UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

"Identificação e isolamento de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da Caatinga"

Osvaldo Luiz Ferreira Junior

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

RIBEIRÃO PRETO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Identificação e isolamento de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da Caatinga”

Osvaldo Luiz Ferreira Junior

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Versão Corrigida

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

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudos e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira Junior, Osvaldo Luiz

Identificação e isolamento de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da caatinga. Ribeirão Preto, 2018.
111 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.
Orientador: Moraes, Luiz Alberto Beraldo.

1. Espectrometria de massas. 2. Produtos naturais. 3. Fitotoxinas; 4. Albociclina; 5. Actinobactéria; 6. Caatinga.

Nome: FERREIRA JUNIOR, Osvaldo Luiz.

Título: Identificação e isolamento de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da caatinga

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

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____ Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico aos meus pais e ao meu irmão, com todo o amor do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Laudiceia e Osvaldo e ao meu irmão João Vitor pelo amor, apoio e incentivo incondicionais durante todos esses anos, fazendo o possível e o impossível para que eu pudesse chegar até aqui. Amo vocês.

Agradeço ao professor Luiz Alberto, pela oportunidade dada e confiança depositada desde a iniciação científica. Obrigado pela amizade, orientação e inspiração. Por estar sempre ao lado nos momentos de dificuldade, auxiliando e ensinando. Muito obrigado por tudo durante todos esses anos!

Aos meus amigos que se tornaram a família que a USP me deu: Eloisa, Vitor, Thaynara, Ariel, Rafael, Ana Carol, Ana Maria, Flávia, Gabriela, Geraldo e Felipe. Muito obrigado pelas risadas (muitas risadas), amizade, companheirismo, apoio, incentivo, BK's e todas as emoções compartilhadas durante esses anos.

Muito obrigado a minha namorada Bruna, ao Caio e Fernando, por todo o apoio, companheirismo, incentivo, risadas e conselhos nos momentos difíceis e de alegria. Muito obrigado por tudo!

Agradeço a todos do LabEMass: a Raquel, que foi meu braço direito durante esses anos, muito obrigado por tudo. Ao Henrique, pela grande ajuda com os ensaios de germinação. Ao Fernando, Bruna, Julia, Luana, Geraldo, Talita, Amanda, Eduardo Crevelin e a todos os membros e ex-membros do laboratório, muito obrigado.

Aos meus amigos Mateus, Rafaela, Michael, Lilian, Amanda, Tiago e Felipe pela incrível amizade de muitos anos, que se manteve viva mesmo à distância. Muito obrigado pelos encontros semestrais, às vezes anuais, para matar a saudade, pelos conselhos, apoio, incentivo e companheirismo.

A todo o pessoal do apartamento 502, obrigado pelos anos de convívio.

A turma do cafezinho e agregados do laboratório, obrigado pelas conversas, ideias, conselhos e apoio.

Agradeço ao professor Antonio Eduardo Miller Crotti e a Tânia Petta pelas sugestões e conselhos no exame de qualificação.

A Ana Paula Ferranti Peti, pelas análises de HRMS, conselhos e ajuda.

Ao Danilo Tosta, pelas análises de identificação por sequenciamento genético e ajuda.

Ao professor Itamar Soares de Melo e todos os colaboradores da Embrapa Meio Ambiente. Obrigado por todos os ensinamentos desde os tempos de estágio em 2010/2011.

Ao professor Abel Elias Rahal, que através do atletismo me ajudou a manter corpo e mente equilibrados.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e seus funcionários.

Ao café e a música, que foram os combustíveis para a realização desse trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida durante esses últimos anos. Muito obrigado!

Look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious.

- Stephen Hawking
(1942 – 2018)

RESUMO

FERREIRA JUNIOR, Osvaldo Luiz.: **Identificação e isolamento de fitotoxinas produzidas por actinobactérias isoladas da Caatinga.** 2018, 109 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Palavras chave: Espectrometria de massas; Produtos naturais; Fitotoxina; Albociclina; Actinobactéria; Caatinga.

As actinobactérias são uma reconhecida fonte de metabólitos secundários bioativos com grande diversidade estrutural e funcional. Dentre elas, o gênero *Streptomyces* é sem dúvida o mais explorado, correspondendo a cerca de 75% dos metabólitos secundários estudados, e por dois terços dos antibióticos conhecidos. Dessa forma, ainda é crescente a necessidade de novos herbicidas com perfil de baixa toxicidade ambiental e novos mecanismos de ação, para a substituição de produtos que são utilizados extensivamente há anos. Grandes avanços tecnológicos têm sido alcançados em termos de instrumentação analítica nas últimas décadas, tornando a espectrometria de massas a técnica mais eficiente e robusta na identificação de metabólitos secundários, principalmente quando acoplada a técnicas cromatográficas de ultra eficiência (UHPLC-MS). Nessa dissertação foi explorada a diversidade metabólica de actinobactérias isoladas do bioma Caatinga para a identificação de metabólitos secundários com atividade fitotóxica. Foram produzidos 166 extratos brutos de actinobactérias, das quais, 27 apresentaram algum nível de atividade fitotóxica contra *Lemna minor*. Devido pronunciada bioatividade (MIC = 6,25 µg) o extrato bruto da actinobactéria, CAAT 7-52, foi selecionado para desreplicação, caracterização e fracionamento guiado por bioensaios, e, ao mesmo tempo, um estudo taxonômico foi realizado para determinar o posicionamento filogenético do novo isolado. A análise da sequência do gene 16S rRNA suportou a classificação da linhagem no gênero *Streptomyces* e mostrou que CAAT 7-52 formou uma linha filética distinta junto com a linhagem tipo de *Streptomyces actinomycinicus*, com um valor de identidade da sequência de 99,0%. No extrato bruto de CAAT 7-52 foi identificada a Albociclina como responsável pela atividade fitotóxica (MIC = 3,12 µg), assim como alguns compostos análogos. O monitoramento da massa micelial seca e produção de Albociclina mostrou uma maior produção do composto ativo aos 21 dias de crescimento. Esse extrato foi submetido a ensaios de inibição de germinação, onde apresentou atividade contra sementes de buva (*Conyza canadensis*) (MIC = 12,5 µg), alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*). Variações no meio de cultivo mostraram uma produção seletiva de Albociclina nos meios de cultivo PMB e Czapeck-GL. Ensaios de fitotoxicidade contra *Lemna minor*, utilizando o fermentado do meio PMB sem extração com solventes orgânicos, mostrou atividade em uma diluição de 20%. Portanto, foi possível demostrar através desse estudo o grande potencial das actinobactérias na produção de metabólitos secundários bioativos e da espectrometria de massas como técnica analítica na identificação dos compostos ativos.

ABSTRACT

FERREIRA JUNIOR, Osvaldo Luiz.: **Identification and isolation of phytotoxins produced by actinobacteria isolated from Caatinga.** 2018, 109 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Keywords: Mass spectrometry; Natural products; Phytotoxin; Albocycline; Actinobacteria; Caatinga.

Actinobacterias are a well know source of bioactive secondary metabolites with great structural and functional diversity. Among them, the *Streptomyces* genus is certainly the most explored, corresponding to about 75% of studied secondary metabolites, and for two thirds of known antibiotics. Thus, there is still a growing need for new herbicides with low environmental toxicity e new modes of action, for the replacement of products that have been broadly used for years. Great technological progress has been achieved in analytical instrumentation in the last few decades, making mass spectrometry the most efficient and robust technique to identify secondary metabolites, mainly when accoupled to ultra-performance chromatographic techniques (UHPLC-MS). In this essay, was explored the metabolic diversity of the actinobacterias isolated from the Caatinga biome to identification of secondary metabolites with phytotoxic activity. Were produced 166 crude extracts from actinobacterias, from this, 27 showed some phytotoxic activity against *Lemna minor*. Due to noticeable bioactivity (MIC = 6,25 µg) the crude extract from actinobacteria CAAT 7-52, was selected to dereplication, characterization and bioassay guided fractionation, and, at the same time, a taxonomic study was carried out to determinate the phylogenetic location of the new isolated. The analysis of 16S rRNA gene sequence supported the lineage classification on the genus *Streptomyces* and established that CAAT 7-52 assembled a distinct phyletic line together with the lineage type of *Streptomyces actinomycinicus*, with an identity sequence value of 99,0%. In the crude extract CAAT 7-52, Albocycline was identified as the responsible for the phytotoxic activity (MIC = 3,12 µg), so as some analogous compounds. The mycelial dry mass and Albocycline production monitoring revealed a major production of the active compound at 21 days of growth. This extract was subjected to germination inhibition assays, where revealed activity against horseweed (*Conyza canadensis*) (MIC = 12,5 µg), lettuce (*Lactuca sativa*) and arugula (*Eruca sativa*) seeds. Variations in the culture media showed a selective production of Albocycline in the PMB and Czapeck-GL culture media. Phytotoxicity assays against *Lemna minor*, applying the fermented PMB media without organic solvents extractions, revealed activity with a 20% dilution. Therefore, through this study was able to demonstrate the great potential of the actinobacterias in the production of bioactive secondary metabolites and the mass spectrometry as analytical technique to identification of the active compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infográfico da distribuição dos compostos bioativos e suas origens. 23
Figura 2. Antibióticos Ácido Fusídico, Penicilina, Cefalosporina, Bacitracina e Polimixina B. 24
Figura 3. Antifúngicos Equinocandina B, Enfumafungina e Estrobilurina B. 25
Figura 4. Algumas auxinas naturais (A) e sintéticas (B) utilizadas como herbicidas. 26
Figura 5. Fosfinotricina, fitotoxina natural proveniente do Bialafos e o Glifosato, seu equivalente sintético. 28
Figura 6. Aumento de plantas-daninhas resistentes ao longo dos anos. 29
Figura 7. Aumento na utilização de Glifosato após a introdução de cultivares resistentes. 29
Figura 8. Aumento cronológico de resistência por espécie ao Glifosato nos cinco países com maior número de espécies resistentes. 31
Figura 9. Comparação entre as estações chuvosa e seca na região do semiárido. 35
Figura 10. Representação da região de rizosfera e processo de atração dos microrganismos. 36
Figura 11. Algumas actinobactérias isoladas utilizadas nesse trabalho. Observa-se sua grande variedade morfológica. 39
Figura 12. Diferentes tipos de varreduras possibilitadas pelos analisadores do triplo quadrupolo. 42
Figura 13. Esquema ilustrativo simplificado de coleta (A), isolamento em placa (B) e preservação em tubo criogênico dos microrganismos (C). 44
Figura 14. Métodos de extração utilizados: extração da placa de meio sólido (A); extração liquído-liquído (B); extração em cartucho de fase sólida C18 (C). 46
Figura 15. Foto da placa contendo as plantas de Lemna minor utilizadas neste trabalho 47
Figura 16. Esquema ilustrativo do bioensaio de fitotoxicidade contra Lemna minor. 47
Figura 17. Esquema ilustrativo do ensaio de germinação. 49
Figura 18. Esquema ilustrativo da análise em cromatografia de camada delgada (TLC) (A) e ensaio de bioautografia (B). 50
Figura 20. Extratos brutos com atividade fitotóxica contra Lemna minor. 57
Figura 21. Ensaio de germinação contra Buva (Conyza canadensis) mostrando atividade do extrato bruto CAAT 7-52. 58
Figura 22. Árvore Neighbor-Joining mostrando a posição filogenética da linhagem CAAT 7-52 em relação aos membros do gênero Streptomyces. 60

Figura 23. Isolado CAAT 7-52 em meio de cultivo sólido BDA. 62
Figura 24. Comparação entre os cromatogramas LC-UV do extrato bruto CAAT 7-52. A) Cromatograma LC-UV analítico; B) Cromatograma LC-UV preparativo. 63
Figura 25. Bioensaio de fitotoxicidade das frações do extrato CAAT 7-52 contra L. minor... 64
Figura 26. Espectro em modo positivo e negativo do íon m/z 139 presente na fração 15. 65
Figura 27. Espectro de íons produto do íon m/z 139 em modo positivo. Energia de colisão de 20 eV. 65
Figura 28. Proposta de fragmentação do íon m/z 139. 66
Figura 29. Espectro de ^{1}H da fração 15 do extrato CAAT 7-52. 67
Figura 30. Espectro de correlação HMQC da fração 15 do extrato CAAT 7-52. 67
Figura 31. Espectro de correlação HMBC da fração 15 do extrato CAAT 7-52. 68
Figura 32. Correlações de HMBC da fração 15 do extrato CAAT 7-52. 68
Figura 33. Espectro de íons produtos em modo positivo do íon m/z 139. A) Padrão de ácido 3-hidroxibenzóico. B) Fração 15. Energia de colisão de 20 eV. 69
Figura 34. Bioensaio com padrões de derivados de ácido benzóico. A) Controles; B) ácido 2-hidroxibenzóico (ácido salicílico), ácido 3-hidroxibenzóico (padrão), C) ácido 4-hidroxibenzóico e D) ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico 70
Figura 35. Cromatograma LC-MS-TOF do extrato bruto CAAT 7-52. 72
Figura 36. (A) Espectro de íons produto do íon m/z 309 (ESI+) da fração 30. (B) Espectro de íons produto do íon m/z 309 (ESI+) do padrão de Albociclina. 73
Figura 37. Espectro de ^{1}H – 500 MHz da fração 30 do extrato CAAT 7-52 ($CDCl_3$). 74
Figura 38. Correlações dos hidrogênios do composto presente na fração 30 do extrato CAAT 7-52. 74
Figura 39. Cromatograma de íons em modo full scan positivo (ESI+) do extrato bruto CAAT 7-52. 75
Figura 40. Espectro de íon extraído do íon m/z 347[M+Na]+ correspondentes aos derivados da albociclina. 75
Figura 41. Análogos hidroxilados e o epóxido propostos. 76
Figura 42. Cromatograma de LC-MS total de íons em modo positivo dos extratos CAAT 7-52 fermentados em diferentes meios de cultivo. A) Czapeck modificado; B) Czapeck; C) ISP-2; D) PMB e E) BD 77
Figura 43. Bioensaio contra Lemna minor dos extratos CAAT 7-52 fermentados em diferentes meios de cultivo. 79

Figura 44. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto CAAT 7-52 mostrando a atividade positiva contra Lemna minor em 6,25 µg de extrato bruto. 80
Figura 45. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto CAAT 7-52 mostrando a atividade positiva contra buva (Conyza canadensis) em 12,5 µg de extrato bruto. 81
Figura 46. Bioensaio de mínima concentração inibitória das frações ativas e uma mistura delas. 82
Figura 47. Bioensaio de controle com meio de cultivo PMB sem fermentar. 83
Figura 48. Bioensaio com o meio de cultivo fermentado CAAT 7-52. 83
Figura 49. Gráfico de crescimento micelial e produção de Albociclina no período de 30 dias. 85
Figura 50. Placa de TLC contendo o extrato bruto CAAT 7-52 eluida com acetato de etila. Posteriormente foi utilizado acetato de etila/hexano para melhor separação. (A) 365 nm (B) 254 nm 86
Figura 51. Bioautografia do extrato bruto CAAT 7-52 contra L. minor. (A) Condições iniciais (B) Após 7 dias de incubação, observa-se necrose na folha inferior. 87
Figura 52. Cromatograma de extração do íon m/z 309 mostrando a maior intensidade do sinal em 10,2 minutos. 88
Figura 53. Espectro de massas (ESI+) comparando o sinal em 10,2 minutos da fração 1 do TLC com o extrato bruto CAAT 7-52. 89
Figura 54. Bioensaio de fitotoxicidade para AM 33-22. 90
Figura 55. Perfil químico de LC-UV do extrato AM 33-22. A) UV-Vis; B) Cromatograma de íons em modo negativo; C) Cromatograma de íons em modo positivo. 91
Figura 56. Bioensaio realizado contra Lemna minor, observa-se as frações ativas as quais foram analisadas. 92
Figura 57. Cromatograma GC-MS das frações 14 (A) e 15 (B) do extrato AM 33-22. 93
Figura 58. Cromatograma da fração 22 do extrato AM 33-22. 93
Figura 59. Espectro de massas (EI) do Ácido Benzoacético, presente nas frações 14 e 15 em 13,5 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados. 94
Figura 60. Espectro de massas (EI) de Benzoacetamida, presente nas frações 14 e 15 em 15,7 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados. 94
Figura 61. Espectro de massas (EI) do Indol-3-carboxaldeído, presente na fração 22 em 21,0 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados. 95

Todas as imagens sem citação de fonte são de propriedade do autor. Todas as moléculas foram desenhadas utilizando o software ChemDraw Professional 17.0 (PerkinElmer Informatics, Inc.) com licença concedida pela Universidade de São Paulo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios de ação conhecidos para herbicidas. 30
Tabela 2. Relação das plantas-daninhas resistentes registradas no Brasil. 31
Tabela 3. Relação de alguns compostos com atividade biológica produzidos por Streptomyces. 37
Tabela 4. Relação dos extratos brutos obtidos por ELL e SPE avaliados e suas respetivas atividades fitotóxicas 55
Tabela 5. Extratos brutos e suas atividades apresentadas no ensaio de germinação. 58
Tabela 6. Cálculos de identidade de sequências entre CAAT 7-52 e seus vizinhos filogenéticos mais próximos usando o servidor Ez-taxon. 60
Tabela 7. Valores de massa micelial e área do sinal do íon de m/z 309,2053 monitorado. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

° C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
A.E.C.	Antes da Era Comum
ACN	Acetonitrila
ACT	Acetona
APCI	(Do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) Ionização química a pressão atmosférica
BD	Batata-Dextrose
BDA	Batata-Dextrose-Agar
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
$CHCl_3$	Clorofórmio
CID	(Do inglês *Collision Induced Dissociation*) Dissociação induzida por colisão
cm	Centímetro
d	Dubleto
Da	Dalton
DAD	(Do inglês *Diode Array Detector*) Detector de arranjo de diodo
DMSO	Dimetilsulfóxico
DNA	(Do inglês *Desoxyribonucleic acid*) Ácido desoxirribonucleico
DNP	(Do inglês *Dictionary of Natural Products*) Dicionário de Produtos Naturais
E.C.	Era comum
EI	(Do inglês *Electron Ionization*) Ionização por elétron

ELL	Extração líquido-líquido
EMS	Extração do meio de cultivo sólido
ESI	(Do inglês *Electrospray Ionization*) Ionização por eletrospray
EtOH	Etanol
eV	Eletron-volt
GC	(Do inglês *Gas Chromatography*) Cromatografia gasosa
GC-MS	(Do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GYE	(Do inglês *Glucose Yeast Extract*) Glicose extrato de levedura
GYEA	(Do inglês *Glucose Yeast Extract*) Glicose extrato de levedura ágar
HMBC	(Do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy*) Espectroscopia de correlação heteronuclear de múltipla ligação
HMQC	(Do inglês *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy*) Espectroscopia de correlação heteronuclear múltipla-quântica
HPLC	(Do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) Cromatografia líquida de alta performance
HPLC-MS	(Do inglês *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas

HRMS	(Do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*) Espectrometria de massas de alta resolução
ISP-2	(Do inglês *International Streptomyces Project-2*) Projeto Internacional de Strepetomyces-2
J	Constante de acoplamento
kV	Quilovolt
L	Litro
LC-MS	(Do inglês *Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry*) Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LC-MS/MS	(Do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
m	Multipleto
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Mega-hertz
MIC	(Do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) Concentração mínima inibitória
mL	Mililitro
MS	(Do inglês *Mass Spectrometry*) Espectrometria de massas
MS/MS	(Do inglês *Tandem Mass Spectrometry*) Espectrometria de massas sequencial
NIST	Do inglês *National Institute of Standards and Technology*
nm	Nanometro

PKS	(Do inglês *Poliketide synthase*) Policetídeo sintase
PMB	(Do inglês *Postgate's Medium B*) Meio B de Postgate
Rf	(Do inglês *Retention factor*) Fator de retenção
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H
Rpm	Rotações por minuto
s	Singleto
SIS	Do inglês *Swedish Standard*
SPE	(Do inglês *Solid Phase Extraction*) Extração em fase sólida
td	Triplodubleto
THF	Tetrahidrofurano
TLC	(Do inglês *Thin Layer Chromatography*) Cromatografia em camada delgada
TMS	Trimetilsilano
TOF	(Do inglês *Time of Flight*) Tempo de voo
UPLC®	(Do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*) Cromatografia líquida de ultra performance
UPLC-MS	(Do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) Cromatografia liquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Volts
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **22**

1.1. Produtos naturais e algumas aplicações: um breve histórico. **22**

1.2. A proteção das plantações e o surgimento dos herbicidas sintéticos. **25**

1.3. Do Bialafos ao Glifosato no controle de plantas-daninhas **27**

1.4. O papel de biomas diferenciados e suas fontes biológicas **34**

1.5. Actinobactérias, a fermentação microbiana e sua importância biotecnológica **37**

1.6. A espectrometria de massas e seu poder analítico na desreplicação de produtos naturais **40**

2. OBJETIVO **43**

2.1. Objetivo Geral **43**

2.2. Objetivo Específico **43**

3. MATERIAL E MÉTODOS **43**

3.1. Preservação e manutenção das actinobactérias **43**

3.2. Fermentação microbiológica e obtenção dos extratos orgânicos **44**

3.3. Bioensaios **46**

3.3.1. Bioensaio de fitotoxicidade contra *Lemna minor* 46

3.3.2. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) 48

3.3.3. Bioensaio de germinação 48

3.3.4. Bioautografia 49

3.4. Identificação da actinobactéria CAAT 7-52 por sequenciamento do gene 16S rRNA50

3.5. Isolamento e caracterização dos compostos ativos: métodos cromatográficos e espectrométricos **51**

3.6. Variação de meio de cultivo para melhor produção dos compostos ativos **53**

3.7. Monitoramento da produção dos metabólitos secundários com atividade fitotóxica **53**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 54

4.1. Obtenção dos extratos brutos e *screening* de atividade fitotóxica 54

4.2. Ensaio de germinação 57

4.3. Identificação da actinobactéria CAAT 7-52 por sequenciamento do gene 16S rRNA 59

4.4. Desreplicação e fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto CAAT 7-52 empregando LC-MS/MS 62

4.4.1. Análise de LC-MS/MS e RMN de ^{1}H das frações ativas selecionadas 64

4.4.2. Ensaio de atividade fitotóxica para outros derivados do ácido benzoico. 69

4.4.3. Desreplicação da fração ativa 30 71

4.4.4. Ensaio de variação de meio de cultivo 76

4.5. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) do extrato bruto CAAT 7-52 79

4.5.1. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) com as frações ativas 15 e 30 81

4.5.2. Ensaio de atividade fitotóxica do meio de cultivo fermentado com CAAT 7-52. 82

4.5.3. Monitoramento de produção diária dos compostos ativos 84

4.5.4. Bioautografia 85

4.6. Desreplicação por fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto AM 33-22 89

4.6.1. Análises por LC-MS e GC-MS das frações ativas selecionas do extrato bruto AM 33-22 92

5. CONCLUSÃO 95

6. REFERÊNCIAS 97

ANEXO A 108

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais e algumas aplicações: um breve histórico.

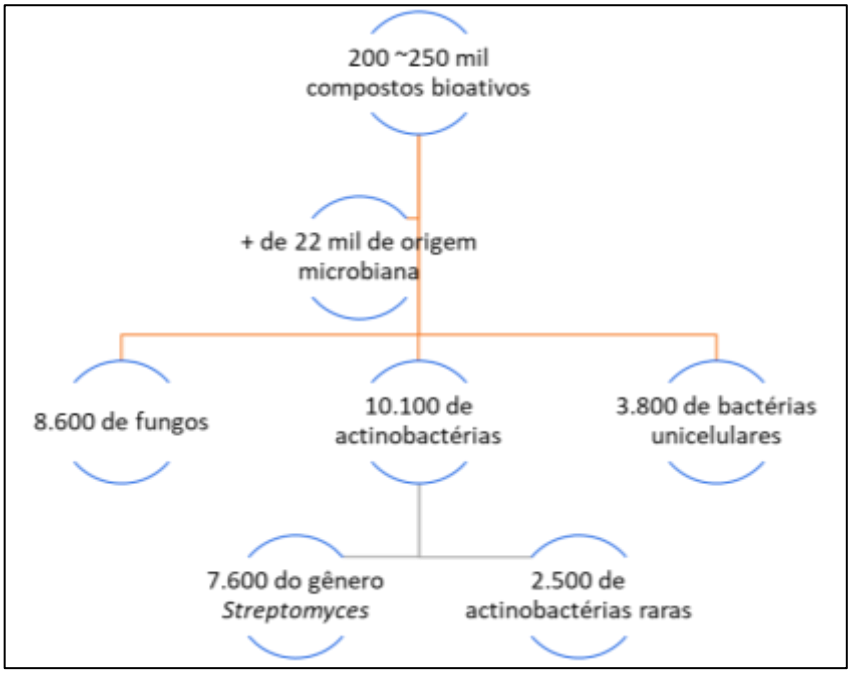
Historicamente os produtos naturais são usados há séculos nas mais diversas funções, como relatam documentos da Mesopotâmia de 2600 A.E.C, onde óleos de *Cedrus sp.*, *Cupressus sempervirens*, *Commiphora sp*., *Glycyrrhiza glabra* e *Papaver somniferum*, eram utilizados no tratamento de tosses, resfriados, infecções e inflamações. Existem documentos da medicina egípcia, como o Papiro Ebers (1500 A.E.C), que relatam cerca de 700 drogas sendo na sua maioria plantas, incluindo diversas formulações. Bem como na medicina chinesa, havendo documentos datados de 1100 A.E.C como o Materia Medica chinês o qual contém drogas e prescrições utilizadas na época. Entre os séculos V e XII E.C. apesar de diversos monastérios europeus preservarem esse conhecimento, foram os árabes quem preservaram os conhecimentos Greco-Romanos e ainda incluíram os conhecimentos asiáticos adquiridos, sendo os primeiros a estabelecerem drogarias particulares durante o século VIII.[1,2]

Os produtos naturais podem ter diversas fontes biológicas como, bactérias[3–5], fungos[6–8], plantas[9,10] e fontes biológicas marinhas[11,12]. Cerca de mais de 1.000.000 metabólitos secundários já foram descritos, sendo grande parte de plantas (500.000 ~ 600.000)[13].

Dentre os compostos obtidos a partir fontes naturais destacam-se os metabólitos secundários microbianos, compostos que auxiliam os organismos a sobreviver em seu ambiente natural, mas em laboratório acabam não sendo necessários para sua sobrevivência[14].

Estes somam em torno de 50.000 compostos, sendo cerca de 22.500 descritos como sendo biologicamente ativos e dentre eles, cerca de 3.800 (17%) são provenientes de bactérias (principalmente *Bacillus spp e Pseudomonas spp.*), 8.600 (38%) tem sua origem em fungos e cerca de 10.100 (45%) são de origem de fermentação de actinobactérias, uma reconhecida, rica e abrangente fonte de produtos naturais microbianos com grande atividade biológica, sendo que dessas, cerca de 7.600 (75%) são provenientes do gênero *Streptomyces*, as quais produzem a grande maioria dos antibióticos conhecidos hoje[13] (Figura 1).

