



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp.**

INGRID REIS DA SILVA

**MANAUS
2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

INGRID REIS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp.**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Rudi Emerson Lima Procópio
Co-orientador: Dr. Valdir Florêncio da Veiga Jr.

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586c Silva, Ingrid Reis da
Caracterização de compostos antimicrobianos produzidos por
Streptomyces sp. / Ingrid Reis da Silva. 2016
103 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rudi Emerson de Lima Procópio
Coorientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Actinomicetos. 2. Antibiótico. 3. Streptomyces. 4.
Actinomicinas. I. Procópio, Rudi Emerson de Lima II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia

Candidato(a): **Ingrid Reis da Silva**

Título da Tese: **Caracterização de Compostos Antimicrobianos Produzidos por *Streptomyces* sp.**

Orientador: **Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio**
Co-Orientador: **Dr. Valdir Florêncio da Veiga Jr.**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada em 16 / 12 / 2016, considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Presidente Assinatura
Nome **Rudi Emerson de Lima Procópio**
Instituição **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

Examinador(a) Assinatura
Nome **Ieda Hortêncio Batista**
Instituição **Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

Examinador(a) Assinatura
Nome **Edmar Vaz de Andrade**
Instituição **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**

Examinador(a) Assinatura
Nome **André Luis Willerding**
Instituição **Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia do Amazonas**

(SECT)

Examinador(a) Assinatura
Nome **Sandra Patrícia Zanotto**
Instituição **Centro de Biotecnologia do Amazonas (CBA)**

*Ofereço
À Deus,
Por ter me dado força nos momentos de fraqueza;
Ânimo nos momentos de tristeza;
Calmia nos momentos de desespero;
Por estar sempre presente em todos os momentos de
minha vida;
Obrigada Senhor, pois jamais teria conseguido sem ti.*

Agradecimentos

Ao Dr. Rudi Procópio, pela orientação e amizade, muito importa em minha construção pessoal e profissional. Agradeço pelo carinho, conhecimentos científicos e confiança depositada em mim ao longo de todos esses anos de trabalho.

Ao Dr. Valdir Florêncio da Veiga Jr, pela orientação, incentivo e apoio na realização deste trabalho. Agradeço pelo carinho e preciosos ensinamentos profissionais que tive durante estes anos de convivência.

À amiga Clarice Maia pelas sugestões e ajuda imprescindível. Sempre disposta a colaborar com seus conhecimentos mesmo distante e, principalmente pela paciência, aprendizado e amizade.

À Universidade Federal do Amazonas, juntamente com a coordenação do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro desta pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia, em especial às Coordenações de Química de Produtos Naturais (LQPN) e Central Analítica na pessoa do Dr. Felipe Moura A. da Silva, pela disponibilidade na realização das análises finais necessárias para a conclusão deste trabalho.

À amiga Amanda Lima Dias pela contribuição na realização deste trabalho. Pelos ensinamentos adquiridos no Laboratório de Fitoquímica do Centro de Biotecnologia da Amazônia. Pela paciência e principalmente pela amizade.

À minha querida amiga Rosângela Santana Martins que muito me ajudou na realização deste trabalho.

Ao meu querido esposo Dinálvaro Nogueira, pelo amor e incentivo à realização de meus projetos.

À minha filha Maria Clara, minha luz e fonte de inspiração.

À minha mãe, Maria do Carmo, que apesar de distante, sempre me apóia e torce pelo meu sucesso.

À Deus, por mais essa oportunidade de aprender, crescer e vencer.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

O aumento de bactérias resistentes a antibióticos incentiva a pesquisa por novas substâncias antibacterianas. Diante disso, a seleção de microrganismos com potencial para a produção de novos compostos antimicrobianos tem sido amplamente estudada. Dentre estes microrganismos uma especial atenção é dada aos actinomicetos que apresentam capacidade de produzir uma ampla variedade de compostos bioativos como antibióticos, antifúngicos, antitumorais entre outros compostos que podem ser aplicados nos mais diversos segmentos da indústria. O gênero *Streptomyces* é considerado de grande importância industrial devido à sua capacidade de produzir muitos metabólitos secundários, respondendo por 80% dos antibióticos utilizados atualmente. Em trabalhos anteriores, foi possível reportar a atividade antimicrobiana de uma linhagem de *Streptomyces* spp. que apresentou atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Enterococcus faecalis* ATCC 292123. Posteriormente, verificou-se ainda a sua atividade tuberculicida inibindo o crescimento da *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294). A partir desses resultados preliminares, o presente trabalho teve por objetivo analisar os extratos e frações de metabólitos de *Streptomyces* sp. visando isolar, purificar e identificar quimicamente o(s) composto(s) com atividade antimicrobiana e tuberculicida. A partir dos metabólitos obtidos em meio AC líquido e por partição líquido-líquido utilizando solventes de polaridade crescente, obteve-se as frações em hexano (fr-Hex), acetato de etila (fr-AcoEt) e clorofórmio (fr-Clo). A fr-Clo foi escolhida para dar continuidade aos ensaios pois o seu rendimento foi maior, apresentando alta atividade antibacteriana nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*. Dessa forma, a fr-Clo foi submetida à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando vários sistemas de eluentes e, em seguida, a técnica de Bioautografia foi realizada para identificar os compostos com atividade. Dessa purificação foram obtidas duas sub-frações bioativas, as quais foram submetidas ao isolamento dos compostos pela técnica de CCD preparativa e HPLC – DAD-MS. As substâncias isoladas foram denominadas Clarina A e Clarina B, as mesmas apresentaram uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,0 µg/mL para a Clarina A e 0,5 µg/mL para Clarina B frente a bactéria *Staphylococcus aureus* e 16 µg/mL frente a *Mycobacterium smegmatis*. As mesmas não apresentaram citotoxicidade para células não tumorais 3T3-L1. As substâncias Clarina A e Clarina B foram analisadas por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de baixa e alta resolução para identificação química. As substâncias isoladas foram identificadas como Actinomicina D e Actinomicina X₂ com *m/z* de 1277 [M + Na] e 1291 [M+Na]. A forte atividade antibacteriana apresentada pelas substâncias isoladas torna este produto uma importante fonte de compostos antibacterianos naturais.

Palavras-chave: Actinomicetos, Antibiótico, *Streptomyces* spp, Actinomicinas.

ABSTRACTS

The increase of antibiotic-resistant bacteria encourages the search for new antibacterial substances. Therefore, the selection of microorganisms with potential for the production of new antimicrobial compounds has been extensively studied. Among these microorganisms, special attention is given to actinomycetes that are capable of producing a wide variety of bioactive compounds, such as antibiotics, antifungals, antitumorals and other compounds that can be applied in various segments of the industry. The genus *Streptomyces* is considered of great industrial importance due to its capacity to produce many secondary metabolites, accounting for 80% of the antibiotics currently used. In previous studies, it was possible to report the antimicrobial activity of a strain of *Streptomyces* spp. Which showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 and *Enterococcus faecalis* ATCC 292123. Subsequently, its tuberculicidal activity was also inhibited by the growth of *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294). From these preliminary results, the present work had the objective of analyzing extracts and fractions of metabolites of *Streptomyces* sp. Aiming to isolate, purify and chemically identify the compound (s) with antimicrobial and tuberculicidal activity. The fractions in hexane (fr-Hex), ethyl acetate (fr-AcoEt) and chloroform (fr-Clo) were obtained from the metabolites obtained in liquid AC medium and by liquid-liquid partition using solvents of increasing polarity. The fr-Clo was chosen to continue the tests because its yield was higher, presenting high antibacterial activity in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium smegmatis*. Thus, the fr-Clo was subjected to thin layer chromatography (CCD) using several eluent systems and then the Bioautography technique was performed to identify the compounds with activity. From this purification two bioactive sub-fractions were obtained, which were subjected to the isolation of the compounds by preparative CCD and HPLC-DAD-MS technique. The isolated substances were named Clarin A and Clarin B, which presented a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 1.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for Clarin A and 0.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for Clarin B against *Staphylococcus aureus* and 16 $\mu\text{g} / \text{MI}$ against *Mycobacterium smegmatis*. They did not present cytotoxicity to 3T3-L1 non-tumor cells. The Clarin A and Clarin B substances were analyzed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and low resolution and high resolution Mass Spectrometry techniques for chemical identification. The isolated substances were identified as Actinomycin D and Actinomycin X2 with m / z of 1277 [M + Na] and 1291 [M + Na]. The strong antibacterial activity of the isolated substances makes this product an important source of natural antibacterial compounds.

Key words: Actinomycetes, Antibiotic, *Streptomyces* spp, Actinomycins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição dos micro-organismos produtores dos metabólitos secundários bioativos	17
Figura 2.	Diversidade morfológica de actinomicetos do gênero <i>Streptomyces</i>	19
Figura 3.	Estrutura química de lansai a-d (1-4) produzidas por <i>Streptomyces</i> sp.	26
Figura 4.	Estrutura química geldanamicina produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. (1); Análogo geldamicina (2)	26
Figura 5.	Estrutura química de Azalomicina f4a produzidas por <i>Streptomyces</i> sp.	27
Figura 6.	Estrutura da Chenomicina A produzidas por <i>Streptomyces</i> sp.	28
Figura 7.	Estrutura química (I) Valinomicina; (II) Estaurosporina; (III) Butenólídeo produzidas por <i>Streptomyces</i> sp.	29
Figura 8.	Estrutura química da Streptorubin B produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. ...	31
Figura 9.	Estrutura química dos derivados fenoxazínicos	36
Figura 10.	Estrutura da Actinomicina D	36
Figura 11.	Representação esquemática de um espectrômetro de massas	40
Figura 12.	Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado dos compostos com atividade antibacteriana de <i>Streptomyces</i>	43
Figura 13.	Fluxograma de procedimento da Partição Líquido-Líquido (PLL)	46
Figura 14.	Análise das Placas Cromatográficas em Scanner	48
Figura 15.	Método de antibiose por difusão em Ágar/disco	53
Figura 16.	Procedimento sequencial para o preparo do inóculo de <i>M. tuberculosis</i> , utilizado no teste de antibiose frente às frações de <i>Streptomyces</i> sp	54
Figura 17.	Procedimento de Bioensaio pela técnica de Alamar Blue, para verificar a ação inibitória do <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 18.	Esquema para Determinação da Concentração Inibitória Mínima de antagonismo frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 dos compostos isolados	57
Figura 19.	Metabólitos antimicrobianos de <i>Streptomyces</i>	59
Figura 20.	Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto	60
Figura 21.	Perfil Cromatográfico das frações obtidas da PLL	61
Figura 22.	Perfil cromatográfico da fração em Clorofórmio	62
Figura 23.	Perfil Cromatográfico mostrando a evolução do fracionamento e purificação dos compostos com atividade antibacteriana do <i>Streptomyces</i>	62
Figura 24	UV 254, 366 e 400. Cromatograma de todas as frações (I); Fração Clorofórmio (II); Clarina A (III) e Clarina B (IV)	64
	Bioautografia dos Compostos Isolados.....	64
Figura 25.	Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para Fração Clorofórmio ...	65
Figura 26.	Ampliação do Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para fração clorofórmio	66
Figura 27.	Espectros de DAD dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio	66
Figura 28.	Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para o extrato. Corrida isocrática 70% de B por 16 minutos (1 mL.min ⁻¹)	67
Figura 29	Bioensaio de antibiose dos extratos obtidos da PLL frente a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	68

Figura 30A	Antibiose em Agar do caldo de fermentação do <i>Streptomyces</i> frente à bactéria <i>M. smegmatis</i>	69
Figura 30 B	Antibiose em Agar disco da fração em Clorofórmio frente à bactéria <i>M. smegmatis</i>	69
Figura 31.	Bioensaio pela técnica de Alamar Blue, para verificação da ação inibitória do <i>M. tuberculosis</i> pela fração em hexano e clorofórmio	70
Figura 32.	Bioautografia da fração em Clorofórmio	71
Figura 33.	Bioautografia dos compostos isolados	72
Figura 34.	Bioensaio antibacteriano dos Compostos isolados	73
Figura 35.	Concentração Inibitória Mínima de antagonismo a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23923 dos Compostos Isolados	74
Figura 36.	Concentração Inibitória Mínima de antagonismo a <i>M. smegmatis</i> dos Compostos Isolados	75
Figura 37.	Efeito citotóxico das substâncias Clarina (A) e Clarina (B) nas diferentes concentrações testadas (1-200 µg/mL) em 24 h de incubação sobre a viabilidade das células 3T3-L1	76
Figura 38.	Efeito dos tratamentos com as substâncias Clarina A e B nas concentrações de 1 a 200µg/mL (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7	77
Figura 39.	Efeito dos tratamentos com as substâncias Clarina A e B nas concentrações de 1 a 200µg/mL (72 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7	77
Figura 40.	Espectro de ESI-MS (modo positivo) em modo <i>full scan</i> da fração clorofórmio (A), Clarina A (B) e Clarina B (C) isolados por CCD	79
Figura 41.	Espectro de ESI-MS ² (modo positivo) dos íons de <i>m/z</i> 1278 (A) e 1292 (B) presentes na fração clorofórmio	80
Figura 42.	Espectro de APCI-MS (modo positivo) dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio	81
Figura 43.	Espectro de APCI-MS (modo negativo) dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio	81
Figura 44.	Espectro de ESI-MS (modo positivo) dos picos cromatográficos de interesse (A e B)	82
Figura 45.	Espectro de ESI-HRMSMS (modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 1291.5972 presente na amostra A, obtida a partir do fracionamento por HPLC-preparativo da fração clorofórmio	83
Figura 46.	Espectro de ESI-HRMSMS (modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 1277.6185 presente na amostra B, obtida a partir do fracionamento por HPLC-preparativo da fração clorofórmio	83
Figura 47.	Espectro de COSY (¹ H 600 MHz, CDCl ₃) da substância Clarina A	84
Figura 48.	Estrutura da Actinomicina D	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i>	24
Tabela 2.	Antimicrobianos produzidos por <i>Streptomyces</i> disponíveis no mercado	33
Tabela 3.	Classificação da atividade antibacteriana apresentada pelos extratos obtidos da PLL	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Actinobactérias e o Gênero <i>Streptomyces</i>	16
3.2 Ecologia dos <i>Streptomyces</i>	21
3.3 Metabolismo Secundário e a Produção de Compostos Biologicamente Ativos	22
3.4 Tuberculose e <i>Streptomyces</i>	31
3.5 Actinomicinas	34
3.6 Técnicas Cromatográficas de Separação, Purificação e Identificação de Compostos Antimicrobianos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Fluxogramas de Procedimentos	43
4.2 Material Biológico.....	43
4.2.1 <i>Streptomyces</i>	43
4.2.2 Cepas de <i>Mycobacterium</i> spp	44
4.2.3 Bactérias Indicadoras	44
4.3 Obtenção dos Metabólitos Microbianos	45
4.4 Fracionamento Bioguiado dos Compostos Isolados	45
4.4.1 Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto.....	45
4.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	46
4.4.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa	47
4.4.4 Análise em Scanner dos Compostos Isolados.....	48
4.5 Isolamento por HPLC das Substâncias Bioativas	48
4.5.1 Investigação da fração Clorofórmio por HPLC-DAD-MS	49
4.5.2 Fracionamento por HPLC Semi-Preparativo	49
4.5.3 Solventes	50
4.6 Caracterização das Substâncias Isoladas	50
4.6.1 Análise por Espectrometria de Massas	50
4.6.2 Análise por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização “eletrospray” (ESI-MS)	50
4.6.3 Análise por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI-MS)	51
4.6.4 Análise por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-HRMSMS)	51
4.6.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear – NMR	51
4.7 Bioensaios das Frações e Compostos Isolados por CCD	52
4.7.1 Bioensaio de Antibiose - Método de Difusão em Discos/ Ágar	52
4.7.2 Bioensaios de Antibiose contra <i>M. tuberculosis</i>	53
4.7.3 Bioautografia da Fração em Clorofórmio e Compostos Isolados	55
4.8 Bioensaios dos Compostos Isolados por HPLC	56
4.8.1 Difusão em Disco	56
4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Compostos Isolados pelo Método de Microdiluição em Microplaca	56

4.8.3 Avaliação da Atividade Citotóxica	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Obtenção dos Metabólitos Microbianos	59
5.2 Isolamento Bioguiado dos Compostos Bioativos	59
5.2.1 Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto	59
5.2.2 Cromatografia em Camada Delgada	60
5.2.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa	61
5.2.4 Perfil Cromatográfico dos Compostos Isolados por CCD	62
5.2.5 Análise em Scanner dos Compostos Isolados	63
5.3 Isolamento por HPLC das Substâncias Ativas	65
5.3.1 Investigação da Fração Clorofórmio por HPLC-DAD-MS	65
5.3.2 Fracionamento por HPLC Semi-preparativo	67
5.4 Bioensaios das Frações e Compostos Isolados por CCD	67
5.4.1 Bioensaio de Antibiose – Método de Difusão em Disco/ Ágar	67
5.4.2 Bioensaio de Antibiose contra <i>M. smegmatis</i>	69
5.4.3 Bioensaio de Antibiose contra <i>M. tuberculosis</i>	70
5.4.4 Bioautografia da Fração em Clorofórmio e dos Compostos Isolados por CCD ..	71
5.5 Bioensaio das Substâncias Isoladas por HPLC	72
5.5.1 Antibiose - Difusão em Disco	72
5.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Compostos Isolados pelo Método de Microdiluição em Microplaca	74
5.5.3 Avaliação da Atividade Citotóxica	76
5.6 Caracterização das Substâncias Bioativas	78
5.6.1 Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização “eletrospray” (ESI-MS)	78
5.6.2 Análise por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI-MS)	80
5.6.3 Análise por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-HRMSMS)	82
5.6.4 Análise por RMN	83
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

Existe uma constante necessidade de se descobrir novos antibióticos. A indústria farmacêutica tem buscado novos medicamentos que possam ser mais eficazes e que produzam menos efeitos indesejáveis. A partir da introdução da penicilina, a taxa de mortalidade por micro-organismos patogênicos caiu drasticamente (DANCER, 2008). No entanto, nas últimas décadas tem ocorrido um aumento considerável de bactérias resistentes a antibióticos tais, como *Staphylococcus aureus* resistente à penicilina, linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes (MRSA) e susceptíveis à meticilina (MRSA) e vancomicina (VISA), o que tem tornado a resistência bacteriana um importante problema global. Nos Estados Unidos, cerca de 70% dos dois milhões de pessoas que contraíram alguma doença de origem bacteriana, envolvem cepas resistentes a pelo menos uma droga (CUSHINE; LAMB, 2005).

Outra doença que tem preocupado muito a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a tuberculose, uma epidemia de maior incidência nos países em desenvolvimento, que também apresenta altos índices de resistência aos antibióticos utilizados em seu tratamento. Tal fato indica a necessidade de uma releitura na busca por novas substâncias antibióticas (BRÖTZ-OESTERHELT; SASS, 2010). Produtos oriundos de microrganismos são uma estratégia importante para o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas e vários trabalhos indicam a potencialidade da utilização de microrganismos na produção de compostos antimicrobianos. Dentre estes microrganismos, grande parte dessa produção é dada ao gênero *Streptomyces*, que são responsáveis pela produção de uma variedade de compostos com aplicação na indústria, medicina e veterinária (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Os microrganismos possuem algumas características importantes que justificam sua grande aplicação biotecnológica, dentre elas: facilidade de adaptação em diversos ambientes, o que permite transpor um microrganismo da natureza para o laboratório e posteriormente cultivá-lo em escala industrial; possuem um rápido mecanismo de nutrição e altas taxas de metabolismo e biossíntese; podem realizar uma grande variedade de reações; possibilidade de manipulação genética e capacidade de biossíntese de enantiômeros específicos, geralmente ativos. (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Estas características os tornam promissores, estimulando ainda mais a busca de novos microrganismos produtores de compostos bioativos, principalmente na região Amazônica devido à grande diversidade de plantas e nichos exóticos pouco estudados. Dessa forma, a chance de encontrar novos fármacos, como por exemplo, novas substâncias antimicrobianas, é grande.

A partir destes conhecimentos, Silva (2012) analisou a atividade antimicrobiana de 371 actinomicetos isolados de solo de diferentes localidades da região Amazônica. Destes 371 isolados, 46 produziram metabólitos com atividade antimicrobiana, com espectro de ação predominante para bactérias Gram-positivas. Constatou que substâncias presentes em extratos de três linhagens de *Streptomyces* sp. apresentavam atividade inibitória frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 292123, *Mycobacterium tuberculosis* e a uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente a diversos antibióticos. A fim de otimizar a produção desses compostos antimicrobianos, foi analisada a influência das variáveis físicas (temperatura, pH, agitação e tempo) e químicas (concentrações de carbono e nitrogênio) de acordo com um planejamento estatístico fatorial utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. Os resultados apresentados neste primeiro trabalho demonstraram que as condições ambientais e do substrato são fundamentais na produção de metabólitos secundários, principalmente antimicrobianos e que o *Streptomyces* chamado isolado nº 01 é produtor de metabólitos bioativos (SILVA et al., 2012).

A etapa seguinte para a indicação de um produto biotecnológico determina que se realize o fracionamento químico dos metabólitos, ensaios de bioatividade por fração, separação e identificação química da substância ativa. Assim, dando sequência aos trabalhos preliminares, a presente proposta pretendeu realizar o fracionamento dos extratos ativos, guiado por bioensaios de atividade antimicrobiana, visando isolar, purificar e caracterizar quimicamente os metabólicos com atividade antibacteriana.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Determinar os constituintes responsáveis pela atividade antimicrobiana de extratos de *Streptomyces* por meio de fracionamento fitoquímico bioguiado.

2.2 Específicos

- Fracionar os extratos e frações por técnicas de partição e cromatográficas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extrato, frações e substâncias isoladas frente aos microrganismos alvos Gram-positivos e Gram-negativos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* (MRSA); *M. smegmatis*; *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 e *E. coli* ATCC 25922.
- Purificar os compostos bioativos utilizando técnicas cromatográficas;
- Determinar a estrutura do(s) composto(s) bioativo(s) purificado(s) através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Actinobactérias e o Gênero *Streptomyces*

A família *Streptomycetaceae* compreende um importante grupo de bactérias, provenientes principalmente do solo, pertencentes à classe das actinobactérias, também conhecida como actinomicetos (SOARES et al., 2010).

A classe das actinobactérias compreende um grupo de bactérias filamentosas, Gram-positivas, anaeróbias ou anaeróbias facultativas. Apresentam características intermediárias específicas, tais como: células procariontes, portanto, com ausência de membrana nuclear; sensibilidade às lisoenzimas e agentes antibacterianos; crescimento cúbico, formando grânulos em meio de cultura líquido; filamentos finos semelhantes as hifas fúngicas, mas com diâmetro significativamente menor (0,5 a 1,0 μm) e dimensão análoga a células bacterianas (GOODFELLOW, 1989).

As actinobactérias representam um grupo diversificado de microrganismos classificados taxonomicamente através de sua morfologia, coloração do micélio, composição e estrutura do peptídeoglicano, arranjo dos conidiósporos, porcentagem de G+C, sequência de 16S rDNA, composição fosfolipídica da membrana celular e resistência dos esporos ao calor (OLIVEIRA, 2003).

A maioria destes microrganismos são quimio-organotróficos, os quais crescem em pH neutro, mas alguns são acidófilos ou alcalófitos. Outros ainda são halófilos e alguns são termófilos (GOODFELLOW, 1989).

As actinobactérias são as bactérias mais biologicamente viáveis e mantêm uma posição de destaque devido a sua diversidade e capacidade comprovada para produzir novos compostos com atividade biológica (SUBRAMANI; ALBERSBERG, 2012).

Cerca de 22.500 metabólitos que mostram alguma atividade biológica são produzidos por microrganismos. Desses, cerca de 17% (3.800) são produzidos por bactérias unicelulares (especialmente *Bacillus* e *Pseudomonas* spp.); 45% (10.100) são produzidos pela fermentação de actinobactérias; e cerca de 38% (8.600) são de origem fúngica. Entre as actinobactérias, cerca de 75% (7.600) dos metabólitos são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces*. (SOLECKA, et al., 2012) (Figura X).

A família *Streptomycetaceae* é constituída de quatro gêneros: *Intrasporangium*,

Kineosporia, e *Streptoverticillium*, onde *Streptomyces* tem sido o mais estudado, contendo o maior número de espécies descritas (MENDES, 2010; HODGSON, 2000).

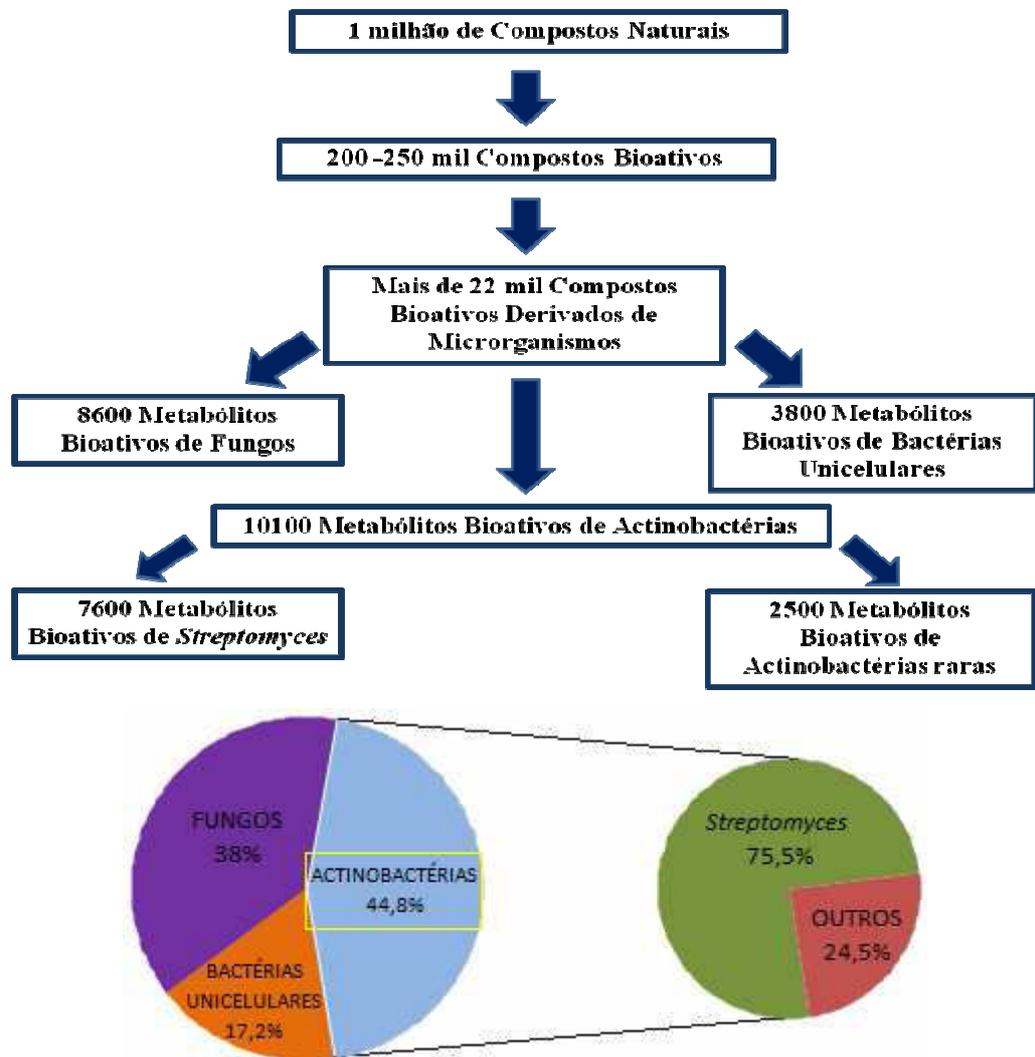


Figura 1. Distribuição dos micro-organismos produtores dos metabólitos secundários bioativos (DEMAIN e SANCHEZ, 2009).

Streptomyces é um gênero de bactérias Gram-positivas, aeróbias, mesofílicas que apresentam crescimento relativamente lento. Este gênero é caracterizado por sua diversidade morfológica, ecológica e de patogenicidade (HODGSON, 2000).

Embora algumas espécies de *Streptomyces* sejam encontradas em ambientes aquáticos, o solo é o seu principal habitat, pois oferece condições apropriadas para o seu crescimento e proliferação (SOARES et al., 2010).

São classificados como quimioheterotróficos e são geralmente capazes de crescer em meio composto de sais inorgânicos e glicose. Sua parede celular é constituída de uma rede de peptidoglicanos ligada por subunidades peptídicas de L-alanina, L-ácido glutâmico e L-ácido

diaminopolimérico ligados por pontes de glicina. O tipo de fosfolipídio predominante é o fosfatidiletanolamina com ácidos graxos do tipo saturados (PIEPERSBERG, 1993).

O ciclo de vida dos *Streptomyces* é saprofítico, precisam excretar enzimas para digerir polímeros insolúveis como nutrientes e consumir monômeros para a biossíntese da sua biomassa. Esse processo demanda tempo e libera uma alta concentração de enzimas digestivas (HODGSON, 2000).

Espécies do gênero *Streptomyces* são catalase positiva, reduzem nitratos a nitritos e degradam adenina, esculina, caseína, gelatina, hipoxantina, amido, e L – tirosina (SMAOUI et al., 2011).

Produzem micélio aéreo que está vinculado com a alta concentração de enzimas digestiva na matriz alimentícia, gerando uma alta concentração de produtos digestivos disponíveis para o crescimento celular. Uma desvantagem desse crescimento micelar é a exaustão de nutrientes, pois não existem caminhos de acesso a novos nutrientes, levando a morte celular. Uma estratégia utilizada por *Streptomyces* é a fragmentação do pseudo-micélio no final da colônia de crescimento e pelo desenvolvimento da mobilidade ou imobilidade dos esporos. *Streptomyces* sintetizam esporos no final de seu ciclo de vida a partir de um micélio sobreposto ao micélio de substrato (YAGÜE et al., 2013).

Sua diversidade morfológica está baseada, primeiramente, nas estratégias reprodutivas, que levam à formação de uma variedade de estruturas de esporos (DUARTE, 2009; OMURA et al., 2001).

Apresentam colônias com crescimento lento, necessitando em torno de sete a dez dias para desenvolver suas hifas aéreas (FAVORETTO, 2010). Em geral, possuem colônias pequenas pulverulentas ou velutinas, com micélio aéreo de diferentes tonalidades e produção de pigmentos solúveis, sendo bem distintas das colônias de outros gêneros como *Frankia*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Thermoactinomyces* (SOARES et al., 2010) (Figura 2).

Estes microrganismos produzem uma variedade de pigmentos responsáveis pela coloração do micélio sob o substrato e micélio aéreo. A produção de pigmentos no micélio e de exopigmentos é considerado um elemento-chave para identificação de *Streptomyces*. As colônias possuem um odor terra molhada devido à produção de um metabólito volátil chamado geosmina (JÜTTNER; WATSON, 2007; SORIANO; BERNILLA, 2010).

A temperatura ótima de crescimento varia de 25 a 35 °C, sendo que algumas espécies são psicrófilas e termófilas. O pH ótimo para crescimento varia entre 6,5 a 8,0 (MARCON, 2002).

Os esporos germinam para formação das hifas, com micélio aéreo multinuclear, que forma septos em intervalos regulares, formando uma cadeia de esporos uninucleados (OHNISHI et al., 2008). Quando o esporo encontra condições favoráveis de temperatura, nutrientes e umidade, o tubo germinativo é formado e a partir dele são desenvolvidas as hifas.



