UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo
secundário de actinobactérias endofíticas**

Larissa Varella

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo
secundário de actinobactérias endofíticas**

Tese 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: Larissa Varella

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 04/03/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Ribeirão Preto
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Varella, Larissa

Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas. Ribeirão Preto, 2015.

179 p.: il. ; 30 cm

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. Actinobactérias endofíticas. 2. *Streptomyces*. 3. Policetídeos. 4. Desreplicação 5. Co-cultura. 6. Recombinação homóloga

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Larissa Varella

Título do trabalho: Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas.

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

Orientadora: 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 esse trabalho:

Aos meus pais Justiniano e Marilza, que eu amo muito e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e que sempre estão comigo nos momentos mais difíceis me dando conselhos, amparo, ajuda e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo pela amizade, oportunidade de trabalhar ao seu lado e aos valiosos ensinamentos que foram de extrema importância para a minha formação e que levarei como exemplo em minha vida acadêmica. Agradeço também pela oportunidade de conhecer sua mãe Deise e seu irmão Fábio, que me acolheram como uma filha durante o período em que fiquei em Campinas e que são para mim um exemplo de fé, coragem e determinação;

Ao meu futuro marido Marcelo pelo amor, carinho, por sempre estar ao meu lado me incentivando, ensinando a ter estrutura, disciplina e planejamento e me ajudando a realizar mais este sonho da minha vida;

À técnica Cláudia Castania de Macedo pela amizade, favores e companhia durante esses anos de pesquisa;

Aos colegas de trabalho do LQMo (Laboratório de Química de Micro-organismos) pela amizade, discussões e trocas de experiências;

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e ao técnico Eduardo José Crevelin pela amizade, ensinamentos colaboração nas análises de massas que foram de extrema importância para a realização desse projeto;

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes e ao técnico José Carlos Tomaz pela amizade e colaboração na obtenção dos espectros de massas;

À Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo pela oportunidade da realização dos ensaios antibacterianos em bactérias resistentes em seu laboratório no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP);

À Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira pela amizade, ensinamentos e oportunidade para a realização de experimentos de biologia molecular em seu laboratório na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP);

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e a Universidade de São Paulo (USP);

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida.

À FAPESP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dos projetos de pesquisa do laboratório.

Esta tese de Doutorado fez parte das pesquisas realizadas no INCT-INBEQMeDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas) e no CEPID-CIBFar (Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos).

RESUMO

VARELLA, L. **Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas**. 2015. 179p. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os micro-organismos são profícuas fontes de produtos naturais bioativos. Diversos fármacos de importância clínica são de origem microbiana, sendo que a maioria dos antibióticos usados clinicamente é produzida por actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*. A resistência a múltiplas drogas por micro-organismos patogênicos e também pelas células tumorais leva à necessidade por novos fármacos antibacterianos e antitumorais. Actinobactérias endofíticas têm demonstrado grande potencial para a busca de produtos naturais bioativos. O presente trabalho relata o estudo químico de duas linhagens de actinobactérias endofíticas, *Streptomyces* sp. RTd 22 e *Streptomyces* sp RTd 31, isoladas das raízes de *Tithonia diversifolia*. As frações ativas nos ensaios biológicos foram fracionadas para a identificação dos compostos bioativos, sendo eles os antibióticos macrolídeos concanamycinas A (**S31-1**) e B (**S31-2**), anidro-agliconas das concanamycinas A (**S31-3**) e B (**S31-4**), todos produzidos por *Streptomyces* sp RTd31, e o ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**), produzido por *Streptomyces* sp. RTd22. Foi realizado o monitoramento da produção desses compostos bioativos por UPLC-MS através do modo SIM. As concanamycinas A e B tiveram um máximo de produção com 96h, já a grisorixina obteve um máximo com 192h. Outros compostos identificados por desreplicação dos extratos butanólicos de ambas as actinobactérias foram os sideróforos norcardamina (**S31-7**) e desoxi-nocardamina (**S31-8**), já o sideróforo desferrioxamina B (**S31-9**) foi identificado apenas nos extratos butanólicos de *Streptomyces* sp RTd31. Experimentos de variação do meio de cultivo e co-cultura com bactérias patogênicas foram empregados a fim de estimular a biossíntese de novos compostos, porém nenhum novo metabólito foi identificado. O sequenciamento genético da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 permitiu verificar a presença de vários *clusters* biossintéticos nesse micro-organismo através da análise feita pelo antiSMASH. Foi possível identificar o *cluster* da himastatina (**S22-4**) e da coeliquelina (**S22-5**), sendo que ambos os compostos não foram biossintetizados nas condições de cultivo utilizadas. O *cluster* biossintético da grisorixina foi determinado e o experimento de recombinação homóloga para a deleção do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina *nigC* foi realizado. Dois mutantes foram obtidos e um deles foi cultivado para a análise do perfil metabólico por espectrometria de massas. Não houve a produção da grisorixina nem do seu possível precursor pelo mutante, mas outros metabólitos foram produzidos.

Palavras-chaves: actinobactérias endofíticas, *Streptomyces*, policetídeos, desreplicação, co-cultura, recombinação homóloga

ABSTRACT

VARELLA, L. **Chemical study and strategies for modifying the secondary metabolism of endophytic actinobacteria**. 2015. 179p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Microorganisms are prolific sources of bioactive natural products. Several clinically important drugs have microbial origin, and most of the therapeutically used antibiotics are produced by actinobacteria, mainly from the genus *Streptomyces*. The multidrug resistance observed in pathogenic microorganisms and tumor cells lead to the need for new antibacterial and antitumor drugs. Endophytic actinobacteria have shown great potential in the search for bioactive natural products. This work describes the chemical study of two endophytic actinobacteria strains: *Streptomyces* sp. RTd 22 and *Streptomyces* sp RTD 31, isolated from *Tithonia diversifolia* roots. Active fractions in biological assays were further fractionated for identifying the bioactive compounds, which are: the macrolide antibiotics concanamycins (**S31-1**) and B (**S31-2**), anhydrous aglycones of concanamycins A (**S31-3**) and B (**S31-4**), all four produced by *Streptomyces* sp. RTd31, and the ionophore polyether grisorixin (**S22-2**), produced by *Streptomyces* sp. RTd22. The production of these bioactive compounds was monitored by UPLC-MS via the SIM mode. Concanamycins A and B had maximum production at 96 h, and grisorixin at 192 h. Other compounds identified by the dereplication of buthanolic extracts of both actinobacteria were the siderophore norcardamine (**S31-7**) and deoxy-nocardamine (**S31-8**), the siderophores desferrioxamine B (**S31-9**) was identified only in buthanolic extracts of *Streptomyces* sp RTd31. Experiments varying media and co-culture were tested to stimulate the biosynthesis of novel compounds, but nothing new was identified. By genome sequencing of *Streptomyces* sp RTd22 and antiSMASH analysis it was possible to verify the presence of several biosynthetic clusters in the genome of this strain. It was possible to identify the biosynthetic clusters of himastatin (**S22-4**) and its analogous compound coelichelin (**S22-5**); however, these compounds were not biosynthesized in the culture conditions used. The grisorixin biosynthetic cluster was determined, and homologous recombination was performed for deleting the analogue gene of nigericin flavin monooxygenase *nigC1*. Two mutants were obtained, and one of them was cultured for analyzing its metabolic profile by mass spectrometry. There was no production of grisorixin or its possible precursor by the mutant, but others compounds were produced.

Keywords: endophytic actinobacteria, *Streptomyces*, polyketides, dereplication, co-culture, homologous recombination

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes de pequenas moléculas aprovadas pela FDA como fármacos.....	1
Figura 2 - Fármacos produzidos por micro-organismos	2
Figura 3 - Anticancerígenos produzidos por micro-organismos do gênero <i>Streptomyces</i>	3
Figura 4 - Estruturas químicas de compostos produzidos por micro-organismos endofíticos e também produzidos pelas plantas hospedeiras	7
Figura 5 - Estruturas químicas de novos metabólitos produzidos por actinobactérias endofíticas.....	9
Figura 6 - Métodos que influenciam a biossíntese de metabólitos secundários nos micro-organismos.....	11
Figura 7 - Libertelenonas A-D produzidas em co-cultura.....	12
Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos identificados por <i>genome mining</i>	15
Figura 9 - <i>Streptomyces</i> sp RTd22 (A) e <i>Streptomyces</i> sp RTd31 (B); 21 dias em meio sólido ISP-2	16
Figura 10 - Protocolo utilizado para o ensaio de microdiluição seriada para o ensaio antibacteriano e para a microdiluição do antibiótico penicilina para o ensaio com <i>S.aureus</i>	26
Figura 11 - Esquema do cultivo das actinobactérias <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e <i>Streptomyces</i> sp RTd 31 para a determinação do tempo ideal de cultivo para a produção de compostos bioativos.....	38
Figura 12 - Esquema do preparo do inóculo bacteriano para o experimento de eliciação.	41
Figura 13 - Purificação da fração 31-FAS-2.4 por HPLC.....	55
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H do composto S31-1 (CDCl_3 , 500 MHz).....	55
Figura 15 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto S31-1 (CDCl_3 , 500 MHz).....	56
Figura 16 - Espectro de COSY do composto S31-1 (CDCl_3 , 11,7 T).....	57
Figura 17 - Espectro de HMQC do composto S31-1 (CDCl_3 , 11,7 T).....	60
Figura 18 - Espectro de HMBC do composto S31-1 (CDCl_3 , 11,7 T)	62
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do composto S31-2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	64

Figura 20 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto S31-2 (CDCl_3 , 500 MHz).....	65
Figura 21 - Espectro de COSY do composto S31-2 (CDCl_3 , 11,7 T).....	67
Figura 22 - Espectro de HMQC do composto S31-2 (CDCl_3 , 11,7 T).....	67
Figura 23 - Espectro de HMBC do composto S31-2 (CDCl_3 , 11,7 T)	69
Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto S31-1	70
Figura 25 - Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto S31-2	71
Figura 26 - Estrutura do composto S31-1 (concanamicina B) e do composto S31-2 (concanamicina A) com dados de RMN obtidos.....	73
Figura 27 - Espectro de íons produtos da concanamicina A por CID m/z 888 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (energia de colisão 60 eV).....	75
Figura 28 - Espectro de íons produtos da concanamicina B por CID m/z 874 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (energia de colisão 60 eV).....	76
Figura 29 - Proposta de fragmentação da concanamicina A e B.....	76
Figura 30 - Perfil da fração 31-FAL-3.3.3 por HPLC.....	78
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da amostra 31-FAL-3.3.3 em $\text{DMSO}-d_6$, 500MHz.....	79
Figura 32 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra 31-FAL-3.3.3 em $\text{DMSO}-d_6$, 500MHz.....	80
Figura 33 - Espectro de COSY da amostra 31-FAL-3.3.3, $\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T.....	81
Figura 34 - Espectro de HMQC da amostra 31-FAL-3.3.3, $\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T.....	83
Figura 35 - Espectro de HMBC da amostra 31-FAL-3.3.3, $\text{DMSO}-d_6$, 11,7 T.	85
Figura 36 - Espectro de massas (IDMS) da amostra RTd31-FAL 3.3.3, em modo positivo.	86
Figura 37 - Estruturas químicas das anidro-agliconas das concanamicinas A e B...87	
Figure 38 - Estrutura da anidro-aglicona da concanamicina A, com os dados obtidos de RMN.	89
Figura 39 - Espectro de íons produtos da anidro-aglicona da concanamicina A por CID m/z 697 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (energia de colisão 45 eV).....	90
Figura 40 - Espectro de íons produtos da anidro-aglicona da concanamicina B por CID m/z 683 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (energia de colisão 45 eV).....	90

Figura 41 - Cromatograma de íons total obtido por UPLC-MS para o extrato 31-FAL na identificação das concanamicinas que apresentam íons produtos m/z 515 (A) e m/z 501 (B).....	91
Figura 42 - Espectros dos íons precursores do íon produto m/z 501 (a,c,e) e m/z 515 (b,d,f):	92
Figura 43 - Estrutura química dos artefatos O-metil concanamicinas A e B.....	93
Figura 44 - Cromatograma de purificação das concanamicinas por HPLC, presentes nas fração obtidas com H ₂ O:MeOH (2:8).	94
Figura 45 - Análise por espectrometria de massas (ID-MS) das concanamicinas isoladas por HPLC-UV.	95
Figura 46 - Estruturas das concanamicinas.....	97
Figura 47 - Estrutura química da concanamicina evidenciando as ligação de hidrogênio entre o anel lactônio e o anel hemiacetal.	98
Figura 48 - Espectros de massas do extrato hexânico do meio sólido de arroz (31-FHS) (G), extrato butanólico do meio sólido de arroz (31-FBS) (H) e extrato butanólico do meio líquido ISP-2 (31-FBL) (I)	102
Figura 49 - Ampliação dos espectros de massas das frações butanólicos do meio sólido de arroz (31-FBS) e do meio líquido ISP-2 (31-FBL)	103
Figura 50 - Espectros de fragmentação por CID dos íons m/z 601 (D), 585 (E), 569 (F), 553 (G) e 561 (H) todos com energia de fragmentação de 30 eV e obtidos no equipamento de UPLC-MS.....	104
Figura 51 - Estruturas químicas da nocardamina (S31-7), desoxi-nocardamina (S31-8) e desferrioxamina B (S31-9).	106
Figura 52 - Fragmentação da desferrioxamina B	106
Figura 53 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.....	111
Figura 54 - Estrutura química da pseudofactina I, composto Pa-1	112
Figura 55 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas	112
Figura 56 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato	

em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas..... 114

Figura 57 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas..... 115

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H da amostra 22-FAL-5 em CDCl_3 e 500MHz .. 118

Figura 59 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra 22-FAL-5 em CDCl_3 e 500MHz..... 119

Figura 60 - Análise por inserção direta da sub-fração 22-FAL-5 em modo positivo (I) e em modo negativo (J)..... 120

Figure 61 - Estrutura química da grisorixina, um análogo da nigericina. 121

Figura 62 - Espectros de CID:22-FAL-5 m/z 731 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (K), nigericina padrão m/z 747 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (L), ambas com energia de 55 eV..... 121

Figura 63 - Espectro de fragmentação por CID do íon m/z 745 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (energia de colisão 65eV)..... 122

Figura 64 - Estrutura do artefato proposto da grisorixina, composto **S22-3**..... 123

Figura 65 - Espectros de massas dos compostos presentes nas bandas cromatográficas observadas na análise por UPLC-MS..... 124

Figura 66 - Espectros de massas da fração hexânica do meio sólido de arroz (22-FHS) (M), fração acetato de etila do meio sólido de arroz (22-FAS) (N), fração butanólica do meio sólido de arroz (22-FBS) (O) e fração butanólica do meio líquido ISP-2 (22-FBL) (P) 128

Figura 67 - Espectro de íons produtos da grisorixina complexada com Na^+ (Q) e com Cu^{2+} (R)..... 129

Figura 68 - Proposta de fragmentação da grisorixina complexada com Na^+ 130

Figura 69 - Proposta de fragmentação da grisorixina complexada com Cu^{2+} 131

Figura 70 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas..... 137

Figura 71 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato

butanólico da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas	138
Figura 72 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.	139
Figura 73 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.....	140
Figura 74 - Distribuição das categorias dos subsistemas presentes no genoma de <i>Streptomyces</i> sp. RTd22, obtido pelo servidor RAST.	143
Figura 75 - Organização do <i>cluster</i> biossintético da grisorixina (R) e sua homologia com <i>cluster</i> biossintético da nigericina (S), obtido através da plataforma do antiSMASH.....	144
Figura 76 - Estrutura química da nigericina evidenciado a oxidação pela citocromo P450 mono-oxigenase.....	145
Figura 77 - Estrutura química da himastatina (S22-4)	146
Figura 78 - Organização do <i>cluster</i> biossintético de NRPS obtido através da plataforma do antiSMASH (T) e sua homologia com o <i>cluster</i> biossintético da himastatina (U).	146
Figura 79 - Estrutura química da coeliquelina (S22-5)	148
Figura 80 - Organização do <i>cluster</i> biossintético de NRPS obtido através da plataforma antiSMASH (V) e sua homologia com o <i>cluster</i> biossintético da coeliquelina (W).....	148
Figura 81 - Proposta para a biossíntese da monensina A e B por <i>Streptomyces cinnamomensis</i>	150
Figura 82 - Precursores <i>E,E,E</i> -trienos da monensina A e B quando o gene <i>monCI</i> é deletado.....	151
Figura 83 - Representação da estratégia adotada para promover a deleção do gene alvo.....	152
Figura 84 - Eletroforese da amplificação da região com 1908 pb (1) e da região com 1956 pb (2).	152
Figura 85 - Plasmídeo pYH7 e as etapas da reação pelo de montagem isotérmica.	153

Figura 86 - Gel de agarose da análise da reação de restrição feita com <i>NdeI</i>	154
Figura 87 - Alinhamento do gene análogo ao gene <i>nigCl</i> (deleção dos 1034 pb), com o sequenciamento do plasmídeo pLV Δ <i>griCl</i>	155
Figura 88 - Conjugação e triagem para obtenção de possíveis mutantes de <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	156
Figura 89 - Esquema da triagem por PCR dos potenciais mutantes	157
Figura 90 - Confirmação por PCR para possíveis mutantes de <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	157
Figura 91 - Confirmação por PCR dos novos possíveis mutantes de <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	158
Figura 92 - Espectros de massas do metanol utilizado para dissolver as amostras, do extrato acetato de etila do meio líquido ISP-2 e do extrato acetato de etila do cultivo do mutante 17-5.....	159
Figura 93 - Ampliação do espectro acetato de etila do cultivo do mutante 17-5, na região de <i>m/z</i> 740- 840.....	160
Figura 94 - Estruturas químicas da nonactina, monactina, dinactina, trinactina e tetranactina.....	160
Figura 95 - Estrutura química do possível precursor da biossíntese da grisorixina	161
Figura 96 - Genes encontrados pelo alinhamento do genoma de <i>Streptomyces</i> sp RTd22 com o <i>cluster</i> da nonactina (vermelho). Busca isolada pelos demais genes (azul).	162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos etanólicos das actinobactérias endofíticas em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL	16
Tabela 2 - Solução estoque de antibióticos	22
Tabela 3 - Frações e suas respectivas massas obtidas das partições com solventes orgânicos da porção aquosa do cultivo em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2 das actinobactérias <i>Streptomyces</i> sp. RTd 22 e <i>Streptomyces</i> sp. RTd 31....	29
Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> sp. RTd22	36
Tabela 5 - Solução estoque de antibióticos	43
Tabela 6 - Vetor utilizado no trabalho	44
Tabela 7 - Plasmídeo criado no trabalho	45
Tabela 8 - Oligonucleotídeos sintéticos utilizados no trabalho.....	45
Tabela 9 - Reação de PCR.....	48
Tabela 10 - Percentual de inibição da proliferação de células tumorais das frações frente a quatro linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.	52
Tabela 11 - Atividade antibacteriana das frações oriundas dos cultivos em meio sólido de arroz e do e meio líquido ISP-2 das actinobactérias <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e <i>Streptomyces</i> sp. RTd 31.	53
Tabela 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL) das frações da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e dos antibióticos comerciais	54
Tabela 13 - Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) e ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) do composto S31-2 em comparação com dados da literatura da concanamicina A	72
Tabela 14 - Percentual de inibição do crescimento celular das subfrações em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.	78
Tabela 15 - RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e HMQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T) da fração 31-FAL-3.3.3 em comparação com dados da literatura.....	88
Tabela 16 - Resultados dos ensaios de inibição da proliferação de células tumorais para as concanamicinas isoladas. CI ₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%)	95
Tabela 17 - Intensidade da área versus tempo (h) obtido através do monitoramento pelo modo SIM das concanamicinas A, B e G.	100

Tabela 18 - Peso seco da massa micelial da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd31 e pH do meio de cultura durante as 168h.....	108
Tabela 19 - Percentual de inibição do crescimento celular da subfração 22-FAL-5 em quatro linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.	126
Tabela 20 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (µg/mL) da subfração 22-FAL-5 e dos antibióticos comerciais	126
Tabela 21 - Intensidade da área versus tempo (h) obtido através do monitoramento pelo modo SIM da grisorixina.....	133
Tabela 22 - Peso seco da massa micelial da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e pH do meio de cultura durante as 168h.....	135
Tabela 23 - Funções das ORFs da grisorixina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura.	145
Tabela 24 - Funções das ORFs da himastatina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura	146
Tabela 25 - Funções das ORFs da coeliquelina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura	148

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Produção das concanamicinas em função do tempo, calculado pelas médias das intensidades das áreas versus o tempo obtido pelo SIM de cada concanamicina.	100
Gráfico 2 - Curva de crescimento da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31 obtida pela média dos pesos secos	109
Gráfico 3 - Curva de calibração da glicose [10-100 µg/mL].....	109
Gráfico 4 - Consumo de açúcares totais pela actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31 durante as 240 h de cultivo em meio líquido ISP-2	110
Gráfico 5 - Produção das concanamicinas em função do tempo, calculado pelas médias das intensidades das áreas versus o tempo obtido pelo SIM da grisorixina	133
Gráfico 6 - Curva de crescimento da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 obtida pela média dos pesos secos	135
Gráfico 7 - Consumo de açúcares totais pela actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 durante as 168h de cultivo em meio líquido ISP-2.....	136

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio sólido de arroz da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd31.....	31
Fluxograma 2 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31.....	33
Fluxograma 3 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	35

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Espectro de massas de alta resolução da subfração 31-FAL 3.3.3.....	172
Anexo 2 - Espectros de massas do MeOH utilizado para a solubilização das amostras, branco da fração hexânica do meio sólido de arroz (BHS), branco da fração butanólica do meio sólido de arroz (BBS) e branco da fração butanólica do meio líquido ISP-2 (BBL).....	173
Anexo 3 - Espectro de massas de alta resolução da fração 31-FBS.....	174
Anexo 4 - Espectros de massas de alta resolução da grisorixina presente na subfração 22-FAL-5.....	174
Anexo 5 - Espectro de fragmentação por CID do íon m/z 726, referente a grisorixina cationizada com amônio.....	175
Anexo 6 - Espectros de massas (IDMS) dos extratos dos controles do meio de cultura extraídos com acetato de etila.....	176
Anexo 7 - Espectros de massas dos extratos acetato de etila obtidos do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 nos meios ISP-1 ao ISP-7.....	177
Anexo 8 - Espectros de massas dos extratos dos controles do meio de cultura extraídos com acetonitrila:água.....	178
Anexo 9 - Espectros de massas dos extratos acetonitrila: água obtidos do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp.RTd22 nos meios ISP-1 ao ISP-7.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American type culture collection</i> - coleção de micro-organismos Norte Americana
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> - demanda bioquímica de oxigênio
bp	<i>Base pairs</i> - pares de base
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CID	<i>Collision induced dissociation</i> - dissociação induzida por colisão
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> - instituto de padronização clínica e laboratorial
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> - correlação espectroscópica
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>ddq</i>	Duplo duplo quadrupeto
<i>dl</i>	Dupleto largo
DMSO	Dimetilsufóxido
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
DNP	<i>Dictionary of natural products</i> - dicionário de produtos naturais

<i>dq</i>	Duplo quadrupeto
ESI	<i>Electrospray ionization</i> - ionização por eletrospray
ESI-MS	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i> - espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EtOH	Etanol
FAD	<i>Flavin-adenine dinucleotide</i> - flavina-adenina dinucleótido
FDA	<i>Food and drug administration</i> - administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy</i> - correlação heteronuclear com acoplamento a longa distância
HMQC	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence spectroscopy</i> - coerência quântica heteronuclear múltipla
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	<i>High performance liquid chromatography - diode array detector</i> - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e ultravioleta
HR-ESI-MS	<i>High resolution electrospray ionization mass spectrometry</i> - espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray
IARC/WHO	<i>International agency for research on cancer / World Health Organization</i> - agência internacional para pesquisa de câncer pertencente a Organização Mundial da Saúde
ID-MS	Espectrometria de massas por inserção direta
ISP	<i>International <u>Streptomyces</u> project</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipeto
<i>m/z</i>	Razão entre a massa atômica de um íon pelo seu número de cargas
Mb	<i>mega base pairs</i> - mega pares de bases

MeOH	Metanol
MRSA	<i>Methicillin resistant <u>Staphylococcus aureus</u></i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> - espectrometria de massas
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> - espectrometria de massas sequencial
MSSA	<i>Methicillin sensitive <u>Staphylococcus aureus</u></i>
Na-TFA	Trifluororacetato de sódio
<i>n</i> -BuOH	Butanol
NRSP	<i>Nonribosomal peptide synthetase</i> - peptídeo sintetase não ribossomal
OD600	Densidade óptica de uma amostra medida no comprimento de onda de 600 nm
ORF	<i>Open reading frame</i> - fase de leitura aberta
OSMAC	<i>One strain many compounds</i> - uma linhagem, muitos compostos
P450	Citocromo P450
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - cadeia de reação da polimerase
PKS	<i>Polyketide synthase</i>
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico
s	Simpleto
SAM	<i>S-adenosyl methionine</i> - S-adenosilmetionina
SIM	<i>Selected ion monitoring</i> - monitoramento seletivo de íons
SPE	<i>Solid phase extration</i> - extração em fase sólida
<i>t</i>	Tripleto
TIC	<i>Total ion chromatogram</i> - cromatograma de íon totais
u	Unidade de massa

UFC	Unidade formadora de colônia
UPLC-MS	<i>Ultra performance chromatography - mass spectrometry</i> - cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a espectrometria de massas
UV	Ultravioleta
VISA	<i>Vancomycin intermediate</i> <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>
VRE	<i>Vancomycin resistant</i> <u><i>Enterococcus</i></u>
WT	<i>Wild type</i> - linhagem selvagem

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Gráficos	xi
Lista de Fluxogramas	xii
Lista de Anexos	xiii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O papel dos micro-organismos na descoberta de fármacos	1
1.2 O problema da resistência	4
1.3 A busca por novos antibióticos	5
1.3.1 Micro-organismos endofíticos como fontes de produtos naturais	5
1.3.2 Produtos naturais bioativos de actinobactérias endofíticas	7
1.4 Estratégias para acessar produtos naturais de micro-organismos	9
1.4.1 Cultura mista	11
1.4.2 Variações nas condições de cultivo	12
1.4.3 <i>Genome mining</i> visando novos produtos naturais	14
2.OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Principais etapas experimentais para atingir os objetivos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Equipamentos utilizados	18
3.2 Condições das análises cromatográficas e espectrométricas	20
3.3 Solventes	21
3.4 Meios de cultura para cultivo das actinobactérias	21
3.5 Métodos Microbiológicos	21
3.5.1 Ensaio antibacterianos	21
3.5.1.1 Linhagens bacterianas	22
3.5.1.2 Preparo das amostras	23
3.5.1.3 Preparo dos antibióticos	23
3.5.1.4 E-test	24

3.5.1.5 Preparo do inóculo bacteriano para o ensaio de microdiluição.	24
3.5.1.6 Protocolo utilizado no ensaio antibacteriano	25
3.5.2 Ensaio citotóxico em células tumorais.....	26
3.6 Cultivo e obtenção dos extratos e frações das actinobactérias endofíticas.....	27
3.7 Fracionamento e isolamento de compostos produzidos pelas linhagens <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e <i>Streptomyces</i> sp. RTd31	30
3.7.1 Fracionamento da fração 31-FAS.....	30
3.7.2 Fracionamento da fração 31-FAL.....	31
3.7.3 Fracionamento da fração 22-FAL.....	33
3.8 Cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 em diferentes meios de cultura.....	36
3.9 Cultivo das actinobactérias endofíticas em meio líquido ISP-2 para a determinação do tempo ideal de cultivo para a produção de compostos bioativos...37	
3.10 Experimentos de eliciação: <i>Streptomyces</i> sp. RTd22 e <i>Streptomyces</i> sp. RTd31 X <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	39
3.10.1 Crescimento, consumo de glicose e pH	39
3.10.2 Protocolo do experimento de eliciação.....	40
3.11 Análise do perfil de fragmentação da grisorixina com complexo de cobre.....	41
3.12 Experimento do íon precursor para a identificação das concanamidas produzidas pela actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RT31	42
3.13 Experimentos de biologia molecular.....	42
3.13.1 Meios de cultura utilizados	43
3.13.2 Vetor.....	44
3.13.3 Plasmídeo	44
3.13.4 Oligonucleotídeos sintéticos.....	45
3.13.5 Células de <i>E. coli</i> quimicamente competentes: preparação e transformação	45
3.13.6 Conjugação	46
3.14 Métodos de biologia molecular.....	47
3.14.1 Isolamento de DNA	47
3.14.2. Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)	48
3.14.3 Gel de eletroforese de DNA	49
3.14.4 Ligação de três fragmentos de gene usando método isotérmico	49
3.14.5 PCR de Colônia.....	49
3.14.6. Digestão com enzimas de restri�o.....	50
3.15 Métodos de bioinformática	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Atividade biológica das frações	52
4.2 Estudo químico das frações da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd31.....	54
4.2.1 Fração acetato de etila do meio sólido de arroz (31-FAS)	54
4.2.2 Fração acetato de etila do meio líquido ISP-2 (31-FAL).....	77
4.3 Monitoramento da produção das concanamicinas.	99
4.4 Desreplicação das frações hexânica e butanólicas da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd31	101
4.5 Experimento de eliciação: <i>Streptomyces</i> sp RTd31 X <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 e <i>S. aureus</i> ATCC 6538	107
4.5.1 Crescimento, consumo de glicose e pH	108
4.6 Estudo químico das frações da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	116
4.6.1 Fração acetato de etila meio líquido ISP-2 (22-FAL).....	116
4.6.2 Desreplicação das frações hexânica, acetato de etila e butanólicas da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	127
4.7 Análise do perfil de fragmentação da grisorixina com complexo de sódio e de cobre	129
4.8 Monitoramento da produção da grisorixina	132
4.9 Experimento de eliciação para a actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTd22.....	134
4.9.1 Crescimento, consumo de glicose e pH	134
4.10 Cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp RTD22 em diferentes meios de cultura.....	141
4.11 Sequenciamento genético da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. RTd22.....	142
4.12 Deleção do gene análogo à flavina mono-oxigenase <i>nigCl</i> da nigericina	149
4.12.1 Amplificação por PCR das regiões que flanqueiam o gene análogo ao gene <i>nigCl</i> - flavina mono-oxigenase	151
4.12.2 Obtenção do mutante	152
5. CONCLUSÕES	153
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
ANEXOS	172

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel dos micro-organismos na descoberta de fármacos

Ao longo das últimas décadas, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel de grande importância como fonte promissora de novos compostos bioativos e como precursores para a síntese de novos fármacos (QIN et al., 2011).

