



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

“Design experimental para produção de Actinomicina D e avaliação da relação
estrutural vs atividade microbiana”

Amanda Carvalho de Godoi Rodrigues Pinto

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

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

“Design experimental para produção de Actinomicina D e avaliação da relação
estrutural vs atividade microbiana”

Amanda Carvalho de Godoi Rodrigues Pinto

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

Versão Corrigida

Orientador: Luiz Alberto Beraldo de Moraes

RIBEIRÃO PRETO -SP

2022

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.

Pinto C G R, Amanda

“Design experimental para produção de Actinomicina D e avaliação da relação estrutural vs atividade microbiana”.

75 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Moraes, Luiz Alberto B.

1. Actinobactéria. 2. Actinomicina D. 3. Microbiologia. 4. LC-MS. 5. Design experimental

Nome: PINTO C G R, Amanda

Título: “Design experimental para produção de Actinomicina D e avaliação da relação estrutural vs atividade microbiana”.

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é
o período mais difícil da vida de alguém”**

(Dalai Lama)

Agradeço a minha família, meus pais e meu irmão, por estarem ao meu lado nesse momento tão importante. Foram muitos desafios enfrentados nessa etapa e o apoio incondicional de vocês foi fundamental para trilhar esse caminho.

Ao meu namorado Bruno, que esteve ao meu lado durante todo o percurso, me estendendo a mão sem hesitar. Obrigada pela paciência, calma e pelos sacrifícios feitos durante esses anos.

A todos os meus amigos de laboratórios, com quem eu compartilhei momentos de conhecimento, alegria e companheirismo: Júlia, Ana Paula, Thalita, Fernanda, Fernando, Tânia, Osvaldo, Luana, Gabriela, Bruna, Henrique e Raquel.

A meu orientador Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por toda a paciência, disponibilidade e compreensão nos momentos de maior dificuldade. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado e pela amizade ao longo de todos esses anos.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e a Universidade de São Paulo por toda minha formação acadêmica e por todas as oportunidades a mim concedidas.

A CAPES, CNPq e a Fapesp por todo apoio financeiro na realização desse trabalho.

RESUMO

PINTO C G R, Amanda.: “**Design experimental para produção de Actinomicina D e avaliação da relação estrutural vs atividade microbiana**”. 2022, 75 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Os metabólitos secundários, produzidos por actinobactérias, são considerados uma fonte de novas substâncias com atividade biológicas, como antitumorais e antibióticos. Esses produtos têm sido obtidos após décadas de monitoramento e seleção de microorganismos. A molécula da actinomicina D é um cromopeptídeo, uma vez que possui dois anéis peptídicos cíclicos com cinco aminoácidos ligados ao cromóforo fenoxazinona. A actinomicina D é utilizada para tratar tumores malignos, como Rbdomiossarcoma da infância, tumor de Wilms e Sarcoma de Ewing, em combinações com outros agentes antitumorais, como vincristina e doxorrubicina, e radioterapia. Nesse trabalho realizou-se um estudo de designe experimental (Box-Behnken) visando aumentar a produção da Actinomicina D em processos fermentativos empregando a actinobactéria Caat 7-38 isolada do bioma caatinga. Obteve-se um modelo matemático preditivo e significativo para otimizar o meio de cultivo constituído por frutose, extrato de soja e carbonato de cálcio. Como resultado desse planejamento experimental foi obtido um aumento de aproximadamente 3 vezes da produção de Actinomicina D em relação a condições iniciais. Foram realizados também modificações estruturais da Actinomicina D, com o intuito de verificar a atividade antibiótica dos produtos formados. Foram realizadas reações de hidrólise e metanólise na porção éster localizado nos anéis despeptídicos da Actinomicina D. O produto formado na hidrólise não apresentou atividade antibiótica e o produto da metanólise apresentou atividade menor quando comparados a molécula da Actinomicina D intacta.

Palavras-chaves: 1. Actinobactéria. 2. Actinomicina D. 3. Microbiologia. 4. LC-MS. 5. Design experimental

ABSTRACT

PINTO C G R, Amanda.: **Experimental design for Actinomycin D production and evaluation of the structure vs. microbial activity relationship.** 2022, 75 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto

Secondary metabolites, produced by actinobacteria, are considered a great source of new substances with biological activity, such as antitumor and antibiotics. These products have been obtained after decades of monitoring and selecting microorganisms. Actinomycin D is used to treat malignant tumors such as childhood rhabdomyosarcoma, Wilms' tumor and Ewing's sarcoma, where it is used in combination with other antitumor agents such as vincristine and doxorubicin, and radiation therapy. The actinomycin D molecule is classified as a chromopeptide as it has two cyclic peptide rings with five amino acids attached to the phenoxazinone chromophore. In this work, an experimental design study (Box-Behnken) was carried out to increase the production of Actinomycin D in fermentation processes using the actinomycetes Caat 7-38 isolated from the Caatinga biome. A predictive and significant mathematical model was obtained to optimize the culture medium consisting of fructose, soy extract and Calcium Carbonate, which resulted in an increase of approximately 3 times the production of Actinomycin D. The structural modification of Actinomycin D was also carried out, in order to verify the antibiotic activity of the products. A hydrolysis and transesterification with methanol were carried out on the ester located in the cyclic peptide rings of Actinomycin D. The product formed in the hydrolysis did not show antibiotic activity and the methanolysis product showed lower activity than Actinomycin D without structural modification.

Palavras-chaves: 1.Actinobacteria. 2.Actinomycin D. 3.Microbiology. 4.LC-MS. 5. Experimental design

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antibióticos produzidos por actinobactérias ¹	18
Figura 2. O bioma caatinga ¹⁴	20
Figura 3. Estrutura molecular das actinomicinas, em particular da actinomicina ²²	23
Figura 4. Estrutura molecular da actinomicina D e intercalação com o DNA ²⁵ ..	25
Figura 5. Representação gráfica de um cromatógrafo líquido de alta eficiência e suas divisões ³⁵	27
Figura 6. Representação gráfica de um triplo quadrupolo onde na figura é representado Q1 e Q3 os analisadores e q2 o fragmentador ⁴¹	29
Figura 7. Cubo representando o planejamento multivariado BDD onde é possível observar pontos nas arestas e um ponto central ⁴²	32
Figura 8. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster mostrando os locais de quebra das ligações na molécula de éster genérico assim como a nomenclatura A,B, AC,AL, 1 e 2 ⁴⁷	35
Figura 9. Figura 8. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster utilizando hidróxido de sódio como catalisador ⁴⁷	35
Figura 10. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster utilizando um ácido forte como catalisador ⁴⁷	36
Figura 11. Representação genérica de uma reação de transesterificação de um éster com um álcool genérico e a obtenção de um outro éster e outro álcool ⁴⁸	36
Figura 12. Representação de uma reação de transesterificação entre a molécula de tereftalato de dimeila e um etileno glicol ⁴⁸	37
Figura 13. Propostas de modificações estruturais da Actinomicina D.....	43

Figura 14.Cromatogramas da produção de Actinomicina D nos diferentes meios e suas respectivas áreas, em $\lambda = 240\text{nm}$	49
Figura 15.Curva de crescimento bacteriano em relação ao tempo e as fases que o processo ocorre ⁵³	51
Figura 16.Cromatogramas da produção de Actinomicina D nos respectivos experimentos com volumes de pré-inóculo	51
Figura 17.Superfícies de resposta para a Actinomicina D. a)Carbonato de Cálcio(g/L) – Frutose (g/L); b) Extrato de Soja(g/L) – Frutose(g/L); c) Carbonato de Cálcio(g/L) – Extrato de Soja(g/L)	54
Figura 18.Parâmetros de desejabilidade	56
Figura 19.Superfícies de resposta para a Actinomicina D. a) Carbonato de Cálcio(g/L) – Frutose (g/L); b) Extrato de Soja(g/L) – Frutose(g/L); c) Extrato de Soja(g/L) – Carbonato de Cálcio(g/L).....	58
Figura 20.Parâmetros de desejabilidade	60
Figura 21.Hidrólise da Actinomicina D	62
Figura 22.Monitoramento por TLC da Hidrólise. 1.Produto da reação; 2. Extrato Bruto Caat 7-38	63
Figura 23.a) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38 b) ESI+ do pico em 7,09 min c) ESI+ do pico 7,65 min d) ESI+ do pico 6,88 min.....	64
Figura 24.a) Cromatograma LC-UV: 1 hora de reação. B) Cromatograma LC-UV: 26h de reação	64
Figura 25.Transesterificação com metanol da Actinomicina D.....	65
Figura 26.a) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38 b) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38, m/z 1271 c) ESI+ do	

pico em 8,78 min d) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38, m/z 1287 e) ESI+ do pico 6,36 min	66
Figura 27.a) Cromatograma LC-UV: 96 hora de reação. B) Cromatograma LC-UV: 144 h de reação	66
Figura 28.Bioensaio com bactéria 97 (<i>Streptococcus Agalactiae</i>). 1.Síntese NaOH; 2. Extrato bruto; 3. Síntese MeOH; 4. Actinomicina D Purificada; C.Tetraciclina	67
Figura 29.Bioensaio com bactéria xantomonas FDC12. 1.Síntese NaOH; 2.Extrato bruto; 3.Síntese MeOH; 4.Actinomicina D Purificada; C.Tetraciclina	68
Figura 30.Bioensaio com bactéria <i>Escherichia coli</i> K12 .1.Síntese NaOH; 2.Extrato bruto; 3.Síntese MeOH; 4.Actinomicina D Purificada; C.Tetraciclina	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Comparação entre diferentes analisadores de massas utilizados referente ao limite de massa, resolução e amostragem de íons ³³	30
Tabela 2. Planejamento Box-Behnken para um sistema de três variáveis ^{42,43} .	33
Tabela 3.Relação dos experimentos, volume de pré-inóculo e % no meio de cultivo	42
Tabela 4.Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento Box-Behnken.	43
Tabela 5.Volumes referentes ao pré-inóculo adicionados e suas respectivas áreas (uV/min).....	52
Tabela 6.Planejamento Box-Behnken	53
Tabela 7.ANOVA.....	55
Tabela 8.Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento Box-Behnken.	57
Tabela 9.Planejamento Box-Behnken e seus respectivos resultados	57
Tabela 10.ANOVA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AAC – Ligação acíclica

AI – Ligação alquílica

API – Ionização a pressão atmosférica

BBD – Box Behnken

BD – Meio de cultivo batata dextrose

CCD – *Central composite design*

DM – *Doehlert matrix*

DAD – Detector de arranjo de diodos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GYEA – Meio de cultivo extrato de levedura e glucose

ISP-2 – Meio de cultivo extrato de levedura

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a detector de massas

LC – UV – Cromatografia líquida acoplado a detector de ultra violeta

m/z – Razão massa carga

NRPS – Peptídeos não ribossômicos

pH - **Potencial** hidrogeniônico

PKS -Policetídeos sintetases

RPM – Rotação por minuto

RSM – *Response surface methodology*

RT – Tempo de retenção

SPE – *Solid phase extraction*

TSB – Caldo triptico de soja

TOF – Time of flight

U.M.A – Unidade de massa atômica

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Metabólitos secundários de microrganismos	16
1.2 Actinobactérias	18
1.3 Bioma Caatinga	19
1.4 Rizosfera	21
1.5 Actinomicina D	22
1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas	27
1.7 Box-Behnken	31
1.8 Hidrólise e Transesterificação de ésteres	34
2. OBJETIVOS DO TRABALHO	38
2.1 Objetivos específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODO	39
3.1 Microorganismo	40
3.2 Cultivo da actinobacteria Caat 7-38 em diferentes meios de cultivo..	40
3.3 Obtenção do extrato bruto	41
3.4 Fermentações com diferentes volumes de pré-inóculo	41
3.5 Desing Experimental (Box-Behnken)	42
3.6 Modificações estruturais da Actinomicina D	43

3.6.1	Reação de hidrólise	44
3.6.2	Reação de transesterificação com metanol	44
3.7	Bioensaio de disco de difusão	45
3.8	Condições cromatográficas	46
4.1	Cultivo da actinobacteria Caat 7-38 em diferentes meios	48
4.2	Fermentações com diferentes volumes de pré-inóculo	50
4.3	Desing Experimental (Box-Behnken)	52
4.4	Modificações estruturais da Actinomicina D	62
4.4.1	Reação de hidrólise	62
4.4.2	Reação de transesterificação com metanol	65
5	Conclusão	69
6	Referências	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabólitos secundários de microrganismos

Os organismos vivos utilizam rotas sintéticas muito semelhantes para a geração dos compostos necessários para a manutenção da vida, são os metabólitos primários, como por exemplo os açúcares, ácidos graxos, ácidos nucleicos e aminoácidos. Porém, existe também outras rotas sintéticas, que dão origem aos mais variados tipos de compostos que são utilizados para sinalização, defesa, interação com outros seres vivos e com o ambiente que está inserido, esses são os metabólitos secundários¹. Normalmente, a biossíntese dos metabólitos secundários é ativada na fase final do crescimento logarítmico do micro-organismo, quando a produção de biomassa e divisão celular já está no final e ocorrem por duas principais vias biossintéticas que são a síntese de policetídeos e a síntese de peptídeos não ribossômicos².

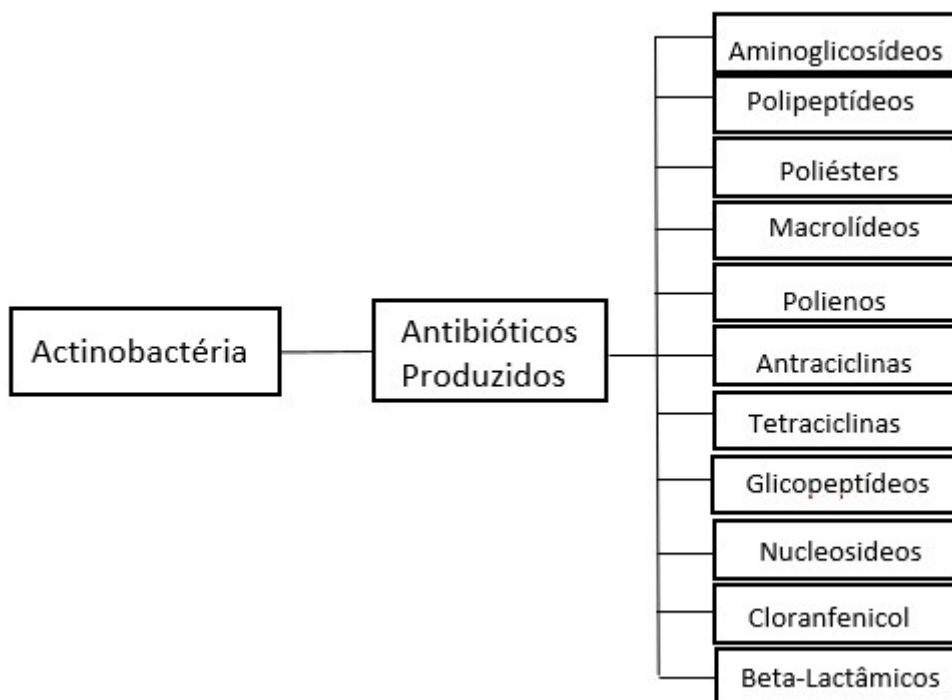
A biossíntese dos policetídeos ocorre através da condensação de subunidades propanoílicas e acetílicas sendo classificadas em quatro grupos: aromáticos, macrolídeos, poliésteres e polienos³. Os policetídeos são sintetizados pelos policetídeos sintetases (PKS), que são sistemas multi-enzimático. As sintetases modulam as funções dos policetídeos e a sua forma, catalisando as modificações estruturais através da adição de grupos funcionais. Os policetídeos sintetases são divididas com bases na sua organização genética e arquitetura enzimática, podendo ser do tipo I, tipo II ou tipo III⁴.

Já a via de peptídeos não ribossômicos (NRPS), são multi-enzimas gigantes, que formam peptídeos cíclicos ou lineares através de acoplamentos sequenciais de aminoácidos. As NRPS são responsáveis pela construção de peptídeos que possuem dispositivos para conectar ácidos graxos a L-

aminoácidos e D-aminoácidos. Os responsáveis por realizar o acoplamento são compostos com domínios enzimáticos que são trocados combinatoriamente formando novas máquinas de montagem, responsáveis por gerar novos peptídeos⁵.

