi isolado de *Streptomyces braegensis* subsp. *japonicus* (RANCE et al., 1989). Neste estudo foi relatada atividade de contra *S. aureus* de CIM < 0,2 μ m/mL. Também está relatado na literatura atividade antiviral contra replicação do HIV-1 apresentando IC₅₀ de cerca de 0,5 nM (JAYASURIYA et al., 2005). Com relação a atividade citotóxica, apresentou valores extremamente baixos de IC₅₀: 0,2 ng/mL contra HeLa; 0,4 ng/mL contra HL-60; 7,1 ng/mL contra tsFT210; e 29 ng/mL contra src^{ts}-NRK (LIM et al., 2014). Neste mesmo estudo de Lim e colaboradores (2014) testaram também algumas atividades antimicrobianas em que este composto apresentou novamente baixos valores de IC₅₀: 17 ng/mL contra *S. aureus* 209; 66 ng/mL contra *E. coli* HO141; 0,82 µg/mL contra *Magnaporthe oryzae* kita-1 e 8,7 µg/mL contra *C. albicans* CM1542 (LIM et al., 2014).

Análise por espectrometria de massas de alta resolução mostrou que os compostos 5 e 6 possuem a mesma massa com 16 Da a mais que o composto 7, sugerindo que a única diferença fosse um oxigênio a mais na estrutura nestes compostos. Análise comparativa entre os três espectros de RMN de ¹H evidenciou que a região com as maiores diferenças de deslocamento dos sinais de ¹H e ¹³C é a do tioacetal.

A figura 77 mostra esta região e as diferenças dos dados de deslocamentos químicos de 13 C e 1 H entre os três compostos já nas estruturas sugeridas que estão descritas em tópicos posteriores. Como pode ser observado, os hidrogênios e carbonos que flanqueiam os átomos de enxofre estão desblindados nos compostos **5** e **6** em relação ao composto **7**, corroborando a hipótese de haver um oxigênio nessa região. Como os espectros dos três compostos apresentam o mesmo número de hidrogênios e carbonos, a única posição que este oxigênio pode estar é nos enxofres formando um grupo sulfóxido. A presença de sulfóxido nestes dois compostos justifica o fato destes serem mais polares em relação ao composto **7**. Talvez também justifique o fato

dos compostos **5** e **6** serem menos tóxicos contra *S. aureus*, pois a presença destes grupos facilita sua excreção das células justamente por aumentar a polaridade dos compostos. A menor toxicidade pode também ser devida a mudanças conformacionais que poderiam interferir na intercalação com o DNA, que é o provável mecanismo de ação do composto SW-163D.



Figura 77: Diferença entre os compostos 5-7 nos deslocamentos químicos de 1 H (A) e 13 C (B) na região do grupo tioacetal.

Portanto, sugeriu-se a presença de um grupo sulfóxido nos compostos **5** e **6**, sendo estes apenas isômeros de posição. Buscas no banco de dados SciFinder identificaram o composto RK-1355A, que é justamente a adição de um grupo sulfóxido na região do grupo tioacetal de SW163-D (figura 78).

Análises dos dados obtidos por RMN de ¹H (figura 90 do anexo 1), gHSQC e gHMBC (figura 91 do anexo 1), bem como comparação com dados disponíveis na literatura, confirmaram que o composto 6 é o composto RK-1355A (figura 78) (LIM et al., 2014). A tabela

20 mostra a atribuição dos sinais observados nas análises de RMN. Análise por inserção direta deste composto em HR-ESI-MS detectou os íons: $m/z [M+H]^+$ 1143,3904, $m/z [M+Na]^+$ 1165,3701 Da e $m/z [M+K]^+$ 1181,3430 (figura 99 do anexo 2), confirmando a determinação deste composto (erro de 0,55 ppm para o íon protonado). Foram obtidos 1,5 mg do composto **6**.

O composto RK-1355A foi isolado em 2014 da linhagem *Streptomyces* sp. RK88-1355, e apresentou atividade citotóxica e antimicrobiana (LIM et al., 2014). Com relação a atividade citotóxica, apresentou IC₅₀ de: 0,16 µg/mL contra HeLa; 0,15 µg/mL contra HL-60; 0,56 µg/mL contra tsFT210; e 1,2 µg/mL contra src^{ts}-NRK. Com relação à atividade antimicrobiana, apresentou IC₅₀ de: 0,48 µg/mL contra *S. aureus* 209; 1,4 µg/mL contra *E. coli* HO141 e 3,1 µg/mL contra *M. oryzae* kita-1 (LIM et al., 2014).



Figura 78: Estrutura química do composto 6 (RK-1355A) (LIM et al., 2014).