Segundo a última revisão de Newman e Cragg (2012) acerca dos produtos naturais como fonte de novos fármacos desenvolvidos de 1981 a 2010, compreendendo 30 anos, pode-se observar que das 1073 pequenas moléculas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), 64% compreendem produtos naturais (N), fitoterápicos (NB), seus derivados semissintéticos (ND), mímicos de produtos naturais (S*/MN e S/MN) e compostos sintéticos cujas estruturas farmacofóricas foram inspiradas em produtos naturais (S*) e 36% são substâncias totalmente sintéticas (S) (Figura 1).

Figura 1 - Fontes de pequenas moléculas aprovadas pela FDA como fármacos (adaptado de Newman e Cragg, 2012)

Além das plantas, os micro-organismos representam uma rica fonte de metabólitos bioativos e têm gerado importantes produtos para a indústria farmacêutica, dentre eles: agentes antibacterianos como os β -lactâmicos (**1**, penicilina G e **2** cefalosporina C), tetraciclina (**3**, clortetracilina), aminoglicosídeos (**4**, estreptomicina), macrolídeos (**5**, eritromicina), glicopeptídeos (**6**, vancomicina),

lipopeptídeos (**7**, daptomicina); agentes imunossupressores como ciclosporina (**8**) e rapamicina (**9**); agentes hipolipêmicos como a lovastatina (**10**) e fármacos anti-helmínticos e antiparasitários como a ivermectina (**11**) (CRAGG; NEWMAN, 2013; GUIMARÃES et al., 2010) (Figura 2). Cerca de 47% dos metabólitos microbianos (aproximadamente 33000 compostos) apresentam algum tipo de atividade biológica e cerca de 40% (aproximadamente 28000 compostos) são antibióticos convencionais. As actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas como grandes produtoras de metabólitos bioativos, produzindo cerca de 39% de todos os metabólitos microbianos (BÉRDY, 2012).

Figura 2 - Fármacos produzidos por micro-organismos

Durante a "Era Dourada dos Antibióticos", entre os anos 1940-1950, quase todos os grupos de importantes antibióticos clínicos foram descobertos, sendo a maioria isolada de espécies de *Streptomyces*, representando cerca de 70-80% de todos os compostos isolados. Este período marca também o início da descoberta de antitumorais e antivirais (BÉRDY, 2005).

Metabólitos produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* também deram contribuições importantes para a quimioterapia antineoplásica, que inclui antibióticos anticancerígenos como bleomicina B2 (**12**), actinomicina D (**13**), mitomicina C (**14**), antraciclinas (**15**, daunorubicina e **16**, doxorrubicina) e pentostatina (**17**) (PUPO et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Anticancerígenos produzidos por micro-organismos do gênero *Streptomyces*

1.2 O problema da resistência

Apesar da descoberta dos antibióticos ter revolucionado o tratamento médico, ocasionando a redução da mortalidade causada por agentes patogênicos, o uso indiscriminado destes fármacos, inevitavelmente, leva à seleção de micro-organismos resistentes e, apesar dos diversos antibióticos em uso clínico, existe a necessidade de novos fármacos antimicrobianos (CLARDY et al., 2006). O número de patógenos multirresistentes está constantemente aumentando. Atualmente, mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes à maioria dos antibióticos comerciais. A mortalidade por infecções multirresistentes é de 50 a 80%. Nos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões pessoas adquirem infecções bacterianas nos hospitais, resultando em cerca de 100.000 mortes por ano (BÉRDY, 2012).

A terapia do câncer também sofre com graves problemas de resistência a múltiplas drogas (MDR), na qual as células tumorais apresentam uma resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (GONG et al., 2012; RUMJANEK et al., 2003).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2014, também válidas para o ano de 2015, apontavam para a ocorrência de aproximadamente 567 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (Instituto Nacional de Câncer/ Ministério da Saúde, 2014).

Devido a esses fatos, há a necessidade de buscar novos fármacos com atividade antibiótica (antibacteriana e antitumoral). Para isso, algumas estratégias podem ser adotadas na pesquisa em produtos naturais, tais como, utilizar organismos que habitam biótopos únicos, como os micro-organismos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Organismos e seus biótopos que são submetidos a constantes interações metabólicas e ambientais devem produzir ainda mais metabólitos secundários. Endófitos são micro-organismos que habitam tais biótopos, ou seja, as plantas superiores, razão pela qual eles são atualmente considerados

como uma fonte de novos metabólitos secundários com grande potencial para usos médicos, agrícolas, e/ou aproveitamento industrial (STROBEL, 2003). Atualmente, os endófitos são vistos como uma excelente fonte de produtos naturais bioativos, porque há muitos deles ocupando milhões de nichos biológicos exclusivos (plantas superiores) e crescendo em muitos ambientes incomuns. Existem quase 300.000 espécies de plantas na terra capazes de abrigar um ou mais endófitos exclusivos, portando os micro-organismos endofíticos são uma fonte rica e confiável de diversidade genética e de novas espécies de micro-organismos não descritos e que podem gerar novos produtos naturais (QUIN, et al., 2011; STOBEL; DAISY, 2003; STROBEL 2003).

1.3 A busca por novos antibióticos

1.3.1 Micro-organismos endofíticos como fontes de produtos naturais

A palavra endofítico vem do grego (*éndon* + *phytón*), significando “dentro da planta” e abrange bactérias, fungos, algas e insetos que convivem de uma forma simbiótica com a planta hospedeira (SCHULZ; BOYLE, 2005). A aplicabilidade do termo refere-se, principalmente, a bactérias e fungos (GUNATILAKA, 2006).

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam internamente os tecidos da planta hospedeira sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO, et al., 2000). Segundo Petrini (1991), estes micro-organismos vivem no interior das plantas pelo menos em um período do seu ciclo de vida. Além disso, eles distinguem-se dos fitopatogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais (AZEVEDO, 1999).

Nas interações simbióticas estes micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas, tais como controle de insetos e animais herbívoros, o aumento da tolerância a estresses abióticos, controle de outros micro-organismos fitopatogênicos e também ajudam no crescimento da planta (KUSARI et al., 2012; QIN et al., 2011; SCHARDL et al., 2004).

Outro fato a ser considerado é que os endófitos podem produzir antibióticos de toxicidade celular reduzida, caso contrário ocorreria a morte do tecido

do hospedeiro, que é composto de células eucarióticas. Este é um fato importante devido a grande preocupação da comunidade médica com a toxicidade latente de qualquer fármaco (STROBEL, 2003).

Os endófitos podem penetrar nos tecidos vegetais através da zona radicular e das partes aéreas das plantas como flores, caules e cotilédones, através dos estômatos e ferimentos. Os micro-organismos endofíticos podem permanecer no ponto de entrada, ou disseminarem-se pelo sistema vascular e alojarem intra e/ou intercelularmente (KOBAYASHI; PALUMBO 2000; ZINNIEL et al., 2002).

Alguns endófitos podem produzir alguns compostos químicos que são característicos do hospedeiro. Isto pode estar relacionado a uma recombinação genética dos endófitos com o hospedeiro que ocorre no tempo evolutivo (TAN; ZOU, 2001). Um dos casos mais interessantes é o da produção do paclitaxel (Taxol®) (**18**), um diterpenoide utilizado contra certos tipos de câncer e que, além de ser produzido por alguns vegetais, como *Taxus brevifolia* (Taxaceae), também é produzido por fungos que habitam esta planta, como *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1993, STROBEL; LONG, 1998). Outros importantes anticancerígenos de origem vegetal também têm sido isolados de fungos endofíticos. A vincristina (**19**) foi isolada do fungo endofítico *Mycelia sterilia*, associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). *Entrophospora infrequens*, um endofítico isolado de *Nothapodytes foetida*, produziu a camptotecina (**20**) (PURI et al., 2005). Outro produto natural vegetal, podofilotoxina (**21**), precursor de diversos agentes anticancerígenos semissintéticos, foi produzido por *Trametes hirsute*, um novo endofítico de *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2006), e também por *Phialocephala fortinii*, fungo associado com *Podophyllum peltatum* (EYBERGER et al., 2006). A hipericina (**22**), que apresenta diversas atividades biológicas, foi produzida pelo fungo endofítico *Hypericum perforatum* isolado da planta *Thielavia subthermophila* que é produtora do mesmo composto (KUSARI et al., 2008). As estruturas químicas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 4.

Figura 4 - Estruturas químicas de compostos produzidos por micro-organismos endofíticos e também produzidos pelas plantas hospedeiras

1.3.2 Produtos naturais bioativos de actinobactérias endofíticas

Apesar de mais recente, a pesquisa com actinobactérias endofíticas tem conduzido ao isolamento de metabólitos secundários com atividade antibiótica (antimicrobiana e antitumoral).

Os compostos (23) e (24), foram isoladas do endófito *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 presente no tecido da raiz de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). Estes compostos apresentaram atividades antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória (TAECHOWISAN et al., 2005; TAECHOWISAN et al., 2007a; TAECHOWISAN et al., 2007b). As munumbicinas A, B, C, D, E-4 e E-5 são antibióticos produzidos por *Streptomyces* NRRL 30562 um endófito de *Kennedia igriscans*, uma planta presente no território norte da Austrália. Estas munumbicinas são descritas com um amplo espectro de atividade incluindo atividade antimicrobiana e antimalárica (CASTILLO et al., 2006; CASTILLO et al., 2002). As coronamicinas são um complexo de peptídeos produzidos por *Streptomyces* sp.

(MSU-2110), um endófito de uma videira *Monstera* sp., que apresentaram atividade antifúngica e antimalárica (EZRA et al., 2004). Duas novas antraquinonas, lupinacidinas A e B (**25** e **26**), foram isoladas de uma nova linhagem endofítica pertencente ao gênero *Micromonospora*. As lupinacidinas mostraram significativos efeitos antitumorais (IGARASHI et al., 2007). O endófito *Streptomyces* sp. NRRL 30566 foi descrito e caracterizado parcialmente a partir de folhas *Grevillea pteridifolia* árvore que cresce no território do norte da Austrália. Esta actinobactéria produziu um novo antibiótico, a kakadumicina A (**27**), que apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas (CASTILLO et al., 2003). Uma nova ansamicina, naftomicina K (**28**) e cinco novos macrolídeos pertencentes à família das bafilomicinas (**29-33**), foram isolados da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp CS, isolada da planta medicinal *Maytenus hookeri*. Naftomicina K apresentou atividade citotóxica contra linhagens celulares P388 e A-549 e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. As bafilomicinas apresentaram atividade citotóxica para células de melanoma (LU; SHEN, 2007; LI et al., 2010). Uma nova γ -butirolactona (**34**) e mais nove compostos conhecidos foram isolados da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp W5 isolada da planta *Trewia nudiflora* L (WEI et al., 2010). As estruturas químicas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 5.

Figura 5 - Estruturas químicas de novos metabólitos produzidos por actinobactérias endofíticas.

1.4 Estratégias para acessar produtos naturais de micro-organismos

Um dos maiores desafios na pesquisa de produtos naturais é a busca por novos compostos, uma vez que re-isolamento de moléculas previamente identificadas é muito comum. Estima-se que a frequência de isolamento de antibióticos já conhecidos é de $1-2 \times 10^7$, ou seja, a frequência de distribuição dos antibióticos comuns supera o menos comum. Cerca de 10^7 actinobactérias precisam ser rastreadas para encontrar um antibiótico cuja abundância está abaixo do limiar (BALTZ, 2007).

Evitar o re-isolamento demanda análises químicas precisas dos extratos e uma busca detalhada em banco de dados de todos os compostos já conhecidos. Essa estratégia, conhecida como desreplicação, tem auxiliado nos estudos de

metabolômica e na descoberta de novas substâncias farmacologicamente ativas em um extrato (ITO; MASUBUCHI, 2014; NIELSEN et al., 2012; WOLFENDER et al., 2010; SILVA et al., 2010). As análises por espectrometria de massas (MS) tanto em baixa quanto em alta resolução (HRMS) são utilizadas como ponto de partida na busca por compostos cadastrados nos bancos de dados de produtos naturais como Dicionário de Produtos Naturais, MassBank, Metlin e Antibase. A desreplicação é uma tarefa difícil especialmente quando um banco de dados contém muitos candidatos com similaridades de massas. Para a exclusão dos candidatos, a utilização de dados como espectro de absorção no UV, fragmentação induzida por colisão (MS/MS) e o conhecimento taxonômico do organismo produtor auxiliam na identificação (ITO; MASUBUCHI, 2014; WOLFENDER et al., 2010).

Além disso, os micro-organismos são capazes de produzir muito mais compostos dos que são observados nas condições normais de laboratório. Muitos *clusters* de genes biossintéticos são silenciados ou são pouco expressos na ausência de um estímulo particular, como determinados nutrientes, sinais ambientais, compostos sinalizadores, dentre outros muitas vezes desconhecidos (SCHERLACH; HERTWECK, 2009). Dessa forma, para buscar novos metabólitos, várias metodologias têm sido empregadas para induzir a quimiodiversidade que os micro-organismos possuem. Isso pode ser alcançado em nível de genoma, transcriptoma, proteoma ou metaboloma (Figura 6) (BERTRAND et al., 2014). Serão discutidas algumas das metodologias que foram empregadas neste trabalho, tais como a cultura mista, variações das condições de cultivo e manipulação genética.

Figura 6 - Métodos que influenciam a biossíntese de metabólitos secundários nos micro-organismos. OSMAC - *one strain many compounds* (adaptado de BERTRAND et al., 2014)

1.4.1 Cultura mista

Nos bioprocessos industriais e pesquisas laboratoriais para a produção de antibióticos e de outros produtos farmacêuticos, é comum o uso de culturas microbianas puras. Porém na natureza, os micro-organismos não existem isoladamente, eles fazem parte dos minúsculos ecossistemas (OH et al., 2005). O número de cepas endofíticas encontradas dentro do tecido da planta pode variar de algumas para centenas por planta. A competição microbiana por espaço limitado e nutrientes pode ser a grande ferramenta da produção ecológica de metabólitos secundários bioativos (MARMANN et al., 2014). Acredita-se que diversas sinalizações e retroalimentação aconteçam entre os organismos, o que gera a produção de novos compostos (KNIGHT et al., 2003). Há evidências que a ativação de vias biossintéticas silenciadas requer a presença física de um segundo micro-organismo (interação célula-célula) e que metabólitos isolados (ex. parede celulares de células mortas, sobrenadantes livres de células ou extratos) não são suficientes para induzir a produção de metabólitos secundários (BERTRAND et al., 2014). Assim, a cultura de micro-organismos diferentes juntos (co-cultura ou cultura mista), força a interação direta o que pode induzir a produção de compostos que não são

previamente observados quando as linhagens são cultivadas independentemente (PETTIT, 2009). A aplicação desta técnica de cultura mista representa uma estratégia potencialmente importante para a descoberta de novos metabólitos secundários. Estudos têm demonstrado que a utilização de técnicas de co-cultura pode induzir a biossíntese de novos compostos, além disso, pode aumentar os teores e rendimentos de alguns metabólitos devido à co-culturas competitivas (RATEB et al., 2013; TRAXLER et al., 2013; MOREE et al., 2012; NONAKA et al., 2011; LUTI & MAVITUNA, 2011; PETTIT 2009; OH et al., 2007; OH et al., 2005).

Um exemplo é descrito por OH e colaboradores (2005) que relatam a aplicação de co-culturas entre o fungo *Libertella* sp., isolado de uma ascídia, e uma α -proteobactéria marinha. A interação das células microbianas na co-cultura levou a produção de diterpenos libertelenonas A-D (35-38), sendo que a libertelenona D demonstrou potente atividade citotóxica contra HCT-116 uma linhagem de células de adenocarcinoma humano (Figura 7).

Figura 7 - Libertelenonas A-D produzidas em co-cultura

1.4.2 Variações nas condições de cultivo

Variações nas condições de cultivo podem afetar o perfil metabólico do micro-organismo, mostrando a importância de serem realizados experimentos com diferentes meios de cultura para otimizar a produção de um determinado metabólito ou buscar novos compostos. Esta metodologia é conhecida como OSMAC ("*one strain many compounds*"), que visa alterar as condições de cultivo de um micro-organismo a fim de simular diferentes ambientes e consequentemente induzir a produção de diferentes metabólitos (BODE et al., 2002). Os parâmetros que são variados incluem luz (TISCH; SCHMOLL, 2010), pH, temperatura e aeração. No meio de cultura podem-se variar a fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, sais inorgânicos e traços de metais (RUIZ et al., 2010; TAKUR et al., 2009; GESHEVA et

al., 2005; SANCHEZ; DEMAIN, 2002; IWAI; OMURA, 1982). O meio de cultura pode ser suplementado com outras pequenas moléculas ou metais pesados que funcionam como indutores ou supressores ou através de mecanismos desconhecidos (PETTIT, 2011).

A aplicação da estratégia OSMAC tem levado a produção de compostos semelhantes a fármacos e também a produção de novos metabólitos (BODE et al., 2000a, BODE et al., 2000b; BODE et al., 2002; MASUMA et al., 1986). Um exemplo dessa metodologia é descrita por Bode e colaboradores (2002) que isolaram mais de 100 compostos de mais de 25 classes estruturais de seis diferentes micro-organismos pela alteração das condições de cultivo.

A fonte de carbono é um dos principais fatores requeridos para controle do metabolismo secundário (ILIC et al., 2013). Um exemplo de antibióticos cuja produção é regulada pela fonte de carbono incluem os antibióticos β -lactâmicos e policetídeos macrocíclicos. A cefamicina C é um β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus* cuja síntese é inibida pelo glicerol através da repressão das enzimas cefamicina C sintetase e expandase. Além da cefamicina C, *S. clavuligerus* produz ácido clavulânico, um inibidor da beta-lactamase. Embora estruturalmente relacionados, estes dois beta-lactâmicos são derivados de diferentes precursores biossintéticos. Surpreendentemente, apesar de glicerol abolir a produção de cefamicina C, ele, concomitantemente, aumenta a formação de ácido clavulânico. Dessa forma, o glicerol se torna uma boa fonte de carbono para a produção de ácido clavulânico para este micro-organismo (RUIZ et al., 2010).

A glicose também causa a inibição na produção de actinorrodina por *S. lividans*, devido repressão da síntese de *afsR2* mRNA, que codifica uma proteína regulatória global envolvida na estimulação da biossíntese de metabólitos secundários. Como esperado, nenhuma repressão é observada quando a glicose é substituída por glicerol neste micro-organismo (KIM et al., 2001).

Micro-organismos também usam uma variedade de fontes de nitrogênio para crescimento, mas nem todas as fontes suportam igualmente o crescimento. Em geral, as melhores fontes de nitrogênio são glutamina, amônia e asparagina, enquanto prolina e uréia qualificam-se como pobres fontes de nitrogênio. A fim de selecionar a melhor fonte dentre uma grande diversidade de fontes de nitrogênio disponíveis, os micro-organismos têm sensores desenvolvidos e mecanismos

regulatórios, os quais permitem a utilização da melhor fonte de nitrogênio presente no meio (SANCHEZ; DEMAINE, 2002).

O mesmo acontece com sais inorgânicos, nas fermentações microbianas, a produção de enzimas extracelulares e metabólitos secundários são frequentemente regulados por fosfato inorgânico. Em *S. lividans*, por exemplo, a produção de agarase é estimulada pela limitação de fosfato (SANCHEZ; DEMAINE, 2002).

Dessa forma, as variações das fontes de carbono, nitrogênio e metais presentes no meio de cultura resultam em diferenciação química (metabólitos secundários) e morfológica (morfogênese) do micro-organismo produtor de metabólitos bioativos. Portanto, quando há a necessidade de otimizar a produção de algum composto de interesse experimentos devem ser realizados variando-se as fontes destes elementos a fim de se verificar os efeitos na biossíntese do composto desejado (RUIZ et al., 2010).

1.4.3 *Genome mining* visando novos produtos naturais

Genome mining, ou exploração genômica, pode ser definido como o uso da bioinformática, da genética molecular e da química de produtos naturais para acessar os metabólitos encontrados no genoma de um organismo (GOMEZ-ESCRIBANO; BIBB 2014). Dessa forma, o sequenciamento genômico tem auxiliado os estudos de *genome mining* possibilitando a identificação de genes que não são expressos em condições usuais de cultivo em laboratório e a identificação de novos produtos naturais através das informações genéticas obtidas (GUIMARÃES et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2013). Muitos dos *clusters* de genes biossintéticos não são expressos em condições laboratoriais, e métodos de biologia molecular têm sido aplicados com sucesso para estimular a biossíntese de produtos naturais *crípticos* e para entender as sequências reacionais envolvidas na produção de produtos naturais por micro-organismos. Actinobactérias, mixobactérias e outros prolíficos produtores de metabólitos secundários dedicam, em média, cerca de 5% da sua capacidade codificação para a síntese de metabólitos secundários (MONCIARDINI et al., 2014).

O *genome mining* pode auxiliar tanto na ativação da expressão de um *cluster* de genes silenciado através da manipulação genética, utilizando a deleção ou a super-expressão de supostos reguladores transcricionais positivos ou negativos quanto na clonagem de gene de interesse e a sua expressão através de um hospedeiro heterólogo aceitável (GOMEZ-ESCRIBANO & BIBB, 2014).

A coeliquelina (**39**), um peptídeo não-ribossomal (NRPS) de *Streptomyces coelicolor* (LAUTRU et al., 2005) e a orfamida A (**40**), um lipopeptídeo cíclico com atividade antifúngica produzido por *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (GROSS et al., 2007), são exemplos de compostos descobertos através do *genome mining*. As estruturas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 8. A coeliquelina foi identificada através das análises genômicas e posterior nocaute de genes específicos e análise do perfil metabólico. A orfamida A combinou a análise genômica com o fracionamento guiado pelo isótopo para a identificação de compostos desconhecidos (DE OLIVEIRA et al., 2013; GROSS et al., 2007; LAUTRU et al., 2005).

Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos identificados por *genome mining*

Fungos endofíticos foram isolados de *Tithonia diversifolia* e estudos químicos foram realizados para a identificação de compostos produzidos por esses micro-organismos (BORGES; PUPO, 2006; GUIMARÃES et al., 2008; BORGES, 2008). Recentemente, 28 linhagens de actinobactérias endofíticas foram isoladas das raízes de *Tithonia diversifolia*, uma planta pertencente à família Asteraceae e também conhecida como margaridão ou girassol mexicano (CONTI, 2012). As linhagens pertencem a coleção do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Na triagem biológica realizada, os extratos etanólicos dos cultivos em arroz parboilizado por 21 dias (30°C) de duas linhagens de actinobactérias, *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp RTd31 (Figura 9), destacaram-se pelas elevadas atividades citotóxicas em células tumorais (Tabela 1).

Figura 9 - *Streptomyces* sp RTd22 (A) e *Streptomyces* sp RTd31 (B); 21 dias em meio sólido ISP-2 (página 21).

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos etanólicos das actinobactérias endofíticas em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL

Amostra	Citotoxicidade em linhagens de células tumorais (%)		
	MDAMB-435 (melanoma)	HCT-8 (cólon)	SF-295 (sistema nervoso)
Branco			
meio	5,74	31,53	SA
RTd 22	89,40	98,17	94,52
RTd 31	95,32	95,40	88,71
DOX	97,30	96,94	87,67

SA – Sem Atividade; Atividade baixa – 1 ≥50%; Atividade moderada – 50 ≥75%; Atividade alta – 75 ≥ 100%.
DOX: doxorubicina (controle positivo)

O extrato etanólico da cultura em arroz de *Streptomyces* sp RTd22 também apresentou CIM de 25 µg/mL frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *S. saprophyticus*, sendo que o controle positivo penicilina G apresentou CIM de 0,0922 µg/mL para *S. aureus* e 0,1844 µg/mL para *S. saprophyticus*. Segundo dados da literatura, pode-se considerar uma boa atividade antimicrobiana quando o extrato apresenta CIM abaixo de 100 µg/mL, sendo assim, esses resultados de CIM para bactérias Gram-positivas mostraram-se muito satisfatórios (RÍOS; RECIO, 2005).

Desta forma, as duas linhagens destacam-se como promissoras para o isolamento de produtos naturais bioativos frente a células tumorais. A linhagem *Streptomyces* sp RTd22 também apresentou potencial para o estudo químico na busca por produtos naturais contra bactérias Gram-positivas.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar os produtos naturais ativos frente a células tumorais e bactérias patogênicas produzidos pelas actinobactérias endofíticas *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31 e aplicar estratégias para a modulação do metabolismo secundário.

2.2 Principais etapas experimentais para atingir os objetivos

- Cultivar as linhagens de actinobactérias endofíticas *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31 em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2 em escala ampliada e obtenção dos extratos orgânicos;
- Fracionamento dos extratos obtidos através de partição líquido-líquido, colunas cromatográficas usando diferentes fases estacionárias (sílica gel, sílica de fase reversa C-18, Sephadex® LH-20), e HPLC- DAD/UV (em fase reversa C-18 e/ou normal em sílica gel) para isolamento das substâncias;
- Identificação estrutural das substâncias isoladas através de métodos de RMN uni e bidimensionais, MS, IV e UV;
- Submissão das frações e substâncias obtidas em quantidades suficientes aos ensaios antibacterianos e citotóxicos em células tumorais;
- Cultivar as actinobactérias endofíticas em meio líquido ISP-2 para determinar o tempo ideal de produção dos compostos bioativos;
- Cultivar a actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. RTd22 em diferentes meios de cultura a fim de verificar a influência da composição do meio de cultura na produção de metabólitos secundários;
- Cultivar as actinobactérias endofíticas com bactérias patogênicas a fim de verificar a possível eliciação da produção de substâncias antibacterianas;
- Manipular a via de biossíntese do poliéter grisorixina em nível genético a fim de verificar a produção de precursores e/ou outros produtos naturais pela actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos utilizados

- Para a reativação das actinobactérias em tubos falcon, pré-inóculo e cultivo das actinobactérias em Erlenmeyers contendo meio líquido ISP-2 foi utilizado a mesa agitadora Innova® 44 TM 4300 (New Brunswick Scientific).
- A esterilização dos meios de cultura e demais materiais foi realizada na autoclave vertical Phoenix AV 75 a 121 °C e 1,0 atm por 20 min.
- As amostras foram concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida (Büchi – modelo R-II)
- As manipulações dos micro-organismos foram realizadas em fluxo laminar da PACHANE PA-320
- Para a incubação das actinobactérias em meio sólido de arroz foi utilizada a estufa B.O.D (*Biologic Oxygen Demand*) modelo TE-391 da Tecnal a uma temperatura de 30 °C. Para a incubação das bactérias utilizadas no ensaio antimicrobiano foi utilizada a estufa Odontobrás Modelo ECB 1.2 à temperatura de 37 °C.
- Para a pesagem de meios de cultura e demais substâncias foram utilizadas as balanças Metter Toledo XS 205 e Gehaka BG400
- A análise de presença de açúcares no meio de cultura no experimento de eliciação foi feita no espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu - modelo UV-1650) utilizando cubetas espectrofotométricas de quartzo com comprimento óptico de 1 cm.
- Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos nos espectrômetros Bruker ARX 300 e 500 MHz.
- As análises por HPLC foram realizadas nos seguintes cromatógrafos líquidos:
 - Cromatógrafo analítico e semipreparativo binário Shimadzu, modelo: LC-10 AVP - controlador, LC-6 AD – bomba, com detectores: DAD modelo SPD-M10AVP e RID modelo RID-10A, auto injetor SIL-10AF. As análises foram processadas no software Class VP.

- Cromatógrafo preparativo isocrático Shimadzu, modelo: CBM-20A – controlador, LC-6A – bomba, com detector UV-VIS SPD-20A. As análises foram processadas no software LabSolutions.
- Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetros de massas ESI operando em modo positivo e negativo de análise. A ionização em modo positivo apresentou melhor eficiência com maior diversidade de sinais. Os espectrômetros de massas utilizados nas análises foram:
 - Acquity™ UPLC (Waters Corporation Milford, USA) para as análises via UPLC-MS. O equipamento apresenta sistema de bomba quaternária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização por electrospray (ESI) equipado com Z-spray ortogonal. Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK). A fonte de ionização foi operada em modo positivo e negativo e os parâmetros empregados nas análises foram: tempo de scan: 0,5 s; gás de dessolvatação: N₂ a 350 °C; temperatura da fonte de ionização: 150 °C e voltagem do capilar: 3,2 kV (modo positivo) e -3,2 kV (modo negativo), voltagem do cone: 40 V. As análises foram processadas no software MassLynk (Waters).
 - As análises de alta resolução (HR-ES-IMS) foram feitas no equipamento UltrOTOFT-Q (Bruker Daltonics, Billerica, MA - EUA) com analisador de tempo de voo e electrospray como fonte de ionização, para as análises em modo *full-scan* e MS/MS em modo positivo e negativo. Bomba de infusão (modelo Cole Parmer) com fluxo de 300 µL/h. Fonte de ionização: *end plate* de 500 volts, voltagem capilar de 3500 volts, nitrogênio como gás nebulizador a uma pressão de 0,4 bar. A temperatura do gás de secagem foi 180 °C, fluxo de 4L/min. A fase móvel utilizada na solubilização das amostras foi MeOH:H₂O. A calibração interna foi feita antes das análises com solução Na-TFA a 10 mg/mL.
 - As reações de PCR foram feitas no termociclador Téchné, modelo TC-512.
 - Para a eletroforese de DNA, foi utilizada a fonte - Holfer modelo PS-300B, com voltagem de 110 por 50min e cuba horizontal Apelex modelo Midigel 2. A leitura do gel foi feita no equipamento MinBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).
 - A concentração de ácidos nucleicos foi medida no espectrofotômetro Bio Mate™ 3S (Thermo Scientific).

- A água ultrapura utilizada nos preparos foi purificada através do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, France).
- A água destilada foi obtida pelo equipamento de osmose reversa, marca Gehaka OS 10 LX.
- Centrífuga Eppendorf modelo 5810R.
- Sonicador Unique - modelo USC 1600.

3.2 Condições das análises cromatográficas e espectrométricas

- O fracionamento em coluna clássica foi realizado em colunas de vidro (Vidrolabor). Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel 60 (80-230 mesh - Acros Organics) e Sephadex LH-20 (25-100 μm , Amersham Bioscience).
- As análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em Cromatofolhas – Sílica gel F254 TLC-cards 20×20 cm da Fluka. Reveladores: radiação UV (254 e 360 nm) e vanilina em ácido sulfúrico.
- As análises por HPLC foram monitoradas por DAD-UV-vis de 190 a 800 nm. As análises foram feitas em fase reserva em coluna analítica com pré-coluna Phenomenex, modelo Gemini C₁₈ 110 A (4.6 x 250 mm; 5 μm). A coluna semi-preparativa com pré-coluna modelo Nucleosil 120-5 C18 (10 x 250 mm; 5 μm) foi usada no isolamento dos compostos. As condições de eluição estão descritas na metodologia de cada experimento.
- Nas análises por UPLC-MS foram injetados 5 μL de amostra em coluna ACQUITY-BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 μm). A fase móvel no sistema A foi composta de acetato de amônio 10 mM e MeOH no sistema B. As condições de eluição estão descritas na metodologia de cada experimento
- As análises por inserção direta (ID-MS) foram realizadas por meio de inserção direta de soluções da amostra em MeOH/H₂O em equipamentos de espectrometria de massas sem coluna cromatográfica. No UltrOTOFT-Q a injeção das amostras foi realizada com bomba de seringa com fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Nas análises de RMN as frações e compostos isolados foram dissolvidos em CDCl₃ ou DMSO-*d*₆ e utilizados tubos de RMN grade 7 U-P PK-5. Para compostos com pequena quantidade de material, foram utilizados tubos

Shiguemi® (5mm), para os experimentos de RMN de ^1H , COSY, HMBC e HMQC.