Os metabólitos secundários são considerados uma grande fonte de novas substâncias com atividade biológicas, como antitumorais e antibióticos⁶. Esses produtos têm sido obtidos após décadas de monitoramento e seleção de micro-organismos². O isolamento de metabólitos bioativos possibilitou a descoberta de milhares de compostos que foram descritos na literatura⁷.

Dentre as diversas fonte de metabolitos secundários, as actinobactérias são consideradas as bactérias mais valiosas para exploração biotecnológica para a produção de metabólitos secundários. Aproximadamente 10.000 metabólitos bioativos são produzidos por Actinobactéria, que representa 45% de todos os metabólitos microbianos bioativos descobertos os procariontes mais econômica e biotecnologicamente viáveis, mantendo um lugar de destaque devido sua diversidade e capacidade em produzir compostos, principalmente os antibióticos⁸.

Figura 1. Antibióticos produzidos por actinobactérias¹

1.2 Actinobactérias

Em um aspecto geral, as actinobactérias são um tipo de bactérias Gram-positivas com uma alta concentração de ligação guanina e citosina em seu DNA. Essas bactérias são filamentosas e estão distribuídas em dois principais ecossistemas: aquático e terrestre. As actinobactérias se desenvolvem através das rotas metabólicas que compõem os metabolitos primários, já os metabolitos secundários tem a função de sinalização, proteção e interação dessas actinobactérias com o meio ambiente que está inserida e os organismos presentes¹⁰. Essas bactérias tem uma elevada importância para a vida terrestre uma vez que, as mesmas possuem grande metabolismo secundário e com isso são responsáveis por aproximadamente dois terços da produção de antibióticos naturais produzidos¹¹.

A densidade populacional dessas actinobactérias depende principalmente do ambiente que elas vivem, nos solos por exemplos, estão presentes em aproximadamente 10^6 células por grama do solo¹¹. Ainda se tratando do crescimento desses microrganismos no solo, alguns fatores naturais fazem com que sua concentração mude e essas variáveis estão ligadas principalmente, a temperatura, pH e umidade do solo. Com relação o crescimento vegetativo, por exemplo, o crescimento dessas bactérias é desfavorecido pela baixa umidade, onde em solos secos quase não existe o seu crescimento. Outro ponto importante é que essas bactérias crescem em solos com pH entre 6 e 9, porém o melhor pH para crescimento entre esses citados é o pH 7¹¹. A temperatura do solo, como citado anteriormente, possui também um importante papel no crescimento desses actinomicetos, onde a grande maioria dessas bactérias tem seu crescimento ótimo na faixa dos 30°C, porém, alguns outros grupos de actinobactérias podem crescer em temperatura mais elevadas¹¹.

1.3 Bioma Caatinga

A Caatinga é um bioma que se encontra na região semiárida do nordeste brasileiro. Devido a sua extensão e ao sistema de ventos provenientes do Sudeste e Nordeste, apresenta um padrão de chuva instável, limitado a poucos meses do ano, com uma precipitação média de 250 a 1000 mm por ano. A alta temperatura e a alta luminosidade fazem com que haja uma grande demanda evaporativa, e com a dessecação do solo, ocasiona um grande estresse hídrico nessa região^{12,13}.

Como consequência, a Caatinga apresenta uma floresta sazonalmente seca, com gramíneas, arbustos espinhosos e pequenas árvores, que apresentam queda de folhas nas épocas secas, e que voltam a brotar e ficar verde nas épocas de chuvas. Na **Figura 2** é possível observar o tipo de vegetação e solo encontrados no bioma denominado “caatinga”¹⁴.

Figura 2. O bioma caatinga¹⁴



Assim como as plantas, os micro-organismos dessa região, embora se apresentem em uma menor diversidade, se encontram bem adaptados para as condições extremas uma vez que desenvolvem diversos mecanismos para proteção, o que os torna únicos, apresentando alto potencial de bioprospecção^{12,13}. Dentre esses microrganismos, é possível citar algumas moléculas geradas a partir desse ecossistema, assim como, suas aplicações: obtenção de carotenoides (β -caroteno) para utilização em cosméticos, outra utilização desses microrganismos oriundos da caatinga tem como escopo a diminuição da atividade antiplasmodial com frações de acetato de etila e

alcaloides oriundos do caule de plantas *Aspidosperma* para o tratamento da malária^{15,16}.

Dessa forma, pode-se dizer que a alta biodiversidade microbiana do solo desse bioma com características extremas, é altamente promissora e por ser pouco explorada, apresenta alta oportunidade de descobertas de micro-organismos que podem apresentar metabólitos secundários com relevância biotecnológica.^{12,13}

1.4 Rizosfera

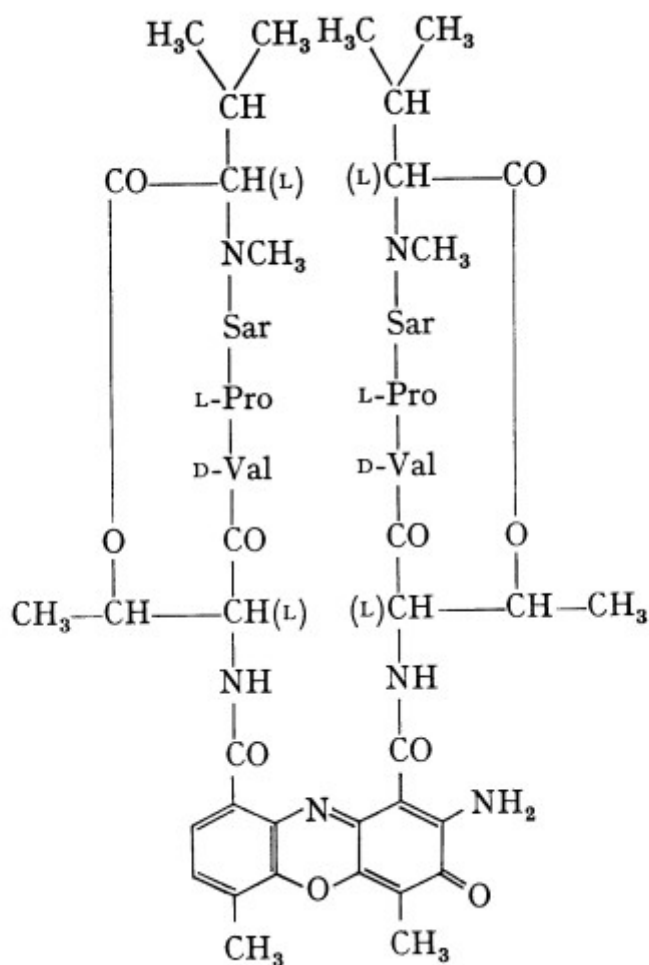
A rizosfera é definida como a região do solo que sofre influência de raízes de plantas em crescimento.^{17,18}

Nessa região ocorre a liberação de diversos compostos pelas raízes das plantas como por exemplo, aminoácidos, açúcares, esteróis, ácidos orgânicos e ácidos graxos, dentre outros. As raízes também são responsáveis pela acidificação do solo através da secreção de íons H⁺ e armazenamento de água. Esses fatores promovem condições para a instalação de bactérias e fungos nessa região, como por exemplo as actinobactérias, que apresentam vantagens na associação com plantas devido a sua capacidade de produção de compostos bioativos.^{19,20} Essa associação ocorre com a raiz fornecendo substâncias como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos que atraem microrganismos, que por sua vez liberam compostos antimicrobianos que protegem a planta contra agentes patógenos. Da mesma forma, esse ambiente rico em compostos contendo carbono, pode atrair microrganismos patógenos em busca de nutrientes, que causam danos na planta e na comunidade microbiana da rizosfera.²¹

1.5 Actinomicina D

O grupo denominado “Actinomicinas” foram descobertas por *Waksman* e *Woodruff* na década de 40 e foi o primeiro antibiótico originário de um actinomiceto (*Streptomyces antiocticus*). A massa molecular desses compostos pode variar de 700 até 1000 u.m.a. Podem ser encontrados alguns tipos de actinomicinas, dentre eles é possível citar a Actinomicina A, B, C, D, X e I²². As actinomicinas possuem estruturas químicas relativamente similares observando-se grupos químicos como: sarcosina, D-valina, L-treonina, L-prolina e N-metil-L-valina²².

Figura 3. Estrutura molecular das actinomicinas, em particular da actinomicina²²

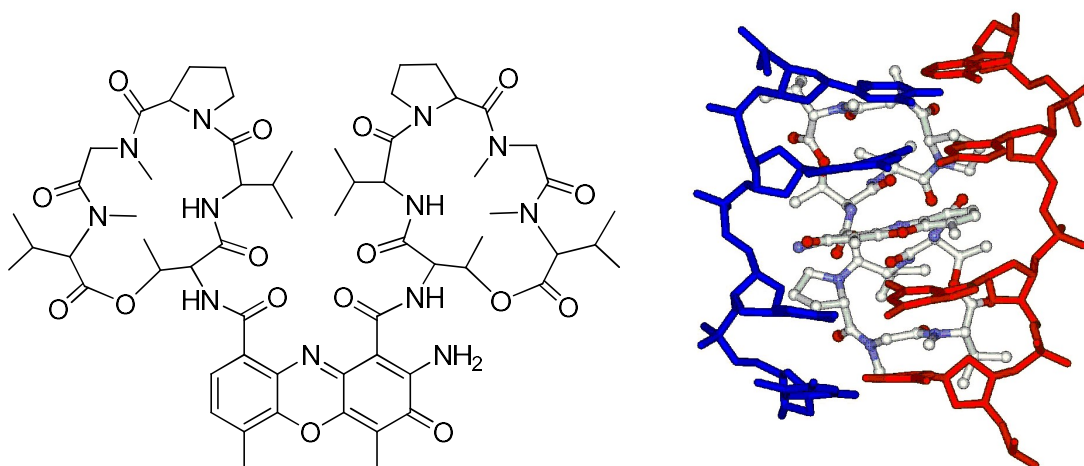


Embora essas Actinomicinas sejam compostos semelhantes, não representam uma unidade isolada (ex: Actinomicina I) e sim uma mistura dessas moléculas por isso esses compostos podem ser separados, como por exemplo, a Actinomicina I e Actonomicina X. Nas quais as frações C_v , C_2 e C_a e X_{0a} , X_1 , X_{1a} , X_2 , X_3 e X_4 podem ser obtidas. Essa frações podem ser obtidas para essas misturas não homogêneas representadas pelas Actonimicinas A, B, C, X e I, porém, quando se é tratada a Actinomicina D, a mesma possui homogeneidade que as outras não possuem²².

De uma forma mais específica, os peptídeos não ribossômicos são uma importante classe de produtos naturais, que representam um número significativo de medicamentos disponíveis para uso clínico, incluindo antibióticos, como a tirocidina, bem como agentes antitumorais, como a bleomicina, e antifúngicos, antivirais e imunossupressores²³.

A molécula da Actinomicina D é derivada do ácido 3-hidroxiantranílico, um metabólito da via degradativa do aminoácido triptofano²⁴ e é classificada como um cromopeptídeo, uma vez que possui dois anéis peptídicos cíclicos com cinco aminoácidos ligados a um cromóforo, a fenoxazinona. Esse fragmento heterocíclico contendo uma porção quinonimina é responsável pela cor do composto e sua habilidade de intercalar com o DNA (Figura 4).²⁵

Figura 4. Estrutura molecular da actinomicina D e intercalação com o DNA²⁵



As actinomicinas bloqueiam o alongamento da cadeia, inibindo a síntese de DNA e RNA, interagindo com os pares de base C-G, uma vez que utilizam o grupo 2-amino da guanina para a ligação. O anel de fenoxazona se intercala dentro da dupla hélice, e as cadeias laterais do pentapeptídeo interage com o sulco menor do DNA, resultando em interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Como resultados dessas interações, forma-se um complexo muito estável²⁶. Essa ligação ocasiona uma distorção estrutural, alterando a interação proteína-DNA que conseqüentemente bloqueia a replicação e transição, que são fundamentais para a sobrevivência da célula²⁷.

A Actinomicina D é utilizada para tratar tumores malignos, como Rabdomyosarcoma da infância, tumor de Wilms e Sarcoma de Ewing, onde ela é utilizada em combinação com outros agentes antitumorais, como vincristina e doxorrubicina, e radioterapia. A Actinomicina D também pode ser usada em alguns tipos de tumores adultos, como a Doença Trifloblástica gestacional, embora essa utilização não seja comum^{28,29}.

Na agricultura, as actinomicinas veem sendo exploradas como agentes de bio-controle de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, com o intuito de diminuir a grande perda de produção.

Kulkarin e colaboradores, produziram, caracterizaram e otimizaram a produção de actinomicina D a partir de uma linhagem de bactérias denominada de *Streptomyces hydrogenans* IB310. Nesse trabalho foram otimizados glicerol, farinha de aveia e twenn 80, empregando a otimização multivariada denominada “metodologia de superfície de resposta” (Response Surface Methodology – RSM), obtendo-se uma produção de 18,91 mg/L e a aplicação contra bactérias e fungos de plantas³⁰.

Toumatia e colaboradores, conseguiram a partir da linhagem de *Streptomyces mutabilis* um valor de 46,7 mg/L por dia de actinomicina D, a qual foi aplicada no controle de dois diferentes fungos, reduzindo a atividade dos mesmos³¹. Este foi o primeiro trabalho no qual a Actonomicina D foi extraída e purificada a partir de uma espécie de *S. mutabilis*.

Recentemente, a molécula de Actnomicina D também foi obtida da produção de uma nova linhagem de *Streptomyces*, chamada de *Streptomyces smyraeus* UKAQ_23 e foi utilizada como uma potencial molécula antimicrobiana sendo o meio de produção (pH, temperatura e concentração de agar) otimizada pelo método de otimização multivariada denominada de “Box-Behnken”, utilizando metodologia de superfície de resposta³². A Actonimicina D nesse trabalho foi isolada e caracterizada obtendo-se uma concentração de 561,3±0,3 mg/kg³².

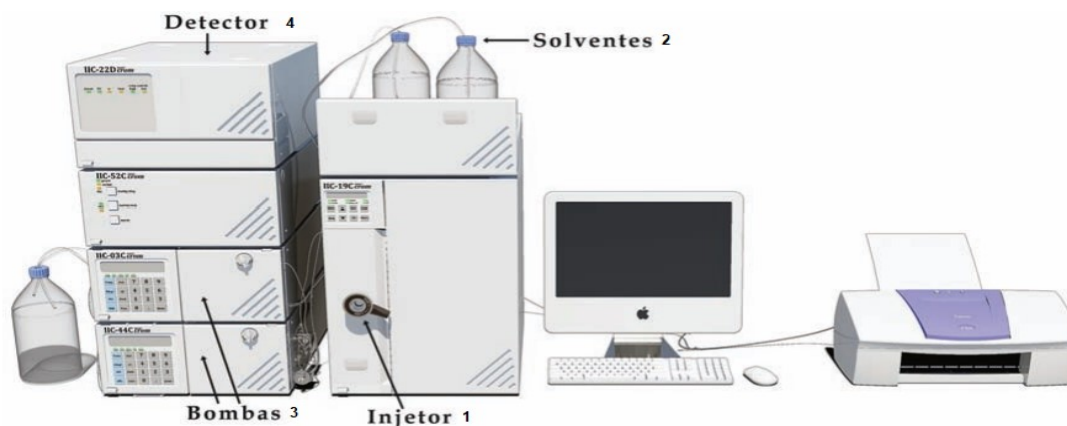
Outro trabalho atual empregando esse grupo de bactérias foi realizado por *Dahal* e colabolarodores onde o bioativo foi extraído da cepa de

Streptomyces sp. T1317-0309. Além de uma análise da sua sequência genômica para possíveis outros potenciais bioativos antifúngicos por exemplo³³.

1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas

Quando se é tratado de amostras complexas, ou seja, amostras que possuem diversos analitos e são de extrema complexibilidade, a utilização de técnicas poderosas quanto a separação desses analitos é de extrema importância³⁴. Para isso, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência é uma importante ferramenta para a determinação dessas amostras citadas principalmente pela facilidade de separar esses analitos de interesse³⁴. Na **Figura 5**, é possível identificar um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência onde é possível observar o injetor (1), solventes (2), bombas (3) e detector (4)³⁵.