Figura 1. Infográfico da distribuição dos compostos bioativos e suas origens.



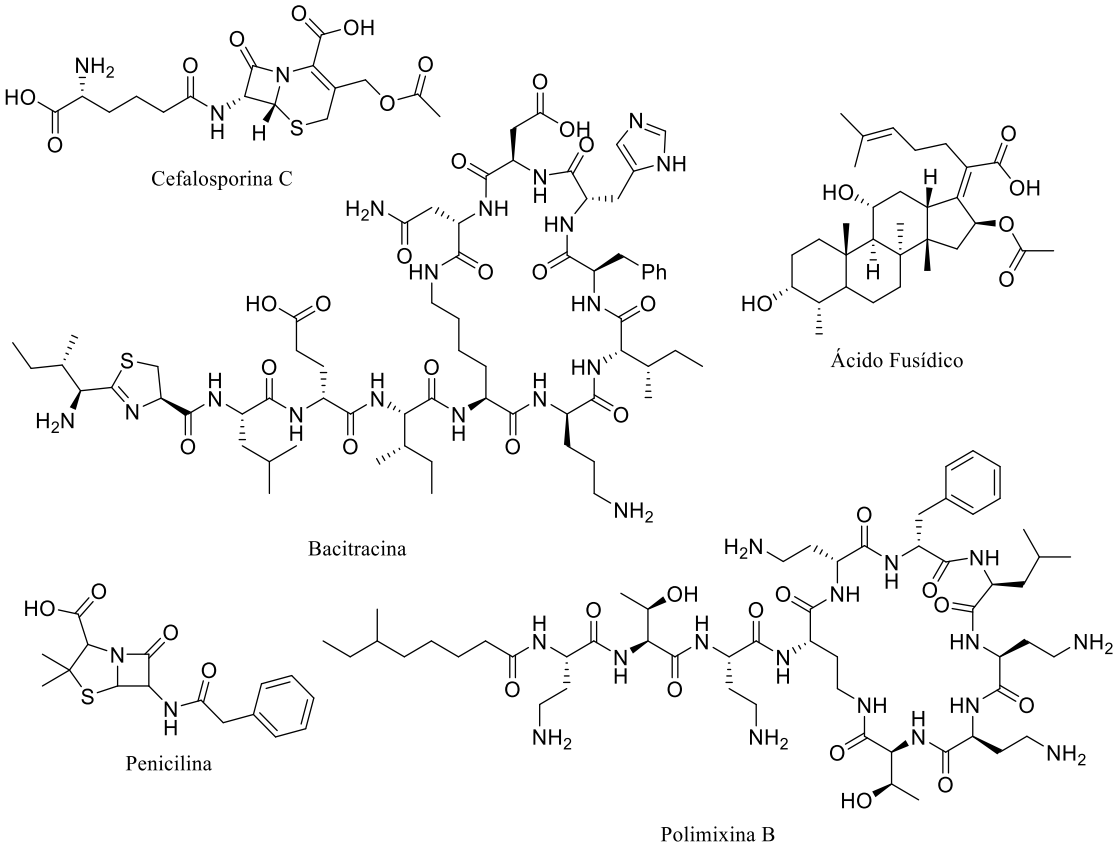
(Fonte: Adaptado de: Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. & Rajnisz, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sci.* **7,** 373–390 (2012).[13])

Desde a descoberta da Penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, por Alexander Fleming em 1928[8,15], o interesse por novos produtos naturais de origem microbiana vem crescendo, sendo descobertos uma infinidade de novos compostos com atividade antibacteriana como a classe das Cefalosporinas, que se tornou o ponto de partida para a produção de outros antibióticos, sendo produzida pelo fungo *Cephalosporium acremonium* isolado em 1945 por Guiseppe Brotzu[15].

Outro exemplo, o Ácido Fusídico isolado nos anos 1960 a partir do fungo *Fusarium coccineum*, apresenta atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas inibindo a síntese de proteínas, sendo também bacteriostático[15].

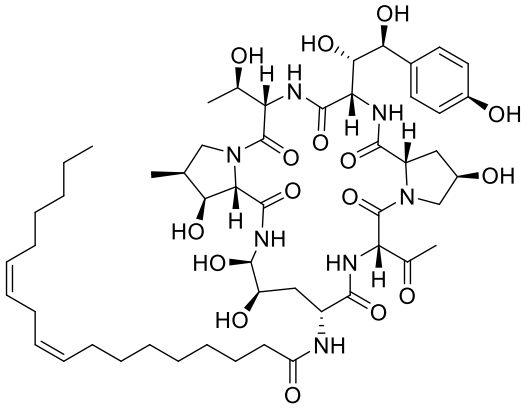
Também é possível citar alguns antibióticos produzidos por bactérias como a Bacitracina, um composto com a atividade contra bactérias gram-positivas, descoberto em 1945 e produzido por isolados de *Bacillus licheniformis* e a classe das Polimixinas, as quais são um grupo de compostos descobertos em 1947 produzidos por *Bacillus polymyxa* e que apresenta atividade contra bactérias gram-negativas[16] (Figura 2).

Figura 2. Antibióticos Ácido Fusídico, Penicilina, Cefalosporina, Bacitracina e Polimixina B.

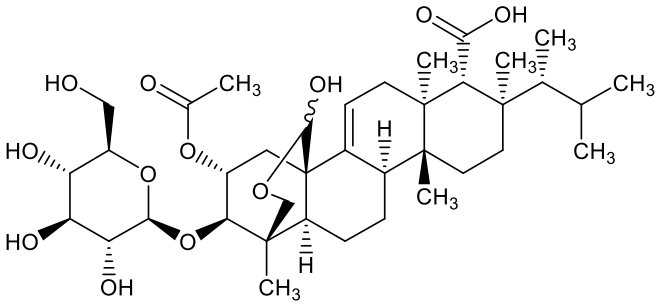


Além dos antibacterianos, é possível citar alguns compostos com atividade antifúngica obtidos a partir de fontes microbianas. Dentro desse grupo, está a classe das Estrobilurinas constituída por potentes fungicidas produzidas por *Strobilurus tenacellus* muito utilizadas no combate a fungos patogênicos em plantações. Equinocandina B produzido por algumas espécies de *Aspergillus spp*. e Enfumafungina produzida por *Hormonema carpetanum*, são utilizadas no tratamento de infecções fúngicas[17] (Figura 3).

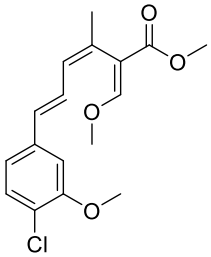
Figura 3. Antifúngicos Equinocandina B, Enfumafungina e Estrobilurina B.



Equinocandina B



Enfumafungina



Estrobilurina B

1.2. A proteção das plantações e o surgimento dos herbicidas sintéticos.

Até aqui, foi possível observar como os produtos naturais sempre estiveram muito envolvidos no processo de desenvolvimento de fármacos e nas mais variadas aplicações dentro da medicina, tanto pela utilização direta dos compostos obtidos, como pela utilização dessas moléculas de origem natural como inspiração para de novas moléculas sintéticas ou semissintéticas.

Contudo, um lugar de destaque no qual os produtos naturais receberam grande utilização é na agricultura, onde o poder herbicida de algumas moléculas no combate a pragas e plantas-daninhas continua sendo muito explorado[18].

A busca por métodos de proteger as plantações vem desde tempos antigos quando sumérios (3000 A.E.C) utilizavam compostos de enxofre para o controle de insetos e ácaros, assim como Gregos e Romanos (600 A.E.C) utilizavam óleos, cinzas e enxofre também para controle de insetos [18,19].

Com a descoberta na década de 1930 que hormônios reguladores de crescimento em plantas, conhecidos como auxinas, em determinada concentração passavam a apresentar

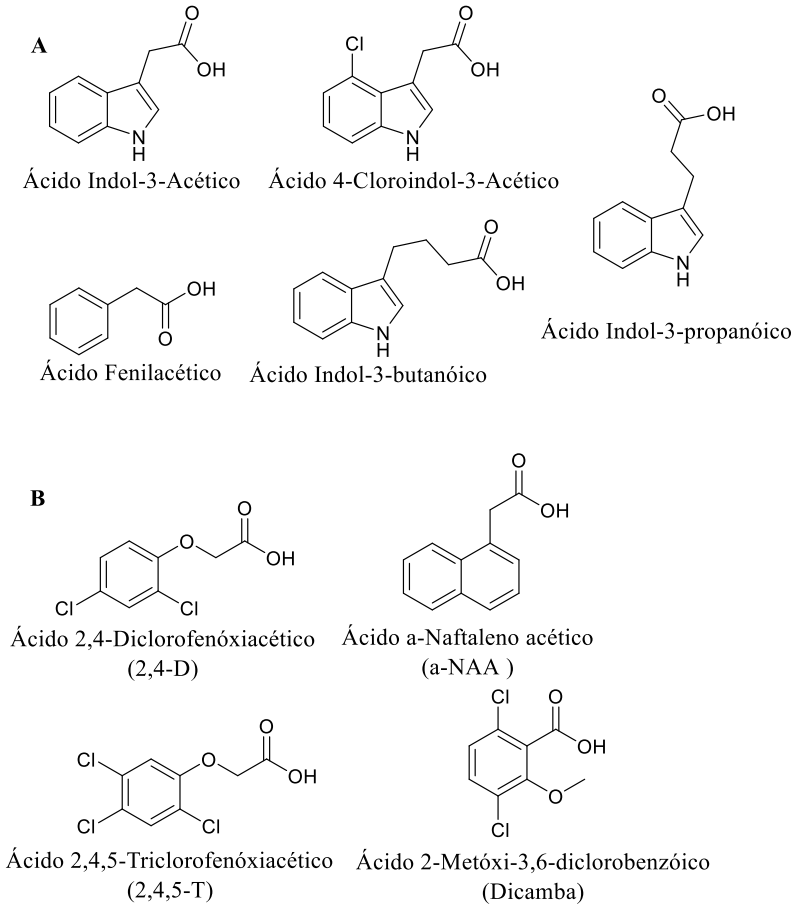
toxicidade às plantas se deu início a utilização de produtos sintéticos com efeitos semelhantes as auxinas, como o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), assim, se iniciando a era dos herbicidas químicos sintéticos[20,21].

O 2,4-D, sintetizado em 1941, atua mimetizando as auxinas e apresenta efeitos na fotossíntese e no metabolismo de carboidratos além de, um agente seletivo a plantas dicotiledôneas[20,22] (Figura 4).

A auxina que inspirou a síntese do 2,4-D foi o ácido indol-3-ácetico, sendo que dados de 2014 mostram que existem cerca de 25 compostos da classe do ácido fenoxicarboxílico utilizados como herbicidas e o 2,4-D possui cerca de 2,7% do mercado de herbicidas[23].

Assim, com a contínua pesquisa sobre as auxinas, novos compostos sintéticos foram sendo comercializados como herbicidas como o 2,4,5-T (Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético), Dicamba (Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzóico), α-NAA (Ácido α-naftalenoacético) (Figura 4)[23].

Figura 4. Algumas auxinas naturais (A) e sintéticas (B) utilizadas como herbicidas.



Com o grande aumento na utilização de herbicidas, houve o surgimento de algumas espécies de plantas-daninhas resistentes aos compostos utilizados no seu controle, como *Amaranthus hybridus* (Caruru roxo/branco; crista de galo), *Conyza sumatrensis* (Buva) e *Lactuca serriola* (Alface brava) resistentes ao 2,4-D e *Amaranthus viridis* (Caruru verde/comum), *Arabidopsis thaliana* (Erva-estrelada) e *Digitaria sanguinalis* (Capim-colchão) resistentes a Atrazina[24], bem como a preocupação com a toxicidade desses compostos, na sua maior parte clorados, ao meio ambiente e aos humanos uma vez que resíduos podem permanecer nas plantações[25] levando a pesquisa por novos herbicidas que apresentassem novos modos de ação e com menor toxicidade.

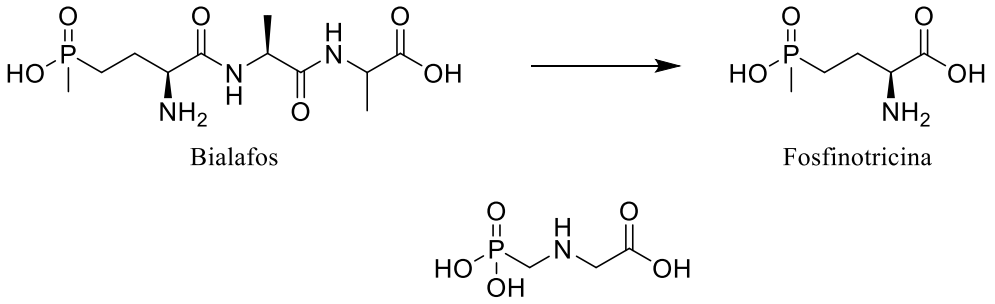
1.3. Do Bialafos ao Glifosato no controle de plantas-daninhas

Isolado a partir de culturas de *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus*, o Bialafos, um composto com atividade fitotóxica não seletiva e pós-emergente o qual foi o primeiro, e um dos poucos compostos de origem microbiana que já foram comercializados como herbicidas[26,27].

O Bialafos na verdade é considerado um pró-herbicida não apresentando atividade *in vitro*, mas quando metabolizado pelas plantas é convertido em sua forma bioativa, a Fosfinotricina (Figura 5), que por ser uma molécula análoga ao ácido glutâmico acaba por inibir a enzima glutamina sintase causando a diminuição de alguns aminoácidos como a glutamina, aspartato, serina, glicina e alanina[27] juntamente com o aumento no nível de amônia e queda da fixação de CO_2, levando a clorose[28].

Com a grande atividade herbicida apresentada pela Fosfinotricina, esta molécula acabou sendo um modelo para a síntese de um novo composto herbicida, o Glifosato (Figura 5), que se tornou o herbicida mais utilizado do mundo[29].

Figura 5. Fosfinotricina, fitotoxina natural proveniente do Bialafos e o Glifosato, seu equivalente sintético.

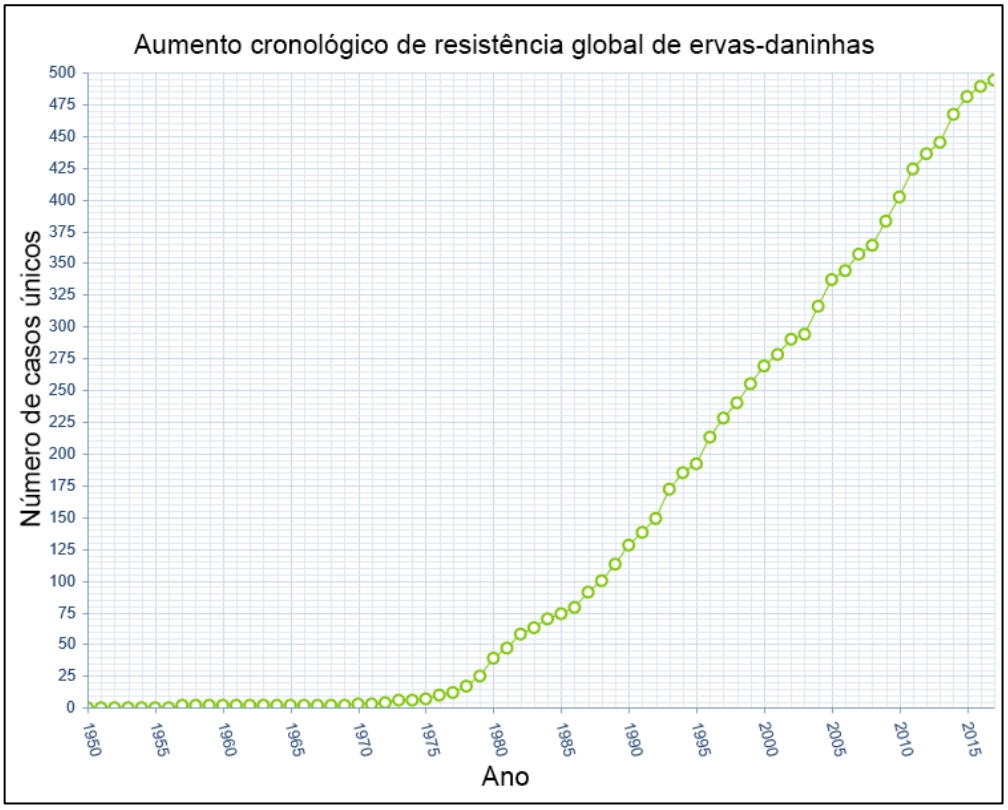


O Glifosato foi sintetizado e avaliado como herbicida em 1970 e logo em 1974 já estava no mercado sob o nome comercial Roundup®, produzido pela Monsanto. Ele atua como um herbicida não seletivo e de ação pós-emergente, assim como o Bialafos[30]. O principal diferencial dessa nova molécula era seu modo de ação herbicida através da inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), pertencente a via de biossíntese do chiquimato, inibindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos[31].

Por apresentar um alto poder fitotóxico, apenas uma pequena quantidade quando em contato com as plantas-daninhas era suficiente para seu controle. Porém, essa característica acabou por afetar também as culturas desejadas e aplicações pontuais as ervas indesejadas não eram viáveis. Então, com a ajuda da biotecnologia, foram criadas culturas geneticamente modificadas resistentes ao Glifosato. Assim, em 1996, foi introduzida a primeira cultivar de soja resistente ao Glifosato, iniciando o que seria uma revolução no controle de plantas-daninhas[29].

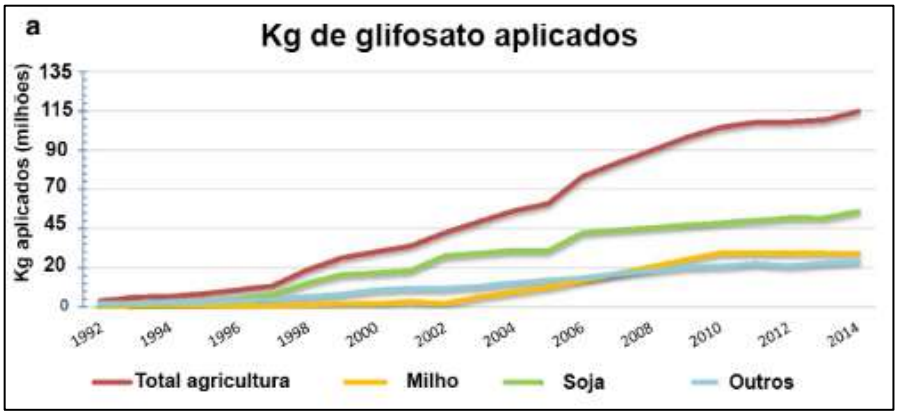
Porém, nos anos que se seguiram, a resistência dessas culturas indesejadas não só ao Glifosato, como também a outros herbicidas muito utilizados, vem crescendo tendo mais que dobrado nos últimos 20 anos (Figura 6). Uma provável causa, seria a resistência de pelo menos uma planta-daninha a 23 dos 26 modos de ação conhecidos atualmente para herbicidas[24,32] (Tabela 1), além do aumento e uso indiscriminado do Glifosato que vem aumentando com a introdução de novos cultivares geneticamente modificados[33] (Figura 7).

Figura 6. Aumento de plantas-daninhas resistentes ao longo dos anos.



(Fonte: Adaptado de: Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 2018. Disponível: www.weedscience.org)[24]

Figura 7. Aumento na utilização de Glifosato após a introdução de cultivares resistentes.



(Fonte: Adaptado de: Benbrook, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* **28,** 15 (2016))[33].

Tabela 1. Sítios de ação conhecidos para herbicidas.

Classificação	**Sítio de ação**
A	Inibidores Acetil-CoA carboxilase (ACCase)
B	Inibidores Aceto Lactato Sintase (ALS)
C1	Inibidores Foto-sistema II
C2	Inibidores Foto-sistema II (Ureias e Amidas)
C3	Inibidores Foto-sistema II (Nitrilas)
D	Inibidores Foto-sistema I (Fluxo de Elétrons)
E	Inibidores Protoporfirinogênio Oxidase (PPO)
F1	Inibidores Biossíntese de Carotenóides
F2	Inibidores Enzima 4-Hidroxifenil piruvato dioxigenase (HPPD)
F3	Inibidores Biossíntese de Carotenóides
F4	Inibidores 1-Deoxi-D-Xilulose 5-Fosfato (DOXP)
G	Inibidores 5-Enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS)
H	Inibidores Glutamina Sintase
I	Inibidores Diidropteroato Sintase (DHPS)
K1	Inibidores Microtubulo
K2	Inibidores Mitose
K3	Inibidores Ácidos Graxos de cadeia longa
L	Inibidores Celulose
M	Desacopladores
N	Inibidores de Lipídeos
O	Auxinas Sintéticas
P	Inibidores Transporte de Auxinas
Z	Desregulador Mitótico Antimicrotubulo
	Inibidores Alongamento Celular
	Inibidores Ácido Nucleico
	Desconhecido

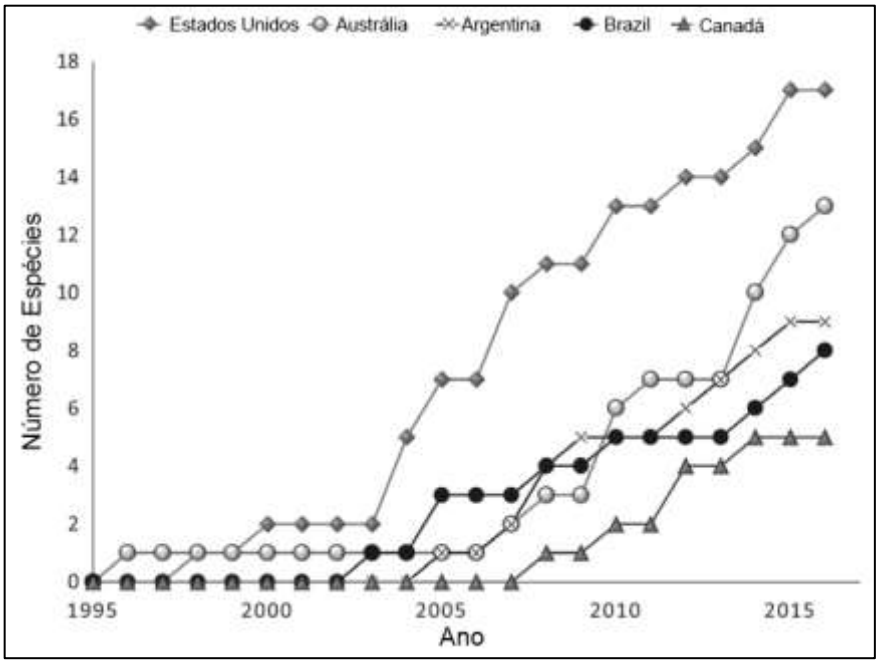
(Fonte: Adaptado de: Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 2018. Disponível: www.weedscience.org)[24].

No Brasil, os primeiros casos de resistência datam de 1993 (Tabela 2) e hoje existem registros de cerca de 50 espécies de plantas-daninhas que apresentam resistência a algum modo

de ação[24,34], sendo que o aumento dos casos de resistência ao Glifosato progridem logo após os anos 2000 com a introdução oficial da soja RR (Roaundup® Ready)[34] (Figura 8).

Essa resistência acaba resultando em grandes perdas na agricultura onde estima-se, que uma planta de *Conyza bonariensis* por metro quadrado, pode gerar perdas de 20 Kg de soja em uma plantação[35] e custo de controle podendo atingir cerca de R$215,00 por hectare[34] e cerca de 15% da produção mundial de grãos é perdida por causa das plantas-daninhas existentes nas lavouras[36].

Figura 8. Aumento cronológico de resistência por espécie ao Glifosato nos cinco países com maior número de espécies resistentes.



(Fonte: Adaptado de: Heap, I. & Duke, S. O. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag. Sci.* **74,** 1040–1049 (2018))[37].

Tabela 2. Relação das plantas-daninhas resistentes registradas no Brasil.

Espécie	Ano de Registro	Modo de Ação Resistente
Bidens pilosa	1993	Inibidores de ALS (B/2)
Euphorbia heterophylla	1993	Inibidores de ALS (B/2)
Bidens subalternans	1996	Inibidores de ALS (B/2)
Urochloa plantaginea (=Brachiaria plantaginea)	1997	Inibidores de ACCase (A/1)

Sagittaria montevidensis	1999	Inibidores de ALS (B/2)
Echinochloa crus-pavonis	1999	Auxinas sintéticas (O/4)
Echinochloa crus-galli var. crus-galli	1999	Auxinas sintéticas (O/4)
Cyperus difformis	2000	Inibidores de ALS (B/2)
Fimbristylis miliacea	2001	Inibidores de ALS (B/2)
Raphanus sativus	2001	Inibidores de ALS (B/2)
Digitaria ciliaris	2002	Inibidores de ACCase (A/1)
Lolium perenne ssp. multiflorum	2003	Inibidores EPSPs (G/9)
Eleusine indica	2003	Inibidores de ACCase (A/1)
Euphorbia heterophylla	2004	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Inibidores de PPO (E/14)
Parthenium hysterophorus	2004	Inibidores de ALS (B/2)
Conyza bonariensis	2005	Inibidores EPSPs (G/9)
Conyza canadensis	2005	Inibidores EPSPs (G/9)
Oryza sativa var. sylvatica	2006	Inibidores de ALS (B/2)
Bidens subalternans	2006	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Inibidores do Foto-sistema II (C1/5)
Digitaria insularis	2008	Inibidores EPSPs (G/9)
Echinochloa crus-galli var. crus-galli	2009	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Auxinas sintéticas (O/4)
Sagittaria montevidensis	2009	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Inibidores Foto-sistema II (Nitrilas) (C3/6)
Lolium perenne ssp. multiflorum	2010	Inibidores de ALS (B/2)
Lolium perenne ssp. multiflorum	2010	Resistencia multipla:
		Inibidores de ACCase (A/1)
		Inibidores EPSPs (G/9)
Conyza sumatrensis	2010	Inibidores EPSPs (G/9)
Avena fatua	2010	Inibidores de ACCase (A/1)
Conyza sumatrensis	2011	Inibidores de ALS (B/2)
Conyza sumatrensis	2011	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Inibidores EPSPs (G/9)
Amaranthus retroflexus	2011	Resistencia multipla:
		Inibidores de ALS (B/2)
		Inibidores do Foto-sistema II (C1/5)

Amaranthus viridis	2011	Resistencia multipla: Inibidores de ALS (B/2) Inibidores do Foto-sistema II (C1/5)
Amaranthus retroflexus	2012	Inibidores de ALS (B/2)
Raphanus raphanistrum	2013	Inibidores de ALS (B/2)
Ageratum conyzoides	2013	Inibidores de ALS (B/2)
Chloris elata	2014	Inibidores EPSPs (G/9)
Amaranthus retroflexus	2014	Inibidores de PPO (E/14)
Cyperus iria	2014	Inibidores de ALS (B/2)
Amaranthus palmeri	2015	Inibidores EPSPs (G/9)
Echium plantagineum	2015	Inibidores de ALS (B/2)
Echinochloa crus-galli var. crus-galli	2015	Resistencia multipla: Inibidores de ACCase (A/1) Inibidores de ALS (B/2) Inibidores de celulose (L/26)
Eleusine indica	2016	Inibidores EPSPs (G/9)
Amaranthus palmeri	2016	Resistencia multipla: Inibidores de ALS (B/2) Inibidores EPSPs (G/9)
Digitaria insularis	2016	Inibidores de ACCase (A/1)
Bidens pilosa	2016	Resistencia multipla: Inibidores de ALS (B/2) Inibidores do Foto-sistema II (C1/5)
Lolium perenne ssp. multiflorum	2016	Resistencia multipla: Inibidores de ACCase (A/1) Inibidores de ALS (B/2)
Conyza sumatrensis	2016	Fluxo de elétron Foto-sistema I (D/22)
Lolium perenne ssp. multiflorum	2017	Resistencia multipla: Inibidores de ALS (B/2) Inibidores EPSPs (G/9)
Conyza sumatrensis	2017	Inibidores de PPO (E/14)
Conyza sumatrensis	2017	Resistencia multipla: Inibidores de ALS (B/2) Desviador de elétron Foto-sistema I (D/22) Inibidores EPSPs (G/9)
Eleusine indica	2017	Resistencia multipla: Inibidores de ACCase (A/1) Inibidores EPSPs (G/9)
Conyza sumatrensis	2017	Resistência multipla:

	Inibidores Foto-sistema II (Ureias e amidas) (C2/7)
	Fluxo de elétron Foto-sistema I (D/22)
	Inibidores de PPO (E/14)
	Inibidores EPSPs (G/9)
	Auxinas sintéticas (O/4)

(Fonte: Adaptado de: Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 2018. Disponível: www.weedscience.org)[24].