Figura 2 - Diversidade morfológica de actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Fotografado no Centro de Biotecnologia da Amazônia – Laboratório de Microbiologia

Posteriormente, surgem às hifas aéreas e, num estágio programado se inicia a organização de vários processos como o de crescimento e ciclo celular. A explicação para a presença de esporos em *Streptomyces* é que provavelmente estes surgiram a partir de fragmentos miceliais que sob pressão seletiva, podem ter desenvolvido a habilidade de sobreviver fora de invertebrados e plantas, ou seja, em ambientes extremos. A habilidade dos

esporos sobreviver em ambientes hostis deve ter sido aumentada devido ao pigmento e aroma presentes nos esporos em algumas espécies (CHATER; CHANDRA, 2006).

Outro ponto a ser destacado é a extremidade da hifa, considerada como sendo a região mais importante, onde proteínas de membranas e lipídeos podem ser secretados e reunidos especialmente na zona apical de crescimento (FLÄRDH; BUTTNER, 2009).

Algumas espécies de *Streptomyces* contêm plasmídeos, geralmente associados a fatores de fertilidade, que podem ser circulares ou lineares com tamanhos que variam de 10 a 600 kb. Os cromossomos lineares possuem um tamanho de 8 a 10 Mb e, em geral, contêm mais de 20 *clusters* de genes associados com a biossíntese de metabólitos secundários (NETT, 2009). Esses estão restritos a espécies com estrutura e ciclo de vida sofisticada como os *Streptomyces*, *Nocardia*, *Streptoverticilium*, *Saccharopolispora*, *Actinoplanses*, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* (SALAMONI, 2010).

As extremidades do cromossomo de *Streptomyces* apresentam telômeros com proteínas ligadas covalentemente, permitindo assumir forma circular sob condições naturais ou em laboratório. Essas regiões terminais possuem sequências repetitivas que codificam principalmente funções relacionadas à regulação, secreção, diferenciação, transporte e biossíntese de antibióticos (SALAMONI, 2010).

Durante o metabolismo secundário são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos difusíveis no meio, que está diretamente relacionado ao ciclo celular de *Streptomyces*, sofrendo influência de fatores como variações nas fontes nutricionais e fatores de regulação (PADILHA, 2002). Este processo é único entre as bactérias Gram-positivas, e requer um metabolismo especializado e coordenado, que é mais complexo do que outras bactérias Gram-positivas (OMURA *et al.*, 2001).

Filogeneticamente, *Streptomyces* fazem parte dos *Actinomycetes*, seu DNA é rico em CG (70%), quando comparado com outras bactérias como a *Escherichia coli* (50%) (CHATER; CHANDRA, 2006). Essa característica aumenta sua estabilidade genética, ficando entre os mais numerosos e mais versáteis microrganismos do solo. Os *Streptomyces* são importantes por causa da sua ampla taxa de metabólitos e processos de biotransformação, além de possuírem a capacidade de degradar lignocelulose e quitina, sendo fundamentais nos ciclos biológicos da matéria orgânica (BENTLEY *et al.*, 2002).

Streptomyces são microrganismos com capacidade para a produção de uma grande variedade de produtos naturais complexos, sendo de extrema importância particularmente

para a indústria farmacêutica, assim como também para a agricultura e indústria alimentícia (NAEIMPOOR, 2001).

Entre os antibióticos produzidos por *Streptomyces* estão as antraciclinas, como a daunorrubicina e a doxorubicina, e os antibióticos antitumorais (dactinomicina) largamente empregadas no tratamento quimioterápico de diversos tipos de tumores (PAMBOUKIAN, 2003).

3.2 Ecologia dos *Streptomyces*

Streptomyces podem também ser encontrados em água fresca, ambientes marinhos e no ar. Mas seu habitat preferencial é o solo, onde desempenham funções ecológicas importantes como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Além de possuírem atividade proteolítica, decomposição de queratina, quitinas, celulose, amido e também participam no ciclo de aminoácidos e nitrogênio (ARAÚJO, 1998; ANDERSON, 2001; CHATER; CHANDRA 2006).

Solos muito secos inibem seu crescimento. O número total de *Streptomyces* na população microbiana encontrada no solo pode aumentar de 1-20% em condições normais, em 70% em solos secos ou até 98% sob condições muito severas de seca. Acredita-se que a resistência dos *Streptomyces* a dessecação é devido as suas habilidades na formação de esporos (HIRSCH & MCCANN-MCCORMICK, 1985).

Os *Streptomyces* também podem colonizar a rizosfera de raízes e mesmo tecidos vegetais. Em alguns casos a produção natural de antibióticos por espécies de *Streptomyces* pode proteger o vegetal contra agentes patogênicos (CASTILLO *et al* 2002).

As bactérias de solo provavelmente desenvolvem várias estratégias de sobrevivência, como a limitação de nutrientes e a flutuação na disponibilidade de nutrientes durante o ano no solo. Dentre essas estratégias está: um ciclo de vida complexo, a capacidade de formação de esporos e a indução a proteínas específicas para mudar a fisiologia celular (KJELLEBERG, 1993).

Dessa forma, a população e a biodiversidade de *Streptomyces* em um ecossistema são determinadas por vários fatores físicos, químicos e biológicos. E a identificação de novos sistemas ecológicos é, portanto, crucial para a descoberta de novos estreptomicetos (INAHASHI *et al.*, 2011).

3.3 Metabolismo Secundário e a Produção de Compostos Biologicamente Ativos

O metabolismo primário produz metabólitos essenciais para o crescimento, manutenção da vida e reprodução dos seres vivos, como os aminoácidos, açúcares, ácidos nucleicos ácidos graxos, estando presentes em toda forma de vida. O metabolismo secundário consiste em outra rota metabólica que possibilitam os organismos a produzirem os mais diversos tipos de compostos, alguns inclusive restritos a certos gêneros ou espécies. (VINING, 1986)

Os produtos naturais microbianos derivados do metabolismo secundário representa uma importante via para a descoberta de novos produtos com aplicações clínicas principalmente antibióticos. (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

As actinobactérias em especial o gênero *Streptomyces*, têm sido especialmente úteis para a indústria farmacêutica devido à sua capacidade, aparentemente ilimitada, de produzir metabólitos secundários com diversificadas estruturas químicas e atividades biológicas (NAEIMPOOR, 2001).

A descoberta de novos agentes antimicrobianos mais seguros, com menos efeitos colaterais indesejáveis e mais facilmente obtidos são essenciais na descoberta de novos agentes antimicrobianos (LIU et al., 2001).

Cerca de 66 %, de todas as novas moléculas aprovadas como fármacos antimicrobianos humanos, são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (HASANI et al., 2014). A investigação de novos fármacos derivados de produtos naturais tem diminuído desde o início do século. Um dos argumentos mais utilizados, é que os recursos monetários para a identificação e posterior isolamento dos compostos antimicrobianos são muito elevados (HASANI et.al., 2014).

As principais vantagens, segundo ZHANG (2009), atribuídas à descoberta de fármacos baseados em produtos naturais em relação à química sintética são:

- Os produtos naturais oferecem diversidade química com complexidade estrutural;
- Os produtos naturais foram selecionados pela natureza através de interações biológicas específicas;
- Produtos naturais são as principais fontes de fármacos. Drogas como a ciclosporina A e FK-506 não são apenas ativos como imunossuppressores, mas também, como antivirais, antifúngicos e antiparasitários;

- Os recursos naturais são ainda inexplorados e as novas descobertas levarão a novos compostos bioativos;
- Os produtos naturais podem orientar a síntese de compostos sintéticos.

No entanto, a extração a partir de fontes naturais, apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, a variação sazonal e possíveis problemas ecológicos envolvidos com a extração, pondo em risco a obtenção de tais compostos. Como alternativa promissora na solução deste problema, surge então, o uso de técnicas biotecnológicas, como a manipulação de genes de microrganismos (BICAS et al., 2009).

Antibióticos são produtos do metabolismo secundário, produzidos por organismos vivos capazes de inibir em baixas concentrações os processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos (KOROLKOVAS, 1999).

Alexander Fleming, em 1928, observou que colônias do fungo *Penicillium notatum*, que era um contaminante na placa, inibiam o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*. Esse componente ativo foi isolado posteriormente e denominado penicilina (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Essa descoberta só despertou real interesse após a eclosão da Segunda Guerra Mundial, em 1939. Em 1940, um grupo de pesquisadores chefiados por Howard Florey e Erns Chain, retomou as pesquisas de Fleming e conseguiram produzir penicilina para fins terapêuticos em escala industrial, inaugurando a chamada “Era dos Antibióticos”.

Nas últimas décadas, o crescente aumento da resistência bacteriana, em virtude da transferência e disseminação de genes de resistência de microrganismos aos antibióticos, juntamente com a sensibilidade de pacientes imunodeprimidos e a dificuldade em controlar certas doenças, e principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos, tem levado ao avanço nas pesquisas sobre novos antibióticos (MICHEL et al., 2006; FISCHBACH; WALSH, 2009; ALVAN et al., 2011).

Waksman (1943) foi o primeiro a introduzir os *Streptomyces* em um programa sistemático de seleção para novos antibióticos. Antes mesmo da estreptomicina, Waksman publicou em 1940 sobre a descoberta das actinomicinas, uma delas, a actinomicina D, que foi usada para combater o tumor de Wilms em crianças e se tornou extremamente importante como ferramenta básica para o desenvolvimento da biologia molecular, agindo como inibidor de RNA polimerase (DEMAIN, 2006). Mais tarde, durante os anos 1970 e 1980, foram introduzidos os métodos de mutassíntese, fusão celular e manipulação genética e suas aplicações foram feitas especialmente em *Streptomyces*, o que facilitou a descoberta de novos antibióticos (YAGÜE et al., 2013).

Os *Streptomyces* têm sido a fonte mais abundante de importantes antibióticos desde a descoberta da actinomicina D, estreptomicina e estreptotricina. A estreptomicina foi o primeiro antibiótico ativo contra a bactéria da tuberculose e também contra a meningite bacteriana (DEMAIN, 2006). Esse gênero, sintetiza uma grande variedade de inibidores químicos distintos em diferentes processos celulares. Incluindo antibióticos, fungicidas, citostáticos, moduladores de resposta imune e efetores de crescimento de plantas, portanto, são de grande interesse para a medicina e indústria (HOPWOOD, 2007).

Um grande número de antibióticos tem sido produzido por microrganismos industriais tais como *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Bacillus* e *Actinomycetes*. A espécie *Streptomyces* é a mais versátil e comercialmente importante produtora de antibióticos.

A produção de antibióticos é a característica mais importante e estudada dos *Streptomyces*, o qual produz a maioria dos antibióticos utilizados em humanos, na veterinária e agricultura (CHATER, 2006). Cerca de 75% dos antibióticos utilizados na clínica médica são produzidos por esse gênero, aumentando assim sua importância econômica (TADDEI *et al.*, 2005).

Alguns antibióticos de importância médica são produzidos por *Streptomyces*, entre eles estão anfotericina B, produzida por *Streptomyces nodosus*, ativos na membrana celular de fungos; eritromicina, produzida por *Streptomyces erythreus*, que é eficiente contra bactérias Gram-positivas, atuando na síntese protéica; neomicina, produzida por *Streptomyces fradiae*, usada em infecções de pele, olhos e ouvidos; estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, que atua contra bactérias Gram-negativas, aeróbias e certas micobactérias; a tetraciclina produzida por *Streptomyces rimosus*; a rifamicina e a tobramicina, eficientes no tratamento da tuberculose; e a gentamicina, produzida por *Streptomyces tenebrarius* (SAADAUM & GHARAIBEH, 2003).

Alguns antibióticos produzidos por *Streptomyces* estão apresentados na Tabela 1.

Tabela1. Antibióticos produzidos por *Streptomyces* sp. (SAADAUM & GHARAIBEH, 2003).

<i>Streptomyces</i> SP.	Antibiotics	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibiotics
<i>S. orchidaccus</i>	Cycloserin	<i>S. erythraeus</i>	Erytromycin
<i>S. orientalis</i>	Vancomycin	<i>S. vensuella</i>	Chloramphenicol
<i>S. fradiae</i>	Neomycin, Actinomycin, Fosfomycin Dekamycin	<i>S. aureofaciens</i>	Chlortetracycline, Dimethylchlor Tetracycline
<i>S. nodosus</i>	Amphotricin B	<i>S. ambofaciens</i>	Spiramycin

<i>S. noursei</i>	Nistatin	<i>S. avermitilis</i>	Avermectin
<i>S. mediterranei</i>	Rifampin	<i>S. alboniger</i>	Puromycin
<i>S. griseus</i>	Streptomycin	<i>S. niveus</i>	Novobicin
<i>S. knanamyceticus</i>	Kanamycin	<i>S. platensis</i>	Platenmycin
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramycin	<i>S. roseosporus</i>	Daptomycin
<i>S. spectabilis</i>	Spectinomycin	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamycin
<i>S. viridifaciens</i>	Tetracycline	<i>S. garyphalus</i>	Cycloserine
<i>S. lincolensis</i>	Lincomycin, Clindamycin	<i>S. vinaceus</i>	Viomycin
<i>S. rimosus</i>	Oxytetracyclin	<i>S. clavuligerus</i>	Cephalosporin

Notáveis progressos têm sido feitos em análise molecular para a produção de antibióticos por *Streptomyces*, principalmente em duas espécies modelo, *Streptomyces griseus*, o produtor da Estreptomicina, e *Streptomyces coelicolor* A3 (2), a linhagem mais estudada. A grande maioria dos antibióticos produzidos por *Streptomyces* são do tipo polipeptídeos, sintetizados pela condensação de unidades de ácidos carboxílicos. Esse grupo de antibióticos tem atraído a atenção de pesquisadores devido ao seu potencial no uso das sintases polipeptídicas (PKSs – Poliketide Synthases) engenheiradas geneticamente e por produzirem novos polipeptídeos pela biossíntese combinatória de bancos de dados de moléculas sintéticas (MACDANIEL et al., 1994; KHOSLA, 1997; HOPWOOD, 1999).

A produção da maioria dos antibióticos é espécie-específica, sendo estes metabólitos secundários importantes para que as espécies de *Streptomyces* possam competir com os outros microrganismos que ele pode entrar em contato, ou mesmo dentro do próprio gênero (HOPWOOD, 1985).

Existem espécies de *Streptomyces* que produzem mais de um tipo de antibiótico, bem como existem espécies de diferentes habitats que podem produzir o mesmo antibiótico. Essa diversidade dos metabólitos produzidos é devido ao tamanho do seu genoma e por apresentarem centenas de fatores de transcrição que controlam a expressão gênica (HOPWOOD, 1985).

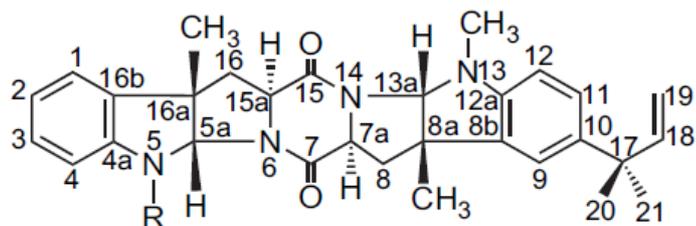
Outro processo importante envolvendo a produção de antibióticos é a simbiose entre *Streptomyces* e plantas, enquanto o antibiótico protege a planta contra fitopatógenos, a planta fornece exudatos para o desenvolvimento do *Streptomyces* (CHATER et al., 2010).

Dados encontrados na literatura têm sugerido que alguns antibióticos foram originados como moléculas sinais, podendo induzir mudanças na expressão de alguns genes que não estão relacionados a uma resposta ao estresse (CHATER et al., 2010).

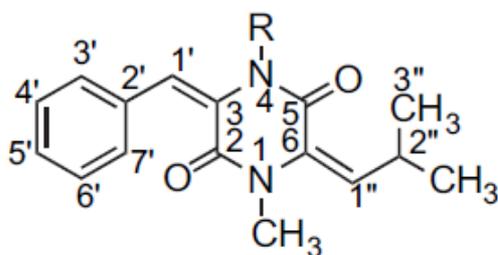
Outras substâncias importantes produzidas por este gênero incluem enzimas, agentes anti-tumorais, agentes antifúngicos, inseticidas, acaricidas, anti-helmínticos entre outras. Estas

características fazem deste gênero um instrumento de pesquisa importante tanto do ponto de vista acadêmico como industrial (STROBEL et al., 2004).

Segundo, Tuntiwachwuttikul (2008), *Streptomyces* são microrganismos promissores com alta capacidade de produzir actinomicinas biologicamente ativas. Em seu estudo foram isolados e identificados estruturalmente quatro novos compostos, lansai A-D (FIGURA 4), a partir de *Streptomyces* sp. que apresentaram atividades antifúngicas e anti-câncer.



LANSAI A (1): R = H, LANSAI B (2): R = CH₃



LANSAI C (3): R = OH, LANSAI D (4): R = H

Figura 3: estruturas de lansai a-d (1-4), (TUNTIWACHWUTTIKUL, 2008)

A geldanamicina (Figura 4), pertencente à família das ansamicinas provenientes do metabolismo secundário de actinobactérias, é um agente anticancerígeno produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, que se liga ao sítio de ligação do ATP da proteína de choque 90 (HSP90) e inibe atividade dependente de ATP que são críticas para suas interações com várias proteínas oncogênicas, necessárias para a transdução de sinal e transcrição durante a tumorigênese.

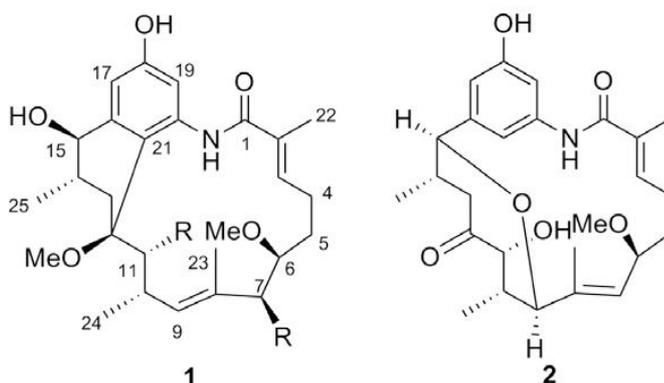


Figura 4: geldanamicina (1); Análogo geldamicina (2), (HONG, 2010).

Portanto, a GM e seus análogos são considerados anticancerígenos e potenciais agentes quimioterápicos (HONG, 2010).

Em análise química de metabólitos realizada por Yuan (2010), a cepa *Streptomyces* sp. 211726, isolada de solo de mangue, apresentou uma produtividade notável de lactonas macrocíclicas. O fracionamento resultou no isolamento de uma nova lactona macrocíclica, cuja estrutura foi caracterizada como 2-1 éster etil pentílico da azalomicina com base em evidências espectroscópicas, e três conhecidas lactonas macrocíclicas azalomicinas F3A, F4A e F5A, foram simultaneamente isoladas dos metabólitos da cepa (Figura 5).

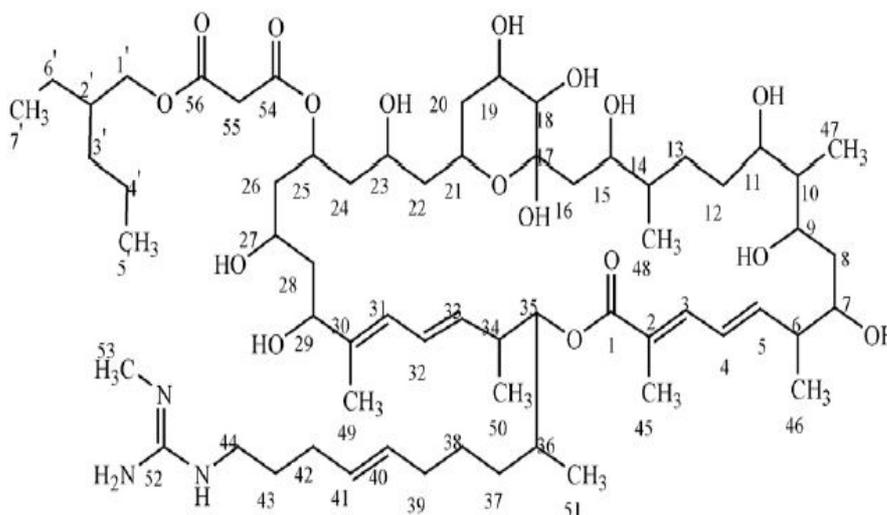


Figura 5: Estrutura de azalomicina f4a . (YUAN, 2010).

Estes quatro compostos apresentaram largo espectro de atividade antifúngica, e as concentrações inibitórias mínimas contra *Candida albicans* ATCC 10231 de azalomicinas F3A, F4A e F5A foram 2,34 mg/mL, 1,56 mg/mL, 3,13 mg/mL e 3,13 mg/mL, respectivamente. Estes compostos, também, apresentaram efeitos citotóxicos contra células de tumor de cólon humano HCT-116.

Outra substância com atividade antibacteriana, parcialmente purificada P3-1, foi obtida a partir de *Streptomyces* sp. N°87. Essa substância mostrou atividade contra diversas espécies de agentes patogênicos, incluindo bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e Gram-negativas, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* e *Xanthomonas* sp (CHAROENSOPHARAT et al., 2008).

Chenomicina A, um novo antibiótico anguciclinone, com atividade contra *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium* foi extraído a partir do caldo da cultura de *Nocardia*

mediterranei subsp. *kanglensis* 1747-64. A estrutura química (Figura 4) foi determinada depois de uma análise espectroscópica detalhada (SUN et al., 2007).

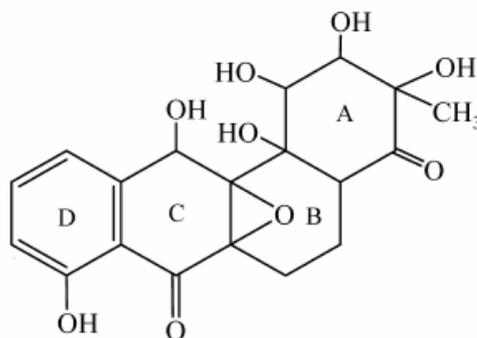


Figura 6 . Estrutura da Chenomicina A (SUN et al., 2007).

Dois compostos 5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina e 5,7-dimetoxi-4-p-metóxi-fenilcumarina produzidos por *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130, possui ação anti-inflamatória e foi investigada sobre a formação de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-6 e IL-1 β), e também óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em macrófagos murino (células RAW 264.7) estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Os dados obtidos mostraram o efeito inibitório dose-dependente (TAECHOWISAN et al., 2007).

Os extratos e frações da estirpe 606 isolada de um solo tropical brasileiro e classificada como *Streptomyces* sp. apresentaram atividade antimicrobiana, onde a fração metanólica apresentou elevada atividade antiviral contra o vírus herpes simplex 1 (HSV-1) em células HEp-2 em concentração não citotóxica (SACRAMENTO et al., 2004).

O extrato acetoetílico também de *Streptomyces* sp. isolado da rizosfera da planta medicinal chinesa, *Rhizoma curcumae* Longae, apresentou atividade antioxidante contra os radicais livres DPPH e ABTS [ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] (ZHONG et al., 2011).

Foram extraídos a partir da fermentação de *Streptomyces plutensis* MER-11107 sete novos macrolídeos, designados pladienolídeos. Seis destes novos macrolídeos apresentaram atividade inibidora contra a linhagem humana U251 (glioblastoma multiforme - tumor maligno mais comum do Sistema Nervoso Central) (SAKAI et al., 2004).

Shaaban et al. (2011) isolaram oito novos compostos denominados landomicina P-W, juntamente com outros 10 anguciclinone conhecidos, a partir da fermentação de *Streptomyces cyanogenus* S-136. Todos os compostos apresentaram atividade em linhagens de câncer mama (MCF7 e MDA MB-231).

A partir da cultura de *Streptomyces* sp. KN-0647, foi obtido o extrato acetatoetílico que causou a inibição do crescimento de insetos patogênicos, como *Spodoptera exigua*, *Dendrolimus punctatus*, *Plutella xylostella*, *Aphis glycines* e *Culex pipiens*. O composto ativo foi isolado e identificado como quinomicina A. Este foi o primeiro relato sobre a atividade inseticida do antibiótico quinomicina A (LIU et al., 2008).

O estudo biomonitorado de metabólitos de *Streptomyces* sp. isolado de esponjas do Mediterrâneo levou ao isolamento e purificação de três compostos conhecidos com atividade antiprotozoária, a valinomicina, a estaurosporina e o butenolídeo, que apresentaram novas atividades contra *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei I* (Figura 7).

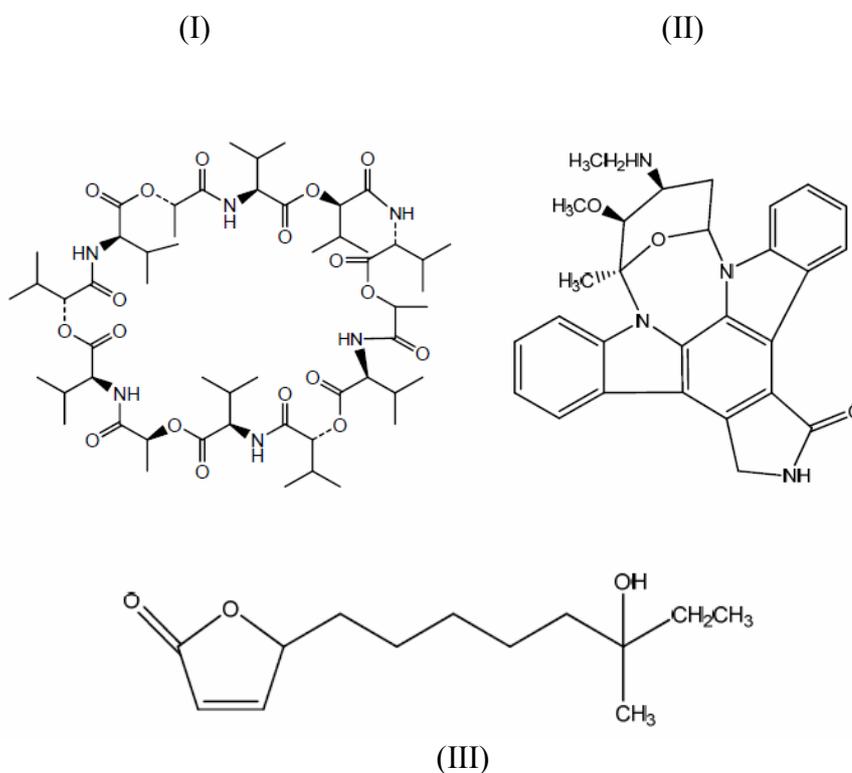


Figura 7. (I) Valinomicina; (II) Estaurosporina; (III) Butenolídeo. (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010).

Este foi o primeiro relato do isolamento da valinomicina a partir de uma fonte marinha (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010).

Metabólitos de sete isolados de actinobactérias isoladas do solo do deserto de diferentes regiões do Egito causaram 100% de mortalidade contra as larvas no terceiro estágio do mosquito *Culex pipiens*. Estes foram identificados como *Streptomyces fungicidicus*, *S.*

griseus, *S. albus*, *S. rochei*, *S. violaceus*, *S. alboflavus* e *S. griseofuscus* (EL-KHAWAGH et al., 2011).

Um potente metabólito secundário produzido por *Streptomyces parvulus* RSPSN2 foi isolado de solo marinho de sedimentos da costa do Mar Visakhapatnam, Baía de Bengala. O metabólito mostrou alta atividade frente a bactérias resistentes a estreptomicina como (*Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas putida* e de *Bacillus cereus*). Os dados encontrados na literatura apontam esse metabólito como sendo um antibiótico polipeptídico (actinomicina D) que é produzido por *Streptomyces RSPSN2 parvulus* (SHETTY et al., 2013).

Durante os estudos de triagem para descobrir composto antidiabético a partir de recursos microbianos, uma cepa PM0324667 *Streptomyces* (MTCC 5543) foi isolado do solo árido. Esse metabólito secundário induziu a captação de glicose em células do músculo esquelético L6. Este foi caracterizado com base em MS e de RMN 2D de dados espectrais e identificado como NFAT-133 que é um conhecido agente imunossupressor que inibe a transcrição dependente de NFAT in vitro (KULKARNI-ALMEIDA et al., 2011).

A partir da fração em acetato de etila de *Streptomyces purpurascens*, isolado do solo, foram obtido três compostos, Rhodomycin B, Rhodomycin II e Obelmycin respectivamente. O Composto E, identificado como Rhodomycin B, demonstrou ser o mais potente com um MIC de 2 µg / mL contra o *Bacillus subtilis* (HOLKAR, 2013). Três tetrahydroxanthonos policíclicos, chrestoxanthonos C, em conjunto com conhecida chloroalbofungin e albofungin foram isolados a partir de *Streptomyces chrestomyceticus* BCC 24770. As estruturas foram elucidadas por análises espectroscópicas extensivas. Chrestoxanthone A é ativo contra *Curvularia lunata* e *Alternaria brassicicola*, enquanto todos os outros metabolitos isolados exibiram ampla atividade antifúngica contra *C. lunata*, *A. brassicicola*, *Colletotrichum capsici* e *Colletotrichum gloeosporioides* (BUNYAPAIBOONSRI et al., 2015).

Um macrolídeo chamado hygrobafilomycin foi isolado a partir de *Streptomyces varsoviensis*. Sua estrutura foi totalmente estabelecida por MS e análises de RMN, revelando um híbrido bafilomycin hygrolidin com uma molécula incomum de monoalkylmaleic anidrido. Hygrobafilomycin mostrou forte atividade antifúngica, antiproliferativa e citotóxica (NDEJOUONG et al., 2010).

Suzuki et al., 2015, descobriram que uma cultura de *Streptomyces* sp. estirpe MC11024 apresentou atividade inibitória sobre a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e isolaram o composto streptorubin B como o inibidor da formação deste biofilme. A

formação do biofilme foi reduzida para menos que 30 % a 1 ug / mL de streptorubin B , e nesta concentração o crescimento celular não foi afectada (Figura 8).

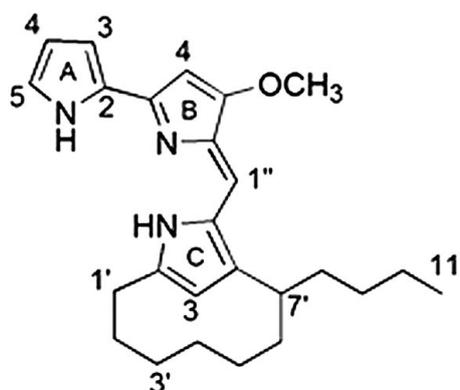


Figura 8. Estrutura da Streptorubin B. (SUZUKI et al., 2015)

3.4 Tuberculose e *Streptomyces*

A tuberculose (TB) é uma doença crônica endêmica na maioria dos países em desenvolvimento, transmitida pelo ar e existente há milhares de anos. É causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*, que, por ser uma bactéria aeróbia, desenvolve-se principalmente nos pulmões, mas também pode atacar outras áreas do corpo humano. Estima-se que um terço da população mundial seja portadora assintomática do Bacilo de Koch, dos quais 5% a 10% irão manifestar a doença que tem como principais sintomas tosse crônica persistente, suor noturno, dor no tórax e perda de peso devido à falta de apetite. (DE SOUZA et al., 2010).