3.3 Solventes

- Nas extrações, partições líquido-líquido, eluições de coluna cromatográficas a baixa pressão e de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizados solventes P.A. da Vetec, Synth, Dinâmica e Cinética. Nas análises por HPLC e UPLC-MS foram utilizados solventes de grau cromatográfico da Merck.
- Para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados Cambridge Isotope Laboratories e Acros Organic (98,0 – 99%).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth) foi utilizado na solubilização das amostras testadas nos ensaios antibacterianos.

3.4 Meios de cultura para cultivo das actinobactérias

Os meios de cultura utilizados das actinobactérias endofíticas foram:

- **Meio sólido de arroz** - Arroz parboilizado comercial (Carrefour)
- **Meio ISP-2 líquido**

Dextrose	4 g
Extrato de levedura	4 g
Extrato de malte	10 g
Água destilada	1L, pH 7,2

- **Meio ISP-2 sólido** . adicionar 20 g de ágar bacteriológico

3.5 Métodos Microbiológicos

3.5.1 Ensaio antibacterianos

➤ **Materiais e reagentes utilizados:** Foram utilizadas placas de 96 poços da marca TPP, ponteiros de 1000, 200 e 10 μL , tubos eppendorf de 1,5 mL, solução reveladora resazurina (Sigma-Aldrich), NaCl (J.T.Baker) para preparo de

solução salina 0,9%, tubos de ensaio, solução padrão 0,5 de McFarland (0,5mL de BaCl_2 0,048 mol/L (1,175% v/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5mL de H_2SO_4 0,18 mol/L (1% v/v) - OD 600 de 0,08 a 0,10), DMSO (Synth) para solubilização das amostras, caldo e ágar Muller-Hinton (Himedia). As fitas de E-test® (MIC Evaluator- Oxoid) de oxacilina foram utilizadas como controle positivo nos ensaios antibacterianos com bactérias resistentes. Antibióticos padrões usados nos ensaios antibacterianos: estreptomicina (Sigma-Aldrich), penicilina G (Sigma-Aldrich), vancomicina (Sigma-Aldrich), daptomicina (Novartis). As soluções de antibióticos foram esterilizadas utilizando filtro de 0,22 μm , estocadas a -20 °C e usadas nas concentrações mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Solução estoque de antibióticos

Antibiótico	Classe Química	Solvente	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração de trabalho ($\mu\text{g/mL}$)
Estreptomicina (Est)	aminoglicosídeo	H_2O	0,1	20
Penicilina (Pen)	β -lactâmico	H_2O	0,1	20
Vancomicina (Van)	glicopeptídeo	H_2O	0,2	40
Daptomicina (Dap)	lipodepsipeptídeo	H_2O	0,2	40

3.5.1.1 Linhagens bacterianas

Os ensaios antibacterianos foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) sob orientação da Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo. As linhagens bacterianas utilizadas foram:

- Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. saprophyticus* ATCC 15305

Os ensaios antibacterianos com bactérias resistentes foram realizados no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) no Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo – IFSC/USP – sob supervisão

da Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo. As linhagens bacterianas multirresistentes utilizadas foram:

- *Staphylococcus aureus* Mu50 ATCC 700699 – linhagem Japonesa VISA (resistência intermediária à vancomicina) e MRSA (resistente à meticilina)
- *Staphylococcus aureus* SA16 – linhagem hospitalar MRSA
- *Enterococcus faecium* VRE16 – linhagem hospitalar resistente a vancomicina
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MSSA – susceptível a meticilina) – cepa utilizada como controle de qualidade

3.5.1.2 Preparo das amostras

Inicialmente foram pesados em eppendorf esterilizados 1 mg das amostras, as quais foram adicionadas 125 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se então a concentração de 8000 µg/mL. Essa solução (Sol. 1) foi agitada até a solubilização completa da amostra. Posteriormente, em outro eppendorf, foram colocados 10 µL da Sol. 1 e acrescentado 70 µL de caldo Mueller-Hinton, obtendo-se então a solução mãe (SM) com uma concentração de 1000 µg/mL. Esta SM (80 µL) foi adicionada ao primeiro poço da placa de 96 poços para a realização da diluição seriada. A faixa de contração das substâncias testadas, para a obtenção da contração inibitória mínima (CIM) foi de 400 – 0,195 µg/mL.

3.5.1.3 Preparo dos antibióticos

Penicilina G e estreptomicina foram utilizadas como controle positivo para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Foi pesado 1 mg do antibiótico e dissolvido em 10 mL de tampão fosfato de potássio a 1%, pH = 6,0 (2,0 g do fosfato de potássio dibásico; 8,0 g do fosfato de potássio monobásico, qsp 1000 mL). Foi transferido 1 mL desta solução para um tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Mueller-Hinton. Foram aplicados 59 µL desta última solução no primeiro poço da placa de 96 poços. A faixa de contração dos antibióticos, para a obtenção da CIM, está entre 5,9 – 0,0115 µg/mL, exceto para o ensaio com e *Staphylococcus*

aureus, no qual a faixa de contração da penicilina, para a obtenção da CIM, está entre 5,9 – 0,00009 µg/mL (Figura 10).

Para os ensaios com as bactérias resistentes, foram utilizadas a vancomicina e daptomicina como controles positivos. Foram pesados 2 mg da vancomicina e dissolvidos em 10 mL de água Milli-Q. Foi transferido 1 mL desta solução para um tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Muller-Hinton. Foram aplicados 80 µL desta última solução no primeiro poço da placa de 96 poços. A faixa de concentração testada foi de 16 a 0,125 µg/mL.

Para daptomicina seguiu-se o mesmo protocolo, porém o caldo Muller-Hinton utilizado foi suplementado com 50 mg/L de cálcio (solução de cloreto de cálcio). Para algumas linhagens a CIM dos antibióticos foi realizada por E-test, conforme descrito no item 3.5.1.4.

3.5.1.4 E-test

Para determinação da CIM através de fitas Etest® primeiramente as linhagens bacterianas foram inoculadas em ágar BHI (*brain heart infusion*-Difco) e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para obtenção de colônias isoladas. Com colônias isoladas produziu-se uma suspensão na escala 0,5 de McFarland em solução fisiológica e inoculou-se em placa de Ágar Mueller-Hinton (ou Mueller-Hinton + 2% NaCl para Oxacilina). Após a cultura secar na placa, colocou-se com pinça uma fita Etest® do antimicrobiano a ser testado. Incubou-se em estufa a 37 °C e realizou-se a leitura após 24 e 48 horas. A CIM é aquela onde a elipse de inibição toca a fita no valor correspondente.

A determinação da CIM dos antibióticos por esse método foi utilizada para as linhagens *Staphylococcus aureus* Mu50 ATCC 700699 e *Enterococcus faecium* VRE16.

3.5.1.5 Preparo do inóculo bacteriano para o ensaio de microdiluição.

Suspensões das culturas bacterianas foram preparadas em tubos contendo 5 mL salina esterilizada (0,9%) e padronizada com a escala 0.5 McFarland

(que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias – UFC/mL). Uma alíquota de 1000 μL foi diluída em 9000 μL de solução salina, obtendo-se uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Posteriormente 2000 μL desta solução foram adicionados a 10.000 μL do meio de cultura, obtendo-se assim, a concentração de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ UFC/mL.

Alíquotas de 20 μL de cada suspensão microbiana foram transferidas para os poços da placa de microdiluição após a realização das microdiluições seriadas das substâncias a serem testada e do antibiótico de referência (controle). Portanto em cada poço a concentração do inóculo foi de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL.

3.5.1.6 Protocolo utilizado no ensaio antibacteriano

Os ensaios antibacterianos foram realizados aplicando-se o teste de susceptibilidade para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo as normas descritas pelo CLSI (2003) (*Clinical Laboratory Standards Institute*), segundo a norma M7-A6, com modificações (Figura 10). Para garantir a eficiência do ensaio alguns controles foram realizados como a esterilidade do meio de cultura e das amostras. Também foi feito o teste do DMSO para comprovar que o mesmo não está inibindo o crescimento microbiano, e também foi realizado o controle da cultura para comprovar a viabilidade do inóculo microbiano. Terminado o procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas. Após o crescimento e leitura visual dos resultados foram realizadas as sementeiras do meio líquido contido nos poços que apresentarem inibição no crescimento bacteriano. A sementeira foi realizada em placas de Petri com o Ágar Müeller-Hinton, confirmando o efeito bacteriostático ou bactericida das amostras e antibiótico. Depois da retirada do material para sementeira, as placas de Elisa foram reveladas com 20 μL do revelador de crescimento microbiano – resazurina – o qual foi preparado numa concentração de 0,02%. A resazurina muda de coloração (de azul para rosa) quando há crescimento do micro-organismo. É um indicador de oxido-redução que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade de células microbianas (PALOMINO et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é reduzida na presença de células viáveis a resofurina, tornando-se rosa (FUKUSHIMA et al., 2003).

C = caldo (meio de cultura); I = inoculo bacteriano; SM = solução-mãe; ATB = antibiótico

Figura 10 - Protocolo utilizado para o ensaio de microdiluição seriada para o ensaio antibacteriano e para a microdiluição do antibiótico penicilina para o ensaio com *S.aureus*

3.5.2 Ensaio citotóxico em células tumorais

Os ensaios citotóxicos em células tumorais foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade das Profas. Dras. Cláudia Pessoa e Letícia Veras Costa-Lotufo.

As linhagens tumorais utilizadas, HL-60 (leucemia – humana), MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano), OVCAR-8 (ovário-humano) e LH-60 (leucemia) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI, EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera

contendo 5% de CO₂. As amostras foram dissolvidas em 0,1% de DMSO na concentração estoque de 10 mg/mL. A citotoxicidade da amostra foi avaliada pelo método do MTT (MOSMAN, 1983). É um método colorimétrico no qual o corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) de coloração amarela é reduzido por enzimas mitocondriais à um produto insolúvel - formazana - de coloração púrpura.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades: 0,3 x 10⁶ (HL-60), 0,7 x 10⁵ (HCT-8), 0,6 x 10⁵ (SF-295) e 0,1 x 10⁶ (MDAMB-435). As amostras foram adicionadas e as placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. As amostras foram testados em uma única concentração (50 µg/mL) em triplicata em dois experimentos independentes. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa a 595 nm. Os resultados foram analisados através de uma escala de intensidade para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (Mo, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%). Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

3.6 Cultivo e obtenção dos extratos e frações das actinobactérias endofíticas

Para o cultivo das actinobactérias endofíticas primeiramente foi feito um pré-inóculo, no qual ambas as linhagens, preservadas em glicerol, foram reativadas em tubos falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio líquido ISP-2 por 48 h (30 °C a 120 rpm) e posteriormente semeadas em placas de Petri com ISP-2 ágar com auxílio de um “swab”. As placas foram incubadas em estufa por 7 dias a 30 °C. Da placa de cada cultura microbiana foram retirados 20 discos de micélio-ágar, com auxílio de um tubo de transferência (Fischer®), e adicionados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido. Os frascos foram submetidos à agitação por 48 h (30°C, 120rpm). Após esse período deu-se início ao cultivo em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2

➤ **Cultivo em meio sólido de arroz:** para o cultivo de cada linhagem de actinobactéria foram utilizados 25 Erlenmeyers de 500 mL contendo o meio sólido de arroz (100g de arroz parboilizado e 90 mL de água destilada, autoclavados por 40 minutos a 121 °C e 1 atm). Em cada frasco foram adicionados 10 mL das culturas obtidas nos pré-inóculos e incubados em estufa B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) a 30 °C por 21 dias. Após o período de crescimento foram adicionados 200 mL de álcool etílico (EtOH) 95% em cada frasco de cultura, para a extração dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. O período de maceração em EtOH 95% foi de 24 horas. Após esse período, o micélio foi filtrado por filtração a vácuo, e a porção etanólica submetida à concentração sob pressão reduzida em rota-evaporador para evaporação do álcool etílico. Posteriormente foi adicionada água para que pudesse ser feita a partição líquido-líquido com solventes orgânicos. A porção aquosa do cultivo das actinobactérias foi submetida a partição líquido-líquido com o mesmo volume de solventes orgânicos, sendo que este volume foi dividido em três procedimentos. Os solventes orgânicos utilizados para a partição líquido-líquido do meio sólido de arroz foram hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH). A evaporação dos solventes orgânicos forneceu as frações de hexano (FHS), acetato de etila (FAS) e *n*-butanol (FBS). Experimentos controle, sem adição das actinobactérias, foram realizados para se obter extratos do meio de cultura apenas, para futura comparação com os extratos oriundos dos meios inoculados.

➤ **Cultivo em meio líquido ISP-2:** para o cultivo de cada linhagem de actinobactéria em meio líquido foram utilizados 25 Erlenmeyers de 500 mL contendo 190 mL de ISP-2 autoclavados por 20 minutos (121°C, 1 atm). Uma alíquota de 10 mL do pré-inóculo foi transferida para cada Erlenmeyer. As culturas foram incubadas em mesas agitadores por 21 dias, a 120 rpm, 30 °C. Após o período de crescimento foram adicionados 100 mL de EtOH 95% por frasco de cultura para a extração dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. O período de maceração em EtOH foi de 24 horas. Posteriormente, o meio foi homogeneizado com aparelho mixer e mantido em ultrassom por 15 minutos. O micélio foi separado por filtração à vácuo e a porção hidroalcóolica foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para a eliminação do etanol. Posteriormente foi adicionado água para que pudesse feita a partição líquido-líquido. A porção aquosa do cultivo das actinobactérias foi submetida a partição líquido-líquido com o mesmo volume de solventes orgânicos,

sendo que este volume foi dividido em três procedimentos. Os solventes orgânicos utilizados para a partição líquido-líquido do meio sólido de arroz foram, acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH). A evaporação dos solventes orgânicos forneceu as frações em AcOEt (FAL) e *n*-BuOH (FBL). Experimentos controle, sem adição das actinobactérias, foram realizados para se obter extratos do meio de cultura apenas, para futura comparação com os extratos oriundos dos meios inoculados. A Tabela 3 mostra as frações obtidas a partir dos cultivos das actinobactérias em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2 com as respectivas massas. Posteriormente, as frações com massa superior a 50 mg, foram submetidas ao ensaio citotóxico em células tumorais e ao ensaio antimicrobiano.

Tabela 3 - Frações e suas respectivas massas obtidas das partições com solventes orgânicos da porção aquosa do cultivo em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2 das actinobactérias *Streptomyces* sp. RTd 22 e *Streptomyces* sp. RTd 31.

Cultivo em meio sólido de arroz	Massa (gramas)	Cultivo em meio líquido ISP-2	Massa (gramas)
22 – FHS	2,182	22 – FAL	0,730
22 – FAS	5,450	22 – FBL	5,646
22 – FBS	13,514	31 – FAL	0,272
31 – FHS	0,200	31 – FBL	1,521
31 – FAS	1,011		
31 – FBS	7,73		

FHS: fração hexânica do cultivo em meio sólido de arroz; FAS: fração acetato de etila do cultivo em meio sólido de arroz; FBS: fração *n*-butanol do cultivo em meio sólido de arroz; FAL: fração acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2; FBL: fração *n*-butanol do cultivo em meio do meio líquido ISP-2

3.7 Fracionamento e isolamento de compostos produzidos pelas linhagens *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31

3.7.1 Fracionamento da fração 31-FAS

A fração 31-FAS oriundo da partição com acetato de etila do cultivo em meio solido de arroz da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31, apresentou boa atividade no ensaio citotóxico em células tumorais e atividade antibacteriana para *S. aureus*, como mostram as Tabelas 10 e 11 respectivamente no item 4.1. Dessa forma procedeu-se o fracionamento para isolamento dos compostos bioativos segundo mostra o Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio sólido de arroz da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31.

3.7.2 Fracionamento da fração 31-FAL

A fração 31-FAL oriunda da partição com acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31, apresentou elevada atividade no ensaio citotóxico em células tumorais e também apresentou atividade antibacteriana para *S. aureus*, como mostram as Tabelas 10 e 11 respectivamente no item 4.1. Dessa forma procedeu-se o fracionamento para isolamento dos compostos bioativos segundo mostra o Fluxograma 2.

Fluxograma 2 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31.

3.7.3 Fracionamento da fração 22-FAL

A fração 22-FAL oriunda da partição com acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22, apresentou elevada atividade no ensaio citotóxico em células tumorais e também apresentou atividade antibacteriana para *S. aureus*, como mostram as Tabelas 10 e 11 respectivamente no item 4.1. Dessa forma procedeu-se o fracionamento para isolamento dos compostos bioativos segundo mostra o Fluxograma 3.

Fluxograma 3 - Fracionamento da fração acetato de etila do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22.

3.8 Cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 em diferentes meios de cultura

A actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. RTd22 foi cultivada em diferentes meios de cultura visando a variação no perfil metabólico e busca por diferentes compostos bioativos. Os meios selecionados foram: ISP-1, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ISP-6, ISP-7 (ATLAS, 1993), Tabela 4. Foram feitos cultivos semissólido em placas de Petri. As placas foram incubadas por 15 dias a 30 °C em estufa B.O.D. Também foram realizados experimentos controle, sem adição da actinobactéria para se obter apenas os extratos do meio de cultura, para posterior comparação com os extratos oriundos dos meios inoculados. Após o período de cultivo, os meios sólidos contendo as actinobactérias e os controles foram colocados separadamente em recipientes contendo 100 mL de acetato de etila e deixados em maceração por 24h. Posteriormente o meio foi triturado com auxílio de mixer e mantido em ultrassom por 15 minutos para a extração dos compostos presentes em cada meio. A massa micelial e os resíduos do meio de cultura foram filtrados a vácuo para a obtenção apenas da fase orgânica contendo os compostos extraídos. Em seguida o meio foi extraído com acetonitrila:água (1:1) e feito o mesmo procedimento para obtenção do extrato. Posteriormente, os extratos foram submetidos às análises por espectrometria de massas por ID-MS. As amostras foram solubilizadas em acetonitrila

Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados para o cultivo da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. RTd22

Meios de Cultura	Composição (para 1000 mL de água)
ISP-1	Triptona 5g; Extrato de levedura 3g
ISP-3	Farinha de aveia 20g, solução traços de sais*
ISP-4	Amido solúvel 20g; glicose 20g; H ₂ HPO ₄ 2g; MgSO ₄ · 7H ₂ O 2g; NaCl 2g; (NH ₄) ₂ SO ₄ 2g; CaCO ₃ 4g; solução traços de sais* 1mL
ISP-5	Asparagina (base anidra) 1g; glicerol 10g; K ₂ HPO ₄ ; solução traços de sais* 0,1mL
ISP-6	Peptona 15g; Proteose peptona 5g; citrato férrico amoniacal 0,5g; K ₂ HPO ₄ 1g; tiosulfato de

ISP-7

sódio 0,08g; extrato de levedura 1g

Glicerol 15g; Tirosina 0,5g; Asparagina 1g;
 K_2HPO_4 0,5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g; NaCl 0,5g;
 Sulfato de ferro 0,01g; solução de elementos
 traços HO-LE** 1mL

Para a preparação do ágar, em todos os meios são adicionados 1,5% de ágar bacteriológico. Todos os meios são autoclavados por 15 min a 121 °C

* Solução traço de sais (para 100 mL de água destilada): Sulfato de Ferro II (0,1g); Cloreto de manganês (0,1g); Sulfato de zinco (0,1g).

** Solução de elementos traços HO-LE (para 1000 mL de água destilada): H_3BO_3 2,85g; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,8 g; Tartarato de sódio 1,77g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,36g; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,04g; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,027g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0,25; $ZnCl_2$ 0,020g.

3.9 Cultivo das actinobactérias endofíticas em meio líquido ISP-2 para a determinação do tempo ideal de cultivo para a produção de compostos bioativos.

As actinobactérias endofíticas foram cultivadas em meio líquido ISP-2 para a determinação do tempo ideal de produção do ionóforo poliéter grisorixina e dos macrolídeos concanamycin A, B e G produzidos por *Streptomyces* sp.RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31, respectivamente.

Para o cultivo de cada linhagem de actinobactéria em meio líquido foram utilizados 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 190 mL de ISP-2 autoclavados por 20 minutos. Uma alíquota de 10 mL do pré-inóculo foi transferida para cada Erlenmeyer. As culturas foram incubadas por um período total de 480h, a 200 rpm e 30°C, sendo que a cada intervalo de 48h, dois Erlenmeyers eram extraídos (denominados de A e B) por maceração em 100 mL de EtOH 95% em cada frasco por 48h. Previamente à adição de EtOH, o pH do meio foi aferido. Após as 48 horas, a suspensão hidroalcoólica foi mantida em ultrassom por 15 minutos. O micélio foi subsequentemente separado por filtração a vácuo. A porção hidroalcoólica foi rotaevaporada para a evaporação do etanol e a fase aquosa (200 mL) de cada Erlenmeyer foi submetido à partição líquido-líquido com 200 mL AcOEt e *n*-BuOH separadamente (volume dividido em três procedimentos). A evaporação dos solventes orgânicos forneceu as frações em AcOEt (FAL) e *n*-BuOH (FBL) para as duas actinobactérias. Experimentos controle, sem adição das actinobactérias, foram realizados para se obter extratos do meio de cultura apenas, para posterior

comparação com as frações oriundas das culturas microbianas. A Figura 11 esquematiza o experimento realizado.

Posteriormente, as frações acetato de etila das actinobactérias foram analisadas por espectrometria de massas onde os compostos de interesse foram monitorados pelo modo SIM (monitoramento seletivo de íons) e quantificados através da área do pico obtida. Verificou-se, dessa forma, o melhor tempo de produção dos compostos bioativos produzidos por essas actinobactérias.

Figura 11 - Esquema do cultivo das actinobactérias *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp RTd 31 para a determinação do tempo ideal de cultivo para a produção de compostos bioativos.

As frações acetato de etila foram solubilizadas em 1 mL de metanol (MeOH) grau HPLC. Posteriormente, 100 µL dessas soluções foram transferidos para microtubos do tipo eppendorf previamente pesados e secos em *speed vac*. Após a secagem, as amostras foram pesadas e dissolvidas em MeOH a fim de se obter uma concentração de 1 mg/mL (Sol. A). Posteriormente, todas as Sol. A foram diluídas em MeOH para se obter uma concentração final de 10 µg/mL para a injeção no espectrômetro de massas. O íon selecionado para o monitoramento da grisorixina foi o m/z 731 $[M+Na]^+$ e os íons selecionados para o monitoramento das concanamicina A, B e anidro-algicona das concanamicina A e B (concanamicina G) foram m/z 888 $[M+Na]^+$, m/z 874 $[M+Na]^+$ e m/z 683 $[M+Na]^+$ e m/z 697 $[M+Na]^+$, respectivamente. Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas foram:

voltagem do capilar: 3.2 kV; voltagem do cone: 40 V; temperatura da fonte: 150 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 500 L/h. Condições do UPLC - Fluxo de 0,4 mL/min - coluna ACQUITY UPLC BEH C8 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm). A temperatura do forno da coluna foi de 50 °C. Bomba A - H₂O contendo 10 mM acetato de amônio, bomba B - MeOH. As condições de eluição para o monitoramento da produção da grisorixina foram: 0-5 min: 65% -97% MeOH; 5-8 min: 97% MeOH; 8-9min: 97%-65% MeOH; 9-13 min: 65% MeOH. As condições de eluição para o monitoramento da produção das concanamicinas foram: 0-5 min: 55% -97% MeOH; 5-7 min: 97% MeOH; 7-8 min: 97%-55% MeOH; 9-12 min: 55% MeOH

3.10 Experimentos de eliciação: *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31 X *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Para a realização dos experimentos de eliciação foi escolhida a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 6538 e a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* ATCC 9027 como eliciadores. Foram realizados dois experimentos de eliciação. Em um experimento adicionou-se ao mesmo tempo no meio fermentativo os eliciadores (bactérias patogênicas) e as actinobactérias (tempo zero) e em outro experimento adicionou-se os eliciadores no momento em que as actinobactérias se encontravam na fase estacionária. Para a realização do segundo experimento foi necessário determinar o momento em que as actinobactérias entravam na fase estacionária. Foram realizados experimentos de curva de crescimento e consumo de glicose, conforme descrito no item 3.10.1.

3.10.1 Crescimento, consumo de glicose e pH

Primeiramente foi obtido um pré-inóculo de cada actinobactéria, da mesma maneira descrita no item 3.7. Foram transferidos 5 mL do pré-inóculo para 20 Erlenmeyers de 500 mL contendo 95 mL meio líquido ISP-2 (5% v/v) – meio fermentativo – que foi mantido em incubação por 240h (200 rpm e 30 °C). Cinco alíquotas de 5 mL do pré-inóculo foram filtradas à vácuo utilizando papéis de filtro previamente pesados. Os papéis de filtro contendo o micélio foram colocados em

estufa aquecida a 80 °C e deixados secar até peso constante, para posterior determinação da quantidade de micélio adicionada em cada Erlenmeyer, do meio fermentativo, através do peso seco. A determinação do crescimento de cada actinobactéria foi realizada em duplicata por um período de 168h. A cada intervalo de 24 h foram retirados dois Erlenmeyers da mesa agitadora. A massa micelial contida em cada Erlenmeyer foi filtrada a vácuo separadamente em papéis de filtro previamente pesados e secos em estufa até peso constante para a determinação do peso seco. Posteriormente, foi medido o pH do meio fermentativo (fitas de pH 0-14 - Marcherey Nagel) e também realizado o teste do fenol-sulfúrico, descrito por Dubois (1956), para a determinação de açúcares totais no meio. Método do fenol-sulfúrico: 0,5 mL do meio fermentativo foram transferidos para tubos de ensaio de vidro e adicionados 0,5 mL de solução de fenol 5%, a solução foi agitada levemente. Em seguida foram adicionados lentamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após esse processo, a amostra foi deixada em repouso por 15 minutos e feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 485 nm. Para a determinação da quantidade de açúcares totais, foi feita uma curva de calibração no qual foram preparadas 10 soluções de glicose nas concentrações de 10 a 100 µg/mL, essas soluções também foram preparadas pelo método do fenol-sulfúrico e analisadas no espectrofotômetro e determinada a equação da reta.

3.10.2 Protocolo do experimento de eliciação

As bactérias patogênicas, estocadas em glicerol 20% à -80 °C foram reativadas em caldo Mueller-Hinton por 24h. Após crescimento, elas foram estriadas em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e deixadas crescer por 24h. Após crescimento, uma alçada de cada bactéria foi retirada e adicionada em salina (NaCl 0,9%) e a turbidez ajustada segundo a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e densidade ótica em 600 nm (0,08 - 0,1), segundo as normas do CLSI. Após ajustada a concentração, 1 mL de cada inóculo bacteriano foi adicionado em 9 mL de meio líquido ISP-2, previamente autoclavado em tubo falcon (diluição 1/10). Dessa forma, a concentração passou para $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Após essa preparação foram adicionados, separadamente, 2,5 mL de cada inóculo bacteriano nos Erlenmeyers contendo a actinobactéria *Streptomyces* sp.RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd31 no tempo zero (t_0) (simultaneamente) e na fase estacionária (fe). As actinobactérias,

juntamente com os eliciadores, foram mantidas em incubação a 200 rpm, 30 °C por 168h. A Figura 12 ilustra o experimento realizado. Esses experimentos foram realizados de acordo como descrito por Luti e Mavituna (2011), com algumas modificações.

Figura 12 - Esquema do preparo do inóculo bacteriano para o experimento de eliciação.

Posteriormente, após o período de 168h de incubação, as bactérias foram centrifugadas a 8000 g por 10 min. Na sequência, o sobrenadante foi submetido a partição com solventes orgânicos (acetato de etila e *n*-butanol). As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas para análise do perfil metabólico.

3.11 Análise do perfil de fragmentação da grisorixina com complexo de cobre.

Foi aplicada a mesma metodologia de Lopes e colaboradores (2004) para avaliar a diferença no perfil de fragmentação do ionóforo poliéter grisorixina com complexo de cobre. Sais de cobre foram adicionados a subfração 22-FAL-5, que contém esse composto, e dissolvidos em MeOH:H₂O (7:3, 1 mg/mL). A subfração foi submetida à análise por espectrometria de massas no equipamento ACQUITY-UPLC para observar o perfil de fragmentação por espectrometria de massas.

3.12 Experimento do íon precursor para a identificação das concanamicinas produzidas pela actinobactéria *Streptomyces* sp. RT31

Foi realizado um experimento de íon precursor para buscar na fração acetato de etila oriunda do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31 em meio líquido ISP-2 (31-FAL) todas as concanamicinas que estavam sendo produzidas por essa actinobactéria. Esse experimento foi realizado por espectrometria de massas, através da análise em UPLC-MS, no qual foram buscados os íons pais (precursores) do m/z 501 e m/z 515. Os parâmetros de operação do espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar: 3.2 kV; voltagem do cone: 40 V; temperatura da 13 fonte: 150 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 500 L/h.

Condições do UPLC - Fluxo de 0,4 mL/min - coluna ACQUITY UPLC BEH C8 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm). A temperatura do forno da coluna foi de 50 °C. Bomba A: H₂O contendo 10 mM acetato de amônio, bomba B: MeOH. As condições de eluição foram: 0-3 min: 30% -97% MeOH; 3-5 min: 97% MeOH; 5-6min: 97%-70% MeOH; 6-10 min: 70% MeOH

3.13 Experimentos de biologia molecular

Os experimentos de biologia molecular foram realizados no Departamento de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob orientação da Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira. As linhagens e os reagentes utilizados foram:

- *Escherichia coli* DH10B: usada para clonagem de rotina.
- *E. coli* ET12567/ pUZ 8002 com metilação triplamente deficiente (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsdM*⁻) foi usada como uma linhagem doadora para conjugação em *Streptomyces* sp. (MACNEIL et al., 1992).
- Actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. RTd22 foi usada como uma linhagem produtora de grisorixina.
- O DNA plasmidial foi isolado a partir de uma cultura *overnight* (2 mL), usando o Plasmid Mini Kit da Axygen, seguindo as instruções do fabricante.
- Os fragmentos de DNA e produtos de PCR foram purificados do gel de agarose utilizando o kit da Invitex de acordo com as normas do fabricante. Para a

purificação de produtos de PCR também foi utilizado o co-precipitante Pellet Paint (Novagen).