Assim, a busca por novas fitotoxinas as quais as plantas-daninhas não apresentem resistência e também por novos modos de ação dessas fitotoxinas, se mostra de extrema importância para a agricultura e para o meio ambiente uma vez que a obtenção de fitotoxinas de origem natural sobretudo microbiológica, é de grande interesse, pois: apresentam uma menor toxicidade ao meio ambiente; são mais seletivas que as obtidas sinteticamente; podem ter o mesmo efeito sendo utilizada em menores quantidades; se decompõe com maior rapidez diminuindo possíveis contaminações do solo e corpos d'água; podem contribuir para a diminuição da utilização dos herbicidas sintéticos[38].

1.4. O papel de biomas diferenciados e suas fontes biológicas

Nessa busca por novas fontes biológicas de fitotoxinas, destacam-se ambientes extremos e diferenciados, por exemplo, biomas exclusivos e ainda pouco explorados. Nesse contexto, a Caatinga se mostra um ambiente promissor nessa busca por novas fontes biológicas, apresentando estudos focados em plantas e animais, porém poucos estudos em relação aos microrganismos[39].

Localizada na região nordeste do Brasil, possuindo uma área aproximada de 900.000 Km^2 e apresentando um clima predominantemente semiárido, a Caatinga é um bioma extremamente interessante e exclusivamente brasileiro. Uma característica marcante é o fato desse bioma apresentar duas estações bem distintas: uma chuvosa e uma seca gerando um grande estresse hídrico[40] (Figura 9). Outras características da Caatinga incluem sua vegetação

xerófila que apresenta muitas espécies espinhentas e também suculentas[41], assim como grande incidência de raios ultravioleta, altas temperaturas e alta salinidade do solo[42].

Figura 9. Comparação entre as estações chuvosa e seca na região do semiárido.

(Fonte: Adaptado de: Taketani, R. G., Kavamura, V. N. & Santos, S. N. Diversity and Technological Aspects of Microorganisms from Semiarid Environments. in *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (eds. de Azevedo, J. L. & Quecine, M. C.) 1–439 (2017) Fotografia por Suikinai Nobre Santos, Abril e Novembro 2010[39].

Essa variação de condições climáticas acaba afetando a diversidade microbiana do solo, levando a uma adaptação da biota e microbiota, resultando na seleção de microrganismos muito versáteis na produção de diferentes metabólitos secundários e apresentando a habilidade de resistir a essas condições em razão da grande variação do meio em que vivem[42,43].

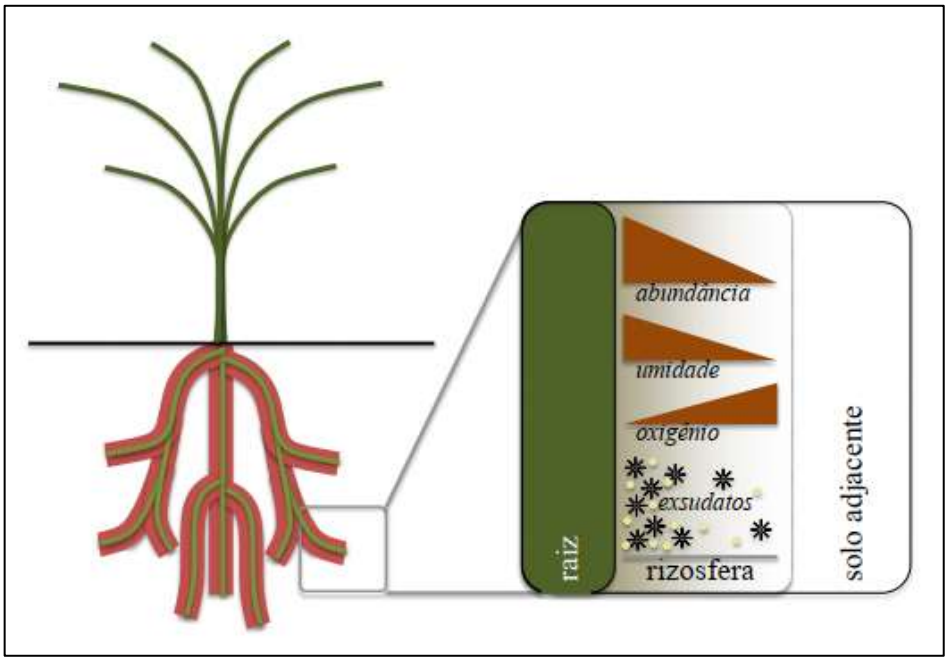
Estudos mostraram que ocorre uma grande abundância de Actinobactérias na rizosfera de cactáceas durante o período seco[44,45], podendo indicar que esses microrganismos auxiliam na promoção de crescimento e tolerância ao estresse hídrico devido as condições de adaptação e resistência do microrganismo[44].

A rizosfera é uma região do solo na qual ocorre a influência da raiz da planta (Figura 10). Essa influência ocorre através de exsudatos orgânicos liberados pela raiz da planta que acarretam na atração microbiana para suas proximidades. Essa região é rica em nutrientes fazendo com que essa população microbiana seja abundante, mas apresentando uma menor

diversidade biológica em comparação com outras regiões de solo distante das raízes uma vez que estão presentes microrganismos altamente selecionados[46].

A comunidade microbiana formada na rizosfera está diretamente envolvida no desenvolvimento da planta, uma vez que esses microrganismos atuam em várias funções que auxiliam a planta como a fixação de nitrogênio, mineralização de nutrientes e controle de patógenos e pragas[46].

Figura 10. Representação da região de rizosfera e processo de atração dos microrganismos.



(Fonte: Romagnoli, E. M. & Andreote, F. D. Rizosfera. in *Microbiologia do Solo* (eds. Cardoso, E. J. B. N. & Andreote, F. D.) 47–60 (ESALQ, 2016)[46]

Portanto, a partir das informações apresentadas é possível dizer que são encontradas na Caatinga características de grande relevância na busca por novas moléculas com ação fitotóxica de origem natural. O ambiente pouco explorado e único, a Caatinga; uma região de alta população microbiana, a rizosfera; e microrganismos que apresentam uma produção muito variada de metabólitos secundários, as Actinobactérias.

1.5. Actinobactérias, a fermentação microbiana e sua importância biotecnológica

As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram-positivas e apresentam alto teor de guanina e citosina (G+C) em seu DNA. São amplamente distribuídas em ecossistemas terrestres e aquáticos. São organismos procariotos e apresentam formação de micélios aéreos que liberaram esporos utilizados para reprodução, sendo por muito tempo consideradas uma forma transitória entre fungos e bactérias[47,48]. São encontradas actinobactérias heterotróficas ou quimiotróficas, porém, esses microrganismos são em sua maioria quimioheterotróficos apresentando a capacidade de utilizar múltiplas fontes nutricionais, como polissacarídeos complexos[47].

São encontradas principalmente em solos, onde desempenham importante papel na degradação de matéria orgânica, ciclos de aminoácidos e nitrogênio, assim como na degradação de proteínas[13,47]. O gênero dominante no solo é o *Streptomyces*, correspondendo a pelo menos 90% dos isolados encontrados[47,49].

O gênero *Streptomyces* é conhecido por seu alto poder de produção de metabólitos secundários bioativos com grande diversidade estrutural e funcional[49], sendo que entre as actinobactérias filamentosas, esse gênero corresponde a cerca de 75% dos metabólitos produzidos[13]. Produzem cerca de dois terços dos antibióticos utilizados atualmente, como aminoglicosídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclinas e polienos[50], assim como muitos compostos anticâncer, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, herbicidas entre outros[47,49,50] (Tabela 3), sendo que uma actinobactéria isolada de um ambiente adverso pode levar a descoberta de um novo composto ativo, devido ao seu metabolismo diferenciado[50].

Tabela 3. Relação de alguns compostos com atividade biológica produzidos por *Streptomyces*.

Tipo de composto e espécie produtora	Agente bioativo	Referência
Antibacteriano		
Streptomyces anulatus	Actinomicinas	51
Streptomyces griseus	Cicloheximida	52
Streptomyces kanamyceticus	Kanamicina	53
Streptomyces fradiae	Neomicinas	54
Streptomyces mediterranei	Rifamicina	55
Streptomyces griseus	Estreptomicina	56

Antifúngico		
Streptomyces nodosus	Anfotericina B	57
Streptomyces venezuelae	Cloranfenicol	58
Streptomyces lavendulae	Estreptotricina	59
Bioherbicida/biopesticida		
Streptomyces hygroscopicus	Herbimicina	60
Streptomyces avermitilis	Ivermectina (derivado da avermectina)	61
Streptomyces prasinus	Prasinons	62
Antiparasitário		
Streptomyces avermitilis	Avermectina	63
Streptomyces coelicolor	Prodiginina	64
Streptomyces bottropensis	Trioxacarcina	65
Antitumoral		
Streptomyces spp.	Borrelidina	66
Streptomyces peucetius	Doxorubicina	67
Imunossupressor		
Streptomyces filipinensi	Higromicina / Pentalenolactona	68

(Fonte: Adaptado de: Barka, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **80,** 1–43 (2016).[47])

A produção de metabólitos secundários por *Streptomyces* é tão complexa que seu genoma é singularmente grande para uma bactéria, sendo que, o genoma de *Streptomyces* mais estudado, o da *Streptomyces coelicolor*, apresenta quase o dobro de pares de bases no DNA em comparação com a *Escherichia coli*, além de apresentar mais de 20 clusters de enzimas envolvidas na formação de metabólitos secundários[13].

Assim, esses microrganismos metabolicamente versáteis podem ser cultivados utilizando diferentes fontes de carbono, sendo biotecnologicamente viáveis para a produção de metabólitos por fermentação microbiana, tornando-se muito promissores na busca de novos compostos com atividade biológica[69].

Neste cenário, a fermentação microbiológica de actinobactérias, sobretudo de *Streptomyces*, se mostra de alto valor na obtenção de novos metabólitos secundários bioativos

e obtendo por meio das fermentações o controle e otimização de parâmetros como a concentração dos constituintes do meio de cultivo, oxigenação, pH, temperatura de incubação, tempo de incubação, métodos de tratamento pós fermentação, entre outras variáveis importante a fim da obtenção otimização dos metabólitos secundários bioativos[70].

Todas essas características únicas das actinobactérias, esse grupo único de organismos que podem apresentar características tão diferentes entre si, como morfologia, fisiologia e bioquímica, agregam um enorme valor e importância biotecnológica e industrial a esses microrganismos[71] (Figura 11).

Figura 11. Algumas actinobactérias isoladas utilizadas nesse trabalho. Observa-se sua grande variedade morfológica.

(Fotografias: Acervo pessoal.)

1.6. A espectrometria de massas e seu poder analítico na desreplicação de produtos naturais

Uma das etapas que sempre demandam maior tempo e esforços na química dos produtos naturais são as etapas de isolamento e identificação dos compostos ativos. Durante anos a identificação e isolamento desses compostos foi desenvolvida utilizando técnicas como cromatografia de camada delgada (TLC) e ensaiados por bioautografia contra células do alvo em questão[72].

Esse processo durante o auge da descoberta de novos compostos provindos dos produtos naturais foi responsável pela identificação de muitas novas moléculas, contudo, a demanda por novas moléculas ativas levou ao desenvolvimento e utilização de novas e modernas técnicas de identificação desses compostos. Esse processo de identificação dos extratos contendo compostos já conhecidos, dos extratos que apresentam a possibilidade de conter novas moléculas ativas é conhecido como desreplicação[73].

O processo de desreplicação de um extrato bruto envolve e combina várias técnicas de separação cromatográfica, podendo ser líquida de alta performance (HPLC) ou gasosa (GC), espectroscópicas, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^{1}H e ^{13}C), e a espectrometria de massas (MS). A combinação dessas técnicas com registros de bancos de dados, *como Dictionary of Natural Products*, *Chemical Abstracts Services*, *PubMed* e *ChemSpider*, levam a um processo de desreplicação e identificação dos compostos ativos com muita rapidez e eficiência[74,75].

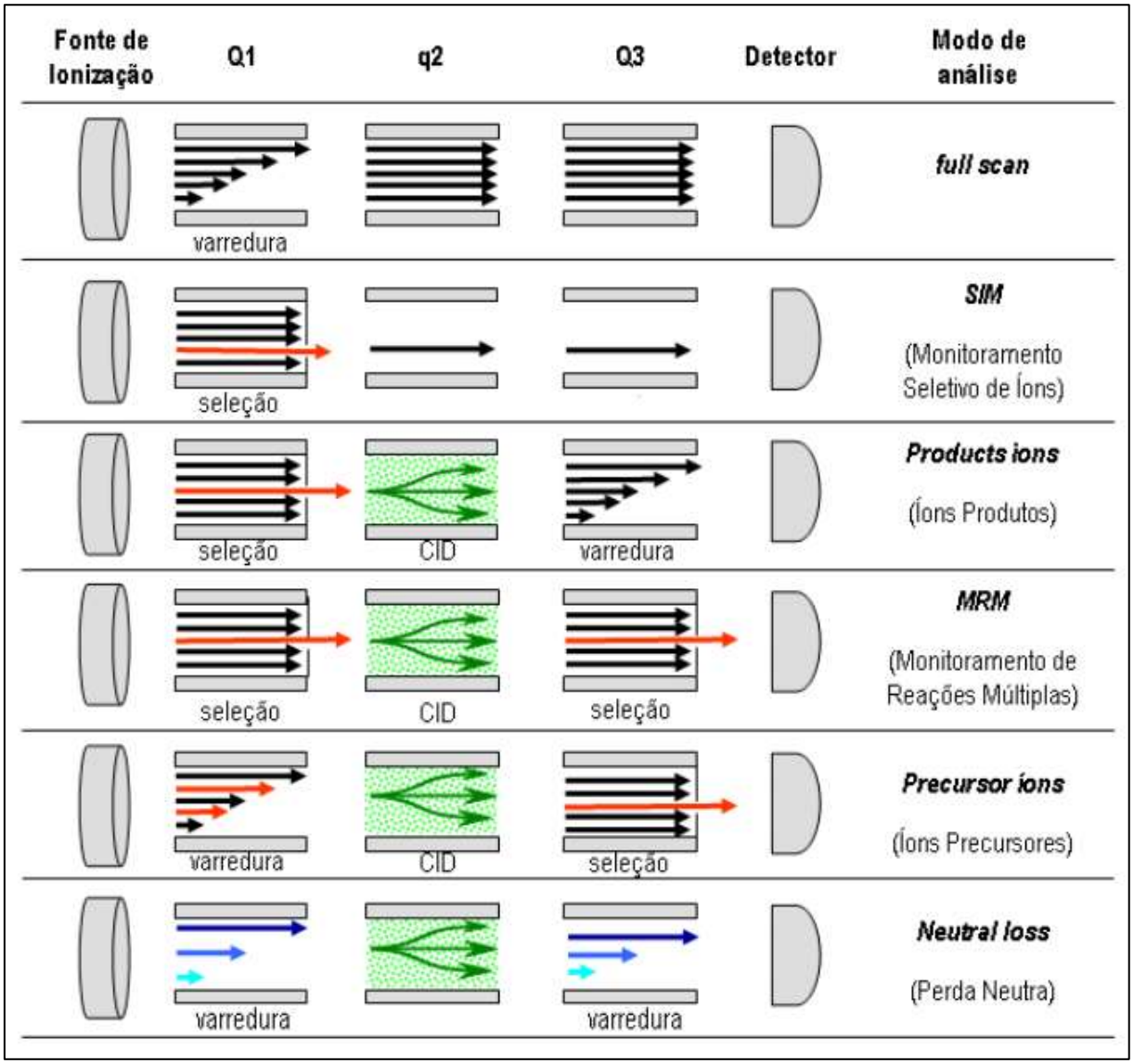
Nas últimas décadas, a espectrometria de massas tem apresentado grandes avanços em sua instrumentação, como novos analisadores de massas e fontes de ionização, possibilitando a aceleração dessa desreplicação. Sistemas de ionização a pressão atmosférica como a Ionização Química a Pressão Ambiente (APCI) e a Ionização por Electrospray (ESI), principalmente quando utilizados em sistemas acoplados a cromatógrafos de alta eficiência (HPLC-MS), possibilitam a análise de moléculas que não seriam possíveis por sistemas convencionais de GC-MS, como moléculas não voláteis, presentes em matrizes biológicas complexas como os extratos brutos de fermentação microbiana[76].

O acoplamento de várias técnicas de análise tem se mostrado um grande avanço nessa área, onde uma configuração instrumental muito utilizada hoje em dia é a utilização de um sistema de cromatografia de ultra eficiência (UPLC®) com detectores ultravioleta-visível de

arranjo de diodo (DAD) acoplados à um espectrômetro de massas sequencial (MS/MS), o qual apresenta dois analisadores de massas sequenciais. Essa configuração permite a obtenção de muitas informações sobre o extrato em uma única e rápida análise, como o perfil cromatográfico, perfil de absorção UV-Vis e perfil do espectro de massas dos compostos contidos na amostra, e a partir da análise sequencial de massas é possível a obtenção de informações estruturais pela fragmentação de íons selecionados[77,78].

Dentre os analisadores de massas, o analisador do tipo quadrupolo é um dos mais versáteis. (Figura 12) A configuração de MS/MS possibilita a realização de analises de forma seletiva, pela fragmentação de um íon em particular dentro de uma mistura, assim podendo identificar padrões de fragmentação da molécula ou de uma classe de compostos em particular, uma vez compostos de uma mesma classe apresentam fragmentações características[79].

Figura 12. Diferentes tipos de varreduras possibilitadas pelos analisadores do triplo quadrupolo.



Outra característica única da espectrometria de massa é possibilidade da diferenciação de diferentes isótopos em um espectro de massas, assim a partir de um padrão isotópico apresentado é possível verificar a presença de elementos não triviais a produtos naturais como halogênios e metais complexados[80].

A análise de massas de alta resolução, como um analisador por tempo de voo (TOF) permite a obtenção de uma massa exata dos compostos analisados, diferentemente dos quadrupolos que apresentam uma massa nominal. Assim, além da diferenciação de isótopos, é possível a análise e diferenciação de isóbaros, o que acelera ainda mais o processo de desreplicação dos compostos presentes em extratos de produtos naturais[81].

Nesse contexto, é possível inferir que a espectrometria de massas é hoje um instrumento de grande importância no processo de descoberta de novos produtos naturais bioativos, sendo uma ferramenta de grande robustez, versatilidade e poder analíticos. Assim, se mostrando de extrema importância na realização e desenvolvimento desse projeto.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho é a identificação, isolamento e caracterização estrutural de substâncias com atividade fitotóxica produzidas por processos fermentativos de actinobactérias isoladas do bioma Caatinga.

2.2. Objetivo Específico

- Realização de bioensaios de fitotoxicidade empregando *Lemna minor* e inibição de germinação de sementes.
- Aplicação da espectrometria de massas na desreplicação dos extratos brutos ativos.
- Isolamento e caracterização estrutural das fitotoxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

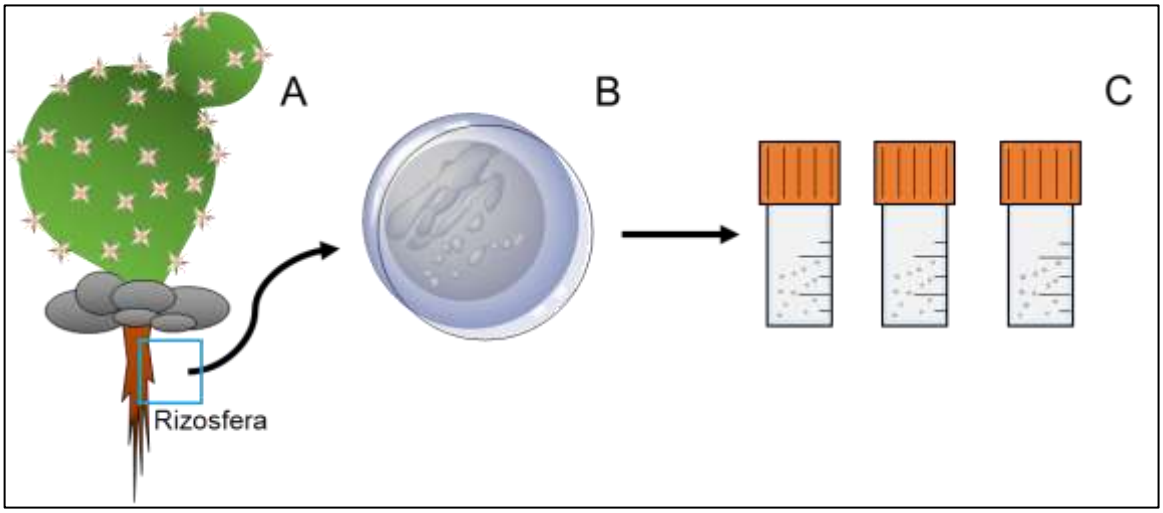
3.1. Preservação e manutenção das actinobactérias

As actinobactérias utilizadas nesse trabalho como fonte dos metabólitos secundários, foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Dr. Itamar Soares de Melo, do Laboratório de Microbiologia Ambiental (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP). Estas actinobactérias foram coletadas e isoladas da rizosfera de cactáceas do bioma Caatinga, tendo seus locais de coleta distribuídos pelos estados de Pernambuco e Bahia.

Os microrganismos foram reativados em placas de BDA (Caldo de batata; Dextrose; Ágar) e GYEA (Dextrose; extrato de levedura; Ágar) (ANEXO A, pg. 108), incubados por 7 dias a 28 °C em estufa microbiológica (Biotech), então uma alçada dos esporos sendo coletada e preservadas em tubos criogênicos (Axygen) contendo 1 mL de solução de glicerol (Synth) 20% e mantidas a -20 °C. Durante o estudo, foi realizada a manutenção das placas contendo as actinobactérias que apresentavam atividades biológicas de interesse, a fim de sempre possuir microrganismos com células viáveis para realização dos ensaios, assim elas eram repicadas regularmente (Figura 13).

Todos os meios de cultivo, meios de preservação e demais instrumentos para manipulação dos microrganismos utilizados nesse estudo foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix) a 120 °C e pressão de 1 atm por 20 minutos. Todos os procedimentos envolvendo qualquer manipulação dos microrganismos foram realizadas em sistema de capela de fluxo laminar (ESCO Class II). Os instrumentos não estéreis utilizados dentro da capela de fluxo laminar foram esterilizados por esterilizador infravermelho (Biotech), também foram utilizadas alças descartáveis estéreis.

Figura 13. Esquema ilustrativo simplificado de coleta (A), isolamento em placa (B) e preservação em tubo criogênico dos microrganismos (C).



3.2. Fermentação microbiológica e obtenção dos extratos orgânicos

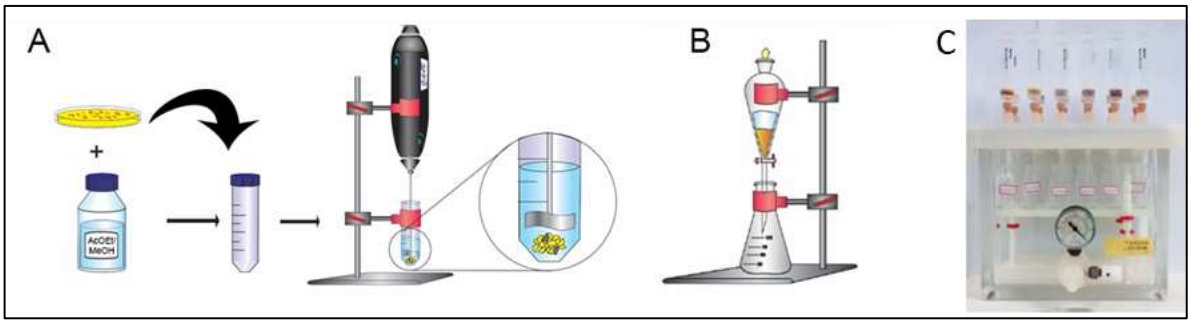
Todos os isolados viáveis foram submetidos a fermentação microbiológica nos meios de cultivo líquido BD (Caldo de batata, dextrose) e GYE (Extrato de levedura, dextrose) (ANEXO A, pg. 108) em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 1/5 do volume do frasco em triplicata. Nos meios de cultivo devidamente esterilizados, foram inoculados com uma alçada de esporos de actinobactéria, e por fim mantidos encubados sob agitação em shaker orbital (Marconi) a 120 rpm e 28 °C por 7 dias. Após esse período, os meios de cultivo foram filtrados a vácuo utilizando funil de Büchner com papel de filtro para separação do caldo fermentado e dos micélios formados. Três diferentes processos de extração foram utilizados para obtenção dos metabólitos secundários, sendo eles extração líquido-líquido (ELL), extração do meio de cultivo sólido (EMS) e extração em fase sólida (SPE) (Figura 14).

A extração líquido-líquido foi feita em um funil de separação adicionando um volume do meio de cultivo fermentado para três volumes de acetato de etila, sendo adicionado um pouco de solução saturada de cloreto de sódio, proporcionando o efeito *salting-out* e reduzindo a formação de emulsões. Esse procedimento foi repetido por três vezes. A fração orgânica obtida foi evaporada em evaporador rotativo (Büch) a 40 °C até a secura obtendo-se o extrato bruto, o qual foi transferido para frascos do tipo penicilina e armazenados em geladeira.