Figura 5. Representação gráfica de um cromatógrafo líquido de alta eficiência e suas divisões³⁵.



Os detectores empregados na cromatografia são diversos, entre eles: detector de índice de refração, UV ou DAD, espalhamento de luz e fluorescência podem ser utilizados, com a finalidade de detecção desses compostos separados nesses cromatógrafos ou também podem fazer o papel de detectores para uma determinação quantitativa dessas amostras³⁵.

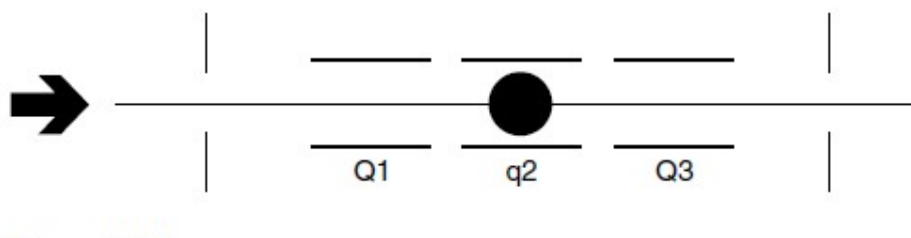
Dessa forma, com o crescente interesse de estudo na área de produtos naturais (que são matrizes extremamente complexas), o desenvolvimento das técnicas analíticas que permitem o acoplamento de técnicas de separação com técnicas espectrométricas foi indispensável para possibilitar o entendimento dos extratos brutos obtidos de plantas e micro-organismos. Esse acoplamento foi possível graças ao desenvolvimento da técnica de ionização a pressão atmosférica (API), fazendo com que essa técnica se tornasse uma das mais sensíveis e de fácil aplicação, sendo utilizada para monitoramento de fermentações de microrganismos e desreplicação dos compostos bioativos produzidos^{36,37}.

A aplicação da cromatografia acoplada a espectroscopia de massas (em especial a cromatografia líquida – LC-MS e LC-MS/MS), apresenta uma alta sensibilidade e seletividade, se tornando uma importante ferramenta para análises de metabólitos oriundos de matrizes complexas. Através da cromatografia é possível realizar a separação dos compostos em função de sua eficiência e resolução de colunas cromatográficas, além de reduzir o efeito de supressão iônica na ionização a pressão atmosférica (API). Com o acoplamento dessas técnicas é possível identificar e quantificar metabólitos secundários, mesmo em concentrações baixas, o que é de extremo interesse se tratando de amostras de produtos naturais^{35,38}. A informação de massa

molecular e informações estruturais obtidas pelos padrões de fragmentações dos compostos são utilizadas para a desreplcação, possibilitando a descoberta de novas substâncias ou identificação de substâncias já conhecidas^{39,40}.

Dentro da variada gama desses equipamentos acoplados, podemos citar o quadrupolo, onde basicamente se é utilizada a trajetória em campos elétricos que oscilam, com o intuito de separar os íons de interesse conforme sua relação de massa e carga. Esses chamados “polos” (podendo ser quadrupolo, hexapolo ou octapolo) tem algumas características distintas, como por exemplo: “poder de foco” e “faixa de massa para transmissão simultânea de íons”. Basicamente os quadrupolos tem um poder de foco maior e uma faixa de massa menor em relação ao hexapolo e o octapolo, por exemplo. Assim, quando se é associado três quadrupolos por exemplo, temos a formação de um tripoquadrupolo⁴¹. A associação desses quadrupolos, podemos obter um sistema chamado de triploquadrupolo. Na Figura 6 é possível observar a esquematização na qual esse sistema opera, onde Q1 e Q3 são espectrômetros de massa e q2 localizado no centro do quadrupolo, é uma célula de colisão⁴¹.

Figura 6. Representação gráfica de um triplo quadrupolo onde na figura é representado Q1 e Q3 os analisadores e q2 o fragmentador⁴¹



Basicamente, inicialmente um gás inerte transfere energia para o íon convertendo energia cinética em energia interna. Em seguida, os fragmentos

desses ions gerados são então analisados pelos quadrupolos (Q1 e Q3). No *modo scan* de varredura Inicialmente, escolhe-se uma relação m/z adequada para o primeiro espectrômetro (Q1), em seguida, o ion gerado colide no quadrupolo central, o q2, onde é fragmentado e por fim, no terceiro quadrupolo (Q3), o produto das reações que ocorreram nas outras etapas anteriores é analisado⁴¹.

Com a finalidade de comparar os analisadores de massa, a **Tabela 1** compara os analisadores de massas em relação ao limite de massa, resolução, acurácia e amostragem de ions para três diferentes analisadores de massas: quadrupolo, ion trap e TOF⁴¹

Tabela 1. Comparação entre diferentes analisadores de massas utilizados referente ao limite de massa, resolução e amostragem de íons³³

	<u>Quadrupolo</u>	<u>Ion Trap</u>	<u>TOF</u>
<u>Limite de massa</u>	4000 Th	6000 Th	>10000 Th
<u>Resolução</u>	2000	4000	5000
<u>Amostragem de ions</u>	contínuo	pulsado	pulsado

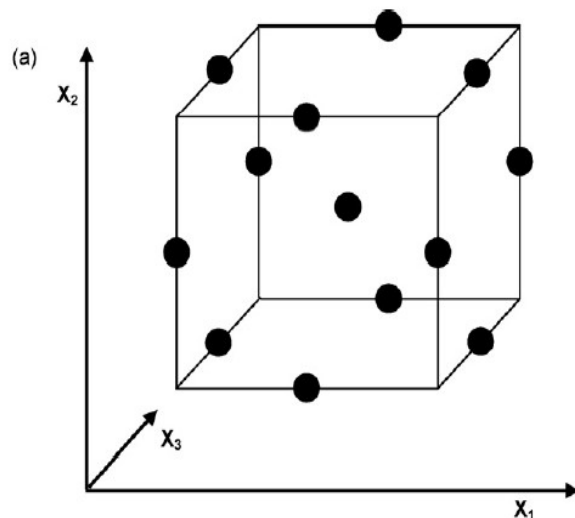
1.7 Box-Behnken

Com o desenvolvimento da ciência e principalmente com o avanço da tecnologia e equipamentos para determinação analítica, as ferramentas quimiométricas ganharam proeminência. Essa importância se dá principalmente pela necessidade do emprego de uma quantidade menor de reagentes que promovem essas determinações, assim como menos trabalho realizado pelo analista⁴².

Dentro desse contexto, as otimizações simples ou univariadas podem ser relativamente falhas, principalmente devido ao fato de uma variável estar dependente de outros níveis envolvidos nesse tipo de otimização. Portanto, uma opção relativamente mais completa seria as otimizações multivariadas, nas quais, todas as variáveis podem ser testadas praticamente simultaneamente, tornando-se uma excelente alternativa às otimizações univariadas. Dentre essas otimizações multivariadas podemos citar algumas, entre elas: *Doehlert matrix (DM)*, *central composite designs (CCD)* e também *Box- Behnken design (BBD)*⁴².

A otimização multivariada denominada de Box-Behnken surgiu no ano de 1960 na Universidade de Wisconsin por dois cientistas: G.E.P Box e D.W. Behnken⁴³. Essa otimização baseia-se em uma classe de experimentos rotativos (ou semi), baseando-se em experimentos fatoriais incompletos de três diferentes níveis e pode ser representada basicamente de duas formas: o cubo característico onde é possível notar um ponto central e pontos nas arestas desse cubo representado na **Figura 7**^{42,43}.

Figura 7. Cubo representando o planejamento multivariado BDD onde é possível observar pontos nas arestas e um ponto central⁴².



Como conceito base, o número de experimentos é definido como:

$$N = 2k(k-1) + C_0$$

k = número de fatores

C₀ = números de pontos centrais

Na **Tabela 2** está representada uma tabela genérica para otimização multivariada do tipo Box-Behnken para três valores de variáveis (X_1, X_2 e X_3):

Tabela 2. Planejamento Box-Behnken para um sistema de três variáveis^{42,43}

Experimento	X₁	X₂	X₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
Controle	0	0	0
Controle	0	0	0
Controle	0	0	0

Basicamente, a otimização por BBD pode ser utilizada em vários contextos analíticos a fim de promover melhores resultados. *Dönmez* e colaboradores utilizam BBD para otimizar o tempo de análise assim como o uso de solventes para determinação simultânea de ibuprofeno, benzoato de sódio, metil parabeno e propil parabeno em amostras de xarope. Nesse trabalho, os autores variaram porcentagem de acetonitrila na fase móvel, pH e fluxo de forma simultânea até encontrar a melhor resposta⁴⁴.

Outro trabalho realizado por *Yildiz* e colaboradores, os autores utilizaram BBD para determinação de nitrito em carne utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com polivinilimidazolio. O planejamento fatorial de

dois níveis (2⁴) foi realizado, variando-se pH, potencial de deposição, tempo de deposição e porcentagem de polivinilimidazolio na base do carbono⁴⁵.

Aplicando-se a otimização multivariada tipo BDD em sistemas biológicos, é possível citar o trabalho de *Qureshi* e colaboradores onde *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ_23, isolado de mangue, foi verificada a sua atividade microbiana contra *Staphylococcus aureus*, e seus dois compostos principais foram nomeados como Actinomicina X2 e D³². Nesse trabalho, a otimização BDD foi realizada utilizando como variáveis: pH, temperatura, volume de inoculação e concentração de agar. Apesar de não ser o escopo principal do trabalho, o resultado mostrou que a otimização experimental pode ajudar na busca de novos potenciais tipos de *Streptomyces* para aplicação de extração de actinomicinas diferentes.

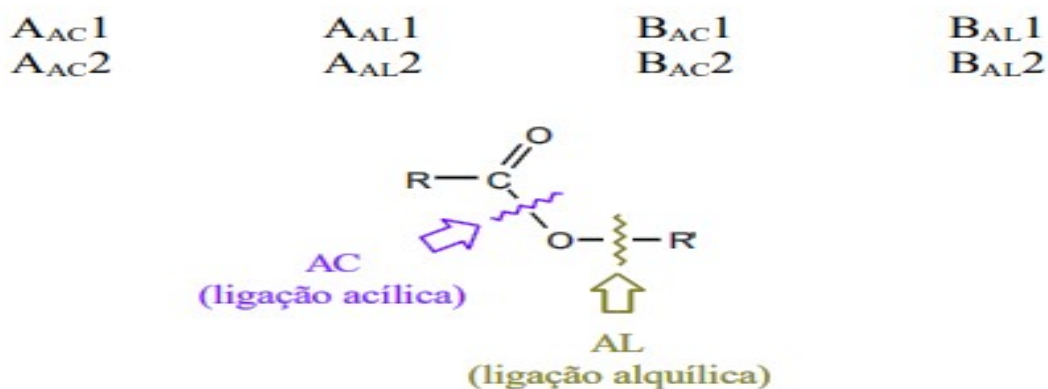
Outro trabalho interessante realizado com aplicação desse tipo de otimização foi realizado por *Rajeswari* e colaboradores, mostrando que objetivamente a otimização realizada por BDD apresentou um aumento na produção de actinomicina D de aproximadamente 80% comparado com o método não otimizado⁴⁶. Portanto, a utilização de BDD para diversos trabalhos vem sendo amplamente utilizado na literatura e a sua utilização ajuda no desenvolvimento de uma metodologia eficaz e confiável também para produção otimizada de actinobactérias.

1.8 Hidrólise e Transesterificação de ésteres

A molécula de éster pode hidrolisar de algumas formas diferentes principalmente devido a sua peculiar estrutura. Existem aproximadamente 8 formas de hidrolisar essa molécula que é exemplificada na Figura a seguir⁴⁷. A

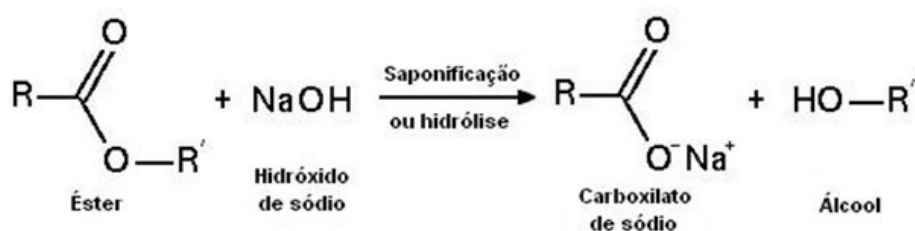
Figura 8 mostra em as letras A e B maiúsculas que significam “catálise ácida” e “catálise básica”, respectivamente. As letras menores (AC e AL) indicam qual ligação que se rompe onde AC é a ligação acíclica e a AL ligação alquílica. Os números mostram se é uma reação que ocorre em uma etapa ou em duas etapas (unimolecular ou bimolecular)⁴⁷.

Figura 8. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster mostrando os locais de quebra das ligações na molécula de éster genérico assim como a nomenclatura A,B, AC,AL, 1 e 2⁴⁷.



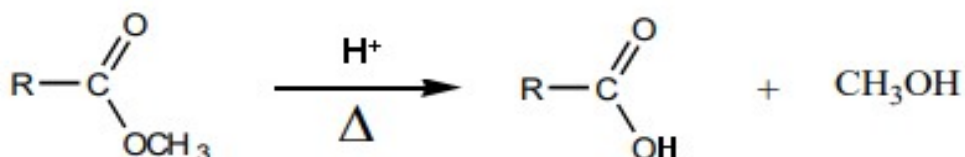
Na catálise básica ou hidrólise básica é possível observar a formação de um sal e um grupo álcool. A **Figura 9** a seguir mostra a reação que ocorre em um éster metílico em presença de hidróxido de sódio e aquecimento⁴⁷.

Figura 9. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster utilizando hidróxido de sódio como catalisador⁴⁷



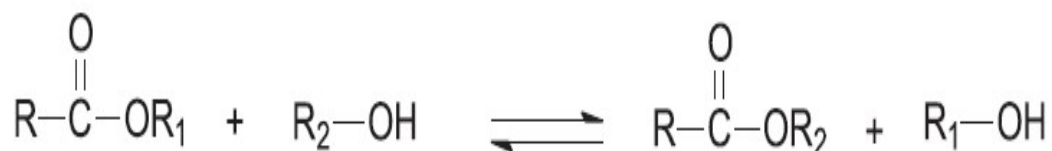
Quando se é observado a catálise ácida ou hidrólise ácida, é possível observar a formação de um ácido carboxílico e um grupo álcool. Na **Figura 10** é possível verificar a hidrólise ácida de um éster metílico e a formação de um ácido carboxílico e um metanol⁴⁷.

Figura 10. Representação genérica de uma reação de hidrólise de um éster utilizando um ácido forte como catalisador⁴⁷



De forma geral, o processo químico denominado de “transesterificação” também conhecida como alcoólise de éster carboxílicos, se resume a uma reação que ocorre entre um éster e um álcool (também denominado de “agente transesterificante”) para formação de outro éster diferente através de uma alcoxila⁴⁸. Nesse processo também há a formação de um álcool. A **Figura 11** exemplifica a reação de transesterificação entre essas moléculas⁴⁸.

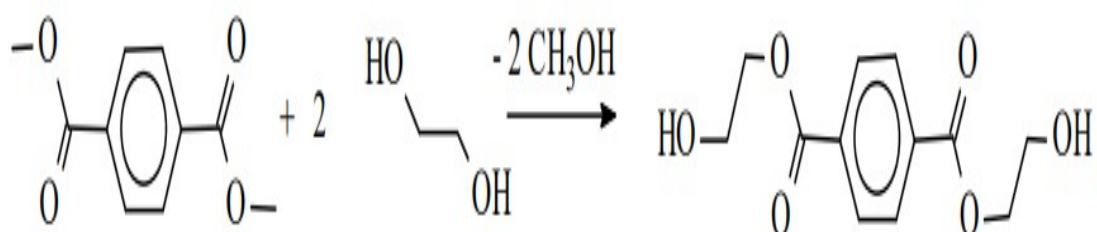
Figura 11. Representação genérica de uma reação de transesterificação de um éster com um álcool genérico e a obtenção de um outro éster e outro álcool⁴⁸



Especificamente, a reação do éster com esse álcool é reversível e contínua apenas com a mistura dos reagentes, porém, a adição de um catalisador ácido ou mesmo de um catalisador básico pode acelerar essa reação e dessa forma aumentando a velocidade da reação, assim como a quantidade dos produtos⁴⁹.