- Todas as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB líquido ou sólido com antibiótico apropriado. As culturas foram incubadas a 37 °C e 250 rpm no caso de culturas líquidas.
- Para conjugação e purificação do DNA genômico, *Streptomyces* sp. RTd22 foi cultivada em 5 mL meio líquido TSBY a 30 °C, 250 rpm em Erlenmeyers de 25 mL contendo mola.
- Os antibióticos usados para os experimentos de recombinação homóloga foram: canamicina, apramicina, cloranfenicol, ampicilina e ácido nalidixico. Todos foram obtidos da Sigma-Aldrich. As soluções de antibióticos foram esterilizadas utilizando filtro de 0,22 µm, estocadas a -20 °C e usadas nas concentrações mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Solução estoque de antibióticos

Antibiótico	Classe Química	Solvente	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração de trabalho (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	β-lactâmico	H ₂ O	100	100
Apramicina (Apr)	aminoglicosídeo	H ₂ O	50	50
Cloranfenicol (Cln)	anfenicóis	EtOH	25	25
Canamicina (Cam)	aminoglicosídeo	H ₂ O	50	50
Ácido Nalidíxico (Nal)	quinolona	0,15M NaOH	25	25

3.13.1 Meios de cultura utilizados

Meio 2TY

Triptona	16 g
Extrato de levedura	10 g
NaCl	5 g
Água Milli-Q	1 L, pH 7.0
Agar bacteriológico	20 g/L

Meio LB

Tryptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Água Milli-Q	1 L, pH 7.0
Agar bacteriológico	20 g/L

Meio TSBY

TSB (Caldo triptona de soja)	30 g
Sacarose	103 g
Extrato de levedura	5 g
Água Milli-Q	1 L

Meio SFM*

Farinha de soja	20 g
D-Manitol	20 g
Água destilada	1 L
Agar bacteriológico	20 g/L
MgCl ₂	10 ml/L de solução 1M MgCl ₂ (10mM concentração final)

* A farinha de soja foi misturada com a água destilada e autoclavada duas vezes (121 °C, 1 atm), em seguida o manitol foi dissolvido no sobrenadante, adicionado o ágar e autoclavado novamente.

3.13.2 Vetor

O vetor utilizado no experimento de recombinação homóloga está presentes na Tabela 6.

Tabela 6 - Vetor utilizado no trabalho

Vetor	Genes marcação	Aplicação	Fonte
pYH7	<i>tsr, bla, aac(3)IV, cos, oriT</i> , <i>P_{T3}, P_{T7}, rep_{pIJ101}, ori_{ColEI}</i>	Nocaut de gene	(HARVEY et al., 2007 e SUN et al., 2009)

3.13.3 Plasmídeo

O plasmídeo obtido no experimento de recombinação homóloga está presente na Tabela 7.

Tabela 7 - Plasmídeo criado no trabalho

Nome do Plasmídeo	Descrição	Vetor Pai
pLV Δ <i>griCI</i>	Região homologia para a direita e esquerda do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina <i>nigCI</i>	pYH7

3.13.4 Oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Exxtend- Solução em Oligos. A Tabela 8 mostra os oligonucleotídeos sintetizados.

Tabela 8 - Oligonucleotídeos sintéticos utilizados no trabalho

Nome	Sequência (direção 5'- 3')
1- Primer_conf_F	CCAGAACCTCGCTCGGATGGTCCAGG
2- Primer_conf_R	CATGCCGACGAGCGCGATCGGATCC
3- Primer_FMNO_FI	TGATCAAGGCGAATACTTCATATGTCGTCGCCATCGACCTGGACGTAC
4- Primer_FMNO_RI	CACGTCGCACACCAGCAGTTCGTCGACGATACGGGC
5- Primer_FMNO_FII	GACGAACTGCTGGTGTGCGACGTGGTGACCGATGTG
6- Primer_FMNO_RII	CCGCGCGGTTCGATCCCCGCATATGAGCCGTCGAACAGGAACACCGTCC

3.13.5 Células de *E. coli* quimicamente competentes: preparação e transformação

Foi realizada a preparação de células quimicamente competentes de *E.coli* para a posterior incorporação de DNA plasmidial. As células de *E. coli* DH10B não apresentam resistência a antibióticos. As células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 apresentam resistência a canamicina (Can) e cloranfenicol (Cln) (KIESER et al., 2000).

Células de *E. coli* DH10B preservadas em glicerol 20% no freezer -80 °C foram estriadas em placas de Petri contendo meio sólido de LB e mantidas em estufa a 37 °C por 16h. Após o crescimento, foi feito um pré-inóculo no qual uma colônia isolada foi transferida para tubo falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio líquido LB e incubados por 16h, 200 rpm a 37 °C. Após esse período, 1 mL dessa cultura foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido LB e mantidos a 37 °C e 250 rpm até atingir OD 600 de 0,3 - 0,6. Posteriormente, a

cultura foi transferida para falcon de 50 mL e centrifugada a 3000 rpm, 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi cuidadosamente ressuspense em 50 mL de tampão A gelado (tampão A: 50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, pH 6,2) e mantido no gelo por 1 hora. Em seguida, o tubo falcon foi centrifugado a 3500 rpm, 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspense cuidadosamente em 3 mL de tampão B (tampão B: 50 mM CaCl₂, 10 mM CH₃CO₂K, 20% glicerol, pH 6,2) e aliqotado 100 µL em eppendorf de 1,5 mL previamente resfriado em gelo seco. Os tubos eppendorf foram estocados em freezer -80 °C.

Para transformar as células com DNA plasmidial, um eppendorf de células quimicamente competentes estocadas no freezer -80 °C foi descongelado, adicionado 1 µL do vetor (plasmídeo) e deixado no gelo por 30 min. Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 55 s, e imediatamente colocadas no gelo por pelo menos 2 min. Na sequência, foram adicionados 500 µL de meio líquido LB e as culturas foram incubadas a 250 rpm, 37 °C por 1 hora. Em seguida, foram aliqotados 100-300 µL em placas de Petri contendo meio sólido LB com antibiótico correspondente ao gene de resistência plasmidial. As células foram espalhadas com auxílio de alça de Drigalski, deixadas secar em fluxo laminar e colocadas em estufa a 37 °C por 16h.

3.13.6 Conjugação

O protocolo de conjugação foi seguido como descrito por Kieser e colaboradores (2000). O plasmídeo de deleção foi introduzido em *Streptomyces* sp. RTd22 por conjugação usando *E. coli* ET12567/pUZ8002 como uma linhagem hospedeira doadora. *Streptomyces* sp. RTd 22 foi cultivada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido TSBY a 37 °C, 200 rpm por 48h. Posteriormente, o cultivo foi transferido para tubos falcon de 50 mL e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min. As células foram posteriormente lavadas com 20 mL de 2TY, centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado. A linhagem de *E. coli* ET12567/pUZ8002 foi transformada com o plasmídeo de deleção e colocada pra crescer em tubo falcon de 50 mL contendo 5 mL de 2TY com Amp, Apr, Cln e Can a 37 °C, 200 rpm por 20 horas. Em seguida, 500 µL foram inoculados em tubo falcon de 50 mL com 10 mL de 2TY contendo metade da concentração de Apr, Amp, Cln e

Can e mantidas a 37 °C e 200 rpm até atingir OD600 0,4 - 0,6. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e lavadas duas vezes com 20 mL de 2TY. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de 2TY. O micélio da *Streptomyces* sp. RTd22 (200 µL) e a suspensão de *E.coli* ET12567/pUz 8002 contendo o plasmídeo recombinante (200 µL) foram misturados e 200 µL da mistura foram estriadas com auxílio de alça de Drigalski em placas de SFM, deixadas secar e colocadas em estufa a 30 °C por 20h. Após esse período, foi adicionado 1 mL de solução de antibiótico nas placas – em 10 mL de água foram dissolvidos 20 µL de apramicina (50 mg/ mL) e 200 µL de ácido nalidixico (25 mg/mL). As placas foram mantidas na estufa a 30 °C até o aparecimento de colônias.

Quando exconjugantes resistentes a Apr apareceram, as colônias foram transferidas para placas de SFM contendo 50 µg/ mL de Apr e 25 µg/mL de Nal para confirmar resistência ao antibiótico. As células que cresceram foram repicadas em placas de SFM livres de antibióticos para permitir a perda do plasmídeo de mutação através de recombinação homóloga.

Para rastrear mutantes em que ocorreu duplo *crossover*, colônias isoladas a partir desta placa foram estriadas em placas de SFM sem e com apramicina, respectivamente. Colônias candidatas com o fenótipo correto foram confirmadas como mutantes por PCR.

3.14 Métodos de biologia molecular

3.14.1 Isolamento de DNA

O isolamento do DNA genômico de alto peso molecular da actinobactéria foi feito segundo o protocolo descrito por Sharma e Singh (2005).

A actinobactéria foi reativada em Erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL de meio líquido ISP-2 e incubada para crescimento por 48h a 200 rpm e 30 °C. Após esse período 2 mL da cultura microbiana foram transferidos para tubos Eppendorfs de 2mL e centrifugados a 5000g por 5 min a 37 °C. O pellet foi resuspenso em 200 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Posteriormente, foram adicionados 400 µL de Solução I, a solução resultante foi homogeneizada e mantida

a 37 °C por 10 min. Após esse período, foi adicionado o mesmo volume de PCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico - 25:24:1 saturado com 10 mM Tris, pH 8,0 e 1mM EDTA - Sigma-Aldrich) e misturou-se por inversão. Posteriormente, o tubo foi centrifugado a 10000 g por 5 min a 37 °C. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo, adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio e 0,6 volume de isopropanol e misturou-se seis vezes por inversão. Novamente o tubo foi centrifugado a 10000 g por 5 min a 37 °C. O DNA foi precipitado na forma de um pellet. O pellet foi lavado com 1 mL etanol 70 % e centrifugado a 10000 g por 3 min a 37 °C. O sobrenadante foi removido e o pellet seco a temperatura ambiente. Após a secagem o DNA foi resuspendido em 20 µL de água Milli-Q autoclavada.

3.14.2. Reação de Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram feitas no termociclador Téchné, modelo TC-512. A reação de PCR, mostrada na Tabela 9, foi usada para amplificação dos fragmentos usados na construção do plasmídeo de deleção.

Tabela 9 - Reação de PCR

Reagentes	Volumes
Amostra de DNA	2 µL
Água Milli-Q	13 µL
Primer F*	2,5 µL
Primer R*	2,5 µL
DMSO	5 µL
2X Phusion Master Mix	25 µL

Condições:

Número de ciclos: 25

Desnaturação inicial: 98 °C - 30 s

Desnaturação: 98 °C - 10 s

Anelamento: 72 - 64,8 °C (intervalo de 0,3 °C) - 30 s**

Extensão: 72 °C - 1 min

Extensão final: 72 °C - 5 min

4 °C - ∞

* Primers da Tabela 8 usados para a amplificação das regiões que flanqueiam o gene análogo a flavina mono-oxigenase (*nigC1*) foram 3, 4, 5 e 6. Para a confirmação da possível mutação foram usados os primers 1 e 2.

3.14.3 Gel de eletroforese de DNA

Foi preparado gel de agarose (Invitrogen) 0,7% em tampão TBE (Tris-borato-EDTA - Sigma Aldrich) contendo 3 μ L de SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies) como revelador. Como marcador de peso molecular foi usado o GeneRuler™ High 1kb DNA Ladder (Fermentas). O 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific) foi adicionado às amostras de DNA, as quais foram acondicionadas nas canaletas do gel de agarose. Foi utilizada a fonte - Holfer modelo PS-300B, com voltagem de 110 V por 60 min e cuba horizontal Apelex modelo Midigel 2. A leitura do gel foi feita no equipamento MinBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems) em câmera de UV (254 nm) e fotografada com UVP câmera.

3.14.4 Ligação de três fragmentos de gene usando método isotérmico

Para ligar os fragmentos correspondentes as regiões direita e esquerda que flanqueiam o gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina (*nigCI*) ao vetor suicida pYH7, foi usado o método de montagem isotérmica descrito por Gibson (GIBSON et al., 2009).

Os fragmentos foram amplificados por PCR e purificados por gel (concentração final ajustada para 0,1 pmol), o vetor pYH7 foi digerido com a endonuclease Fast Digest *NdeI* (Thermo Scientific), desfosforilado com fosfatase alcalina bacteriana (BAP) e purificado por gel (a concentração final foi ajustada para 0,02 pmol). Um volume de 6 μ L de fragmentos (3 μ L do vetor + 3 μ L dos fragmentos amplificados), 4 μ L de água Milli-Q e 10 μ L do Gibson Assembly Master Mix foram misturados. A mistura foi incubada a 50°C por 60 min. Posteriormente, 10 μ L da montagem foram usados para a transformação em células de *E.coli* DH10B quimicamente competentes.

3.14.5 PCR de Colônia

PCR de colônia é um método de alto rendimento conveniente para determinar a presença ou ausência da inserção de DNA em construções de plasmídeos. Uma pequena quantidade dos transformantes individuais foi transferida

para 3,5 μL água e colocados no freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Este passo de resfriamento provoca a libertação do DNA do plasmídeo, de modo que pode servir como molde para a reação de amplificação. Em seguida, em cada tubo de PCR foram adicionados 6,5 μL da mistura contendo 0,5 μL do primer FMNO_FI; 0,5 μL de primer FMNO_RI; 0,5 μL de DMSO e 5 μL de 2X Phusion Master Mix. Os parâmetros para a reação de PCR foram os mesmo descritos no item 3.14.2. Terminada a reação de PCR foi feito gel de eletroforese de todas as amostras para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados.

3.14.6. Digestão com enzimas de restrição

Simples ou dupla digestão foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante. Para as reações realizadas, foram utilizadas 1 μL de enzimas *fast digest* da Thermo Scientific, 1-2 μL do 10X *fast digest buffer* amostra, 1-2 μg DNA e para 20 μL . A reação é incubada a 37°C de acordo com o tempo requerido por cada enzima.

3.15 Métodos de bioinformática

Informações sobre a sequência de DNA, alinhamento e visualização de múltiplas e os desenhos de primers foram feitos usando o programa Geneious v5.4.6. A pesquisa em banco de dados foi feita utilizando o algoritmo BLAST.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade biológica das frações

As frações obtidas dos cultivos das actinobactérias em meio sólido de arroz e em meio líquido ISP-2 (Tabela 3) foram submetidas ao ensaio citotóxico em células tumorais e aos ensaio antibacterianos. As frações com melhores atividades biológicas foram selecionadas para estudo químico e identificação dos compostos bioativos. Os resultados dos ensaios biológicos estão presentes nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Percentual de inibição da proliferação de células tumorais das frações frente a quatro linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.

Frações	Linhagens celulares			
	HCT-8	MDA-MB435	SF-295	HL-60
22 – FHS	MA (100%)	MA (100%)	MA (97,68%)	MA (100%)
22 – FAS	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)
22 – FBS	MA (81,36%)	Mo (71,07%)	MA (80,43%)	MA (99,31%)
22 – FAL	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)
22 – FBL	MA (79,03%)	Mo (68,99%)	MA (83,29%)	MA (94,20%)
31 – FHS	MA (96,95%)	MA (94,59%)	MA (100%)	MA (100%)
31 – FAS	MA (84,34%)	MA (77,83%)	Mo (71,21%)	MA (100%)
31 – FBS	MA (100%)	MA (97,24%)	MA (93,42%)	MA (100%)
31 – FAL	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)
31 – FBL	PA (26,22%)	PA (3,05%)	PA (29,38%)	PA (49,51%)
Doxorrubicina	MA (96,94%)	MA (97,30%)	MA (87,67%)	MA (95,75%)

Linhagens celulares: HCT-8 (cólon-humano); MDA-MB435 (melanoma-humano); SF-295 (glioblastoma-humano); HL-60 (leucemia-humana). (PA): pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%); (Mo): atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%); (MA): muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Tabela 11 - Atividade antibacteriana das frações oriundas dos cultivos em meio sólido de arroz e do meio líquido ISP-2 das actinobactérias *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd 31.

Frações	Atividade antibacteriana (µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)		<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
22 – FHS	1,562	3,125	3,125	200
22 – FAS	1,562	50	3,125	>400
22 – FBS	12,5	>400	12,5	>400
22 – FAL	0,195	100	1,562	>400
22 – FBL	400	>400	>400	>400
31 – FHS	400	>400	>400	>400
31 – FAS	400	400	>400	>400
31 – FBS	200	>400	100	200
31 – FAL	200	>400	>400	>400
31 – FBL	>400	>400	>400	>400
Penicilina G	0,0115	0,0115	1,475	1,475

CIM: concentração inibitória mínima, **CBM:** concentração bactericida mínima

Os resultados dos ensaios citotóxicos revelaram que a maioria das frações das duas actinobactérias apresentaram grande potencial citotóxico frente a células tumorais, uma vez que as atividades inibitórias foram de 75 a 100%. A fração menos ativa foi a fração butanólica do cultivo em meio líquido ISP-2 da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31 (31-FBL). O ensaio antibacteriano evidenciou que a fração hexânica (FHS) e as frações acetato de etila do meio de arroz (FAS) e do meio líquido ISP-2 (FAL) da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foram muito ativas, apresentando valores de CIM muito baixos. Essas frações com alta atividade também foram testadas em bactérias resistentes a antibióticos (Tabela 12). A fração butanólica dessa mesma actinobactéria e todas as frações da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 foram menos ativas no ensaio antibacteriano.

Os controles obtidos de cada meio de cultivo (brancos), foram inativos no ensaio citotóxico (todos apresentaram pouca atividade - 1 a 50%) e no ensaio antibacteriano (CIM e CBM > 400 µg/mL), evidenciado que as atividades observadas estão relacionadas aos compostos produzidos pelas actinobactérias endofíticas.

Todas as amostras acima não apresentaram atividade antibacteriana, nas concentrações testadas, para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, possivelmente devido ao fato dessas bactérias apresentarem uma membrana externa e uma membrana interna

que delimita um espaço periplasmático. A membrana externa desempenha um papel crucial de proteção para esse micro-organismo, funcionando como uma barreira seletiva. As propriedades de permeabilidade desta barreira têm um impacto significativo sobre a susceptibilidade dessas bactérias aos antibióticos (DELCOUR, 2009). Todas as CIM apresentaram valores acima de 400 µg/mL. Esses resultados confirmam as atividades das frações, das duas actinobactérias, apenas contra bactérias gram-positivas. Portanto, os demais ensaios antibacterianos foram direcionados para bactérias gram-positivas.

Tabela 12 - Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL) das frações da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e dos antibióticos comerciais

Bactérias gram-positivas	FHS	FAS	FAL	Van	Dap	Oxa
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,39	3,125	0,39	1,00	1,00	-
<i>S. aureus</i> Mu50 ATCC 700699	0,781	6,25	0,781	4,00	1,50	>256
<i>S. aureus</i> SA16	1,562	6,25	1,562	2,00	0,5	>256
<i>E. faecium</i> VRE 16	0,781	6,25	0,781	-	3,00	>256

Van: vancomicina, Dap: daptomicina, Oxa: oxacilina.

Os resultados da Tabela 12 evidenciam que a fração hexânica (FHS) e as frações acetato de etila (FAS e FAL) da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foram muito ativas também para as bactérias resistentes. A concentração bactericida mínima (CBM) foi a mesma que a CIM para a maioria dos extratos, exceto para a fração FAS que apresentou CIM de 12,5 µg/mL para *S. aureus* SA16.

A partir desses resultados as frações acetato de etila do meio sólido de arroz e do meio líquido ISP-2 de ambas as actinobactérias foram selecionadas para o estudo químico.

4.2 Estudo químico das frações da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31

4.2.1 Fração acetato de etila do meio sólido de arroz (31-FAS)

A fração acetato de etila do meio sólido de arroz (31-FAS) apresentou manchas na placa de CCDA que revelaram no UV em λ 254 nm e também na

vanilina sulfúrica. Essa fração foi fracionada como descrito no item 3.7.1. A subfração 31-FAS-2 foi escolhida para fracionamento por conter esses compostos com absorção no UV. Os compostos presentes na subfração 31-FAS-2.4 foram posteriormente purificados por HPLC, sendo isolados dois compostos **S31-1** e **S31-2** como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Purificação da fração 31-FAS-2.4 por HPLC. Cromatógrafo analítico binário da Shimadzu (modelo: LC-10 AVP - controlador, LC-6 AD – bomba, com detector: DAD modelo SPD-M10AVP). Coluna semi-preparativa com pré-coluna modelo Nucleosil 120-5 C18 (10 x 250, 5 μ m), com uma fluxo de 3 mL/min e eluição isocrática ACN:H₂O (8:2), tempo de corrida de 15 minutos). Espectro de absorção no UV das duas bandas cromatográficas.

Os compostos isolados apresentam o mesmo espectro de absorção no ultravioleta o que sugere que sejam compostos análogos. Ambos foram submetidos às análises de RMN uni e bidimensionais e análise por espectrometria de massas para identificação estrutural. As análises podem ser observadas na Figuras 14-23.

Figura 14 - Espectro de RMN de ¹H do composto S31-1 (CDCl₃, 500 MHz)

Figura 15 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **S31-1** (CDCl_3 , 500

Figura 18 - Espectro de HMBC do composto **S31-1** (CDCl_3 , 11,7 T)

Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H do composto **S31-2** (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 20. Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 500 MHz)

Figura 22 - Espectro de HMQC do composto S31-2 (CDCl₃, 11,7 T)

Figura 23 - Espectro de HMBC do composto **S31-2** (CDCl₃, 11,7 T)

Através das análises por RMN pode-se observar que ambos os compostos apresentam espectros muito parecidos e de alta complexidade. As correlações H→C no espectro de HMBC para o composto **S31-2** estão mais visíveis, pois este foi isolado em maior quantidade. No espectro de RMN de ^1H fica visível a presença de metilas na região de δ 0,8 - 1,0. Também é possível observar a presença de duas metoxilas em δ 3,2 e 3,5 e a presença de sinais de hidrogênios vinílicos em δ 5,2 - 6,5 no espectro de RMN de ^1H . Para auxiliar na elucidação estrutural esses compostos foram analisados por espectrometria de massas. As Figuras 24 e 25 mostram os espectros obtidos pela análise em alta resolução HR-ESI-MS.

Figura 24 - Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto **S31-1**.

Figura 25 - Espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-MS) do composto **S31-2**.

Nas análises por espectrometria de massas é possível verificar os íons m/z 874 e 890 para o primeiro composto e os íons m/z 888 e 904 para o segundo composto. A diferença entre os íons é de 16 u que corresponde a diferença de massa entre sódio e potássio. Dessa forma os íons m/z 874 e 888 estão cationizados com sódio e os íons m/z 890 e 904 estão cationizados com potássio. Portanto os compostos sem os adutos apresentam massa molecular de 865 e 851 u. Através dessas análises foi utilizado o banco de dados on-line Dictionary of Natural Products (DNP) (<http://dnp.chemnetbase.com>) para tentar identificar os compostos com essas massas e que são produzidos por espécies de *Streptomyces*. Dentre os vários compostos sugeridos pelo banco de dados, os antibióticos macrolídeos concanamicinas A e B apresentam bandas de absorção no ultravioleta no mesmo comprimento de onda observado para os compostos isolados ($\lambda_{\max}$ 240 e 280 nm). Os dados de RMN uni e bidimensionais foram comparados com a literatura (BINDSEIL & ZEECK, 1994) e dessa forma foi possível confirmar que o composto **S31-1** se trata da concanamicina B e o composto **S31-2** se trata da concanamicina A. Os dados dos deslocamentos químicos, multiplicidade e J comparados com a literatura podem ser observados na Tabela 13. Os dados de HR-ESI-MS permitiram determinar a fórmula molecular $C_{46}H_{75}NO_{14}Na^+$ m/z 888,5080 (calculado para

$C_{46}H_{75}NO_{14}Na$ 888,5085) e $C_{46}H_{75}NO_{14}K^+$ m/z 904,4825 (calculado para $C_{46}H_{75}NO_{14}K$ 904,4819) para concanamicina A e $C_{45}H_{73}NO_{14}Na^+$ m/z 874,4923 (calculado para $C_{45}H_{73}NO_{14}Na$ 874,4929) e $C_{45}H_{73}NO_{14}K^+$ m/z 890,4680 (calculado para $C_{45}H_{73}NO_{14}K$ 890, 4663) para concanamicina B.

Tabela 13 - Dados de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) e RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) do composto **S31-2** em comparação com dados da literatura da concanamicina A (BINDSEIL & ZEECK, 1994).

Composto S31-2 (500 MHz, $CDCl_3$)			Concanamicina A - Literatura	
Posição	δ^1H (J = Hz)	$\delta^{13}C^{\#}$	δ^1H (J = Hz) (500 MHz, CD_2Cl_2)	$\delta^{13}C$ (125,3 MHz, CD_2Cl_2/CD_3OD , 2:1)
1	-	-	-	167,5
2	-	142,0	-	142,2
2-OCH ₃	3,57 s	59,1	3,50 s	59,7
3	6,39 s	130,4	6,40 s	132,3
4	-	-	-	132,2
4-CH ₃	1,99 s	14,1	1,96 s	14,4
5	5,70 m	139,7	5,66 d (9,5)	142,3
6	2,74 m	34,5	2,69 ddq (9,5; 7,2)	35,8
6-CH ₃	1,06	16,6	0,99 d (7,0)	17,2
7	3,78 dd (10,8; 4,6)	74,3	3,78 dd (10,0 e 2,0)	73,8
8	1,50 *	43,4	1,46 m	44,6
8-CH ₂	1,25 m	29,5	1,24 m	23,1
8-CH ₃	0,87 m	11,6	0,81 t (7,0)	12,2
9	3,23 m	79,7	3,17 dd (10,0 e 1,5)	80,1
10	2,20 m	36,4	2,27 m	35,9
10-CH ₃	1,06	21,4	1,03 d (6,5)	22,3
11	1,97	44,8	1,9-2,0(m)-obscuro	46,5
12	-	-	-	143,9
12-CH ₃	1,86 s	16,0	1,86 s	16,5
13	5,8 m	123,1	5,77 d (11,0)	123,5
14	6,56 dd (14,6; 10,8)	133,2	6,59 dd (15,0; 11,0)	135,0
15	5,23 dd (14,6; 9,2)	127,5	5,16 dd (15,0; 9,0)	127,1
16	3,86 t (9,0)	81,3	3,85 t (9,0)	82,5
16-OCH ₃	3,26 s	55,6	3,23 s	56,1
17	5,03 dl (7,4)	75,6	4,93 dd (9,0; 0,5)	76,0
18	2,18 m	36,7	2,09 ddd (10,0; 7,0; 0,5)	37,8
18-CH ₃	0,83 d (7,0)	9,2	0,77 d (7,0)	9,6
19	4,04 dl (9,1)	70,2	3,97 ddd (10,0; 4,0; 1,5)	70,9
19-OH	4,64	-	4,64	-
20	1,77 d (7,0)	41,5	1,74 dd (7,0; 1,5)	42,0
20-CH ₃	1,06	6,9	0,99 d (7,0)	7,2
21	-	99,5	5,62 d (1,5)	100,5
22	2,32 dd (12,0; 5,0)	39,9	2,28 dd (12,0; 5,0)	39,9
	1,14 m		1,09 m (12,0; 12,0; 1,5)	
23	3,73 m	76,0	3,71 ddd (12,0; 12,0 e 5,0)	76,2
24	1,27 m	41,3	1,20 ddd (12,0; 10,0; 7,0)	42,3
24-CH ₃	0,90 d (6,5)	13,2	0,82 d (7,0)	13,7
25	3,98 dd (9,5 e 8,0)	75,5	4,92 dd (10,0 e 8,0)	76,7
26	5,31 ddq (15,2; 8,0; 1,1)	131,5	5,25 ddq (15,0; 8,0; 1,0)	131,5
27	5,56 dq (15,2; 6,5)	127,6	5,54 dq (15,0; 6,0)	128,9
28-CH ₃	1,58 *	17,6	1,56 dd (6,0; 1,0)	18,1
1'	4,56 dd (9,6; 1,2)	96,5	4,55 dd (10,0; 1,0)	97,1
2'	2,17 m	40,1	2,10 m obsc.	40,5
	1,67 m		1,55(ddd, 12,0; 12,0; 10,0)	
3'	3,72 m	70,6	3,74 m	69,8
4'	4,28 t (9,0)	80,1	4,20 t (9,0)	79,0
CONH ₂	4,75 s	157,6	4,83/5,08(2)s	159,0
5'	3,37 dq (9,4; 6,2)	69,5	3,65 dq (9,0; 6,0)	70,8
6'	1,25m	17,6	1,20 d (6,0)	17,8

[#] deslocamentos químicos de ^{13}C atribuídos com base nos espectros de HMQC e HMBC. * Sinal embaixo do sinal da água do $CDCl_3$ – atribuído com base no HMQC e HMBC. (-) Não observado

A Figura 26 mostra as estruturas químicas das concanamicinas com os dados de RMN obtidos.

Figura 26 - Estrutura do composto **S31-1** (concanamicina B) e do composto **S31-2** (concanamicina A) com dados de RMN obtidos (as configurações relativas foram baseadas na literatura (WESTLEY et al., 1984)).

A concanamicina A difere da concanamicina B apenas na posição 8, na qual ao invés de apresentar um grupo etila ligado ao C8, apresenta apenas uma metila. Os demais deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio se mantêm iguais aos da concanamicina A.

As concanamicinas são lactonas macrocíclicas de 18-membros com uma longa cadeia com um anel hemicetálico de 6 membros com 2-desoxi- β -D-raminosil como grupo substituinte (KINASHI et al., 1984). Os íons referentes às concanamicinas A e B foram submetidos à fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão), como pode ser observado nas Figuras 27 e 28.

Figura 27 - Espectro de íons produtos da concanamicina A por CID m/z 888 $[M + Na]^+$ (energia de colisão 60 eV)

Figura 28 - Espectro de íons produtos da concanamicina B por CID m/z 874 $[M + Na]^+$ (energia de colisão 60 eV)

Através do espectro de fragmentação por CID foi possível fazer uma proposta de fragmentação para essas concanamicanas, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - Proposta de fragmentação das concanamicanas A e B

O mecanismo de fragmentação envolvido nesta reação é do tipo *charge remote*, no qual ocorre a clivagem de uma ligação covalente não adjacente ao local da carga (GROSS, 2000). Através de um mecanismo concertado, houve a quebra da ligação carbono-carbono (C19-C20) e eliminação de uma molécula neutra de m/z 373 ($C_{18}H_{31}NO_7$) formando o íon produto de m/z 501 $[M+Na]^+$ para a concanamicina A e o íon m/z 515 $[M+Na]^+$, mantendo assim o anel macrolactônico intacto. Estes dois íons produtos podem ser considerados íons diagnósticos desta classe de compostos, pois se tratam dos picos base nos espectros de íons produtos das concanamicinas A e B. Esse tipo de fragmentação também ocorre para os antibióticos macrolídeos bafilomicina, que são lactonas macrocíclicas de 16-membros (CREVELIN et al., 2013). Esses dados de fragmentação são de grande importância pois auxiliam no estudo de desreplicação para metabólitos secundários de micro-organismos como *Streptomyces*. Além disso, não há nenhuma proposta de fragmentação desses compostos na literatura.