A tuberculose tornou-se ainda mais delicada quando inserida no contexto da pandemia de HIV/AIDS, já que a co-infecção por *M. tuberculosis* e HIV tem se mostrado uma combinação letal. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam a ocorrência de mais de 300 casos anuais de TB a cada 100.000 habitantes em áreas da África subariana, local em que há maior incidência do vírus HIV. Nessas áreas, mais de dois terços das pessoas infectadas por TB estão co-infectadas por esse vírus. No Brasil, dados da OMS mostram que no período entre 2000 e 2006 foram notificados quase 700.000 casos de TB, sendo o Rio de Janeiro o estado com maior número de casos registrados por ano, e pouco mais de 60.000 óbitos causados por essa doença. Aproximadamente 20% associadas a pacientes co-infectados pelo vírus HIV. (WHO, 2014). Esse fato demonstra a urgência de novos esforços com relação

à identificação de novos alvos terapêuticos e ao desenvolvimento de novos fármacos no combate à TB. (WHO, 2013)

A quimioterapia é fundamental no controle da TB, pois interrompe a cadeia de transmissão, que são os pacientes bacilíferos. No entanto, é necessário que os fármacos sejam utilizados em esquemas terapêuticos padronizados: (i) administrados em combinação de pelo menos 3 fármacos, com ação sobre diferentes sítios de lesão e sobre diferentes fases do metabolismo bacteriano, para prevenir o desenvolvimento de resistência; (ii) prescritos corretamente e por tempo prolongado de tratamento, visando atingir os bacilos de crescimento lento e intermitente; e (iii) tomados regularmente para manter as concentrações necessárias sobre a população bacilar (BRASIL, 2004).

Os fármacos mais eficazes no tratamento da tuberculose são Isoniazida e Rifampicina. A forma de TB com bacilos resistentes à Isoniazida e à Rifampicina foi denominada Multidrug resistant (MDR), segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) (SAÚDE, 2014). A resistência a um destes fármacos pode ser suprida pela ação de outros fármacos do esquema básico, porém, a resistência a ambos, demanda tratamento com os fármacos de segunda escolha, esquema multidroga resistente, que são menos efetivos e mais tóxicos (SHARMA; MOHAN, 2004).

O tratamento da tuberculose, preconizado pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia e Ministério da Saúde (SBPT, 2009), consiste de uma associação de quimioterápicos com dois esquemas padronizados:

- a) Esquema Básico → indicado para casos novos de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningoencefalite) infectados ou não pelo HIV, sendo utilizados a rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol nos 2 primeiros meses e continuação do tratamento por mais 4 meses utilizando somente a rifampicina e isoniazida;
- b) Esquema para multirresistência → indicados para pacientes com resistência à rifampicina e isoniazida, resistência à rifampicina e isoniazida e outro(s) fármaco(s) de primeira linha, falência ao esquema básico ou na impossibilidade do uso do esquema básico por intolerância a dois ou mais fármacos. Este esquema utiliza, nos dois primeiros meses, estreptomicina por 5 dias da semana, etambutol, levofloxacina, pirazinamida e terizidona, e mais quatro meses de estreptomicina por 3 dias da semana, etambutol, levofloxacina, pirazinamida e terizidona, mantendo por mais 12 meses etambutol, levofloxacina e terizidona.

A utilização do esquema básico é geralmente efetiva no combate aos microrganismos sensíveis com a cura do paciente ao término do tratamento. A longa duração do tratamento e a

falha dos pacientes em completar o tratamento têm levado ao aparecimento e distribuição de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETI et al., 2002).

Dada a importância de se obter novos fármacos para o controle e cura da TB, podemos destacar os obtidos de produtos naturais, como por exemplo, a descoberta da estreptomicina, que foi uma das mais relevantes da história da medicina moderna e da humanidade. A estreptomicina foi isolada a partir de culturas de *Streptomyces griseus*, pela equipe liderada por, Selman Waksman, em 1943. Esse medicamento foi responsável pela cura e pelo controle da tuberculose que, na época de seu surgimento, causava a morte de milhões de pessoas no mundo todo. (SOUZA, 2011).

Após a descoberta da estreptomicina, outros aminoglicosídeos foram descobertos e utilizados até os dias atuais no tratamento e controle da tuberculose, como a canamicina, obtida a partir da cultura de *Streptomyces kanamyceticus*; a amicacina, derivado semisintético obtido a partir da canamicina A; e a capreomicina 1A, obtida a partir da cultura *Streptomyces capreolus*. Além dos aminoglicosídeos, pode-se mencionar também a D- cicloserina, obtida a partir da fermentação de *Streptomyces* sp.

Além dos fatos relatados, diversos antibióticos disponíveis hoje no mercado e utilizados na terapêutica atual, produzidos por síntese ou semi-síntese, tiveram como modelo produtos naturais, principalmente microrganismos, tendo um destaque especial aos do gênero *Streptomyces* como mostra a Tabela 2 (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Tabela 2. Antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* disponíveis no mercado.

Antimicrobianos	Microrganismos
Ácido Clavulanico	<i>Streptomyces clavuligerus</i> ⁶
Anfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i> ⁷
Capreomicina	<i>Streptomyces capreolus</i> ⁴
Canamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> ⁵
Cicloserina	<i>Streptomyces orchidaceus</i> ²
Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i> ⁷
Clortetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i> ⁷
Daptinomicina	<i>Streptomyces roseosporum</i> ⁷
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i> ⁷
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i> ¹
Rifampicina	<i>Streptomyces mediterranei</i> ³
Vancomicina	<i>Streptomyces orientalis</i> ⁷

1 Waksman et.al. (1944); 2 Umezawa et al. (1957); 3Harmed (1960); 4Sensi; Thiemann (1967); 5Gyselen-Cohen (1971); 6Saudagar et al. (2008); 7Takahashi; Lucas (2008).

Com o crescente surgimento de bactérias resistentes a praticamente todos os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, diversos grupos de pesquisa tem se concentrado na

busca por novas substâncias naturais no combate à tuberculose. Nesse contexto, pode-se destacar o crescente número de publicações científicas na área, como por exemplo, podemos citar o trabalho de Arzuaga et al. (2011) que avaliaram o potencial de *Streptomyces* como vetor de uma vacina para TB. Neste trabalho, inocularam a vacina BCG juntamente com culturas de *Streptomyces* em cobaias e observaram que a carga bacilar foi significativamente mais baixa quando as cobaias foram sensibilizadas com *Streptomyces*. Neste contexto, a utilização de microrganismos, principalmente o gênero *Streptomyces* pode ser uma alternativa promissora no combate a tuberculose multiresistente.

3.5 Actinomicinas

Nas últimas duas décadas, a exploração e possibilidade de desenvolvimento de novas classes de compostos antimicrobianos emergiu proeminente devido a agentes patogênicos que adquiriram resistência a antibióticos emergentes. Paralelamente, os compostos antimicrobianos disponíveis estão ficando velhos e menos eficientes, e apenas alguns substitutos estão disponíveis (NATHAN; GOLDBERG, 2005; PAYNE., et al 2007).

Desde o final da década de 1960, apenas duas novas classes de antibióticos, as oxazolidinonas e os lipopeptídeos cíclicos, entraram no mercado. Hoje em dia, uma enorme quantidade de recursos está sendo investido em P & D para encontrar novos agentes antimicrobianos que podem resolver o problema da resistência bacteriana (MARIA-NETO et al., 2012). Portanto, a triagem e caracterização de novos compostos antimicrobianos, especialmente os peptídios de microorganismos, tem chamado a atenção (PIRRI et al., 2009; LAVERTY et al., 2011).

Entre os peptídios antimicrobianos, lipopeptídios são moléculas pequenas e foram consideradas como potencial fonte de futuros antibióticos devido aos seus diferentes mecanismos de ação, em comparação com os antibióticos convencionais (BAINDARA et al., 2013).

O mecanismo de ação dos lipopeptídios são distintos dos outros antibióticos atualmente no mercado. Eles formam poros em membranas de bactérias após a oligomerização e estes poros podem causar afluxo transmembrana de íons, incluindo Na⁺ e K⁺, que resultam na ruptura da membrana e morte celular. Duas propriedades fundamentais dos lipopeptídeos são: a) os lipopeptídios tendem a oligomerizar; e b) possuem capacidade de interagir com as membranas através de sua cauda lipídica (STRAUS; HANCOCK, 2006).

Estas propriedades únicas dos lipopeptídios torna-os altamente ativo contra bactérias multirresistentes (MANGONI; SHAI, 2011).

Actinomicinas são uma família de antibióticos cromopeptídeo lactona que apresentam propriedades anti-tumorais, sendo utilizados no tratamento de várias neoplasias humanas (PRAVEEN et al., 2008). Eles representam uma importante classe de produtos naturais que, apesar de sua primeira descoberta a mais de 60 anos atrás, continuam a ser foco de investigação especialmente nas áreas de ciências biológicas e medicinais. Hoje existe uma riqueza de conhecimentos para esta classe de compostos e os seus produtores microbianos.

Actinomicina D, foi o primeiro antineoplásico de origem natural, extraído do cultivo de *Streptomyce*. Foi utilizado em um paciente com tumor de Wilms metastático em 1954, tal fato, despertou o interesse do meio científico por esta classe (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Existem pelo menos 19 espécies de *Streptomyces* capaz de produzir actinomicinas. Tais estirpes incluem *S. antibioticus* (WAKSMAN; ASPÉRULA, 1940), *S. flavus* (HIRATA; NAKANISHI, 1949), *S. chrysomallus* (FROMMER, 1959), *S. lanatus* (FROMMER, 1959), *S. michiganensis* (FROMMER, 1959), *S. murinus* (FROMMER, 1959), *S. galbus* (FROMMER, 1959), *S. fradiae* (BOSSI et al., 1958), *S. globosus* (MARROQUIN, 1959), *S. fluorescens* (MEN'SHIKOV; DENISOVA, 1962), *S. regensis* (GUPTA et al., 1963), *S. melanochromogenes* (KURZATKOWSKI, 1975), *S. parvulus* (WILLIAMS; KATZ, 1977), *S. elizabethii* (PIRT et al., 1981), *S. viridiviolaceus* (EL-GAMMAL, 1987), *S. floridae* (HA; HONG 1994), *S. Nasri* (EL-NAGGAR, 1998), *S. plicatus* (LAM, et al. 2002), e *S. violascens* (ROOS; LOANE, 2004). No entanto, a maior parte pode produzir actinomicinas apenas em pequenas quantidades.

Entre as actinomicinas, actinomicina D foi estudada extensivamente e é um alcalóide, pois deriva do ácido 3-hidroxiantranílico, um metabólito da via degradativa do aminoácido triptofano (GOODFELLOW, 1989). A sua estrutura química contém duas lactonas pentapeptídicas, com cinco aminoácidos ligados ao cromóforo fenoxazina (2-amino-4,6-dimethylphe- ácido noxazine-3-ona-1,9-dicarboxílico), sendo por este motivo, classificada como cromopeptídeo (Figura 9).

Várias espécies de microrganismos sintetizam uma variedade de metabólitos, entre eles o pigmento de coloração vermelha-alaranjado característicos do tipo 2-amino fenoxazina (Figura 9) (SMÂNIA et al., 1998).

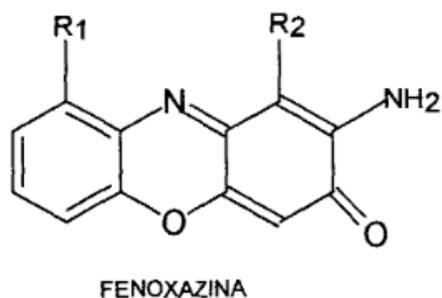


Figura 9. Estrutura dos derivados fenoxazínicos. (SMÂNIA et al., 1998)

Todas as actinomicinas naturais compartilham desse mesmo cromóforo, variando apenas o conteúdo de aminoácidos dos anéis pentapeptídeolactona (WAKSMAN, 1968).

O mecanismo de ação baseia-se na intercalação do cromóforo phenoxazinone entre dois pares de base guanina / citosina da dupla hélice do DNA. O peptídeolactona das cadeias laterais ligam-se em ambas as direções com o menor sulco do DNA. Assim, a força de ligação está dependente da sequência de flanqueamento, bem como a composição de aminoácidos (BITZER et al., 2006).

Actinomicina D é o composto mais comum deste grupo de antibióticos e pode ser considerada como uma estrutura de referência (Figura 10). É uma isoactinomicina porque contém os mesmos aminoácidos (L-Thr, D-Val, L-Pro, Sar, MeVal) em cada unidade peptídeolactona (BITZER et al., 2006).

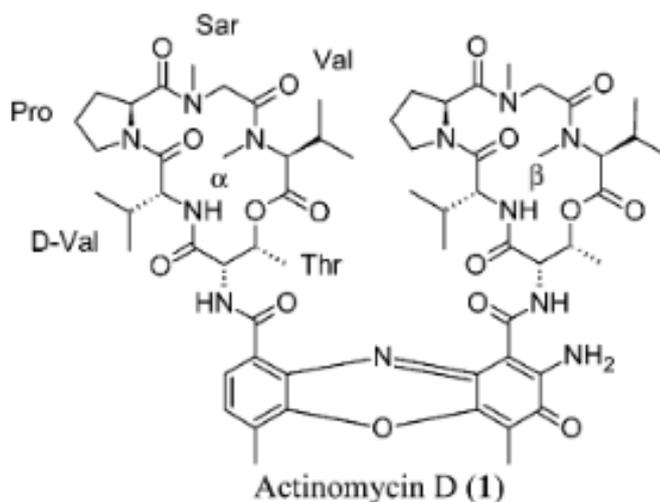


Figura10. Estrutura da Actinomicina D. (BITZER et al., 2006)

A actinomicina D é amplamente utilizada para tratamento de tumores malignos, como tumor de Wilms e Rbdomiossarcoma da infância e Sarcoma de Ewing, em que ela é

usada em combinação com radioterapia e outros agentes anticânceres, tais como vincristina e doxorrubicina. Embora raramente usada, a actinomicina D também é eficaz em alguns tipos de câncer em adultos, tais como a Doença Trofoblástica Gestacional (FARBER et al., 2002; TURAN et al, 2006).

Actinomicina D tem a capacidade de intercalar no DNA duplex, o que resulta na inibição de DNA-dependente de RNA-polimerase e, portanto, a síntese de proteínas. Além disso ela tem sido proposta para o tratamento do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), graças à sua capacidade comprovada de inibir a transcrição reversa (IMAMICHI et al, 2003). Devido à propriedades biológicas únicas, actinomicina D tornou-se uma ferramenta importante na clínica, biologia celular e molecular (KLEEFF et al., 2000; CHEN et al. 2004).

O potencial da actinomicina D tem estimulado uma grande quantidade de investigação sobre a sua natureza química e física. A modificação estrutural de actinomicinas com o objetivo de minimizar os seus efeitos colaterais indesejados e para investigar a relação estrutura / função para esta classe de compostos é uma área contínua e ativa de pesquisas (TAKUSAGAWA et al. 2001; BOLOGNESE et al., 2002). Actinomicina X₂ está estruturalmente relacionadas com actinomicina D, mas as suas propriedades medicinais não têm sido bem investigadas. Novas fontes naturais de actinomicina X₂ seria extremamente valiosa.

3.6 Técnicas Cromatográficas na Pesquisa de Novos Antimicrobianos

Entre as décadas de 1950 e 1970, ocorreu o auge dos produtos naturais, e durante este período, vários métodos foram desenvolvidos para o isolamento de uma grande variedade de metabólitos secundários. No entanto, para esse processo, era despendido muito tempo no isolamento e purificação de novos compostos, e por sua vez era um processo que apresentava alto custo (GRABLEY; THIERICKE, 1999).

O monitoramento bioguiado também é um procedimento de fundamental importância, pois analisa a potência das frações, sub-frações e substâncias puras dos extratos, permitindo prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi determinado (CECHINEL; YUNES, 1998).

O objetivo principal na escolha da melhor estratégia de purificação é obter um máximo rendimento com a máxima pureza, e minimizar os custos. Para isso, é necessário

reduzir ao máximo o número de etapas no processo de purificação (HARRIS e ANGAL, 1995).

O primeiro aspecto que deve ser considerado quando se procura obter substâncias ativas naturais é a preparação do extrato. No caso de metabólitos microbianos a preparação do meio de cultura, fornecendo os nutrientes ideais para a produção do metabólito de interesse, é de fundamental importância (HARRIS e ANGAL, 1995).

Posteriormente, o extrato pode ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de baixa, média e alta polaridade, como hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol, visando separar as substâncias através de suas polaridades (HAYACIBARA et al., 2005; ALENCAR et al., 2007). Todos os extratos semi-puros devem ser testados com o objetivo de identificar aquele que apresenta o efeito biológico de interesse, e posteriormente esse extrato deve ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o fracionamento, isolamento e purificação da substância com atividade biológica.

Os avanços tecnológicos na instrumentação analítica tornaram possível o acoplamento das técnicas de cromatografia com os métodos espectroscópicos, o que vem possibilitando uma maior velocidade com que os produtos naturais são identificados e avaliados quanto a sua atividade biológica (CASS; CASSIANO, 2015; WOLF; SIEMS, 2007). A combinação de ambas as técnicas (hifenação) facilita muito o processo de desreplicação, principalmente na identificação estrutural.

Em produtos naturais desreplicação implica necessariamente a utilização de técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa (CG), cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia líquida (LC). Uma única técnica analítica não é capaz de cobrir sozinha toda a variedade molecular produzida pelo metabolismo secundário dos seres vivos, de modo que a quantificação e caracterização desses compostos contam com uma variedade de técnicas analíticas que auxiliam nesses estudos (CASS; CASSIANO, 2015).

A cromatografia líquida destaca-se devido à sua capacidade de propiciar análises rápidas com alta resolução, precisão, exatidão e robustez. Apresenta também grande versatilidade possibilitando a separação de ampla gama de compostos com propriedades físico-químicas distintas, ainda tem a possibilidade de utilizar diferentes modos de eluição e disponibilidade de grande diversidade de fases estacionárias (CASS; CASSIANO, 2015).

Atualmente as técnicas hifenadas mais utilizadas são cromatografia líquida hifenada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (LC – DAD – MS) e cromatografia acoplada à espectroscopia de ressonância magnética nuclear (LC – NMR) (CASS;

CASSIANO, 2015). Outras técnicas de escolha para a identificação de metabólitos em extratos brutos de microrganismos e plantas, como CG-MS (Cromatografia gasosa-Espectrometria de massas) são utilizadas para compostos voláteis e termicamente estáveis, assim como LC-NMR e LC-MS (Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas) para outros compostos que não são voláteis e termicamente instáveis. Essas novas tecnologias possibilitam a identificação rápida de compostos sem a necessidade de isolamento e purificação, caracterizando uma metodologia de alta eficiência e com redução significativa do tempo de análise (WOLF; SIEMS, 2007).

3.6.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Além de ser utilizada no acompanhamento da purificação, também pode ser usada no isolamento de compostos (CCD-preparativa) (TRUSHEVA et al., 2006; AWALE et al., 2008).

O parâmetro de maior importância na CCD é o fator de retenção, que é a razão entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela fase móvel. Esse fator determinará se a substância analisada confere com a substância padrão (AWALE et al., 2008).

As frações obtidas devem ser reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico, verificado na CCD, assim como nos ensaios de atividade biológica alvos. As frações com atividade biológica devem ser novamente submetidas a outras técnicas cromatográficas de acordo com sua complexidade, como cromatografia líquida de alta eficiência (JIN et al., 2005; OLDINI, 2007).

Uma vez isolada a substância com atividade biológica, deve-se proceder à elucidação estrutural da mesma (TEIXEIRA et al., 2006). O uso em conjunto de algumas técnicas espectrais é importante na identificação rápida e eficiente de misturas, como a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa, e de ressonância magnética nuclear (RMN). Essas técnicas têm permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais (TRUSHEVA et al., 2006).

3.6.2 Cromatografia Líquida (LC) - Espectrometria de Massas (MS)

A Espectrometria de massas (MS) pode ser entendida como uma técnica analítica que através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass to charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sua composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura (VILA-BÔAS et al, 2005).

A Espectrometria de Massas (MS) tem um papel importante na aceleração da elucidação estrutural dos compostos ativos, seja fornecendo resultados relevantes para buscas em banco de dados, ou como complemento de informações obtidas através de outras técnicas, que juntas auxiliam na completa caracterização do ativo (VILA-BÔAS et al, 2005).

A MS tem se tornado uma importante ferramenta para análise de metabólitos em matrizes biológicas complexas, principalmente devido à sua alta sensibilidade e seletividade (VILA-BÔAS et al, 2005; CRISTONI; BERNARDI, 2003). Os extratos microbianos são mais complexos, e em algumas situações há necessidade de uma separação cromatográfica para reduzir os interferentes que causam a supressão de íons (espécies que são mais facilmente ionizáveis, podem mascarar a presença de espécies menos ionizáveis) (GARCIA et al, 2008).

Um espectrômetro de massas é composto por três módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores (Figura 11).



Figura 11 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas. (MAURER, 2005)

Fontes de íons: parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons;

Analisadores de massas: parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com seu m/z , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos;

Detectores: parte final de um espectrômetro de massas, responsável pela detecção e amplificação dos íons.

Desde a introdução das técnicas de ionização por *electrospray* (ESI) e ionização química à pressão atmosférica (APCI), a junção da cromatografia líquida com a

espectrometria de massa (LC-MS) foi utilizada para a análise de produtos naturais, devido à elevada especificidade, velocidade e sensibilidade (MAURER, 2005; QIAN, 2005).

As diferentes interfaces LC-MS para analisar produtos naturais, têm em comum uma característica, todos pretendem originar uma ionização ligeira, com poucos íons formados. Mostrando uma ionização mais estável e sensibilidade mais elevada (XING, 2006; PICO, 2004). Dessa forma, a MS acoplada com outras técnicas cromatográficas, em especial a cromatografia líquida (LC-MS e LC-MS/MS), permite a identificação e a quantificação de metabólitos secundários, até mesmo quando tais compostos estão presentes em concentrações relativamente baixas em uma amostra. A identificação dos metabólitos secundários é obtida por meio da interpretação dos diferentes dados espectrais (VILA-BÔAS et al, 2005).

Pela técnica LC-MS foi possível analisar o extrato bruto de um coral das Caraíbas, *Pseudoplexaura porosa*, para pesquisa de compostos antibacterianos para agentes patogênicos marinhos e humanos (SCHUG, 2012). Os resultados mostraram a presença de vários compostos desconhecidos que inibiam o crescimento de várias estirpes de bactérias, incluindo algumas resistentes a fármacos (SCHUG, 2012). Ficou demonstrado que esta técnica (HPLC-ESI-MS) é importante na investigação de novos fármacos antimicrobianos, uma vez que permite ultrapassar técnicas mais demoradas de isolamento, que além de consumirem muito tempo, também são dispendiosas, tornando a investigação mais onerosa. (SCHUG, 2012).

As informações das massas moleculares dos analitos obtidos em equipamentos de alta e baixa resolução, assim como as informações estruturais que são deduzidas a partir de padrões de fragmentação dos compostos são utilizadas como ponto de partida no processo de desrepliação, acelerando o estágio de descoberta de novas substâncias, como também de compostos já caracterizados, mas que não apresentam todas as suas atividades biológicas descritas na literatura (COEDEEL et al, 1997; KONISHI et al., 2007).

A “redescoberta” de compostos já descritos na literatura é um problema custoso do processo de isolamento e caracterização de substâncias. Depois de caros e demorados processos de isolamento e elucidação estrutural, encontrar uma estrutura com atividade biológica já descrita pode ser comum e indesejado. A pesquisa voltada para produtos naturais, a identificação de novos metabólitos e os compostos conhecidos são objetivos igualmente importantes, sendo o último fator um pré-requisito fundamental para a desrepliação bem sucedida (CONSTAT; BEECHER, 1995).

A desrepliação consiste em um processo de reconhecimento e eliminação prévia de substâncias isoladas presentes em um extrato com a finalidade de economizar tempo de

pesquisa e dinheiro e tem sido um consenso na química de produtos naturais desde o início da pesquisa de antibióticos. (COEDEEL et al, 1997). Essa metodologia é um passo crucial na busca de metabólitos secundários bioativos inéditos ou para a confirmação de uma atividade biológica não caracterizada.

Para a desreplicação eficiente é altamente desejável não apenas os compostos conhecidos, mas também os seus parentes próximos desconhecidos. Geralmente, os organismos responsáveis pela produção de muitos metabólitos secundários microbianos, produzem uma gama de produtos muito semelhantes, obtidos por modificações posteriores efetuadas por enzimas com seletividade variável. No entanto a desreplicação de compostos estruturalmente semelhantes usando somente espectros de MS não é tão simples, podendo obter resultados enganosos, já que pequenas mudanças na estrutura podem acarretar mudanças significativas no padrão de fragmentação. A fragmentação também depende do tipo de espectrômetro de massa e os parâmetros instrumentais utilizados. Novos métodos que possibilitem uma robusta comparação de um elevado número de espectros de MS, para avaliar a semelhança estrutural dos compostos analisados são extremamente necessários. (KRUG; MÜLLER, 2014).

3.6.3 RMN

A técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN, quando associada a outros métodos espectroscópicos, também é uma valiosa ferramenta de identificação e caracterização das moléculas fornecendo um grande volume de informações, fruto dos efeitos das ações inter- e intramoleculares sobre os valores da força do campo magnético ao nível dos núcleos das moléculas (CORREIA, 2002).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se nas propriedades físicas e químicas da matéria, na observação de que núcleos magnéticos tais como hidrogênio, carbono, fósforo e nitrogênio podem absorver energia em frequências características, quando colocados em um campo magnético interpretando-se como um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos (CORRADI et al., 2006). Em química, a espectroscopia de RMN é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos usando técnicas uni- ou bidimensionais simples. É uma técnica não destrutiva que permite a análise de compostos orgânicos e inorgânicos (CORREIA, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxogramas de Procedimentos

As principais atividades desenvolvidas neste trabalho estão apresentadas na Figura 12 abaixo.

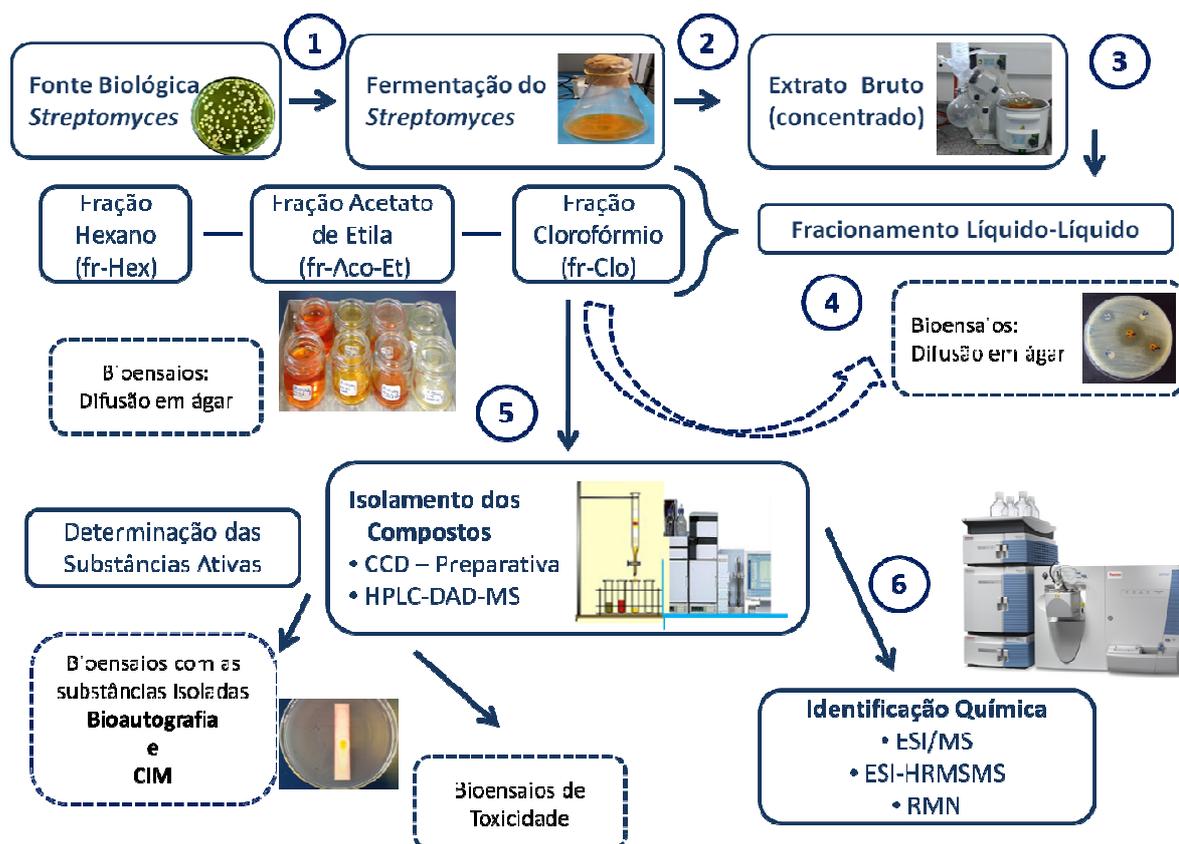


Figura 12 – Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado por bioensaios dos compostos com atividade antibacteriana de *Streptomyces*

4.2 Material Biológico

4.2.1 Pré-inóculo - *Streptomyces*

O *Streptomyces* em estudo foi selecionado de uma triagem inicial à partir de 371 actinomicetos isolados de amostras de solo coletadas de várias localidades da região. O mesmo foi isolado de solo, do Distrito Industrial, bairro de Nova Republica cuja localização geográfica está a 3° 06'24.71"S na cidade de Manaus. A cultura pura foi crescida em meio líquido de amido caseína e armazenada em freezer a -70°C até ser reativada para utilização. A

linhagem foi identificada através do sequenciamento do gene 16S do rRNA como pertencentes ao gênero *Streptomyces* (SILVA, 2012).

Para a preparação do pré-inóculo, o *Streptomyces* em estudo foi reativado em placa contendo meio Amido Caseína (AC) de Küster; Williams (1964) e meia placa de crescimento de 7 dias foi inoculada em um erlemeyer de 1000 mL contendo 100mL de meio Amido Caseína Líquido de composição (g/L): amido (10,0), caseína (0,3), KNO₃ (2,0), NaCl (2), K₂HPO₄ (2), KH₂PO₄ (1,0), CaCO₃ (0,1), MgSO₄ (0,1), FeSO₄ (0,01), ZnSO₄ (0,01) e água destilada (50:50), o pH foi ajustado para 6,5 e autoclavado. O inóculo foi incubado sob agitação (150 rpm), a 30°C por 48h

4.2.2 Cepas de *Mycobacterium* spp.

A cepa de *M. smegmatis* foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira, estando armazenada a 4 °C na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas. Para a reativação, a micobactéria foi cultivada em caldo Triptona de Soja (TSB: 15 g/L de triptona, 5 g/L de digestão papaínica de soja, 5 g/L de cloreto de sódio) a 35 °C por 48 horas. Após esse período, a suspensão micobacteriana foi padronizada com a turbidez da escala n° 1 de McFarland.

A cepa de *M. tuberculosis* utilizada foi a cepa padrão H₃₇Rv (ATCC 27294) armazenada no Laboratório de Micobacteriologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram realizadas as análises com a *M. tuberculosis*. Para a reativação, a micobactéria foi cultivada em caldo Lowenstein-Jensen (2,4 g KH₂PO₄; 0,24 g MgSO₄; 0,6g C₆H₆MgO₇; 3,6 g asparagina; 12 mL glicerol; 600 mL água destilada; 1000 mL homogeneizado de ovos; 20 mL Verde de Malaquita a 2%) a 35 °C por 21 dias. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de aproximadamente 100 µL para padronização com a turbidez da escala n°1 de McFarland.

4.2.3 Bactérias Indicadoras

As bactérias indicadoras *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *E. coli* ATCC 25922 foram reativadas em caldo Triptona de Soja (TSB: 15g/L d e triptona, 5 g/L de digestão papaínica de soja, 5 g/L de cloreto de sódio)

a 35 °C por 24 horas. Após esse período, a suspensão micobacteriana foi padronizada com a turbidez da escala n° 0,5 de McFarland.