Para a extração diretamente da placa contendo meio de cultivo sólido, a placa contendo a actinobactéria é cortada em pequenos pedaços, introduzida em um tubo Falcon de 50 mL contendo 30 mL de uma solução de acetato de etila/metanol (7:3). Essa mistura é triturada por 5 minutos com o auxílio de um homogeneizador e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos em centrifuga de bancada (NOVA Instruments). O sobrenadante de cerca de 25 mL foi coletado e seco em evaporador rotativo, produzindo o extrato bruto o qual foi armazenado em frasco do tipo penicilina.

A extração em fase sólida, foi realizada utilizando cartuchos Bakerbond 7020-07 contendo uma fase sólida estacionária C18 (1000 mg) (J.T.Baker) e metanol como eluente, empregando um sistema de manifold à vácuo (Chromabond). Os cartuchos C18 foram primeiramente lavados com metanol (3 lavagens com 5 mL de metanol) e em seguida condicionados com água deionizada (3 lavagens com 5 mL de água deionizada). Para a extração dos metabólitos, foram utilizados 20 mL de caldo fermentado sendo eluídos com 20 mL de metanol diretamente em frascos tipo penicilina.

Figura 14. Métodos de extração utilizados: extração da placa de meio sólido (A); extração liquído-liquído (B); extração em cartucho de fase sólida C18 (C).



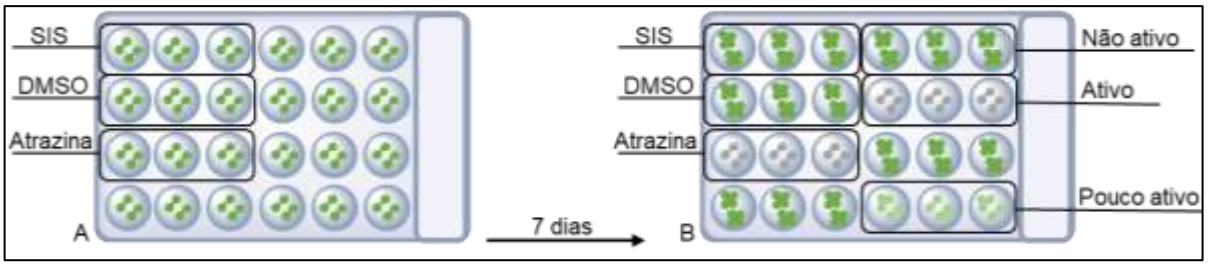
3.3. Bioensaios

3.3.1. Bioensaio de fitotoxicidade contra *Lemna minor*

Para manutenção da *Lemna minor* (Figura 15), as plantas foram mantidas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio SIS[82] (ANEXO A, pg. 108) em pH 6,5 esterilizado por ultrafiltração por filtro 0.22 (Millipore). As plantas eram repicadas em meio SIS a cada 15 dias. O bioensaio foi desenvolvido em placas de 24 poços (Corning) contendo 20 µL do extrato bruto ou fração em DMSO (grau analítico) na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ e mais 1980 µL de meio SIS, resultando em uma concentração final de 100 $\mu g.mL^{-1}$ do extrato bruto por poço. Em cada poço foram adicionadas dois pares de pétalas de *Lemna minor*. Como controle negativo foi utilizado um poço contendo 1980 µL de meio SIS mais 20 µL de DMSO[83]. Como controle positivo, Atrazina (Sigma-Aldrich) na concentração final de 100 $\mu g.mL^{-1}$ foi utilizada. As placas contendo o controle e os bioensaios foram mantidos por 7 dias em câmara de foto-período (16h/8h claro/escuro) a 28 °C. Após esse período a inibição de crescimento foi determinada visualmente com relação aos controles positivos e negativos utilizados, observando-se os efeitos de clorose e/ou necrose das folhas (Figura 16).

Figura 15. Foto da placa contendo as plantas de *Lemna minor* utilizadas neste trabalho

Figura 16. Esquema ilustrativo do bioensaio de fitotoxicidade contra *Lemna minor*.



3.3.2. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para cada poço da placa de Elisa de 24 poços, foram adicionados 1980 µL de meio nutritivo SIS (*Swedish Standard*) mais 20 µL do extrato bruto com uma diluição seriada na faixa de concentração de 10,0 mg. mL^{-1} até 1,25 $mg.mL^{-1}$. Posteriormente, foram adicionados dois pares de pétalas de *Lemna minor* por poço. O ensaio foi realizado em triplicada para cada concentração avaliada. Foram utilizados 20 µL de DMSO em 1980 µL de meio SIS como controle negativo e Atrazina diluída nas mesmas concentrações utilizada como controle positivo.

3.3.3. Bioensaio de germinação

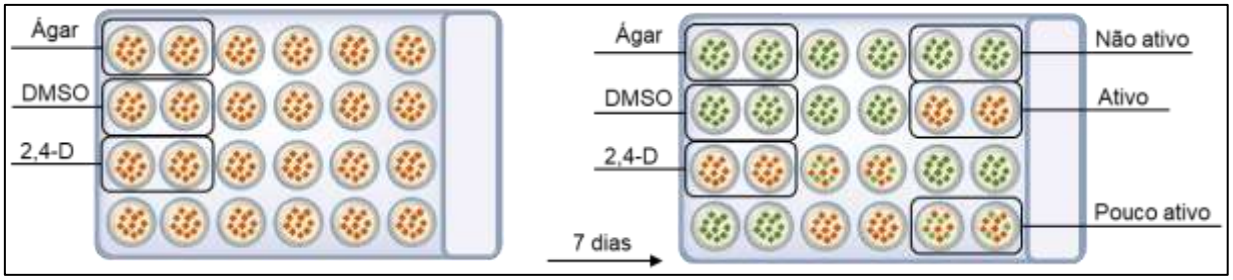
Foram utilizadas sementes de Buva (*Conyza canadenses*), Alface (*Lactuca sativa*), Rúcula (*Eruca sativa*) estas dicotiledôneas, Capim Amargoso (*Digitaria insularis*) e Capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) estas monocotiledôneas.

Para o desenvolvimento do procedimento foram realizados testes utilizando diferentes solventes para se verificar possível interferência do solvente na inibição na germinação. Foram testados os solventes: metanol (MeOH), etanol (EtOH), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrila (ACN), acetona, clorofórmio ($CHCl_3$) e tetrahidrofurano (THF). Desses, somente o MeOH não apresentou inibição de crescimento das sementes, porém, ele não apresenta solubilidade ideal para alguns dos extratos estudados, além disso, o MeOH apresenta inibição de crescimento da *Lemna minor*. Assim, foi abordada uma alternativa na utilização de DMSO, sendo que após sua aplicação no papel de filtro, o mesmo é deixado sob ventilação para evaporação do solvente. Este método se mostrou eficiente e o emprego do DMSO não apresentou influência no crescimento das sementes, além do mais, o DMSO apresenta um alto poder de solubilidade para os extratos brutos obtidos, tornando-se o solvente de primeira escolha para os bioensaios desenvolvidos em nosso laboratório.

O procedimento foi desenvolvido em placas de 24 poços (Corning), onde foram adicionados filtros de papel circulares (12 mm) contendo 20 µL do extrato bruto na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ em DMSO. A placa com os discos de papel foi mantida sob ventilação durante 24 horas para secagem do solvente. Após esse período, 200 µL de solução

de ágar 1,5% são adicionados em cada poço. Após a polimerização da solução de ágar 1,5% e aguardada uma hora, antes de se adicionar aproximadamente 10 sementes de cada planta por poço. Em seguida, a placa é selada com filme plástico e incubada em câmara de foto-período por 7 dias. Os ensaios foram realizados em duplicatas e como controles negativos foram utilizados poços contendo apenas ágar e DMSO evaporado, e como controle positivo foi utilizado o herbicida comercialmente utilizado 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (Figura 17).

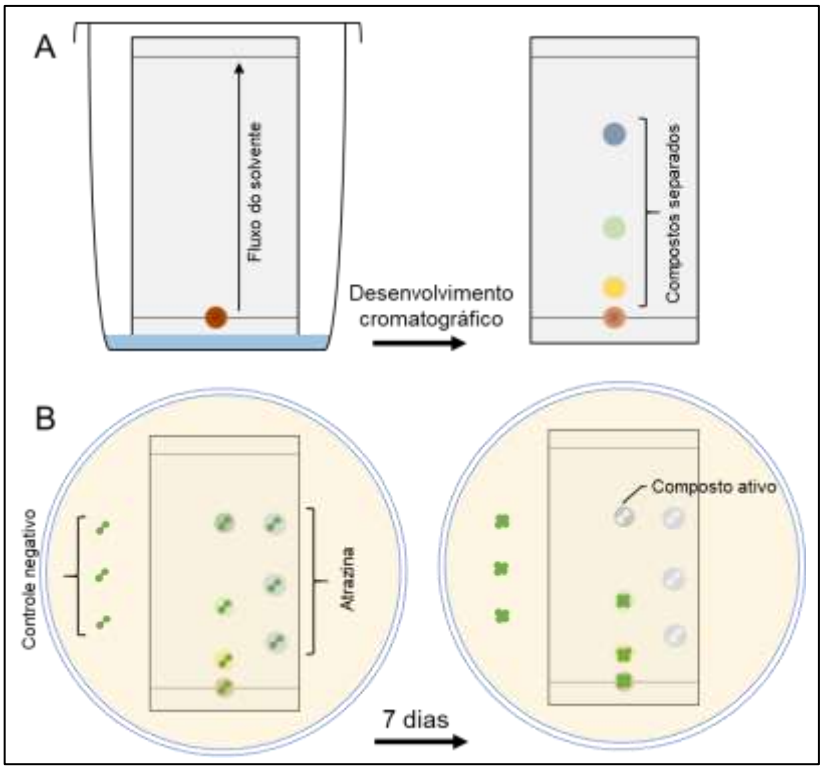
Figura 17. Esquema ilustrativo do ensaio de germinação.



3.3.4. Bioautografia

Em uma placa cromatográfica de Sílica-Gel 60 (Merck), foram adicionados 10 µL do extrato bruto em Metanol (grau analítico) na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$. Uma mistura de acetato de etila e hexano (1:1) (grau analítico) foi empregada como fase móvel. Após o desenvolvimento da placa cromatográfica os compostos foram observados sob luz UV 254 nm e 365 nm. A placa cromatográfica foi recoberta por uma solução de ágar 1,5% (Difco) em uma placa de Petri. Com o ágar solidificado, foi adicionado sobre os compostos separados um par de pétalas de *Lemna minor*. Atrazina nas mesmas condições do extrato bruto foi utilizada para controle positivo. Pétalas de *Lemna minor* foram adicionadas sobre o ágar fora da área da placa cromatográfica, como controle negativo. O ensaio foi mantido por 7 dias em câmara de foto-período (16h/8h claro/escuro) a 28 °C. A inibição do crescimento foi determinada visualmente com relação aos controles utilizados (Figura 18).

Figura 18. Esquema ilustrativo da análise em cromatografia de camada delgada (TLC) (A) e ensaio de bioautografia (B).



3.4. Identificação da actinobactéria CAAT 7-52 por sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA da CAAT 7-52 foi extraído usando o kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante. A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi realizado como descrito por Souza et al. (2017)[84], utilizando o conjunto de oligonucleotídeos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991).

Para sequenciamento dos fragmentos de interesse foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, USA) de acordo com instruções do fabricante. Para isto, os produtos de PCR foram purificados enzimaticamente com FastAP mais Exo I (Life Technologies, San Diego, CA, USA) e quantificados com *low mass* DNA ladder (Invitrogen, USA). O sequenciamento foi realizado em um analisador genético Applied Biosystems 3500, usando os oligonucleotídeos senso e anti-senso utilizados para amplificação do gene. Em adição, outros iniciadores internos foram

utilizados para obter mais do que 1.400 pb de comprimento do gene rRNA 16S[85]. As sequências foram analisadas quanto à qualidade e montadas em *contig* com o *software* Sequencher Gene Codes Corporation (www.genecodes.com) e, por fim, checadas para potencial contaminação utilizando a ferramenta online Decipher[86].

As sequências obtidas foram comparadas com sequências mais próximas depositadas nos bancos de dados do Genbank e os cálculos de identidade das sequências foram obtidos usando o servidor Ez-Taxon[87]. Sequências com alta identidade de nucleotídeos (>97%), compondo linhagens tipo de referência foram selecionadas no GenBank para a montagem das árvores filogenéticas. O alinhamento do conjunto de dados foi realizado com o ClustalW[88] usando o programa MEGA 5.2[89]. Árvores filogenéticas foram inferidas usando os algoritmos Máxima verossimilhança[90], Máxima-Parcimônia[91] e Neighbor-Joining[92]. A matriz de distância evolutiva para a análise Neighbor-Joining foi gerada utilizando o modelo Tamura 3 parâmetros. As topologias das árvores resultantes foram avaliadas por análise de bootstrap[93] com base em 1.000 repetições.

3.5. Isolamento e caracterização dos compostos ativos: métodos cromatográficos e espectrométricos

Foi obtido um pré-inóculo de 400 mL do isolado ativo divididos 8 frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo BD após incubação por 3 dias a 30 °C em shaker rotativo a 120 rpm. O pré-inóculo foi transferido para frasco tipo schott de 10 L contendo 3,6 L de meio de cultivo BD, totalizando 4 L, sendo fermentado por 7 dias a 30 °C em shaker rotativo a 120 rpm. A extração dos metabólitos secundários microbianos foi conduzida utilizando acetato de etila. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo (Buchi) a 40 °C.

O método cromatográfico em escala analítica foi desenvolvido empregando um sistema HPLC Shimadzu com controladora CBM -20A, duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector UV-Vis SPD-20A monitorando os comprimentos de onda de 230 nm e 254 nm, injetor manual Rheodyne, coluna PolymerX RP-100A (250 x 4,6 mm, 10 µm) (Phenomenex, USA). Tempo de eluição de 50 minutos com fase móvel binária de água ultrapura (A) e metanol (B) iniciando com 20% de B até 90%, fluxo de 1,2 $mL.min^{-1}$ e volume de injeção de 20 µL na concentração de 1 $mg.ml^{-1}$ e transposto para o modo preparativo.

O fracionamento em HPLC preparativo foi realizado utilizando sistema HPLC Shimadzu com controladora CBM -20A, duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A5, detector UV-Vis SPD-20A monitorando os comprimentos de onda de 230 nm e 254 nm, injetor manual Rheodyne, coluna PolymerX RP-100A (250 x 21,2 mm, 10 µm) (Phenomenex, USA). Tempo de eluição de 50 minutos com fase móvel binária de água ultrapura (A) e metanol (B) iniciando com 20% de B até 90%, fluxo de 18 mL.min-1 e volume de injeção de 500 µL.

As análises de cromatografia líquida de ultra-performance – espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS), foram realizadas em sistema ACQUITY UPLC H-Class Xevo® TQ-S (Waters Corporation) com fonte Z-spray e ionização por eletrospray, gás de dessolvatação N_2 a 350 ºC com fluxo de 600 $L.h^{-1}$, scan time de 0,5 s em modo *full scan* de *m/z* 180 a *m/z* 1100, com temperatura da fonte a 150 ºC, voltagem do cone 40 V e capilar 3,2 kV para o modo ESI+; e voltagem do cone 40 V e capilar 2,5 kV para o modo ESI-. Condições cromatográficas sendo fase móvel, 80% água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e 20% metanol com 0,1% de ácido fórmico (B) com gradiente de A variando de 80% até 20% de 0 a 12 minutos e retornando a sua condição inicial até 15 minutos com fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, foi utilizada uma coluna Ascentis Express HPLC F5 (10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm) (Supelco Analytical). Tais parâmetros foram utilizados pensando em abranger ao máximo a análise e separação dos compostos presentes nos extratos brutos, sendo a coluna de fase F5 (pentafluorofenilpropil) uma escolha para a separação de compostos similares entre si de maneira eficiente, assim como abrangendo compostos polares e não polares[94]. Os dados foram processados no software MassLynx versão 4.1 (Waters Corporation)[95].

As análises de HR-MS foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS Nexera X_2 TripleTOF 5600^+ (Shimadzu - Kyoto, HO, JP; Sciex - Foster, CA, USA) equipado com sistema de calibração automática CDS (*Calibrant Delivery System*) e fonte de ionização ESI *Turbo-V IonSpray* operando em modo positivo de análise. Os parâmetros do equipamento foram: gás 1: 60 psi; gás 2: 40 psi; curtain gas: 25 psi; voltagem do capilar: 5 kV; voltagem do cone: 80 V; temperatura da fonte: 550 °C; faixa de *m/z*: 150 a 2000. A calibração de massa (erro < 2 ppm) foi realizada por meio da fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) empregando a solução *Positive Calibration Solution* (Sciex - Foster, CA, USA). Condições cromatográficas sendo fase móvel 80% água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico (A) e 20% metanol com 0,1% de ácido fórmico (B) com gradiente de A variando de 80% até 20% de 0 a 12 minutos e retornando a sua condição inicial até 15 minutos com fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, foi utilizada uma coluna Ascentis Express HPLC F5 (10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm) (Supelco Analytical).

Ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizada em um equipamento Bruker DRX 500 e DRX 400 operando a 500/125 e 400/100 MHz, respectivamente para ^{1}H e ^{13}C, onde, δ em partes por milhão relativo ao TMS (tetrametilsilano) e *J* em Hertz. Clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, Sigma-Aldrich) foi utilizado na dissolução das amostras para as análises de ^{1}H, correlação heteronuclear múltipla-quântica (HMQC) e correlação heteronuclear de múltiplas ligações (HMBC). Os espectros foram analisados utilizando o software ACD/NMR Processor Academic Edition versão 12.01 (ACD/Labs) e MestReNova versão 6.0.2 (Mestrelab Research).

3.6. Variação de meio de cultivo para melhor produção dos compostos ativos

Os experimentos foram conduzidos como descrito no item 3.2, pg. 44, utilizando meios de cultivos BD, PMB, ISP-2, Czapeck e Czapeck modificado, utilizando xarope de glicose como substituto a sacarose do meio de cultivo original (ANEXO A, pg. 108), sendo fermentados e extraídos por método líquido-líquido nas mesmas condições descritas no item 3.2 § 2°.

3.7. Monitoramento da produção dos metabólitos secundários com atividade fitotóxica

Em 20 erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de PMB, foram inoculados 5 mL de um pré-inóculo de 3 dias e então fermentados nas mesmas condições já descritas no item 3.2. Assim, o experimento foi monitorado durante um período de 30 dias. A cada 3 dias foi retirado uma alíquota em duplicata, filtrados à vácuo utilizando papel de filtro para separação dos micélios. Após secos, os micélios foram pesados em balança analítica (Celtac). Os extratos obtidos por extração líquido-líquido (item 3.2 § 2°) foram analisados por sistema LC-MS/MS, Nexera X_2 TripleTOF 5600^{+} (Shimadzu - Kyoto, HO, JP; Sciex - Foster, CA, USA) como descrito no item 3.5 § 5°.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos extratos brutos e *screening* de atividade fitotóxica

Para as 76 actinobactérias isoladas foram obtidos 166 extratos brutos empregando três diferentes metodologias de extração. Porém, nem todos os isolados possibilitaram a execução das três metodologias de extração, em virtude das condições experimentais exigidas e a qualidade das placas do meio sólido. Assim, foram obtidos 74 extraídos por extração líquido-líquido (ELL); 65 extraídos por extração em fase sólida (SPE) e 27 extraídos por extração diretamente da placa em meio de cultivo sólido (EMS), esta última sendo utilizada como uma variável no final dos estudos para comparação com alguns dos demais extratos obtidos, assim sendo obtidos em menor quantidade. O acetato de etila foi empregado na extração líquido-líquido devido a sua faixa de polaridade, a qual abrange compostos de baixa e média polaridade. A fim de aumentar a diversidade de compostos extraídos, foram empregadas extrações em fase sólida utilizando cartucho contendo fase extratora C18 e metanol como eluente, proporcionando a extração de compostos de média polaridade. Neste trabalho, também foi avaliada a extração do meio de cultivo sólido, a qual foi realizada empregando uma mistura de acetato de etila/metanol (7:3) para extração de compostos de média-alta polaridade.

Como método de triagem primária para a identificação dos extratos brutos ativos foi utilizado o bioensaio de fitotoxicidade, tendo a planta aquática *Lemna minor* como alvo biológico. Ensaios de fitotoxicidade utilizando a planta aquática monocotiledônea *Lemna minor*, são amplamente utilizados e reconhecidos como ensaios padrão por agências ambientais para monitoramento de qualidade e níveis de poluição de corpos d'água, como também apresenta grande facilidade e reprodutibilidade em seu desenvolvimento e resultados obtidos[96–98]. O bioensaio foi desenvolvido em placas de 24 poços e atrazina foi utilizada como controle positivo, como descrito no item 2.3.1.

Dos 166 extratos brutos submetidos ao bioensaio, 18 extratos líquido-líquido (24,3%), 7 extratos por SPE (10,8%) e 2 extratos por extração da placa sólida (7,4%) (CAAT 10-2 e CAAT 8-15) apresentaram algum nível de atividade fitotóxica contra *Lemna minor*, somando 27 extratos ativos ou, 16,3% do total de extratos obtidos.

Desses 27 extratos ativos, podemos destacar os extratos CAAT 11-12M (extração líquido-líquido e extração em fase sólida), CAAT P11-13 (extração líquido-líquido), CAAT

P11-30 (extração líquido-líquido), AM 33-22 (extração líquido-líquido), BCV3-01F (extração líquido-líquido), Caatinga 219 (extração líquido-líquido e extração em fase sólida), Caatinga 234 (extração líquido-líquido e extração em fase sólida), Caatinga 88 (extração líquido-líquido) e CAAT 7-52 (extração líquido-líquido) sendo este último o que apresentou uma maior rapidez e eficiência em sua ação fitotóxica, quando comparado ao controle positivo, a Atrazina, sendo escolhida para o processo de desreplicação dos compostos ativos.

A Tabela 4 apresenta a relação dos extratos obtidos por ELL e SPE analisados e os resultados de suas atividades fitotóxicas. Os resultados obtidos pela extração da placa sólida não foram significativos para o resultado final uma vez que apresentaram uma baixa atividade quando comparados relativamente aos extratos obtidos por ELL e SPE.

Tabela 4. Relação dos extratos brutos obtidos por ELL e SPE avaliados e suas respetivas atividades fitotóxicas

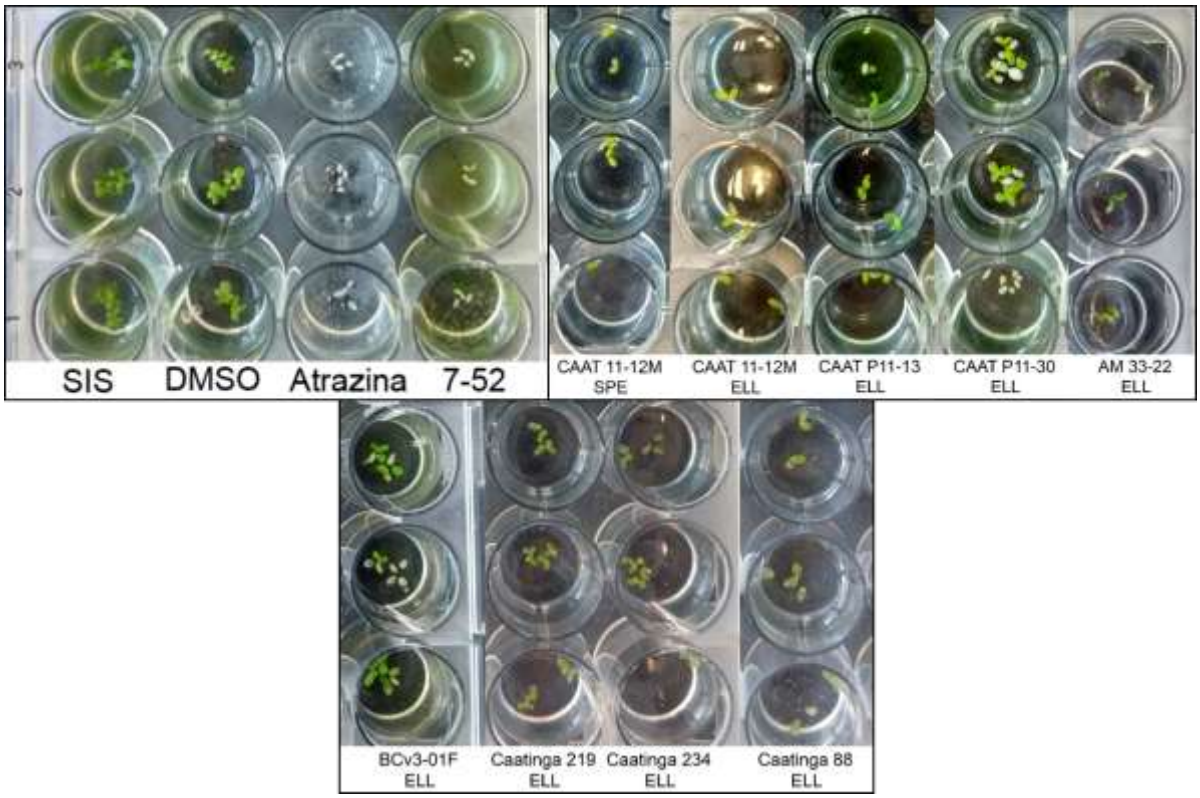
Código Extrato bruto	Atividade do extrato		Código Extrato bruto	Atividade do extrato	
	ELL	SPE		ELL	SPE
AM 33-22	++	--	CAAT P11-13	++	--
AM P18-02	++	--	CAAT P11-24	--	--
BCV1-20F	--	--	CAAT P11-30	++	NO
BCV2-14F	--	--	CAAT P5-06	--	NO
BCV3-01F	++	--	CAAT P5-1	--	--
CAAT 10-2	--	--	CAAT P5-118	--	NO
CAAT 11-12 M	++	++	CAAT P5-129 (a)	NO	--
CAAT 11-3	--	--	CAAT P5-129 (b)	--	--
CAAT 1-54	++	NO	CAAT P5-133	--	--
CAAT 18-47	++	++	CAAT P5-14	--	--
CAAT 2-11	--	--	CAAT P5-16	--	--
CAAT 2-49	--	+-	CAAT P5-18	--	--
CAAT 5-35	++	NO	CAAT P5-25	--	--
CAAT 5-46	--	NO	CAAT P8-10	--	NO
CAAT 7-52	++	NO	CAAT P8-111	--	--
CAAT 8-14	--	NO	CAAT P8-116	--	--
CAAT 8-15	--	+-	CAAT P8-126	--	--
CAAT 8-18	++	--	CAAT P8-128	--	--
CAAT 9-5	NO	NO	CAAT P8-15	--	--
CAAT P11-10	--	--	CAAT P8-3	--	--
CAAT P11-109	--	--	CAAT P8-68	--	+-
CAAT P11-127	--	--	CAAT P8-77	--	--

Código Extrato bruto	Atividade do extrato	
	ELL	SPE
CAAT P8-78	++	--
CAAT P8-80	--	--
CAAT P8-99	--	--
Caatinga 138	--	--
Caatinga 211	--	--
Caatinga 219	++	++
Caatinga 234	++	++
Caatinga 27	--	--
Caatinga 79	--	--
Caatinga 88	++	NO
CAN V1-20	--	--
CAN V1-26	--	--
CAN V1-29F	--	--
CAN V1-46F	--	--
CAN V1-50F	--	--
CAN V1-56	--	--
CAN V1-58	--	--
CAN V1-68F	--	--
CAN V1-74F	--	--
CAN V2-26F	--	--
CAN V2-33F	--	--
CAN V2-37F	--	--
P1-3-1	--	--
P8-19	--	--
PAP 26-14	++	--
PAP 26-16	--	--
PAP 26-20	--	--
PAP-2605	++	--
PAP-2615	--	--
PAP-2618 A	++	--
PAP-2618 B	--	--
PAP-2622	--	--

Sem atividade (--); Atividade não significativa (+-); Atividade positiva (++); Extrato não obtido (NO). Extração líquido-líquido (ELL); Extração em fase sólida (SPE). Caatinga (CAAT/Caatinga); AM (Amazônia, solo de floresta); BCV (Bertioga, sedimento de mangue); PAP (Santarém, solo de floresta); CAN (Cananéia, sedimento de mangue).