4.2.2 Fração acetato de etila do meio líquido ISP-2 (31-FAL)

A fração acetato de etila oriunda do cultivo em meio líquido ISP-2 também apresentou manchas na placa de CCDA que revelaram no UV em λ 254 nm e também na vanilina sulfúrica e foi submetida ao fracionamento conforme descrito no item 3.7.2. As subfrações 31-FAL-3, 31-FAL-4, 31-FAL-5, 31-FAL-6 e 31-FAL-7 foram enviadas aos ensaios citotóxicos em células tumorais. A subfração 31-FAL-3 apresentou 100% de inibição do crescimento celular para três linhagens de células tumorais testadas (cólon, melanoma e glioblastoma), conforme pode ser observado na Tabela 14, portanto foi escolhida para o fracionamento. Deste fracionamento, foram isolados dois compostos em mistura, compostos **S31-3** e **S31-4**, presentes na subfração 31-FAL-3.3.3 e seu perfil foi analisado por HPLC como pode ser observado na Figura 30.

Tabela 14 - Percentual de inibição do crescimento celular das subfrações em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.

Frações	Linhagens celulares		
	HCT-8	MDA-MB435	SF295
RTd31-FAL-3	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)
RTd31-FAL-4	MA (81,04%)	MA (100%)	MA (100%)
RTd31-FAL-5	MA (100%)	MA (96,54%)	Mo (60,57%)
RTd31-FAL-6	MA (97,50%)	MA (93,18%)	Mo (61,88%)
RTd31-FAL-7	MA (95,82%)	MA (93,40%)	Mo (51,90%)
Doxorrubicina	MA (96,94%)	MA (97,30%)	MA (87,67%)

Linhagens celulares: HCT-8 (côlon humano); MDA-MB435 (melanoma humano); SF-295 (glioblastoma humano); (PA): pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%); (Mo): atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%); (MA): muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Figura 30 - Perfil da fração 31-FAL-3.3.3 por HPLC. Cromatógrafo analítico binário da Shimadzu (modelo: LC-10 AVP - controlador, LC-6 AD – bomba, com detector: DAD modelo SPD-M10AVP). Coluna analítica com pré-coluna Phenomenex, modelo Gemini C18 110 A (4.6 x 250 mm; 5 µm), com fluxo de 1 mL/min. Eluição gradiente com H₂O e acetonitrila (ACN): 0-30 min 10% – 100% ACN; 30-32 min 100% - 10% ACN; 32-40 min 10% - 0% ACN. Espectros de absorção no UV de dos picos majoritários.

Pelo espectro de absorção no UV, pode-se perceber que a fração 31-FAL 3.3.3 apresenta compostos da mesma classe das concanamicinas e portanto também foi analisada por RMN uni e bidimensionais e por espectrometria de massas para a identificação estrutural, conforme pode ser observado nas Figura 31 -35 .

Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da amostra 31-FAL-3.3.3 em $\text{DMSO-}d_6$, 500MHz

Figura 32 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra 31-FAL-3.3.3 em $\text{DMSO-}d_6$, 500MHz

Figura 33 - Espetro de COSY da amostra 31-FAL-3.3.3, DMSO- d_6 , 11,7 T

Figura 35 - Espetro de HMBC da amostra 31-FAL-3.3.3, DMSO- d_6 , 11,7 T.

Os espectros de RMN mostram-se muito similares aos das concanamicinas A e B. No espectro de RMN de ^1H não foram observados alguns dos sinais referentes ao grupo raminosil como os sinais em δ 4,56 (*d*; H-1') e em δ 4,28 (*t*; H-4'). Foi possível observar a presença de sinais adicionais em δ 6,7 e 6,13 ambos acoplando entre si com uma constante de $J = 15,9$ Hz, sugerindo a presença de uma ligação dupla com os hidrogênios em relação *trans*. Para auxiliar na identificação, essa amostra também foi analisada por espectrometria de massas como mostra a Figura 36.

Figura 36 - Espectro de massas (IDMS) da amostra RTd31-FAL 3.3.3, em modo positivo.

Através dessa análise pode-se observar a presença de alguns compostos na faixa de m/z de 680 – 700, como os íons m/z 683 e 697 que apresentam diferença de massa de 14u, sugerindo a presença de compostos análogos. Como as outras concanamicinas estavam cationizadas principalmente com íon sódio, a massa molecular desses dois íons sem o aduto de sódio corresponde a 660 e 674 u. Dessa forma, foi utilizado o banco de dados DNP para auxiliar na identificação de análogos da concanamicina com essas massas. Para o composto de 660 u foi sugerido o composto concanamicina G (anidro-aglicona da concanamicina B). Para o composto de massa 674, o banco de dados não sugeriu nenhum composto derivado da concanamicina, mas como foi observada a diferença de 14 u entre os dois íons, provavelmente esse composto se trata da anidro-aglicona da concanamicina A (Figura 37). Só há um relato dessa substância na literatura e foi obtida sinteticamente como um produto de degradação alcalina da concanamicina A, através de um tratamento com 0,03N NaOH, em metanol. Durante o cultivo dessa linhagem, o aumento do pH do meio poderia levar a degradação das concanamicinas, gerando as anidro-agliconas. Essa transformação química foi realizada para auxiliar

na elucidação estrutural da concanamicina A (KINASHI et al., 1981). Até o momento não há nenhum relato na literatura de isolamento da anidro-aglicona da concanamicina A de espécies de *Streptomyces*.

Os dados de RMN de uni e bidimensionais foram comparados com os dados da literatura e dessa forma foi possível propor a estrutura da anidro-aglicona da concanamicina A, por se tratar do composto majoritário na amostra. Os dados dos deslocamentos químicos, multiplicidade e *J* podem ser observados na Tabela 15. Os dados de HR-ESI-MS permitiram determinar a fórmula molecular $C_{39}H_{62}O_9Na^+$ *m/z* 697,4285 (calculado para $C_{39}H_{62}O_9Na$ 697,4286) para anidro-aglicona da concanamicina A (composto **S31-3**) e $C_{38}H_{60}O_9Na^+$ *m/z* 683, 4138 (calculado para $C_{38}H_{60}O_9Na$ 683, 4130) para anidro-aglicona da concanamicina B (composto **S31-4**) (Figura 37). O espectro de massa de HR-ESI-MS pode ser visualizado no Anexo 1. A Figura 38 mostra a estrutura da anidro-aglicona da concanamicina A com os dados de RMN obtidos.

R = $CH_2CH_2CH_3$ - anidro-aglicona da concanamycin A, composto **S31-3**

R = CH_3 - anidro-aglicona da concanamicina B, composto **S31-4**

Figura 37 - Estruturas químicas das anidro-agliconas das concanamicinas A e B

Tabela 15 - RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) e HMQC (DMSO- d_6 , 11,7 T) da fração 31-FAL-3.3.3 em comparação com dados da literatura (BINDSEIL & ZEECK, 1994 e KINASHI et al., 1981)

Posição	$\delta^{13}\text{C}^\#$	$\delta^{13}\text{C}^{[a]}$	$\delta^1\text{H} (J = \text{Hz})$	$\delta^1\text{H}^{[b]} (J = \text{Hz})$
1		167,5	-	-
2	141,8*	142,2	-	-
2-OMe	59,3	59,7	3,50 s	3,53 s
3	129,4	132,3	6,26 s	6,41 s
4	-	132,2	-	-
4-Me	14,4	14,4	1,90 s	1,98 s
5	141,1	142,3	5,62 d (9,0)	5,80 d (9,0)
6	-	35,8	2,60 m	3,60 m
6-Me	17,7	17,2	0,92 d (6,0)	1,00 d (6,8)
7	82,6	73,8	3,88 m	3,70 d
7-OH	-		4,25	-
8	44,2	44,6	1,27 m	2,89 m
8-CH ₂	29,3	29,5	1,23 m	-
8-CH ₃	9,09	12,2	0,96 d (6,4)	1,16 d (6,0)
9	78,0	80,1	2,97 dl	3,08 d (10,0)
9-OH	-	-	4,26	-
10	35,2	35,9	2,43 m	2,36 m
10-Me	22,3	22,3	1,05	1,00 d (6,7)
11	46,0	46,5	1,87	1,49 m
12	-	143,9	-	-
12-Me	16,6	16,5	1,82 s	1,80 s
13	129,0	123,5	5,67 d (10,0)	5,84 d (10,8)
14	133,3	135,0	6,63 d (12,0)	6,49 q (15,8; 9,6)
15	127,2	127,1	5,07 dd (15,0; 9,0)	5,19 dd (15,8; 9,6)
16	82,6	82,5	3,88 t (9,0)	3,73 t (9,6)
16-OMe	55,7	56,1	3,13 s	3,22 s
17	74,5	76,0	5,17 d (6,7)	5,09 d (9,6)
18	38,7	37,8	1,90 m	2,09 m
18-Me	10,0	9,6	0,89 d (7,0)	0,92 d (6,0)
19	72,3	70,9	3,65 dl (9,15)	3,72 dd
19-OH	-	-	4,34	-
20	46,0	42,0	2,90 m	2,86 m
20-Me	22,3	7,2	0,95 m	1,10 d (6,7)
21	202,0	-	-	-
22	129,4	-	6,13 d (15,9)	6,26 d (15,8)
23	148,7*	-	6,75 dd (15,9 e 7,5)	6,85 dd (15,8; 8,0)
24	42,2	-	2,30 dd (12,7; 6,5)	2,36 m (8,0; 6,7)
24-Me	15,6	-	0,91 d (6,5)	0,99 d (6,7)
25	74,7	-	3,82	3,87 t (7,2)
25-OH	-	-	4,80 s	-
26	133,2	131,5	5,36 dd (15,0; 6,7)	5,41 d (15,5; 7,2)
27	125,5	128,9	5,54 dq (15,0; 6,7)	5,66 dq (15,5; 6,2)
28-Me	17,7	18,1	1,63 d (6,1)	1,69 d (6,2)

[#] atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C baseadas nos espectros de HMQC e HMBC

*Dados confirmados pelo HMBC. (-) Não observado.

^[a] (125,3 MHz, CD₂Cl₂/CD₃OD, 2:1), ^[b] (270 MHz, CDCl₃ com adição de D₂O).

Figure 38 - Estrutura da anidro-aglicona da concanamicina A, com os dados obtidos de RMN.

Os íons referentes às anidro-agliconas das concanamicinas A e B também foram submetidos à fragmentação por CID (dissociação induzida por colisão), conforme mostra as Figuras 39 e 40.

Figura 39 - Espectro de íons produtos da anidro-aglicona da concanamicina A por CID m/z 697 $[M + Na]^+$ (energia de colisão 45 eV)

Figura 40 - Espectro de íons produtos da anidro-aglicona da concanamicina B por CID m/z 683 $[M + Na]^+$ (energia de colisão 45 eV)

O mecanismo de fragmentação desses compostos é o mesmo que acontece para as concanamicinas A e B (*charge remote*) uma vez que produzem os mesmos íons diagnósticos m/z 515 e 501. Para produzir esses íons ocorre uma perda neutra de 182 u ($C_{11}H_{18}O$). Na literatura não há nenhum relato sobre a fragmentação das anidro-agliconas das concanamicinas.

O experimento do íon precursor foi realizado no intuito de identificar todas as concanamicinas produzidas por essa actinobactéria. Dessa forma, foram buscados íons precursores do m/z 501 e m/z 515 (página 70). As análises foram feitas por UPLC-MS como mostrado no item 3.12. Os cromatogramas de íons totais e os íons precursores identificados podem ser visualizados nas Figuras 41 e 42.

Figura 41 - Cromatograma de íons totais obtido por UPLC-MS para o extrato 31-FAL na identificação das concanamicinas que apresentam íons produtos m/z 515 (A) e m/z 501 (B).

Figura 42 - Espectros dos íons precursores do íon produto m/z 501 (a,c,e) e m/z 515 (b,d,f): (a) m/z 683 (anidro-aglicona da concanamicina B), (b) m/z 697 (anidro-aglicona da concanamicina A) (c) m/z 874 (concanamicina B), (d) m/z 888 (concanamicina A), (e) m/z 888 (O-metil concanamicina B), (f) m/z 902 (O-metil concanamicina A).

Nas análises foi possível identificar a presença das concanamicinas já identificadas (concanamicina A e B e as anidro-agliconas das concanamicinas A e B) e a presença de dois íons diferentes. Um apresenta m/z 888 $[M+Na]^+$ e é um íon precursor do m/z 501, portanto se trata de um composto análogo a concanamicina B, uma vez que apresenta uma diferença de 15 u a mais (sugerindo a presença de grupo metila - CH_3) e o mesmo íon produto. O outro íon apresenta m/z 902 $[M+Na]^+$ e é um íon precursor do m/z 515, sugerindo um composto análogo a concanamicina A, pois também apresenta a mesma diferença de 15 u a mais e o mesmo íon

produto. De acordo com esses dados, sugere-se que esses compostos se tratam de possíveis artefatos originados devido ao uso de metanol. Sabe-se que o uso de alguns solventes pode levar a produção de artefatos durante o processo de obtenção dos extratos (SARKER et al., 2005). WOO e colaboradores (1992) relatam a produção O-metil concanamycinas devido ao uso de metanol. Dessa forma, esses dois compostos se tratam da O-metil concanamicina A (composto **S31-5**) e O-metil concanamicina B (composto **S31-6**), conforme mostra a Figura 43.

R=CH₂CH₃ - O-metil concanamicina A, composto **S31-5**

R=CH₃ - O-metil concanamicina B, composto **S31-6**

Figura 43 - Estrutura química dos artefatos O-metil concanamicina A e B.

A actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp RTd31 foi novamente cultivada em meio sólido de arroz (dois Erlenmeyers) para um novo isolamento das concanamycinas e submissão das mesmas aos ensaios citotóxicos em células tumorais. O cultivo e a extração dos metabólitos foram realizados da mesma maneira como descrito no item 3.6. A fração acetato de etila foi eluída em cartucho SPE-C₁₈ de 1g com gradiente de fase móvel: 100% H₂O, H₂O:MeOH (8:2), H₂O:MeOH (6:4), H₂O:MeOH (4:6), H₂O:MeOH (2:8) e MeOH 100%. Pelas análises em CCDA, utilizando a revelação em UV e vanilina sulfúrica, verificou-se que a subfração eluída com H₂O:MeOH (2:8) continha as concanamycinas. Esta subfração foi posteriormente refractionada em HPLC para isolamento dos compostos. A Figura 44 mostra o cromatograma do isolamento.

Figura 44 - Cromatograma de purificação das concanamicinas por HPLC, presentes nas fração obtidas com H₂O:MeOH (2:8). Utilizou-se cromatógrafo preparativo isocrático Shimadzu (modelo: CBM-20A – controlador, LC-6A – bomba, com detector UV-VIS SPD-20A. Coluna semi-preparativa com pré-coluna modelo Nucleosil 120-5 C18 (10 x 250 mm, 5 µm), com fluxo de 3mL/min, no λ de 240 e 280 nm e eluição ACN: H₂O (7:3 v/v), loop de 200 µL.

Foram isoladas as bandas cromatográficas C, D, E e F que posteriormente foram analisadas por espectrometria de massas e confirmaram a presença da concanamicina B (composto **S31-1**), concanamicina A (composto **S31-2**), O-metil concanamicina B (composto **S31-5**) e O-metil concanamicina A (composto **S31-6**), respectivamente. As análises por espectrometria de massas podem ser visualizadas na Figura 45. As amostras foram submetidas aos ensaios antitumorais. A Tabela 16 mostra os resultados obtidos nos ensaios.

Figura 45 - Análise por espectrometria de massas (ID-MS) das concanamicinas isoladas por HPLC-UV. A faixa de massas analisada foi m/z 800-1000. Concanamicina B (C), concanamicina A (D), O-metil concanamicina B (E), O-metil concanamicina A (F)

Tabela 16 - Resultados dos ensaios de inibição da proliferação de células tumorais para as concanamicinas isoladas. Cl_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%)

COMPOSTO	OVCAR-8 Cl_{50} (nM) IC95%	SF295 Cl_{50} (nM) IC95%	HCT-116 Cl_{50} (nM) IC95%	HL-60 Cl_{50} (nM) IC95%
Composto S31-1	14.68 10.27-20.02	20.72 14.28-30.07	11.81 6.88-20.25	4.110 2.98- 5.65
Composto S31-2	1.93 1.65- 2.25	4.98 3.66-6.77	1.362 1.22-1.51	< 0.97
Composto S31-5	79.50 57.84- 109.3	111.4 78.72-157.7	38.67 29.62-50.47	51.12 38.44-67.99
Composto S31-6	14.58 4.11-51.68	264.4 193.9-360.5	10.15 4.30-23.93	94.24 71.96-123.4
Doxorrubicina	0.02 0.02 – 0.04	0.03 0.02 – 0.04	0.33 0.22 – 0.43	0.29 0.18 – 0.40

OVCAR-8: ovário-humano; SF295: glioblastoma-humano; HCT-8: cólon-humano; HL-60: leucemia-humana

Os resultados dos ensaios mostram que as concanamicinas são realmente muito ativas para linhagens de células tumorais testadas, sendo a concanamicina A (**S31-2**) o composto mais ativo. As anidro-agliconas não foram testadas nos ensaios antitumorais devido a baixa quantidade isolada. Esses dados podem explicar a alta atividade citotóxica em células tumorais observada para as frações do meio líquido ISP-2 e do meio sólido de arroz do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31.

As concanamicinas A, B e C foram primeiramente isoladas de *Streptomyces diastatochromogenes* S-45 por Kinashi e colaboradores (1981, 1982). Esses compostos foram descobertos através de uma triagem para compostos imunossupressivos. As concanamicinas foram assim denominadas por inibirem a concanavalina-A, um mitógeno que estimula a proliferação celular de linfócitos T (KINASHI et al., 1984). As concanamicinas também foram ativas contra fungos e leveduras, mas não contra bactérias (KINASHI et al., 1984). Posteriormente foram isoladas outras quatro concanamicinas análogas D, E, F e G de *Streptomyces* sp. A1509 por Woo e colaboradores (1992a) (Figura 46). As concanamicinas possuem um anel lactônico de 18-membros com uma cadeia lateral contendo um anel hemicetal de seis membros. As concanamicinas são modificadas pelos substituintes ligados ao carbono 23 do anel hemicetal. Os substituintes variam de acordo com cada concanamicina A-F, exceto a concanamicina G que se apresenta uma cadeia lateral linear ligada ao anel lactônico (Figura 46).

concanamicinas

concanamicina G

Composto	R1	R2	R3
Concanamicina A	CH ₂ CH ₃		H
Concanamicina B	CH ₃		H
Concanamicina C	CH ₂ CH ₃		H
Concanamicina D	CH ₃		H
Concanamicina E	H		H
Concanamicina F	CH ₂ CH ₃	H	H

Figura 46 - Estruturas das concanamicinas.

No caso das concanamicinas A e B no C-23 está ligado um desoxi açúcar 4'-O-carbamoil-2'-desoxi-D-raminose. Trata-se de um açúcar incomum, modificado pela adição de uma unidade de carbamoil, observada em biossíntese de outros produtos naturais como a novobiocina e cefamicina (HAYDOCK et al., 2005). Ligações de hidrogênio formam uma rede envolvendo a carbonila da lactona no C-1, a hidroxila no C-19 e o grupo hidroxila do anel hemiacetal no C-21 (YOSHIMOTO et

al., 2002), como pode ser visualizado na estrutura da concanamicina A presente na Figura 47.

Figura 47 - Estrutura química da concanamicina evidenciando as ligações de hidrogênio entre o anel lactônico e o anel hemiacetal.

As concanamicinas também são conhecidas inibidores potentes e específicos da enzima ATPase vacuolar tipo H^+ (V-ATPase), interrompendo a acidificação de organelas ácidas intracelulares, levando a uma diversidade de atividades biológicas como antifúngica, antiprotozoária, antiviral, anticâncer, imunossupressora (HUSS et al., 2011; PÉREZ-SAYÁNS et al., 2009; YOSHIMOTO et al., 2002; KATAOKA et al., 1995; GUINEA et al., 1995, WOO et al., 1992b, OMURA et al., 1983). Essas enzimas são bombas de próton presentes na membrana celular de organelas como lisossomos, endossomos, vacúolos de plantas e fungos, e utilizam a energia liberada da hidrólise do ATP para o processo de transporte de solutos através das membranas, mantendo o pH dessas organelas dentro dos limites fisiológicos (DORSE; ALTENDORF 1997). Estudos de relação estrutura-atividade hipotetizaram que a rede de ligações de hidrogênio era importante para a atividade biológica das concanamicinas (WESTLEY et al., 1984). Entretanto, os estudos feitos por Woo e colaboradores (1992) mostraram que a metilação do anel hemiacetal da concanamicina B e a concanamicina G foram 5 e 25 menos ativas que a concanamicina B para a inibição da acidificação lisossomal, respectivamente. Contudo, a concentração de inibição da acidificação lisossomal foi de 10^{-9} M para a concanamicina G, sugerindo que o anel macrolídeo tem um papel importante na atividade biológica. Essa hipótese foi comprovada posteriormente pelos estudos realizados por Yoshimoto e colaboradores (2002) no qual análogos sintéticos sem o anel hemiacetal e/ou com outro substituinte ligado ao anel

macrolídeo mantiveram a atividade inibitória para V-ATPase, evidenciando que o anel macrolídeo é o farmacóforo dessas estruturas e que as ligações de hidrogênio não são necessárias, podendo ser modificadas por outros substituintes gerando outros análogos sintéticos que podem ser mais potentes, seletivos e de menor toxicidade. As concanamicinas são altamente tóxicas por inibirem V-ATPase de outros tecidos, limitando seu uso clinicamente, assim o desenvolvimento de análogos mais seletivos e menos tóxicos é interessante (BINDSEIL; ZEEK, 1994; KINASHI et al., 1984).

4.3 Monitoramento da produção das concanamicinas.

O monitoramento da produção das concanamicinas foi realizado conforme descrito no item 3.9 e teve por objetivo determinar o melhor tempo de produção das concanamicinas A e B e anidro-agliconas das concanamicinas A e B.

Foram obtidos os extratos controles A e B de acetato de etila e de n-butanol, sendo que apenas os extratos acetato de etila foram analisados, pois contêm as concanamicinas presentes. Também foi medido o pH do meio de cultivo antes da realização da partição, sendo que o pH do meio com 48h de cultivo foi 7 e após 480h o pH subiu para 9.

A relação entre tempo e a intensidade da área obtida para cada concanamicina pode ser observada na Tabela 17, no qual A e B são os dois controles e M é a média entre eles.

Tabela 17 - Área versus tempo (h) obtido através do monitoramento pelo modo SIM das concanamicinas A, B e G.

Tempo (h)	concanamicina A m/z 888			concanamicina B m/z 874			concanamicina G m/z 863		
	A	B	M	A	B	M	A	B	M
48	732,37	3422,0811	5387,226	4007,577	3449,223	3728,4	0	0	0
96	11233,659	6855,093	9044,376	9954,702	5417,893	7686,298	302,299	230,759	266,539
144	3855,231	5329,414	4592,323	1180,406	1460,288	1320,347	346,514	505,212	425,863
192	1050,159	1220,542	1135,351	65,941	119,661	92,807	165,32	175,609	170,4645
240	632,743	308,824	470,7835	49,853	12,797	31,325	149,879	112,486	131,1825
288	197,933	214,454	206,1935	5,786	4,108	4,947	152,084	126,361	139,2225
336	37,443	36,954	37,1985	0	0	0	103,319	121,182	112,2505
384	0	0	0	0	0	0	42,7	83,067	62,8835
432	0	0	0	0	0	0	0	0	0
480	0	0	0	0	0	0	0	0	0

O gráfico 1 mostra o perfil das médias das áreas versus o tempo obtido pelo monitoramento de cada composto.

Gráfico 1 - Produção das concanamicinas em função do tempo, calculado pelas médias das áreas versus o tempo obtido pelo SIM de cada concanamicina.

Como pode-se observar pelo gráfico o perfil de produção das concanamicinas A e B é bastante semelhante sendo que o melhor tempo de

produção de ambas é com 96 horas (4 dias). Após esse período ocorre uma diminuição na produção desses compostos e com 336 h (14 dias) não há mais a produção de nenhuma delas. Já a concanamicina G apresenta uma produção menor comparada às demais concanamicinas, sendo que sua produção inicia-se com 96 h, e há um aumento na produção com 144h e logo em seguida uma diminuição e não há mais produção com 432 h (18 dias). Nesse experimento não foi possível fazer o monitoramento da anidro-aglicona da concanamicina A, devido a baixa intensidade da banda cromatográfica referente ao íon desse composto (m/z 697 $[M+Na]^+$), o que inviabilizou a determinação da área pelo tempo. Isso pode ter corrido devido à baixa produção desse composto nas amostras.

O interessante desses resultados foi observar que a produção da concanamicina G obteve um máximo na produção ao mesmo tempo em que a produção da concanamicina B apresentou uma queda. Outro dado importante foi a análise o pH do meio. Ao longo do cultivo houve um aumento do pH no meio de cultura, isso pode ter ocasionado a abertura do anel hemicetal com eliminação do açúcar, assim como acontece no experimento de obtenção do produto de degradação alcalina da concanamicina A, gerando a anidro-aglicona da concanamicina A na presença de uma base (KINASHI et al., 1981).

4.4 Desreplicação das frações hexânica e butanólicas da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31

A estratégia da desreplicação foi utilizada para identificar os compostos presentes na frações hexânica do meio sólido de arroz (31-FHS) e butanólicas do meio sólido de arroz e do meio líquido ISP-2 (31-FHS e 31-FBL). As análises foram feitas por inserção direta ID-MS no equipamento UPLC-MS em modo positivo. A Figura 48 mostra os espectros obtidos.

Figura 48 - Espectros de massas da fração hexânica do meio sólido de arroz (31-FHS) (G), fração butanólica do meio sólido de arroz (31-FBS) (H) e fração butanólica do meio líquido ISP-2 (31-FBL) (I)

Para as análises das frações foram excluídos os íons observados nas análises do solvente (MeOH) e dos brancos dos meios de cultura. Os espectros dessas amostras estão na no Anexo 2. Nessas análises foi possível verificar que a fração hexânica (31-FHS) contém muitas impurezas, devido a presença de vários íons. Muitos deles apresentam diferenças de 44 u. Isso evidencia a presença de surfactantes na amostra, pois tal distribuição é devido ao grau de polimerização ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) dos surfactantes (NISHIKAWA et al., 2003). Nas frações butanólicas é possível observar a presença de vários íons na região de m/z 500 a 650 u. A Figura 49 mostra a ampliação dessa região.

Figura 49 - Ampliação dos espectros de massas das frações butanólicas do meio sólido de arroz (31-FBS) e do meio líquido ISP-2 (31-FBL)

Nas análises das frações butanólicas foi possível observar a presença de alguns íons em comum como m/z 585, 601, 607 e 623. Os íons mais intensos na fração butanólica do meio líquido ISP-2 íon m/z 601 e 623 apresentam uma diferença de 22 u, o que indica que o íon m/z 601 está cationizado com próton e o íon m/z 623 está cationizado com sódio, dessa forma o composto neutro apresenta massa molecular de 600 u. O mesmo acontece para os íon m/z 585 e 607, ambos apresentam diferença de 22 u, portanto estão cationizados com próton e sódio respectivamente, e o composto neutro apresenta massa molecular de 584 u. Outros íons observados foram o m/z 561 e 583, o m/z 553 e 575 e o m/z 569 e 591, ambos os pares com diferença de 22 u, evidenciando mais três compostos com massas moleculares de 560, 552 e 568 u. Todos os íons protonados foram submetidos à análise por CID (Figura 50). Foi utilizado o banco de dados DNP para identificação dos compostos.

Figura 50 - Espectros de fragmentação por CID dos íons m/z 601 (D), 585 (E), 569 (F), 553 (G) e 561 (H) todos com energia de fragmentação de 30 eV e obtidos no equipamento de UPLC-MS.

Pelas análises de fragmentação foi possível observar os compostos presentes nos espectros D e E apresentam perfil de fragmentação bastante similar, o íon m/z 601 apresenta duas perdas de 200 u originando os íons m/z 401 e 201, e o íon m/z 585 apresenta uma perda de 200 u e outra de 184 u (16 u a menos, o que indica uma possível perda de OH). Os compostos presentes nos espectros F e G apresentam fragmentação similar ao do íon m/z 585, podendo se tratar de possíveis

derivados. No espectro F é possível observar uma perda de 200 e 184 u originando os íons m/z 369 e 185 (de baixa intensidade). No espectro G é possível observar a perda de 202 u e de 166 u, originando os íons m/z 351 e 185 u.

Pelas análises de fragmentação, e com as informações obtidas pelo banco de dados, foi possível identificar que o composto de massa molecular de 600 u corresponde a desferrioxamina E também conhecida como nocardamina, o composto de massa molecular de 584 u corresponde a desoxi-nocardamina e o composto de massa molecular de 560 u corresponde a desferrioxamina B (Figura 51). As desferrioxaminas E e B já foram previamente isoladas no nosso grupo de pesquisa de outras linhagens de *Streptomyces* e foram observados os mesmos íons (m/z 601, 401 e 201) na fragmentação da desferrioxamina E (CONTI, 2012; CHAGAS, 2014). Os dados de HR-ESI-MS permitiram determinar a fórmula molecular $C_{27}H_{48}N_6NaO_9^+$ m/z 623,3361 (calculado para $C_{27}H_{48}N_6NaO_9$ 623,3375) para a nocardamina (**S31-7**), $C_{27}H_{48}N_6NaO_8^+$ m/z 607,3406 (calculado para $C_{27}H_{48}N_6NaO_8$ 607,3426) para a desoxi-nocardamina (**S31-8**) e $C_{25}H_{49}N_6O_8^+$ m/z 561,3605 (calculado para $C_{25}H_{49}N_6O_8$ 561,3606) para desferrioxamina B (composto **S31-9**). O espectro de alta resolução pode ser visualizado no Anexo 3. O perfil de fragmentação da desferrioxamina B foi o mesmo observado na literatura (GROENEWOLD et al., 2004), como mostra a Figura 52. Os compostos de massa 552 e 568 u, apresentaram padrão de fragmentação parecido com a desoxi-nocardamina, porém não há nenhum derivado do sideróforo nocardamina com essas massas nos bancos de dados DNP e Antibase. Esses compostos podem se tratar de novos produtos naturais.