4.3 Obtenção dos metabólitos microbianos

Para a obtenção dos metabólitos em meio líquido foram utilizados Erlenmeyers de 2000 mL contendo 180 mL de meio Ágar-Amido-Caseína (AC) líquido com algumas modificações (12,5 g/L de amido e 1 g/L de sulfato de amônio). O pré-inóculo foi preparado de acordo com o item 4.2.1. O conteúdo de 20 mL do pré-inóculo foi adicionado a cada erlenmeyer de 2.000 mL contendo 180 mL de meio AC líquido modificado. Os frascos foram incubados por 48 hs a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm. Após este período, 400 mL desse inóculo foi transferido para o biorreator Bioflo 110 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO) contendo 3.6 L de meio Amido-Caseína (AC) líquido. As condições de incubação foram: pH 6,5, 400 rpm, 30 °C e 3 m³ de ar por hora. O período de incubação para o isolamento dos compostos antimicrobianos foi de 4 dias. Essas condições de incubação foram pré-estabelecidas em ensaios anteriores.

4.4 Isolamento Bioguiado dos Compostos Bioativos

4.4.1 Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto

Após o período de incubação em escala preparativa do *Streptomyces* em estudo o caldo de fermentação foi separado do micélio por meio de filtração em papel de filtro. O metabólito foi avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana conforme descrito no item 4.7.1.

O caldo de fermentação foi concentrado, em rota evaporador em banho Maria a 40 °C sob pressão 42 atm. Para cada litro do fermentado concentrado, o volume foi reduzido a 150 mL.

O extrato concentrado foi primeiramente separado por partição líquido-líquido (PLL) em funil de separação com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. Foram utilizados 150 mL do caldo de fermentação e 150 mL do solvente (1:1) para cada partição conforme esquema apresentado na Figura 13 (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

A partição líquido-líquido é uma técnica cromatográfica que se baseia na diferença de solubilidade dos componentes da amostra entre os solventes imiscíveis (COLLINS; BRAGA; BONATO; 2006).

As partições foram realizadas utilizando o seguinte esquema de solvente:

- Hexano (2x), as frações foram reunidas;
- Clorofórmio (2x), as frações foram reunidas;
- Acetato de Etila (2x), as frações foram reunidas.

As frações obtidas de cada solvente foram secas em capela de exaustão de gases, à temperatura ambiente para cálculo de seus rendimentos e posteriormente avaliadas quanto a sua atividade biológica conforme item 4.7.1.

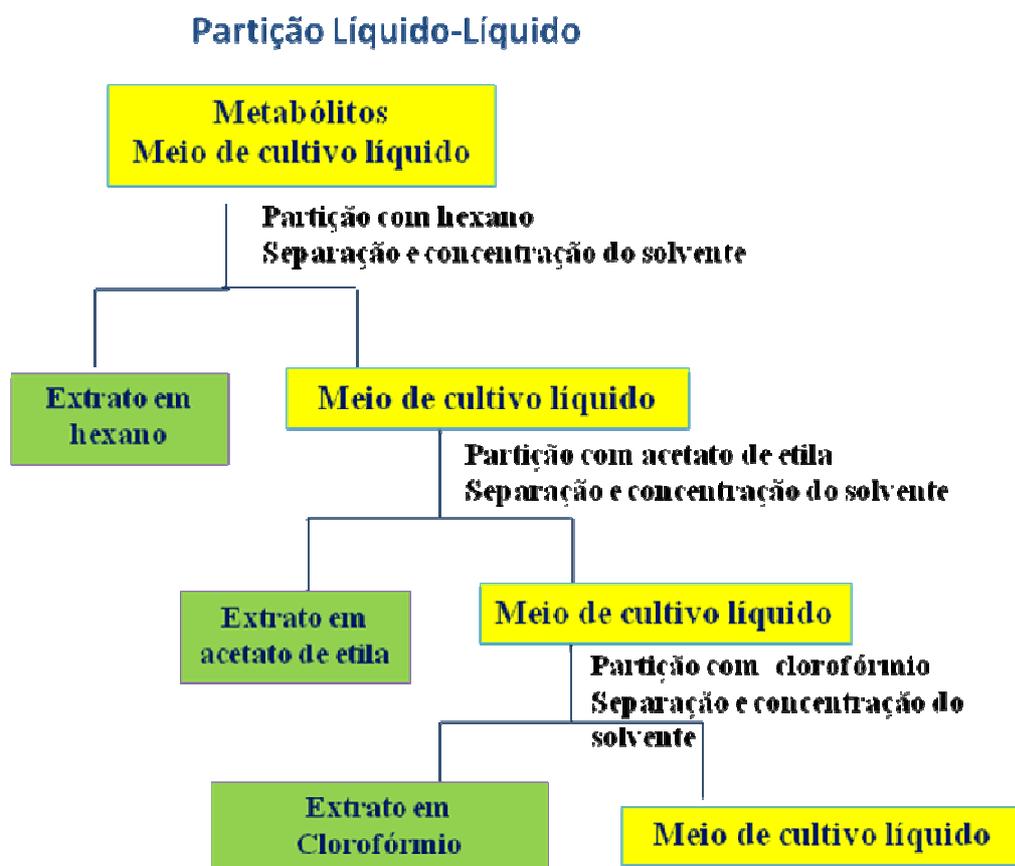


Figura13. Fluxograma de procedimento da Partição Líquido-Líquido (PLL)

Estas análises foram realizadas em colaboração com a Coordenação de Química de Produtos Naturais (LQPN) do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

4.4.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações em hexano, acetato de etila e clorofórmio obtidas na PLL (item 4.4.1) que apresentaram atividade antimicrobiana foram avaliadas quanto ao seu perfil cromatográfico pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Diferentes solventes ou misturas

destes como fase móvel foram utilizadas para avaliar a complexidade dos compostos. A técnica de CCD foi utilizada durante todo o processo de isolamento dos compostos bioativos, para avaliar o perfil de separação e pureza das substâncias isoladas.

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck Co.).

Alíquotas de 4 uL de cada fração foram aplicadas em placas de sílica, utilizando o aparelho AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 – CAMAG. Após a secagem, as placas de CCD foram colocadas em cuba previamente saturada com o eluente da fase móvel. Os sistemas eluentes testados foram misturas polares de solventes orgânicos nas seguintes proporções: acetato de etila/metanol (1:1; 8:2; 9:1) e clorofórmio/acetato de etila (1:1; 8:2; 7:3; 9:1). A cuba foi fechada para saturação da placa de CCD e a eluição do solvente feita até 7 cm a partir da aplicação da amostra na placa. Após eluição as placas foram secas e reveladas sob os comprimentos de onda 254 e 366 nm, utilizando o aparelho Luz ultravioleta (UV) CAMAG REPROSTAR 3. As placas foram fotografadas utilizando o sistema Wincats e seus fatores de retenção foram calculados (Rf).

A partir do perfil cromatográfico, definem-se quais os novos fracionamentos a serem realizados nas frações ativas, com a finalidade de isolar a substância que contém a atividade biológica. A fração em Clorofórmio (fr-Clo) foi utilizada nos ensaios posteriores, pois, apresentou o mesmo perfil da fração em Acetato de Etila, esta também obtida em maior quantidade.

4.4.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) Preparativa

Com o objetivo de isolar a substância com atividade biológica 40µL da fração em clorofórmio foi aplicado em uma placa de sílica preparativa em suporte de vidro. Foram realizadas várias repetições para obtenção de uma maior quantidade das substâncias isoladas.

A placa foi eluída no sistema AcoEt/MetOH 9:1 e, em seguida, visualizada nos comprimentos de onda 254, 366 nm e visível. O perfil cromatográfico das substâncias foram analisadas para verificar se houve uma boa separação.

Em seguida as regiões dos Rfs 0,51 e 0,44 foram raspadas das placas de sílica e solubilizadas em metanol e filtradas em algodão estéril. A partir desse material foi realizado um ensaio de bioautografia, conforme descrito no item 5.4.4, utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como indicadora.

4.4.4 Análise em Scanner dos Compostos Isolados (Clarina A e Clarina B)

As frações correspondentes às regiões dos Rf's 0,51 e 0,44 que foram raspadas da placa preparativa foram avaliadas por Scanner (AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 – CAMAG) para verificar o perfil de isolamento das mesmas.

Para isso, as substâncias foram novamente submetidas à CCD. Na mesma placa de sílica foram aplicadas 4 uL da fração em clorofórmio, 10 uL da fração Rf 0,51 e 10 uL da fração Rf 0,44. A fração em clorofórmio foi utilizada como padrão para nível de comparação dos compostos isolados.

A placa foi eluída utilizando o sistema AcoEt/MetOH 9:1. Após eluição, a análise da placa cromatográfica foi realizada em Scanner nos diferentes comprimentos de onda 254 nm, 366 nm e 400 nm com o objetivo de verificar a pureza das substâncias isoladas (Figura 14).

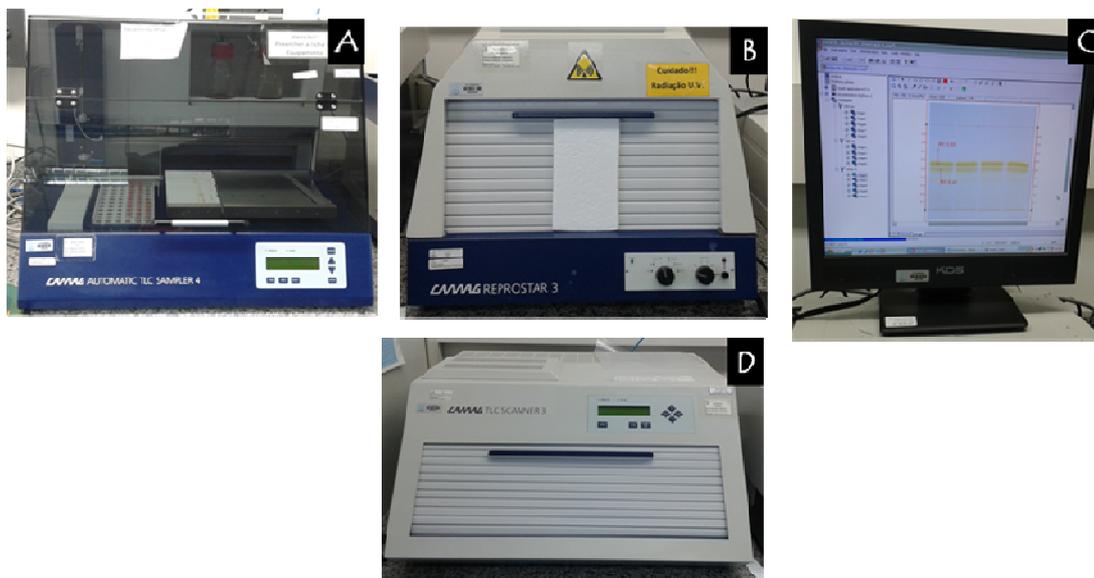


Figura 14 - Análise das Placas Cromatográficas em Scanner. (A) Aplicador de amostras; (B) Câmara de UV: 254nm, 366 e Visível – digitalização das imagens; (C) Programa Wincats; (D) Scanner – varredura nos diferentes comprimentos de onda.

A figura 14 mostra individualmente os blocos do aparelho AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 – CAMAG, onde foram realizadas as análises de CCD para isolamento das substâncias ativas, inclusive as análises em Scanner.

4.5 Isolamento por HPLC das Substâncias Bioativas

As análises em HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo Surveyor Plus[®] (Thermo Scientific) equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com

detector de arranjo de diodos (DAD) Surveyor PDA Plus Detector e de espectrometria de massas (MS) (LCQ Fleet).

4.5.1 Investigação da fração Clorofórmio por HPLC-DAD-MS

Além do isolamento por CCD preparativa as substâncias bioativas foram isoladas por HPLC. Para essa análise, 10 µL da solução estoque (1 mg.mL⁻¹) da fração Clorofórmio foram analisados em sistema HPLC-DAD-MS. Foi utilizada durante a análise uma coluna C18 (Luna) (5µm, 150 x 4,60 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (0,01% TFA – Ácido Trifluoacético) (A) e metanol (B). Inicialmente foi realizada uma análise com gradiente de eluição de 20-80% (B) em 24 minutos (1 mL.min⁻¹), seguido de 80% por mais 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma análise em modo isocrático 70% de B por 20 minutos (1 mL.min⁻¹). O detector de DAD monitorou os comprimentos de onda na faixa de 200-400 nm.

4.5.2 Fracionamento por HPLC semi-preparativo da fração em Clorofórmio

As análises em HPLC semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC[®] (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A₅, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL).

Como o objetivo de otimizar o isolamento das substâncias bioativas, cerca de 20 mg da fração em clorofórmio foi solubilizada, individualmente, em 200 µL de metanol e submetida a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo. Nesta etapa utilizou-se uma coluna C18 (Luna) (5µm, 250 x 10,00 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B), sendo monitorados os comprimentos de onda de 240 e 280 nm. As análises foram conduzidas em modo isocrático de eluição 70% de B por 20 min, com fluxo de 6 mL.min⁻¹. Após análises por MS em equipamento TSQ Quantum Acess. As frações obtidas foram encaminhadas para análises de NMR 2D e MS de alta resolução.

As análises para isolamento e caracterização das substâncias bioativas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e no Laboratório da Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

4.5.3 Solventes

Todos os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos e em experimentos de MS eram grau de pureza HPLC da Tedia. Solventes deuterados da marca Merck foram utilizados para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (NMR). Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, modelo *Synthesis* (Millipore).

4.6 Caracterização das Substâncias Isoladas

4.6.1 Análises por Espectrometria de Massas

Os espectros de baixa resolução foram registrados em equipamento do tipo *ion-trap*, modelo LCQ Fleet[®] (Thermo Scientific), operando com fonte de *electrospray* (ESI) ou com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI), enquanto os espectros de alta resolução foram obtidos a partir do equipamento MicrOTOF QII (Bruker), operando com fonte de *electrospray* (ESI).

4.6.2 Análises por Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização “eletrospray” (ESI-MS)

Soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) da fração Clorofórmio e das duas substâncias Clarina A e B isoladas por CCD preparativa, foram solubilizadas em metanol. Aliquotas ($5 \text{ }\mu\text{L}$) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrometro de massas.

Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de ESI e operando no modo positivo de aquisição para as análises de ESI-MS e ESI-MSⁿ. Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As amostras foram infundidas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento ($10 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$). As condições analíticas da análise foram as seguintes: *spray voltage*, 5 kV; *sheath gas*, 10 arb; *auxiliary gas*, 5 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 200 °C; *capillary voltage*, 40 V; *tube lens*, 115 V; *mass range*, m/z 150 a 2000; colision gas, He. Os espectros de ESI-MSⁿ foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30%.

4.6.3 Análises por espectrometria de massas com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS)

Cada pico cromatográfico gerado no cromatograma obtido por HPLC- DAD-MS (regiões A, B, C e D), do item 4.5.1, foram novamente analisadas por espectrometria de massas com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS) em modo positivo e negativo, com o objetivo de confirmar a m/z das substâncias isoladas.

As condições analíticas da análise foram as seguintes: *discharge current*: 5 μA ; *vaporizer temperature*: 350 $^{\circ}\text{C}$; *capillary temperature*: 270 $^{\circ}\text{C}$; *sheath gas*: 35 psi; *aux gas*: 15 arb, *mass range*, m/z 150-2000. ESI foi utilizada como fonte de ionização no modo isocrático, sendo utilizados os seguintes parâmetros: *spray voltage*, 5 kV; *sheath gas*, 35 arb; *auxiliary gas*, 10 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 250 $^{\circ}\text{C}$; *capillary voltage*, 40 V; *tube lens*, 115 V; *mass range*, m/z 150 a 2000; *colision gas*, He.

4.6.4 Análises por espectrometria de massas de alta resolução (ESI-HRMSMS)

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos utilizando um equipamento micrOTOF – Q II-ESI-TOF, Bruker Daltonics.

Soluções estoque (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) das amostras Clarina A e B, isoladas por HPLC semi preparativo (item 4.5.2), foram solubilizadas em metanol. Aliquotas (5 μL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrometro de massas.

Os espectros de massas foram obtidos através do equipamento MicrOTOF QII (Bruker), operando com fonte de electrospray (ESI). Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As amostras foram infundidas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento (180 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$). As condições analíticas da análise foram as seguintes: *end plate offset*, -50 V; *capillary*, 3500 V; *nebulizer*, 29.0 psi; *dry gas*, 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; *dry temp*, 300 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de ESI-MS² foram obtidos a partir da aplicação de energia de 30 eV.

4.6.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear - NMR

As análises de NMR foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os espectros de COSY foram adquiridos em equipamentos Bruker, modelo ASCEND 500.

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS).

4.7 Bioensaios das Frações e Compostos Isolados por CCD

4.7.1 Antibiose - Difusão em Discos / Ágar (Bauer et al., 1966)

A metodologia adaptada de Kirby e Bauer é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobiano, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).

Os extratos orgânicos, frações e substâncias isoladas foram submetidos a ensaios de antibiose pelo método de difusão em ágar-discos utilizando os seguintes microrganismos indicadores: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *M. smegmatis* e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os microrganismos indicadores foram padronizados de acordo com o item 4.2.2 e 4.2.3. Para o método de difusão em disco, os microrganismos padronizados foram semeados em placas contendo meio Ágar Müller-Hinton onde discos de papel de 6 mm de diâmetro foram previamente colocados no meio de cultura, e 30 μL de cada fração ou metabólito microbianos a ser testado foram inoculados em cada disco.

Para o método de atibiose por difusão em disco, os microrganismos indicadores padronizados foram inoculadas com swab estéril em toda a placa de Petri contendo o meio ágar Müller-Hinton. As placas foram previamente perfuradas obtendo orifícios de 6 mm de diâmetro no Ágar, em seguida, 100 μL do metabólito do *Streptomyces* a ser testado foi inoculado em cada poço.

As placas foram armazenadas em geladeira por aproximadamente 4 h para maior difusão do composto antimicrobiano no ágar. Após esse período as placas foram incubadas a 35 °C, de 16 a 48 horas, dependendo do microrganismo indicador. Após o período de

incubação foi realizada a leitura das placas medindo o diâmetro dos halos de inibição (Figura 15).

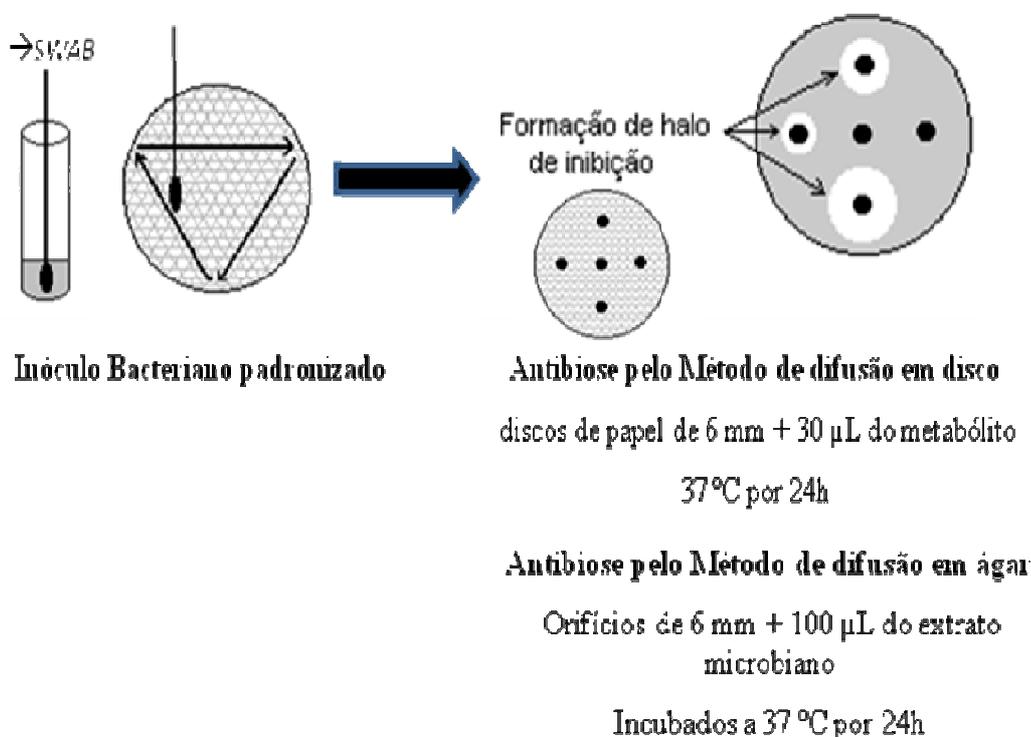


Figura 15 - Método de antibiose por difusão em ágar/disco.

4.7.2 Bioensaios de Antibiose contra *M. tuberculosis*

A fração em Clorofórmio foi utilizada neste ensaio, pois apresentou o mesmo perfil cromatográfico da fração em Acetato de Etila. A mesma também apresentou atividade antimicrobacteriana positiva em testes anteriores. Apesar de baixa atividade antimicrobiana frente à bactéria indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a fração em Hexano também foi utilizada neste ensaio, apenas para averiguação.

No bioensaio, foi utilizada a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), por se tratar de cepa sensível a todos os fármacos utilizados no tratamento da TB. O preparo do inóculo micobacteriano foi realizado após o pré-cultivo da cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv em meio de Lowenstein-Jensen, a 35 °C por 21 dias, conforme descrito no item 4.2.2.

Transferiu-se aproximadamente 5,0 mg de bacilos para um tubo contendo pérolas de vidro, agitando-se em vortex. Após a agitação, adicionou-se 1,5 mL de solução tween 0,04%/albumina 0,2% (v/v) ao tubo e agitou-se novamente em vortex. Transferiu-se 100 µL dessa suspensão para novo tubo contendo 5 mL de solução tween 0,04%/albumina 0,2% (v/v),

agitando-se em seguida, em vortex. Ajustou-se a turbidez da suspensão bacteriana para correspondência com o tubo n° 1 da escala de McFarland.

Em um tubo contendo 7 mL de caldo Middlebrook 7H9 (0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$; 0,1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 0,001 g piridoxina; 0,0005 g biotina; 2,5 g Na_2HPO_4 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,04 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$; 0,05 g MgSO_4 ; 0,0005 g CaCl_2 ; 0,001 g ZnSO_4 ; 0,001 g CuSO_4 ; 900 μL água destilada), desprezou-se 280 μL do volume do meio. Em seguida, foram transferidos 280 μL da suspensão bacteriana a esse tubo contendo meio 7H9, resultando em uma suspensão bacteriana diluída em 25X (Figura 16).

Para a verificação da atividade de antagonismo micobacteriano extracelular foi utilizado Alamar Blue como revelador de óxido-redução, conforme técnica descrita por Franzblau et al. (1998). Para os extratos obtidos foi verificada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em concentrações decrescentes de 512 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo as frações avaliadas em triplicata.

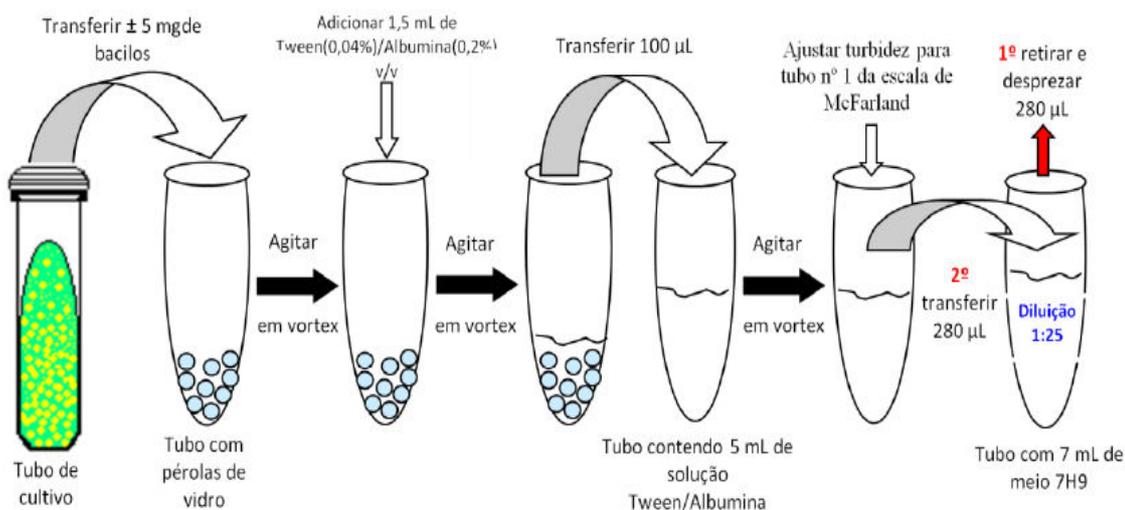


Figura 16 – Procedimento sequencial para o preparo do inóculo de *M. tuberculosis*, utilizado no teste de antibiose frente às frações de *Streptomyces* sp.

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas placas de 96 poços e adicionados os reagentes, na seguinte ordem:

1. água destilada autoclavada: 200 μL nos poços das colunas 1 e 12, e nas fileiras A e H;
2. caldo Middlebrook 7H9: 100 μL nos poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de B a G;
3. extrato teste: 100 μL nos poços da coluna 2, nas fileiras de B a G;
4. diluições sucessivas dos extratos teste: após homogeneização do conteúdo dos poços da coluna 2, fileiras de B a G, foram transferidos 100 μL do extrato teste para os poços

laterais da direita e sucessivamente repetidas até os poços da coluna 10, fileiras de B a G.

Os 100 µL retirados dos poços da coluna 10, fileiras de B a G foram desprezados.

5. inóculo micobacteriano: 100 µL nos poços das colunas 2 a 11, nas fileiras de B a G.

Esses procedimentos estão esquematizados na Figura 17.

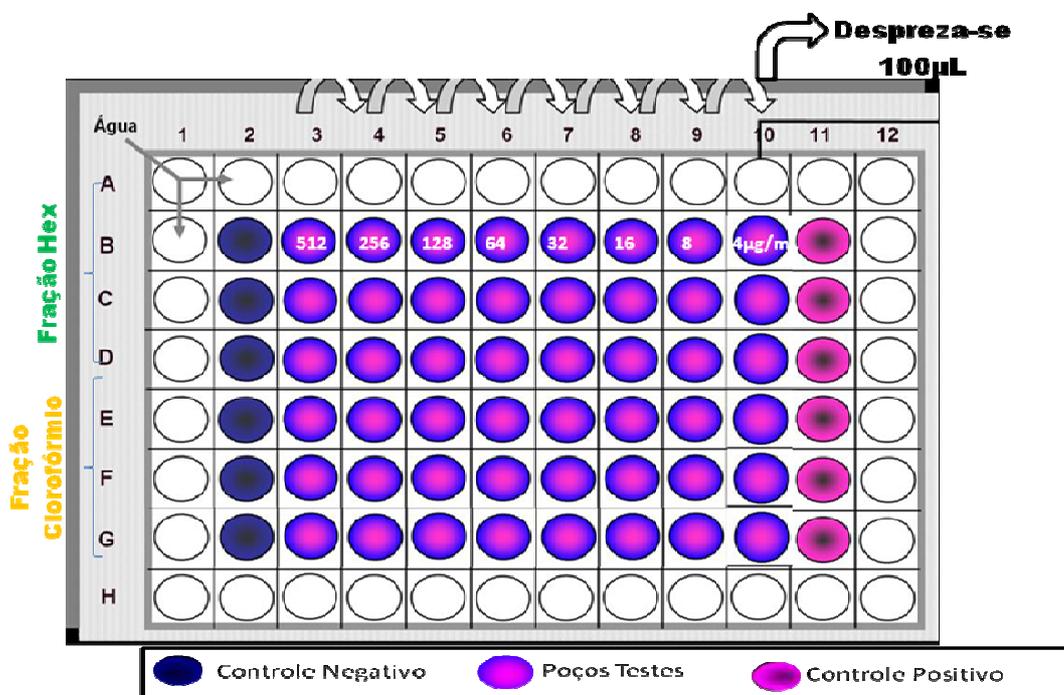


Figura 17 Procedimento de Bioensaio pela técnica de Alamar Blue, para verificar a ação inibitória do *M. tuberculosis* pelos extratos microbianos em Hexano e Clorofórmio. **Controle Negativo:** controle do extrato; **Controle Positivo:** controle de crescimento da cepa *M. tuberculosis* H37Rv; **H₂O:** água foi adicionada para minimizar a evaporação dos reagentes utilizados no bioensaio.

Os extratos foram testados em triplicata. Os diluentes do extrato (etanol e metanol) também foram testados (Extr). Os extratos foram solubilizados em etanol/metanol de modo que as concentrações dos mesmos ficassem a 100 mg/mL (estoque). Posteriormente, os extratos foram diluídos a 2048 µg/mL em meio de cultivo 7H9GC e esterilizados por filtração.

4.7.3 Bioautografia da Fração em Clorofórmio e Compostos Isolados por CCD preparativa

Durante todo o período de isolamento da substância biologicamente ativa, foram realizados testes de bioautografia, com a finalidade de identificar as substâncias biologicamente ativas e nortear os próximos passos a serem dados para o isolamento da

mesma. O método de bioautografia utilizado foi o descrito por Ahmad et al.(2007), com algumas modificações.

A fração em Clorofórmio e os compostos isolados por CCD preparativa, foram aplicados em placas de sílica conforme item 4.4.2. A placa foi eluída utilizando o sistema Acetato de Etila / Metanol (AcoEt/MetOH 9:1).

Após a secagem, as placas cromatográficas foram depositadas em placas de Petri e recobertas com o meio Luria-Bertani (LB) semi-sólido contendo 100 µL da suspensão da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* MRSA padronizada de acordo com o tubo nº 0,5 da escala de Mc Farland. Após a solidificação, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira por 4 horas para difusão do composto antimicrobiano da sílica para o ágar. Após esse tempo, a placa foi incubada a 35 °C, por 16 horas. As placa contendo os bioautogramas foram borrifadas com uma solução de 2,3,5- cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) na concentração de 5 mg/mL, para observação das zonas de inibição sobre a região do composto de interesse e determinação dos fatores de retenção (R_f s) das substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana (SAXENAS et al., 1995). Os R_f s das zonas de inibição serviram como norteadores para o isolamento bioguiado dos compostos ativos.

4.8 Bioensaios dos Compostos Isolados por HPLC

4.8.1 Antibiose - Difusão em disco

Os compostos isolados foram submetidos a ensaios antibacterinos para confirmar sua bioatividade utilizando o método de difusão em disco conforme item 4.7.1. Os microrganismos indicadores utilizando foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os microrganismos indicadores foram padronizados de acordo com o item 4.2.3.

4.8.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo Método de Microdiluição em Microplaca

Foram preparadas soluções estoques das duas substâncias a serem analisadas Clarina A e B. As frações foram solubilizadas em metanol e água na proporção 1:9, de modo que se obteve uma concentração de 1,024 µg/ml para as duas substâncias A e B.

As substâncias foram testadas nas concentrações de 512 a 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para a *M. Smegmatis* foram testadas as concentrações de 512 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As bactérias indicadoras foram previamente padronizadas de acordo com o item 4.2.2 e 4.2.3. Para realização dos bioensaios foram utilizadas placas de 96 poços e adicionados os seguintes reagentes:

1. Meio Ágar Müller Hinton: 100 μL nos poços das colunas 1 a 12, nas fileiras de B a G;
 2. Frações teste: 100 μL nos poços da coluna 1, nas fileiras de B a G, sendo que a substância A foi adicionada nos poços B, C e D e a substância B nos poços E, F e G.
 3. Diluições sucessivas das substâncias teste: após homogeneização do conteúdo dos poços da coluna 1, fileiras de B a G, foram transferidos 100 μL das frações teste para os poços laterais da direita e sucessivamente repetidas até os poços da coluna 11, fileiras de B a G. Os 100 μL retirados dos poços da coluna 11, fileiras de B a G foram desprezados.
 4. inóculo bacteriano: 100 μL nos poços das colunas 1 a 12, nas fileiras de B a G;
- Esses procedimentos estão esquematizados na Figura 18.