Posição	$\delta^1 H^*$	$\delta^{13}C$	Posição	$\delta^{1}H^{*}$	δ ¹³ C
3'-ОН, 3"- ОН	11,34 (2H; s)		31	5,10 (1H; d, 10,5)	71,2
5	6,27 (1H; d; 10,5)	54,6	33 a	3,21 (1H; dd; 11,1, 11,3)	50,1
8	4,89 (1H; m)	45,9	33b	4,44 (1H; dd; 11,2, 11,1)	50,1
9-NH	6,43 (1H; d; 8,3)		35	2,49 (3H; s)	18,5
11	4,97 (1H; m)	50,7	37	2,90 (3H; s)	31,4
12a	4,78 (1H; m)	64,1	38	1,38 (3H; m)	16,9
12b	4,71 (1H; m)	64,1	39-NH	8,86 (1H; s)	
18	5,79 (1H; dd; 11,2, 11,3)	50,5	41a	1,88 (1H; m)	26,3
21	4,85 (1H; m)	45,9	41b	1,30 (1H; m)	26,3
22-NH	6,52 (1H; d; 7,2)		42	1,69 (1H)**	24,9
24	4,92 (1H; m)	50,9	43	1,07 (3H; d; 6,1)	11,6
25a	4,83 (1H; m)	64,1	44	3,41 (3H; s)	36,5
25b	4,68 (1H; m)	64,1	45	3,05 (3H; s)	29,8
27a	1,89 (1H)	26,3	46	1,38 (3H; m)	16,9
27b	1,26 (1H; m)	26,3	47-NH	8,88 (1H;s)	
28	1,76 (1H) **	25,0	Harom	7.69-7,81 (6H; m)	121,2; 126,8; 128,3
29	1,15 (3H; d; 5,9)	11,6	Harom	7,47-7,58 (4H; m)	127,5; 129,0
30	3,39 (3H; s)	35,9			

Tabela 20: Dados de RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) do composto 6.

* em parênteses: número de hidrogênios, multiplicidade do sinal, J em Hz.

** sinal encoberto pelo solvente.

Tendo em vista que os compostos **5** e **6** apresentam a mesma massa molecular, sugeriuse que o composto **5** apresentasse o sulfóxido no outro enxofre do grupo tioacetal. Foi realizada busca no SciFinder desta estrutura sugerida, encontrando o composto Retimicina A descrito por Duncan e colaboradores (DUNCAN et al., 2015). Este composto, apesar de apresentar um grupo metila nas posições 25 e 12, apresenta o grupo sulfóxido na posição sugerida para o composto **5**. A comparação dos dados de RMN de ¹H confirmaram que este composto é de fato igual ao composto **6** apenas alterando a posição do sulfóxido (figura 79). O espectro de RMN de ¹H do composto **5** pode ser visto na figura 88 do anexo 1 e os espetros de gHSQC e gHMBC podem ser vistos na figura 89 do anexo 1. A tabela 21 mostra a atribuição dos sinais observados nas análises de RMN.

Escolheu-se o nome Retimicina B para o novo composto identificado devido a similaridade com o composto Retimicina A. Foram obtidos 1,7 mg do composto 5. Análise por inserção direta em HR-ESI-MS detectou os íons: m/z [M+H]⁺ 1143,3924 e m/z [M+Na]⁺

1165,3709 (figura 98 do anexo 2). O erro de massa calculado para o íon protonado foi de 1,2 ppm, corroborando a estrutura proposta.



Figura 79: Estrutura química do composto 5 (Retimicina B).

Posição	$\delta^1 H^*$	$\delta^{13}C$	Posição	Posição δ ¹ H *	
3'-ОН, 3"- ОН	11,34 (2H; s)		31	4,61 (1H; m)	64,5
5	6,59 (1H; d; 5,7)	59,8	33 a	2,54 (1H; dd; 15,1, 6,6)	27,7
8	4,74 (1H, m)	47,6	33b	3,42 (1H; m)	27,7
9-NH	6,43 (1H; d; 6,3)		35	2,94 (3H; s)	33,5
11	4,96 (1H; m)	50,8	37	2,88 (3H; s)	38,9
12a	4,77 (1H; m)	63,9	38	1,42 (3H; d; 6,9)	17,1
12b	4,68 (1H; m)	63,9	39-NH	8,93 (1H; m)	
18	6,85 (1H; t; 6,6)	54,7	41a	1,81 (1H; m)	26,2
21	4,84 (1H, m)	46,9	41b	1,22 (1H; m)	26,2
22-NH	6,72 (1H; d; 7,1)		42	1,67 (1H)**	24,7
24	4,92 (1H; m)	51,8	43	1,03 (3H; d; 6,2)	11,5
25a	4,85 (1H; m)	63,9	44	3,50 (3H; s)	36,2
25b	4,65 (1H; m)	63,9	45	2,83 (3H; s)	29,8
27a	1,87 (1H; m)	26,0	46	1,39 (3H; d; 6,9)	16,2
27b	1,21 (1H; m)	26,0	47-NH	8,91 (1H; m)	
28	1,74 (1H)**	25,0	H _{arom}	7.66-7,81 (6H; m)	121,3; 126,9; 128,5
29	1,15 (1H; d; 6,22)	11,6	Harom	7,47-7,58 (4H; m)	128,5
30	3,39 (3H; s)	35,6			

Tabela 21: Dados de RMN de ¹H e ¹³C (CDCl₃, 500 MHz) do composto **5**.