Figura 51 - Estruturas químicas da nocardamina, desoxi-nocardamina e desferrioxamina B

Figura 52 - Fragmentação da desferrioxamina B (GROENEWOLD et al., 2004)

Todos os compostos correspondem a sideróforos que são comumente produzidos por diversas espécies de *Streptomyces*. São compostos que quelam ferro e que geralmente são produzidos em condições limitantes desse elemento, uma vez que o ferro é importante para diversas funções metabólicas como a biossíntese de adenosina trifosfato (ATP) em processos aeróbicos e anaeróbicos (CRAIG et al., 2012, BARONA-GOMEZ et al., 2006). Apesar do ferro ser o elemento mais abundante na crosta terrestre, sua biodisponibilidade é baixa por se apresentar na forma férrica. Isto ocorre porque em pH neutro e alcalino o íon férrico forma complexos poliméricos insolúveis de oxi-hidróxidos, os quais não são assimilados pelos micro-organismos. Para resolver esse problema muitos micro-organismos excretam quelantes com alta afinidade ao ferro como os sideróforos (BARONA-GOMES et al., 2006).

Os sideróforos apresentam várias aplicações como no tratamento da malária, tuberculose e infecções bacterianas. A desferrioxamina B é comercializada

como um sal de mesilato sob o nome comercial de Desferal®, marca registrada da Ciba-Geigy, e é utilizada na remoção do excesso de ferro em doenças como hemocromatose e a talassemia (BENITE et al., 2002). A desferrioxamina E apresenta diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antitumoral, indutor metabólico, antioxidante e detoxificante (KALINOVSKAYA et al, 2011).

A 6-desoxi-nocardamina foi isolada de uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* isolada de uma esponja marina desconhecida por Lee e colaboradores (2005). Esse composto, juntamente com a nocardamina e a desmetileno-nocardamina, não foram ativos contra as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos testados.

Foram observadas boas atividades antitumorais para a fração butanólica do meio sólido de arroz (31-FBS). Essas atividades podem estar relacionadas a sinergia de vários sideróforos nessa fração, comparado a fração do meio líquido no qual apenas se observa a presença da desferrioxamina E. Estudos prévios no nosso grupo de pesquisa mostraram que a desferrioxamina E apresentou atividade moderada nos ensaios citotóxicos em células tumorais para células de câncer de cólon HCT-8 e glioblastoma SF-295 (CONTI, 2012).

4.5 Experimento de eliciação: *Streptomyces* sp RTd31 X *P. aeruginosa* ATCC9027 e *S. aureus* ATCC 6538

O experimento de eliciação foi realizado com o intuito de verificar se a adição de eliciadores iria estimular outras vias biossintéticas levando à produção de novos compostos pela actinobactéria. Foram escolhidas bactérias patogênicas como eliciadores uma gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 uma gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Os eliciadores foram adicionados no cultivo com a actinobactéria em dois tempos diferentes: um no tempo zero (actinobactéria e eliciadores adicionados simultaneamente ao meio fermentativo) e na fase estacionária (eliciadores adicionados no meio fermentativo momento em que a actinobactéria se encontrava na fase estacionária).

Previamente ao experimento de eliciação, foi necessário estabelecer a curva de crescimento da actinobactéria, para que fossem estabelecidos os tempos ideais para a adição das bactérias patogênicas ao cultivo.

4.5.1 Crescimento, consumo de glicose e pH

A determinação do crescimento, e o consumo de glicose foram realizados conforme descrito no item 3.10.1. A quantidade de inóculo inicial adicionada no meio fermentativo para o experimento de eliciação foi determinada pelo peso seco de alíquotas do pré-inóculo. Essa quantidade foi de aproximadamente 15 mg. O crescimento da actinobactéria foi determinado através do peso seco da massa micelial a cada 24h de cultivo, juntamente com a determinação do consumo de glicose pelo teste do fenol-sulfúrico. O pH do meio fermentativo também foi medido a cada intervalo de 24 h. A Tabela 18 mostra o peso seco da massa micelial e o pH do meio de cultura durante as 168 h de cultivo. O gráfico 2 mostra a curva de crescimento obtida pela média dos pesos secos.

Tabela 18 - Peso seco da massa micelial da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31 e pH do meio de cultura durante as 168h

Tempo (h)	1ª Pesagem (mg)	2ª Pesagem (mg)	Média (mg)	pH
0	14,5	15,5	15	-
24	268,0	288,5	278,3	7,0
48	430,0	430,0	430,0	7,0
72	375,0	382,6	378,8	8,0
96	313,5	321,1	317,3	8,0
120	340,6	341,0	340,8	8,0
144	280,6	283,0	281,8	9,0
168	254,5	245,8	250,2	9,0

Gráfico 2 - Curva de crescimento da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 obtida pela média dos pesos secos

Para a determinação da quantidade de açúcares totais, foi feita uma curva de calibração. Foram preparadas 10 soluções de glicose nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, essas soluções também foram preparadas pelo método do fenol-sulfúrico e analisadas no espectrofotômetro UV-visível e determinada a equação da reta. O gráfico 3 mostra a curva de calibração o gráfico 4 o consumo de açúcares totais.

Gráfico 3 - Curva de calibração da glicose [10-100 $\mu\text{g/mL}$]

Gráfico 4 - Consumo de açúcares totais pela actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 durante as 240 h de cultivo em meio líquido ISP-2

Após a análise dos dados obtidos verificou-se que a partir de 48 h actinobactéria entra na fase estacionária, uma vez que com 48h ela atinge o máximo de massa micelial e há uma queda na concentração de açúcares totais no meio, evidenciando assim o início da fase estacionária (LUTI; MAVITUNA 2011). Dessa forma, foi estabelecido que a adição dos eliciadores (bactérias patogênicas) na fase estacionária aconteceria 48h após o início do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31, já que é um período em que começa sua produção de metabólitos secundários. Assim, o eliciador poderia induzir a produção de diferentes metabólitos pela actinobactéria. Foi estabelecido que o tempo total de cultivo para todos experimentos seria de 168 h .

Após esse período, os extratos acetato de etila e *n*-butanol foram obtidos e submetidos às análises por espectrometria de massas por inserção direta para avaliar diferenças no perfil metabólico. As Figuras 53 e 55 mostram espectros de massas dos extratos acetato de etila e butanólicos no tempo zero e as Figuras 56-57 mostram os espectros de massas dos extratos acetato de etila e butanólicos na fase estacionária.

Figura 53 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.

As análises dos extratos acetato de etila experimentos de eliciação no tempo zero mostraram que não houve a produção de novos compostos. Os íons que aparecem nesses espectros correspondem aos mesmos íons observados nos extratos controle das bactérias patogênicas ou da actinobactéria. Os íons na faixa de 1026 e 1031 no espectro da *P. aeruginosa* podem corresponder a pseudofactina I (Figura 54), um biosurfactante produzido por espécies de *Pseudomonas* (JANEK et al., 2010).

Figura 54 - Estrutura química da pseudofactina I, composto **Pa-1**

Figura 55 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas

Nos extratos butanólicos da actinobactéria pode-se observar a presença dos íons m/z 601 $[M+H]^+$ e 623 $[M+Na]^+$, que correspondem a desferrioxamina E. Nos experimentos de eliciação, é possível observar a presença desses íons apenas no extrato com *S. aureus*. Aparentemente *P. aeruginosa* inibiu a produção dos sideróforos pela actinobactéria, isso pode ser uma tentativa da bactéria patogênica em limitar o crescimento da actinobactéria. Esse tipo de inibição da produção de sideróforos também foi observada em cultivo misto de actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo *Phomopsis* sp FLe6, no qual o fungo aparentemente inibiu a produção de sideróforos pela actinobactéria (CHAGAS, 2014). Além disso, a competição por nutrientes pode ter inibido o crescimento da actinobactéria, não levando a produção dos sideróforos, porém com os dados obtidos não é possível saber o que realmente está acontecendo.

Figura 56 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.

Nos extratos acetato de etila dos experimentos de eliciação na fase estacionária não foi possível observar a estimulação de novos compostos, os íons observados são os mesmos presentes nos controles.

Figura 57 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas

Nos extratos butanólicos dos experimentos de eliciação é possível observar a presença dos sideróforos nos dois extratos (m/z 601 e 632). Isto provavelmente deve-se ao fato dos eliciadores terem sido adicionados no momento que a actinobactéria encontrava-se na fase estacionária e provavelmente os sideróforos já teriam sido produzidos, dessa forma a bactéria patogênica *P. aeruginosa* não conseguiu inibir a produção dos mesmos como aconteceu no

experimento em que ela foi adicionada no tempo zero, para prejudicar o crescimento da actinobactéria.

Nas análises dos extratos acetato de etila não foram observados os íons referentes às concanamicinas. Isso pode ter acontecido devido à baixa concentração desses compostos nas amostras, uma vez que foram utilizados apenas dois Erlenmeyers por experimento. Vale ressaltar que as concanamicinas foram isoladas em pequenas quantidades (< 2 mg) a partir de um cultivo no qual foram utilizados 25 Erlenmeyers para o meio líquido ISP-2 e para o meio sólido de arroz. Outro fator que pode ter ocasionado a baixa detecção desses compostos pode ser sido a baixa ionização ou supressão iônica, no qual espécies mais facilmente ionizáveis mascaram a presença de espécies menos ionizáveis (VESSECCHI et al., 2011; GARCIA et al., 2008).

4.6 Estudo químico das frações da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22

4.6.1 Fração acetato de etila meio líquido ISP-2 (22-FAL)

Como evidenciado no item 4.1 a fração acetato de etila do meio líquido ISP-2 foi muito ativa nos ensaios antibacterianos, inclusive para bactérias resistentes e nos ensaios citotóxicos em células tumorais. Essa fração apresentou manchas na placa de CCDA, as quais foram reveladas apenas em vanilina sulfúrica, e não no UV, o que inviabilizou a purificação por HPLC-DAD-UV. Essa fração foi fracionada conforme descrito no item 3.7.3. Deste fracionamento, a subfração 22-FAL-5 apresentava-se mais pura através das análises por CCDA e, portanto, foi analisada por RMN de ^1H e por espectrometria de massas (Figuras 58-60). Essa amostra também foi submetida aos ensaios antibacterianos e aos ensaios citotóxicos em células tumorais, cujos resultados são apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H da amostra 22-FAL-5 em CDCl_3 e 500MHz

Figura 59 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H da amostra 22-FAL-5 em CDCl_3 e 500MHz

O espectro de RMN de ^1H evidencia aparentemente uma mistura de compostos, no qual se observa vários sinais na região de δ 0,8 a 2,5 que correspondem a sinais de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos. Também é possível verificar a presença de duas possíveis metoxilas em δ 3,1 e 3,3. Essa fração foi analisada por espectrometria de massas (ID-MS) para a possível identificação dos compostos através de comparação com o banco de dados DNP (Figura 60).

Figura 60 - Análise por inserção direta da subfração 22-FAL-5 em modo positivo (I) e em modo negativo (J)

O espectro de massas da subfração 22-FAL-5 em modo positivo (I) apresenta sinais na faixa de massas de m/z 600-800 como constituintes principais nesta fração. A diferença de massa molecular entre os sinais de m/z 726 e de m/z 731 é 5 u, sugerindo que o composto neutro de massa molecular 708 u está cationizado com íon Na^+ e NH_4^+ , respectivamente. O sinal de m/z 745 corresponde ao composto neutro de massa molecular de 722 u, sugerindo um derivado do composto de massa 708 u, com diferença de massa de 14 u, que sugere a presença de um grupo metileno (CH_2) adicional na estrutura.

O espectro de massas da fração 22-FAL-5 em modo negativo (J) apresentou apenas dois sinais constituintes da amostra, o sinal m/z 707 e m/z 721. Esses sinais correspondem ao composto neutro de massa 708 u desprotonado, originando sinal m/z 707 $[\text{M}-\text{H}]^-$, e ao composto neutro de massa 722 u desprotonado, originando o sinal m/z 721 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Com essas informações, e na tentativa de identificar esses compostos, foi utilizado o banco de dados online DNP. Através das massas moleculares e confrontando as informações obtidas com o gênero *Streptomyces*, alguns compostos foram sugeridos com massa 708 u, sendo que o composto com características mais próximas da amostra foi a 30-desoxi-nigericina, também chamada de grisorixina, um análogo a nigericina (Figura 61). A estrutura do composto foi confirmada através da comparação dos espectros de fragmentação obtidos por CID da grisorixina cationizada com sódio m/z 731 $[M+Na]^+$ presente na subfração 22-FAL-5 com o íon m/z 747 $[M+Na]^+$ do padrão do sal de sódio da nigericina (Sigma-Aldrich) (Figura 62).

nigericina R= CH₂OH, composto (S22-1)
grisorixina R= CH₃, composto (S22-2)

Figure 61 - Estrutura química da grisorixina, um análogo da nigericina.

Figura 62 - Espectros de CID: 22-FAL-5 m/z 731 $[(M-H+Na)+H]^+$ (K), nigericina padrão m/z 747 $[(M-H+Na)+H]^+$ (L), ambas com energia de 55 eV.

O composto **S22-2**, de m/z 731, apresenta o mesmo perfil de fragmentação do padrão da nigericina, com a diferença de 16 u entre os íons. O único íon comum aos dois espectros é o íon de m/z 237. Portanto, esses dados confirmam que a grisorixina é produzida por essa actinobactéria. Os dados de RMN da literatura para a grisorixina são bastante semelhantes aos observados na amostra (GACHON; KERGMARD, 1975).

Para o composto **S22-3**, de massa de 722 u, que apresenta uma diferença de 14 u em relação a grisorixina o banco de dados não sugeriu nenhuma estrutura química da classe dos ionóforos poliéteres. Porém foi realizada a análise de fragmentação por CID do íon m/z 745 $[M+Na]^+$ (Figura 63) no qual podemos observar a primeira perda de 32 u, que corresponde a perda de metanol para formar o íon de m/z 713. Dessa forma, sugere-se que esse composto tenha um grupamento cetol ou invés de um grupo hemicetálico em um dos anéis (Figura 64). Além disso, foi possível observar a presença do íon diagnóstico m/z 237, confirmando que se tratava de um derivado da grisorixina. Esse composto pode ser um artefato da grisorixina, produzido durante o procedimento experimental a partir do uso do metanol, não sendo, assim, produto do metabolismo secundário dessa actinobactéria, como aconteceu para as concanamicanas (**S31-5** e **S31-6**) produzidas pela actinobactéria *Streptomyces sp* RTd31.

Figura 63 - Espectro de fragmentação por CID do íon m/z 745 $[M+Na]^+$ (energia de colisão 65eV)

Figura 64 - Estrutura proposta do artefato da grisorixina, composto **S22-3**.

Para confirmar se esse composto seria realmente artefato ou produto do metabolismo secundário, a actinobactéria foi re-cultivada em meio líquido ISP-2 por 12 dias e 10 mL do meio foram submetidos à partição com AcOEt, não sendo utilizado metanol em nenhuma etapa. Esse extrato foi analisado por UPLC-MS utilizando acetonitrila. As condições de análises foram: coluna ACQUITY-BEH C₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 mm), voltagem do capilar: 3.2 kV; voltagem do cone: 40 V; temperatura da fonte: 150 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; fluxo do gás de dessolvatação: 500 L/h. Bomba A: H₂O contendo 0,1% acetato de amônio, Bomba B: Acetonitrila (ACN). As condições de eluição foram: 0-5 min: 65% - 97% ACN; 5-8 min: 97% - 65% ACN; 8-13 min: 65% ACN. A Figura 64 mostra o cromatograma obtido na análise por UPLC-MS.

Figura 64. Cromatograma de íons totais (TIC) realizado por UPLC-MS do extrato RTd22-AcOEt

A Figura 65 mostra os espectros de massas referente às principais bandas cromatográficas (1-5) observadas na análise por UPLC-MS.

Figura 65 - Espectros de massas dos compostos presentes nas bandas cromatográficas observadas na análise por UPLC-MS

Foi possível observar que no tempo de retenção de 6,71 min está presente a grisorixina (**S22-2**), pela presença dos íons m/z 726 $[M+NH_4]^+$ e 731 $[M+Na]^+$. Os íons referentes ao artefato (**S22-3**) m/z 740 $[M+NH_4]^+$ e 745 $[M+Na]^+$ não foram observados em nenhum tempo de retenção, confirmando que o mesmo é formado somente quando metanol é usado no processo de extração.

Dessa forma, fica evidente que a actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 é produtora da grisorixina, uma substância pertencente à classe dos antibióticos poliéteres, também chamados de ionóforos poliéteres. Os dados de alta resolução (HR-ESI-MS) permitiram determinar a fórmula molecular $C_{40}H_{68}O_{10}Na^+$ m/z 731, 4704 (calculado para $C_{40}H_{68}O_{10}Na$ 731,4710) para grisorixina. O espectro de HR-ESI-MS pode ser visualizado no Anexo 4.

A grisorixina foi isolada de *Streptomyces griseus* por Gachon e colaboradores (1975) e apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos e mostrou-se altamente tóxica em ratos com dose letal de 15 mg/kg.

Os ionóforos poliéteres são substâncias produzidas pelo sistema policetídeo sintetase (PKS) e apresentam um amplo espectro de bioatividade, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral, antitumoral, herbicida, anti-inflamatória, efeitos no sistema nervoso central e sistema imunorregulatória (WANG et al., 2011, GACHON et al., 1975). Caracterizam-se pela presença de anéis tetraidrofuranos e tetraidropiranos e esqueleto espirocetal. Eles apresentam uma cavidade interna rica em oxigênios que se ligam facilmente a íons metálicos (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e um exterior hidrofóbico que promovendo sua passagem através de membranas celulares, levando a despolarização e consequentemente a morte celular (MATABUDUL et al., 2001; WU et al., 2009; KEVIN II et al., 2009; CUER & DAUPHIN, 1986).

Até o momento, mais de 120 ionóforos poliéteres foram caracterizados e todos eles são produzidos por actinobactérias, principalmente dos gêneros *Streptomyces* e *Actinomadura*, mas também por *Actinomyces*, *Dactylosporangium*, *Nocardia* e *Nocardiosis* (WANG et al., 2011).

Os ionóforos poliéteres têm sido amplamente utilizados como medicamentos veterinários, como agentes anticoccidiais contra o parasita *Eimeria* spp. e como aditivos alimentares na alimentação de animais, principalmente em ruminantes. Como aditivos, promovem uma melhora na eficiência alimentar, aumentam a taxa de ganho de peso, por inibir seletivamente algumas bactérias, como as produtoras de metano que são menos eficientes na conversão alimentar, além de diminuírem o problema de inchamento pela inibição do crescimento de bactérias responsáveis pelo excesso da produção de muco e acidose nesse animais (MATABUDUL et al., 2011). Nos ensaios biológicos a subfração 22-FAL-5 também apresentou elevadas atividades antibacterianas e citotóxicas para células tumorais (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 - Percentual de inibição do crescimento celular da subfração 22-FAL-5 em quatro linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.

Subfração	Linhagens celulares			
	HCT-8	MDA-MB435	SF-295	HL-60
22 – FAL-5	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)	MA (100%)
Doxorubicina	MA (96,94%)	MA (97,30%)	MA (87,67%)	MA (95,75%)

Linhagens celulares: HCT-8 (côlon-humano); MDA-MB435 (melanoma-humano); SF-295 (glioblastoma-humano); HL-60 leucemina-humana). (PA): pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%); (Mo): atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%); (MA): muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

Tabela 20 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) (µg/mL) da subfração 22-FAL-5 e dos antibióticos comerciais

Bactérias gram-positivas	22-FAL-5	Van	Dap	Oxa
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,195/ 0,39			
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	0,195/ 0,39			
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,39/ 0,39	1,00	1,00	-
<i>S. aureus</i> Mu50 ATCC 700699	0,781/ 0,781	4,00	1,50	>256
<i>S. aureus</i> SA16	0,781/ 1,562	2,00	0,5	>256
<i>E. faecium</i> VRE 16	0,781/ 12,5	-	3,00	>256

Van: vancomicina, Dap: daptomicina e Oxa: oxacilina.

Os resultados obtidos no ensaio antibacteriano para a subfração 22-FAL-5 revelaram significativo potencial antibacteriano, apresentando CIM com valores muito abaixo da CIM dos antibióticos, inclusive para bactérias resistentes. Provavelmente o mecanismo de ação da grisorixina independe da resistência bacteriana que essas bactérias possuem. Essa subfração também promoveu inibição de 100% do crescimento celular de todas as linhagens de células tumorais evidenciando o alto potencial citotóxico dos ionóforos.

Nos resultados mostrados para as atividades biológicas das frações (Tabelas 10, 11 e 12) da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22, a fração hexânica e as frações acetato de etila apresentaram os melhores valores de CIM, e as melhores atividades citotóxicas provavelmente porque essas frações detêm a maior concentração de ionóforo, devido à sua característica lipofílica. O item 4.6.2 mostra

o estudo de desreplicação no qual todas as demais frações da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foram analisadas por espectrometria de massas.

Apesar do grande espectro de atividade biológica, o principal obstáculo para o uso dos ionóforos poliéteres como fármacos para controle das doenças humanas é a questão da toxicidade. A redução da toxicidade dos poliéteres gera um grande interesse para tratamentos de infecções causadas por linhagens de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) e VRE (*Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina), uma vez que eles se mostram mais efetivos que os fármacos usados clinicamente como a vancomicina e a oxacilina (KEVIN II *et al.*, 2009).

4.6.2 Desreplicação das frações hexânica, acetato de etila e butanólicas da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22

A estratégia da desreplicação também foi utilizada para identificar os compostos presentes na fração hexânica do meio sólido de arroz (22-FHS), a fração acetato de etila do meio sólido de arroz e as frações butanólicas do meio sólido de arroz e do meio líquido ISP-2 (22-FHS e 22-FBL). As análises foram feitas inserção direta IDMS no equipamento UPLC-MS em modo positivo. A Figura 66 mostra os espectros obtidos.

Figura 66 - Espectros de massas da fração hexânica do meio sólido de arroz (22-FHS) (M), fração acetato de etila do meio sólido de arroz (22-FAS) (N), fração butanólica do meio sólido de arroz (22-FBS) (O) e fração butanólica do meio líquido ISP-2 (22-FBL) (P)

Nas análises pode-se observar que a fração hexânica (22-FHS) e a fração butanólica do meio sólido de arroz (22-FAS) apresentam uma grande quantidade de compostos na região de m/z 600 a 800 u, sendo que esses compostos correspondem aos íons referentes ao ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**) (m/z 726 e 731) e ao seu artefato (**S22-3**) (m/z 740 e 745). Alguns outros íons foram observados, como o m/z 659, 641 que correspondem a fragmentos do íon m/z 726 $[(M-H+NH_4) + H]^+$ (Anexo 5). Alguns íons mais instáveis podem sofrer fragmentação na fonte de ionização do espectrômetro de massas. Na fração butanólica do sólido de arroz (22-FBS) e do meio líquido ISP-2 (22-FBL) foi possível observar a presença do sideróforo nocardamina (**S31-7**) através dos íons m/z 601 $[M+H]^+$, 623 $[M+Na]^+$ e 639 $[M+K]^+$. Na fração 22-FBL também é possível observar a presença da desoxi-nocardamina (**S31-8**) em menor quantidade com o íon m/z 585 $[M+H]^+$. Esses dados

mostram que os ionóforos poliéteres e os sideróforos são as principais classes de compostos produzidos por essa actinobactéria nessas condições de cultivo.

4.7 Análise do perfil de fragmentação da grisorixina com complexo de sódio e de cobre

Sabe-se que os ionóforos poliéteres têm a capacidade de se complexar com diferentes íons. Na literatura não há nenhuma proposta de fragmentação para o sal de sódio da grisorixina protonada por ESI-MS. Dessa forma foi realizada uma proposta a fragmentação para o composto (**S22-2**) com m/z 731 $[M+Na]^+$.

Estudos mostram que nos complexos utilizando metais de transição como Cu^{2+} , Fe^{3+} e Ag^+ , o cátion metálico pode mudar seu estado de oxidação em fase gasosa, diferentemente do que acontece com os complexos com metais alcalinos e alcalinos terrosos e conseqüentemente gerar novos mecanismos de fragmentação. Esses trabalhos mostram que os antibióticos poliéteres podem formar complexos com esses metais de transição e gerar novas rotas de fragmentação em fase gasosa (SHEN; BRODBELT 2000; BERKEL 2000; FORBES; VOLMER 2005; LOPES et al., 2004). Dessa forma, a metodologia descrita por Lopes (2004) foi aplicada para analisar a via de fragmentação da grisorixina (**S22-2**) complexada com cobre por ESI-MS. A Figura 67 mostra os espectros de fragmentação da grisorixina complexada com sódio e com cobre. As Figuras 68 e 69 mostram as propostas de fragmentação para a grisorixina cationizada com sódio e cobre.

Figura 67 - Espectro de íons produtos da grisorixina complexada com sódio (Q) e com cobre (R)

Figura 68 - Proposta de fragmentação da grisorixina complexada com Na^+

Figura 69 - Proposta de fragmentação da grisorixina complexada com Cu²⁺

As análises obtidas por espectrometria de massas revelam uma nova rota de fragmentação para a grisorixina complexada com cobre (m/z 770), diferente da que ocorre com o sódio (m/z 731). Nas fragmentações com complexo de sódio, para a formação do pico base (m/z 687), ocorre uma descaboxilação. Posteriormente, há uma perda de metanol originando o íon m/z 655 seguido de um rearranjo pericíclico, no qual ocorre uma perda neutra de 170 u originando o íon m/z 485. Em um segundo mecanismo, a grisorixina m/z 731 sofre uma perda de água, originando o íon m/z 713 que pode sofrer três rotas de fragmentação diferentes. Na fragmentação (a), ocorre apenas uma descarboxilação originando o íon m/z 669. No mecanismo (b) há um rearranjo pericíclico com uma perda neutra de 84u gerando o íon m/z 629 que sofre uma descarboxilação produzindo o íon m/z 585. Na fragmentação (c) ocorre uma perda de metanol originando o íon m/z 681 que também sofre um rearranjo pericíclico com perda neutra de 444u gerando o íon m/z 237.

Já no espectro de massas do complexo de cobre, o primeiro mecanismo de redução do cobre ocorre na formação do pico base m/z 628, no qual o cobre (m/z

770) abstrai um hidreto da posição α -oxigênio de um anel tetraidrofurano (mecanismo de ácido de Lewis), seguido por uma perda neutra de 142 u. Posteriormente o íon m/z 628 sofre uma descarboxilação gerando o íon de m/z 584.

O segundo mecanismo também mostra a tendência do cobre em reduzir seu estado de oxidação de Cu^{2+} para Cu^+ , no qual um íon precursor de massa par (m/z 770) gera íons de massa ímpar (m/z 655). A mudança do estado de oxidação é iniciada pela ligação entre Cu^{2+} e o oxigênio do anel tetraidrofurano. A quebra homolítica da ligação entre o oxigênio e o cobre resulta na redução para Cu^+ , seguida por uma eliminação radicalar. No terceiro mecanismo, o íon m/z 770 sofre apenas uma descarboxilação, gerando o íon de m/z 726.

Dessa forma, pode-se observar as diferenças no perfil de fragmentação da grisorixina (**S22-2**), assim como Lopes e colaboradores (2004) observaram para o composto monensina, outro ionóforo poliéter. Não há dados na literatura que mostram a rota de fragmentação para a grisorixina complexada com sódio e com cobre. Além disso, o uso dessa metodologia combinada com a técnica de dissociação induzida por colisão (CID) é mais uma ferramenta que permite a identificação da grisorixina, e possivelmente dos seus análogos, no extrato bruto obtido através do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22, o que pode ser útil em estudos de desreplicação.

4.8 Monitoramento da produção da grisorixina

O monitoramento da produção da grisorixina foi realizado conforme descrito no item 3.9. Foram obtidos os extratos controles A e B em acetato de etila e em *n*-butanol. Também foi medido o pH do meio de cultivo antes da realização da partição, sendo que o pH do meio com 48h foi 7 e após 480h o pH subiu para 9.

A relação entre tempo e a intensidade da área obtida para a grisorixina pode ser observada na Tabela 21, no qual A e B são os dois controles e M é a média entre eles.

Foi apenas monitorado o composto grisorixina (**S22-2**) produzido pela actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22, uma vez que os demais íons observados correspondem a artefatos produzidos devido ao uso de metanol nos procedimentos experimentais, portanto não são compostos oriundos do metabolismo secundário

dessa bactéria. A produção grisorixina foi monitorada pelo modo SIM (Monitoramento Seletivo de Íons), no qual o íon selecionado para o monitoramento foi o m/z 731 $[(M - H + Na) + H]^+$.

Tabela 21 - Área versus tempo (h) obtido através do monitoramento pelo modo SIM da grisorixina.

Tempo (h)	Área A	Área B	Média
48	0	0	0
96	2836472	12545719	7691096
144	17762286	16858002	17310144
192	21493500	21160668	21327084
240	21386810	22166624	21776717
388	21631052	22441884	22036468
336	18671266	19664158	19167712
384	20380312	21438070	20909191
432	18917108	19479054	19198081
480	17697588	20203542	18950565

O gráfico 5 mostra o perfil das médias das áreas versus o tempo obtido pelo monitoramento do composto.

Gráfico 5 - Produção das concanamicinas em função do tempo, calculado pelas médias das áreas versus o tempo obtido pelo SIM da grisorixina

Pelos resultados obtidos pode-se observar que a grisorixina começa a ser produzida com 96h e atinge um máximo na produção com 192h e a produção praticamente se mantém até o último dia de cultivo. Portanto não há necessidade de

se cultivar essa actinobactéria por um longo período de tempo para se obter uma boa quantidade da grisorixina. *Streptomyces* sp. RTd22 foi inicialmente cultivada por 21 dias em função da triagem preliminar realizada no Laboratório de Química de Micro-organismos (CONTI, 2012).

4.9 Experimento de eliciação para a actinobactéria *Streptomyces* sp RTd22

O experimento de eliciação foi realizado da mesma maneira descrita para a actinobactéria *Streptomyces* sp RTd31, adicionando as bactérias patogênicas *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 no tempo zero e na fase estacionária. Previamente ao experimento de eliciação, foi necessário estabelecer a curva de crescimento da actinobactéria, para o estabelecimento do tempo ideal em que a actinobactéria se encontra na fase estacionária para posterior adição das bactérias patogênicas ao cultivo.

4.9.1 Crescimento, consumo de glicose e pH

O crescimento e o consumo de glicose foram determinados conforme descrito no item 3.10.1. A quantidade de inóculo inicial adicionada no meio fermentativo para o experimento de eliciação foi determinada pelo peso seco de alíquotas do pré-inóculo. Essa quantidade foi de aproximadamente 10 mg. O crescimento da actinobactéria foi determinado através do peso seco da massa micelial a cada 24h de cultivo, juntamente com a determinação do consumo de glicose pelo teste do fenol-sulfúrico. O pH do meio fermentativo também foi medido a cada intervalo de 24 h. A Tabela 22 mostra o peso seco da massa micelial e o pH do meio de cultura durante as 168 h de cultivo. O gráfico 6 mostra a curva de crescimento obtida pela média dos pesos secos.