Um ponto importante a salientar sobre a transesterificação é que geralmente as reações ocorrem com agentes transesterificante de baixa massa molecular, como por exemplo o metanol e o etanol. O metanol como agente transesterificante é um importante reagente, uma vez que sua massa molecular é baixa quando comparada com outros agentes alcoólicos, seu tamanho é menor, preço reduzido e velocidade de reação alta. A reação de transesterificação entre o tereftalato de dimetila com um etileno glicol é mostrado na **Figura 12** como exemplo da reação⁴⁸.

Figura 12. Representação de uma reação de transesterificação entre a molécula de tereftalato de dimetila e um etileno glicol⁴⁸



2. OBJETIVOS DO TRABALHO

O principal objetivo dessa proposta de mestrado é realizar um estudo de designe experimental para aumentar a produção da Actinomicina D em processos fermentativos empregando a actinobactéria Caat 7-38 isolada do bioma caatinga. Também foi avaliada o efeito da estrutura na atividade da Actinomicina D frente a ensaios de atividade antimicrobiana.

2.1 Objetivos específicos

- Cultivo da actinobactéria, em pequena escala, em diferentes meios de cultura
- Realizar um Design Experimental (Box-Behnken), a fim de otimizar as condições de meio de cultivo
- Realizar modificações sintéticas da Actinomicina D e avaliar a atividade antimicrobiana desses derivados

3. MATERIAIS E MÉTODO

Reagentes e Equipamentos utilizados

- Balança analítica FA2104N;
- Capela de Fluxo Laminar Esco Class II BSC Lobov® Modelo SC2;
- Incubadora Marconi modelo MA 830;
- Mesa agitadora Orbital -Biothec
- Autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 150)
- Sistema de purificação de água Milli-Q Reference Merck®;
- Cromatógrafo Líquido Acquity-UPLC™ acoplado ao espectrômetro de massas TQ-S Waters equipado com fonte de ionização por eletrospray operada em modo positivo e negativo e detector PDA para as análises de LC-MS.
- Cromatógrafo Shimadzu com controladora CBM-20A, duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector UV-Vis SPD-20A, injetor manual Rheodyne
- Metanol, acetonitrila, acetato de etila comprados da Synth ou Merck para extração dos extratos brutos, análises de LC-UV e LC-MS.
- Hidróxido de sódio e Ácido Clorídrico da Sigma-Aldrich para ajuste de pH.
- Carbonato de Cálcio da Sigma-Aldrich para o meio de cultivo.
- Cartuchos de extração em fase sólida C18 (Oasis® HBL 1 mL (30mg) Extraction Cartridges
- Coluna Gemini C18 (150x4,60 mm 5 µm)
- Coluna Ascents C18 (100x4.6mm 2,7 µm)

- Dextrose da Synth, extrato de levedura e extrato de soja da Acumedia e extrato de soja da Oxoid para os meios de cultivo.

3.1 Microorganismo

A actinobactéria Caat 7-38 estudada neste trabalho faz parte da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP) e foi isolada da rizosfera de cactáceas do bioma Caatinga. A localização da coleta da Actinobactéria Caat 7-38 foi: Município de Jutaí/PE; Coordenadas: 08°36'13,17"S 40°13'4,18"W; Elevação: 396 m.

3.2 Cultivo da actinobactéria Caat 7-38 em diferentes meios de cultivo

A actinobactéria foi preservada em meio GYEA (10 g/L dextrose; 10 g/L extrato de levedura; 18 g/L ágar). Para a preparação do pré-inóculo, foram retirados três plugs (6 mm) da actinobactéria crescida em meio GYEA e adicionados em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo, respeitando a proporção de 1:5 de meio de cultivo e volume do Erlenmeyer. Os Erlenmeyer foram mantidos sob agitação de 150 rpm e temperatura ambiente por um período de 4 dias. Após esse período, foi adicionado 1 mL de pré-inóculo da actinobactéria Caat 7-38 para os respectivos meios de cultivo, meio BD (batata-dextrose), ISP-2 (dextrose-extrato de levedura-extrato de malte) e Xarope de Soja (xarope de soja-água). Os diferentes meios de cultivo foram incubados em uma mesa agitadora orbital (Biothec) à temperatura ambiente e agitação de 150 rpm por um período de 10 dias.

3.3 Obtenção do extrato bruto

Após o período de fermentação, o meio de cultivo foi filtrado em papel de filtro e o líquido resultante foi submetido a extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos C18 (Oasis® HBL 1 mL (30mg) Extraction Cartridges) como fase estacionária e metanol como solvente eluente. Para a extração, o cartucho foi ativado com 1,0 mL de metanol, condicionado com 1 mL de água e em seguida, foi adicionado 1,0 mL do respectivo meio de cultivo, previamente centrifugado. Em seguida, o cartucho foi lavado com 1,0 mL de água e extraído com 1 mL de metanol. A solução resultante foi submetida a análise quantitativa por LC-UV e LC-MS.

3.4 Fermentações com diferentes volumes de pré-inóculo

Nesta etapa, foi realizada a fermentação da actinobactéria Caat 7-38 com diferentes volumes de pré-inóculo para o meio de cultivo ISP-2.

Para a preparação do pré-inóculo foram retirados três plugs (6mm) da actinobactéria crescida em meio GYEA e adicionados em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo ISP2. Os Erlenmeyer foram mantidos sobre agitação de 150 rpm e a temperatura ambiente por um período de 4 dias. Após esse período foram adicionados diferentes volumes de pré-inóculo ao meio de cultivo (Tabela 3), aos frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultivo ISP2.

Tabela 3. Relação dos experimentos, volume de pré-inóculo e % no meio de cultivo

Experimento	Volume (ML)	pré-inóculo (%)
1	1,0	2
2	2,5	5
3	5,0	10
4	7,5	15
5	10,0	20

Após 10 dias de fermentação, o meio de cultivo filtrado foi submetido a extração por SPE. Os extratos resultantes foram submetidos a análise quantitativa por LC-UV para verificar a produção de Actinomicina D.

3.5 Desing Experimental (Box-Behnken)

Através de estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa do laboratório, foi identificado um meio de cultivo que apresentava uma resposta de produção de Actinomicina D pela actinobactéria 7-38 satisfatória. Dessa forma, o meio de cultivo⁴³, composto por Frutose, Carbonato de Cálcio e Extrato de Soja, adaptado da literatura foi utilizado para a realização do Design Experimental⁴³.

Visando a otimização da produção de Actinomicina D, realizou-se um Planejamento Box-Behnken, com 3 níveis de fatores, gerando superfícies de resposta em função das variáveis independentes, determinadas como Frutose (g/L), Carbonato de Cálcio (g/L) e Extrato de Soja (g/L), conforme a **Tabela 4**.

Foram realizados 15 experimentos. Uma vez determinado o planejamento, cada um dos experimentos foi desenvolvido (em duplicadas) pesando suas respectivas massas do meio de cultivo, adicionados em erlenmeyer de 250 mL (respeitando a proporção de 1:5 de volume de meio líquido) e adicionados em shakers com agitação constante. O pré-inóculo foi

crescido em meio BD por 3 dias e adicionado 1 mL em cada um dos experimentos, mantendo a incubação pelo período de 6 dias.

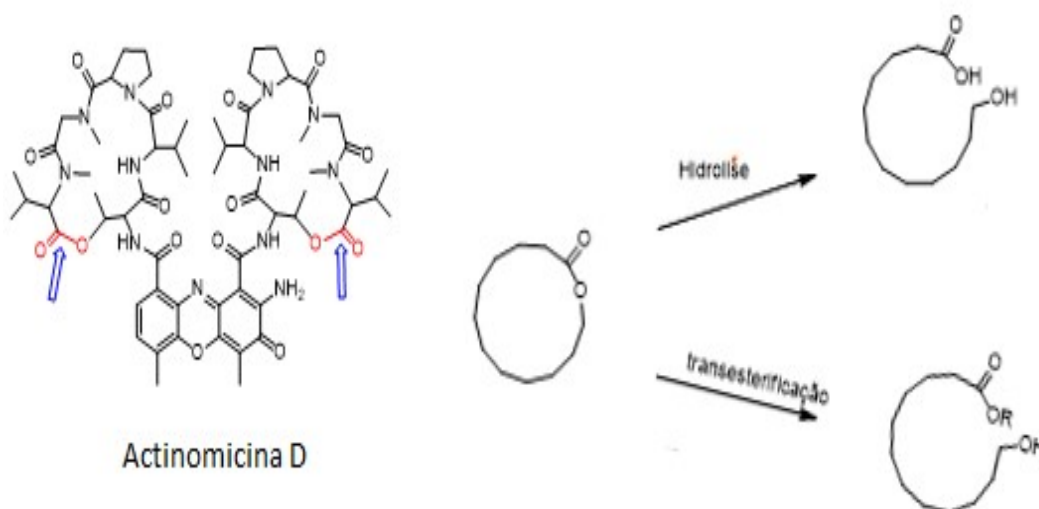
Tabela 4. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento Box-Behnken.

Variáveis Independentes	Níveis de Variação		
	-1	0	1
Frutose (g/L)	20	30	40
Carbonato de Cálcio (g/L)	1	2	3
Extrato de Soja (g/L)	1	3	5

3.6 Modificações estruturais da Actinomicina D

A Actinomicina D é um despeptídeo, o qual apresenta uma função éster na porção peptídica. Desta forma foi realizado modificações estruturais na porção éster dessa molécula e avaliado os efeitos desses novos derivados formados na atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Foi realizado uma hidrólise e uma transesterificação com metanol.

Figura 13. Propostas de modificações estruturais da Actinomicina D



3.6.1 Reação de hidrólise

A reação, representada na **Figura 9**, foi realizada em balão de 50mL onde foi adicionado 10mg de extrato bruto, obtido através da fermentação da Caat 7-38, e 20mL de uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,5 mol/L. A reação foi mantida em refluxo por aproximadamente 26h. O acompanhamento da reação foi realizado através de placas de TLC e por análises de LC-MS. Para as análises, 1mL do meio reacional era retirado do balão, neutralizado com uma solução de HCL 10% e realizada a extração em fase sólida (SPE), e em seguida era analisado.

Ao final das 26h, foi realizada a extração líquido-líquido do meio reacional, com acetato de etila, e a fase orgânica resultante foi concentrada em rota evaporador sob pressão reduzida e analisada por LC-MS.

3.6.2 Reação de transesterificação com metanol

A reação, representada na **Figura 12** foi realizada em balão de 50mL onde foi adicionado 10mg de Actinomicina D, obtida através da fermentação da Caat 7-38 e posteriormente purificada em HPLC, 20 mL de Metanol (MeOH) e uma ponta de espátula de Ácido p-toluenossulfônico. O meio reacional foi mantido em refluxo por aproximadamente 144h, sendo adicionado uma ponta de espátula de ácido p-toluenossulfônico e metanol a cada 24h aproximadamente. Para acompanhamento da reação, uma alíquota de 1mL foi retirada do meio reacional, realizada a extração em fase sólida (SPE) e posteriormente analisada por LC-MS.

Ao final da reação, foi realizada a extração líquido-líquido do meio reacional, com Acetato de Etila, e a fase orgânica resultante foi concentrada em rota evaporador sob pressão reduzida e analisada por LC-MS.

3.7 Bioensaio de disco de difusão

A fim de avaliar a atividade antibiótica das modificações estruturais realizadas com a Actinomicina D, foi desenvolvido um bioensaio empregando como alvo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A linhagem Gram-positiva utilizada foi 97 (*Streptococcus agalactiae*), e as linhagens Gram-negativas, *Escherichia Coli K12* e *Xantomonas citri* FDC12.

As bactérias estavam preservadas em solução de glicerol 20%, armazenadas em freezer. Para a reativação, utilizou-se meio TSB (Caldo trípico de soja), onde foram cultivadas por 1 dia. Após isso, diluiu-se o meio contendo a bactéria, até aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC (0,5 escala McFarland), para isso, foi adicionado 50 μ L do meio com bactéria em 1mL de meio TSB.

Para a realização do ensaio foi utilizado disco de papel de filtro (6 mm de diâmetro), impregnados com 10 μ L do material obtido na síntese solubilizado em Metanol, à uma concentração de aproximadamente 1mg/mL, resultando em uma massa de 10 μ g de material adicionado. Como controle foi utilizado 10 μ L do antibiótico Tetraciclina a uma concentração de 0,5mg/mL. Os discos foram distribuídos em uma placa de Petri, adicionou-se o material obtido na modificação estrutural e em seguida, foi vertido aproximadamente 15 mL de meio BDA(Batata-Dextrose-Ágar). Uma vez endurecido o meio de cultivo, foi

adicionado 300 μ L da suspensão de bactéria e espalhado uniformemente pela placa. A placa de Petri foi incubada em estufa a 38°C por 24h.

3.8 Condições cromatográficas

As análises quantitativas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu com controladora CBM-20A, duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-10A5, detector UV-Vis SPD 20A e injetor manual Rheodyne.

Para o desenvolvimento do método, utilizou-se uma coluna Gemini C18 (150x4,60 mm 5 μ m). Como fase móvel foi utilizado MeOH com 0,1%A.F. (Fase móvel B) e uma solução de 0,1%A.F (fase móvel A) em modo gradiente iniciando com 70% de FM B até 90% de FM B em 30 minutos. Monitorando dois canais de comprimento de onda em 250 e 350 nm.

As análises cromatográficas acopladas a espectrometria de massas foram realizadas empregando um sistema de LC-MS Acquity UPLC® Xevo TQ-S equipado com bomba quaternária, auto injetor e fonte de ionização por eletrospray operada em modo positivo e negativo. Os espectros foram analisados através do software Masslynx versão 4.1.

Os parâmetros empregados no espectrômetro de massas foram: voltagem do capilar de 3,2 kV; voltagem do cone de 40 V, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de desolvatação de 350°C e faixa de m/z 500-1400. Nos experimentos de espectrometria de massas sequencial a melhor energia de colisão foi determinada para cada experimento.

As condições cromatográficas do LC-MS foram: Coluna C18 ascents (10x4.6mm 2,7 μ m). Volume de injeção de 3 μ L, Fase móvel A Água+0,1% A.F e MeOH+0,1% A.F como fase móvel B. Em modo isocrático com 80% de fase

B, com duração de 7 minutos, utilizando um detector de arranjo de diodo com faixa de varredura de $\lambda = 210-750$ nm.

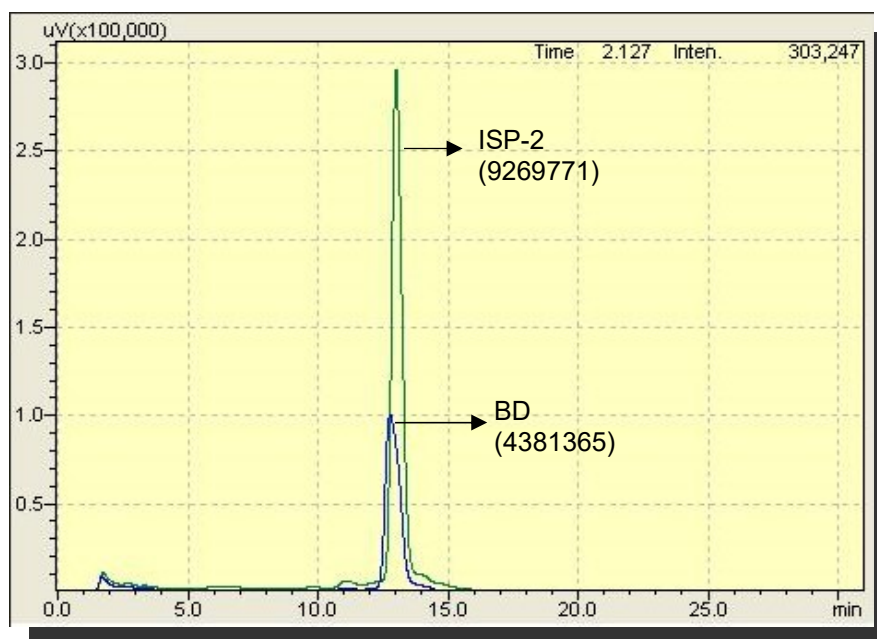
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo da actinobactéria Caat 7-38 em diferentes meios

Em estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa foi observado que a actinobactéria codificada como Caat 7-38 é uma produtora do composto Actinomicina D.