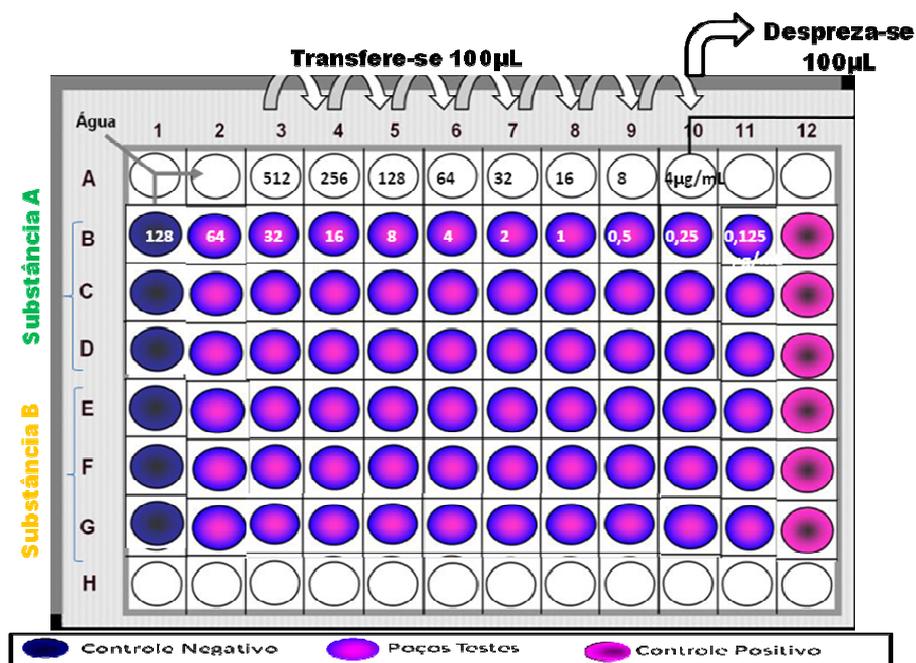


Figura 18. Esquema para Determinação da Concentração Inibitória Mínima de antagonismo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do composto isolado Clarina A (Rf 0,44) e Clarina B (Rf 0,51).

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas para a bactéria *Staphylococcus aureus* e 48h para *M. smegmatis*. Após esse período foi adicionado em cada poço 50 μL de uma solução de 2,3,5- cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) na concentração de 5 mg/mL para observação da mudança de coloração do meio para vermelho onde houver crescimento bacteriano.

4.8.3 Avaliação da Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica das substâncias isoladas foram avaliadas utilizando o ensaio do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil (MTT). Este método consiste em uma dosagem colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) de cor amarela a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação da enzima succinil-desidrogenase presente somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas. Assim, o MTT atua como um indicador da função mitocondrial e, consequentemente, da viabilidade celular (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

Os ensaios para avaliação da atividade citotóxica foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia.

As células utilizadas neste ensaio foram 3T3-L1 (linhagem não tumoral - Fibroblastos não transformados de camundongo) e MCF-7 (linhagem tumoral - adenocarcinoma de mama).

Clarina A e Clarina B foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados em alíquotas a 4°C. As células foram expostas aos compostos após a adesão em placas de 96 poços. A concentração final de DMSO foi mantida em 0,5%.

As células 3T3-L1 e MCF-7 (1×10^4 células/poço) foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas junto ao meio de cultura em estufa em ambiente controlado (temperatura de 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂) por 24, 48 e 72h.

Os tratamentos com Clarina A e Clarina B foram realizados nas concentrações de 1, 50 e 200 µg/mL com incubação a 37°C. Ao término desta incubação, o meio de cultura foi substituído pela solução de MTT (0,25 µg/L) e incubação adicional por 2 h a 37°C. Após esta etapa, a solução de MTT foi retirada e DMSO foi adicionado para solubilizar o precipitado formazan.

As placas foram analisadas espectrofotometricamente utilizando um leitor de microplacas (ELX800, Biotek, Vermont, EUA) em 540nm, determinando a viabilidade celular.

A absorbância do grupo controle foi considerada como 100% de células viáveis. Portanto quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis. A concentração citotóxica que provoca a morte em 50% das células, foi calculada utilizando o *software GraphPad Prism 6* (La Jolla, CA, EUA) - GPW6-242831-RBMZ-03274.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos Metabólitos Microbianos

Os metabólitos antimicrobianos foram produzidos em fermentador/biorreator de 6L nas seguintes condições: pH 6,5, 30°C e 400 rpm. Após 4 dias de cultivo pode-se observar a produção de um pigmento amarelo que pode indicar a produção também do metabólito antimicrobiano de interesse (Figura 19).

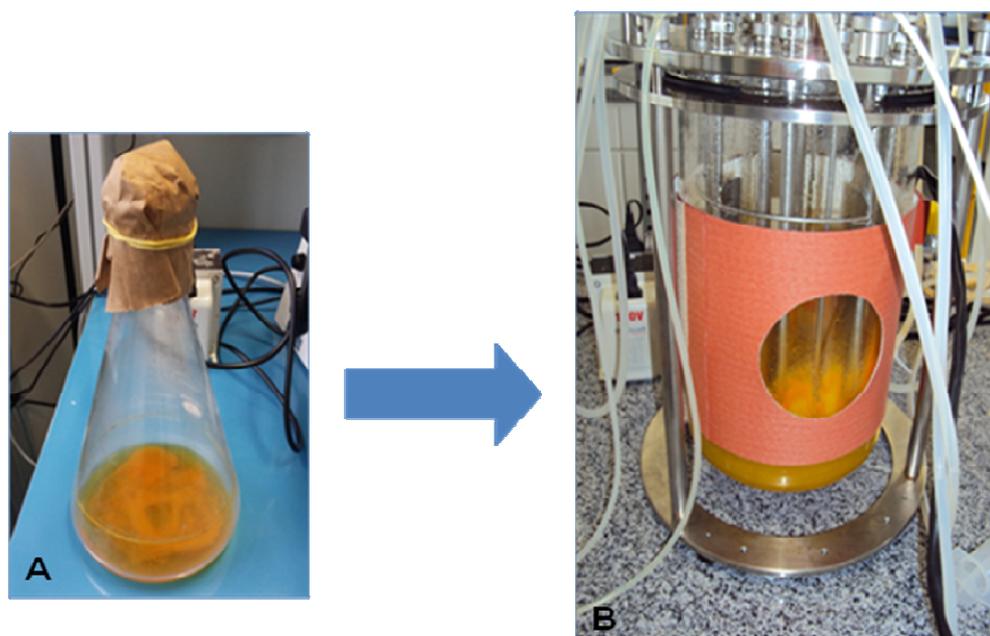


Figura 19. Metabólitos antimicrobianos de *Streptomyces*. (A) pré-inóculo; (B) fermentador.

5.2 Isolamento Bioguiado dos Compostos Bioativos

5.2.1 Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto

A partir do extrato aquoso obtido do *Streptomyces* em estudo foi realizada a concentração do material biológico em rota evaporador em banho Maria a 40°C e pressão 42 atm. Para cada litro de metabólito, o extrato foi concentrado a um volume de 150 mL.

O processo de fracionamento do extrato concentrado iniciou-se com uma partição líquido-líquido em funil de separação, conforme ilustrado na figura 20 A. As partições foram realizadas utilizando 150 mL do metabólito e 150 mL dos solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila (1:1) para cada partição.

As frações obtidas foram secas em capela de exaustão, obtendo-se um rendimento de 34 mg da fração em hexano (fr-Hex), 200 mg da fração em clorofórmio (fr-Clo) e 160 mg da fração em acetato de etila (fr-AcoEt) (Figura 20 B). Em seguida os extratos foram avaliados quanto ao seu perfil cromatográfico e sua atividade antimicrobiana.

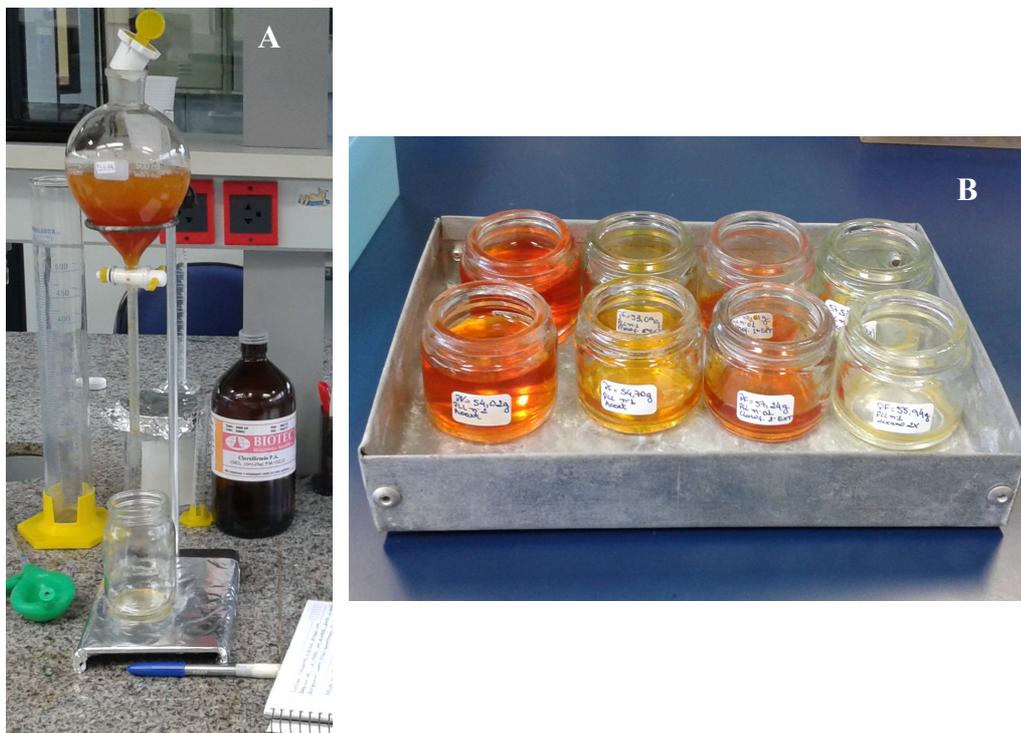


Figura 20 – Fracionamento Líquido-Líquido do Extrato Bruto. (A) Partição líquido-líquido em funil de separação; (B) Os extratos obtidos da partição PLL.

Novas extrações foram feitas durante todo o processo de purificação utilizando o solvente clorofórmio com o objetivo de obter maior quantidade de material para análise.

5.2.2 Cromatografia em Camada Delgada - CCD

Os perfis cromatográficos das frações obtidas da partição líquido-líquido (PLL) foram analisadas por CCD e comparadas. As frações obtidas de clorofórmio e acetato de etila obtiveram perfis cromatográficos e atividade antimicrobiana semelhante (Figura 21).

Conforme o perfil cromatográfico das frações, podemos observar que a fr-Clo apresentou um perfil semelhante à fração a fr-AcoEt e distinto da fr-Hex nos diferentes comprimentos de onda analisados 254, 366 nm e visível. Foram visualizadas várias bandas com Rfs semelhantes tanto na fr-Clo quanto na fr- AcoEt. O sistema utilizado para eluição foi AcoEt/MetOH 9:1, pois observou-se uma melhor separação dos constituintes.

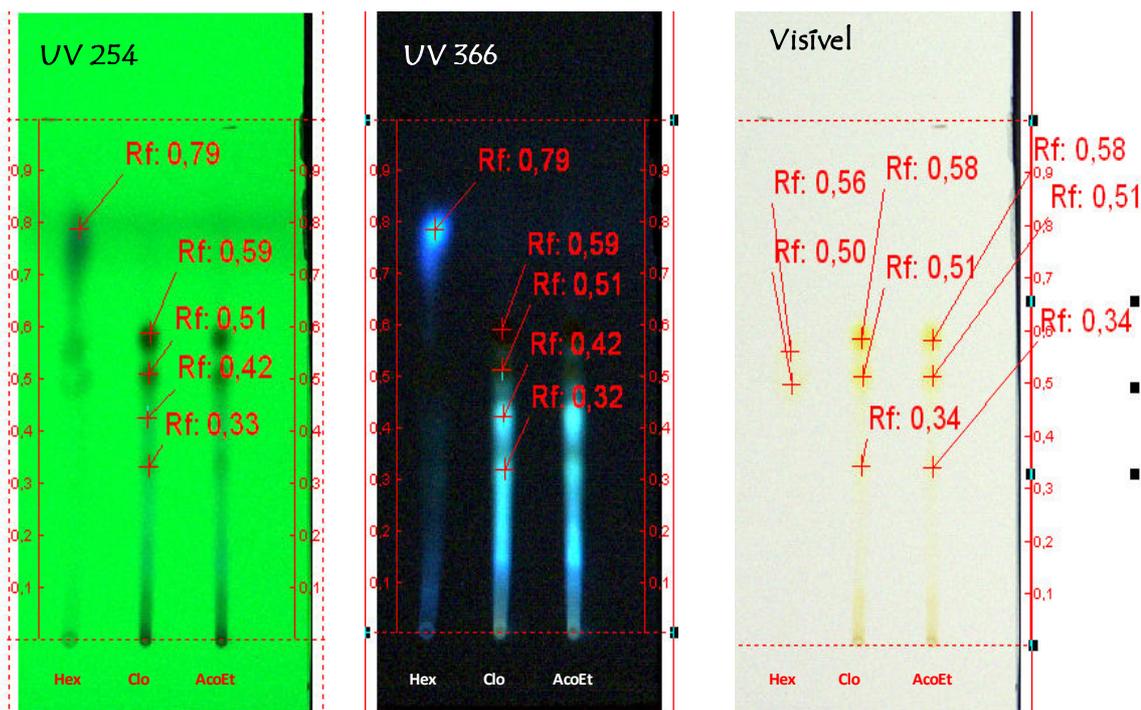


Figura 21 - Perfil Cromatográfico dos extratos da PLL: Hexano (fr-Hex); Clorofórmio (fr-Clo); Acetato de Etila (fr-AcoEt) da PLL nos comprimentos de onda 254nm, 366nm e Visível.

5.2.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Foram feitas várias aplicações da fração em clorofórmio em placa de sílica de vidro preparativa, sendo aplicadas 40 μ L em cada banda. As placas foram eluídas no sistema AcoEt/MetOH 9:1, pois foi o sistema que obteve melhor resolução.

É possível observar as duas substâncias nos diferentes comprimentos de onda. De acordo com os ensaios antimicrobianos anteriores, as frações com atividade são as que possuem os Rfs 0,51 e 0,42 (Figura 21). Sendo observada uma variação nos valores dos Rfs, que ficaram entre 0,55 e 0,49. Essa variação nos valores de Rfs nas diferentes aplicações se deve a variações de temperatura, umidade e até no tipo de sílica em diferentes cromatofolhas. Portanto, as regiões dos respectivos Rfs foram raspadas da placa de sílica, filtradas em algodão e analisadas quanto ao seu perfil cromatográfico e avaliadas quanto à sua atividade biológica. Na Figura 22 podemos observar o perfil de separação à partir da fração em clorofórmio.

De acordo com Wang et al., (2004), o processo de fracionamento separa compostos com polaridades diferentes e rende frações de diferentes composições e propriedades com atividade farmacológicas individualizadas.

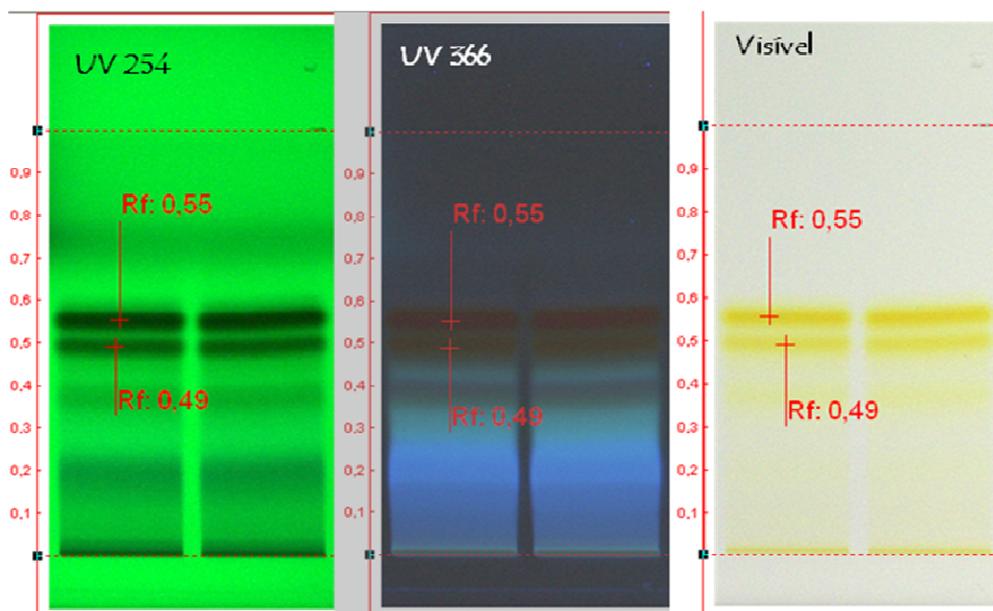


Figura 22 – Perfil cromatográfico da fração em Clorofórmio (fr-Clo) na placa preparativa.

5.2.4 Perfil Cromatográfico dos Compostos Isolados por CCD

Pela técnica de CCD preparativa foi possível isolar as duas substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactéria indicadora *Staphylococcus aureus* ATCC.

Na Figura 23 está ilustrado o cromatograma por CCD da evolução do fracionamento e purificação, partindo da fração em clorofórmio, o que possibilitou o isolamento de duas substâncias bioativas pela técnica de CCD-preparativa.

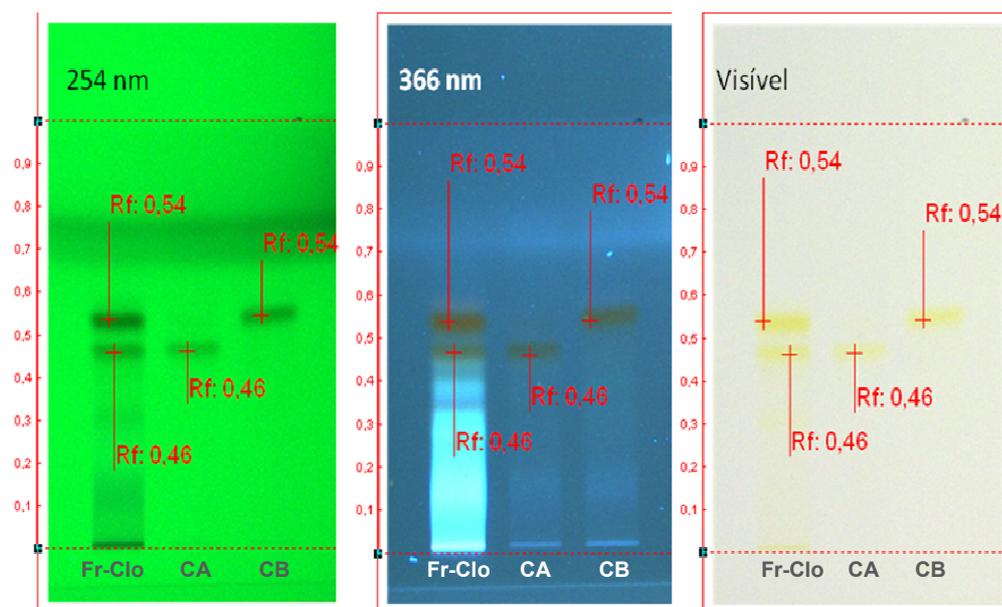


Figura 23 - Perfil Cromatográfico mostrando a evolução do fracionamento e purificação dos compostos com atividade antibacteriana do *Streptomyces*. Sendo Fr-Clo (Fração em Clorofórmio); CA (Composto A isolado); CB (Composto B isolado).

Para melhor entendimento, as duas substâncias isoladas foram chamadas respectivamente de Clarina A (Rf 0,46) e Clarina B (Rf 0,54).

As substâncias isoladas Clarina A e Clarina B, apresentam coloração alaranjada, são amorfo e solúveis em clorofórmio, acetato de etila e metanol. No trabalho realizado por LIN et al. (2010), um novo estreptomiceto, a cepa designada de L0804, isolada de lodo marinho na China, produziu dois compostos ativos a partir de seu metabolismo secundário, os quais apresentaram atividade antimicrobiana e anti-tumoral, sendo que um deles, o composto A é um alcalóide de aparência laranja avermelhado e facilmente solúvel em clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol, metanol e dimetilsulfóxido, mas insolúvel em ciclohexano, em éter de petróleo, éter etílico e água. Nota-se que tais características do composto A, citadas acima, assemelham-se às características das substâncias isoladas (Clarina A e B) no presente trabalho.

5.2.5 Análise em Scanner dos Compostos Isolados

As substâncias isoladas Clarina A e B foram analisadas a nível de Scanner nos diferentes comprimentos de onda 254 nm, 366nm e 400 nm. As análises foram realizadas utilizando o aparelho AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 – CAMAG. A fração em clorofórmio foi utilizada como padrão para comparar a evolução da purificação.

Esse tipo de análise por densitometria pode ser utilizado para identificação, comparando os perfis das curvas analógicas de amostras individuais. Isto inclui a digitalização multi-comprimento de onda, onde é realizado o varrimento sequencial de cada faixa de cromatograma com até 30 comprimentos de onda, e a avaliação de cada um dos trilhos em todos os comprimentos de onda. Os espectros de UV de substâncias separadas pode ser gravado e usado para fins de identificação. Para uma boa avaliação densitométrica é necessário uma boa cromatografia (REICH; SCHIBLI, 2006).

Por meio dessa análise foi possível observar que as substâncias isoladas Clarina A e B estavam isoladas como mostra os cromatogramas das figuras abaixo com a presença apenas de alguma impureza relacionada ao solvente.

Na Figura 24 está o cromatograma de todas as frações e substâncias isoladas nos comprimento. Os cromatogramas da fração em clorofórmio em todos os comprimentos de ondas analisados (254, 366, e 400 nm) apresentaram vários picos, indicando que existe uma mistura de substâncias. É possível observar ainda os dois picos maiores que possivelmente seja das substâncias bioativas (Figura 24 II).

Observando os cromatogramas da substância chamada de Clarina A em todos os comprimentos de onda, verifica-se dois picos, um indicando a presença da substância Clarina A e outro pico maior que provavelmente está relacionado à mistura de solventes (acetato de etila/metanol 9:1) utilizado para eluir as placas cromatográficas. (Figura 24 III). No cromatograma da substância chamada de Clarina B, em todos os comprimentos de onda analisados, observa-se também dois picos, um pico maior, sendo a substância Clarina B e outro pico também relacionado com o solvente. (Figura 24 IV).

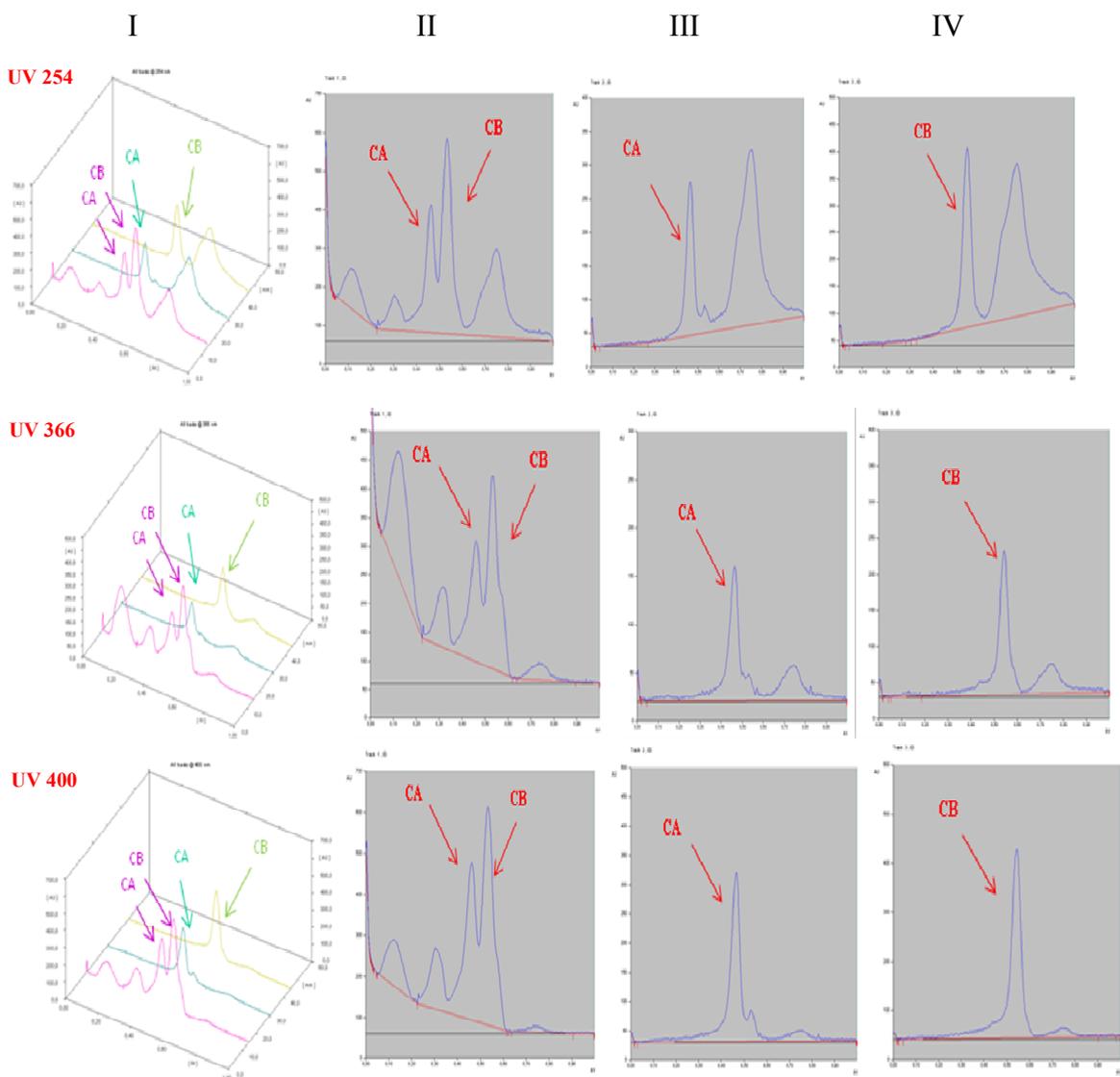


Figura 24: I - Cromatograma de todas as frações nos diferentes comprimentos de onda (254, 366, e 400 nm). Linha (---): Extrato da fração em Clorofórmio; (—): Clarina A; (---): Clarina B.; II – Cromatograma da fr-Clorofórmio nos diferentes comprimentos de onda; III – Cromatograma da substância Clarina A nos diferentes comprimentos de onda; IV – Cromatograma das substâncias Clarina B nos diferentes comprimentos de onda..

Nota-se ainda que nos cromatogramas das substâncias Clarina A e Clarina B no comprimento de onda 400 nm, verifica-se apenas um pico, evidenciando que as substâncias estão isoladas. (Figura 24 I, II, III e IV).

Através da análise dos cromatogramas nos diferentes comprimentos de onda é possível dizer que as substâncias Clarina A e Clarina B estão isoladas. Outros ensaios analíticos foram realizados para confirmar sua pureza e características químicas.

5.3 Isolamento por HPLC das Substâncias Ativas

5.3.1 Investigação da Fração Clorofórmio por HPLC-DAD-MS

Além do isolamento por CCD, as substâncias de interesse foram isoladas por HPLC. Para isso a fração em clorofórmio foi submetida à técnica de HPLC-DAD-MS com detector de UV para isolamento dos compostos antimicrobianos (Figuras 25 e 26). Este método permite a separação simultânea, detecção, identificação e quantificação de uma grande variedade de compostos.

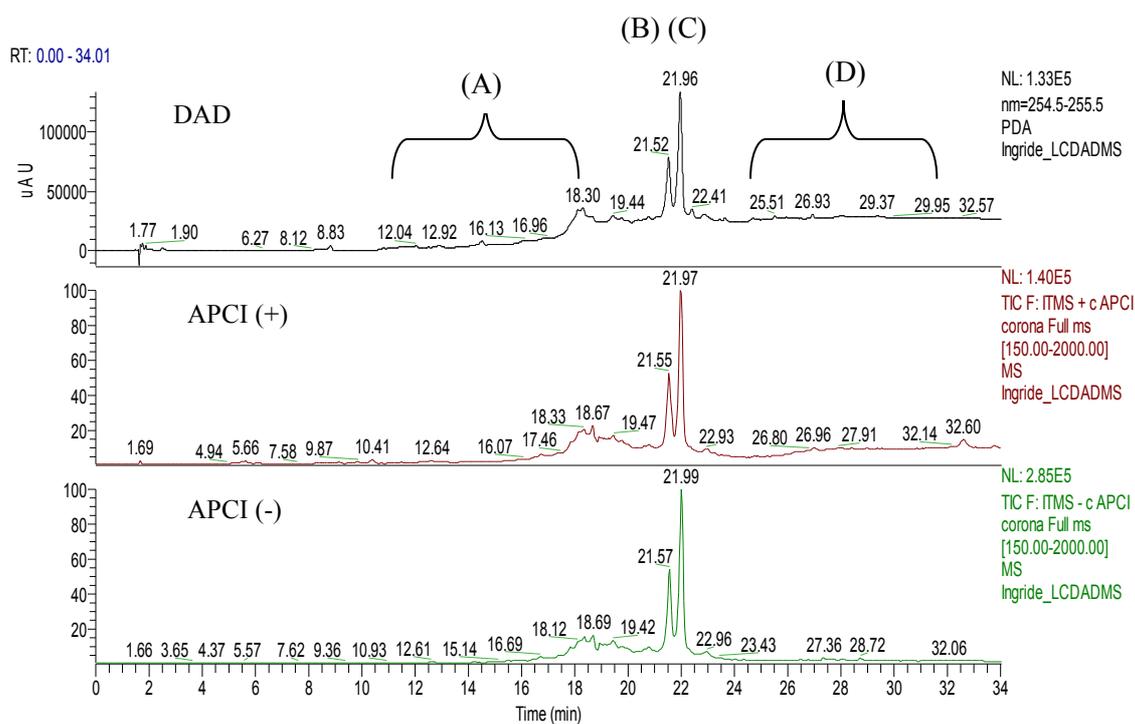


Figura 25. Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para Fração Clorofórmio. Gradiente de eluição: 20-80% de B em 34 minutos ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,60 \text{ mm}$)

Primeiramente foi utilizado um método exploratório com gradiente de eluição onde podemos observar vários picos cromatográficos, sendo as regiões B e C as duas substâncias de interesse. Obteve-se então por HPLC a separação das substâncias B e C com tempo de retenção entre 21,5 e 22 min.) (Figura 26).