Analisando os extratos ativos por ELL e SPE é possível observar uma maior eficiência na obtenção de compostos ativos por ELL, uma vez que comparando com os extratos que apresentaram atividade significativa obtidos por SPE, os mesmos apresentaram atividade por ELL, mostrando a presença de compostos com menor polaridade em ambos os extratos. Somado a maior atividade apresentada pelos extratos ELL no total apresentado, é possível dizer que essa extração é mais eficiente para a obtenção de compostos com atividade fitotóxica quando comparado diretamente com extratos SPE.

Figura 19. Extratos brutos com atividade fitotóxica contra *Lemna minor*.



Os extratos BcV3-01F, AM 33-22, CAAT 11-12M, CAAT 7-52 e CAAT P11-13, foram os mais promissores e foram selecionados para os ensaios posteriores de inibição de germinação de sementes (Figura 19).

4.2. Ensaio de germinação

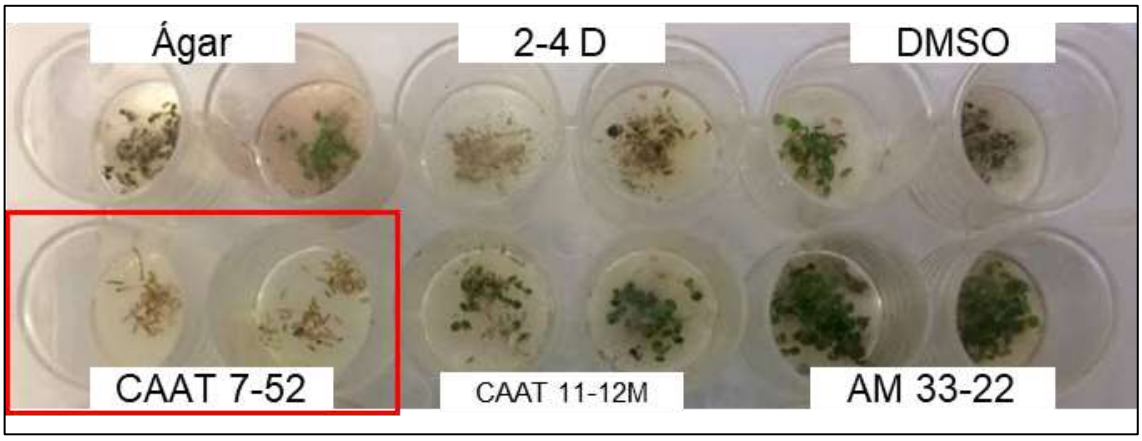
Para esses ensaios foram utilizadas sementes de Buva (*Conyza canadensis*), Alface (*Lactuca sativa*), Rúcula (*Eruca sativa*) como testes para dicotiledôneas. Capim Amargoso

(*Digitaria insularis*) e Capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica*) para testes de monocotiledôneas. Escolhidas para uma diversidade entre plantas mono e dicotiledôneas a fim de se verificar possível seletividade na atividade fitotóxica, bem como, a atividade contra plantas-daninhas comuns na agricultura brasileira, como a buva, capim-amargoso e capim pé-de-galinha. Os extratos utilizados e suas atividades são mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Extratos brutos e suas atividades apresentadas no ensaio de germinação.

Extrato (ELL)	Atividade
CAAT 7-52	Buva, Alface e Rúcula
BcV3-01F	Alface
CAAT 11-12M	Não ativa
AM 33-22	Não ativa
CAAT P11-13	Não ativa
CAAT P5-129	Não ativa
CAAT 2-11	Não ativa
CAAT P8-116	Não ativa
CAAT P8-99	Não ativa
CAAT P8-111	Não ativa
CAAT P8-3	Não ativa

Figura 20. Ensaio de germinação contra Buva (*Conyza canadensis*) mostrando atividade do extrato bruto CAAT 7-52.



Dos extratos analisados o que se mostrou mais eficiente foi extrato bruto CAAT 7-52 (Figura 20), o qual apresentou atividade contra alface, rúcula e buva, sendo esta última a mais proeminente e interessante para nossos estudos.

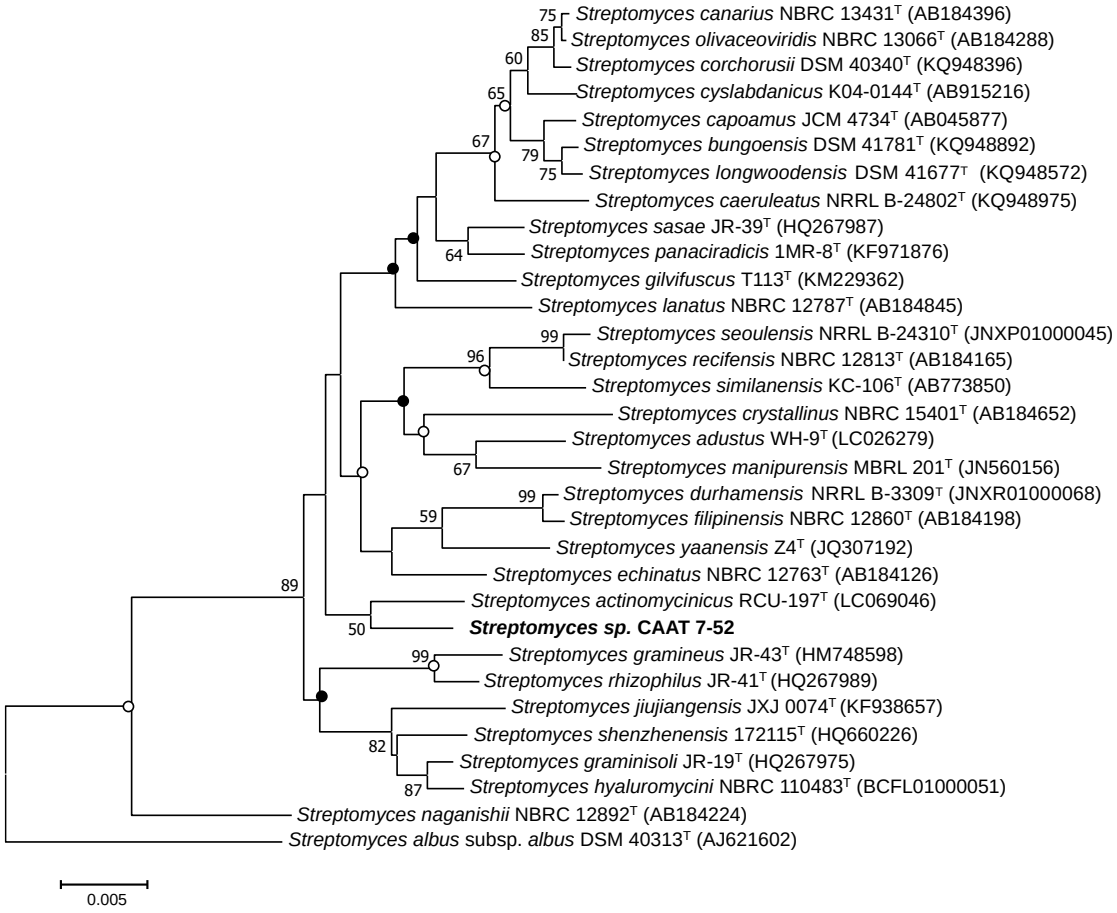
Esses resultados se mostram muito promissores em razão da dificuldade no controle da buva na agricultura, pois essa planta-daninha apresenta uma alta produção de sementes que são facilmente propagadas pelo vento, sendo que lavouras com grandes infestações podem necessitar de 3 a 5 anos de manejo correto até a diminuição dessa infestação[99]. Outro fator relevante é que a buva tem apresentado resistência aos principais herbicidas empregados no cultivo de soja e milho no Brasil.

Tendo em vista a maior e mais rápida atividade fitotóxica contra *Lemna minor* e a maior atividade de inibição de germinação de sementes apresentada pelo extrato CAAT 7-52, assim como uma maior reprodutibilidade apresentada durante os ensaios. Essa actinobactéria foi escolhida como foco principal para os experimentos de desreplicação dos compostos ativos.

4.3. Identificação da actinobactéria CAAT 7-52 por sequenciamento do gene 16S rRNA

Pode ser visto na árvore filogenética usando o algoritmo de Neighbor-Joining (Figura 21) que o isolado CAAT 7-52 forma uma distinta linha filética na árvore do gene 16S rRNA de *Streptomyces*. O isolado é filogeneticamente relacionado com a linhagem tipo de *Streptomyces actinomycinicus* RCU-197^{T}, compartilhando 99,0% de identidade de sequência do gene 16S rRNA. A estreita relação entre a linhagem CAAT 7-52 e a linhagem tipo de *S. actinomycinicus* RCU-197^{T} também é apoiada por um moderado valor de *bootstrap* nas árvores de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Círculos brancos indicam que os nós correspondentes também foram recuperados na árvore de máxima verossimilhança e máxima parcimônia; e círculos pretos indicam nós recuperados apenas nas árvores de máxima verossimilhança e Neighbor-Joining. A linhagem tipo de *Streptomyces albus subsp. albus* DSM 40313T foi utilizada como grupo externo.

Figura 21. Árvore Neighbor-Joining mostrando a posição filogenética da linhagem CAAT 7-52 em relação aos membros do gênero Streptomyces.



Maiores detalhes dos valores de identidade de sequências do gene 16S rRNA de CAAT 7-52 estão representados na Tabela 6.

Tabela 6. Cálculos de identidade de sequências entre CAAT 7-52 e seus vizinhos filogenéticos mais próximos usando o servidor Ez-taxon.

Espécie	**Acesso (GenBank)**	**Identidade (%)**	**Diferença/total de nucleotídeos**
Streptomyces actinomycinicus RCU-197	LC069046	99,00	14/1394
Streptomyces echinatus NBRC 12763	AB184126	98,88	16/1432
Streptomyces lanatus NBRC 12787	AB184845	98,48	22/1447
Streptomyces shenzhenensis 172115	HQ660226	98,34	24/1447
Streptomyces graminisoli JR-19	HQ267975	98,13	27/1447
Streptomyces sasae JR-39	HQ267987	98,12	27/1435
Streptomyces canarius NBRC 13431	AB184396	98,06	28/1447
Streptomyces gilvifuscus T113	KM229362	98,05	28/1439
Streptomyces cyslabdanicus K04-0144	AB915216	98,00	29/1448
Streptomyces olivaceoviridis NBRC 13066	AB184288	98,00	29/1447

Streptomyces rhizophilus JR-41	HQ267989	97,93	30/1447
Streptomyces hyaluromycini NBRC 110483	BCFL01000051	97,92	30/1445
Streptomyces crystallinus NBRC 15401	AB184652	97,91	30/1438
Streptomyces gramineus JR-43	HM748598	97,86	30/1403
Streptomyces corchorusii DSM 40340	KQ948396	97,86	31/1448
Streptomyces panaciradicis 1MR-8	KF971876	97,86	31/1448
Streptomyces similanensis KC-106	AB773850	97,79	32/1448
Streptomyces durhamensis NRRL B-3309	JNXR01000068	97,79	32/1448
Streptomyces jiujiangensis JXJ 0074	KF938657	97,79	32/1447
Streptomyces caeruleatus NRRL B-24802	KQ948975	97,79	32/1446
Streptomyces filipinensis NBRC 12860	AB184198	97,79	32/1445
Streptomyces naganishii NBRC 12892	AB184224	97,78	32/1444
Streptomyces yaanensis Z4	JQ307192	97,76	32/1429
Streptomyces recifenses NBRC 12813	AB184165	97,71	33/1438
Streptomyces adustus WH-9	LC026279	97,65	34/1448
Streptomyces seoulensis NRRL B-24310	JNXP01000045	97,58	35/1448
Streptomyces bungoensis DSM 41781	KQ948892	97,58	35/1448
Streptomyces capoamus JCM 4734	AB045877	97,58	35/1448
Streptomyces longwoodensis DSM 41677	KQ948572	97,58	35/1448

Sustentado pelos dados de cálculo de identidade de sequências e reconstruções filogenéticas, bem como, por características morfológicas após crescimento em meios sólido onde apresenta coloração amarelo esverdeado com hifas aéreas de cor branco acinzentado (Figura 22) e líquido, é evidente que CAAT 7-52 é um membro do gênero *Streptomyces*. Porém, mais estudos taxonômicos devem ser conduzidos com o isolado CAAT 7-52, como por exemplo, uma abordagem de taxonomia polifásica, envolvendo dados de hibridização, para determinar o correto posicionamento filogenético deste novo isolado.

Figura 22. Isolado CAAT 7-52 em meio de cultivo sólido BDA.

4.4. Desreplicação e fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto CAAT 7-52 empregando LC-MS/MS

4.4.1. Fracionamento em escala preparativa do extrato CAAT 7-52 guiado por bioensaio.

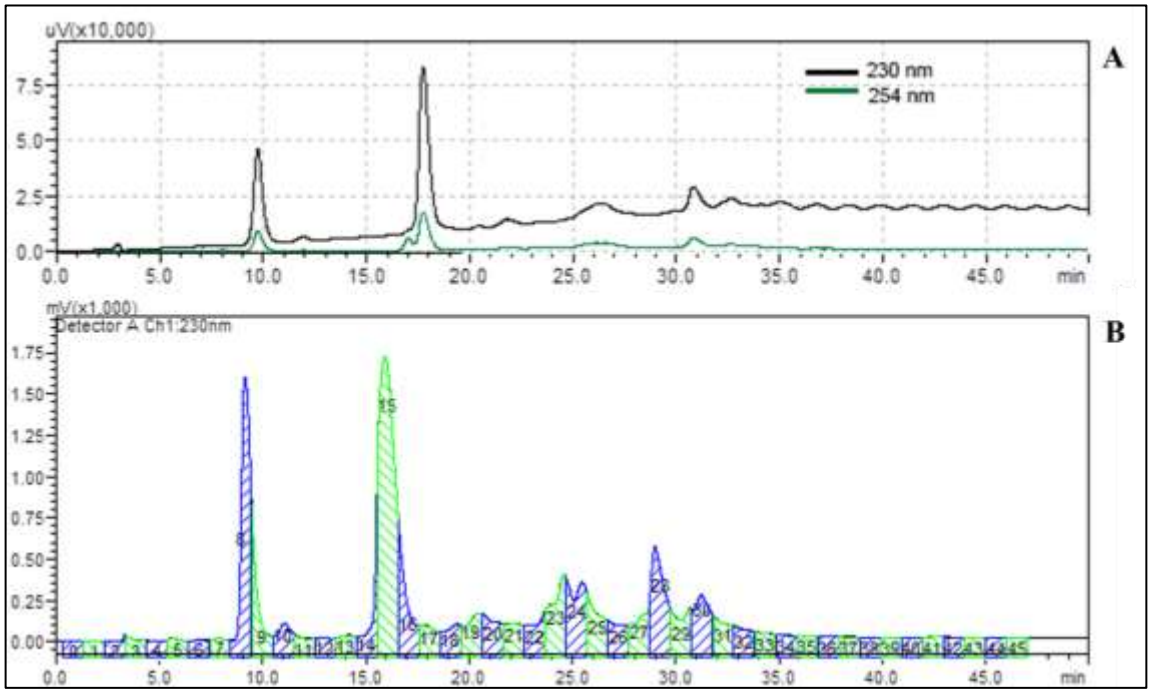
A princípio foram preparados 200 mL de pré-inóculo em meio de cultivo BD em Erlenmeyer 1L, para isso foi retirada uma alçada da actinobactéria crescida com 7 dias em placa de Petri contendo meio de cultivo sólido BDA. O pré-inóculo foi cultivado por 3 dias em shaker rotativo a 120 rpm e 30° C. Em 10 frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 180 mL de meio de cultivo BD foram inoculados 20 mL do pré-inóculo totalizando 200 mL em cada Erlenmeyer.

Após 7 dias de fermentação, o meio de cultivo foi filtrado e submetido a sucessivas extrações com acetato de etila, para a obtenção do extrato bruto contendo os metabólitos de interesse. Esta extração resultou em 330 mg de extrato bruto. O extrato bruto obtido foi submetido a um novo ensaio de atividade contra *Lemna minor*, onde foi confirmada a sua atividade fitotóxica. Com a confirmação da atividade foi desenvolvido um método cromatográfico em escala analítica empregando um sistema HPLC Shimadzu UV-Vis SPD-20A. (Figura 23A).

A partir desta análise, o método analítico foi transposto para uma escala preparativa, utilizando o mesmo cromatógrafo com um coletor automático de frações onde o extrato foi

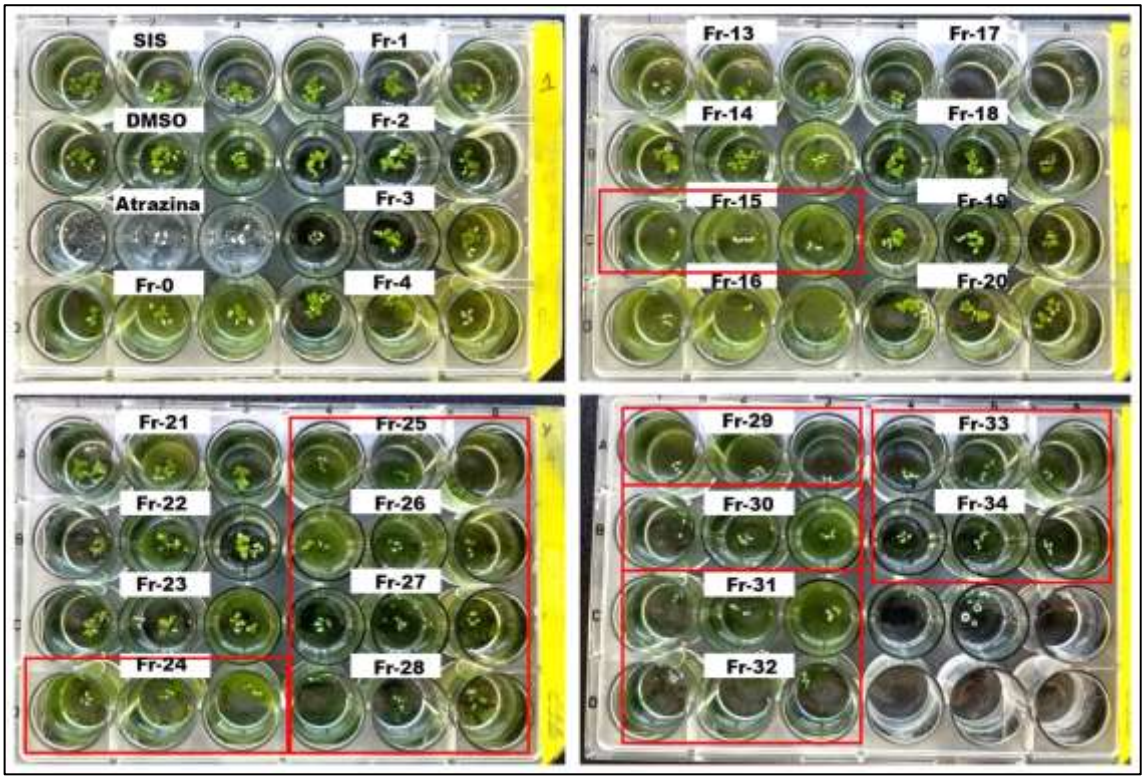
fracionado em uma coluna preparativa polimérica Phenomenex PolymerX RP-100A (250 x 21,2 mm, 10 µm) com um volume de injeção de 500 µL (~150 mg), onde foram coletadas 45 frações (Figura 23B).

Figura 23. Comparação entre os cromatogramas LC-UV do extrato bruto CAAT 7-52. A) Cromatograma LC-UV analítico; B) Cromatograma LC-UV preparativo.



Todas as 45 frações obtidas foram submetidas a um novo bioensaio de fitotoxicidade contra *Lemna minor* para a identificação da fração ativa (Figura 24).

Figura 24. Bioensaio de fitotoxicidade das frações do extrato CAAT 7-52 contra *L. minor*.



Como pode ser observado na Figura 24, as frações 15, 16, 24 a 34 apresentaram atividade fitotóxica após 7 dias de cultivo, sendo as frações 15 e 30 as que apresentaram atividade mais pronunciada devido a rapidez no aparecimento do efeito de clorose das folhas de *Lemna minor*.

4.4.1. Análise de LC-MS/MS e RMN de ^{1}H das frações ativas selecionadas

As frações F15 e F30, as quais apresentaram maior atividade fitotóxica foram analisadas novamente pelo sistema LC-MS/MS, na qual os íons selecionados foram fragmentados em uma câmara de colisão e seus fragmentos analisados.

A fração 15 apresentou os íons de *m/z* 139 (ESI+) e 137 (ESI-) (Figura 25), tendo a massa molecular de 138 Da. O íon de *m/z* 139 foi submetido a experimentos de CID em modo positivo para obtenção de características estruturais (Figura 26).

Figura 25. Espectro em modo positivo e negativo do íon *m/z* 139 presente na fração 15.

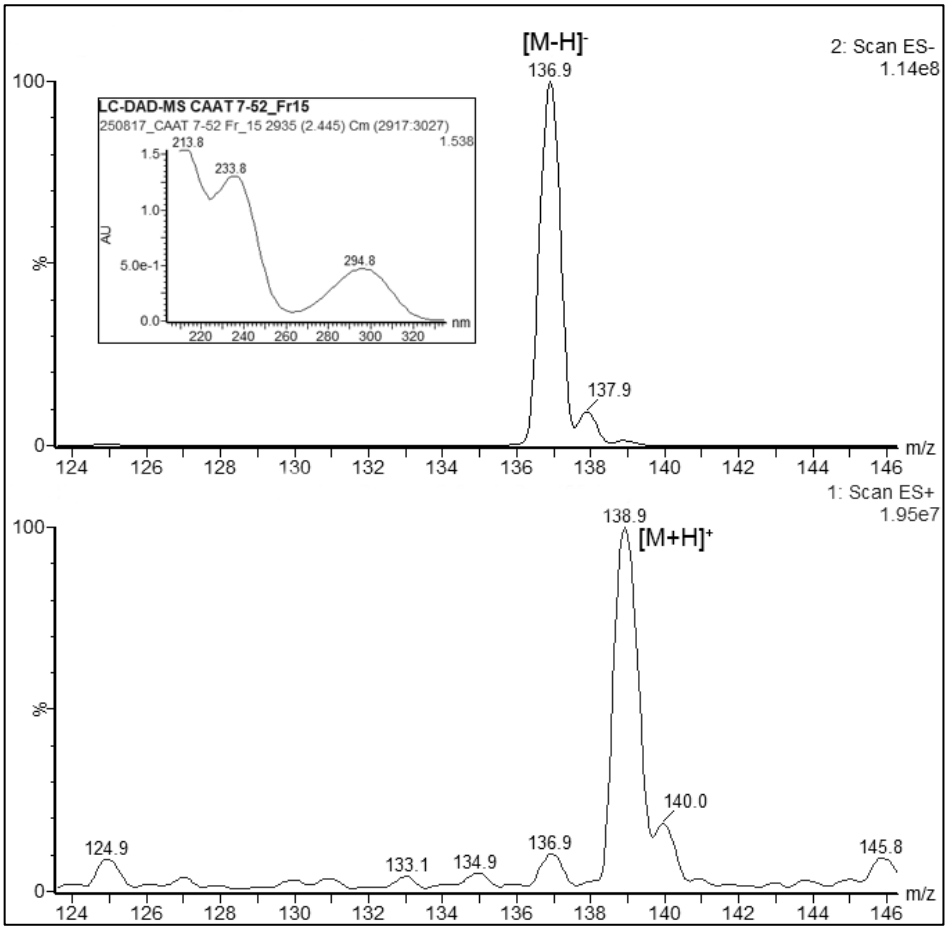
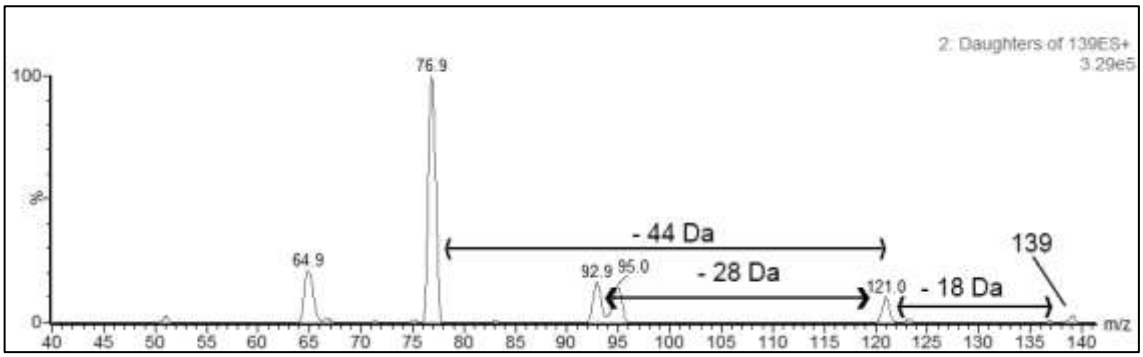


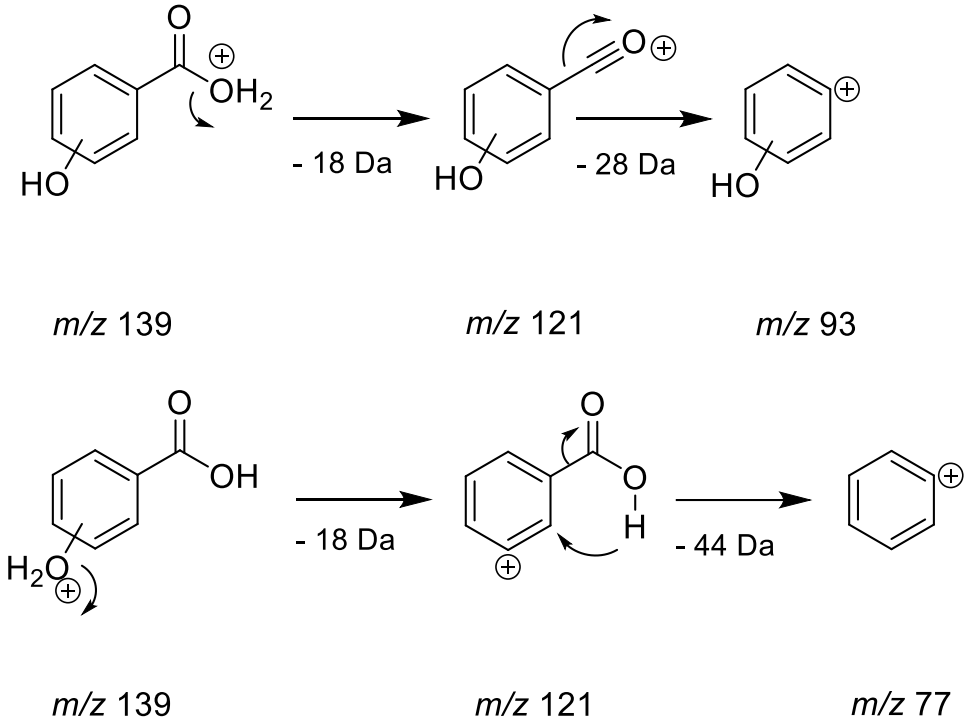
Figura 26. Espectro de íons produto do íon *m/z* 139 em modo positivo. Energia de colisão de 20 eV.