Com o objetivo de explorar o potencial dessa actinobactéria, foi realizada a fermentação em diferentes meios de cultivo, com o objetivo de se identificar qual meio é mais efetivo para a produção da Actinomicina D. Foram testados três diferentes meios de cultivo, BD⁵¹ (200mL/L caldo de batata; 20g/L dextrose), ISP-2⁵² (4g/L dextrose; 4g/L extrato de levedura; 10g/L extrato de malte) e xarope de soja, sendo este último cultivado com quatro porcentagens diferentes do xarope de soja em água: 10, 5, 2,5 e 1,25%. As fermentações foram mantidas por um período de 10 dias sob agitação constante e temperatura ambiente. Após esse período foi realizada a extração (SPE) utilizando cartuchos C₁₈. Os extratos foram analisados quantitativamente por LC-UV e estão representados no cromatograma da **Figura 14**.

Figura 14. Cromatogramas da produção de Actinomicina D nos diferentes meios e suas respectivas áreas, em $\lambda = 240\text{nm}$



Na **Figura 14**, o pico cromatográfico em 13,00 minutos foi atribuído a presença da Actinomicina D. Essa atribuição foi feita com base no tempo de retenção da amostra padrão de Actinomicina D.

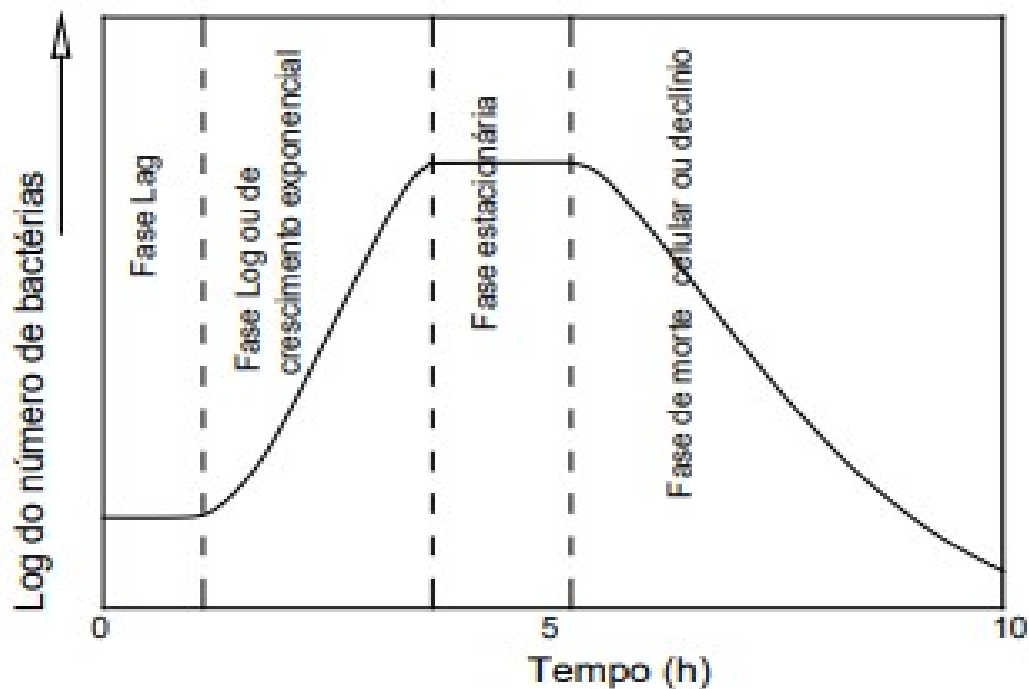
Através das análises comparativas dos cromatogramas apresentados acima, analisando as áreas dos respectivos picos, foi possível observar que o meio ISP-2 apresentou uma maior produção do composto Actinomicina D, de aproximada seis vezes maior que o meio BD. Os meios de cultivo empregando diferentes concentração de melão de soja, não apresentaram crescimento bacteriano e conseqüentemente não produziram a Actinomicina D, sendo descartados.

4.2 Fermentações com diferentes volumes de pré-inóculo

Com o objetivo de se verificar a influência do volume do pré-inóculo adicionado ao meio fermentativo, foi realizado um estudo onde diferentes volumes de pré-inóculo foram avaliados.

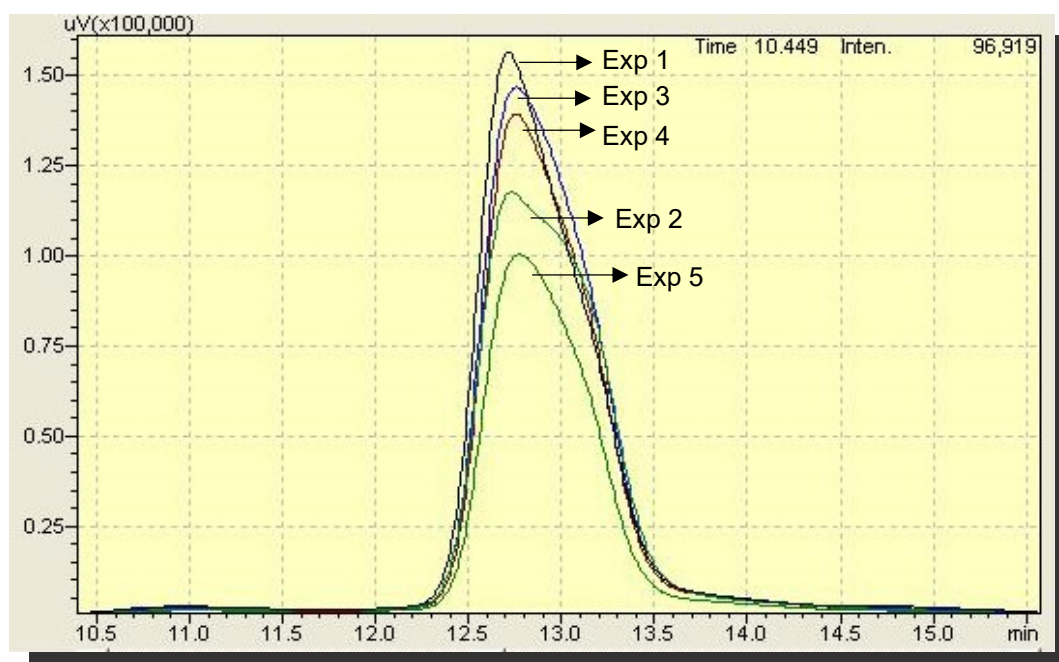
Analisando as áreas dos cromatogramas apresentados na **Figura 16** e as respectivas áreas referentes a actinomicina D (**Tabela 5**), não foi possível definir um padrão de aumento ou diminuição na produção de actinomicina D ao final dos 10 dias de fermentação. Assim, concluímos que não há um efeito significativo na produção da actinomicina D em relação a quantidade de pré-inóculo adicionada para a fermentação ao final de 10 dias, isso ocorre pelo fato de que os metabólitos secundários microbianos normalmente são produzidos durante a idiófase (ou fase estacionária), que é a fase final do crescimento, estando finalizada o desenvolvimento microbiano. Dessa forma, não ocorre mais o desenvolvimento e divisão celular, e o número de células está constante, independentemente do número de células adicionados no pré-inóculo. Podemos inferir que com 10 dias de fermentação, o crescimento bacteriano já está na fase estacionária. Na **Figura 15** podemos observar a curva de crescimento bacteriano e suas fases. Não foi monitorado o efeito do pré-inóculo na fase Log.

Figura 15. Curva de crescimento bacteriano em relação ao tempo e as fases que o processo ocorre⁵³



Padronizou-se então o volume de 2% (1 mL) de pré-inóculo adicionado nas fermentações

Figura 16. Cromatogramas da produção de Actinomicina D nos respectivos experimentos com volumes de pré-inóculo



Na **Tabela 5** é possível observar a comparação dos volumes de pré-inóculo adicionado e suas respectivas áreas (uV/min).

Tabela 5. Volumes referentes ao pré-inóculo adicionados e suas respectivas áreas (uV/min)

Experimento	Volume (ML)	Área do pico
1	1	6542412
2	2,5	5799669
3	5	6298332
4	7,5	6008242
5	10	3779730

4.3 *Desing* Experimental (Box-Behnken)

Visando a otimização da produção de Actinomicina D, realizou-se um Planejamento Box-Behnken, com 3 níveis de fatores, gerando superfícies de resposta em função das variáveis independentes, determinadas como Frutose (g), Carbonato de Cálcio (g) e Extrato de Soja (g), e Actinomicina D como variável dependente, conforme a **Tabela 4**.

Uma vez determinado o planejamento, cada um dos experimentos foi desenvolvido (em duplicadas) pesando suas respectivas massas do meio de cultivo, adicionados em erlenmeyer de 250 mL (respeitando a proporção de 1:5 de volume de meio líquido) e adicionados em shakers com agitação constante. O pré-inóculo foi crescido em meio BD por 3 dias e adicionado 1 mL em cada um dos experimentos, mantendo a incubação pelo período de 6 dias.

Foram realizados 15 experimentos, apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Planejamento Box-Behnken

Experimento	Frutose	Carbonato de Cálcio	Extrato de sódio	Actinomicina D (área)
E1	-1	-1	0	17667
E2	1	-1	0	14360
E3	-1	1	0	17257
E4	1	1	0	21536
E5	-1	0	-1	6709
E6	1	0	-1	7476
E7	-1	0	1	21306
E8	1	0	1	4227
E9	0	-1	-1	4570
E10	0	1	-1	5428
E11	0	-1	1	42882
E12	0	1	1	61246
E13	0	0	0	42136
E14	0	0	0	27974
E15	0	0	0	22762

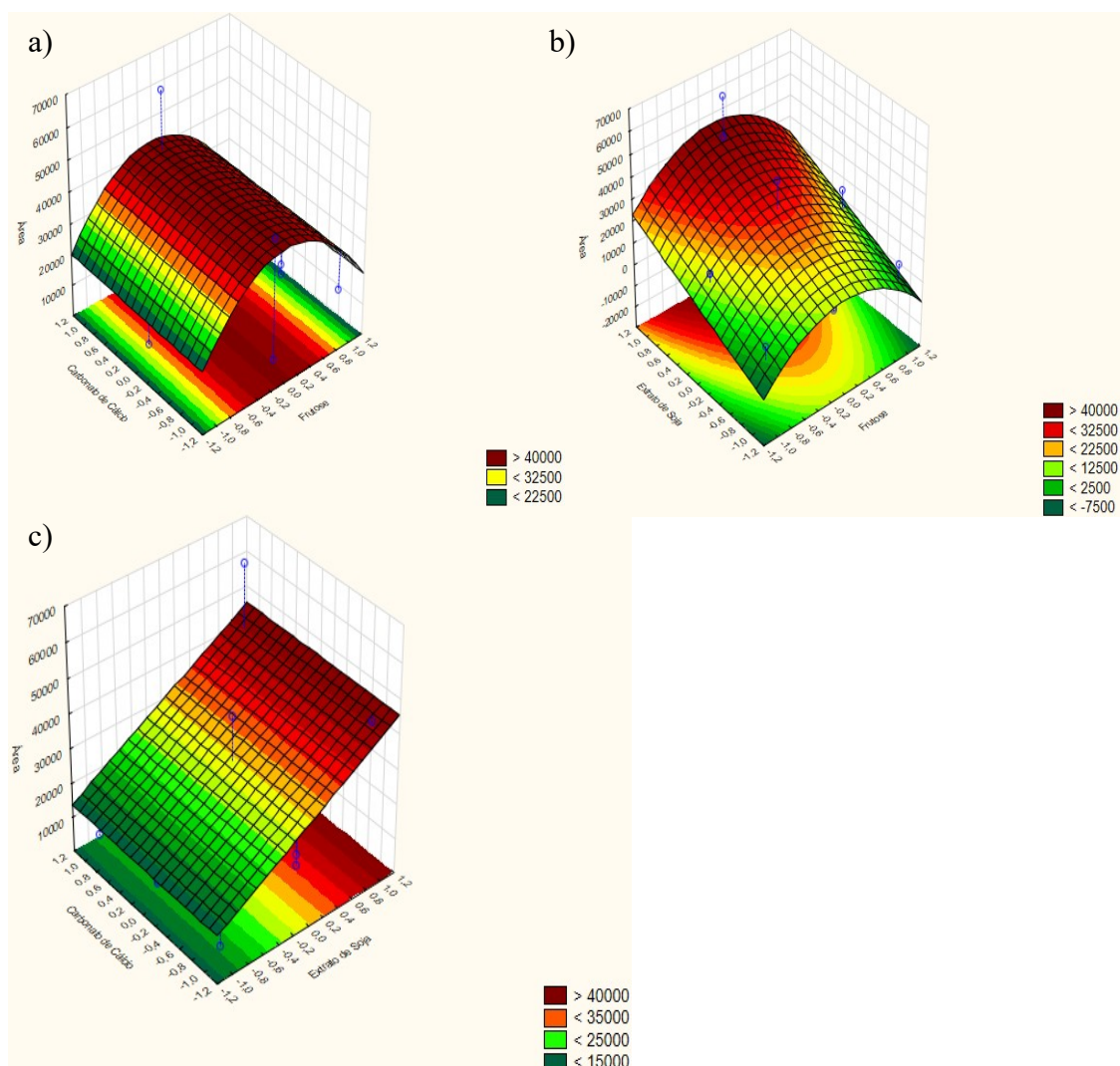
A partir dos resultados experimentais obteve-se um modelo matemático empírico capaz de prever o modelo estudado e gerar superfícies de respostas.

Equação 1. Fórmula matemática do modelo

$$Y = 29571,1 - 15753,9 X_1^2 + 13184,8 X_3$$

Na **Equação 1**, X_1 representa a influência da Frutose e X_3 a influência do Extrato de Sódio, na área de Actinomicina D (Y). A variação de Carbonato de Cálcio não apresentou influência na área de Actinomicina D.

Figura 17. Superfícies de resposta para a Actinomicina D. a) Carbonato de Cálcio(g/L) – Frutose(g/L); b) Extrato de Soja(g/L) – Frutose(g/L); c) Carbonato de Cálcio(g/L) – Extrato de Soja(g/L)



A região vermelha observada no gráfico de superfícies, indica uma maior área de Actinomicina D. Podemos observar para a variável independente Frutose, que a máxima resposta ocorre com valores medianos, apresentando valor ótimo em 30g/L, indicado na **Figura 17.a) e b)**.

Para a variável independente Extrato de Soja, observou-se uma máxima resposta com valores altos, com valor ótimo em 5 g/L, indicado na **Figura 17 b) e c)**. Já a variável independente carbonato de cálcio, apresentou uma resposta

linear, ou seja, a faixa de variação utilizada não apresentou nenhuma influência na área de Actinomicina D, indicado na **Figura 17 b**).