Tabela 22 - Peso seco da massa micelial da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e pH do meio de cultura durante as 168h

Tempo (h)	1ª Pesagem (mg)	2ª Pesagem (mg)	Média (mg)	pH
0	10,6	9,5	10,0	-
24	152,8	150,0	151,4	7,0
48	185,3	196,0	190,6	8,0
72	152,3	155,3	153,8	8,0
96	94,5	95,4	94,9	9,0
120	72,0	67,0	69,5	9,0
144	50,3	50,8	50,5	9,0
168	26,6	30,5	28,5	9,0

Gráfico 6 - Curva de crescimento da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 obtida pela média dos pesos secos

Para a determinação da quantidade de açúcares totais, foi utilizada a mesma equação da reta presente no gráfico 3. O gráfico 7 mostra o consumo de açúcares pela actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22.

Gráfico 7 - Consumo de açúcares totais pela actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 durante as 168h de cultivo em meio líquido ISP-2

Após a análise dos dados obtidos determinou-se que a partir de 48 h actinobactéria também entra na fase estacionária, assim como *Streptomyces* sp RTd31, uma vez que com 48h ela atinge o máximo de massa micelial e há uma queda na concentração de açúcares totais no meio, evidenciando assim o início da fase estacionária. Dessa forma, estabeleceu-se que a adição dos eliciadores (bactérias patogênicas) na fase estacionária também aconteceria com 48h do cultivo da actinobactéria. As Figuras 70 e 71 mostram os espectros de massas das frações acetato de etila e butanólicos no tempo zero e as Figuras 72 e 73 mostram as análises das frações acetato de etila e butanólicas na fase estacionária.

Figura 70 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.

As análises dos extratos acetato de etila experimentos de eliciação no tempo zero mostraram que também não houve a produção de novos compostos. Os íons que aparecem nesses espectros correspondem aos mesmos íons observados nos extratos controle das bactérias patogênicas ou da actinobactéria. Nessas análises pode-se observar que *P. aeruginosa* inibiu a produção do ionóforo poliéter grisorixina pela ausência dos íons m/z 726 $[M+NH_4]^+$ e 731 $[M+Na]^+$ nas amostras da actinobactéria, sendo que o mesmo não aconteceu para o *S. aureus*. Os íons da grisorixina e do artefato m/z 740 $[M+NH_4]^+$ e 745 $[M+Na]^+$ foram observados.

Figura 71 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação no tempo zero, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria *Streptomyces* sp RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas

Nos extratos butanólicos da actinobactéria pode-se observar a presença dos íons m/z 601 $[M+H]^+$ e 623 $[M+Na]^+$ que correspondem a nocardamina. Nos experimentos de eliciação foi possível observar a presença desses íons, em pequena intensidade, apenas no extrato com *S. aureus*. A bactéria patogênica Gram-negativa pode estar limitando o crescimento da actinobactéria, além disso a

competição por nutrientes pode ter causado a inibição da linhagem endofítica, como aconteceu com *Streptomyces* sp RTd31.

Figura 72 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos em acetato de etila obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato em acetato de etila obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato acetato de etila da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas.

Nos extratos acetato de etila dos experimentos de eliciação na fase estacionária não foi possível observar a estimulação da biossíntese de novos compostos, os íons observados foram os mesmos presentes nos controles. É possível observar a presença dos ionóforos na faixa de m/z 700-750 u. Isto deve se

ao fato dos eliciadores terem sido adicionados no momento que a actinobactéria encontrava-se na fase estacionária e, provavelmente, os ionóforos já teriam sido produzidos. Dessa forma as bactérias patogênicas não conseguiram inibir a produção dos mesmos.

Figura 73 - Análise por IDMS em modo positivo dos extratos butanólicos obtidos nos experimentos de eliciação na fase estacionária, juntamente com extrato butanólico obtido do cultivo da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027, o extrato butanólico da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 e o controle do MeOH no qual as amostras foram dissolvidas

A análise dos espectros de massas dos extratos butanólicos dos experimentos de eliciação na fase estacionária também mostra que não houve a produção de novos compostos. Esses resultados indicam que os eliciadores

utilizados não estimularam a biossíntese de novos compostos pela actinobactéria. Em alguns casos ocorreu apenas a inibição dos compostos já produzidos pela actinobactéria.

Quando dois micro-organismos são cultivados juntos, eles geralmente tornam-se competidores. É preciso determinar a concentração mínima necessária de eliciador de modo que não ultrapasse o crescimento do organismo produtor. Alterar as condições do meio de cultura e outras condições ambientais ajudam a manter o crescimento do eliciador sob controle (LUTI; MAVITUNA, 2011). No caso dos experimentos realizados por Luti e Mavituna (2011) a eliciação de *Streptomyces coelicolor* com *E. coli* aumentou a produção de undecilprodigiosina quando ambas foram cultivadas simultaneamente em bioreator. O composto undecilprodigiosina é produzido em baixas quantidades pela cultura simples dessa actinobactéria. As condições para que a cultura de *E. coli* não ultrapasse a cultura da actinobactéria foram controladas pelo biorreator.

No caso dos experimentos realizados em mesa agitadora não há como ter o controle do crescimento microbiano. No caso da eliciação com *P. aeruginosa*, ela inibiu o crescimento da actinobactéria quando ambas foram cultivadas no tempo zero, dessa forma, só foi observado o composto produzido por esse micro-organismo. Porém, na literatura, há vários exemplos que o cultivo misto de micro-organismos no qual houve a biossíntese de novos compostos (RATEB et al., 2013; TAXLER et al., 2013; PETTIT, 2009; OH et al., 2007; OH et al., 2009).

4.10 Cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp RTD22 em diferentes meios de cultura

A actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foi cultivada em outros meios de cultura no intuito de verificar se a composição do meio de cultura poderia influenciar na biossíntese de novos compostos. A actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foi cultivada nos meios sólidos ISP-1 ao ISP-7 no período de 7 dias. Após esse período foram obtidos os extratos acetato de etila e acetonitrila:água (1:1).

Esses extratos foram analisados por espectrometria de massas para verificar se a mudança no meio de cultura induziu a produção de novos metabólitos secundários. Os Anexos 6, 7, 8 e 9 mostram os espectros de massas dos extratos e dos controles dos meios. Nas análises foi possível observar a presença da

grisorixina em praticamente todos os extratos acetato de etila, exceto nos meios ISP-1 e ISP-6, nos quais a actinobactéria apresentou pouco crescimento e praticamente não houve a produção da grisorixina. Nos extratos acetonitrila:água também não foi possível identificar nenhum novo metabólito, todos os íons observados também estão presentes nos controles dos meios de cultura. Apesar dos meios ISPs apresentarem composições bem variadas eles não induziram a biossíntese de outros compostos por essa actinobactéria nas condições de tempo e temperatura avaliadas.

4.11 Sequenciamento genético da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22

O sequenciamento da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 foi realizado no intuito de aprofundar as abordagens genômicas com esse micro-organismo. O sequenciamento genético permite conhecer o potencial biossintético de um micro-organismo e pode fornecer subsídios para a manipulação de vias biossintéticas (DE OLIVEIRA et al., 2013).

No caso de *Streptomyces* sp. RTd22, o ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**) é o principal composto produzido por essa actinobactéria, e o conhecimento de seu genoma pode possibilitar a manipulação desta via de biossíntese.

O genoma da actinobactéria foi sequenciado utilizando-se a tecnologia Illumina MiSeq (2 x 250 bp (300 ciclos) Kit), em colaboração com a Profa. Dra. Luciana G. de Oliveira (IQ-UNICAMP), durante seu estágio de pós-doutoramento na Universidade de Cambridge, Inglaterra (2013).

A sequência foi organizada em 199 contigs e o genoma deste micro-organismo foi estimado em cerca de 11 milhões de pares de bases (Mb). Uma análise prévia utilizando o servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) possibilitou uma visão geral dos subsistemas presentes no genoma (438) e o número de sequências codantes (9614). Foram identificados 15 fatores de iniciação da transcrição (*sigma factor*), componentes do RNA bacteriano que guiam a transcrição de genes regulatórios específicos e subsistemas relacionados a biossíntese de metabólitos secundários, ácido graxos, lipídeos e isoprenóides e sideróforos (Figura 74).

Figura 74 - Distribuição das categorias dos subsistemas presentes no genoma de *Streptomyces* sp. RTd22, obtido pelo servidor RAST.

Com os resultados do sequenciamento, primeiramente foi feita a análise *in silico* de possíveis *clusters* biossintéticos. A plataforma antiSMASH (*Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell*) (MEDEMA et al., 2011) foi usada para a análise do sequenciamento. A análise via antiSMASH revelou a presença de pelo menos 40 *clusters* biossintéticos responsáveis pela produção de metabólitos secundários pertencentes aos seguintes grupos: t1-PKS, NRPS, terpeno, lantipeptídeos, sideróforos, butirolactona, bacteriocina, ectoína e vias mistas NRPS-t1-pks-transAT-pks, NRPS-butirolactona-t1-pks, bacteriocina-lantipeptídeo, terpeno-NRPS-t1-pks, terpeno-t2-pks, NRPS-transAT-pks, t1-pks-oligossacarídeo.

Para a identificação em nível de espécie foi sequenciado o 16S rRNA. Os *gaps* foram complementados utilizando o sequenciamento genômico, totalizando 1315 nucleotídeos. O banco de dados GenBank foi utilizado para analisar a sequência e três espécies foram sugeridas: *S. hygroscopicus*, *S. endus* e *S. platensis*. Segundo a literatura essas três espécies não possuem diferenças fenotípicas suficientes para serem consideradas espécies diferentes, seriam apenas variantes de *S. hygroscopicus* (TRESNER; BACKUS, 1956). Além disso, estudos relatam que as sequências de 16S rRNA não são necessariamente um critério suficiente para determinar a espécie de um organismo (FOX et al., 1992). A análise por antiSMASH indicou grande similaridade dos *clusters* de *Streptomyces* sp. RTd22 com os *clusters* de *S. hygroscopicus* ATCC 53653, que também apresenta um

grande genoma (11 Mb) com um alto número de *clusters* biossintéticos (39) de acordo com o antiSMASH. Esses resultados sugerem que RTd22 seja uma linhagem de *Streptomyces hygrosopicus*; entretanto, não é possível fazer esta afirmação sem estudos mais aprofundados.

Analisando os *clusters* de PKS, foi possível identificar o *cluster* responsável pela produção da grisorixina (Figura 75). Já para os *clusters* de NRPS foi possível identificar dois *clusters* com alta cobertura e similaridade para os compostos himastatina (**S22-4**) e coeliquelina (**S22-5**) (BARONA-GÓMEZ et al., 2006; CHALLIS; RAVEL 2000; MA et al., 2011) (Figuras 78 e 80). Os demais *clusters* presentes não estavam totalmente completos (de acordo com a análise feita pelo antiSMASH) ou não apresentaram similaridade com banco de dados, o que dificultou a identificação de possíveis metabólitos secundários.

Figura 75 - Organização do *cluster* biossintético da grisorixina (R) e sua homologia com *cluster* biossintético da nigericina (S), obtido através da plataforma do antiSMASH.

A organização do *cluster* biossintético da grisorixina foi comparada com o *cluster* biossintético da nigericina, uma vez que são compostos análogos (HARVEY et al., 2007). A análise feita pelo antiSMASH permitiu fazer a determinação das ORFs (*open reading frame*) da grisorixina com proteínas de *Streptomyces violaceusniger* DSM4137, produtora da nigericina, como mostra a Tabela 23.

Tabela 23 - Funções das ORFs da grisorixina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura (HARVEY et al., 2007).

ORF	Função na biossíntese da nigericina	Homologia com proteínas, Organismo, Identidade (%), Cobertura (%)
204	Metiltransferase dependente de SAM	<i>nigE</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 85, 99
205	Genes modulares PKS	<i>nigAI</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 72, 101
207	Genes modulares PKS	<i>nigAII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 77, 101
209	Genes modulares PKS	<i>nigAIII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 77, 102
210	Genes modulares PKS	<i>nigAIV</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 76, 101
212	Genes modulares PKS	<i>nigAV</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 75, 102
213	Genes modulares PKS	<i>nigAVI</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 77, 100
214	Tioesterase como <i>monCII</i>	<i>nigCII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 82, 99
215	Gene PKS auxiliar	<i>nigAXI</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 88,82
217	Gene PKS auxiliar	<i>nigAX</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 68,100
216	Epoxidase dependente de FAD	<i>nigCI</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 84,99
218	Ciclase	<i>nigBI</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 93,100
219	Ciclase	<i>nigBII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 88, 99
221	Gene modular PKS	<i>nigAIX</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 77, 101
223	Gene modular PKS	<i>nigAVIII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 79,100
224	Gene modular PKS	<i>nigAVII</i> , <i>S. violanaceusniger</i> DSM4137, 70,100

Através da análise do *cluster* da grisorixina foi possível verificar a ausência da enzima análoga a *nigD* (citocromo P450 mono-oxigenase) da nigericina, responsável pela oxidação do grupo metila terminal da nigericina (C-30) (Figura 76). Esse tipo de oxidação também é observada na biossíntese dos ionóforos nanchangamicina e monensina A (HARVEY et al., 2007). Estudos mostram que a fermentação da linhagem produtora de nigericina na presença de um inibidor de citocromo P450 mono-oxigenase levou a produção da grisorixina, evidenciando que essa oxidação é a última etapa da biossíntese da nigericina (OIKAWA et al., 1992; MOUSLIM et al., 1995). Todas as ORFs apresentaram alta identidade com as proteínas da linhagem *Streptomyces violanaceusniger* DSM4137 relacionadas à biossíntese da nigericina.

Figura 76 - Estrutura química da nigericina evidenciado a oxidação pela citocromo P450 mono-oxigenase

Outro *cluster* biossintético analisado foi o de peptídeo não ribossomal (NRPS) que apresenta alta homologia com as proteínas de *Streptomyces*

hygroscopicus ATCC 53653 relacionadas à biossíntese do NRPS himastatina (Figura 77). A organização das ORFs desse *cluster* biossintético (Figura 78) foi comparada ao *cluster* da himastatina (MA et al., 2011), conforme pode ser observado na Tabela 24.

Figura 77 - Estrutura química da himastatina (S22-4)

Figura 78 - Organização do *cluster* biossintético de NRPS obtido através da plataforma do antiSMASH (T) e sua homologia com o *cluster* biossintético da himastatina (U) (adaptado de MA et al., 2011).

Tabela 24 - Funções das ORFs da himastatina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura (MA et al., 2011).

ORF	Função na biossíntese da himastatina	Homologia com proteínas, Organismo, Identidade(%), Cobertura(%)
373	Regulador transcricional TetR	Orf(-2), <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99,99
374	Metiltransferase dependente de SAM	Orf(-1), <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 97, 100
376	Regulador transcricional MerR	HmtA, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 92,97
380	Acetilglutamato quinase	HmtB, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 94, 100
381	Regulador negativo	HmtC, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 100, 100
383	Suposto regulador	HmtD, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99,100
387	Proteína hipotética	HmtE, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 100, 100
388	NRPS	HmtF, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 96, 100
391	Acil-CoA desidrogenase	HmtG, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
392	Tioesterase	HmtH, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
394	NRPS	HmtI, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100
395	Tioesterase	HmtJ, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
398	NRPS	HmtK, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100
402	NRPS	HmtL, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100

403	Peptideo mono-oxigenase	HmtM, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
406	Enzima do tipo P-450	HmtN, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
408	Proteína hipotética	HmtO, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100
410	Proteína hipotética	HmtP, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
413	Transportador ABC	HmtQ, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
414	Transportador do tipo ABC-2	HmtR, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100
415	Enzima do tipo P450	HmtS, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 100
416	Enzima do tipo P450	HmtT, <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 99, 100
417	O-metilesterase	Orf (+1), <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 98, 95
418	Suposto regulador transcricional	Orf(+2), <i>S. hygroscopicus</i> ATCC 53653, 97, 99

Pelas análises obtidas de homologia, todas as ORFs apresentam alta identidade com as proteínas da linhagem *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 relacionadas à biossíntese do composto himastatina, evidenciando que esse é um metabólito presente no genoma desse micro-organismo, porém ele não foi expresso nas condições de laboratório usadas neste trabalho.

A himastatina, um ciclohexadepsipeptídeo dimérico, foi isolada de *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 por LAM e colaboradores (1990). Essa linhagem foi isolada de uma amostra de solo coletada no estado de Himachal Pradesh, na Índia. Esse composto apresentou atividade antitumoral *in vivo* contra leucemia P338 e melanoma B16 em ratos e também atividade contra várias bactérias Gram-positivas. Em 1996, a estrutura da himastatina foi proposta e consiste de uma D-valina, um ácido L- α -hidroxi-isovalérico, uma D-treonina, um ácido (3*R*, 5*R*)-5-hidroxipiperázico, uma L-leucina, uma D-treonina e um 2- ácido carboxílico (2*R*, 3*aR*, 8*aR*)-3*a*-hidroxihexahidropirrol [2,3*b*] indol em cada monômero (LEET et al., 1996). Posteriormente em 2011, o *cluster* biossintético da himastatina foi determinado o que possibilitou determinar todas as etapas e enzimas envolvidas no processo de biossíntese desse metabólito (MA et al., 2011).

Outro *cluster* de NRPS analisado apresentou alta homologia com proteínas de *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 e *Streptomyces coelicolor* A3(2). A organização das ORFs desse *cluster* biossintético (Figura 80) foi comparado ao *cluster* da coeliquelina (Figura 79), um sideróforo produzido por *Streptomyces coelicolor* A3(2) (BARONA-GOMÉZ et al., 2006), conforme pode ser observado na Tabela 25.

Figura 79 - Estrutura química da coeliquelina (S22-5)

Figura 80 - Organização do *cluster* biossintético de NRPS obtido através da plataforma antiSMASH (V) e sua homologia com o *cluster* biossintético da coeliquelina (W) (adaptado de BARONA-GOMÉZ et al., 2006).

Tabela 25 - Funções das ORFs da coeliquelina comparada com as análises de homologia obtidas do antiSMASH e dados da literatura (BARONA-GOMÉZ et al., 2006).

ORF	Função na biossíntese da himastatina	Homologia com proteínas, Organismo, Identidade(%), Cobertura(%)
359	Formil transferase	cchA, <i>S.coelicolor</i> A(3)2, 91, 100
360	L-ornitina-N5-mono-oxigenase	cchB, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 84, 100
362	Transportadores do tipo ABC	cchC, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 89,93
363	Transportadores do tipo ABC	cchD, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 85, 99
365	Transportadores do tipo ABC	cchE, <i>S.coelicolor</i> A(3)2, 88,98
367	Receptor de lipoproteína sideróforo-férrico	cchF, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 79,99
368	ATPase/permease de exportação	cchG, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 87, 99
372	NRPS coeliquelina	cchH, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 81, 100
374	ATPase/permease de exportação	cchI, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 86, 95
375	Tioesterase	cchJ, <i>S. coelicolor</i> A(3)2, 79,93

Pelas análises realizadas pode-se observar que muitas das ORFs apresentam homologia com as proteínas relacionadas à biossíntese da coeliquelina, porém algumas ORFs no início e no final do *cluster* não apresentaram correlação com o *cluster* da coeliquelina, sugerindo que esse *cluster* pode corresponder a um metabólito secundário similar a coeliquelina, podendo apresentar modificações diferentes. Porém a coeliquelina, ou composto análogo, não foram identificados nos extratos obtidos nas condições de cultivo laboratoriais empregadas neste trabalho.

A coeliquelina (**S22-5**) foi identificada em 2005 por Lautru e colaboradores, através do emprego do *genome mining* para a linhagem *Streptomyces coelicolor* A(3)2 na busca por metabólitos crípticos, os quais nunca foram isolados e caracterizados, mas podem que ser deduzidos a partir da via biossintética na análise genômica (SEYEDSAYAMDOST; CLARDY, 2014). A coeliquelina é formada por três aminoácidos L- δ -N-formil- δ -N-hidroxiornitina, L-treonina e L- δ -N-hidroxiornitina e também é considerada um sideróforo (BARONA-GÓMEZ et al., 2006).

4.12 Deleção do gene homólogo à flavina mono-oxigenase *nigC1* da nigericina

Vários estudos relacionados têm sido feitos com as enzimas responsáveis pela epoxidação e ciclização dos anéis que atuam durante a biossíntese dos ionóforos. A enzima flavina mono-oxigenase *monC1* é a enzima responsável pela etapa de epoxidação em um precursor trieno linear, como é mostrado na biossíntese da monensina A e B (Figura 81) (HÜTTEL et al., 2014; OLIYNYK et al., 2003; LEADLAY et al., 2001).

Figura 81 - Proposta para a biossíntese da monensina A e B por *Streptomyces cinnamomensis*. A via dos policetídeos produz um precursor trieno, o qual é transferido para uma proteína carreadora de acil (ACPX). Após as ciclações oxidativas, o produto da ligação ACP é finalmente hidrolisado pela *MonCII* originando as monensinas (adaptado de HÜTTEL et al., 2014)

Nos estudos feitos com a monensina, quando o gene responsável pela produção da enzima *monCI* é deletado através de recombinação homóloga, não ocorre produção de monensina A ou monensina B pelo mutante, ocorrendo a acumulação do precursor *E,E,E*-trieno (BHATT et al, 2005) (Figura 82). Esses resultados confirmam que a enzima *monCI* é essencial para a biossíntese da monensina e que todas as configurações *E* são os alvos para a epoxidase iniciar a ciclação oxidativa (BHATT et al., 2005). Os genes *nanC*, *nigCI* e *lasC* dos *clusters* biossintéticos dos ionóforos poliéteres nanchangamicina, nigericina e lasalocida, respectivamente, têm alta sequência homóloga com o gene da monensina *monCI*, indicando que estes genes também realizam a função de epoxidase com seus

respectivos *clusters* (HARVEY et al., 2007 e SMITH et al., 2008). Somente uma mono-oxigenase tem sido encontrada em cada cepa produtora de policetídeo, o que fortalece a ideia que esses genes de mono-oxigenase são únicos e fundamentais para a biossíntese dos poliéteres.

Figura 82 - Precursores *E,E,E*-trienos da monensina A e B quando o gene *monCI* é deletado (BHATT et al., 2005).

Com base nos dados da literatura, experimentos de recombinação homóloga foram desenvolvidos a fim de se tentar provar que a flavina mono-oxigenase está envolvida na biossíntese da grisorixina. Para isso, foi feita a interrupção do gene que é análogo ao *nigCI*, da nigericina. Essa interrupção poderia levar ao acúmulo do precursor poliênico da grisorixina, ou à produção de outros metabólitos, uma vez que a via de biossíntese do principal composto estaria sendo alterada geneticamente.

4.12.1 Amplificação por PCR das regiões que flanqueiam o gene análogo ao gene *nigCI* - flavina mono-oxigenase

A primeira etapa consistiu em fazer a deleção de parte do gene da enzima mono-oxigenase. Foram desenhados *primers* com a ajuda do programa Geneious (KEARSE et al., 2012), para amplificar as regiões que flanqueiam o gene análogo ao *nigCI* (*Primers*: Primer_FMNO_FI, Primer_FMNO_FII, Primer_FMNO_RI, Primer_FMNO_RII - Tabela 8 do item 3.13.4). Esse gene contém 1431 pb (pares de base), e foram deletados 1035 pb da região central do gene. Portanto, o gene ficou no final com 396 pb. A Figura 83 mostra o esquema da deleção. A primeira

amplificação (esquerda) tem 1908 pb e a segunda (direita) 1956 pb. Essas regiões foram amplificadas por PCR, conforme mostra o gel de eletroforese (Figura 84).

Figura 83 - Representação da estratégia adotada para promover a deleção do gene alvo. Pequenas sequências complementares ao plasmídeo são mostradas em verde e a sobreposição complementar entre as regiões que flanqueiam o gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina (*nigC1*) são mostradas em vermelho.

Figura 84 - Eletroforese da amplificação da região com 1908 pb (1) e da região com 1956 pb (2).

4.12.2 Obtenção do mutante

O plasmídeo suicida pYH7 foi usado para a criação do plasmídeo de deleção para o gene análogo à flavina mono-oxigenase da nigericina *nigC1*. Este plasmídeo trabalha de forma muito eficaz para deleções de genes (SUN et al., 2009). Ele não tem uma origem estável de replicação em *Streptomyces* e é

facilmente perdido através de um evento de recombinação na ausência de antibiótico de seleção (SMITH et al., 2008). A fim de fazer uma deleção no genoma, o plasmídeo deve conter as regiões de DNA que flanqueiam os genes-alvo. Os *primers* para amplificar estas regiões foram desenhados de modo que o tamanho das regiões flanqueadas foram 1908 e 1956 bp. A parte deletada do gene deve conter 3n nucleotídeos para manter a janela de leitura e evitar os efeitos polares de genes adjacentes. O DNA genômico da linhagem selvagem foi utilizado como um molde para PCR. Para a ligação dos três fragmentos, foi utilizado o método de montagem isotérmica (GIBSON et al., 2009), que permite a introdução das regiões flanqueadas amplificadas dentro do plasmídeo pYH7, previamente digerido com *NdeI*. O mix isotérmico é um mix de três enzimas: a) T5 exonuclease, a qual remove nucleotídeos da dupla fita de DNA no sentido 5' - 3', b) *Phusion* DNA polimerase, que preenche as lacunas na sobreposição das fitas simples de DNA e c) *Taq* DNA ligase, que liga os fragmentos remanescentes (Figura 85).

Figura 85 - Plasmídeo pYH7 e as etapas da reação pelo de montagem isotérmica (GIBSON et al., 2009).

Após realizada a ligação dos três fragmentos, 10 μ L da mistura foram transformados em células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes. Após a incubação *overnight* a 37 °C foi observado um significativo número de colônias nas placas. Cerca de 96 colônias foram selecionadas e realizado o PCR de colônia e gel de eletroforese para verificar se houve a incorporação dos fragmentos no plasmídeo. As colônias 6, 54, 56, 66, 67, 82, 86 e 91, apresentaram resultado positivo no PCR de colônia, evidenciando que houve a incorporação dos fragmentos. Todas as colônias que deram resultado positivo e uma colônia com resultado negativo (74—escolhida aleatoriamente), foram cultivadas *overnight* em 2 mL de meio LB com apramicina para purificação dos plasmídeos e análise com a enzima de restrição *NdeI*. O gel de agarose, após eletroforese, revelou uma banda acima de 10000 pb, correspondente ao tamanho do vetor pYH7 que apresenta 10325 pb e uma banda entre 3500 e 4000 pb que corresponde ao tamanho dos fragmentos incorporados (3792 pb). A Figura 86 mostra a análise da reação de restrição feita para os nove plasmídeos isolados.

Figura 86 - Gel de agarose da análise da reação de restrição feita com *NdeI*

A análise da reação de restrição para os plasmídeos isolados revelou que muitos deles contêm os fragmentos inseridos no tamanho correto, exceto o plasmídeo 67 que apresentou um tamanho diferente dos demais. O plasmídeo 56 foi escolhido para ser sequenciado a fim de confirmar se a construção da deleção ficou correta. O sequenciamento foi feito pelo método Sanger e foi realizado pela empresa

Helixxa. Foi feito o alinhamento do gene análogo ao gene *nigCI* com o sequenciamento feito para plasmídeo 56, como pode ser observado na Figura 87.

O plasmídeo de deleção 56 foi denominado pLVΔ*griCI*, e posteriormente foi utilizado para o experimento de conjugação com *Streptomyces* sp. RTd22.

Figura 87 - Alinhamento do gene análogo ao gene *nigCI* (deleção dos 1034 pb), com o sequenciamento do plasmídeo pLVΔ*griCI*. O alinhamento foi feito pelo programa Geneious. As regiões em azul são os sequenciamentos feitos com os primers FMNO_FI, FMNO_RI, FMNO_FII e FMNO_RII. Cada sequenciamento tem um tamanho de 1000 pb.

Como pode-se observar, o sequenciamento revela que a ligação das regiões que flanqueiam o gene *griCI* com o plasmídeo pYH7 foi satisfatória.

O plasmídeo pLVΔ*griCI* foi transformado em células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 e estas foram submetidas aos experimentos de conjugação com *Streptomyces* sp. RTd22 (Figura 88). Potenciais exconjugantes apareceram com 7 dias de incubação a 30 °C. Os exconjugantes foram transferidos para novas placas de SFM contendo apramicina (Apr) – para confirmar sua resistência a Apr conferida pelo plasmídeo inserido – e ácido nalidíxico – para inibir o crescimento de *E. coli*. A resistência a Apr confirmou o primeiro evento de *crossover*. As colônias resistentes a

Apr foram estriadas em placas de SFM livre de antibiótico para permitir o segundo evento de *crossover*. As colônias isoladas foram repicadas simultaneamente em placas com e sem Apr. Os clones que apresentaram fenótipo sensível a Apr foram identificados como potenciais mutantes. As colônias sensíveis a Apr foram inoculadas em meio líquido TSBY e as células foram usadas para purificação do DNA genômico para a confirmação da presença ou ausência da mutação. Todo o processo de mutação levou em torno de 15 a 30 dias. A Figura 88 mostra as placas para a obtenção da mutante.

Figura 88 - Conjugação e triagem para obtenção de possíveis mutantes de *Streptomyces* sp. RTd22: após detectar colônias resistentes a Apr (1º *crossover*), as mesmas foram estriadas em placas de SFM sem Apr (2º *crossover*). Colônias isoladas foram repicadas em placas de SFM com e sem apramicina para selecionar colônias sensíveis a Apr o qual é indicador de um segundo *crossover*. As estrelas na imagem mostram os clones que se apresentaram sensíveis a Apr.

Para realizar a análise de PCR os *primers* foram desenhados de forma que um fragmento de tamanho mais longo seria amplificado para a linhagem selvagem e tamanho menor seria amplificado para a deleção (Figura 89). A Figura 90 mostra a triagem feita por PCR para verificar a mutação. Os *primers* utilizados nessa amplificação foram Primer_conf_F e Primer_conf_R (Tabela 8 - item 3.13.4).