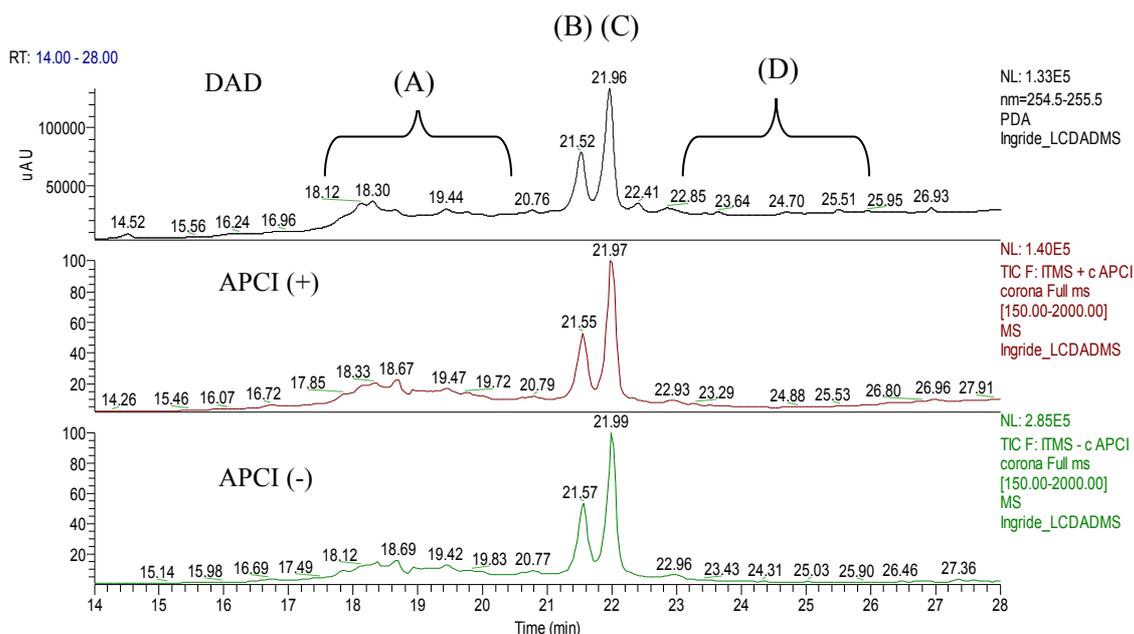


Figura 26. Ampliação do Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para fração clorofórmio, destacando-se os picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D).

Praveen e Tripathi, 2008, também obtiveram à partir do gênero *Streptomyces* um composto com 98% de pureza por HPLC, com tempo de retenção de 21 min, como sendo uma substância caracterizada como Acinomicina D.

Na Figura 27 Cada região do espectro obtido por HPLC-DAD-MS (regiões A,B,C e D) foram analisadas separadamente, onde os espectros se mostram bem parecidos caracterizando substâncias de mesma natureza com absorvância nas regiões entre 200 a 240 nm. Essa faixa de absorvância é característico de estruturas derivadas de cromóforos fenoxazínicos como as actinomicinas (SMÂNIA JR, 1998).

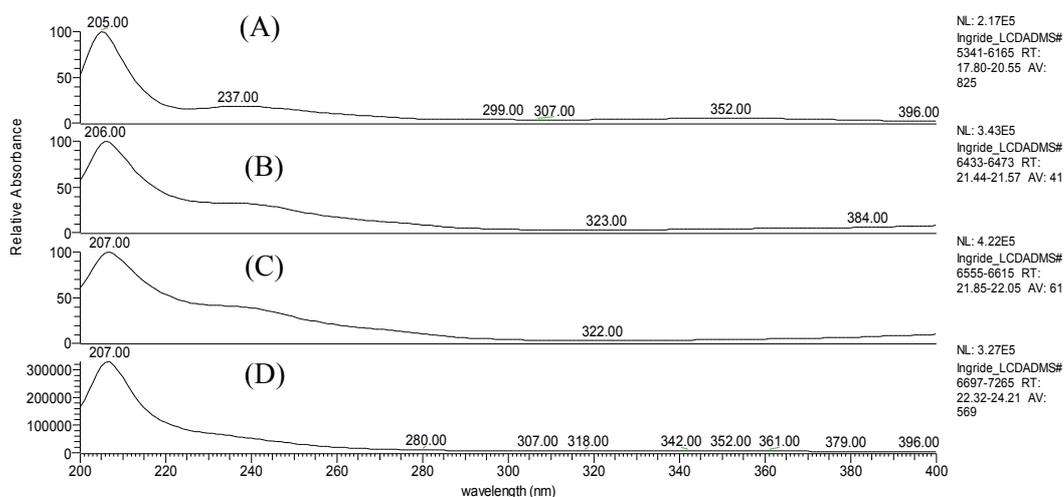


Figura 27. Espectros de DAD dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio.

Segundo Hamza et al., 2013, uma estirpe de *Streptomyces* AH47 também produziu dois compostos antimicrobianos, que eluíram da coluna de HPLC a tempos de retenção semelhantes a de actinomicinas (15,36 e 16,53 min) e teve máximos de absorvância em 220 , 242 e 443 nm.

5.3.2 Fracionamento por HPLC Semi-preparativo

Para melhorar otimizar o isolamento das substâncias de interesse, a fração em clorofórmio foi novamente submetida à técnica de HPLC-DAD-MS semi-preparativo, desta vez utilizando um método de corrida isocrático com 70% de metanol (Figura 28).

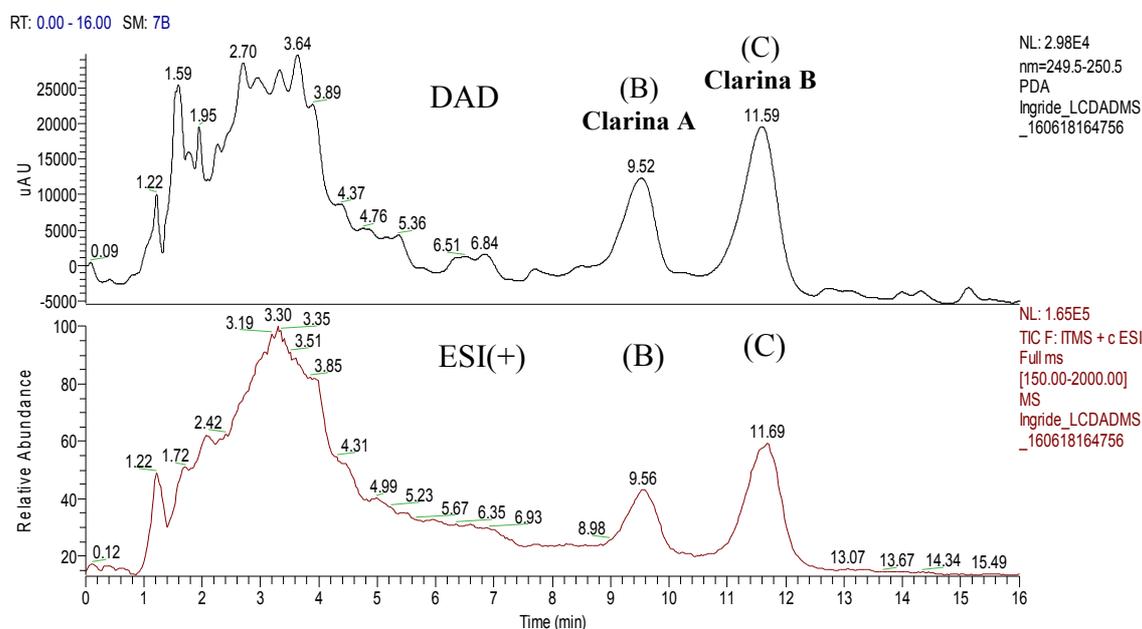


Figura 28. Cromatograma obtido por HPLC-DAD-MS para o extrato. Corrida isocrática 70% de B por 16 minutos ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 (5 μm , 150 x 4,60 mm).

Por este método houve uma melhor separação com menor tempo de retenção para isolamento das substâncias de interesse, sendo de 9,5 min para a substância (B) e 12 min para a substância (C) (Figura 28). Por este método foi possível obter 3 mg da substância Clarina A e 4 mg da substância Clarina B que foram utilizadas nos ensaios antimicrobianos e encaminhadas para análise de NMR e MS de alta resolução.

5.4 Bioensaios das Frações e Compostos Isolados por CCD

5.4.1 Antibiose - Difusão em Discos / Ágar (Bauer et al., 1966)

Pelo método de difusão em disco foi avaliado a atividade antimicrobiana das frações obtidas da partição líquido-líquido do item 4.4.1 e dos compostos isolados por HPLC semi-preparativo conforme item 4.5.2. As frações em hexano, acetato de etila e clorofórmio apresentaram atividade antimicrobiana de baixa a alta intensidade, frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como mostra Tabela 3 e Figura 29.

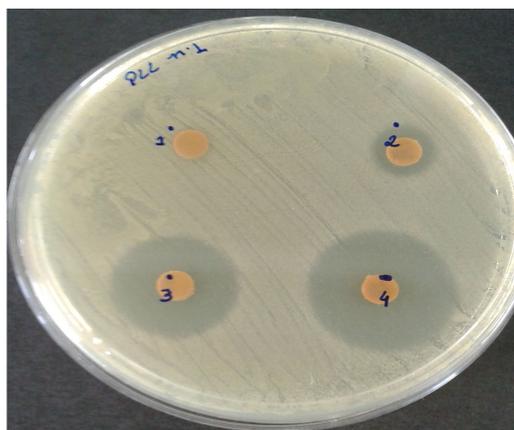


Figura 29 Bioensaio de antibiose dos extratos obtidos da PLL frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. PLL (1) Controle (Metanol); (2) Hexano; (3) Acetato de Etila; (4) Clorofórmio.

Tabela 3. Classificação da atividade antibacteriana apresentada pelos extratos obtidos da PLL.

PLL n° 1	Resultado
(1) Controle	(-)
(2) Hexano (2x)	(+) 10 mm
(3) Acetato de Etila	(+++) 20 mm
(4) Clorofórmio	(+++) 25 mm

- **Baixa (+):** diâmetro do halo de inibição entre 7 a 12 mm;
- **Moderada (++):** diâmetro do halo de inibição entre 13 a 16 mm;
- **Alta (+++):** diâmetro do halo de inibição superior a 17 mm.
 - **Negativo (-):** ausência de halo;

As frações em clorofórmio e acetato de etila apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, apresentando halos de inibição entre 20 e 25 mm. O tamanho do halo de inibição de 25mm, obtido encontra-se dentro dos padrões já descritos pela literatura. Al-Zahrani (2007) e colaboradores estudaram *Streptomyces* sp., isolado de Jazan frente a *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, e obtiveram halos de inibição de 26mm e 25mm.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é responsável por muitas infecções hospitalares, comunitárias e intoxicações, além de algumas doenças de importância veterinária. Sua

virulência deve-se à atuação das exotoxinas e enterotoxinas, além de essa infecção induzir a ativação aberrante das células T, suprimindo a resposta imune (MORK et al., 2010).

Resultados obtidos por Sahim e Ugur (2003), assemelham-se aos resultados obtidos neste trabalho, já que classificaram isolados de *Streptomyces* como moderadamente ativo frente à *Staphylococcus xylosus* (MU29), *S. epidermidis* (UM 30), *S. aureus* (ATCC 6538/P) e *S. aureus* (UM 38), os quais formaram zonas de inibição maiores que 20 mm. Mitra et al. (2011), ao estudarem 11 actinomicetos isolados de solo de estuário da ilha de Sagar, Índia, obtiveram uma atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (MTCC 96) de 11 a 23mm de zona de inibição, confirmando os resultados encontrados na literatura.

Diante desses resultados preliminares, a fr-Clo foi selecionada para dar continuidade ao processo de purificação e norteamto da substância ativa, pois apresentou o mesmo perfil cromatográfico e atividade biológica da fr-AcoEt, além de seu rendimento ter sido maior, 200 mg obtido da PLL.

5.4.2 Bioensaio de antibiose contra *M. smegmatis* – Difusão em Ágar/Disco

Pelo método de difusão em Agar, conforme item 4.7.1, pôde ser constatado a atividade antimicobacteriana do caldo de fermentação do *Streptomyces* em estudo e da fração em clorofórmio frente à bactéria indicadora *M. smegmatis* (Figura 30 A e B).

Mycobacterium smegmatis é um ótimo modelo de estudo para outras espécies de *Mycobactérias*. *M. smegmatis* não é patogênica, seu crescimento é rápido, além de compartilhar várias características importantes da *Mycobacteria tuberculosis*, como por exemplo, mesmas características de estrutura da parede celular (GARY, 2003).

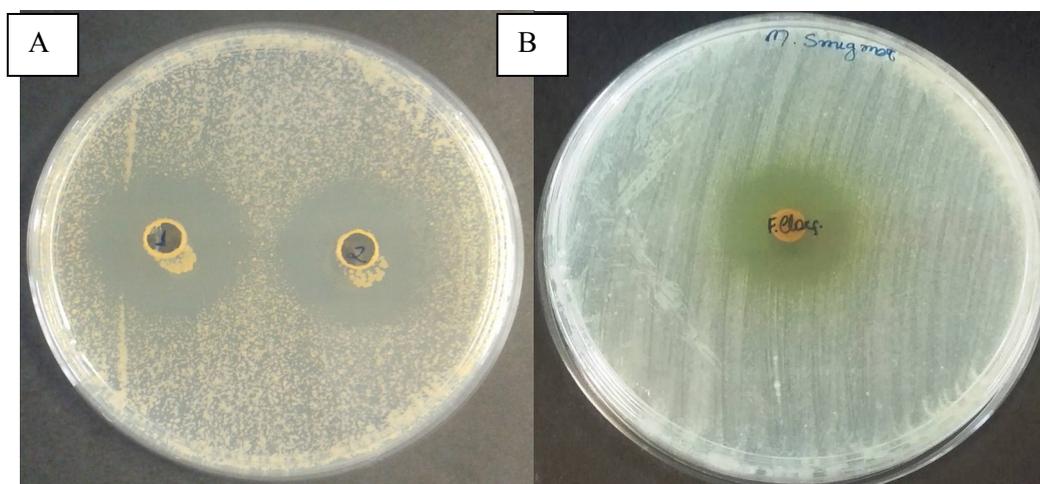


Figura 30 - (A) Antibiose em Ágar do caldo de fermentação do *Streptomyces*; (B) Antibiose em Agar disco da fração em Clorofórmio frente à bactéria *M. smegmatis*

5.4.3 Bioensaio de Anibiose contra *M. tuberculosis*

As Fr- Hexano e Fr- Clorofórmio foram utilizadas para a determinação da sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a *Mycobacterium tuberculosis*. O resultado de atividade inibitória pela técnica do Alamar Blue é constatado quando, após a reação de oxidação, o desenvolvimento micobacteriano é detectado pela coloração rósea e, ao contrário, a ausência de desenvolvimento bacteriano é detectada pela coloração azul. Assim, não foi detectada atividade antimicobacteriana no extrato em Hexano (Coluna 3 a 10, fileiras B, C e D).

No entanto, foi detectada atividade antimicobacteriana positiva na fração em clorofórmio nas concentrações de 512 a 4 ug/mL, já que o corante AlamarBlue permaneceu azul. (Figura 31).

A fração em Clorofórmio possui uma coloração alaranjada que modificou a princípio a cor do Alamar Blue nas concentrações maiores (controle do extrato, 512 e 256 ug/mL) (Figura 31). Porém, a cor do extrato não interferiu mais à medida que foi diluído no bioensaio. No poço G6 provavelmente ocorreu uma contaminação isolada.

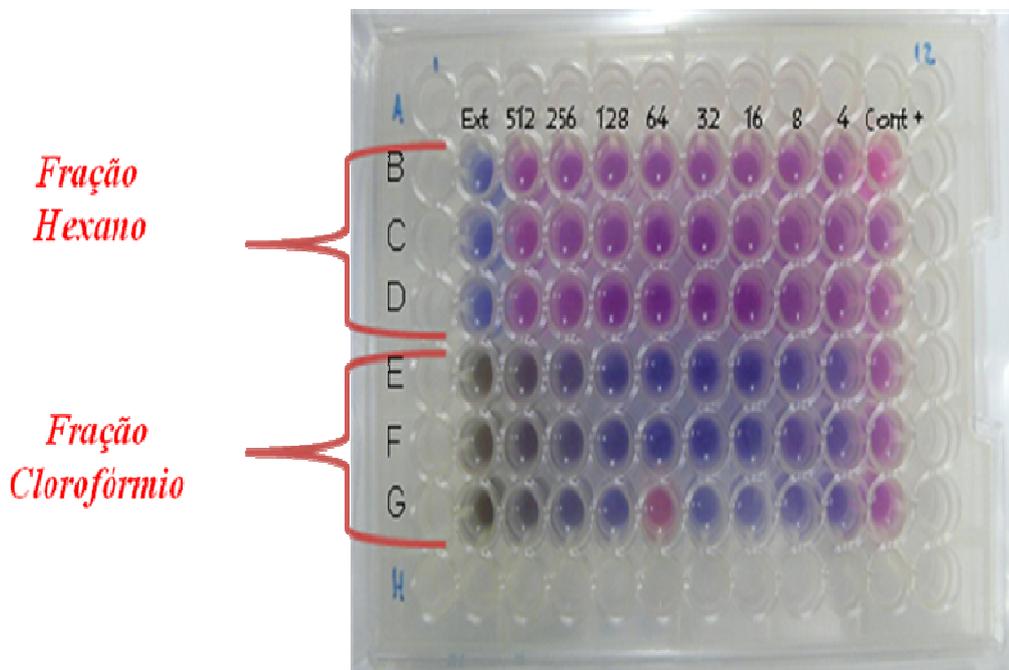


Figura 31. Bioensaio pela técnica de Alamar Blue, para verificação da ação inibitória do *M. tuberculosis* pela fração em hexano e clorofórmio.

Gu et al. (2004), considera como promissores aqueles resultados que apresentam valores de CIM $\leq 125\mu\text{g/mL}$.

Os valores de CIM para extratos e frações observados neste trabalho foram mais promissores dos obtidos por Prince (2008), que ao avaliar a atividade anti-micobacteriana de extratos de fungos endofíticos obteve valores entre 31,25 a 250 µg/mL.

Esse estudo abre perspectivas para a continuidade das análises, visando à descoberta de novos compostos antimicobacterianos.

5.4.4 Bioautografia da Fração em Clorofórmio e dos Compostos Isolados por CCD Preparativa

A bioautografia foi utilizada nas etapas iniciais do processo de purificação para nortear e determinar qual a região que apresentava atividade biológica e seu respectivo Rf. De acordo com a Figura 32, podemos observar que as substâncias que apresentavam atividade biológica correspondem aos Rfs 0,51 e 0,44. Para este ensaio foi utilizado como microrganismo indicador a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

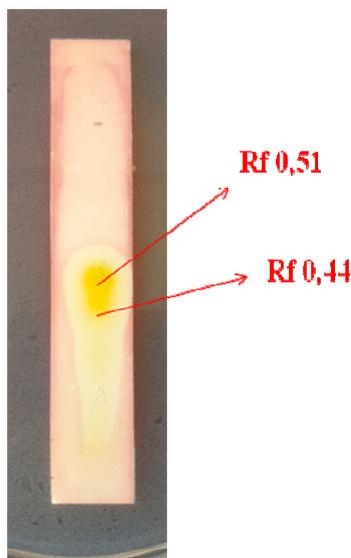


Figura 32 - Bioautografia da fração em Clorofórmio mostrando a região (Rfs 0,51 e 0,44) com atividade biológica.

As substâncias isoladas também foram submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia para confirmar sua bioatividade. Na Figura 33 está ilustrada a bioautografia dos dois compostos isolados por CCD preparativa (Clarina A e Clarina B). Para este ensaio foi utilizado como microrganismo indicador a bactéria *Staphylococcus aureus* MRSA. De acordo com as zonas de inibição formadas, foi possível confirmar que as duas substâncias isoladas continuaram ativas.

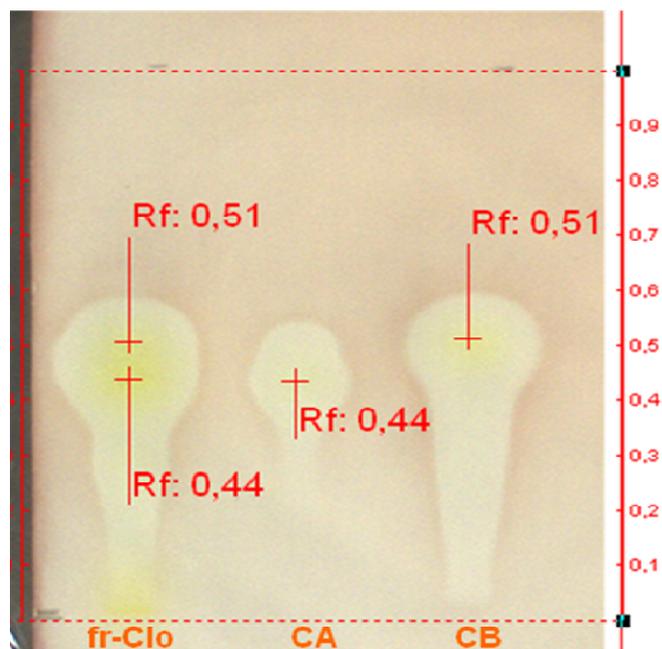


Figura 33. Bioautografia dos compostos isolados: Clarinas A (Rf 0,44) e Clarina B (Rf 0,51) frente a *Staphylococcus aureus* MRSA.

Infecções por bactérias resistentes aos medicamentos continuam a aumentar e ainda é uma grande ameaça para a saúde humana. O *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (também conhecido pela sigla MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é uma bactéria que se tornou resistente a vários antibióticos, primeiro a Penicilina em 1947, e logo depois à Metilina. Em 2007, nos EUA, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) informou que o número de infecções graves causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) estava perto de 100.000 por ano, com quase 19.000 mortes relacionadas. Atualmente está muito propagado, principalmente em ambientes hospitalares, onde devido à resistência crescente, o *Staphylococcus aureus* (estafilococo dourado) é chamado de super-bactéria (CDC, 2011).

5.5 Bioensaios das Substâncias Isoladas por HPLC

5.5.1 Antibiose - Difusão em Discos

As bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas no ensaio para atestar a atividade antimicrobiana dos compostos isolados por HPLC semi-preparativo, Clarina A e Clarina B. Visto que, as mesmas já tinham se mostrado sensíveis ao extrato bruto da qual essas frações foram obtidas. Após isolamento

das duas substâncias, é possível constatar que a atividade antimicrobiana permanece inalterada e apenas ativa para bactérias Gram positivas, pois no ensaio com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922, Gram negativa, as mesmas não obtiveram atividade. Esse resultado já tinha sido observado em resultados anteriores (Figura 34).

Estudos demonstram que isolados de *Streptomyces* apresentam maior atividade contra bactérias Gram positivas do que Gram negativas. González et al., (2005), avaliaram a atividade antimicrobiana de 337 isolados de actinobactérias e destas apenas 27% apresentaram alguma atividade, sendo que a atividade mais predominante foi contra bactérias Gram positivas (23%), contra *Candida albicans* (10,7%) e a menor atividade foi contra bactérias Gram negativas (6,5%).

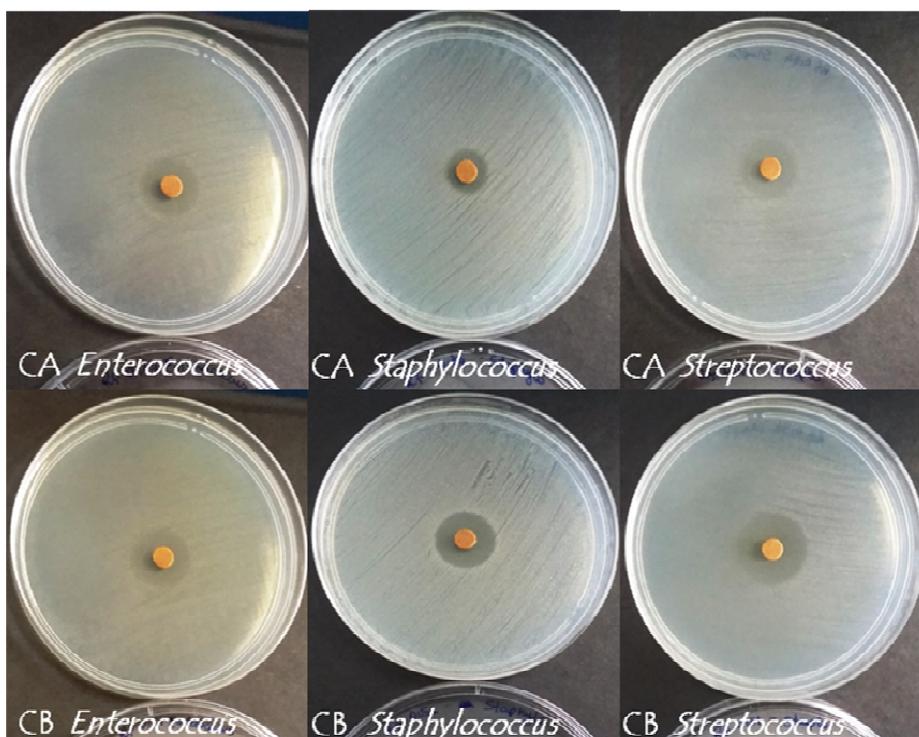


Figura 34. Bioensaio antibacteriano dos Compostos isolados: Clarina A e Clarina B – Método de Difusão em Discos

Em outro estudo com 86 isolados de actinobactérias (ZITOUNI *et al.*, 2005) todas apresentaram forte atividade contra bactérias Gram positivas, moderada contra leveduras e a atividade observada contra bactérias Gram negativas foi fraca a moderada e pouco frequente. Ainda, em outro estudo feito por León *et al.* (2010), durante a seleção preliminar realizada através do antibiograma frente a patógenos Gram positivos e Gram negativos (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella typhi*, *Aeromonas hydrophila*,

Pseudomonas aeruginosa, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* e *Micrococcus* sp.) os resultados também demonstraram que dos 102 isolados de bactérias da região entre-marés da praia de São Francisco no Peru, apenas 10 isolados de bactérias apresentaram halos de inibição, e que a maior inibição foi contra os patógenos Gram positivos.

No trabalho realizado por MELO (2009), dos 41 isolados de actinobactérias isoladas do solo que apresentaram atividade antimicrobiana, 56% inibiram bactérias Gram positivas, 49% inibiram bactérias Gram negativas e 71% apresentaram halos de inibição contra fungos. Este fato corrobora com o trabalho de AZUMA (2011), pois, a maioria dos isolados de sua pesquisa foi capaz de inibir bactérias Gram positivas (77%) e o fungo leveduriforme testado (87%).

5.5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) das Substâncias Isoladas pelo Método de Microdiluição em Microplaca

Os resultados de CIM para as substâncias isoladas foram avaliadas frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 23923 e *Mycobacterium smegmatis* (Figuras 35 e 36). A CIM frente a bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 23923 foi de 1 µg/ml para a substância Clarina A e 0,5 µg/ml para a substância Clarina B (Figura 35).

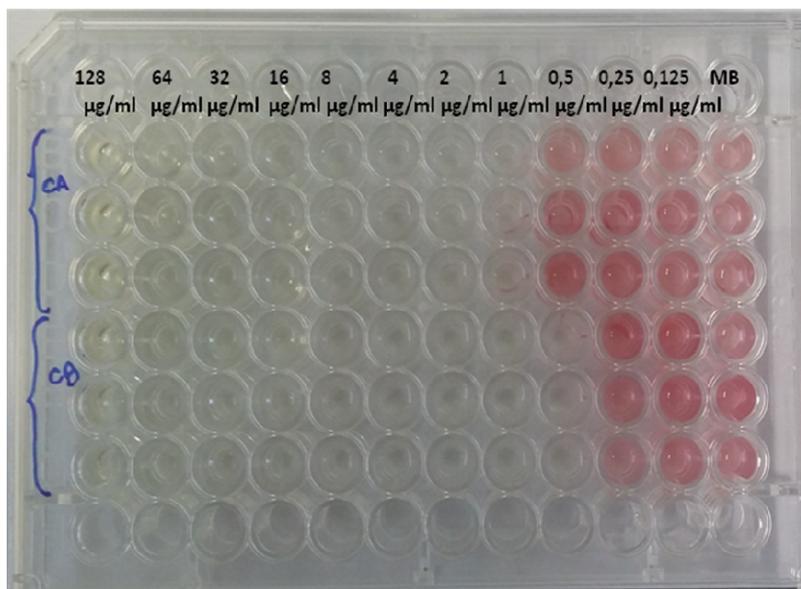


Figura 35. Concentração Inibitória Mínima de antagonismo a *Staphylococcus aureus* ATCC 23923 da Clarina A e Clarina B.

Rhaman et al., 2010, obteve resultados similares onde um polipeptídeo isolado de *Streptomyces parvulus* obteve uma CIM frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 259233 de 2

$\mu\text{g/ml}$. Igualmente Sajid et al., 2011 obtiveram valores de CIM para a actinomicina D isolada de *Streptomyces griseoincarnatus* de $4 \mu\text{g/ml}$.

A CIM frente à *Mycobacterium smegmatis* foi de $16 \mu\text{g/ml}$ tanto pra Clarina A quanto para Clarina B (Figura 36).

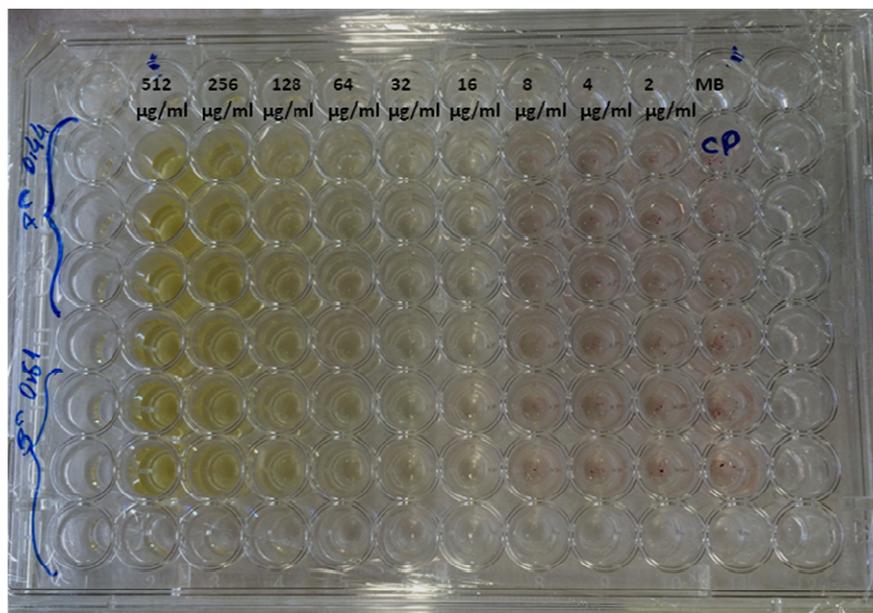


Figura 36. Concentração Inibitória Mínima de antagonismo a *M. smegmatis* da Clarina A (Rf 0,44) e B (Rf 0,51).

Através deste ensaio foi possível determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos isolados, confirmando o seu potencial como um agente antimicrobiano.

Singh et al, 2014, isolaram um metabólito de cor marrom escuro, obtido de *Streptomyces yunnanensis* SU 118. Esse composto foi extraído em acetato de etila e isolado por CCD, onde foi obtido a fração ativa com Rf 0,56. Essa fração foi ativa contra todas as bactérias Gram positivas testadas. O metabólito foi mais ativo frente a *S. aureus* MTCC 96 com MIC de $0,5 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o MIC registrado frente a *M. smegmatis* foi de $3,0 \mu\text{g/mL}$.

Valores de CIM próximos aos observados no presente trabalho foram obtidos por Prince (2008), que ao avaliar a atividade anti-micobacteriana de extratos de fungos endofíticos obteve valores entre $31,25$ a $250 \mu\text{g/mL}$. Os fármacos utilizados na terapêutica da TB apresentam CIM variáveis de $0,03 \mu\text{g/mL}$ (isoniazida) a $50 \mu\text{g/mL}$ (pirazinamida).

Os resultados obtidos também estão de acordo com os encontrados por Sharma et al., (2014), que isolaram um novo lipopeptídeo produzido por *Streptomyces amritsarensis* com

CIM de 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ frente a *Mycobacterium smegmatis* (MTCC 6) e ainda não apresentou citotoxicidade.

Praveen e Tripathi 2009, isolaram a partir do *Streptomyces griseoruber*, uma substância chamada actinomicina D, e obtiveram resultados expressivos frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *M. tuberculosis* com valores de CIM de 0,75 e 0,78 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectivamente.