A partir do padrão de fragmentação observado no espectro de íons produtos, foi possível observar perdas de 18 Da (H_2O), 28 Da (CO) e 44 Da (CO_2), assim como a formação do íon de *m/z* 77, o qual é indicativo de anel aromático. Estas informações sugerem que o composto em

estudo pode ser um derivado hidroxilado do ácido benzoico[100]. Na Figura 27 é apresentada uma proposta de fragmentação para o composto.

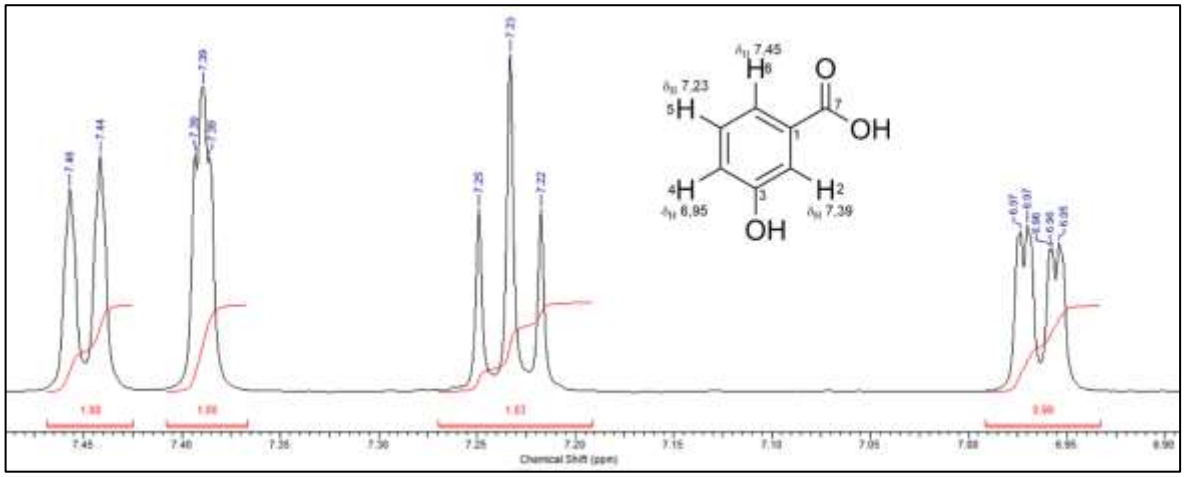
Figura 27. Proposta de fragmentação do íon m/z 139.



Os espectros de RMN de ^{1}H, HMQC e HMBC foram realizados utilizando metanol e clorofórmio deuterados.

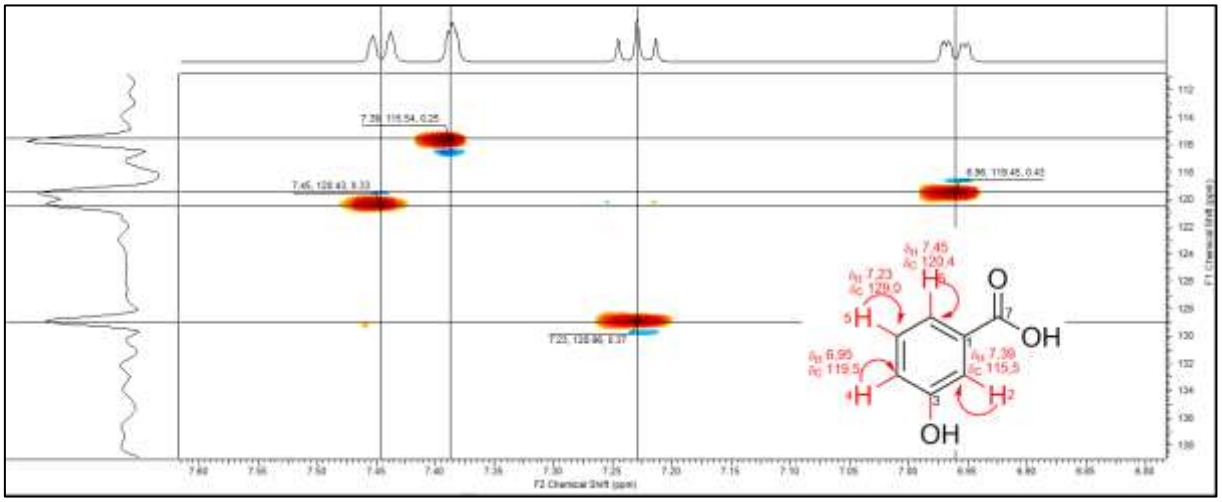
O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 28) apresentou sinais na região de sistemas aromáticos. Em δ 6,96 um duplo dupleto (*J*= 2,00 Hz e *J*= 8,00 Hz) integrando para um, em δ 7,23 um tripleto (*J*= 8,00 Hz) integrando para um, em δ 7,39 um tripleto (*J*= 2,00 Hz) integrando para um e em δ 7,45 um dupleto (*J*= 8,00 Hz) integrando para um.

Figura 28. Espectro de ^{1}H da fração 15 do extrato CAAT 7-52.



No espectro de correlação HMQC (Figura 29) foi possível observar a presença de 4 carbonos metínicos (CH) os quais correspondem ao sistema aromático. Fazendo a correlação entre os espectros obtidos foi possível atribuir que este composto apresenta um sistema aromático 1,3 di-substituído.

Figura 29. Espectro de correlação HMQC da fração 15 do extrato CAAT 7-52.



No espectro de HMBC (Figura 30) é possível observar as correlações entre os hidrogênios e carbonos a longa distância (Figura 31), onde foi observada a presença de dois carbonos não hidrogenados e um carbono carbonílico a partir das correlações entre o hidrogênio δ_H 6,9 e o carbono δ_C 115,5 (^{2}J); δ_H 7,2 e os carbonos δ_C 157,2 (^{3}J), δ_C 131,0 (^{3}J) e δ_C 168,0

(^4J); δ_H 7,4 e os carbonos δ_C 157,2 (^4J) e δ_C 168,0 (^3J); δ_H 7,4 e os carbonos δ_C 157,2 (^3J) e δ_C 168,0 (^3J).

Figura 30. Espectro de correlação HMBC da fração 15 do extrato CAAT 7-52.

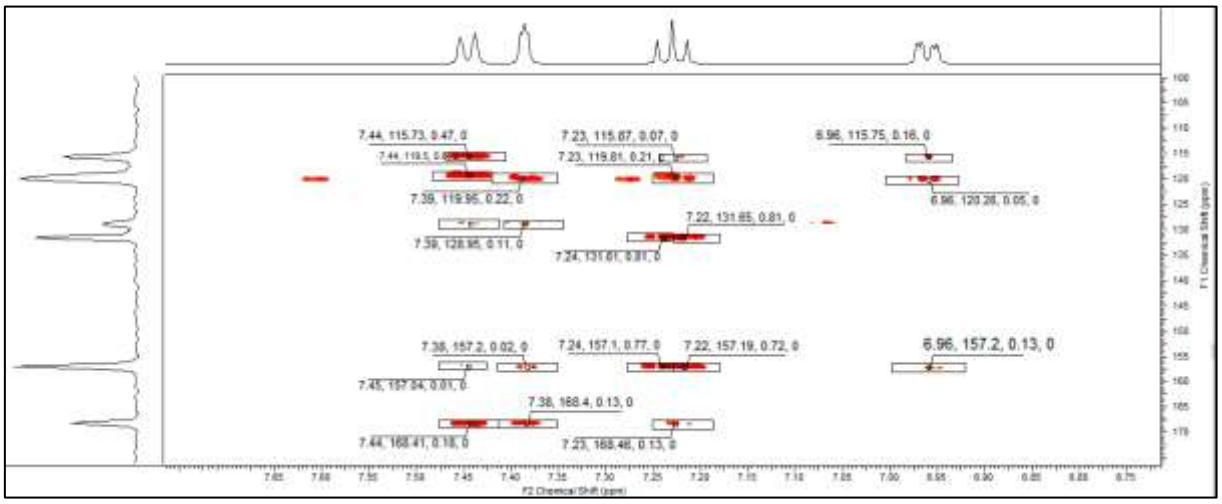


Figura 31. Correlações de HMBC da fração 15 do extrato CAAT 7-52.

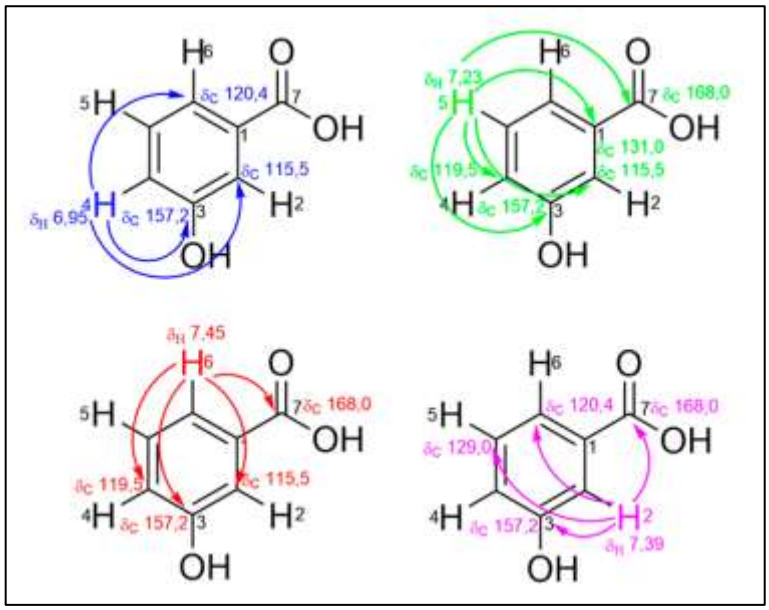
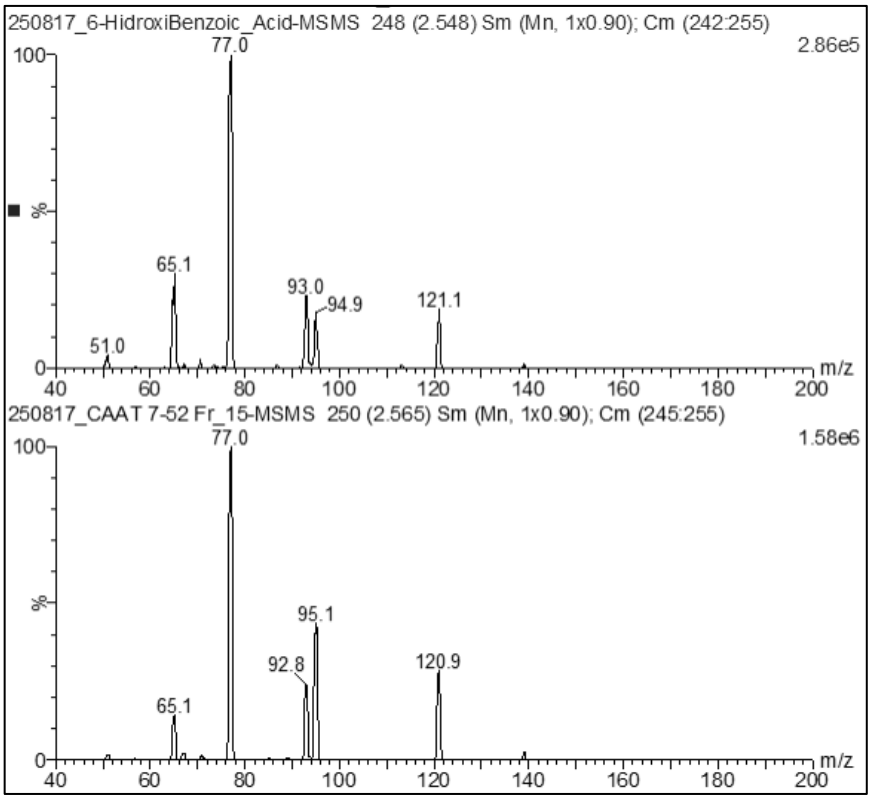


Figura 32. Espectro de íons produtos em modo positivo do íon *m/z* 139. A) Padrão de ácido 3-hidroxibenzóico. B) Fração 15. Energia de colisão de 20 eV.



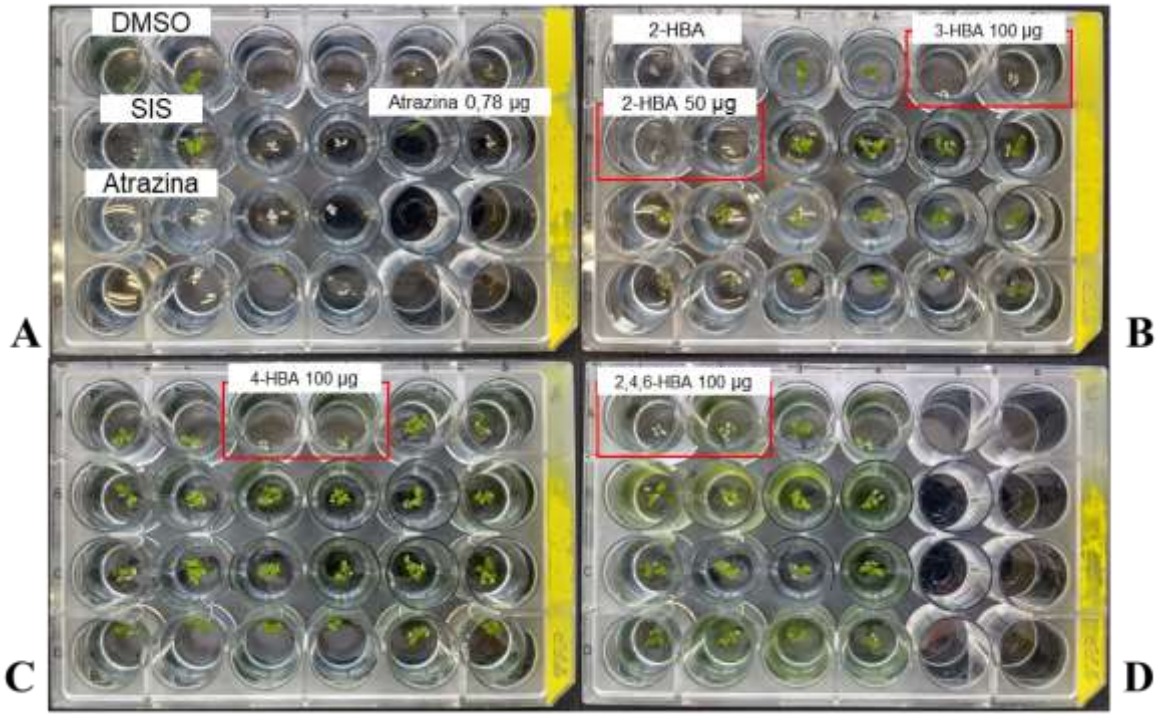
A partir dos dados obtidos por espectrometria de massas mostrando os íons *m/z* 139 (ESI+) e *m/z* 137 (ESI-), a fragmentação do íon *m/z* 139 (ESI+) e sua comparação com o padrão (Figura 32), bem como as correlações obtidas por ressonância magnética heteronuclear de ^{1}H e ^{13}C. É possível afirmar que o composto ativo presente na fração 15 do extrato CAAT 7-52 é o ácido 3-hidroxibenzóico, composto o qual não está descrito na literatura com atividade fitotóxica. Sua produção por microrganismos é atribuída ao fungo *Penicillium griseofulvum* e sua extração de plantas como a *Hydrangea macrophylla* (Hortência) e a *Citrus paradisi* (Toranja)[101].

4.4.2. Ensaio de atividade fitotóxica para outros derivados do ácido benzoico.

A fim de se obter uma comparação da possível atividade fitotóxica de outros derivados do ácido benzoico, foram realizados ensaios de fitotoxicidade a partir de uma solução inicial de concentração 10 $mg.mL^{-1}$, com diluições seriadas até 0,078 $mg.mL^{-1}$ utilizando os ácidos: 2-

hidroxibenzóico (ácido salicílico), 3-hidroxibenzóico (padrão), 4-hidroxibenzóico e 2,4,6-trihidroxibenzóico. Todos padrões Sigma-Aldrich. (Figura 33).

Figura 33. Bioensaio com padrões de derivados de ácido benzóico. A) Controles; B) ácido 2-hidroxibenzóico (ácido salicílico), ácido 3-hidroxibenzóico (padrão), C) ácido 4-hidroxibenzóico e D) ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico



Todos os ácidos analisados apresentaram algum grau de atividade fitotóxica na maior concentração utilizada de 100 µg por poço. No entanto, o ácido 2-hidroxibenzóico apresentou atividade fitotóxica na concentração de 50 µg por poço, mostrando um maior poder fitotóxico.

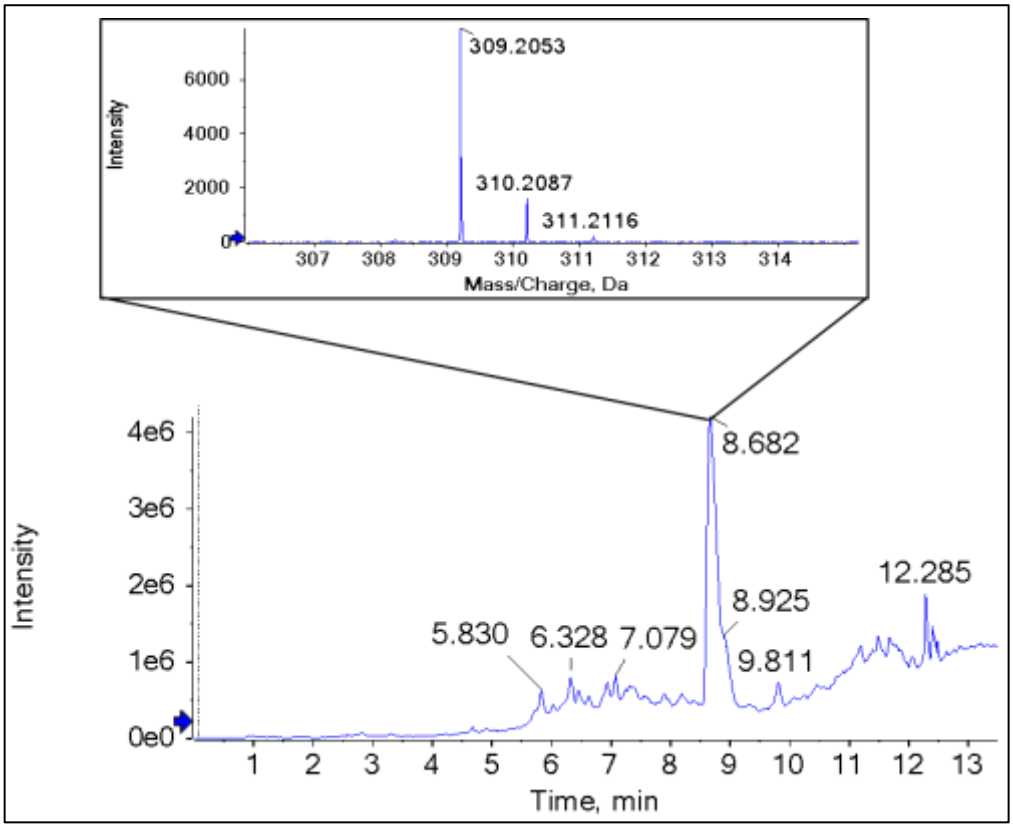
Estudos do efeito fitotóxico do ácido 2-hidroxibezóico e do ácido benzóico contra a alga *Chlamydomonas reinhardtii*, mostraram que a aplicação do ácido 2-hidroxibenzóico na concentração de 600 µM, reduziu um 98% a atividade foto-sintética do foto-sistema II, assim como para o ácido benzóico[102,103], corroborando com os efeitos observados nesse bioensaio.

4.4.3. Desreplicação da fração ativa 30

O espectro de ESI da fração 30 apresentou os íons de *m/z* 309 $[M+H]^+$ e 331 $[M+Na]^+$, o íon de *m/z* 309 foi fragmentado por CID com energia de colisão de 20 eV, o espectro de íons produto obtido apresentou um padrão de fragmentação complexo (Figura 35A). Utilizando buscas em bancos de dados como *Dictionary of Natural Products* (DNP), utilizando dados obtidos pela identificação da actinobactéria como a fonte biológica *Streptomyces*, e através das análises LC-UV-MS com faixa de massa molecular entre 308 Da e 309 Da e absorção máxima no UV entre 210 nm e 220 nm, foram listados alguns possíveis compostos, como a 4-Deoxi, *O*-de-Me Rubiginona A_1, Hidroisoflavona B, Albociclina e 3*R*-Cloro, 6,8-dihidroxi α-Lapachona, esta última descartada devido a presença de cloro, uma vez que os espectros de massas não apresentaram padrão isotópico de cloro.

Também foram realizadas análises por espectrometria de massas de alta resolução utilizando um sistema HPLC Shimadzu Nexera X2 com coluna Ascentis Express HPLC F5 (10 cm x 2,1 mm, 2,7 µm) (Supelco Analytical). acoplado a um sistema de espectrometria de massas AB Sciex TripleTOF 5600^+ com ionização por eletrospray operando em modo positivo.

Figura 34. Cromatograma LC-MS-TOF do extrato bruto CAAT 7-52.

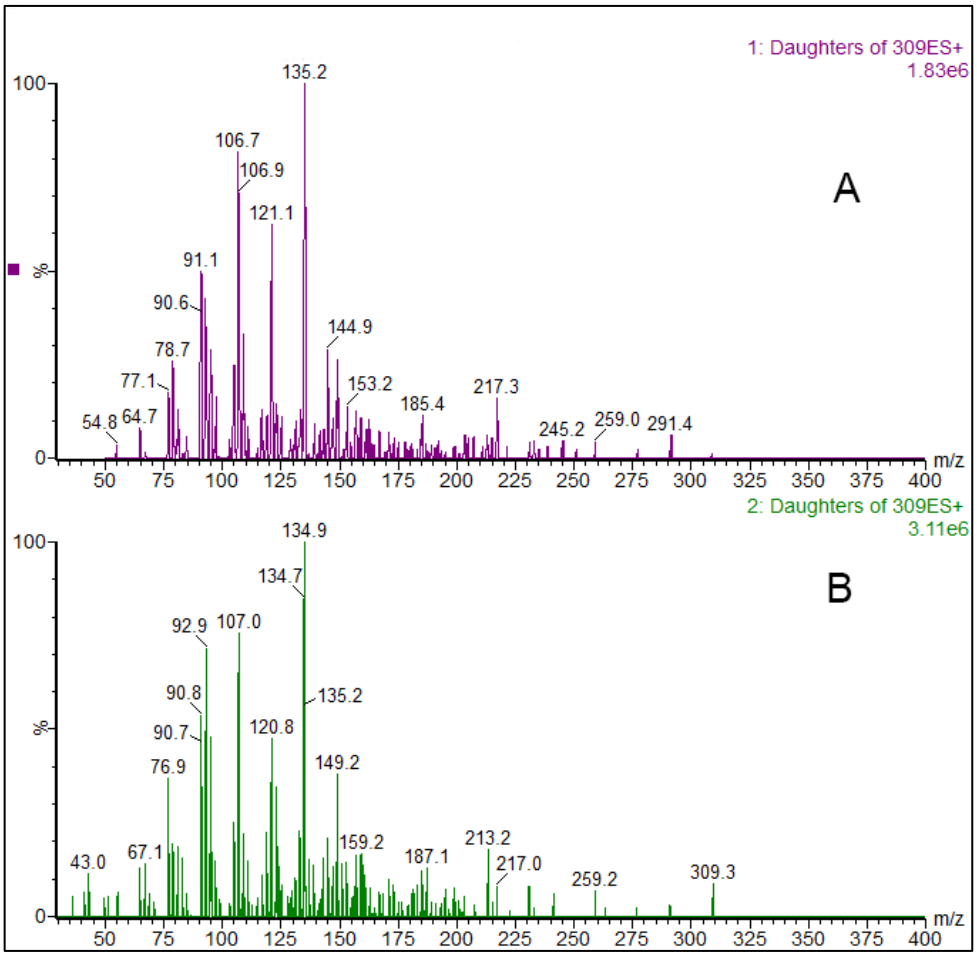


Analisando o sinal em 8,68 minutos é possível observar a presença do íon *m/z* 309,2053 $[M+H^+]^+$ (Figura 34). Relacionando com a massa calculada de 309,2060 Da, temos um erro de 2,3 ppm o que representa um erro apenas na quarta casa decimal de massa para a molécula de fórmula $C_{18}H_{29}O_4$.

A partir da massa molecular obtida por espectrometria de massas de alta resolução, foi realizada uma nova busca nos bancos de dados, sendo utilizada a faixa de massa molecular entre 308.19 Da e 308.20 Da. Nessa nova busca, o único composto encontrado foi a Albociclina.

Assim, a partir do padrão de Albociclina (Sigma-Aldrich), foi obtido um espectro de fragmentação por CID com energia de colisão de 20 eV do íon *m/z* 309, o qual apresentou o mesmo padrão complexo de fragmentação obtido para o íon *m/z* 309 da fração 30 (Figura 35).