* em parênteses: número de hidrogênios, multiplicidade do sinal, J em Hz.

** sinal encoberto pelo solvente.

Levando em consideração que o CGB detectado no genoma de *Krasilnokovia* sp. T082 é muito similar a o CGB de SW-163 já descrito na literatura, pode-se sugerir que a configuração absoluta dos compostos aqui isolados seja a mesma que a descrita para o composto SW-163D (NAKAYA et al., 2007). A figura 80 demonstra os três compostos isolados já com a configuração possível configuração absoluta. Esta configuração foi determinada para o composto SW-163D isolado de sp. SNA15896, a mesma linhagem que teve o CGB deste composto sequenciado e anotado (WATANABE et al., 2009).





Figura 80: Compostos **5-7** isolados de *Krasilnokovia* sp. T082 quando cultivada em meio líquido ISP2, já apresentando suas possíveis configurações absolutas.

A determinação estrutural dos três compostos bioativos isolados demonstrou que o *genome mining* realizado no genoma sequenciado de *Krasilnokovia* sp. T082 de fato permite investigar com confiança o metabolismo secundário microbiano. Isso porque foi possível isolar compostos previstos pelo antiSMASH, provando a eficácia deste método em prever o potencial metabólico de uma linhagem microbiana. Provavelmente a alteração de condições de cultivo podem levar ao isolamento de mais compostos previstos no genoma. A união de técnicas de áreas diferentes: genômica, bioinformática e técnicas clássicas de isolamento de produtos naturais se mostrou, portanto, valiosa para acelerar o processo de determinação estrutural.

4.2.2.4. Produção diferencial de compostos bioativos em Krasilnikovia sp. T082

Como descrito no capítulo 2, em cultivo em meio sólido tanto em ISP2 quanto TSA é observada a indução de uma atividade antibiótica quando esta linhagem é co-cultivada com diversas outras actinobactérias. Culturas em meio sólido em ambos meios de cultura, tanto do cultivo puro de *Krasilnikovia* sp. T082 quanto seu co-cultivo com *Streptomyces* sp. SPB78 foram extraídas no sétimo e décimo dia de cultivo com acetato de etila, e o extrato obtido foi fracionado em SPE em cartucho C_{18} para análise em HPLC-DAD-ELSD analítico. Os compostos 5-7 não foram detectados em nenhumas das condições, apesar do claro halo de inibição ter sido observado quando em co-cultura, comprovando que este antibiótico induzido não é nenhum dos compostos isolados e determinados.

Esta bioatividade descrita em cultivo puro não foi detectada quando foi realizado o cultivo em meio de cultura TSB. Análises comparativas em HPLC-DAD-ELSD analítico mostraram que de fato estes compostos não são produzidos em meio de cultura TSB, como pode ser visto nos cromatogramas da figura 70 (comparar o cromatograma "82 ISP2 – bioativo" com o cromatograma "82 - TSB"). Além disso, adição do filtrado da linhagem *Streptomyces* sp. SPB78 ao meio de cultura no quarto dia interferiu na produção destes (inibiu). O mesmo procedimento leva a resultado oposto quando o cultivo desta actinobactéria rara é realizado em TSB: este mesmo filtrado induz a biossíntese de um composto antibiótico, entretanto, se trata de um composto diferente que apresenta caraterísticas polares (indução descrita no capítulo 2 página 66).

Durante o estudo da curva de crescimento em TSB e ISP2 líquido todas as culturas foram extraídas com acetato de etila e fracionadas em SPE em cartucho C₁₈. A análise em HPLC-DAD-ELSD analítico demonstrou que estes compostos não foram produzidos em nenhum dos pontos analisados durante o cultivo em TSB, e que em ISP2 estes compostos começaram a ser detectados no sexto dia, sendo que o máximo de produção foi detectado no décimo dia. Como pode ser visualizado no gráfico da figura 81, esta produção está sendo iniciada durante a segunda fase de crescimento da curva. Talvez estes compostos não sejam produzidos em cultivo em TSB devido ao fato da linhagem nunca alcançar este segundo estágio de crescimento. Em 2008 Manteca e colaboradores demonstraram que durante o cultivo líquido da actinobactéria *Streptomyces coelicolor* também é observada uma segunda fase de crescimento. Foi demonstrado que durante esta fase um outro tipo de micélio é formado, e é nesta fase de crescimento que os antibióticos undecilprodigiosina e actinorhodina são produzidos (MANTECA et al., 2008). Isto pode explicar a diferença observada entre os meios TSB e ISP2 para a produção dos compostos bioativos identificados.