5.5.3 Avaliação da Atividade Citotóxica

Os resultados obtidos mostraram que as substâncias Clarina A e B não apresentaram citotoxicidade importante na faixa de concentrações testadas (0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para as células 3T3-L1 após 24h de incubação. Não houve diferença estatística significativa na viabilidade celular quando comparado aos tratamentos realizados com o controle negativo, onde a viabilidade celular foi maior que 80% (Figura 37). Não houve diferença significativa na viabilidade celular, quando comparamos os tempos de 48 e 72h de incubação.

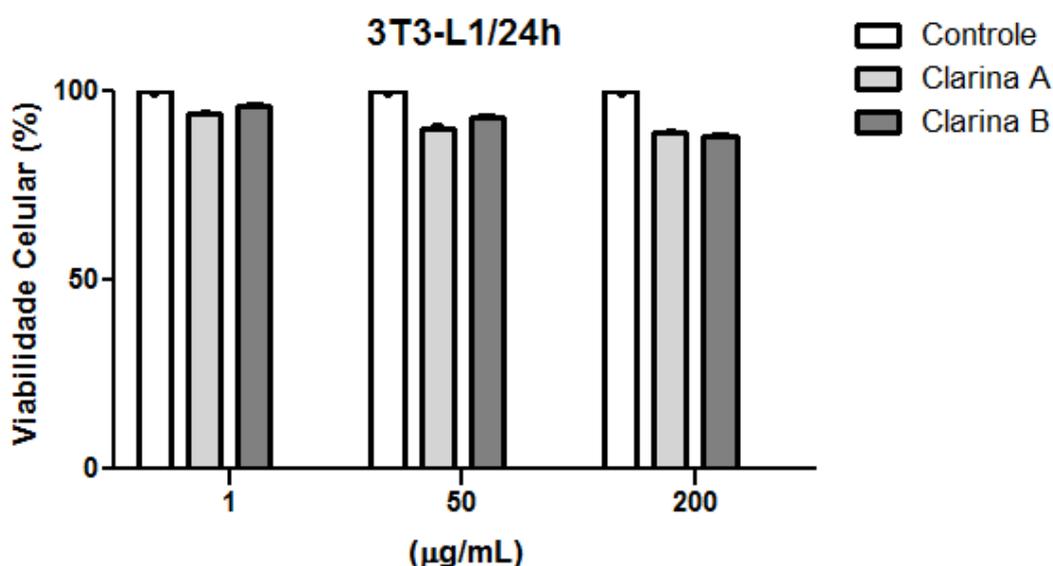


Figura 37. Efeito citotóxico das substâncias Clarina (A) e Clarina (B) nas diferentes concentrações testadas (1-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 24 h de incubação sobre a viabilidade das células 3T3-L1.

Para os tratamentos com as células MCF-7 (linhagem tumoral), os resultados obtidos mostraram redução na viabilidade celular após 72h de tratamento.

A substância Clarina A apresentou efeito citotóxico tempo-dependente, com efeito citotóxico em 24h de 15% e 40% em 72h na maior concentração testada (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para a substância Clarina B, não houve diferença no seu efeito citotóxico, não ultrapassando 15 % de

citotoxicidade na maior concentração testada (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 72h de incubação (Figura 38 e 39).

A Figura 38 e 39 representa graficamente o perfil antiproliferativo das substâncias Clarina A e B frente à linhagem MCF-7 nos períodos de 24 e 72 horas, respectivamente.

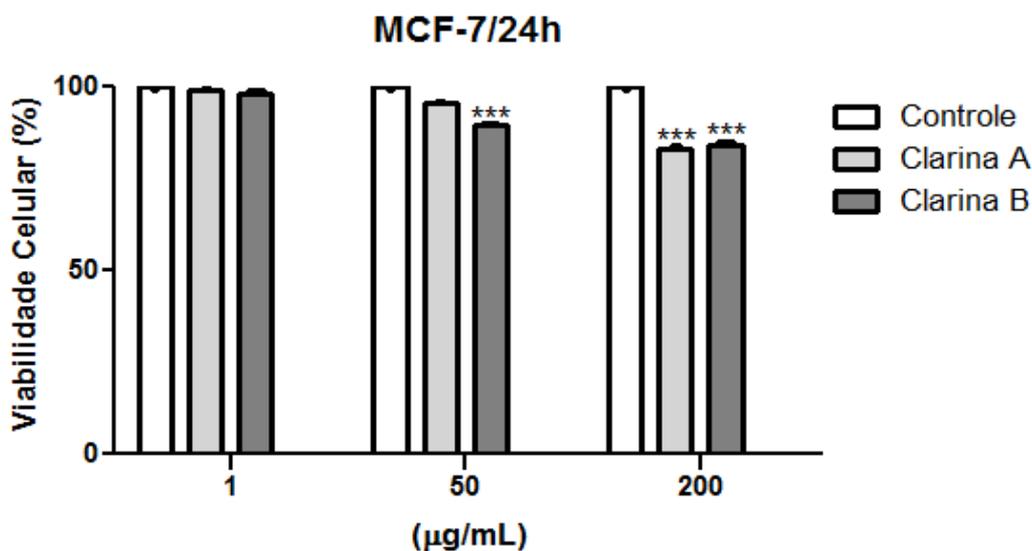


Figura 38. Efeito dos tratamentos com as substâncias Clarina A e B nas concentrações de 1 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7.

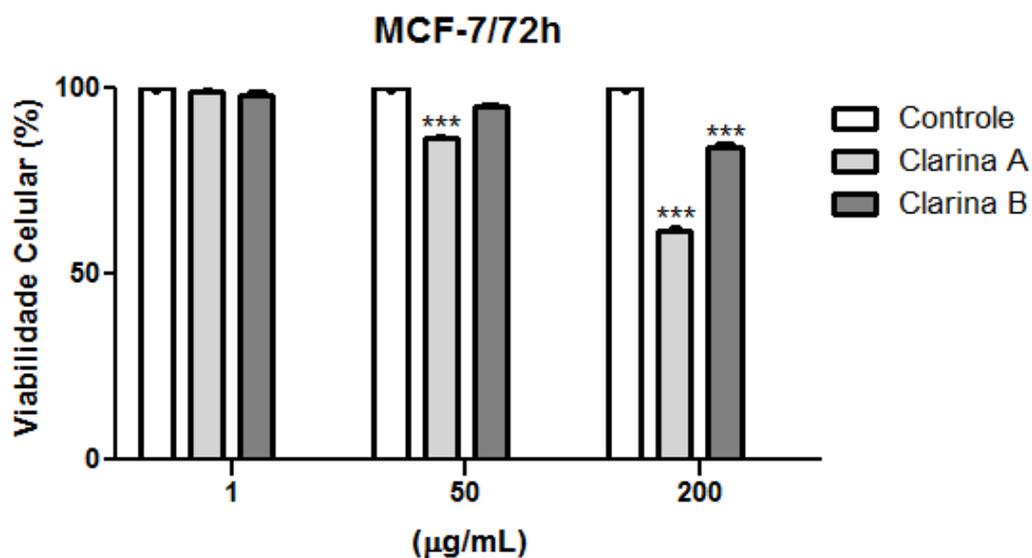


Figura 39. Efeito dos tratamentos com as substâncias Clarina A e B nas concentrações de 1 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (72 h de incubação) sobre a viabilidade das células MCF-7.

A concentração da citotoxicidade de extratos, compostos isolados ou associação de compostos pode ser determinada através de diversos critérios, e um dos mais aceitos, é a determinação do seu valor de CC50. De acordo com SUFFINES & PEZZUTO (1990), um dos critérios mais aceitos na avaliação citotóxica frente a um composto ou mistura de

compostos, é que, para ser considerado biologicamente ativo este deve apresentar a capacidade de induzir citotoxicidade com valores de CC50 inferiores a 200 µg/mL. Tomando este dado como parâmetro para classificação de citotoxicidade podemos inferir que a substância Clarina A, apresentou citotoxicidade importante para a linhagem tumoral MCF-7, uma vez que os ensaios de citotoxicidade pelo método do MTT indicou uma toxicidade de 40 % na concentração de 200 µg/mL em 72 h (Figura 39).

Outras linhagens tumorais e condições diferentes podem ser testadas futuramente para confirmar a atividade antitumoral das substâncias.

5.6 Caracterização das Substâncias Bioativas

5.6.1 Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização por “eletrospray” (ESI-MS)

Após os ensaios biológicos iniciais, a fração em clorofórmio e as substâncias isoladas por CCD preparativa, Clarina A e B foram analisadas por espectrometria de massas de baixa resolução, em modo *full scan*, por inserção direta, no qual foi utilizada a fonte de ionização de eletrospray (ESI) para a determinação do perfil químico. As aquisições foram realizadas no modo positivo. O objetivo desta etapa foi determinar através de uma ferramenta rápida e abrangente as massas moleculares dos metabólitos secundários produzidos pelo *Streptomyces* em estudo, com o intuito de realizar uma comparação entre os perfis químicos e a diversidade metabólica desse extrato.

Durante a ionização por “electrospray” três tipos de produtos podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas ($[M+H]^+$) /desprotonadas ($[M-H]^-$) e moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, ou anionizadas $[M+Cl]^-$ etc).

Os valores de m/z em modo positivo encontrados nos espectros de massas da fração em clorofórmio e das substâncias isoladas por CCD foram comparados com dados da literatura (Figuras 40 e 41).

De acordo com os sinais de massas encontrados no espectro da fração em clorofórmio, foi possível observar uma diversidade de compostos, destacando os picos de m/z 1278 e 1292 como majoritários com uma diferença de 14 Da entre os sinais. Essa diferença pode sugerir uma série homóloga (CH_2), não sendo possível identificar se as substâncias estão protonadas ou desprotonadas (Figura 40).

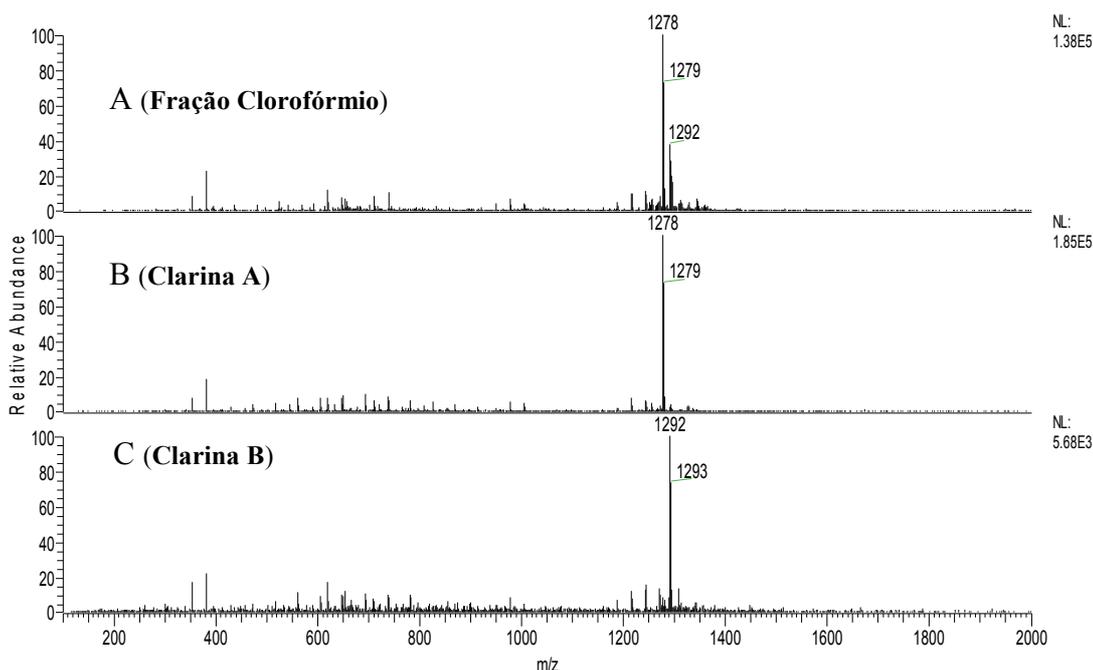


Figura 40. Espectro de ESI-MS (modo positivo) em modo *full scan* da fração clorofórmio (A), Clarina A (B) e Clarina B (C) isolados por CCD.

Ainda analisando os espectros da Figura 40, é possível observar as substâncias isoladas, Clarina A e Clarina B com suas respectivas m/z 1278 e 1292.

Os espectros de ESI+ foram analisados para que de acordo com a diferença m/z entre os sinais detectados, pudessem ser determinadas as espécies iônicas encontradas, ou seja se correspondiam a moléculas protonadas, desprotonadas ou até coordenadas com cátions como Na^+ , K^+ e NH_4^+ .

As substâncias isoladas por CCD preparativa foram novamente submetidas à análise de espectrometria de massas de baixa resolução em modo positivo, com fonte de *electrospray* (ESI-MS²) com fragmentação dos íons da molécula (Figura 41).

As análises de fragmentação também sugerem que as duas substâncias são semelhantes com perdas de 113 Da (Figura 41). Esse tipo de fragmentação também sugere se tratar de peptídeos ou lipopeptídeos, pois essas perdas podem fornecer a composição dos aminoácidos do peptídeo. No entanto, é importante ter em mente que se o íon para um determinado aminoácido não estiver presente, isso não significa que o aminoácido está ausente da seqüência. Seguindo a mesma linha de raciocínio, a presença de um íon com massa correspondente com algum íon que determina a presença de algum aminoácido, não significa necessariamente a presença deste. Tal íon pode corresponder, por exemplo, ao um íon-

fragmento oriundo de rearranjo sofrido pelo peptídeo que por coincidência possui valor de massa igual à de um determinado aminoácido (CANTÚ et al., 2008).

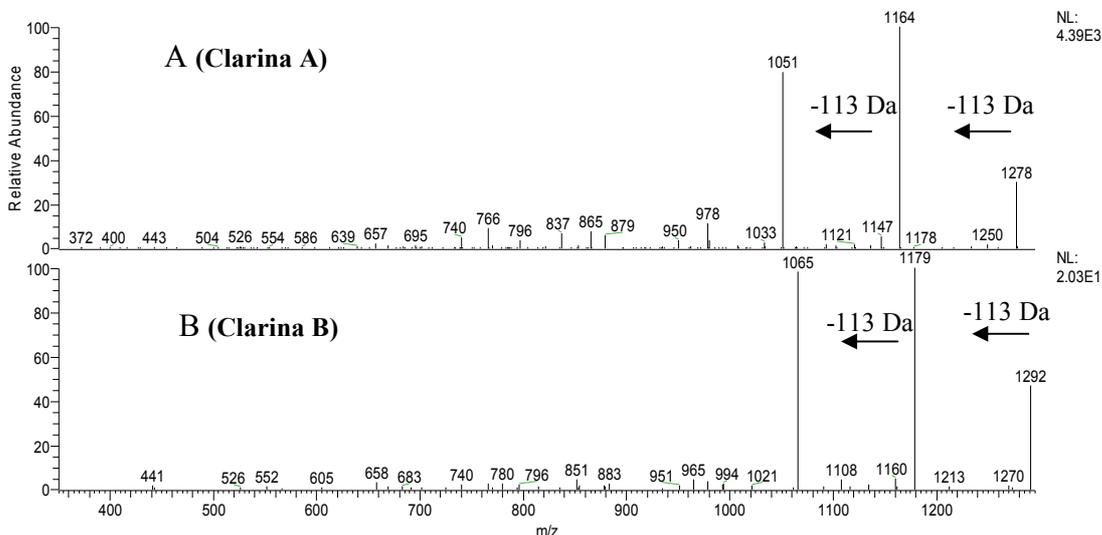


Figura 41. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) dos íons de m/z 1278 (A) e 1292 (B) presentes na fração clorofórmio.

5.6.2 Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Química (APCI-MS)

Após o isolamento por HPLC-DAD-MS as substâncias foram submetidas à espectrometria de massas com fonte de ionização química (APCI) em modo positivo e negativo. No modo de detecção por APCI, as substâncias não formam adutos, como por exemplo com o sódio (Na⁺), elas podem aparecer protonadas $[M+H]^+$ ou desprotonadas $[M+H]^-$.

Nas figuras 42 e 43 os espectros por APCI mostram as regiões A e D que correspondem a regiões de coeluição da fração em clorofórmio, onde observa-se uma mistura de compostos, e as regiões B e C observa-se apenas as substâncias de interesse. Os espectros (C), das figuras 42 e 43 com m/z de 1256, modo positivo e m/z 1255 modo negativo corresponde à substância chamada primeiramente de Clarina A. O espectro (B), das figuras 42 e 43 com m/z de 1270, modo positivo e m/z 1269 modo negativo corresponde à substância chamada primeiramente de Clarina B. As substâncias aparecem protonadas $[M+H]^+$ e desprotonadas $[M-H]^-$.

Praveen e Tripathi, 2008, também obtiveram à partir do gênero *Streptomyces* uma substância caracterizada como Acinomicina D. Que de acordo com os espectros de ESI-MS mostrou um íon intenso de m/z 1277,9 (M + Na⁺) e revelou que o peso molecular do

composto deve ser 1255 que coincide com uma das substâncias em estudo, Clarina A. Essa substância produziu um pigmento colorido, fracamente solúvel em água e de natureza anfotérico devido presença de grupos fenólicos e açúcares aminados básicos.

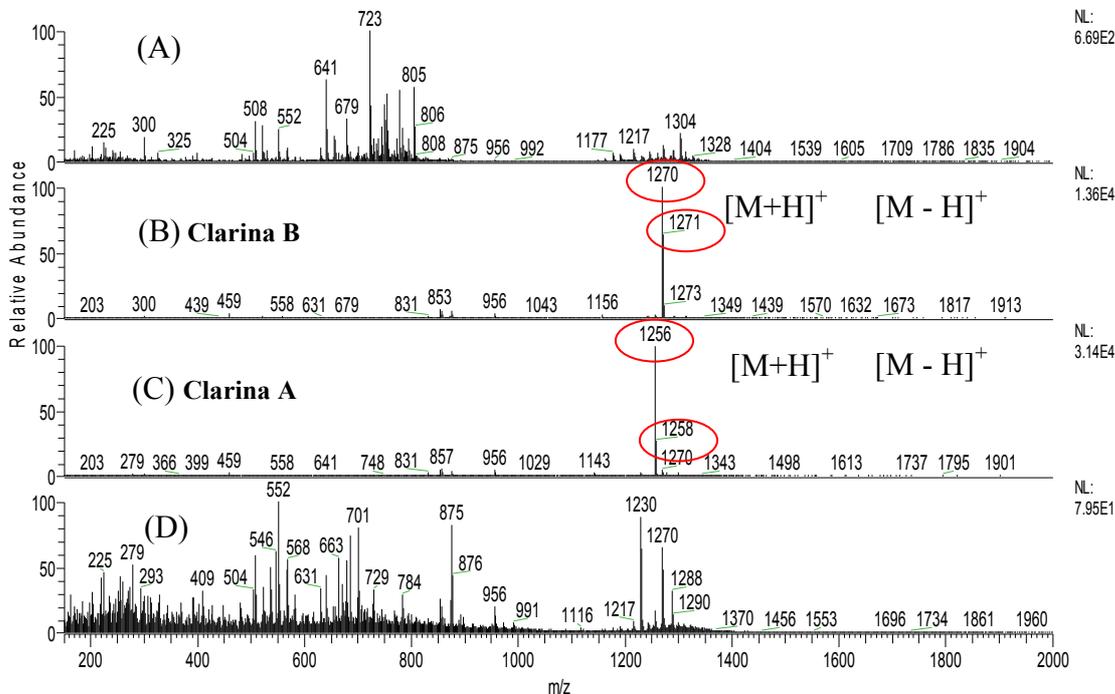


Figura 42. Espectro de APCI-MS (modo positivo) dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio.

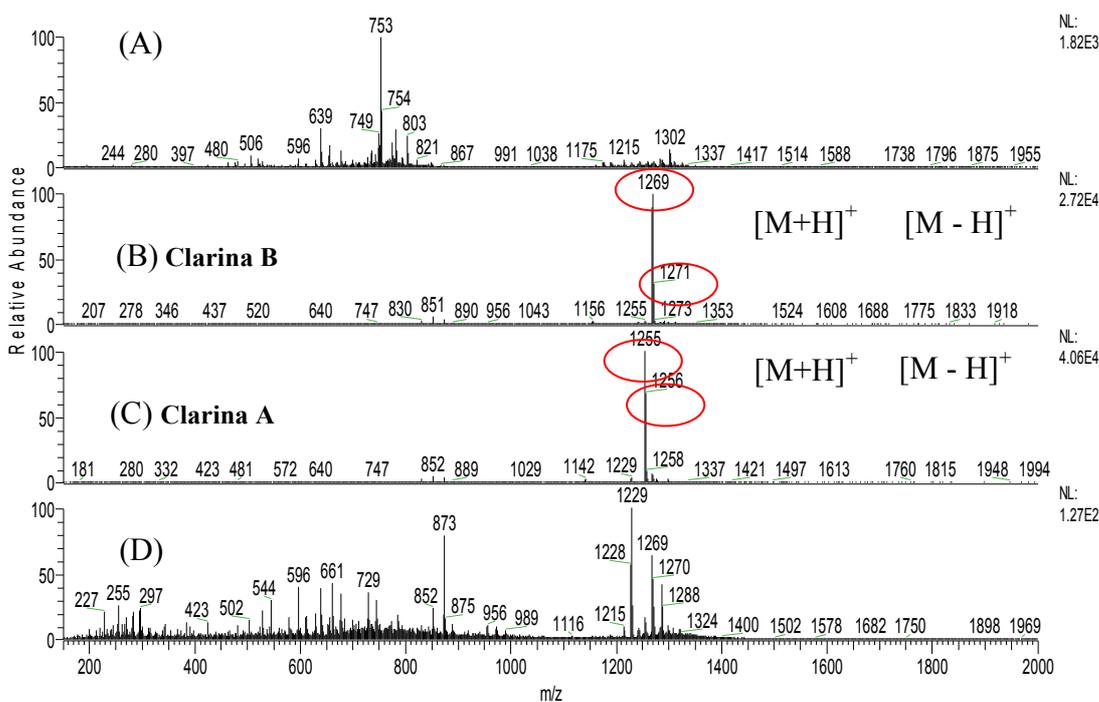


Figura 43. Espectro de APCI-MS (modo negativo) dos picos cromatográficos de interesse (B e C) e regiões de co-eluição (A e D) da fração clorofórmio.

As substâncias Clarina A e B isoladas por DAD-MS foram processadas por ESI-MS em modo positivo.

Os espectros de ESI-MS no modo positivo mostram claramente as duas substâncias isoladas em seu estado protonado $[M+H]^+$ e com aduto de sódio $[M+Na]^+$. Clarina A com m/z 1256 $[M+H]^+$ e 1278 $[M+Na]^+$, Clarina B com m/z 1270 $[M+H]^+$ e 1292 $[M+Na]^+$ (Figura 44).

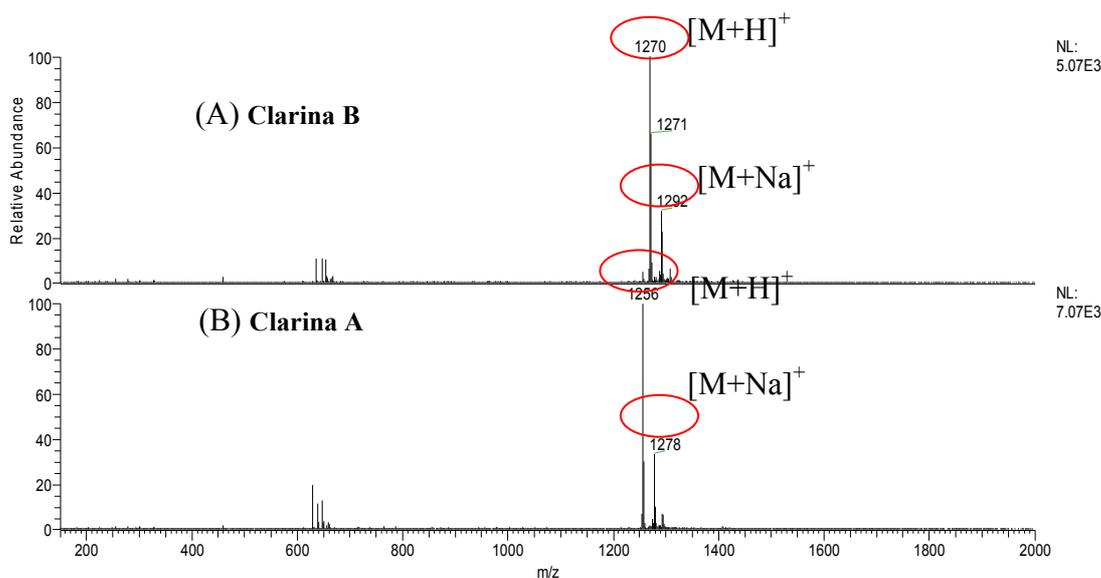


Figura 44. Espectro de ESI-MS (modo positivo) dos picos cromatográficos de interesse (A e B).

5.6.3 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-HRMSMS)

As substâncias Clarina A e B, obtida a partir do isolamento por HPLC- preparativo da fração em clorofórmio, foram submetida à espectrometria de massas de alta resolução com fonte de *electrospray* em modo positivo, onde foi possível confirmar suas m/z como 1292 e 1278 $[M+Na]^+$ respectivamente (Figura 45 e 46).

Com base nos sinais de m/z obtidos nos espectros de ESI, assim como o de massa de alta resolução e de acordo com a fonte biológica, foi realizado então uma busca na literatura, comparando os resultados obtidos com as possibilidades sugeridas.

Foi então identificada, a possível presença de uma substância chamada actinomicina D, um potente antibiótico produzido por algumas espécies do gênero *Streptomyces*, como por exemplo, *Streptomyces chrysomallus* e *Streptomyces antibioticus*.

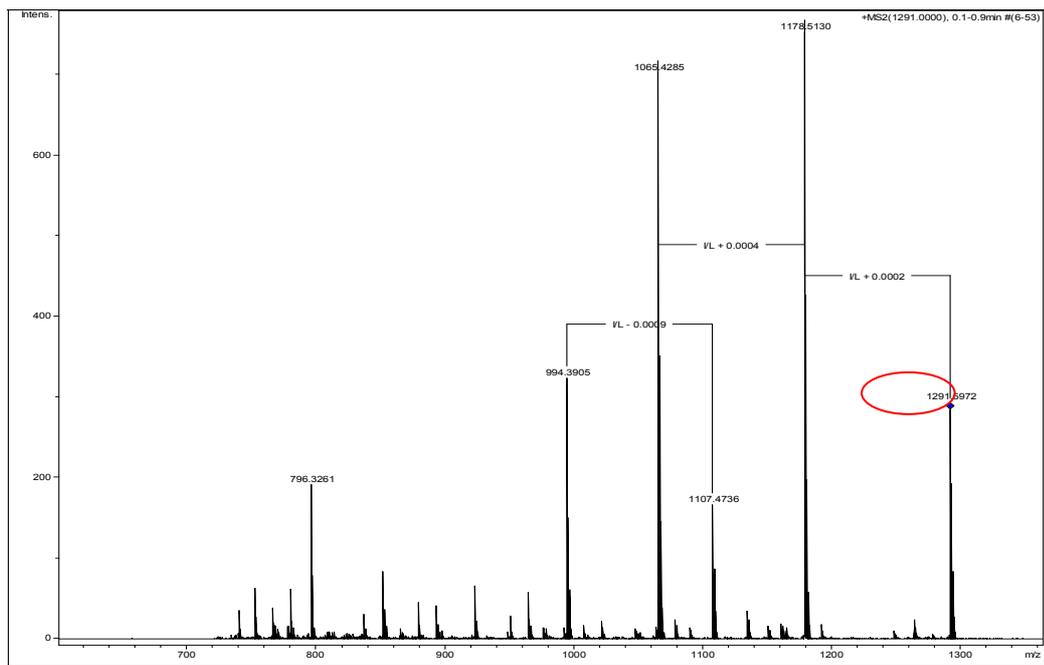


Figura 45. Espectro de ESI-HRMSMS (modo positivo) do íon de m/z 1291.5972 presente na amostra A, obtida a partir do fracionamento por HPLC-preparativo da fração clorofórmio.

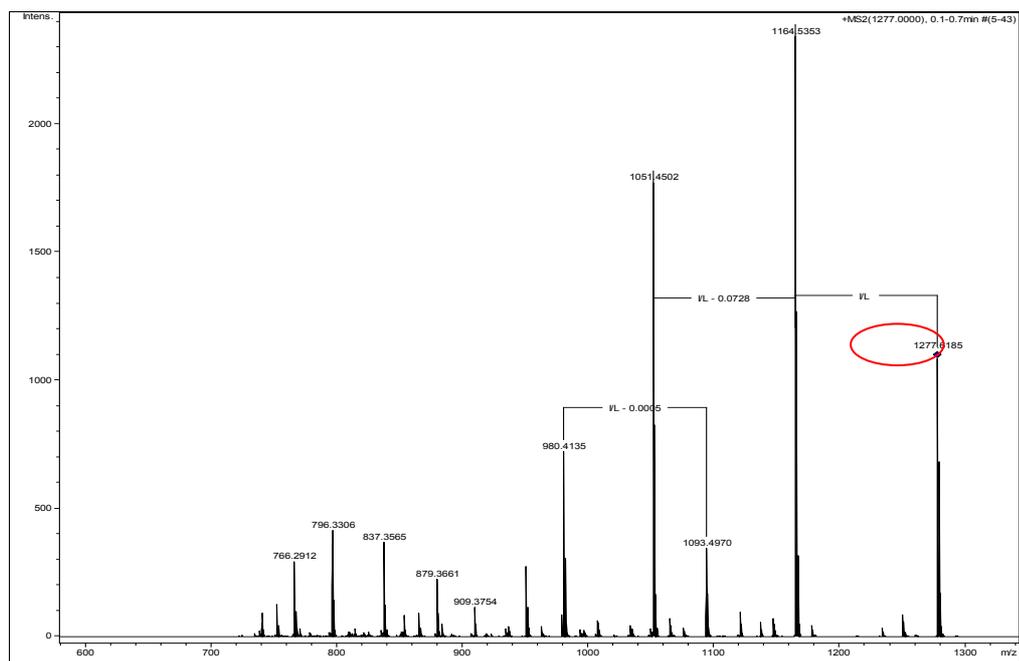


Figura 46. Espectro de ESI-HRMSMS (modo positivo) do íon de m/z 1277.6185 presente na amostra B, obtida a partir do fracionamento por HPLC-preparativo da fração clorofórmio.

5.6.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear - NMR

As substâncias também foram submetidas a análises de RMN para auxiliar na elucidação da estrutura das substâncias em estudo (Figura 47).