Figura 89 - Esquema da triagem por PCR dos potenciais mutantes

Figura 90 - Confirmação por PCR para possíveis mutantes de *Streptomyces* sp. RTd22 (WT-linhagem selvagem, pLVΔgriCI - plasmídeo de deleção)

Os DNAs de sete dos oito clones que aparentemente mostraram-se mutantes foram analisados por PCR para verificar a presença ou ausência da mutação. Como pode-se observar (Figura 90), todos os DNAs apresentam o mesmo tamanho do DNA da linhagem selvagem (WT) o que indica que nenhum dos clones adquiriu a mutação desejada. Os clones deveriam estar com o mesmo tamanho do plasmídeo de deleção (pLVΔgriCI) para confirmar a presença da mutação. Para tentar obter os mutantes, as linhagens que apresentam resistência a Apr foram

novamente submetidas ao segundo *crossover*. Essa etapa foi repetida por quatro vezes porém em nenhuma delas houve a presença de possíveis mutante. Dessa forma, o experimento de conjugação foi repetido, porém a etapa de adição dos antibióticos (solução de apramicina e ácido nalidíxico) foi feita com 17, 18, 19 e 20h. Foram obtidos ao todo 34 clones no primeiro *crossover* e oito possíveis mutantes após o segundo *crossover*. Em seguida, foi isolado o DNA de cada clone e realizada a triagem por PCR. A Figura 91 mostra o gel de agarose com a triagem feita por PCR.

Figura 91 - Confirmação por PCR dos novos possíveis mutantes de *Streptomyces* sp. RTd22. (WT- linhagem selvagem, pLVΔgriCI plasmídeo de deleção)

Dos oito clones obtidos apenas dois deles apresentaram a mutação (17-5 e 17-6). Esses clones foram obtidos com a adição da solução de antibiótico com 17 horas. Posteriormente, o clone 17-5 foi cultivado em meio ISP-2 por um período de 7 dias para análise do perfil metabólico de *Streptomyces* sp. RTd22 após a deleção do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina - *nigCI*. O extrato acetato de etila foi analisado por UPLC-MS (Figura 92).

Figura 92 - Espectros de massas do metanol utilizado para dissolver as amostras, do extrato acetato de etila do meio líquido ISP-2 e do extrato acetato de etila do cultivo do mutante 17-5.

Pelas análises obtidas pode-se observar que não houve a produção da grisorixina pela ausência dos íons m/z 726 $[M+NH_4]^+$ e 731 $[M+Na]^+$, porém é possível observar alguns íons de baixa intensidade na região de m/z 740-840, como pode ser visto na ampliação dessa região (Figura 93). Os demais íons observados são referentes ao controle do meio de cultura e do metanol.

Figura 93 - Ampliação do espectro acetato de etila do cultivo do mutante 17-5, na região de m/z 740- 840

Analisando esses íons foi possível identificar que os pares de íons m/z 754 e 759, 768 e 773, 782 e 787, 796 e 801, 810 e 815 estão cationizados com amônio e sódio respectivamente, devido a diferença de 5 u entre eles. Dessa forma, foi possível identificar cinco compostos análogos com diferenças de 14 u entre eles e com massas de 736, 750, 764, 778 e 792 u. Utilizando o banco de dados DNP foi possível identificar que esses compostos podem se tratar da nonactina (**S22-6**), monactina (**S22-7**), dinactina (**S22-8**), trinactina (**S22-9**) e tetranactina (**S22-10**) (Figura 94).

- $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_3$, nonactina (**S22-6**)
 $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_3$, monactina (**S22-7**)
 $R_1 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = R_4 = \text{CH}_3$, dinactina (**S22-8**)
 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_4 = \text{CH}_3$, trinactina (**S22-9**)
 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, tetranactina (**S22-10**)

Figura 94 - Estruturas químicas da nonactina, monactina, dinactina, trinactina e tetranactina.

Esses compostos pertencem à família dos macrotetrolídeos de poliéteres cíclicos. Esses compostos são derivados do ácido nonático e homononático, foram isolados de várias espécies de *Streptomyces* e exibem um amplo espectro de atividade biológica como antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, inseticida, antiprotozoária, antitumoral e imunossupressiva (REZANKA et al., 2004; KWON et al., 2002).

Nesses experimentos de mutação constatamos que a deleção da enzima análoga a *nigC1* da nigericina inibiu a produção da grisorixina (**S22-2**), nenhum precursor desse metabólito foi identificado. Um possível precursor da grisorixina poderia ser um trieno linear, como acontece na deleção da enzima *monC1* da monensina (BHATT et al., 2005). Comparando os módulos de PKS da monensina com a nigericina (análogo da grisorixina) (HARVEY et al., 2007) foi possível prever um possível precursor da biossíntese da grisorixina, apresentando massa de 628 u (Figura 95), que poderia aparecer com m/z 629 $[M+H]^+$, 647 $[M+NH_4]^+$ e 651 $[M+Na]^+$ nas análises por espectrometria de massas, porém nenhum desses íons foram observados.

Figura 95 - Estrutura química do possível precursor da biossíntese da grisorixina

Foram feitas análises genômicas a fim de identificar o *cluster* da nonactina e seus análogos. Segundo a literatura, esses compostos pertencem à PKS do tipo II (WALCZAK et al., 2000; KWON et al., 2001; KWON et al., 2002). No PKS do tipo I cada reação é catalisada por enzimas multifuncionais que são organizadas em módulos e cada domínio opera apenas uma vez durante a síntese. No PKS tipo II, um pequeno número de proteínas individuais, cada uma com atividade distinta, forma um grande complexo multifuncional. Cada proteína no complexo catalisa uma reação química em cada ciclo de elongação e pode ser utilizada mais de uma vez, exceto o domínio de cetoreductase (WALCZAK et al., 2000).

Nas análises feitas pelo antiSMASH não há nenhum *cluster* referente à PKS tipo II. Como o *cluster* biossintético da nonactina está descrito na literatura (WALCZAK et al., 2000), este foi alinhado com o genoma de *Streptomyces* sp RTd22, e também foram realizadas buscas no genoma para cada gene pertencente ao *cluster* biossintético da nonactina. Alguns genes foram encontrados, mas não foi possível encontrar o *cluster* completo (Figura 96), além disso, esses genes encontrados não apresentaram alta identidade.

Figura 96 - Genes encontrados pelo alinhamento do genoma de *Streptomyces* sp RTd22 com o *cluster* da nonactina (vermelho). Busca isolada pelos demais genes (azul).

A análises genômicas sugerem que os compostos observados por espectrometria de massas podem não corresponder aos macrotetrolídeos de poliéteres cíclicos, sendo necessária uma análise mais profunda desses metabólitos.

Pode-se afirmar que o experimento de deleção do gene análogo à flavina mono-oxigenase da nigericina *nigCI* foi eficaz, uma vez que a linhagem mutante não produziu mais o composto majoritário grisorixina (**S22-2**) e biossintetizou outros compostos que não haviam sido previamente identificados na linhagem selvagem de *Streptomyces* sp RTd22.

5. CONCLUSÕES

O estudo químico das actinobactérias *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd22 levou à identificação de vários compostos produzidos por esses micro-organismos. As análises por espectrometria de massas, juntamente outros dados de RMN, UV e a utilização de banco de dados de produtos naturais foram de extrema importância para a identificação desses metabólitos.

A actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31 é produtora dos antibióticos macrolídeos concanamycinas A (**S31-1**), B (**S31-2**) e das anidro-agliconas das concanamycinas A (**S31-3**) e B (**S31-4**). As concanamycinas A e B também foram muito ativas nos ensaios citotóxicos em células tumorais, evidenciando que a atividade antitumoral observada nas frações pode estar relacionada a presença desses compostos. Os sideróforos nocardamina (**S31-7**), desoxi nocardamina (**S31-8**) e desferrioxamina B (**S31-9**) também foram produzidos por essa linhagem e foram identificados através das análises por espectrometria de massas e busca análises no banco de dados.

Já a actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 é produtora do ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**). Esse é o principal metabólito produzido por essa linhagem e foi identificado através das análises por espectrometria de massas, busca no banco de dados e perfil de fragmentação em comparação com a nigericina. Esse metabólito é responsável pelas elevadas atividade antibacterianas e citotóxicas em células tumorais observadas para as frações e subfrações obtidas do cultivo desse micro-organismo. Essa linhagem também é produtora dos sideróforos nocardamina (**S31-7**) e desoxi-nocardamina (**S31-8**), e também foram identificados através das informações de espectrometria de massas.

Para determinar o melhor tempo de produção das concanamycinas A (**S31-1**), B (**S31-2**), anidro-aglicona da concanamicina B (**S31-4**) e da grisorixina (**S22-2**), foi realizado o monitoramento da produção por UPLC-MS empregando a técnica SIM. Esses dados são importantes pois visam otimizar condições de cultivo das actinobactéria para a obtenção desses metabólitos em experimentos futuros.

Propostas de fragmentação por CID foram realizadas para as concanamycinas (**S31-1**, **S31-2**, **S31-3** e **S31-4**) e para a grisorixina (**S22-2**)

cationizada com sódio e com cobre. As propostas de fragmentação por CID foram importantes para a caracterização dos compostos e poderão servir para estudos futuros de desreplicação, uma vez em que não há dados na literatura para esses compostos. A fragmentação de metabólitos por espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil em estudos metabolômicos, porém há uma escassez desse tipo de análise na literatura e em banco de dados.

Algumas metodologias foram empregadas a fim de estimular outras vias biossintéticas desses micro-organismos, incluindo o experimento de cultivo misto com bactérias patogênicas. Porém, nas análises dos extratos por espectrometria de massas, não foi observada a produção de novos compostos sendo apenas observados os compostos já produzidos pelas actinobactérias. Para a actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 também foi realizado o experimento de cultivo em outros meios de cultura, porém nenhum novo composto foi identificado sendo apenas observada a presença do ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**). Esses resultados confirmaram a difícil tarefa de induzir vias biossintéticas crípticas em micro-organismos em condições laboratoriais.

O sequenciamento total do genoma da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 evidenciou o alto potencial biossintético a ser explorado para esse micro-organismo, uma vez que foi possível identificar vários *clusters* biossintéticos relacionados a metabólitos secundários. Através das análises pelo antiSMASH foi possível identificar o *cluster* da himastatina (**S22-4**) e de um outro NRPS no qual apresenta alta similaridade com a coeliquelina (**S22-5**), porém esses metabólitos não foram identificados nas análises das frações, podendo ser considerados metabólitos crípticos. Os *clusters* biossintéticos poderão servir para estudos futuros de *genome mining*, podendo ser planejados experimentos de expressão heteróloga, deleção ou expressão de reguladores transcricionais, com o intuito de investigar novos compostos codificados no genoma dessa linhagem.

Os experimentos de recombinação homóloga foram realizados para o *cluster* da grisorixina visando a deleção do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina (*nigC1*). Dois mutantes foram obtidos, um deles foi cultivado para a análise do perfil metabólico, no qual pode-se constatar que a grisorixina não foi produzida e nenhum precursor relacionado a esse metabólito foi observado. Porém, essa alteração genômica levou a produção de outros compostos que não foram produzidos pela linhagem selvagem.

Pode-se concluir que entre as estratégias utilizadas para a modulação das vias biossintéticas de *Streptomyces* sp RTd22, a recombinação homóloga foi a mais interferiu no metabolismo secundário, pois além de interromper a biossíntese de grisorixina (**S22-2**), foi a única estratégia que estimulou a produção de outros metabólitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R. M. **Handbook of Microbial Medium**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 1079 p.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Botânica Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MacCHERONI, Jr. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

BALTZ, R. H. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. **Microbe**, v.2, n. 3, p. 125-131, 2007.

BARONA-GÓMEZ, F.; LAUTRU, S.; FRANCOU, F. X.; LEBLOND, P.; PERNODET, J. L.; CHALLIS, G. L. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. **Microbiology**, v. 152, n.11, p. 3355-3366, 2006.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos micro-organismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

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

BERKEL, G. J. V. Electrolytic deposition of metals on to the high-voltage contact in an electrospray emitter: implication for gas-phase ion formation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 7, p. 773-778, 2000.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE S.; SCHUMPP O.; GINDRO K.; WOLFENDER J. L. 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.

BHATT, A.; STARK, C. B. W.; HARVEY B. M.; GALLIMORE A. R.; DEMYDCHUK Y. A.; SPENCER J. B.; STAUNTON J.; LEADLAY P. F. Accumulation of an E,E,E-triene by the monensin-producing polyketide synthase when oxidative cyclization is blocked. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, n. 43, p. 7075-7078, 2005.

BINDSEIL, K. U. & ZEECK, A. The chemistry of unusual macrolides. Part 2. Spectroscopic and biosynthetic investigations of the V-type ATPase inhibitor concanamycin A. **Liebigs Annalen Chemies**, v. 1994, n. 3, p. 305-312, 1994.

BODE, H. B.; BETHE B.; HOF, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBiochem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

BODE, H. B.; ZEECK, A. Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24'707. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 597-601, 2000a.

BODE, H. B.; ZEECK, A. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes. **Phytochemistry**, v. 55, n.4, p. 311-316, 2000b.

BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Thitonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 929-934, 2008.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008. 350f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CASTILLO, U. F.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVER, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M.; TELOW, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; STEVENS, D.; YAYER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v.148, n. 9, 2675–2685, 2002.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; MULLENBERG, K.; CONDRON, M. M.; TELOW, D. B.; FOLGIANO, V.; GALLO, M.; FERRACANE, R.; MANNINA, L.; VIEL, S.; CODDE, M.; ROBISON, R.; PORTER, H.; JENSEN, J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 2, p. 296–300, 2006.

CHAGAS, F.O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 2014. 339f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHALLIS, G. L.; RAVEL, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n.2, p. 111-114, 2000.

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

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 6th ed., Approved Standard (M7-A6)*. NCCLS/CLSI, Wayne, Pennsylvania - USA, 2003.

CONTI, R. **Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético**. 2012. 236f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n.6, p. 3670-3695, 2013.

CRAIG, M.; LAMBERT, S.; JOURDAN, S.; TENCONI, E.; COLSON, S.; MACIEJEWSKA, M.; ONGENA, M.; MARTIN, J. F.; WEZEL, G. V.; RIGALI, S. Unsuspected control of siderophore production by N-acetylglucosamine in streptomycetes. **Environmental Microbiology Reports** v. 4, n. 5, p. 512-521, 2012.

CREVELIN, E. J.; CANOVA, S. P.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; DA SILVA, R. E.; MORAES, L. A. B. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1602-1616, 2013.

CUER, A.; DAUPHIN G. Structure and conformation of bioconversion products of a carboxylic ionophorous antibiotic, grisorixin, by means of two-dimensional nuclear magnetic resonance, **Journal of Chemistry Society-Perkin Transactions 2**, p. 259-299, 1986.

DE OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

DROSE, S.; ALTENDORF, K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, n. 200, n. 1, p. 1-8, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVAR, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 785-793, 2004.

FORBES, M. W.; VOLMER, D. A. A comparison of data analysis methods for determining gas phase stabilities by CID: alkali metal complexes of polyether ionophore antibiotics. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 5, p. 779-791, 2005.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992.

FUKUSHIMA, R.; WEIMWE, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.1, p. 22-26, 2003.

GACHON, P.; KERGMARD A.; STARON, T.; ESTEVE, C. Grisorixin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group. I. Fermentation, isolation, biological properties and structure. **Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 5, p. 345-350, 1975.

GARCIA, D. F.; BAIDOO, E. E.; BENKE, P. I.; PINGITORE, F.; TANG, Y. J.; VILLA, S.; KEASLING, J. D. Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 233-239, 2008.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 243-248, 2005.

GIBSON D. G.; YOUNG L.; CHUANG R.; VENTER J. C.; HUTCHISON III C. A.; SMITH H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; BIBB, M. J. Heterologous expression of natural products biosynthetic gene cluster in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 425-431, 2014.

GONG, J.; JAISWAL, R.; MATHYS, J.; COMBES, V.; GRAU, G.; BEBAWY, M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 3, p. 226-234, 2012.

GROENEWOLD, G. S.; STIPDONK, M. J. V.; GRESHAM, G. L.; CHIEN, W.; BULLEIGH, K.; HOWARD, A. Collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of desferrioxamine siderophore complexes from electrospray ionization of UO_2^{2+} , Fe^{3+} and Ca^{2+} solution. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n.7, p. 752-761, 2004.

GROSS, H.; STOCKWELL, V. O.; HENKELS, M. D.; NOWAK-THOMPSON, R.; LOPER, J. E.; GERWICK, W. H. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene cluster. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, n. 1, p. 134-144, 2008.

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

GUINEA, R.; CARRASCO, L. Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 4, p. 2306-2312, 1995.

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.

HARVEY B. M.; MIRONENKO T.; SUN Y. H.; HONG H.; DENG Z. X.; LEADLAY P. F.; WEISSMAN K. J. HAYDOCK S. F. Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp DSM4137. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 6, p. 703-714, 2007.

HAYDOCK, S. F.; APPLEYARD, A. N.; MIRONENKO, T.; LESTER, J.; SCOTT, N.; LEADLAY, P. F. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3161-3169, 2005.

HUSS, M.; VITAVSKA, O.; ALBERTMELCHER, A.; BOCKELMANN, S.; NARDMANN, C.; TABKE, K.; TIBURCY, F.; WIECZOREK, H. Vacuolar H⁺-ATPases: intra- and intermolecular interactions. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 688-695, 2011.

HUTTEL, W.; SPENCER, J. B.; LEADLAY, P. F. Intermediates in monensin biosynthesis: a late step in biosynthesis of the polyether ionophore monensin is crucial for the integrity of cation binding. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 361-368, 2014.

IGARASHI, Y.; TRUJILLO, M. E.; MARTINEZ-MOLINA, E.; YANASE, S.; MIYANAGA, S.; OBATA, T.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; FUJITA, T.; FURUMAI, T.; Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 13, p. 3702-3705 2007.

ILIĆ, S. B.; KONSTANTINOVIĆ, S. S.; CVIJOVIĆ, G. D. G.; SAVIĆ, D. S.; VELJKOVIĆ, V.B. The impact of glycerol and some carbohydrates on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7. **Medicinal Chemistry Research** v. 22, n. 2, p. 934-937, 2013.

ITO, T.; MASUBUCHI, M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 5, p. 353-360, 2014.

IWAI, S.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 35, n. 2, p. 123-141, 1982.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; REZANKA, T.; KRASOWSKA, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

KALINOVSKAYA, N. I.; ROMANENKI, L. A.; IRISAWA, T.; ERMAKOVA, S. P.; KALINOVSKY, A. I. Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity. **Microbiological Research**, v. 166, n. 8, p. 654-661, 2011.

KATAOKA, T.; SHINOHARA, N.; TAKAYAMA, H.; TAKAKU, K.; KONDO, S.; YONEHARA, S.; NAGAI, K. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 10, p. 3678-3686, 1995.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics Applications Note**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KEVIN, D. A., II; MEUJO, D. A. F.; HAMANN, M. Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 109-146, 2009.

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. Practical *Streptomyces* genetics. United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000. 613 p.

KIM, E. S.; CHOI, C. Y.; COHEN, S. N. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2198-2203, 2001.

KINASHI, H.; SOMENO, K.; SAKAGUCHI, K. Alkaline degradation of concanamycin A. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 39, p. 3857-3860, 1981.

KINASHI, H.; SOMENO, K.; SAKAGUCHI, K. Isolation and characterization of concanamycin A, B and C. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 11, p. 1333-1343, 1984.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S. BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 446-458, 2003.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, In: BACON, C. W.; WHITE J. F. (eds) **Microbial endophytes**. New York: Dekker, 2000, p. 199-236.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 159-162, 2008.

KWON, H. J.; SMITH, W. C.; SCHARON, A. J.; HWANG, S. H.; KURTH, M. J. SHEN, B. C-O bond formation by polyketide synthase. **Science**, v.297, n. 5585, p. 1327-1330, 2002.

KWON, H. J.; SMITH, W. C.; XIANG, L.; SHEN, B. Cloning and heterologous expression of the macrotetrolide biosynthetic gene cluster revealed a novel polyketide synthase that lacks an acyl carrier protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n.14, p. 3385-3386, 2001.

LAM, K. S.; HESLER, G. A.; MATTEI, J. M.; MAMBER, S. W.; FORENZA, S.; TOMITA, K. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. Part I. Taxonomy of production organism, fermentation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 8, p. 956-960, 1990.

LAUTRU, S.; DEETH, R.; BAILEY, L. M.; CHALLIS, G. L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 265-269, 2005.

LEADLAY P. F.; STAUNTON J.; OLIYNYK M.; BISANG C.; CORTES J.; FROST E.; HUGHES-THOMAS Z. A.; JONES M. A.; KENDREW S. G.; LESTER J. B.; LONG P. F.; MCARTHUR H. A. I.; MCCORMICK E. L.; OLIYNYK Z.; STARK C. B. W.; WILKINSON C. J. Engineering of complex polyketide biosynthesis - insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 360-367, 2001.

LEE, H. S.; SHIN, H. J.; JANG, K. H.; KIM, T. S.; OH, K. B.; SHIN, J. Cyclic peptides of nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 623-625, 2005.

LEET, J. E.; SCHROEDER, D. R.; GOLIK, J.; MATSON, J. A.; DOYLE, T. W.; LAM, K. S.; HILL, S. E.; LEE, M. S.; WHITNEY, J. L.; KRISHNAN, B. S. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* Part. III Structural Elucidation. **The Journal of Antibiotic**, v. 49, n. 3, p. 299-311, 1996.

LI, H.; LU, C.; SHEN, Y. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 10, p. 595-599, 2010.
LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; STAUNTON, J.; GATES, P. J. Evidence for gas-phase redox chemistry inducing novel fragmentation in a complex natural product. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 358-363, 2004.

LU, C. H.; SHEN, Y. M. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 10, p. 649-653, 2007.

LUTI, K. J. K.; MAVITUNA, F. Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with *E. coli* in a bioreactor enhances undecyprodigiosin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 3, p. 281-285, 2011.

MA, J.; WANG, Z.; HUANG, H.; LUO, M.; ZUO, D.; WANG, B.; SUN, A.; CHENG, Y.-Q.; ZHANG, C.; JU, J. Biosynthesis of himastatin: assembly line and characterization of three cytochrome P450 enzymes involved in the post-tailoring oxidative steps. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 34, p. 7797-7802, 2011.

MACNEIL D.J.; GEWAIN K.M.; RUBY C.L.; DEZENY G.; GIBBSONS P.H.; MACNEIL T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. **Gene**, v. 111, n. 1, p. 61-68, 1992.

MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN W.; WANG, B.; PROKSCH, P. Co-cultivation - a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

MASUMA, R.; TANAKA, Y.; TANAKA, H.; OMURA, S. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. **Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 11, p. 1557-1564, 1986.

MATABUDUL, D.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. **Food Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 345-354, 2001.

MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; DE JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. W339-346, 2011.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; MAFFIOLI, S.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MOREE, W. J.; PHELAN, V. V.; WU, C-H.; BANDEIRA, N.; CORNETT, D. S.; DUGGAN, B. M.; DORRESTEIN, P. C. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 34, p. 13811-13816, 2012.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUSLIM, J.; CUER, A.; DAVID, L.; TABET, J. C. Biosynthetic study on the polyether carboxylic antibiotic, nigericin production and biohydroxylation of grisorixin by nigericin-producing *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 9, p. 1011-1014, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 30 years from 1981-2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NIELSEN, K. F.; MANSSON, M.; RANK, C.; FRISVAD, C.; LARSEN, O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2338-2348, 2011.

NISHIKAWA, M.; KATAGI, M.; MIKI, A.; TSUCHIHASHI, H. Forensic toxicological determination of surfactant by liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 2, p. 138-148, 2003.

NONAKA, K.; ABE T.; IWATSUKI, M.; MORI, M.; YAMAMOTO, T.; SHIOMI, K. OMURA, S.; MASUMA, R. Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 12, p. 769-774, 2011.

OH, D-C.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5267- 5273, 2005.

OH, D-C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in coprtng co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 515-520, 2007.

OIKAWA, H.; AIHARA, Y.; ICHIHARA, A.; SAKAMURA, S. Accumulation of grisorixin caused by treating a nigericin-producing strain with a P-450 inhibitor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 684, 1992.

OLIYNYK, M.; STARK, C. B. W.; BHATT, A.; JONES, M. A.; HUGHES-THOMAS, Z. A.; WILKINSON, C.; OLIYNYK, Z.; DEMYDCHUK, Y.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P. F. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1179-1190, 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720, 2002.

PÉREZ-SAYÁNS, M.; SOMOZA-MARTIN, J. M.; BARROS-ANGUEIRA, F.; REY, J. M. G.; GARCÍA-GARCÍA, A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. **Cancer Treatment Review**, v. 35, n.8, p. 707-713, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J. & Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: String-Verlag, 179-197, 1991.

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

PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 471-478, 2011.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO; N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In Carlton A. Taft. (Org). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2006, p. 51-78.

PURI, S. C.; BAZIR, A.; CLAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RATEB, M. E.; HALLYBURTON, I.; HOUSSEN, W.; BULL, A.; GOODFELLOW, M.; SANTHANAM, R.; JASPARS, M.; EBEL, R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. **RCS Advances**, v. 3, n. 34, p. 14444-14450, 2013.

REZANKA, T.; SPIZEK, J.; PRIKRYLOVA, V.; PRELL, A.; DEMBITSKY, V.M. Five new derivatives of nonactic and homo-nonactic acids from *Streptomyces globisporus*. **Tetrahedron**, v. 60, n. 22, p. 4781-4787, 2004.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n.2005, p. 80-84, 2005.

RUIZ, B.; CHÁVES, A.; FORERO, A.; GARCIA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUES-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

RUMJANEK, V. M.; SOUZA, K. W.; OLIVEIRA, M. C. M.; MAIA, R. C. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 103-112, 2003.

SANCHEZ, S.; DEMAİN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Natural Products Isolation. 2.ed. New Jersey: Humana Press, 2005. 515 p.

SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 315-340, 2004.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SEYEDSAYAMDOST, M. R.; CLARDY, J. Natural products and synthetic biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 10, p. 745-747, 2014.

SHARMA, A. D.; SINGH J. A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 2, p. 354-356, 2005.

SHEN, J.; BRODBELT, S. Characterization of ionophore-metal complexes by infrared multiphoton photodissociation and collision activated dissociation in a quadrupole ion trap mass spectrometry. **The Analyst**, v. 125, n. 4, p. 641-650, 2000.

SILVA, M. M.; BERGAMASCO, J.; LIRA, S. P.; LOPES, N. P.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R, G. S. Dereplication of bromotyrosine-derived metabolites by LC-PDA-MS and analysis of the chemical profile of 14 *Aplysina* sponge specimens from the Brazilian coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 886-894, 2010.

SMITH L.; HONG H.; SPENCER J. B.; LEADLAY P. F. Analysis of specific mutants in the lasalocid gene cluster: Evidence for enzymatic catalysis of a disfavoured polyether ring closure. **Chembiochem**, v. 9, n. 18, p. 2967-2975, 2008.

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

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, v. 64, n. 5, p. 263-268, 1998.

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.

SUN Y.; HE, X.; LIANG, J.; ZHOU, Z.; DENG, Z. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 303-310, 2009.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Antitumor activity of 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 86-91, 2007a.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1691-1695, 2005.

TAECHOWISAN, T.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S.; TAYLOR, W. C. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 203-211, 2007b.

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

THAKUR, D.; BORA, T. C.; BORDOLOI, G. N.; MAZUMDAR, S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal of Medical Mycology**, v. 19, n.3, p. 161-167, 2009.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1259-1277, 2010.

TRAXLER, M.F.; WATROUS, J.D.; ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P.C.; KOLTER, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00459-13, 2013.

TRESNER, H. D.; BACKUS, E. J. A broadened concept of the characteristics of *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 243-250, 1956.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DORR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v.34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WALCZAK, R. J.; WOO, A. J.; STROHL, W. R.; PRIESTLEY, N. D. Nonactin biosynthesis: the potential nonactin biosynthesis gene cluster contains type II polyketide synthase-like genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 171-175, 2000.

WANG, H.; LIU, N.; XI, L.; RONG, X.; RUAN, J.; HUANG, Y. Genetic screening strategy for rapid access to polyether ionophore producers and products in actinomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3433-3442, 2011.

WEI, G.; ZHU, N.; ZENG, Y.; SHEN, Y.; ZHAO P. Chemical constituents from endophytic *Streptomyces* sp. W5 isolated from *Trewia nudiflora* L. **Annals of Microbiology**, v.60, n. 2, p. 249-253, 2010.

WESTLEY, J.; LIU, C.-M.; SELLO, L. H.; EVANS, R. H.; TROUPE, N.; BLOUNT, J. F.; CHIU, A. M.; TODARO, L. J.; MILLER, P. A. The structure and absolute configuration of the 18-membered macrolide lactone antibiotic X-4357B (concanamycin A). **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 12, p. 1738-1740, 1984.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n.16, p. 1808-1832, 2010.

WOO, J. T.; SHINOHARA, C.; SAKAI, K.; HASUMI, K.; ENDO, A. Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 7, p. 1108-1116, 1992a

WOO, J. T.; SHINOHARA, C.; SAKAI, K.; HASUMI, K.; ENDO, A. Inhibition of the acidification of endosomes and lysosomes by the antibiotic concanamycin B in macrophage J774. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, n. 1, p. 383-389, 1992b.

WU, Z.; BAI, L.; WANG, M.; SHEN, Y. Structure-antibacterial relationship of nigericin derivatives. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 3, p. 333-337, 2009.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S.; Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Chinese Traditional and Herbal Drug**, v. 35, n.1, p. 79-81, 2004.

YOSHIMOTO, Y.; JYOJIMA, T.; ARITA, T.; UEDA, M.; IMOTO, M.; MATSUMURA, S.; TOSHIMA, K. Vacuolar-type H⁺-ATPases inhibitory activity of synthetic analogues of the concanamycins: is the hydrogen Bond network involving the lactone carbonyl, the hemiacetal hydroxyl group and C-19 hydroxyl group essential for the biological activity of the concanamycins? **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n.24, p. 3525-3528, 2002.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSHI, D.; HIGLEY, P; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 Espectro de massas de alta resolução da subfração 31-FAL 3.3.3

Anexo 2 - Espectros de massas do MeOH utilizado para a solubilização das amostras, branco da fração hexânica do meio sólido de arroz (BHS), branco da fração butanólica do meio sólido de arroz (BBS) e branco da fração butanólica do meio líquido ISP-2 (BBL)

Anexo 3 - Espectro de massas de alta resolução da fração 31-FBS

Anexo 4 - Espectros de massas de alta resolução da grisorixina presente na subfração 22-FAL-5

Anexo 5 - Espectro de fragmentação por CID do íon m/z 726, referente a grisorixina cationizada com amônio.

Anexo 6 - Espectros de massas (IDMS) dos extratos dos controles do meio de cultura extraídos com acetato de etila.

Anexo 7 - Espectros de massas dos extratos acetato de etila obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp.RTd22 nos meios ISP-1 ao ISP-7

Anexo 8 - Espectros de massas dos extratos dos controles do meio de cultura extraídos com acetonitrila:água.

Anexo 9 - Espectros de massas dos extratos acetonitrila: água obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp.RTd22 nos meios ISP-1 ao ISP-7