Figura 81: Produção dos compostos 5-7 durante o crescimento de *Krasilnikovia* sp. T082 em ISP2 líquido.

Entretanto, quando a curva de crescimento foi medida novamente em meio ISP2 em um outro experimento para confirmar o resultado, a linhagem não atingiu o segundo estágio de crescimento dentro do tempo observado (figura 82, linha azul). Outro experimento foi realizado, e novamente a linhagem não atingiu o segundo estágio de crescimento (figura 82, linha laranja). Apesar disso não permitir a afirmação de que a linhagem de fato é capaz de entrar em uma segunda etapa de crescimento, foi um resultado importante para corroborar a hipótese que estes compostos bioativos não são produzidos antes de uma segunda fase de crescimento, pois em ambas repetições os compostos não foram detectados.



Figura 82: Repetições da curva de crescimento de *Krasilnikovia* sp. T082 em ISP2 líquido (200 rpm, 30 °C).

Portanto, a produção dos compostos **5-7** apresenta biossíntese específica, não sendo constitutivamente produzidos durante o crescimento de *Krasilnikovia* sp. T082. Isto mostra a importância de variar as metodologias de cultivo utilizadas na busca por produtos naturais bioativos, bem como entender a curva de crescimento da linhagem antes de iniciar um cultivo visando isolamento destes compostos.

5. Conclusões

A análise do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 demonstrou que esta linhagem tem um alto potencial para biossíntese de produtos naturais novos, apresentando pelo menos 21 CGBs detectados pelo antiSMASH. Destes 21 CGBs, apenas quatro apresentaram alta similaridade com algum CGB já depositado nos bancos de dados disponíveis, evidenciando o potencial desta linhagem em biossintetizar compostos novos.

Esta linhagem foi cultivada em dois meios de cultura diferentes, e diferentes metodologias de extração foram empregadas. Foram identificadas algumas dicetopiperazinas, que são conhecidas por seu amplo espectro de atividades biológicas, e três compostos pertencentes a uma classe de peptídeos não-ribossomais que possuem estrutura química complexa e incomum para produtos naturais. Estes últimos apresentaram boa atividade contra bactérias Gram-positivas inclusive contra diferentes linhagens MRSA. Este estudo demonstrou também a relevância em utilizar a estratégia de *genome mining* no estudo de produtos naturais, já que os dados genômicos obtidos e analisados auxiliaram na rápida determinação de três compostos de estrutura química complexa e não-usual em produtos naturais.

Os resultados obtidos mostram que a linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 tem crescimento influenciado e metabolismo secundário expresso de maneira diferente dependendo do meio de cultura utilizado, evidenciando a importância da variação da composição do meio de cultura para o acesso da real capacidade metabólica de micro-organismos.

Considerações Finais

É de amplo conhecimento a necessidade de buscar novos produtos naturais bioativos devido ao alarmante crescimento do número de linhagens microbianas clínicas multirresistentes. Entretanto, para aumentar as chances de encontrar produtos novos, tem-se percebido cada vez mais a importância de compreender mais amplamente o funcionamento do metabolismo secundário microbiano (principal fonte de produtos naturais) para tirar o máximo de proveito deste. Isto exige o uso de técnicas diferenciadas e cada vez mais multidisciplinares.

Informações advindas de sequenciamento do genoma de diversos micro-organismos têm evidenciado o grande potencial que tem sido perdido tanto em biodiversidade quanto em inúmeros CGBs crípticos relacionados ao metabolismo secundário. Esta tese uniu nas abordagens utilizadas e interpretação dos resultados conhecimentos provenientes de várias esferas para a investigação do metabolismo secundário microbiano, com especial enfoque em actinobactérias.

Na abordagem metagenômica tratada no capítulo 1 e *genome mining* tratado no capítulo 3 foram utilizadas ferramentas de bioinformática, conhecimentos sobre expressão gênica, sobre organização e função de genes dentro de CGBs relacionados à produtos naturais, e relação estrutura química-genes. Portanto, foram reunidos conhecimentos advindos de genômica, biologia molecular, bioinformática e química de produtos naturais para explorar o potencial de micro-organismos dificilmente cultiváveis (no caso da metagenômica) e de uma actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo investigado (no caso de *genome mining*).