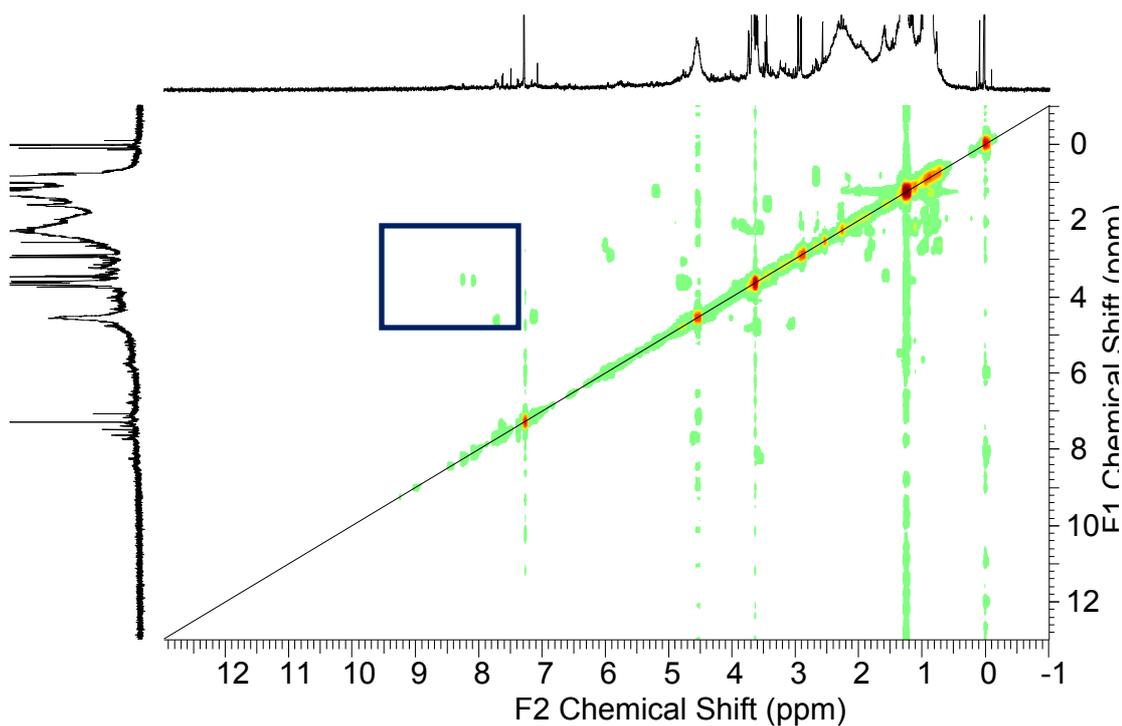


Figura 47. Espectro de COSY (^1H 600 MHz, CDCl_3) da substância Clarina A.

Os acoplamentos obtidos entre 7 e 9 ppm no espectro de COSY da substância Clarina A, também confirmam a presença de estruturas aromáticas, como por exemplo aminoácidos, presentes nas actinomicinas (Figura 48).

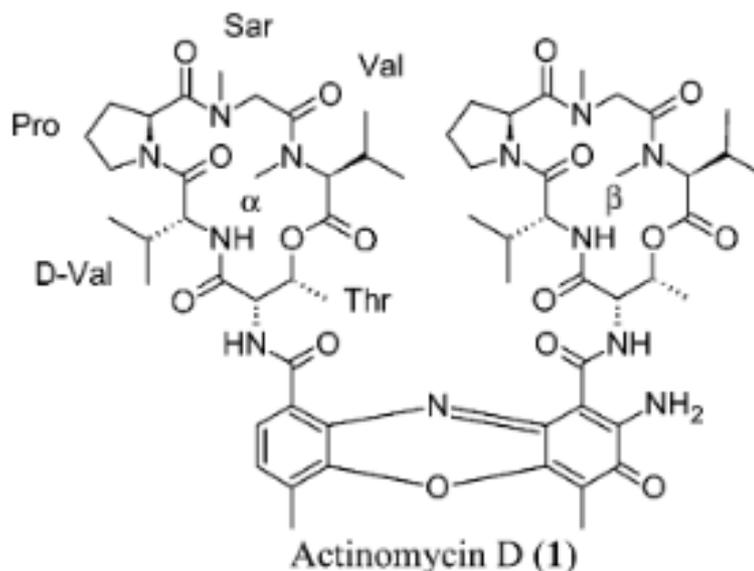


Figura 48. Estrutura da Actinomicina D

Actinomicina D foi identificada como sendo a substância chamada primeiramente de Clarina A, com peso molecular de m/z 1255, 1256 $[\text{M}+\text{H}]$ e 1278 $[\text{M}+\text{Na}]$ que corresponde a fórmula molecular $\text{C}_{62}\text{H}_{86}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$. A outra substância identificada primeiramente como

Clarina B corresponde a um análogo da actinomicina D, conhecida como actinomicina X₂, com peso molecular m/z 1269, 1270 (M+H) e 1292 (M+Na) (AJIJUR et al . , 2010; CHEN et al, 2012; SHETTY et al, 2013).

Vários relatos na literatura reportam a produção de actinomicinas por várias espécies de *Streptomyces*, Lackner et al., 2000, isolaram um complexo de actinomicinas Z a partir de *Streptomyces fradiae*. O complexo de actinomicina Z foi isolado pela primeira vez em 1958 de *Streptomyces fradiae* ETH-20675 e verificou-se conter seis componentes denominados actinomicinas Z0 a Z5.

Segundo, Kurosawa et al., 2006 a estirpe MITKK-103, caracterizada filogeneticamente como membro da espécie *S. padunus*, é capaz de produzir uma grande quantidade de actinomicina X₂, mesmo sob condições não otimizadas de crescimento, permitindo novos estudos sobre essa substância.

O antibiótico produzido por *Streptomyces parvulus* RSPSN2 ativo contra várias bacterias, incluindo bactérias resistentes à estreptomicina como (*Pseudomonas mirabilis*, *Pseudomonas putida* e de *Bacillus cereus*) foi extraído e purificado utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em coluna (CC). Foram realizados estudos de espectrometria de massas, UV-visível e RMN. Os dados encontrados na literatura apontam esse metabólito como sendo um antibiótico polipeptídeo (actinomicina D) que é produzido por *Streptomyces parvulus* (SHETTY, 2013).

Rahman, et al., 2010 e colaboradores, também identificaram a produção de Actinomicina D por *Streptomyces parvulus*, através da comparação de análises espectrométricas com as encontradas na literatura, onde o espectro de massas apresentou m/z 1257 [M+H] e peso molecular C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆.

Foram isolado à partir do solo do Sudão, dois isolados identificados como *Streptomyces* spp., capazes de produzir actinomicina D com m/z 1255 e actinomicina X₂ com m/z 1269. Essas cepas são distintas dos conhecidos produtores de actinomicinas, portanto, são novas fontes desses antibióticos (HAMZA et al., 2014; HAMZA et al., 2013).

A cepa de *S. griseoincarnatus* foi relatada pela primeira vez como capaz de produzir três compostos bioativos simultaneamente, resistomycin, tetracenomicina D e actinomicina D, mesmo em condições não otimizadas (SAJID et al., 2011). Uma cepa também nunca relatada como produtora de actinomicina foi identificada como *S. avermitili*, que foi capaz de produzir quantidades mais elevadas de actinomicinas X₂ (1,92 mg / ml) e actinomicina D (1,77 mg /

ml) do que as cepas previamente descritas como produtoras. Sendo considerada com grande potencial para a produção industrial de actinomicinas (CHEN et al., 2012).

O lipopeptídeo produzido por *Streptomyces amritsarensis* foi purificado usando cromatografia em sílica gel, cromatografia de exclusão de tamanho e de fase reversa HPLC. A análise por MS / MS do lipopeptídeo revelou que tem a sequência de aminoácidos tal como Ala-Thr-Gli-Ser-His-Gln e uma cauda de ácidos graxos de cadeia longa com massa molecular de 161 Da, que é correspondente à -C₁₂H₁₉. Com base na massa molecular (878,5 Da) e composição de aminoácidos, o lipopeptídeo foi identificado como um novo lipopéptido. Os valores de MIC contra *Bacillus subtilis* (MTCC 619), *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 435), *Mycobacterium smegmatis* (MTCC 6) e a estirpe clínica, resistente à metilina *Staphylococcus aureus* (MRSA), foram encontradas como sendo de 10, 15, 25 e 45 µg / ml, respectivamente. Verificou-se também, não ser mutagénica contra *Salmonella typhimurium* (TA98) e não mostrou citotoxicidade quando confrontados com linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO) (SHARMA et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

Dois compostos bioativos foram isolados a partir do caldo de cultura do isolado *Streptomyces* sp. CBA 61.

Com base em espectrometria de massa (ESI - MS), análises RMN - COSY e uma pesquisa na literatura, os compostos purificados foram identificados como actinomicina D, com peso molecular de m/z 1255, que corresponde a fórmula molecular $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$, e um análogo actinomicina X₂, com peso molecular m/z 1269, ambas possuem atividade antimicrobiana e antituberculicida estabelecidos.

As substâncias actinomicina D (Clarina A) e X₂ (Clarina B) não apresentaram efeito citotóxico para as células não tumorais 3T3-L1, onde a viabilidade celular foi maior que 80%. No entanto para os ensaios com a linhagem tumoral MCF-7, actinomicina D obteve uma citotoxicidade de 40% na concentração de 200 µg/mL em 72h.

Pode-se inferir a partir do estudo que o isolado *Streptomyces* sp. é uma fonte potencial de agentes antimicrobianos e pode ser empregado para a produção simultânea destes compostos industrialmente importantes .

O estudo revela, ainda, que os solos de onde foram isolados são nichos ecológicos promissores que podem conter várias outras estirpes de *Streptomyces*, e devem, portanto, ser continuamente explorados para o isolamento de compostos antimicrobianos e antitumorais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEY, M. C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, n.48, p. 589-601, 1988.

ALENCAR, S.M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALVAN, G.; EDLUND, C.; HEDDINI, A. The global need for effective antibiotics – a summary for plenary presentatios. **Drug Resistance Update**, v. 14, p. 70-76, 2011.

AL-ZAHRAMI, S.H.M. Studies on antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Jazan, **JKAU: Scielo**, v.19, p.127-138, 2007.

ANDERSON, A.S.; WELLINGTON, E.H.M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 797, 2001.

ARAÚJO, J. M. Estratégias para o isolamento de actinomicetos. In: Melo, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA. P. 351-367. 1998.

AHMAD, L.; AQIL, F. In vitro e efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESbL- producing multidrug-resistant enteric bacteria. **Microbiological Research**, v. 162, n.1, p. 264-275, 2007.

AJIJUR, R.M.D. et al. Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**. v. 13, p. 14–16. 2010.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red própolis and their preferential cytotoxic activity againt human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medical Chemistry**, Berlin, v. 16, p. 181-189, 2008.

AZUMA, M.V.P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da ilha do mel, PR, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Ferederal do Paraná, Paraná.

BAINDARA, P. et al. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK. DU. 4 isolated from a rhizosphere soil sample. **AMB Express**. v. 3, n. 2, p. 1–11, 2013.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1966.

BENTLEY, S.D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, v. 417, 2002.

BICAS, J.L.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of Terpenes: An Approach for the Flavor Industry. **Chemical Reviews**, v.109, n. 9, p. 4518–4531, 2009.

BITZER, J.; GESHEVA, V.; ZEECK, A. Actinomycins with Altered Threonine Units in the α -Peptidolactone. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1153-1157, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2004. II Diretrizes Brasileiras para a Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30: supl 1.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; SASS P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. **Future Microbiology**. v. 5, n. 10, p. 1553-1579, 2010.

BUNYAPAIBOONSRI, T. et al. Tetrahydroxanthones policíclicos de *Streptomyces chrestomyceticus* BCC 24770. **National Science and Technology Development Agency (NSTDA)**, 2015.

BOLOGNESE, A. et al. Antitumor agents. 1. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of 5H-pyrido[3,2-a]phenoxazin-5-one, a compound with potent antiproliferative activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 5205–5216, 2002.

BOSSI, R. et al. Metabolic products from actinomycetes. XIV. Actinomycin Z. **Helvetica Chimica Acta**. v. 41, p. 1645–1652, 1958.

CANTÚ, M. D. et al. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**. v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. M. **Cromatografia líquida: novas tendências e aplicações**. São Carlos: Campus, 2015.

CASTILLO, U. F. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2675-2685, 2002.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Definition of MRSA. Online Source. Site acessado em 03 de março de 2016. <http://www.cdc.gov>.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAROENSOPHARAT, K. et al. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No 87. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 1362-1368, 2008.

CHATER, K.F. et al. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 34, n. 2, p.171-98, 2010.

CHATER, K.F.; CHANDRA, G. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. **Federation of European Microbiological Societies**, v.30, n. 5, p.651-72, 2006.

CHEN, F.M. et al. The nature of actinomycin D binding to d(AACCAXYG) sequence motifs. **Nucleic Acids Research**. v. 32, p. 271–277, 2004.

CHEN, C. et al. A marine-derived *Streptomyces* sp. MS449 produces high yield of actinomycin X2 and actinomycin D with potent anti-tuberculosis activity. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 95, p. 919–927, 2012.

COEDEL, G.A. et al. The dereplication of plantderives natural products, In Atta – ur – Rahman, **Studies in Natural Products Chemistry**. v.19, p. 749-791, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453 p.

CONSTANT, H.L.; BEECHER, C.W.W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**. v.6, p. 193-196, 1995.

CORRADI-SILVA, M. D. L. et al. Chemical characterization and biotechnology applications of fungal glucans. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 85- 92, 2006.

CORREIA, D. P. **Espectroscopia de RMN Análise Estrutural**. Universidade da Madeira Departamento de Química Dissertação. Funchal, 2002.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p.47-58, 2010.

CRISTONI, S.; BERNARDI, L.R. Development of new methodologies for the mass spectrometry study of bioorganic macromolecules. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 22, n. 6, p. 369-406, 2003.

CUSHINE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.26, n.1, p.343-356, 2005.

DANCER, S.J. Importance of the environment in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquisition: the case for hospital cleaning. **The Lancet – Infectious Diseases**. v. 8, p. 101–113. 2008.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 486-495, 2006.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DE SOUZA, M.V.N. et al. produtos Naturais com atividade inibitória da Translocase I, uma promissora classe de compostos contra tuberculose. **Boletín Latino Americano y Del Caribe de Plantas Medicinai s y Aromáticas**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2010.

DUARTE, M.W. et al. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas extracelulares por actinomicetos isolados de solo**. 2009. TCC (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

EL-GAMMAL, A.A. Characterization of an orange-brown pigment-antibiotic produced by *Streptomyces viridiviolaceus*. **Egypt Journal Microbiology**, v. 21, p. 37–42. 1987.

EL-KHAWAGH, M. A.; HAMADAH, K.H. SH.; EL-SHEIKH, T. M. The insecticidal activity of actinomycete metabolites, against the mosquito *Culex pipiens*. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 103-113, 2011.

EL-NAGGAR, M.Y.M. Synergistic effect of actinomycin X2 produced by *Streptomyces nasri* YG62 with other antibiotics. **Biomedical Letters**. v. 58, p. 169–173, 1998.

FARBER, S. et al. Clinical studies of actinomycin D with special reference to Wilms' tumor in children. 1960. **Journal of Urology**, v. 168, p. 2560–2563, 2002.

FAVORETTO, N. B. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos-SP**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for Emerging Pathogens. **Science**. v. 325, n. 5944, p. 1089 – 1093, 2009.

FLÄRDH, K.; BUTTNER, M.J. *Streptomyces morphogenetics*: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature**, v. 7, p. 36-49, 2009.

FROMMER, W. Zur Systematik der actinomycin bildenden streptomycete. **Archives Microbiology**, v. 32, p. 187–206, 1959.

GARCIA, D. E. et al. Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. **Current Opinion in Microbiology**. v.11, p. 233-239, 2008.

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

GONZÁLEZ, I. et al. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 401–415, 2005.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Bioactive agents from natural sources: Trends in Discovery and Application. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**. v. 64, 1999.

GU, J. Q. et al. Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta Medica**, v. 70, n.1, p. 509-514, 2004.

GUPTA, K.C.; SOBTI, R.R.; CHOPRA, I.C. Actinomycin produced by a new species of *Streptomyces*. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 6, p. 12–16, 1963.

HA, S.C.; HONG, S.D. Identification of the actinomycete strain No.1372, a producer of actinomycin X2. **Sanop Misaengmul Hakhoechi**, v. 22, p. 164–168, 1994.

HAYACIBARA, M. et al. A. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 3, p. 371-376, 2005.

HAMZA, A.A. et al. Isolation and characterisation of actinomycin D producing *Streptomyces* sp. from Sudanese soil. **African journal of biotechnology**. v. 12, n. 9, p. 2624- 2632, 2013.

HAMZA, A.A. et al. Identification of anticancer actinomycin-d in a newly isolated *Streptomyces* sp. From sudan soil. **Journal of Global Biosciences**. v. 3, n. 5, p. 858-865, 2014.

HARRIS, E.L.; ANGAL, V.S. **Protein Purification Methods – A Pratical Approach**, Oxford: Press, 1995.

HASANI, A.; KARIMINIK, A.; ISSAZADEH, K. *Streptomyces*: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. v. 2, n. 1, p. 63-75. 2014.

HIRSCH, C. F.; MCCANN-MCCORMICK, P. A. Biology of *Streptomyces*. In: DEMAIN, A. L. and SOLOMON, N. A. (Eds.), **Biology of Industrial Microorganisms**. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings, 1985.

HIRATA, Y.; NAKANISHI, K. Actinomycin J2, a by-product from a strain of *Actinomyces*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, n 22, p. 121–127, 1949.

HODGSON, D. A. Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. **Advances in Microbial Physiology**. v. 42, p. 47-238, 2000.

HOLKAR, S. et al. Rhodomycin analogues from *Streptomyces purpurascens*: isolation, characterization and biological activities. **Springer Plus**, v. 2, n.93, 2013.

HONG, G. et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12. A using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 4012-4016, 2009.

HOPWOOD, D.A. et al. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v. 314, p. 642-644, 1985.

HOPWOOD, D. A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. **Microbiology**, v. 145, p. 2183-2202, 1999.

HOPWOOD, D.A. ***Streptomyces in nature and medicine***: the antibiotic makers. New York, Oxford: Oxford University. p. 250, 2007.

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. **Jornal of Virology**. v.77, n. 2, p. 1011-1020, 2003.

INAHASHI, Y. et al. *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 297-302, April, 2011.

JIN, U.H. et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. **Clinical Chimica Acta**, London, v. 362, p. 57-64, 2005.

JÜTTNER, F.; WATSON, S. Biochemical and ecological control of geosmin and 2 – methylisoborneol in source waters. **Applied Environment Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4395-4406. 2007.

KHOSLA, C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthase. **Chemical Reviews**, v. 97, p. 2577-2590, 1997.

KJELLEBERG, S. **Starvation in Bacteria**. New York: Plenum Press, 1993.

KLEEFF, J. et al. Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. **International Journal of Cancer**. v. 86, p. 399–407, 2000.

KONISHI, Y. et al. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. **Analytical Chemistry**. v.79, p. 1187-1197, 2007.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. São Paulo: Editora Guanabara.. p.1840-1879. 1999.

KRUG, D.; MÜLLER, R. Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products. **Natural Product Reports**. v. 31, n. 6, p. 768-783, 2014.

KULKARNI-ALMEIDA, A.A. et al. Fermentação, isolamento, estrutura e actividade antidiabética de NFAT -133 produzido pela PM0324667 estirpe *Streptomyces*. **AMB Express**, v. 1, n. 42, 2011.

KUROSAWA, K. B. et al. Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X2-producer. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 72, p.145–154, 2006.

KURZATKOWSKI, W. Role of *Streptomyces melanochromogenes* cell wall and membrane in actinomycin D biosynthesis. **Med Dosw Mikrobiol**. v. 27, p. 325–336, 1975.

LACKNER, H. et al. Structure of five components of the actinomycin Z complex from *Streptomyces fradiae*, two of which contain 4-chlorothreonine. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 352–356, 2000.

LAM, K.S. et al. The effect of space flight on the production of actinomycin D by *Streptomyces plicatus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.29, p. 299–302, 2002.

LAVERTY, G.; GORMAN, S.P.; GILMORE, B.F. The potential of antimicrobial peptides as biocides. **International Journal of Molecular Science**, v.12, p. 6566–6596, 2011.

LEÓN, J. et al. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**. v. 27, n. 2, p. 215-21, 2010.

LIN, Q.; LIU, Y. A new marine microorganism strain L0804: taxonomy and characterization of active compounds from its metabolites. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26. p. 1549-1556, 2010.

LIU, H.; ZOU, X.; LU, H.; TAN, X.; Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-82, 2001.

MANDAL, S.M.; BARBOSA, A.E.A.D.; FRANCO, O.L. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. **Biotechnology Advances**. v. 31, n. 2, p. 338–345, 2013.

MANGONI, M.L.; SHAI, Y. Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences in cell specificities and modes of action. **Celular and Molecular Life Sciences**. v. 68, p. 2267, 2011.

MARCON, J. **Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa***. Piracicaba: USP. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MARIA-NETO S. et al. Deciphering the magainin-resistance process of *Escherichia coli* strains in light of the cytosolic proteome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n. 4, p.1714–1724, 2012.

MARROQUIN, A.S. Actinomycin A from *Streptomyces globosus*. **Revista de la Sociedad Química de Mexico**, v.3, p. 19–22, 1959.

MAURER, H. H.; Advances in analytical toxicology: the current role of liquid chromatography-mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 110-118, 2005.

MCDANIEL, R. et al. Engineering biosynthesis of novel polyketides: influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America*, **Biochemistry**, v. 91, p. 11542 – 11546, 1994.

MELO, F. M. P. **Bioprospecção de actinobactérias rizoféricas de milho (*Zea mays*) com atividade antifúngica**. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENDES, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de Formigas Attini (Hymenoptera: formicidae)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas na área de Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Rio Claro.

MEN'SHIKOV, G.P.; DENISOVA, S.I. Isolation of actinomycins from the group *Actinomyces fluorescens*. **Antibiotic**, v.7, p. 31–32, 1962.

MICHEL, G.B. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella* update. **Microbes and Infections**, v. 8, p. 1814-1898, 2006.

MITRA, A.; PRAMANIK, A.; SANTRA, S.C. *et al.* Phylogeny, phenotypic and nutritional characteristics of estuarine soil actinomycetes having broad-spectrum antimicrobial activity derived from an ecologically guided bioprospecting programme. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.1679-1688, 2011.

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

MORK, T. *et al.* Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. **Veterinary Microbiology**, v.141, p.134-141, 2010.

NAEIMPOOR, F. **Metabolic flux analysis in *Streptomyces coelicolor***. 2001. Tese (Doutorado) – University of Manchester Institute of Science and Technology, Manchester.

NATHAN, C.; GOLDBERG, F.M.; The profit problem in antibiotic R&D. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n.3, p. 887–891, 2005.

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B. S.; **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1362, 2009.

NDEJOUONG, B.S. T. *et al.* Hygrobaafilomycin, a cytotoxic and antifungal macrolide bearing a unique monoalkylmaleic anhydride moiety, from *Streptomyces varsoviensis*. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 359-363, 2010.

OLDINI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

OMURA, S. *et al.* Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98. n. 21, p. 12215-20, 2001.

OHNISHI, Y. *et al.* Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal Bacteriology**, v.190. n. 11, p. 4050-4060, 2008.

PADILHA, G. Manipulação Genética e Molecular de Actinomicetos Produtores de Antibióticos. In: MELO, I.S.; VALADARES, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A. C.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, v. 1, p. 246-261, 2002.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Produção do antitumoral Retamicina por *Streptomyces olidensis* em processos descontínuo alimentado e contínuo.** 2003. Tese (Doutorado em engenharia), Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAYNE, D.J.; GWYNN, M.N.; HOLMES, D.J.; POMPLIANO, D.L.; Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 29–40, 2007.

PICO, Y.; BLASCO, C.; FONT, G.; Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

PIEPERSBERG, W. *Streptomyces* and *Corynebacteria*, In: **Biotechnology, Biological Fundamentals**, Series Eds: H.J. Rehm and G. Reed, V. 1, p. 433-468. 1993.

PIMENTEL-ELARDO, S. M. et al. Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. Strains isolated from mediterranean sponges. **Marine Drugs**, v. 8, p. 373-380, 2010.

PIRRI, G. et al. Lipopeptides as antiinfectives: a practical perspective. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n.3, p. 258–273, 2009.

PIRT, S.J. et al. Antibiotics from the newly isolated *Streptomyces elizabethii*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 167, n. 177, p. 167–177, 1981.

PRAVEEN, V.; TRIPATHI, C.K.M.; BIHARI, V. Studies on optimum fermentation conditions for actinomycin-D production by two new strains of *Streptomyces* spp. **Medical Chemistry Research**, v. 17, p. 114–122, 2008.

PRAVEEN, V. et al. Production of actinomycin-D by a new isolate, *Streptomyces sindenensis*. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 109-114, 2008.

PRINCE, K.A. **Determinação da atividade anti – *Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica de MABA.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biomedicina), Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

QIAN, T. et al. In vivo rat metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p. 223-232, 2005.

RAHMAN, MD. A. et al. Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v. 13, n. 1, 2010.

REICH, E.; SCHIBLI, A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. **CAMAG- Laboratory**, Muttenz, Switzerland, 2006.

ROSSETTI, M. L. R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 4, p. 525-532, 2002.

ROOS, G.H.P.; LOANE, C. A clarifying NMR study of actinomycin X2. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 8, p. 289–294, 2004.

SAADAUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, London, v. 53, p. 365-371, 2003.

SACRAMENTO, D. R. et al. Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 225-229, 2004.

SAKAI, T. et al. Pladienolides, new substances from culture of *Streptomyces platensis* Mer-11107. I. Taxonomy, fermentation, isolation and screening. **Journal of Antibiotics**, v. 57, n. 3, p. 173-179, 2004.

SAHIN, N.; UGUR, A. Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 79-84, 2003.

SALAMONI, S.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* e estudo de produção de moléculas bioativas**. 2010. Tese (Doutorado em microbiologia agrícola e do ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SCHUG, K.A. et al. Direct affinity screening chromatography-mass spectrometry assay for identification of antibacterial agents from natural product sources. **Analyt. Chimi. Acta**, v. 713, p. 103-110, 2012.

SHAABAN, K. A. et al. Landomycins P-W, cytotoxic angucyclines from *Streptomyces cyanogenus* S-136. **Journal of Natural Products**, v. 74, n.1, p. 2–11, 2011.

SAÚDE. Ministério da Saúde. 2014. **O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios**. 45(2): 1-13. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--2--tb.pdf>. Acesso em: 27 mai 2015.

SAJID, I.; SHAABAN, K.A.; HASNAIN, S. Antitumour compounds from a saline soil isolate, *Streptomyces griseoincarnatus* CTF15. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 25, n.5, p. 549-559, 2011.

SAXENAS, G. et al. Use of specific dyes in the detection of antimicrobial compounds from crude plant extracts using a thin layer chromatography agar overlay technique. **Phytochemical analysis**, v. 6, p. 125-129, 1995.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia). III Diretrizes para Tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 35(10): 1018-1048. 2009.

SHARMA, S. K.; MOHAN, A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian Journal of Medicine Reserch**, 120(1): 354-376. 2004.

SHARMA, D.; MANDAL, S. M.; MANHAS, R. K. Purificação e caracterização de uma nova lipopéptido de *Streptomyces amritsarensis* sp . novembro resistente à meticilina ativo contra *Staphylococcus aureus*. **AMB Express**, v. 4, n. 50, 2014.

SHETTY, P.R. et al. A produção de antibiótico polipéptido de *Streptomyces parvulus* e a sua actividade antibacteriana. **Bioengineering and Environmental Centre**, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad, India. April 4, 2013.

SILVA, I.R. **Compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* spp.**. 2012. 94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SILVA et al. **The Effect of Varying Culture Conditions on the Production of Antibiotics by *Streptomyces* spp., Isolated from the Amazonian Soil**. **Fermentation Technology**, v. 1, n. 3, 2012.

SINGH, S.L.; SHARMA, H.; TALUKDAR, N. C. Production of potent antimicrobial agent by actinomycete, *Streptomyces sannanensis* strain SU118 isolated from phoomdi in Loktak Lake of Manipur, India. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 278, 2014.

SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA, A. Jr.; LOGUERCIO-LEITE, C.S. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*, strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v.29, p. 317-320, 1998.

SMAOUI, S. et al. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an Oasis in Tunis. **Archives of Biological Science**, v. 63, n. 4, p. 1047-1056, 2011.

SOARES, A. C. F. et al. Isolados de Estreptomicetos no Crescimento e Nutrição de Mudanças de Tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical de Goiânia**, v. 40, n. 4, p. 447-453, 2010.

SOLECKA, J. et al. Biologically active secondary metabolites from *Actinomycetes*. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 3, p. 373-390, 2012.

SORIANO-BERNILLA, B S.; SORIANO-BERNILLA, E. Degradación de pesticidas por Actinomicetos. **UCV – Scientia**, v. 2, n.1, 2010.

SOUZA, J. V. B. et al. Anti-micobacteriana activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n.3, p. 39 – 43, 2011.

STRAUS, S.K.; HANCOCK, R.E.W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1758, p. 1215–1223, 2006.

STROBEL, G.A.; EZRA, D.; CASTILHO, U. A question concerning the identity of *Streptomyces* sp. MSU-2110. **Microbiology**, v.150, p. 3094-3096, 2004.

SUBRAMANI, R.; ALBERSBERG, W. Marine *actinomycetes*: an ongoing source of novel bioactive metabolites. **Microbiological Research**, v. 167, n.10, p. 571- 580. 2012.

SUFFINESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. **Methods in Plant Biochemistry: Assays Bioactivity**, vol. 6, p. 71-133. 1990.

SUN, C. et al. Chemomicin A, a new angucyclinone antibiotic produced by *Nocardia 84 mediterranei* subsp. kanglensis 1747-64. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 3, p. 211-215, 2007.

SUZUKI, N. et al. Um composto a partir de *Streptomyces* inibe a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*. **College of Pharmaceutical Sciences**, p. 8525–8577, 2015.

TADDEI, A. et al. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. From Venezuelan soils: morphological and biochemical studies. **Microbiological Research**, v. 161, p. 222-231, 2005.
TAECHOWISAN, T. et al. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 Cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 203- 211, 2007.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAKUSAGAWA, F.; CARLSON, R.G.; WEAVER, R.F. Anti-leukemia selectivity in actinomycin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 719–725, 2001.

TEIXEIRA, E.W. et al. Bauer-7-em-3 β -yl acetato: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 245-246, 2006.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis: Evidence based Complementary and Alternative Medicine. **Oxford**, v. 3, p. 249-254, 2006.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P. et al. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. **Tetrahedron**, v. 64, p. 7583–7586, 2008.

TURAN, T. et al. Results with EMA/CO (etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, vincristine) chemotherapy in gestational trophoblastic neoplasia. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 3, p. 1432-1438, 2006.

VILLAS-BÔAS, S.G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 24, p. 613-646, 2005.

VINING, L.C. Secondary metabolism; In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**. VCH, v. 4, p. 19-38, 1986.

WANG, Y. et al. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 178-187, 1999.

WAKSMAN, S.A.; WOODRUFF, H.B. Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes. **Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 45, p.609–614, 1940.

WAKSMAN, S. HERICI, A. The nomenclature and classification of the actinomycetes. **Journal Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 337-341, 1943.

WILLIAMS, W.K.; KATZ, E. Development of a chemically defined medium for the synthesis of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, p. 281–290, 1977.

WHO - World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/bitstream>>. Acesso: 25 mai 2015.

XING, J. et al. A high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemisinin in rat plasma, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, v.20, p. 1463-1468, 2006.

WOLF, D.; SIEMS, K. Burning the hay to find the needle – data mining strategies in natural product dereplication. **CHIMIA**, v. 61, 6, p. 339-345, 2007.

YAGÜE, P. et al. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state of the art and future perspectives. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342, n. 2, p. 79-88, 2013.

YUAN, G. J.; HONG, K.; LIN, H. P.; LI, J. Azalomycin F4a 2-ethylpentyl ester, a new macrocyclic lactone, from mangrove actinomycete *Streptomyces* sp. 211726. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 947–950, 2010.

ZHANG, Y. et al. Broad-Spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. **Marine Drugs**, v.7, p. 97-112, 2009.

ZITOUNI, A. et al. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 984-993, 2005.

ZHONG, K. et al. Antioxidant activity of a novel *Streptomyces* strain Eril2 isolated from the rhizosphere of *Rhizoma curcumae* Longae. **Current Research in Bacteriology**, v. 4, n. 2, p. 63-72, 2011.