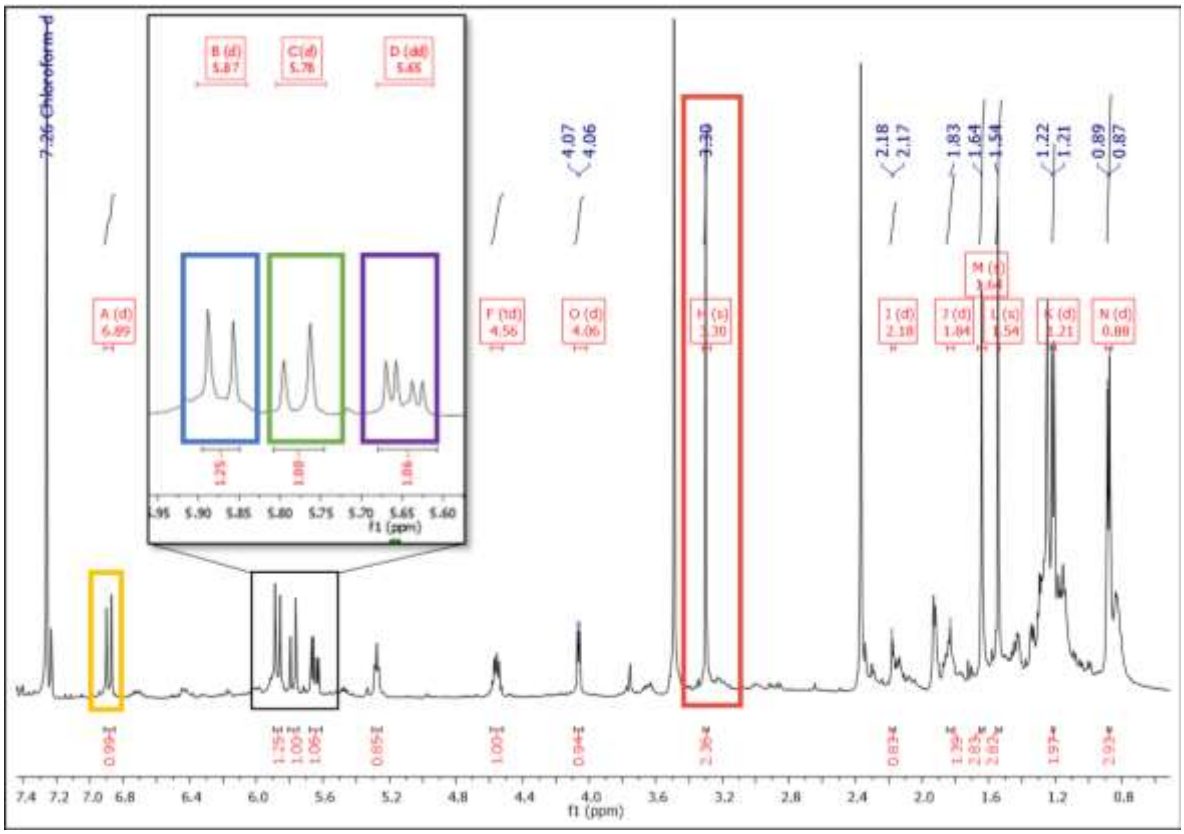
Figura 35. (A) Espectro de íons produto do íon *m/z* 309 (ESI+) da fração 30. (B) Espectro de íons produto do íon *m/z* 309 (ESI+) do padrão de Albociclina.



O espectro de ^{1}H (Figura 36) obtido da fração 30 foi comparado a um outro espectro obtido em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa e relatado como sendo da Albociclina[104]. Os deslocamentos químicos apresentados no RMN de ^{1}H na amostra da fração 30 foram correspondentes aos apresentados pelo espectro de referência, porém apresentando alguns sinais sem correlação que são devido a impurezas presentes na fração obtida.

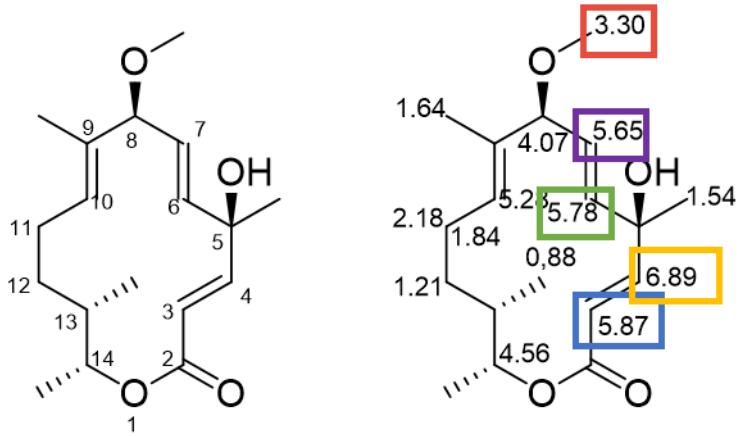
RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6,9 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 5,9 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H), 5,8 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 5,7 (dd, *J* = 16,1, 6,1 Hz, 1H), 5,28 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H), 4,56 (td, *J* = 12,7, 6,2 Hz, 1H), 4,07 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 3,30 (s, 3H), 2,2 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 1,8 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 1,6 (s, 3H), 1,5 (s, 3H), 1,2 (d, *J* = 6,4 Hz, 2H), 0,9 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H).

Figura 36. Espectro de ^{1}H – 500 MHz da fração 30 do extrato CAAT 7-52 ($CDCl_3$).



A partir do espectro obtido e com base no espectro de referência, foram atribuídas as seguintes correlações aos hidrogênios do composto (Figura 37)

Figura 37. Correlações dos hidrogênios do composto presente na fração 30 do extrato CAAT 7-52.



Utilizando os dados obtidos por espectrometria de massas e os obtidos por ressonância magnética nuclear de ^{1}H e comparando com dados descritos na literatura, é possível atribuir a estrutura do composto ativo presente na fração 30 como sendo de fato a Albociclina.

Analisando o cromatograma de íons em modo positivo do extrato bruto nesse momento, também foram observados sinais entre 5,00 minutos e 8,0 minutos correspondentes a íons *m/z* 347 $[M+Na]^{+}$ (Figura 38 e*Figura 39*) que poderiam ser de compostos com estruturas derivadas da Albociclina, hidroxilados em diferentes posições assim como um epóxido (Figura 40).

Figura 38. Cromatograma de íons em modo *full scan* positivo (ESI+) do extrato bruto CAAT 7-52.

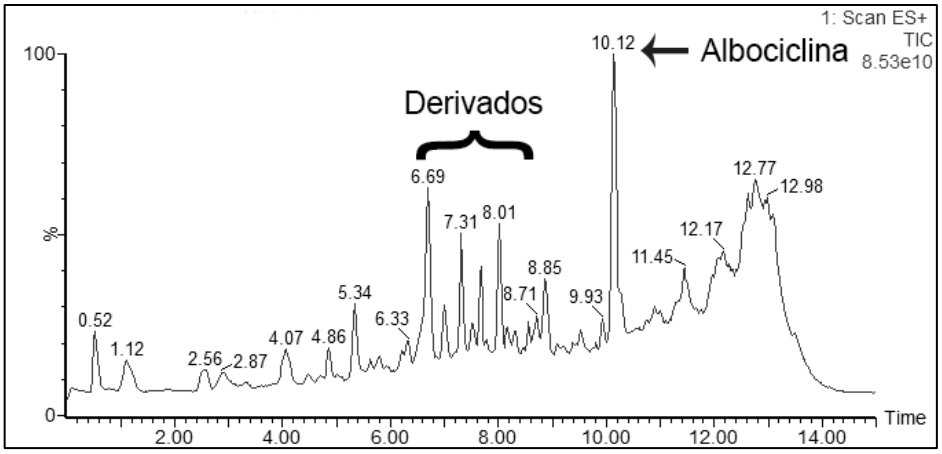


Figura 39. Espectro de íon extraído do íon *m/z* 347[M+Na]+ correspondentes aos derivados da albociclina.

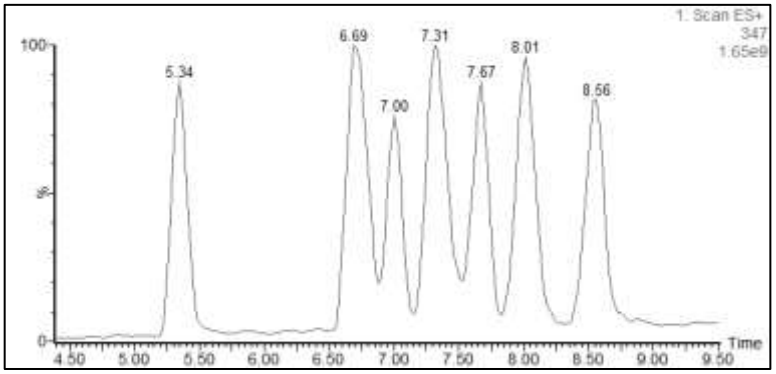
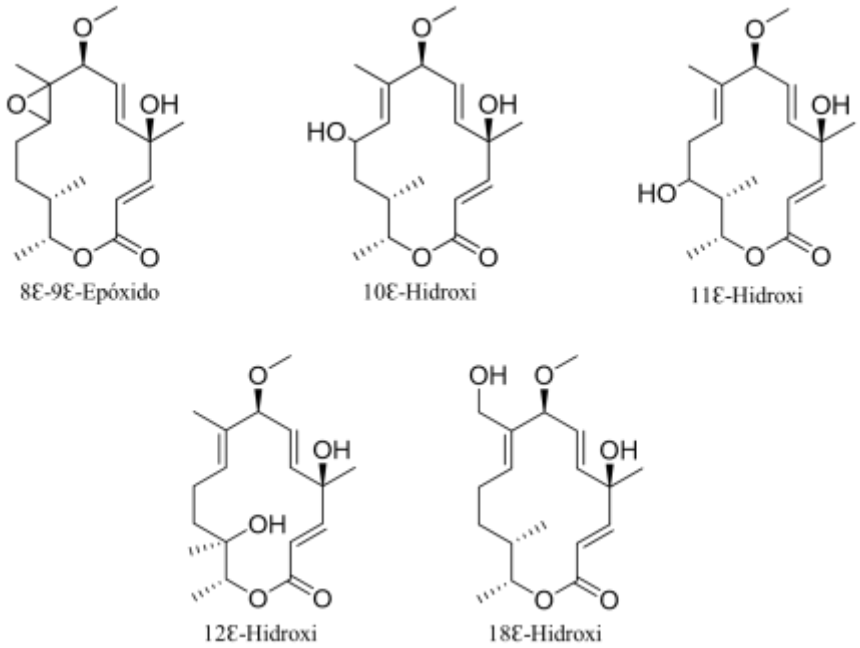


Figura 40. Análogos hidroxilados e o epóxido propostos.



A Albociclina é uma macrolactona cíclica com estrutura semelhante a Eritromicina e proveniente da rota biossintética da policetídeo sintase (PKS)[105,106]. Apresenta atividade descrita contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*[104] e atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus*, inclusive contra linhagens MRSA (linhagens resistentes contra Meticilina e Penicilinas)[107]. Seu modo de ação descrito contra *Bacillus subtilis*, é através da inibição da biossíntese de ácido nicotínico[108].

Este mecanismo de ação se mostra plausível na ação fitotóxica causa pela Albociclina, uma vez que trabalhos mostram o envolvimento do ácido nicotínico no ciclo da trigonelina. A trigonelina é uma molécula promotora de crescimento em plantas, assim, com a inibição da biossíntese do ácido nicotínico não ocorreria sua transformação em trigonelina e afetando o crescimento e desenvolvimento da planta[109–111].

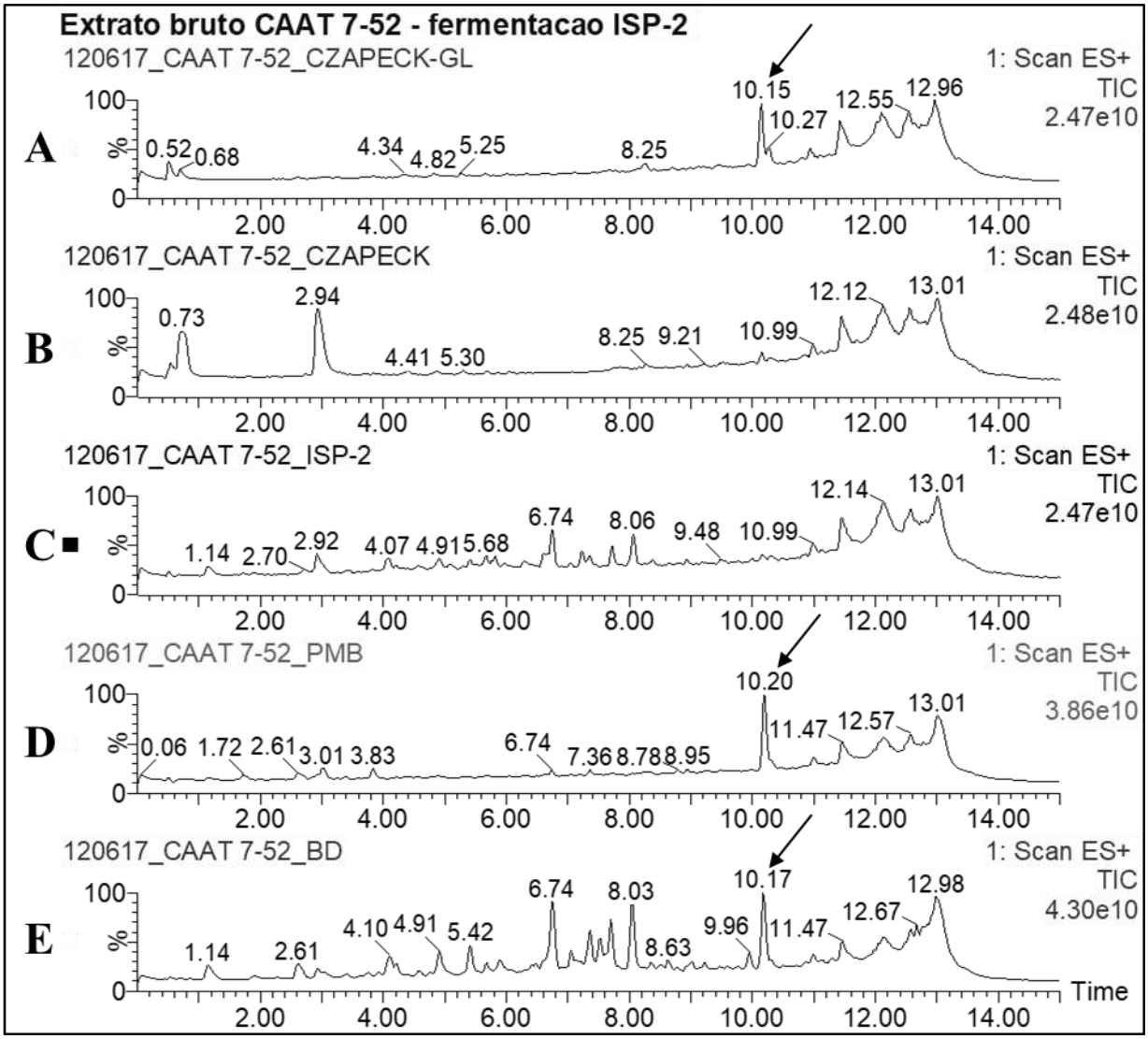
4.4.4. Ensaio de variação de meio de cultivo

A partir do estudo de desreplicação e da elucidação estrutural dos compostos ativos do extrato bruto CAAT 7-52, foram realizados ensaios para uma comparação da produção do composto ativo em variados meios de cultivos diferentes, a fim de se observar o efeito dos

diferentes meios de cultivo na produção dos metabólitos ativos, bem como a possível ativação de outras vias metabólicas na produção de possíveis novos compostos.

Foram realizadas fermentações com os meios de cultivo BD, PMB, ISP-2, Czapeck e Czapeck modificado utilizando xarope de glicose como fonte de carbono em substituição a sacarose (Czapeck-GL). A actinobactéria CAAT 7-52 foi fermentada nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de fermentação os extratos brutos extraídos com acetato de etila foram analisados por sistema LC-MS para a obtenção do perfil químico dos metabolitos produzidos pela actinobactéria (Figura 41).

Figura 41. Cromatograma de LC-MS total de íons em modo positivo dos extratos CAAT 7-52 fermentados em diferentes meios de cultivo. A) Czapeck modificado; B) Czapeck; C) ISP-2; D) PMB e E) BD



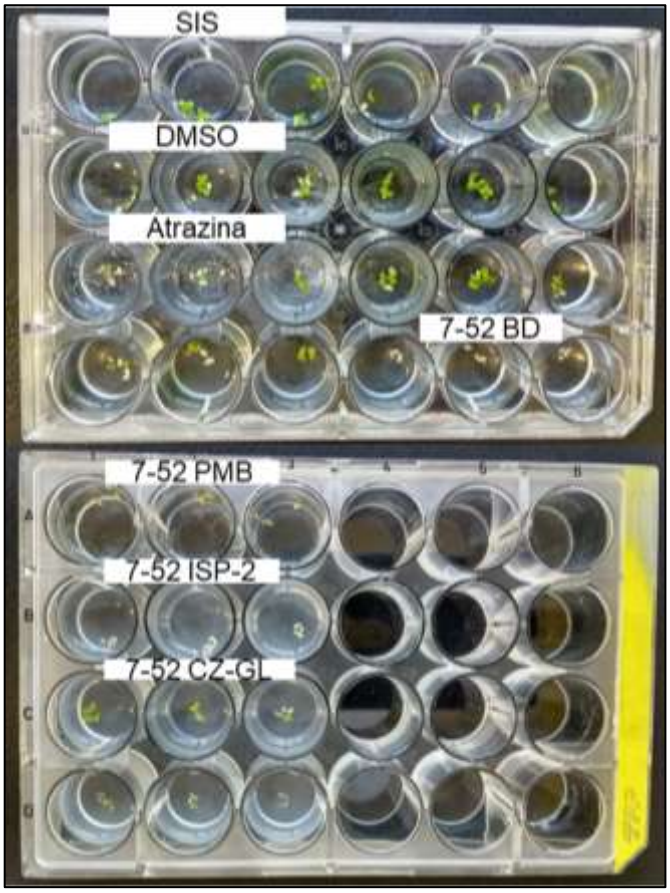
Na figura acima, o sinal observado em 10,2 minutos, foi atribuído a presença da Albociclina. Como pode ser observado os meios de cultivo BD, PMB e Czapeck-GL levaram a produção de Albociclina, sendo que nos meios de cultivo PMB e Czapeck foram os mais eficientes. Outro ponto a ser observado é o favorecimento da produção dos compostos análogos a Albociclina, com sinais entre 6,7 e 8,0 min, pelo meio de cultivo ISP-2. Assim, é possível inferir que a produção seletiva de Albociclina é proporcionada pelos meios de cultivo PMB e Czapeck-GL, bem como a produção seletiva de seus análogos é proporcionada pelo meio de cultivo ISP-2. No meio de cultivo BD não ocorre seletividade, havendo a produção de Albociclina e de seus análogos.

Essa diferença na produção dos metabólitos secundários em diferentes meios de cultivo, está relacionada as diferentes fontes de carbono utilizadas por cada meios de cultivo específico. No meio ISP-2 a principal fonte de carbono é proporcionada pelo extrato de malte, onde a maltose é sua principal fonte de carbono, esta, um dissacarídeo formado por α-D-glicose e β-D-glicose. Já nos meios de cultivo BD, PMB e Czapeck-GL, a principal fonte de carbono é a glicose, um monossacarídeo simples. Ainda o meio de cultivo PMB contém outras fontes de carbono, como o amido, um polissacarídeo complexo, e em menor quantidade o extrato de carne. O xarope de glicose utilizado no meio Czapeck modificado, contém além da glicose, vários oligômeros podendo influenciar na biossíntese dos compostos, diferente da sacarose utilizada no meio de cultivo sem modificações, a qual é um dissacarídeo formado por α-D-glicose e β-D-Frutose[69,112,113]

Todas essas diferenças entre fontes de carbono apresentadas podem, e devem interferir na rota biossintética da policetídeo sintase, a rota responsável pela síntese das macrolactonas, classe de moléculas a qual pertence a Albociclina[114–116]

Posteriormente, todos os extratos brutos obtidos nessa etapa do trabalho foram submetidos a ensaios de fitotoxicidade (Figura 42).

Figura 42. Bioensaio contra *Lemna minor* dos extratos CAAT 7-52 fermentados em diferentes meios de cultivo.

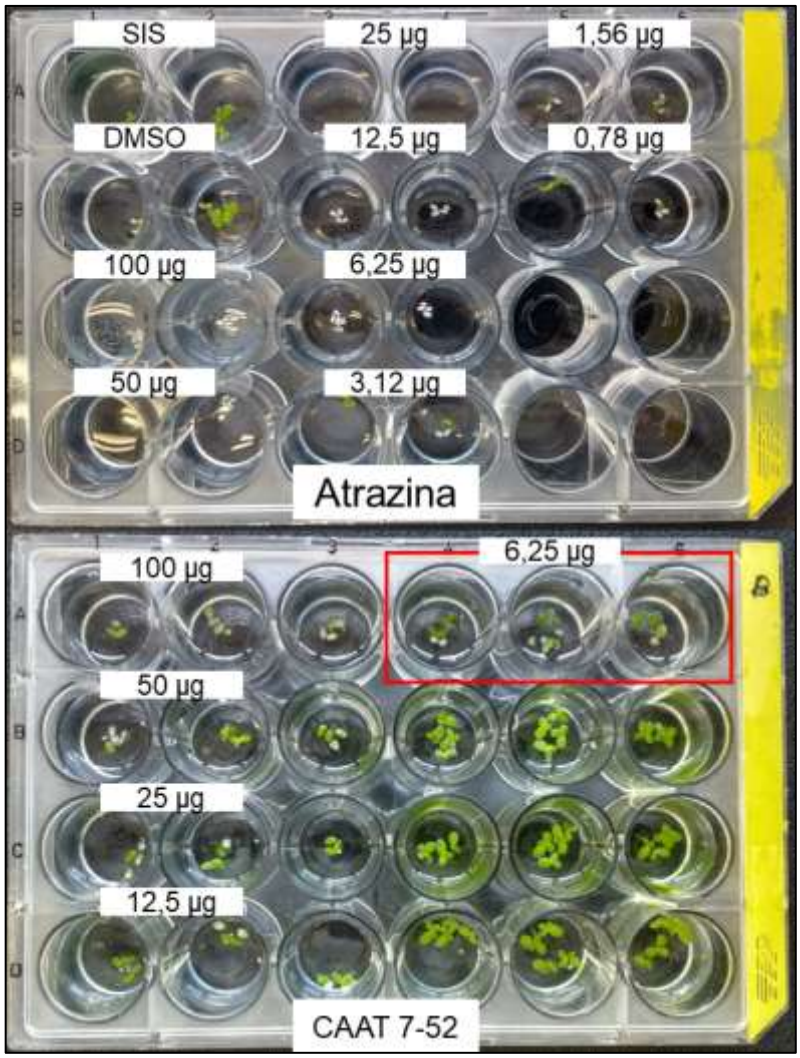


O bioensaio realizado com os extratos obtidos dos diferentes meios de cultivo mostrou atividade fitotóxica dos extratos brutos dos meios de cultivo BD, PMB, Czapeck-GL e ISP-2, indicando atividade fitotóxica também para os compostos análogos a Albociclina, uma vez que no meio de cultivo ISP-2 favorece a produção desses análogos.

4.5. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) do extrato bruto CAAT 7-52

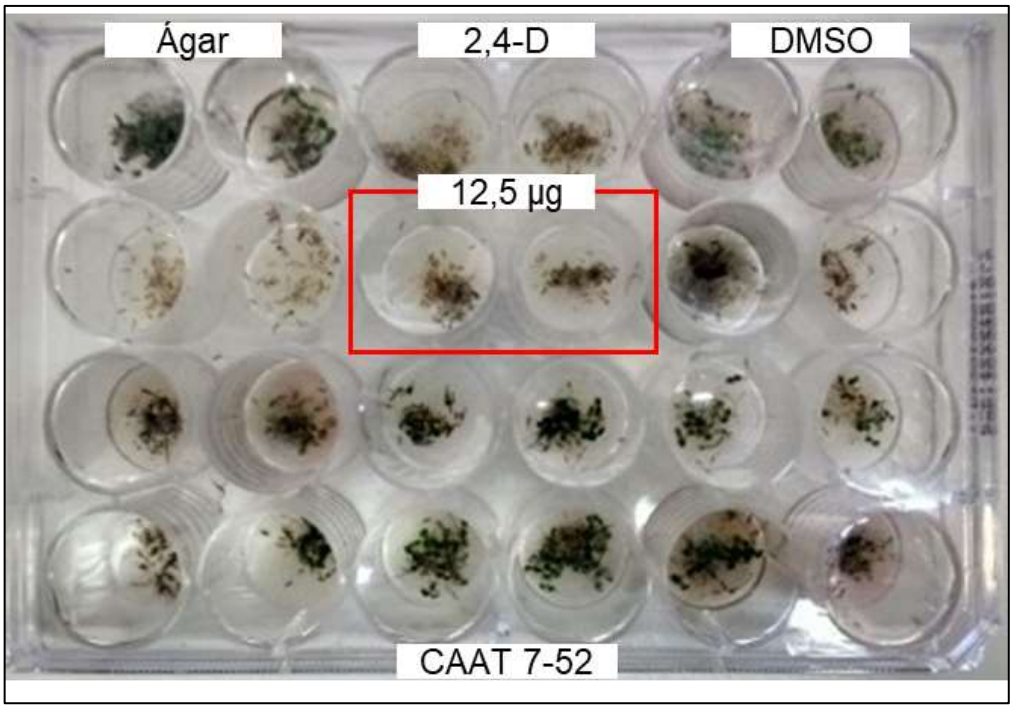
Visando a determinação da concentração mínima do extrato bruto ativo, foram desenvolvidos os ensaios de MIC através de diluições seriadas do extrato bruto CAAT 7-52. O ensaio foi conduzido a partir de uma solução inicial de concentração 10 mg. mL^{-1} do extrato bruto em DMSO sendo realizadas diluições seriadas até 0,078 $mg.mL^{-1}$, ou seja, foram adicionados em cada poço da placa massas de 100 µg até 0,78 µg.

Figura 43. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto CAAT 7-52 mostrando a atividade positiva contra *Lemna minor* em 6,25 µg de extrato bruto.



Após o período de incubação, foi possível observar atividade fitotóxica através dos efeitos de clorose e necrose das folhas de *Lemna minor* causadas pelo extrato bruto até uma concentração de 0,625 mg.mL^{-1}, ou 6,25 µg de extrato bruto por poço. Esta atividade, no entanto, é notada após 3 dias de encubação, mostrando uma ação mais rápida que a do controle positivo utilizado, o qual só se mostra efetivo com 7 dias de incubação (Figura 43).

Figura 44. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória do extrato bruto CAAT 7-52 mostrando a atividade positiva contra buva (*Conyza canadensis*) em 12,5 µg de extrato bruto.