Aqui neste trabalho o uso de metagenômica descrito no capítulo 1 mostrou-se promissor por ter utilizado um novo ensaio funcional antiparasitário, mas também evidenciou a necessidade de utilizar técnicas mais modernas envolvendo sequenciamento em massa, análises bioinformáticas mais detalhadas e técnicas de biologia molecular mais profundamente visando aumentar a chance de sucesso. Análises prévias de sequenciamento de *e*DNA permitem já prever que tipos de compostos estão codificados e depois deve ser estudada a melhor forma de acessar essa informação, utilizando conhecimentos sobre estrutura de um CGB e o que é necessário para correta expressão dos genes nele contidos. A metagenômica voltada à diversidade taxonômica já está bem estabelecida, mas a metagenômica voltada ao estudo de produtos naturais ainda está sendo aprimorada.

No estudo de interações microbianas (tratado no capítulo 2) exemplificou-se a importância de levar em consideração aspectos ecológicos no momento de decidir os experimentos a serem realizados com as linhagens em estudo. Relações simbióticas são produto de um longo processo evolutivo, sendo que o metabolismo secundário dos indivíduos apresenta

papel importante nessas interações, e isto deve ser explorado ao estudar um micro-organismo. Deve-se aproximar cada vez mais o modo de cultivo às condições naturais das linhagens em estudo, pois estas podem conter os estímulos necessários para expressão de CGBs que permanecem crípticos em condições clássicas laboratoriais. Relações simbióticas são complexas e diversas interações microbianas devem ocorrer em seu meio ambiente natural. Portanto, entender como diferentes linhagens microbianas interagem entre si é fundamental para acessar de forma mais completa o potencial metabólico presente em seus genomas.

Os experimentos aqui realizados (descritos no capítulo 2) permitiram algumas inferências a respeito das relações ecológicas envolvidas na simbiose planta-micro-organismos, principalmente entre actinobactérias isoladas de um mesmo hospedeiro, ao ver como uma linhagem se comporta frente a outra. Muitas alterações fenotípicas foram observadas, o que é um indicativo que esta metodologia influenciou no metabolismo secundário das linhagens em estudo, sendo, portanto, uma ferramenta para expressá-lo de maneira diferenciada. Estas alterações evidenciaram uma possível competição entre as linhagens e seu hospedeiro através de um possível controle populacional. Além disso, os micro-organismos endofíticos aqui estudados mostraram-se promissores pelo fato de muitas linhagens terem apresentado atividade antimicrobiana, sendo, portanto, uma boa fonte de produtos naturais. Esta característica é um indicativo que estas linhagens possam talvez conferir proteção à planta hospedeira contra fitopatógenos.

O genome mining descrito no capítulo 3 permitiu acessar a capacidade metabólica da linhagem de actinobactéria rara em estudo, sendo possível analisá-la sem a necessidade de cultivo. Os cultivos realizados evidenciaram que as condições laboratoriais não permitem acessar facilmente este potencial. Apesar de terem sido encontrados diversos CGBs interessantes, foram isolados apenas compostos simples da classe das dicetopiperazinas e um grupo de NRPs análogos previstos durante o *genome mining*. Os demais CGBs identificados permaneceram ou crípticos, ou foram pouco expressos (produzindo compostos em baixas quantidades).

Os NRPs isolados possuem estrutura química interessante e peculiar para produtos naturais, e a informação gênica obtida permitiu uma determinação estrutural mais focada e rápida, mostrando a importância de combinar diversas metodologias até mesmo na determinação estrutural, algo que classicamente tem sido apenas realizado com conhecimentos da área de química. O estudo biológico da linhagem mostrou que essa produção dos NRPs

isolados está ligado à fase de crescimento da linhagem, demonstrando a importância de investigar a parte biológica e química no estudo de produtos naturais, pois o entendimento do desenvolvimento de uma linhagem e como o metabolismo é alterado ao longo das diferentes fases de crescimento pode aumentar as chances de isolamento de diferentes compostos de uma mesma linhagem.

A ciência não é estática e tem se tornado evidente a importância da multidisciplinaridade para ter um real entendimento e explorar ao máximo o material de estudo. É de grande relevância acadêmica a formação de pesquisadores capazes de entender e transitar entre as diferentes áreas do saber, e o desenvolvimento desta tese permitiu isso de maneira satisfatória.

Referências Bibliográficas

ABED, R. M., et al. Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, v. 40, n. 7, p. 759-772, 2013.

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* cf. *podatypa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.

ALTSCHUL, S. F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVAR, J., et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDRADE-NETO, V. V., et al. Antileishmanial activity of ezetimibe: inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles and efficacious in experimental cutaneous leishmaniasis. Antimicrobial Agents Chemotherapy, *In press*. 2016.

ARA, I.; KUDO, T. *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Krasilnikovia cinnamonea* sp. nov. **Actinomycetologica**, v. 21, n. 1, p. 10, 2007.

ARIYO, B., et al. Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 1, p. 165-170, 1998.