Tabela 7. ANOVA

Fator	SS	Df	MS	F	p
(1) Frutose (Q)	9,265579E+08	1	9,265579E+08	7,26791	0,019456
(3) Extrato de Soja (L)	1,390701E+09	1	1,390701E+09	10,90865	0,006308
Erro Puro	1,529833E+09	12	1,274861E+08		
Total SS	3,847092E+09	14			

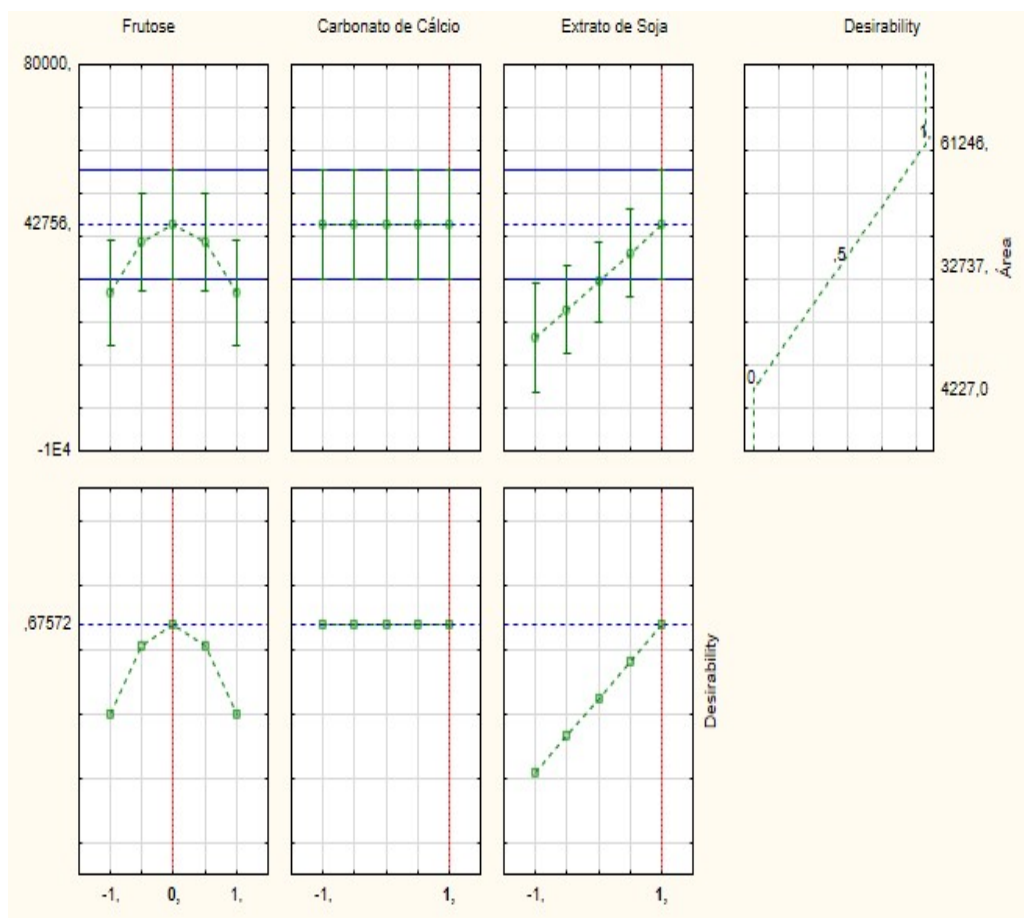
SS Soma dos quadrados. **Df** Graus de liberdade. **MS** Quadrado da média. **F** valor calculado. **p** Nível de significância. **(L)** linear. **(Q)** quadrático

Através da **Tabela 7**, podemos confirmar que os fatores que apresentam valores significativos são: efeito quadrático da frutose e efeito linear do extrato de soja.

A relação entre os valores experimentais em função dos valores calculados pelo modelo preditivo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,602. Isso nos indica que 60,2% das variações dos dados obtidos na análise, podem ser explicados pelo modelo matemático gerado.

Através da análise dos parâmetros de desejabilidade representado na **Figura 18**, foi possível determinar o ponto ótimo alcançado dentro da faixa de estudo determinada: (0) Frutose (1) Carbonato de Sódio e (1) Extrato de Soja, a variação de Carbonato de Cálcio não influenciou na produção de Actinomicina D.

Figura 18. Parâmetros de desejabilidade



Embora o planejamento tenha sido satisfatório, não foi possível concluir se a variável Extrato de Soja alcançou o máximo da sua otimização. Quanto a variável carbonato de cálcio, não é possível determinar se a faixa escolhida não apresentou variação suficiente para causar influência na área ou se o carbonato de cálcio não participa ativamente na produção de Actinomicina D pela actinobactéria. Visando o esclarecimento desses questionamentos, foi definido um novo Planejamento Box-Behnken, mantendo a variável independente Frutose nas mesmas condições e alterando as variáveis independentes Carbonato de Cálcio e Extrato de Soja. A nova faixa de estudo

está descrita na **Tabela 8** e os resultados no novo Planejamento estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 8. Variáveis independentes e níveis de variação do planejamento Box-Behnken.

Variáveis Independentes	Níveis de Variação		
	-1	0	1
Frutose (g/L)	20	30	40
Carbonato de Cálcio (g/L)	3	6	9
Extrato de Soja (g/L)	3	7	11

Tabela 9. Planejamento Box-Behnken e seus respectivos resultados

Experimento	Frutose	Carbonato de Cálcio	Extrato de sódio	Actinomicina D (área)
E1	-1	-1	0	30248
E2	1	-1	0	45004
E3	-1	1	0	30190
E4	1	1	0	29102
E5	-1	0	-1	1794
E6	1	0	-1	8478
E7	-1	0	1	30314
E8	1	0	1	66515
E9	0	-1	-1	21091
E10	0	1	-1	7864
E11	0	-1	1	39794
E12	0	1	1	41129
E13	0	0	0	32505
E14	0	0	0	38680
E15	0	0	0	37034

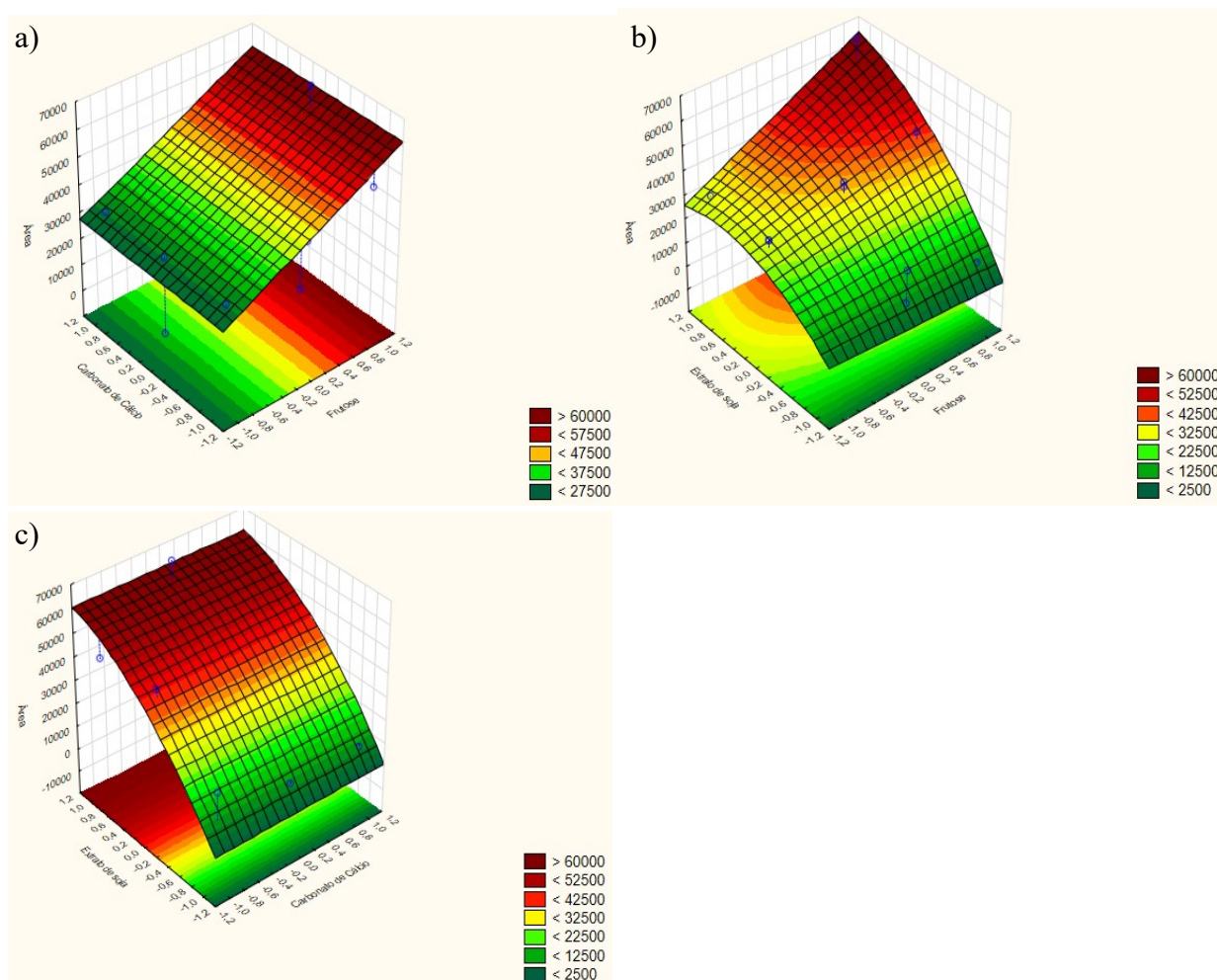
A partir dos resultados experimentais obteve-se um modelo matemático empírico capaz de prever o modelo estudado e gerar superfícies de respostas.

Equação 2. Fórmula matemática do modelo

$$Y = 7069,13 X_1 + 17315,63 X_3 - 7558,05 X_3^2 + 7379,25 X_1 \cdot X_3 + 34680,43$$

Na **Equação 2**, X_1 representa a influência da Frutose e X_3 a influência do Extrato de Sódio, na área de Actinomicina D (Y). A variação de Carbonato de Cálcio não apresentou influência na área de Actinomicina D.

Figura 19. Superfícies de resposta para a Actinomicina D. a) Carbonato de Cálcio(g/L) – Frutose(g/L); b) Extrato de Soja(g/L) – Frutose(g/L); c) Extrato de Soja(g/L) – Carbonato de Cálcio(g/L)



A região vermelha observada no gráfico de superfícies, indica uma maior área de Actinomicina D. Podemos observar para a variável independente Frutose, que a máxima resposta ocorre com valores altos, apresentando valor ótimo em 40g/L, indicado na **Figura.19.a) e b)** .

Para a variável independente Extrato de Soja, observou-se uma máxima resposta com valores altos, com valor ótimo em 11g/L, indicado na **Figura 19 b) e c)**. Já a variável independente Carbonato de Cálcio, apresentou uma resposta linear, ou seja, a faixa de variação utilizada não apresentou nenhuma influência na área de Actinomicina D, indicado na **Figura 19 b)**.

Tabela 10.ANOVA

Fator	SS	Df	MS	F	p
(1) Frutose (L)	3,997802E+08	1	3,997802E+08	39,0972	0,024636
(3) Extrato de Soja (L+Q) 1L by 3L	2,611911E+09	2	1,305955E+09	127,7181	0,007769
Falta de ajuste	4,822054E+08	8	6,027568E+07	5,8948	0,153075
Erro Puro	2,045049E+07	2	1,022530E+07		
Total SS	3,732160E+09	14			

SS Soma dos quadrados. **Df** Graus de liberdade. **MS** Quadrado da média. **F** valor calculado. **p** Nível de significância. **(L)** linear. **(Q)** quadrático

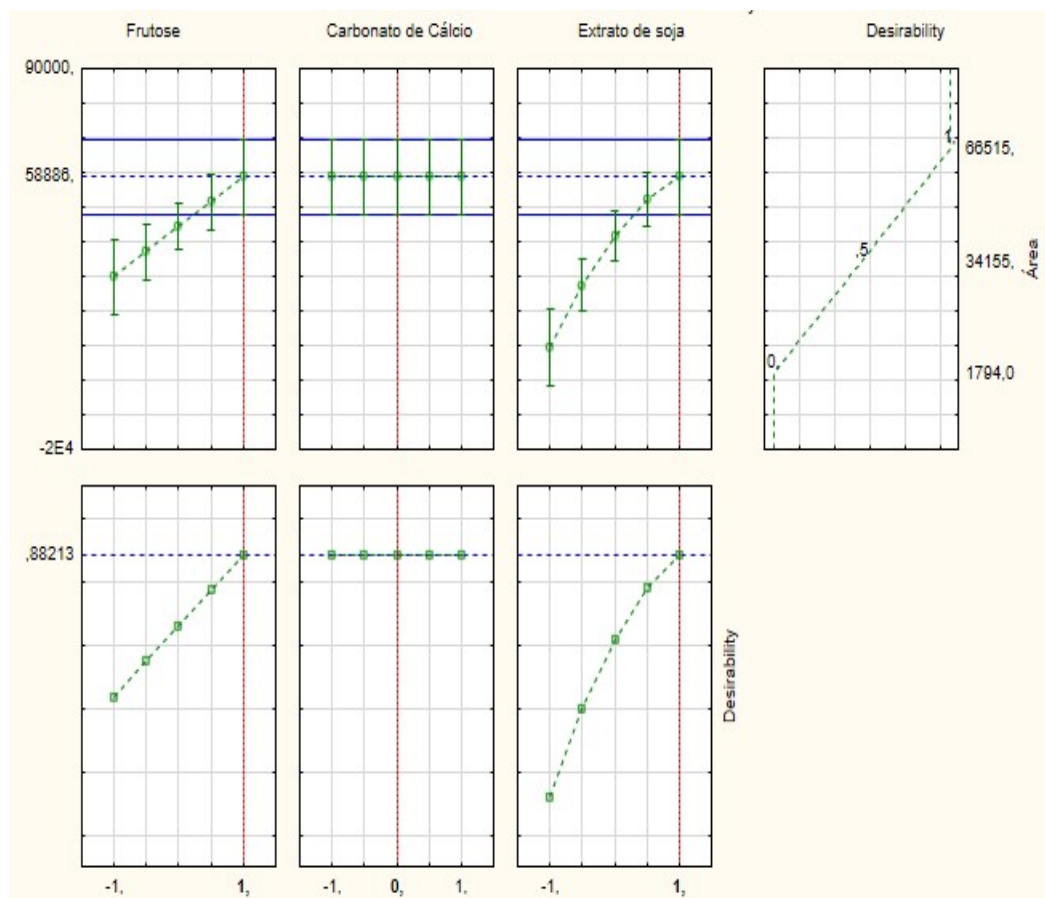
Através da **Tabela 10**, podemos confirmar que os fatores que apresentam valores significativos são: Efeito linear da Frutose, efeito linear e quadrático do Extrato de Soja e efeito da interação linear da Frutose com o Extrato de Soja. A falta de ajuste não apresentou efeito significativo, indicando um bom ajuste do modelo aplicado.

A relação entre os valores experimentais em função dos valores calculados pelo modelo preditivo apresentou um coeficiente de determinação (R²) de 0,865. Isso nos indica que 86,5% das variações dos dados obtidos na análise, podem ser explicados pelo modelo matemático gerado.

Através da análise dos parâmetros de desejabilidade representado na **Figura 20**, foi possível determinar o ponto ótimo alcançado dentro da faixa de estudo determinada: (1) Frutose (0) Carbonato de Cálcio e (1) Extrato de Soja, a variação de Carbonato de Cálcio não influenciou na produção de Actinomicina D.

A produção de Actinomicina D no ponto ótimo (E8) foi de 200 mg/L, apresentando um aumento na produção de Actinomicina D de aproximadamente 3 vezes em relação ao meio de cultivo sem otimização.

Figura 20. Parâmetros de desejabilidade



A variável independente Carbonato de Cálcio continuou não apresentando influência na produção de Actinomicina D, uma hipótese que explica esse fato é a de que o Carbonato de Cálcio tem a função apenas de tamponar o meio de cultivo, e não participa ativamente na produção dos metabólitos secundários.

Podemos observar que a proporção de frutose: extrato de soja utilizada no primeiro planejamento foi de aproximadamente 6 partes de frutose para uma parte de extrato de soja. Nessa proporção, observamos que para uma quantidade de extrato de soja de 5g/L, a quantidade de frutose ideal, para obter o melhor resultado, é de 30g/L. Isso significa que a otimização da variável independente frutose está ligado a variável independente extrato de soja de

forma que, para uma melhor otimização de frutose, a proporção de 6:1 (frutose: extrato de soja) deve ser utilizada.

No segundo planejamento foi fixada a faixa de trabalho da frutose e aumentou-se a faixa de trabalho do extrato de soja. Observamos que o ponto ótimo encontrado para Frutose, foi o ponto 1 (40g/L), ou seja, o ponto máximo do estudo. Uma possível explicação para o comportamento da otimização da frutose, quando comparado o primeiro planejamento com o segundo planejamento é que, ao analisar a proporção de frutose e extrato de soja temos, no ponto máximo, 4 partes de frutose para uma parte de extrato de soja. Observou-se que quando a proporção frutose:extrato de soja alcança a proporção 6:1, obtemos a melhor otimização da Frutose (ponto 0). Sendo assim, uma possível explicação para a resposta no ponto máximo da frutose no segundo planejamento é que a proporção frutose:extrato de soja está abaixo de 6:1.