AWAKAWA, T., et al. Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-Odihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. **Chembiochem**, v. 12, n. 3, p. 439-448, 2011.

AZIZ, R. K., et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC** Genomics, v. 9, n. p. 75, 2008.

BALTZ, R. H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion** in **Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 557-563, 2008.

BANIK, J. J. ; BRADY, S. F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 603-609, 2010.

BELIN, P., et al. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 961-979, 2012.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics (Tokyo), v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.

BERENDONK, T. U., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2015.

BERTRAND, S., et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.

BEZERRA, D. P., et al. Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from *Piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 6, 2012.

BIBB, M. J. Understanding and manipulating antibiotic production in actinomycetes. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 6, p. 1355-1364, 2013.

BRADER, G., et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. Current Opinion in Biotechnology, v. 27, n. p. 30-37, 2014.

BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1297-1305, 2007.

BRADY, S. F.; CHAO, C. J. ; CLARDY, J. Long-chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6865-6870, 2004.

BRADY, S. F., et al. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Organic Letters**, v. 3, n. 13, p. 1981-1984, 2001.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental. DNA **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 51, p. 12903-12904, 2000.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 43, p. 7063-7065, 2005.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

CHARLOP-POWERS, Z.; MILSHTEYN, A.; BRADY, S. F. Metagenomic small molecule discovery methods. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, n. p. 70-75, 2014.

CHARLOP-POWERS, Z., et al. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. eLife, v. 4, n. p. e05048, 2015.

CHOI, S.-S., et al. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1184-1193, 2015.

CHUNG, E. J., et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n. 3, p. 723-730, 2008.

CLSI. Twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012, Wayne, PA, EUA.

CLSI. Twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. **Performance** standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013, Wayne, PA, EUA.

CONTI, R., et al. Endophytic actinobacteria from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the biological potential of their secondary metabolites. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 6, p. 727-736, 2016.

COOPER, R., et al. Sch 42137, a novel antifungal antibiotic from an *Actinoplanes* sp. Fermentation, isolation, structure and biological properties. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 45, n. 4, p. 444-453, 1992.

CORONELLI, C., et al. Purpuromycin, a new antibiotic isolated from *Actinoplanes ianthinogenes* N. sp. Journal of Antibiotics (Tokyo), v. 27, n. 3, p. 161-168, 1974.

CRAIG, J. W.; CHANG, F. Y.; BRADY, S. F. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 23-28, 2009.

CRAIG, J. W., et al. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1633-1641, 2010.

D'COSTA, V. M., et al. Sampling the antibiotic resistome. Science, v. 311, n. 5759, p. 374-377, 2006.

DANIEL, R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2004.

DAVIES, J.; RYAN, K. S. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 252-259, 2012.

DELL, A., et al. Structure revision of the antibiotic echinomycin. Journal of American Chemical Society, v. 97, n. 9, p. 2497-2502, 1975.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. Journal of Antibiotics (Tokyo), v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DING, L., et al. Kandenols A-E, eudesmenes from an endophytic *Streptomyces* sp. of the mangrove tree *Kandelia candel*. Journal of Natural Products, v. 75, n. 12, p. 2223-2227, 2012.

DUNCAN, K. R., et al. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. **Chemical Biology**, v. 22, n. 4, p. 460-471, 2015.

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A. ; MURRAY, H. W. Cutaneous leishmaniasis: current treatment practices in the USA for returning travelers. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 2015.

EKKERS, D. M., et al. The great screen anomaly--a new frontier in product discovery through functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1005-1020, 2012.

EL-GENDY BEL, D.; RATEB, M. E. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. **Bioorganic** Medicinal Chemical Letters, v. 25, n. 16, p. 3125-3128, 2015.

EL-GENDY, M. M.; EL-BONDKLY, A. M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 37, n. 8, p. 831-841, 2010.

FEIL, H., et al. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11064-11069, 2005.

FENG, Z.; KALLIFIDAS, D.; BRADY, S. F. Functional analysis of environmental DNAderived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12629-12634, 2011.

FERNÁNDEZ, J., et al. Biosynthetic modularity rules in the bisintercalator family of antitumor compounds. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2668-2699, 2014.

FERREIRA, E. G., et al. Prospecting anticancer compounds in actinomycetes recovered from the sediments of Saint Peter and Saint Paul's archipelago, Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 9, p. 1149-1157, 2016.

FRANCIS, I.; HOLSTERS, M. ; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010.

GAIDA, S. M., et al. Expression of heterologous sigma factors enables functional screening of metagenomic and heterologous genomic libraries. **Nature Communications**, v. 6, n. p. 7045, 2015.

GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. Trends in Microbiology, v. 24, n. 10, p. 833-845, 2016.

GUIMARÃES, D. O., et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11–12, p. 1423-1429, 2010.

GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUO, B., et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 44, n. 2, p. 153-158, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 1999.

HANDELSMAN, J., et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-249, 1998.

HAYAKAWA, M., et al. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 171-185, 2000.

HOPWOOD, D. A. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 937-940, 2007.

IQBAL, H. A., et al. Natural product discovery through improved functional metagenomics in *Streptomyces*. Journal of American Chemical Society, v. 138, n. 30, p. 9341-9344, 2016.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JAYASURIYA, H., et al. Identification of diverse microbial metabolites as potent inhibitors of HIV-1 Tat transactivation. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 112-122, 2005.

JENKE-KODAMA, H.; MÜLLER, R.; DITTMANN, E. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. **Progress in Drug Research**, v. 65, n. p. 119, 121-140, 2008.

JOSE, P. A. ; JEBAKUMAR, S. R. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. p. 240, 2013.

KALLIFIDAS, D. ; BRADY, S. F. Reassembly of functionally intact environmental DNAderived biosynthetic gene clusters. **Methods in Enzymology**, v. 517, n. p. 225-239, 2012.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KATZ, M.; HOVER, B. M.; BRADY, S. F. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 129-141, 2016.

KIM, O. S., et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 3, p. 716-721, 2012.

KODANI, S., et al. Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from *Amycolatopsis alba*. **Biometals**, v. 28, n. 2, p. 381-389, 2015.

KONIG, C. C., et al. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Chembiochem**, v. 14, n. 8, p. 938-942, 2013.

KUROSAWA, K., et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. Journal of American Chemical Society, v. 130, n. 4, p. 1126-1127, 2008.

LAXMINARAYAN, R., et al. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, v. 353, n. 6302, p. 874-875, 2016.

LI, W., et al. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. Journal of Antibiotics (Tokyo), v. 68, n. 3, p. 216-219, 2015.

LIM, C. L., et al. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 67, n. 4, p. 323-329, 2014.

LIM, H. K., et al. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7768-7777, 2005.

LIN, Y. B., et al. *Streptomyces shaanxiensis* sp. nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 8, p. 1725-1730, 2012.

LIU, M., et al. Endophytic *Streptomyces* sp. Y3111 from traditional Chinese medicine produced antitubercular pluramycins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1077-1085, 2014.

LONG, P. F., et al. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. **Chembiochem**, v. 6, n. 10, p. 1760-1765, 2005.

LOPES, A. R., et al. Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2691-2700, 2013.

MANTECA, A., et al. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3877-3886, 2008.

MARMANN, A., et al. Co-cultivation: a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

MEARS, E. R., et al. A Review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Ttropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003889, 2015.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P. Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 337-347, 2014.

MEYER, F., et al. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. p. 386, 2008.

MICHEL, K. H., et al. The discovery, fermentation, isolation, and structure of antibiotic A33853 and its tetraacetyl derivative. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 37, n. 5, p. 441-445, 1984.

MURPHY, T., et al. Effect of oligosaccharide elicitors on bacitracin A production and evidence of transcriptional level control. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 4, p. 397-403, 2007.

NAKAYA, M., et al. Relative and absolute configuration of antitumor agent SW-163D. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 12, p. 2969-2976, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as "sources" of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. p. 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

ONAKA, H., et al. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. **Applied Environmetal Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 400-406, 2011.

ONAKA, H., et al. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. Journal of Antibiotics (Tokyo), v. 54, n. 12, p. 1036-1044, 2001.

OTSUKA, H., et al. Structure confirmation of triostin a by ¹H and ¹³C magnetic resonance. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 29, n. 1, p. 107-110, 1976.

PEREZ BAZ, J., et al. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 50, n. 9, p. 738-741, 1997.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology** and **Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 19-25, 2009.

QIN, S., et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plantassociated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RANCE, M. J., et al. UK-63,052 complex, new quinomycin antibiotics from *Streptomyces braegensis* subsp. *japonicus*; taxonomy, fermentation, isolation, characterisation and antimicrobial activity. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 42, n. 2, p. 206-217, 1989.

RATH, S., et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. p. 550-555, 2003.

RECIO, E., et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 40, p. 41586-41593, 2004.

RICHTER, T. K.; HUGHES, C. C. ; MOORE, B. S. Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 2158-2171, 2015.

ROBBEL, L., et al. Erythrochelin, a hydroxamate-type siderophore predicted from the genome of *Saccharopolyspora erythraea*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 3, p. 663-676, 2010.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753-1760, 2009.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. *In vivo* and *in vitro* production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234-242, 2008.

SHARMA, R. C. ; SCHIMKE, R. T. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. **Biotechniques**, v. 20, n. 1, p. 42-44, 1996.

SINGH, B. K. ; MACDONALD, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p. 792-799, 2010.

SMANSKI, M. J.; SCHLATTER, D. C.; KINKEL, L. L. Leveraging ecological theory to guide natural product discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 115-128, 2016.

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

STRÖM, K., et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, 2002.

TAMURA, K., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TAUBES, G. The bacteria fight back. Science. v. 321, n. 5887, p. 356-361, 2008.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 108-132, 2012.

TIWARI, K. ; GUPTA, R. K. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 256-294, 2013.

TRAXLER, M. F., et al. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e000459-13, 2013.

TRINDADE, M., et al. Targeted metagenomics as a tool to tap into marine natural product diversity for the discovery and production of drug candidates. **Frontiers in Microbiology**. **6**: 890, 2015.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009.

VANHULLE, S., et al. Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1712-1718, 2007.

WALSH, C. T. ; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2469-2493, 2010.

WANG, G., et al. Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. Chemistry of Natural Compounds, v. 46, n. 4, p. 583-585, 2010.

WANG, G. Y., et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. **Organic Letters**, v. 2, n. 16, p. 2401-2404, 2000.

WANG, J. H., et al. Inhibition of biofilm in *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 by diketopiperazines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 143, 2016.

WANG, M., et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WATANABE, K., et al. *Escherichia coli* allows efficient modular incorporation of newly isolated quinomycin biosynthetic enzyme into echinomycin biosynthetic pathway for rational design and synthesis of potent antibiotic unnatural natural product. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9347-9353, 2009.

WATROUS, J., et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743-1752, 2012.

WEBER, T., et al. antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W237-243, 2015.

WHITT, J., et al. Tetramic acid analogues produced by coculture of *Saccharopolyspora erythraea* with *Fusarium pallidoroseum*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 173-177, 2014.

XU, M., et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, n. 19, p. 5795-5805, 2016.
YANG, J. Y., et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6023-6028, 2012.

YANG, Y. L., et al. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 885-887, 2009.

YUFENG, C., et al. Screening, identification and potassium-dissolving characteristics of potassium-dissolving actinomycete in banana rhizosphere soil. **Biotechnology Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 129, 2015.

ZERIKLY, M. ; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **Chembiochem**, v. 10, n. 4, p. 625-633, 2009.

ZHANG, X.; WEI, W.; TAN, R. Symbionts, a promising source of bioactive natural products. **Reviews Science China Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 1097-1109, 2015.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K.; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 2, p. 371-386, 2014.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K.; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 371-386, 2014.

ZOLOVA, O. E.; MADY, A. S. ; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Recent developments in bisintercalator natural products. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 777-790, 2010.

ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced production of N-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. Journal of Natural **Products**, v. 74, n. 7, p. 1653-1657, 2011.

Anexo 1

Espectros de RMN



Figura 83: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, D_2O) da dicetopiperazina ciclo-isoleucina-prolina (amostra 30_3_4, composto 1).



Figura 84: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) da dicetopiperazina ciclo-leucina-prolina (amostra 30_4_1, composto **2**).



Figura 85: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD_3OD) da dicetopiperazina ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (amostra 30_4_2, composto 3).



Figura 86: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl₃) da dicetopiperazina ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (amostra 30_4_2, composto **3**). A: *g*HSQC. B: *g*HMQC.



Figura 87: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) da dicetopiperazina *rel*-(R,R)-ciclo-fenilalanina-prolina (amostra 40_{5_2} , composto 4).



Figura 88: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Retimicina B (composto **5**).



B



Figura 89: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl₃) de Retimicina B (composto 5). A: *g*HSQC. **B**: *g*HMQC.



Figura 90: Espectro de RMN de 1 H (500 MHz, CDCl₃) de RK-1355A (composto 6).

А



Figura 91: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl₃) de RK-1355A (composto 6). A: gHSQC. B: gHMQC.



Figura 92: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de SW-163D (composto 7).



Figure 03: Espectros de PMN, bidimonsionais (500 MHz, CDCl) de SW 162D (correcte 7)

÷

Figura 93: Espectros de RMN bidimensionais (500 MHz, CDCl₃) de SW-163D (composto 7). A: *g*HSQC. **B**: *g*HMQC.

120

Anexo 2

Espectros de HR-ESI-MS



Figura 94: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_3_4, determinada como ciclo-ileucina-prolina (composto 1).



Figura 95: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_4_1, determinada como ciclo-leucina-prolina (composto 2).



Figura 96: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 30_4_2, determinada como ciclo-S-fenilalanina-R-prolina (composto **3**).



Figura 97: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta da amostra 40_5_2, determinada como *rel*-(R,R)-ciclo-fenilalanina-prolina (composto 4).



Figura 98: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de Retimicina B (composto 5).



Figura 99: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de RK-1355A (composto 6).



Figura 100: Espectro de massas (HR-ESI-MS) em modo positivo obtido por inserção direta de SW-163D (composto 7).