Analisando o extrato de soja, observa-se no primeiro planejamento que o ponto de resposta máxima foi o ponto 1 (5g/L), impossibilitando afirmar que esse ponto é a melhor otimização possível para o extrato de soja no meio de cultivo selecionado. Na tentativa de melhorar a otimização, foi realizada uma alteração na faixa de trabalho do extrato de soja, aumentando as quantidades (em g) de massa de extrato de soja adicionadas no meio de cultivo. Como resposta, podemos observar no segundo planejamento, que embora o ponto ótimo ainda seja o ponto máximo (ponto 1: 11g/L) observamos um gráfico não retilíneo, apresentando uma curva, o que pode indicar que a otimização está próxima de alcançar o nível máximo com posterior queda na resposta. Dessa forma, uma possível conclusão é que a otimização de extrato de soja máxima

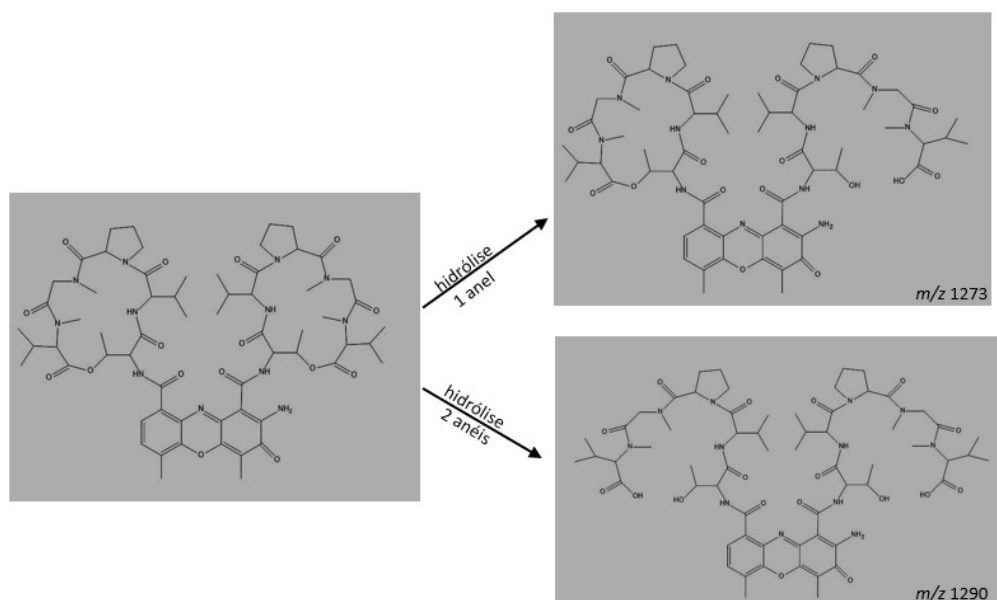
possível para o meio de cultivo com as proporções de frutose selecionadas (20-40 g/L) está próxima da massa utilizada (g/L).

4.4 Modificações estruturais da Actinomicina D

Foi realizada modificações estruturais na molécula de Actinomicina D, com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana das novas estruturas. Para isso foi realizada uma reação de hidrólise e uma reação de transesterificação na molécula de Actinomicina D e em seguida, foi avaliada sua atividade antimicrobiana através de um bioensaio utilizando bactérias gram-positivas e Gram-negativas

4.4.1 Reação de hidrólise

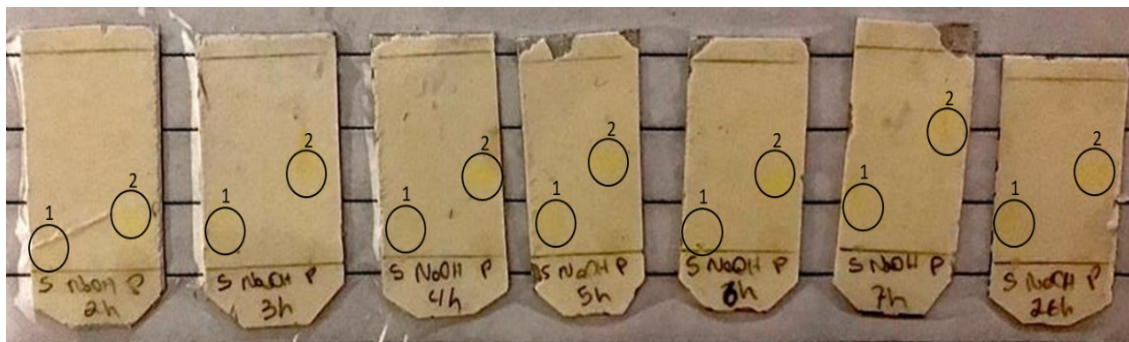
Figura 21. Hidrólise da Actinomicina D



Através do monitoramento da reação por placas de cromatografia em camada delgada (TLC) (**Figura 22**), pudemos observar a formação de um

produto de síntese com o valor de R_f diferente do material de partida, indicando a modificação estrutural da molécula de Actinomicina D.

Figura 22. Monitoramento por TLC da Hidrólise. 1. Produto da reação; 2. Extrato Bruto Caat 7-38



Analisando a **Figura 23** é possível observar os picos cromatográficos em 7,09 min e 7,65 min e seus respectivos espectros de ESI+ com m/z no valor de 1273, o qual indica a adição de um grupo hidroxila em um dos anéis peptídicos cíclicos da molécula de Actinomicina D.

Observamos também o pico cromatográfico em 6,88 min e seu espectro ESI+ com m/z 1290, que foi atribuído a adição de dois grupos hidroxila, um em cada anel peptídico cíclico da molécula de Actinomicina D.

Analisando os cromatogramas representados na **Figura 24**, observamos que ao decorrer da reação, o pico de Actinomicina D (em 10 min) diminui e ocorre o surgimento de dois picos, em 6,95 e 7,61min, indicando a hidrólise da Actinomicina D.

Figura 23.a) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38 b) ESI+ do pico em 7,09 min c) ESI+ do pico 7,65 min d) ESI+ do pico 6,88 min

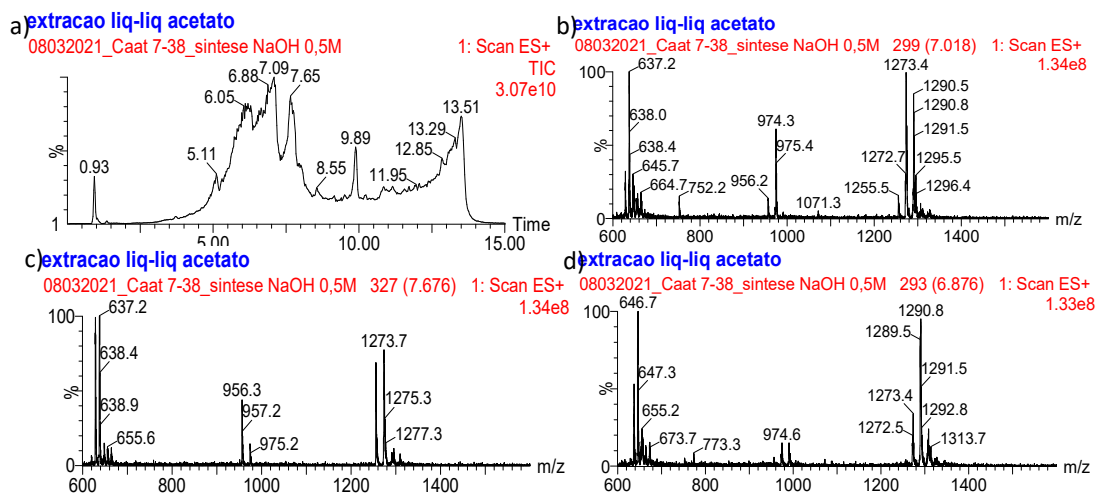
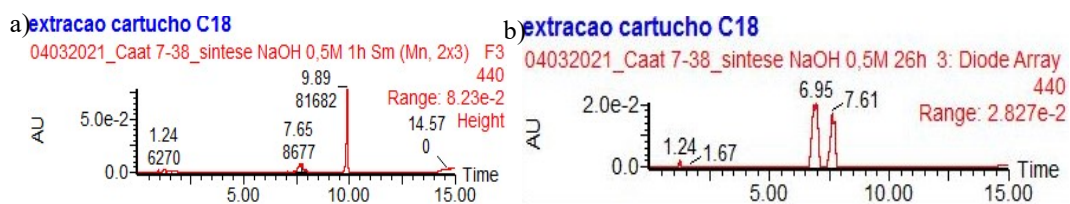
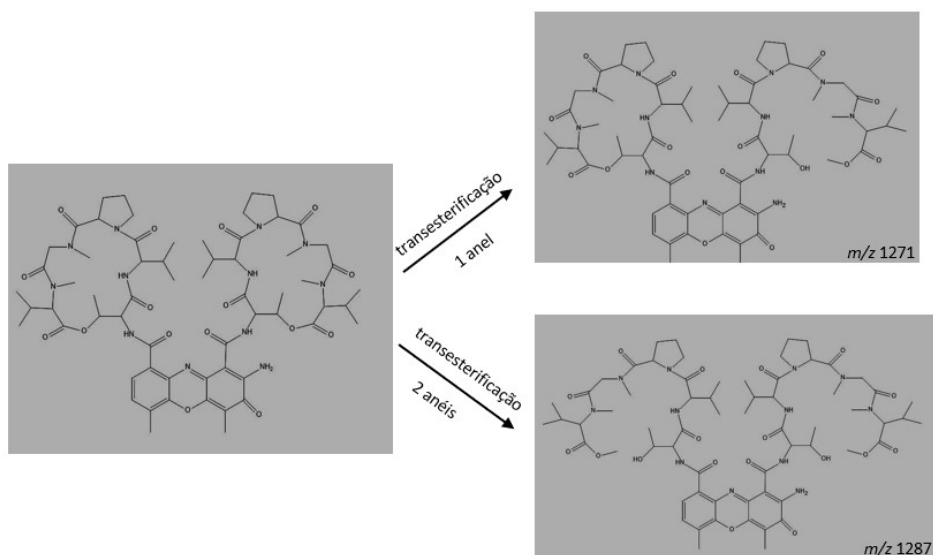


Figura 24.a) Cromatograma LC-UV: 1 hora de reação. B) Cromatograma LC-UV: 26h de reação



4.4.2 Reação de transesterificação com metanol

Figura 25. Transesterificação com metanol da Actinomicina D



Analisando a **Figura 26** é possível observar os picos cromatográficos em 8,78 min e 7,82 min com espectro de ESI+ com m/z no valor de 1271 que indica a adição de um grupo metoxila em um dos anéis peptídicos cíclicos da molécula de Actinomicina D.

Observamos também o pico cromatográfico em 6,36 min e seu espectro ESI+ com m/z 1287, que é atribuído a adição de dois grupos metoxila, um em cada anel peptídico cíclico da molécula de Actinomicina D.

Analisando os cromatogramas (**Figura 27**), observamos que ao decorrer da reação, a área do pico de Actinomicina D (em 9,86 min) diminui, indicando o consumo de Actinomicina D na reação de transesterificação, porém, observa-se a presença da Actinomicina D ao final da reação, indicando que a reação não ocorreu com todo o material adicionado inicialmente, restando Actinomicina D no produto.

Figura 26. a) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38 b) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38, m/z 1271 c) ESI+ do pico em 8,78 min d) Cromatograma LC-MS para o extrato bruto da Caat 7-38, m/z 1287 e) ESI+ do pico 6,36 min

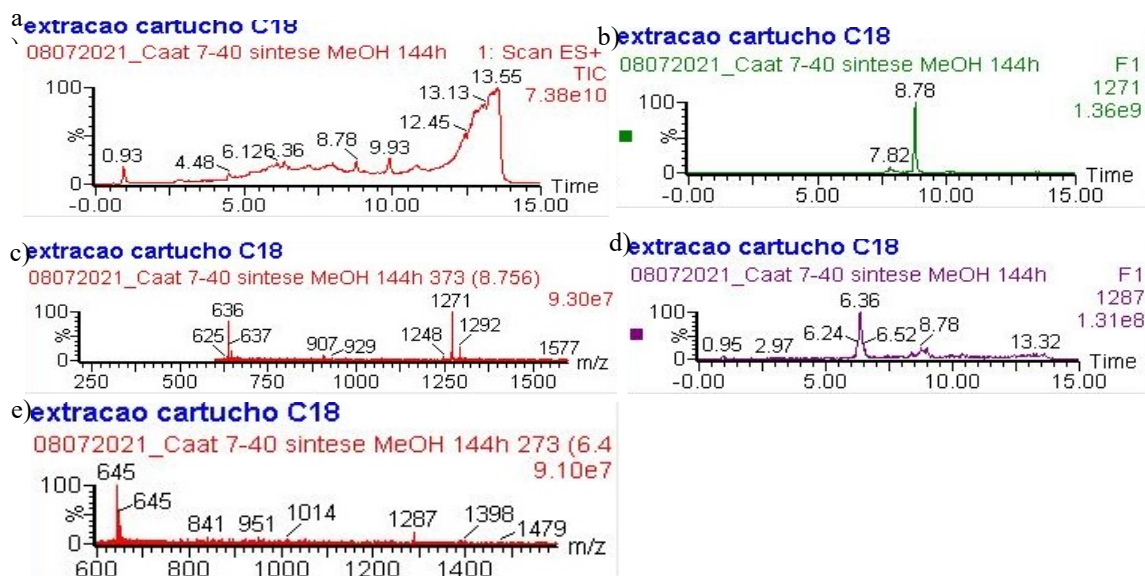
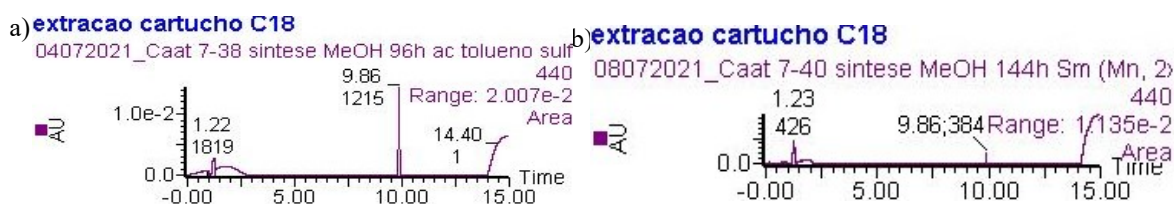


Figura 27. a) Cromatograma LC-UV: 96 hora de reação. B) Cromatograma LC-UV: 144 h de reação



Após a realização das modificações estruturais da Actinomicina D, foi realizado o bioensaio para avaliar a atividade antibiótica das estruturas obtidas. Foram utilizadas as bactérias *Streptococcus Agalactiae* (97) e *Escherichia coli* K12 e *Xantomonas citri* FDC12.

Analisando os bioensaios (**Figuras 28, 29 e 30**), é possível observar que a hidrólise da Actinomicina D (número 1) não possui atividade antibiótica para nenhuma das três bactérias testadas. Já a reação de transesterificação com metanol da Actinomicina D (número 3), apresentou um halo de inibição para as bactérias *Streptococcus Agalactiae* (97) e *Escherichia coli* K12, porém o halo

de inibição é menor do que o halo formado pela Actinomicina D pura, demonstrando assim que a atividade antibiótica do produto da reação é menor do que a atividade da Actinomicina D. É necessário pontuar também que parte da Actinomicina D não sofreu a reação de transesterificação com metanol, sendo possível observar isso no cromatograma da reação (**Figura 27**), onde aparece um pico em 9,86 minutos, correspondente a Actinomicina D, dessa forma, parte do halo de inibição demonstrado no ponto 3, é em decorrência da atividade antibiótica da Actinomicina D.

Figura 28. Bioensaio com bactéria 97 (*Streptococcus Agalactiae*). 1. Síntese NaOH; 2. Extrato bruto; 3. Síntese MeOH; 4. Actinomicina D Purificada; C. Tetraciclina

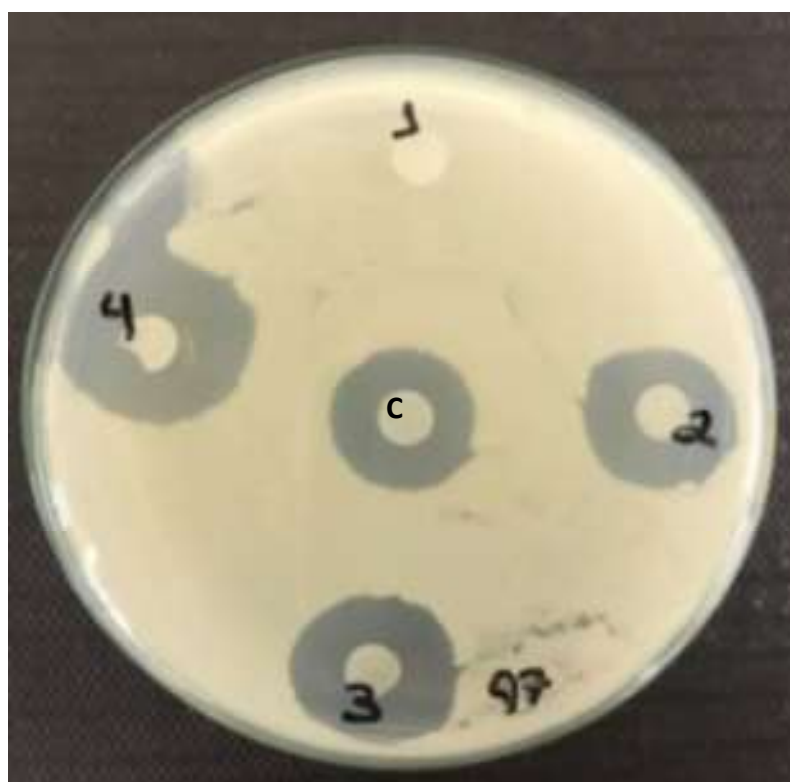


Figura 29. Bioensaio com bactéria xantomonas FDC12. 1. Síntese NaOH; 2. Extrato bruto; 3. Síntese MeOH; 4. Actinomicina D Purificada; C. Tetraciclina

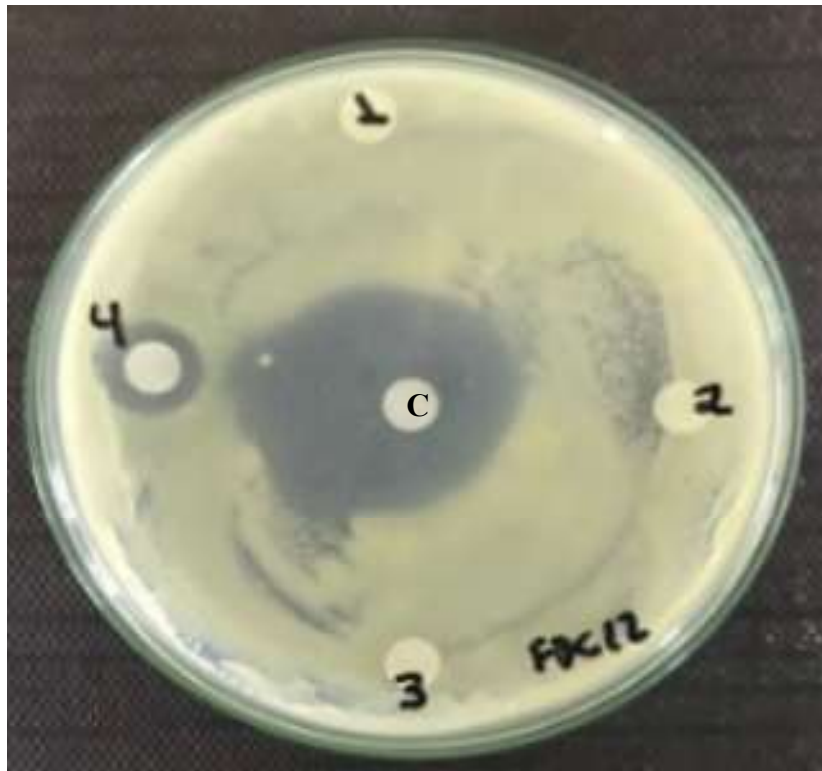
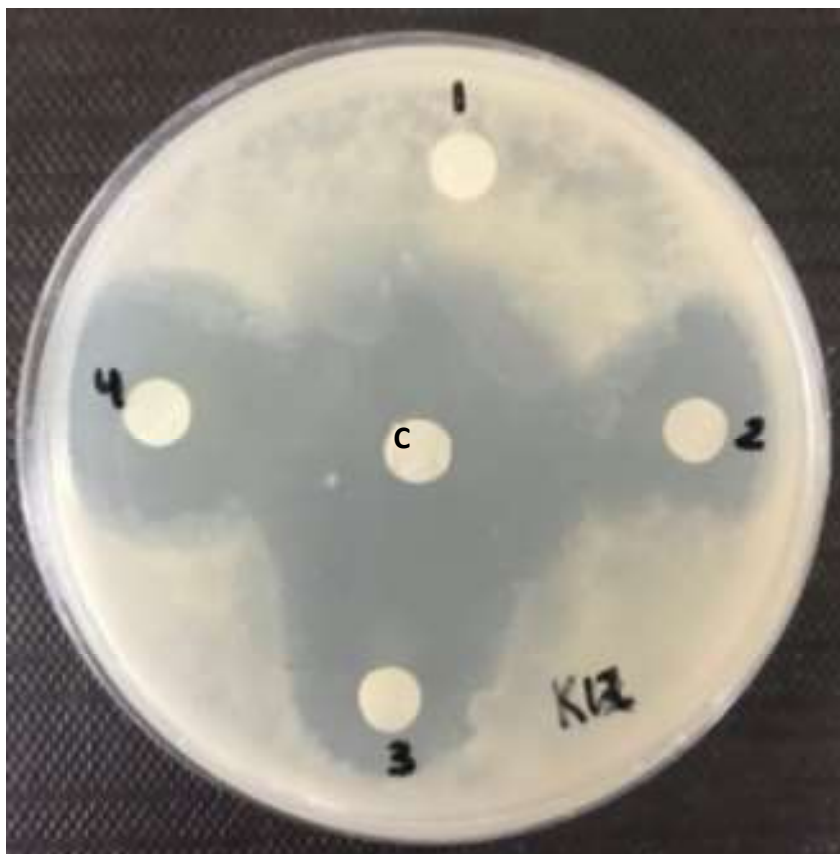


Figura 30. Bioensaio com bactéria Escherichia coli K12. 1. Síntese NaOH; 2. Extrato bruto; 3. Síntese MeOH; 4. Actinomicina D Purificada; C. Tetraciclina



5 Conclusão

Com base nos resultados obtidos durante o desenvolvimento do projeto de mestrado, podemos fazer as seguintes conclusões:

- O meio de cultivo composto por extrato de soja, Carbonato de Cálcio e Frutose se mostrou o mais eficiente, dentre os meios testados, para a produção da Actinomicina D pela actinobactéria Caat 7-38.
- O volume de pré-inóculo adicionado na fermentação não apresentou influência na produção de Actinomicina D ao final de 10 dias de fermentação. Sendo padronizado o uso de 1 mL de pré-inóculo adicionado.
- Através do design experimental do tipo Box-Behnken foi possível otimizar a produção de Actinomicina D, onde obteve-se um aumento de aproximadamente 3 vezes em relação ao meio de cultivo sem otimização, atingindo uma produção de 200mg/L.
- Foi realizada a modificação estrutural da Actinomicina D, resultando na hidrólise dos anéis peptídicos da estrutura.
- Foi realizado um bioensaio das modificações estruturais realizadas na Actinomicina D, onde a hidrólise não apresentou atividade para as bactérias 97 (*Streptococcus Agalactiae*), *Escherichia coli* K12 e *Xantomonas citri* FDC12. A transesterificação com metanol apresentou atividade para as bactérias avaliadas, porém essa atividade foi menor do que a atividade da Actimicina D sem alteração estrutural.

6 Referências

1. Barka, E. A. *et al.* Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and
1. Vining, L. . *Secondary Metabolism, in Biotechnology: A comprehensive
treatise in 8 volumes.* (1986).
2. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. Rare genera of
actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van
Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **78**, 399–405 (2000).
3. Hutchinson, C. R. Microbial polyketide synthases: More and more prolific. *Proc.
Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3336–3338 (1999).
4. Simpson, T. J. The biosynthesis of polyketides. *Nat. Prod. Rep.* **2**, 321–347
(1985).
5. Baltz, R. H. Model for Synthetic Biology To Accelerate the Evolution of
Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways. *ACS Synth. Biol.* **3**, 748–758
(2014).
6. Olano, C., Méndez, C. & Salas, J. A. Antitumor compounds from marine
actinomycetes. *Mar. Drugs* **7**, 210–248 (2009).
7. Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.*
18, 355–383 (2000).
8. Subramani, R. & Aalbersberg, W. Marine actinomycetes: An ongoing source of
novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* **167**, 571–580 (2012).
9. Stonard, R.J., Miller-wideman, M. A. *Herbicides and plant growth regulators., in
Agrochemicals from natural products.* (1994).
10. Tegge, G. Rehm, H. J., and G. Reed (Ed.): Biotechnology, A Comprehensive
Treatise in 8 Volumes. Vol. 3: Biomass, Microorganisms for Special
Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources. Volume

- Editor: H. Dellweg. Verlag Chemie, Weinheim –Deer. *Starch - Stärke* **35**, 367–367 (1983).
11. Barka, E. A. *et al.* Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, (2016).
 12. (IBGE), F.I.B.d.G.e.E., I. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. *Man. Técnico da Veg. Bras. (Manuais Técnicos em Geociências no 1)* **Rio de Jan**, (1992).
 13. Gorlach-Lira, K. & Coutinho, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* **38**, 135–141 (2007).
 14. Adunoye, G. O. *et al.* Advances in Applied Science and Technology Vol. 5. *Adv. Appl. Sci. Technol. Vol. 5* (2019) doi:10.9734/bpi/aast/v5.
 15. Mendes-Silva, T. de C. D. *et al.* Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. *Adv. Microbiol.* **10**, 397–410 (2020).
 16. Parada-Pinilla, M. P. *et al.* Biopolymer production by halotolerant bacteria isolated from Caatinga biome. *Brazilian J. Microbiol.* **52**, 547–559 (2021).
 17. de Vasconcellos, R. L. F., da Silva, M. C. P., Ribeiro, C. M. & Cardoso, E. J. B. N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. *Sci. Agric.* **67**, 743–746 (2010).
 18. FREITAS, S.; SILVEIRA, A. Microbiota do solo e qualidade ambiental. *Campinas Inst. Agrônomo Campinas-IAC* (2007).
 19. PEREIRA, J. Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera. *Embrapa Agrobiologia. Documentos* ISSN 1517-8498 (2000).
 20. SILVEIRA, A.; CARDOSO, E. Micorrizas. Microbiologia do solo. *Soc. Bras.*

- Ciência do Solo* 257–282 (1992).
21. Rincon-Florez, V. A., Carvalhais, L. C. & Schenk, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity* **5**, 581–612 (2013).
 22. E.Katz. Biosynthesis. in *Antibiotics biosynthesis* (eds. Gottlieb, D. & Shaw, P. D.) (Springer Berlin Heidelberg, 1967). doi:10.1007/978-3-662-38441-1.
 23. Marahiel, M. A. Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **4**, 561–567 (1997).
 24. Goodfellow, M.I.W., S. T.; Sharpe, M. E.; Holt, J. G. *Suprageneric classification of actinomycetes. Bergey's manual of systematic bacteriology.* (1989).
 25. Waksman, S. A. Actinomycin-nature, formation and activities. (1968).
 26. Nucleic Acid-Drug Interactions. . [cited 2019 10 de março]; <<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions/>>.
 27. Imamichi, T. *et al.* Actinomycin D Induces High-Level Resistance to Thymidine Analogs in Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Interfering with Host Cell Thymidine Kinase Expression. *J. Virol.* **77**, 1011–1020 (2003).
 28. TURAN, T. e. a. Results with EMA/CO (etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, vincristine) chemotherapy. *Gestation. Trophobl. neoplasia. . Int. J. Gynecol. Cancer*, **16**, 1432-1438. (2006).
 29. FARBER, S. e. a. Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children. 1960. *Journal Urol.* **168**, 2560–2563 (2002).
 30. Kulkarni, M., Gorthi, S., Banerjee, G. & Chattopadhyay, P. Production, characterization and optimization of actinomycin D from *Streptomyces hydrogenans* IB310, a(n antagonistic bacterium against phytopathogens. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **10**, 69–74 (2017).

31. Toumatia, O. *et al.* Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *J. Basic Microbiol.* **55**, 221–228 (2015).
32. Qureshi, K. A. *et al.* Isolation, characterization, anti-MRSA evaluation, and in-silico multi-target anti-microbial validations of actinomycin X2 and actinomycin D produced by novel *Streptomyces smyrnaeus* UKAQ_23. *Sci. Rep.* **11**, 1–21 (2021).
33. Dahal, R. H. *et al.* The genome insights of *Streptomyces lannensis* T1317-0309 reveals actinomycin D production. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **73**, 837–844 (2020).
34. François, I., Sandra, K. & Sandra, P. Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations-A review. *Anal. Chim. Acta* **641**, 14–31 (2009).
35. Lanças, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente ‘compatíveis’? *Sci. Chromatogr.* **5**, 27–46 (2009).
36. Xu, Z. N., Shen, W. H., Chen, X. Y., Lin, J. P. & Cen, P. L. A high-throughput method for screening of rapamycin-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus* by cultivation in 96-well microtiter plates. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1135–1140 (2005).
37. SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *J. Microbiol. Methods* **25**, n.1, 5–17.
38. Lang, G. *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *J. Nat. Prod.* **71**, 1595–1599 (2008).
39. Konishi, Y. *et al.* Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to

- expedite dereplication of natural products. *Anal. Chem.* **79**, 1187–1197 (2007).
40. Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M.; Constant, H. L. . C. & H. B.; Fang, L.; Seo, E. K.; Long, L.; Cui, B.; Barillas, K. S. . The dereplication of plant_derives natural products, In Atta – ur – Rahman. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **19**, 749–791 (1997).
41. Hoffmann, D. *Mass Spectrometry*. Wiley vol. 1796 (Wiley, 2007).
42. Ferreira, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta* **597**, 179–186 (2007).
43. Box, G. E. P. & Behnken, D. W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics* **2**, 455–475 (1960).
44. Dinç-Zor, Ş. & Aksu Dönmez, Ö. Box-Behnken Design-Desirability Function Approach in Optimization of HPLC Method for Simultaneous Determination of Ibuprofen Along with Additives in Syrup Formulation. *J. AOAC Int.* **104**, 78–83 (2021).
45. Yildiz, G., Oztekin, N., Orbay, A. & Senkal, F. Voltammetric determination of nitrite in meat products using polyvinylimidazole modified carbon paste electrode. *Food Chem.* **152**, 245–250 (2014).
46. Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R. & Jebakumar, S. R. D. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Front. Microbiol.* **5**, 1–11 (2014).
47. Constantino, M. Os mecanismos de hidrólise e formação de ésteres. in *Química orgânica - curso básico universitário - Volume 2* 321–332 (TLC, 2005).
48. Dhanamurugan, A. & Subramanian, R. Performance and emission characteristics of a diesel engine with various injection pressures using bael biodiesel. *Appl. Mech. Mater.* **592–594**, 1714–1718 (2014).

49. Geris, R. *et al.* Biodiesel from soybean oil - Experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories. *Quim. Nova* **30**, 1369–1373 (2007).
50. Sousa, M. F. V. Q., Lopes, C. E. & Pereira, N. Development of a bioprocess for the production of actinomycin-D. *Brazilian J. Chem. Eng.* **19**, 277–285 (2002).
51. WILLIAMS, E. K. & S. T. Selection of Media for Isolation of Streptomycetes. *Nature* **2**, 48–50 (1964).
52. SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Cooperative Description of Type Strains of Streptomyces: V. Additional Descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**, 265–394 (1972).
53. Cisalpino, P. S. Levantamento Da Curva De Crescimento Da Bactéria M. Phlei Para Obtenção De Biomassa Em Ensaio De Separação Sólido-Líquido. *Xxiv Entmme* 749–755 (2011).