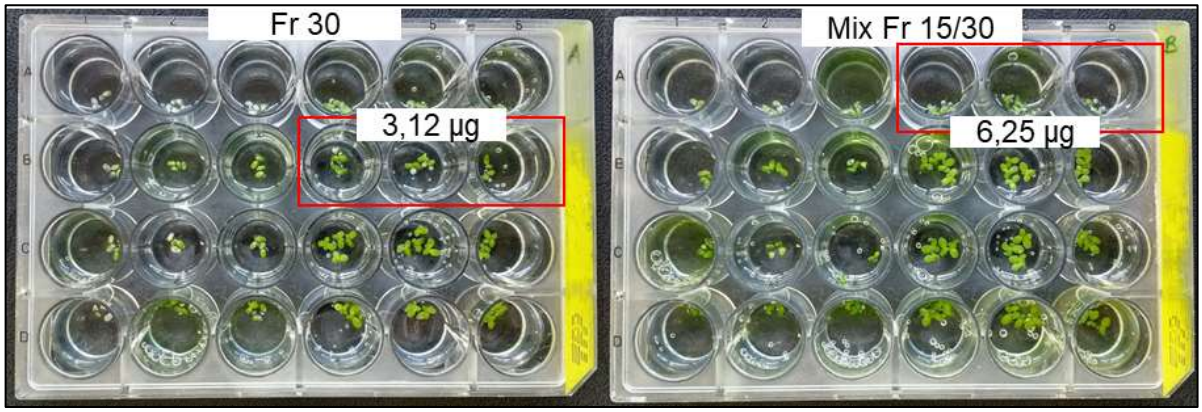


Para a *Conyza canadenses* (buva), o extrato bruto apresentou uma atividade de inibição de germinação na concentração de 1,25 mg.mL^{-1}, o que corresponde a 12,5 µg do extrato bruto por poço (Figura 44). Essa atividade foi equivalente a apresentada pelo controle 2,4-D na concentração de 100 µg por poço, mostrando um resultado promissor do extrato CAAT 7-52 também em relação a inibição de germinação de uma planta-daninha muito problemática na agricultura.

4.5.1. Ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC) com as frações ativas 15 e 30

A partir dos resultados das frações ativas, foi realizado um ensaio de concentração mínima inibitória com as frações de maior atividade a fim de se obter uma comparação com a atividade apresentada pelo extrato bruto CAAT 7-52. O ensaio foi realizado seguindo as condições e método de diluições utilizado para o ensaio com o extrato bruto. (Figura 45)

Figura 45. Bioensaio de mínima concentração inibitória das frações ativas e uma mistura delas.



A fração 15 apresentou inibição na concentração de 100 µg por poço, mesma concentração do ensaio inicial mostrado na pg. 64, Figura 24, e já discutido no item 4.4.2 pg. 70, Figura 33 onde foi apresentado o ensaio com o padrão de ácido 3-hidroxibenzóico.

A fração 30 apresentou atividade de inibição de crescimento de 3,12 µg por poço, sendo uma concentração menor que a obtida pelo extrato bruto, 6,25 µg por poço, mostrando que a Albociclina isolada é mais ativa que o extrato bruto.

O ensaio com uma mistura equivalente das frações 15 e 30 apresentou atividade até a concentração de 6,25 µg, mesma concentração obtida para o extrato bruto CAAT 7-52 e maior que a obtida pela fração 30 separadamente.

A partir desses resultados, podemos observar que não ocorre grande influência da fração 15 na atividade total apresentada pelo extrato bruto e que a atividade fitotóxica observada para o extrato bruto CAAT 7-52 é atribuída quase em sua totalidade a Albociclina, identificada na fração 30.

4.5.2. Ensaio de atividade fitotóxica do meio de cultivo fermentado com CAAT 7-52.

A fim de se obter uma possível aplicação do meio de cultivo fermentado diretamente no combate a plantas daninhas, sem a necessidade de extração por solventes orgânicos e diminuindo os custos de produção. Foi realizado um ensaio de fitotoxicidade empregando *Lemna minor* utilizando diretamente o meio de cultivo fermentado e diluições com o meio SIS a fim de se obter uma proporção mínima que cause atividade fitotóxica.

Foi realizada uma fermentação da actinobactéria CAAT 7-52 em meio de cultivo PMB, o qual apresentou uma produção majoritária de Albociclina, após o período de fermentação o caldo foi filtrado para separação da massa micelial.

Para o ensaio foram realizadas diluições contendo desde 90% até 2,5% de meio fermentado com meio SIS. Um ensaio utilizando somente o meio de cultivo PMB não fermentado nas mesmas diluições foi realizado como um controle negativo. Os meios de cultivos foram todos filtrados em filtros de 0,22 µm para esterilização.

Figura 46. Bioensaio de controle com meio de cultivo PMB sem fermentar.

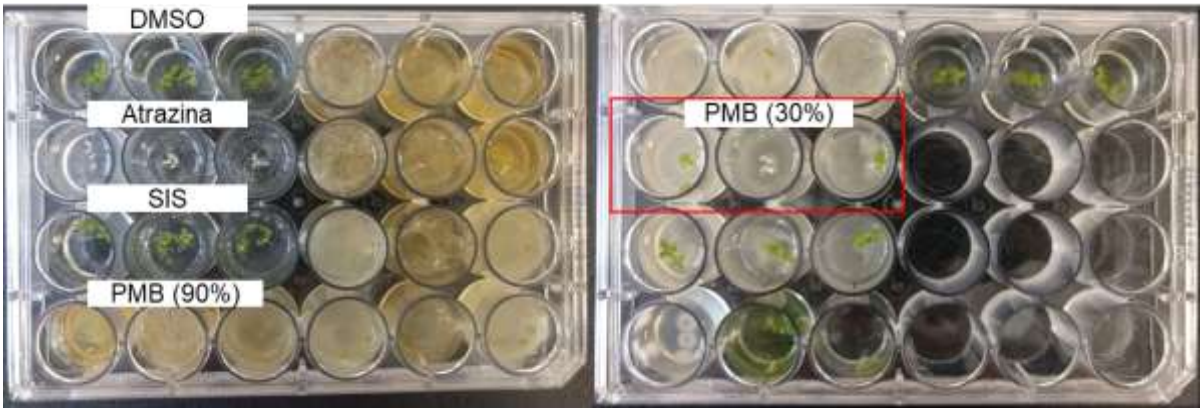
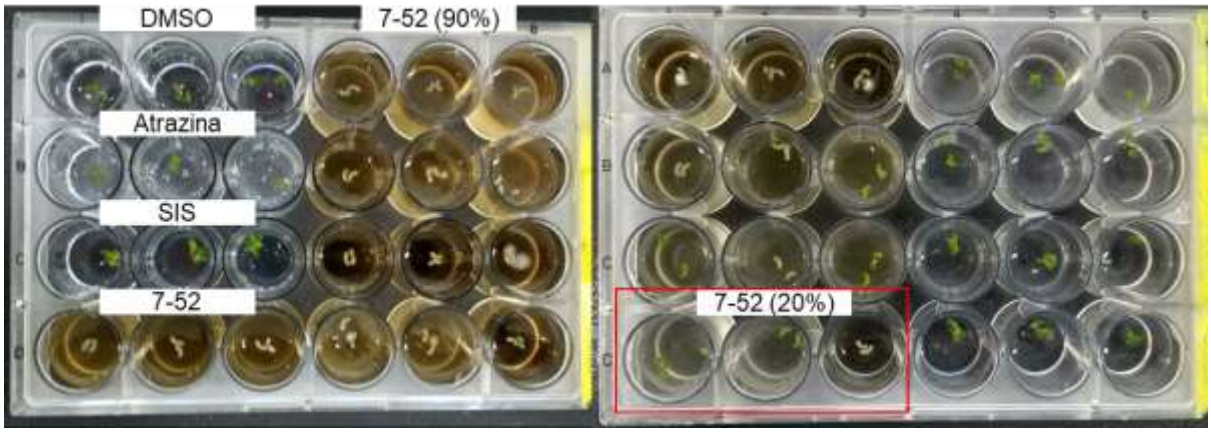


Figura 47. Bioensaio com o meio de cultivo fermentado CAAT 7-52.



Comparando os ensaios, é possível observar uma influência do meio de cultivo PMB até a proporção de 30% (Figura 46), porém o caldo fermentado apresentou ação de necrose das folhas de *Lemna minor* até a proporção de 20% (Figura 47), indicando que esta atividade é proveniente da ação dos metabólitos secundários produzidos pela fermentação da actinobactéria

CAAT 7-52. Este resultado se mostra promissor uma vez que ocorre a possibilidade de utilização direta do meio de cultivo fermentado em uma possível aplicação em campo.

4.5.3. Monitoramento de produção diária dos compostos ativos

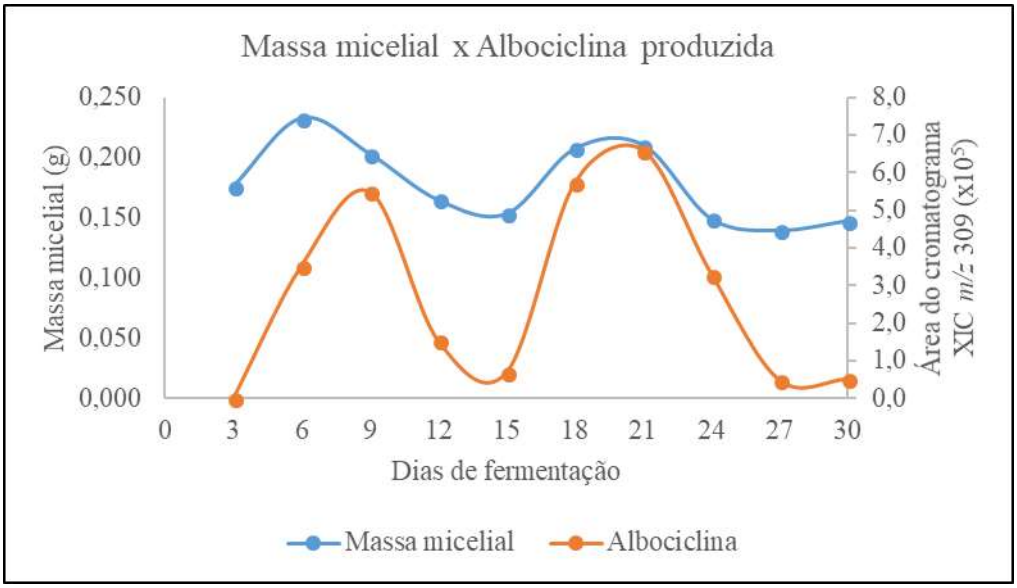
Para a avaliação da produção de Albociclina em função dos dias de fermentação, o cultivo foi monitorado durante 30 dias o crescimento da actinobactéria CAAT 7-52 e a produção de Albociclina foram monitoradas. Alíquotas de fermentação foram retiras a cada 3 dias de fermentação e analisadas por LC-MS-TOF. Para cada alíquota retirada os micélios foram separados por filtração à vácuo e secos para análise da massa micelial seca (Tabela 7). Assim, foi possível gerar um gráfico mostrando os ciclos de crescimento micelial e produção metabólica, em especifico da albociclina de interesse.

Monitorando o íon de *m/z* 309,2053 $[M+H^+]^+$ por HRMS, atribuído a Albociclina foi possível gerar um cromatograma de extração de íon (XIC) e calcular a área do sinal cromatográfico (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de massa micelial e área do sinal do íon de *m/z* 309,2053 monitorado.

Dias	**Massa micelial (g)**	**Albociclina (área íon 1,0x10^5)**
3	0,1761	0
6	0,2330	3,53
9	0,2033	5,49
12	0,1650	1,54
15	0,1535	0,69
18	0,2076	5,73
21	0,2107	6,59
24	0,1492	3,30
27	0,1398	0,48
30	0,1477	0,52

Figura 48. Gráfico de crescimento micelial e produção de Albociclina no período de 30 dias.



No gráfico (Figura 48) é possível observar a presença de dois ciclos de desenvolvimento celular, um com o final da fase estacionária em torno de 7 dias e outro em 21 dias, após esses períodos ocorrendo a fase de morte celular.

Para a produção de Albociclina, temos um primeiro pico por volta de 9 dias e uma produção cerca de 17% maior aos 21 dias.

As curvas de crescimento e produção são coerentes com os ciclos de crescimento e produção de metabólitos secundários apresentados pela literatura, onde o máximo de produção de metabólitos secundários aparece ao final da fase estacionária de desenvolvimento celular[117,118].

Essa maior produção em 21 dias abre a possibilidade de novos ensaios com o meio de cultivo fermentado, uma vez que essa produção é muito maior a de 7 dias utilizada usualmente ocorre a possibilidade de uma atividade fitotóxica utilizando um sistema mais diluído.

4.5.4. Bioautografia

Com o objetivo de se desenvolver um ensaio para uma análise rápida e obtenção de algumas características dos compostos ativos presentes nos extratos brutos, foi desenvolvido um ensaio de bioautografia empregando *Lemna minor* como alvo biológico. Este ensaio se

mostra inovador, sendo que não são encontrados relatos na literatura sobre a utilização do ensaio de bioautografia aplicado em *Lemna minor*.

O extrato CAAT 7-52 foi submetido ao ensaio de bioautografia utilizando uma mistura dos solventes Acetato de Etila/Hexano (1:1) como solvente de eluição. Após a observação sob luz UV, as manchas em destaque foram marcadas para posterior análise, sendo o ensaio prosseguido com uma duplicata da placa de TLC (Figura 49).

Figura 49. Placa de TLC contendo o extrato bruto CAAT 7-52 eluida com acetato de etila. Posteriormente foi utilizado acetato de etila/hexano para melhor separação. (A) 365 nm (B) 254 nm

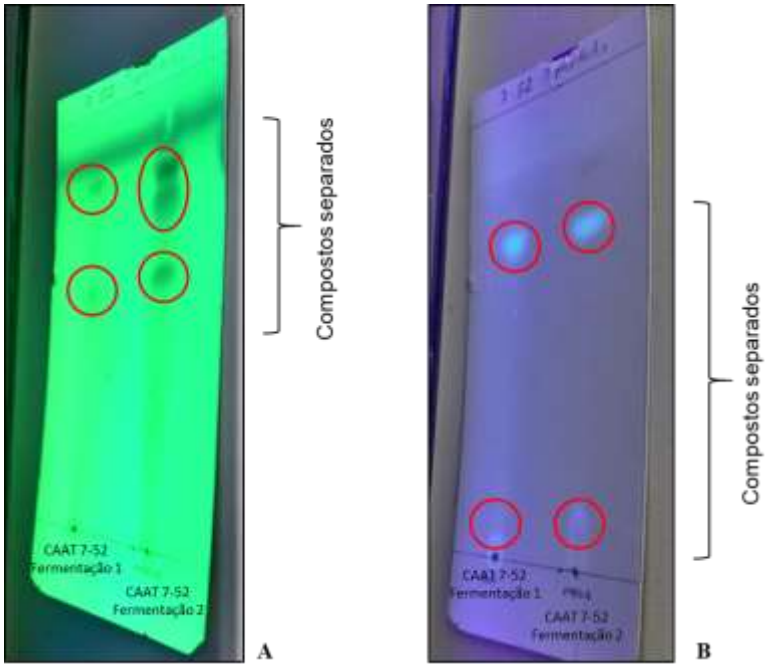
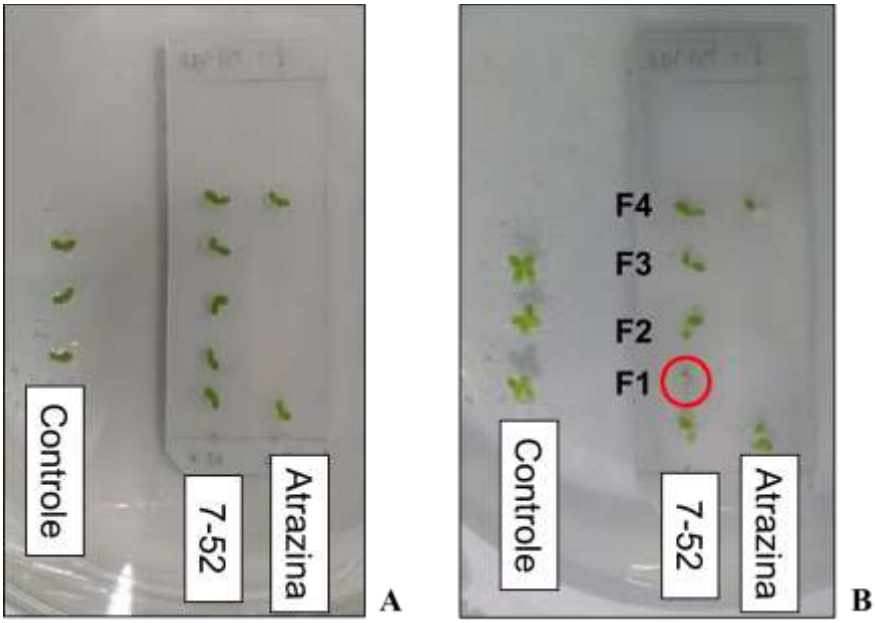


Figura 50. Bioautografia do extrato bruto CAAT 7-52 contra *L. minor*. (A) Condições iniciais (B) Após 7 dias de incubação, observa-se necrose na folha inferior.



Após o período de incubação das placas, foi observado necrose nas folhas na marca de Rf 0,23 (Figura 50). As manchas marcadas foram raspadas da placa controle e então os compostos extraídos com metanol a fim de serem analisados por sistema LC-MS.

As frações foram numeradas de 1 a 4 a partir da fração ativa. A fração ativa mostrou a presença de um sinal relevante em 10,2 minutos, sendo este o mesmo observado com relevância no extrato bruto, apresentando os íons em modo positivo (ESI+) *m/z* 309 $[M+H]^+$, *m/z* 331 $[M+Na]^+$ e *m/z* 339 $[2M+Na]^+$, sendo observado com maior clareza pelo cromatograma de extração do íon *m/z* 309 mostrado abaixo (Figura 51).

Figura 51. Cromatograma de extração do íon *m/z* 309 mostrando a maior intensidade do sinal em 10,2 minutos.

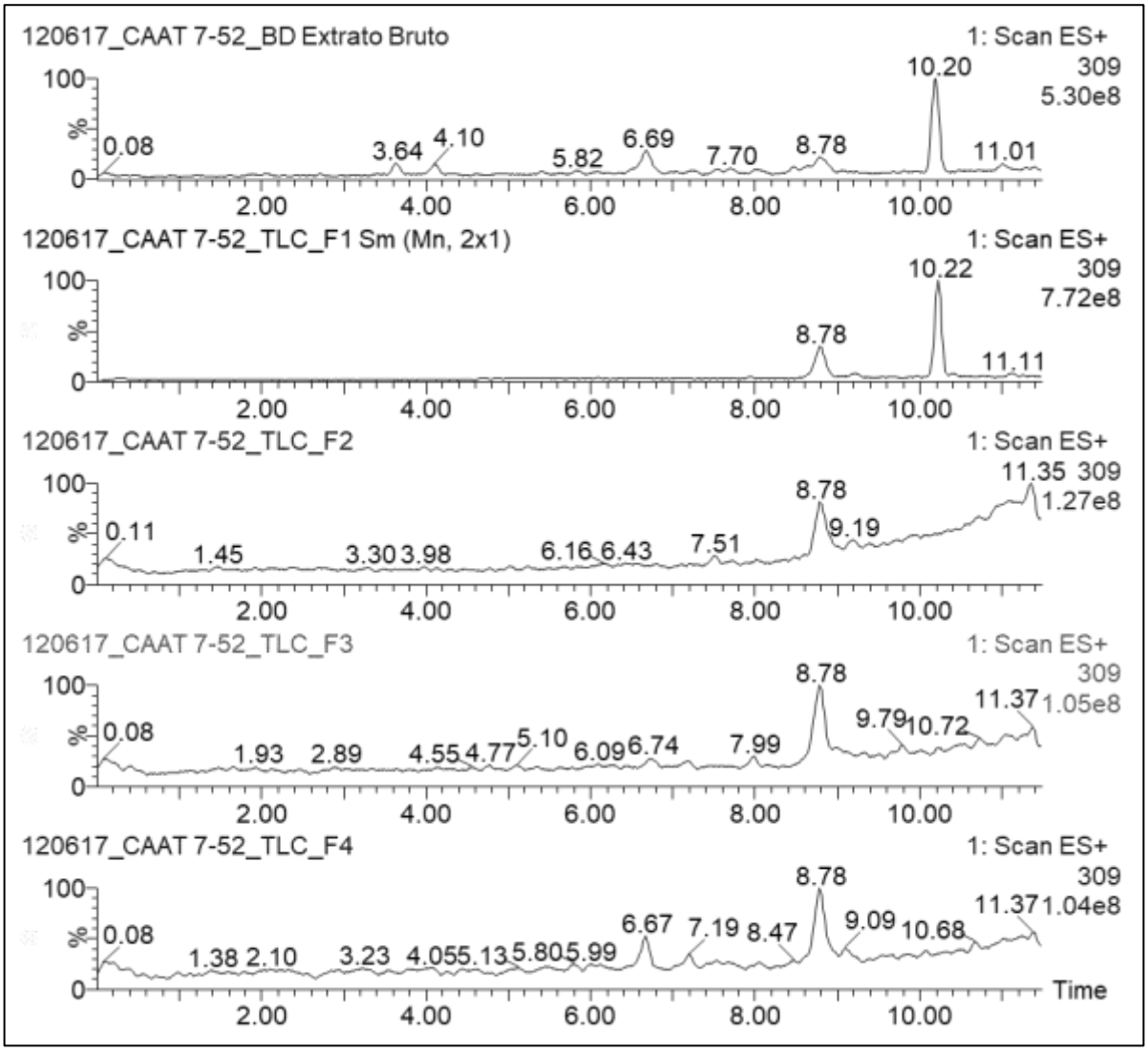
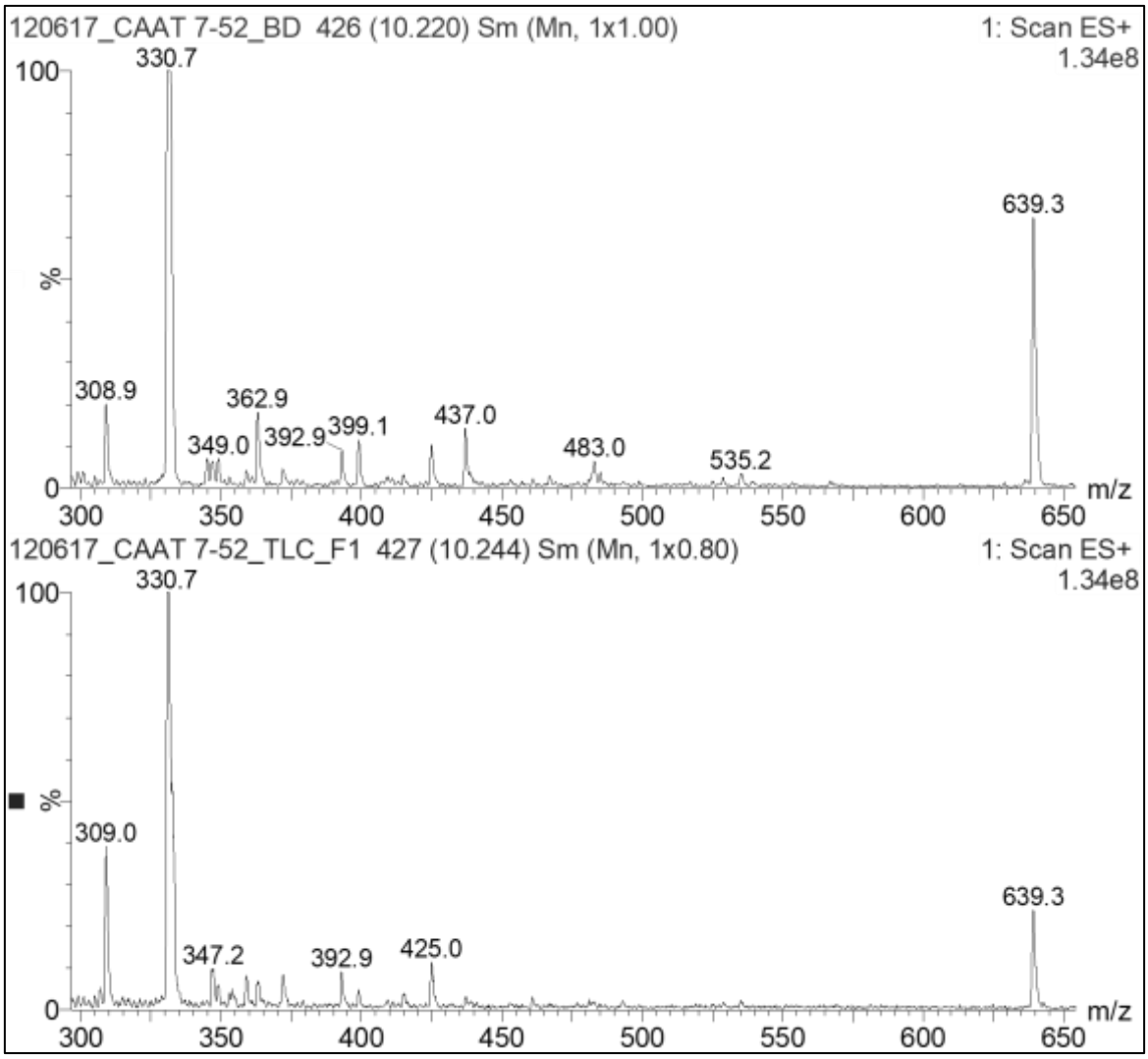


Figura 52. Espectro de massas (ESI+) comparando o sinal em 10,2 minutos da fração 1 do TLC com o extrato bruto CAAT 7-52.

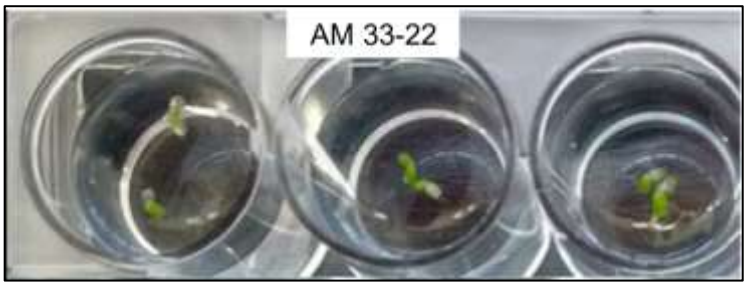


No espectro de massas em modo positivo (ESI+) (Figura 52) é possível observar o mesmo padrão de íons presentes no sinal de maior intensidade do extrato bruto e na fração ativa retirada da placa de TLC, mostrando o composto responsável pela atividade fitotóxica presente nesse extrato, nesse caso a já identificada Albociclina. Este ensaio se mostra de grande importância para uma comparação com os ensaios das frações do modo preparativo realizados posteriormente, assim como auxiliando em um processo de desreplicação dos compostos ativos.

4.6. Desreplicação por fracionamento guiado por bioensaio do extrato bruto AM 33-22

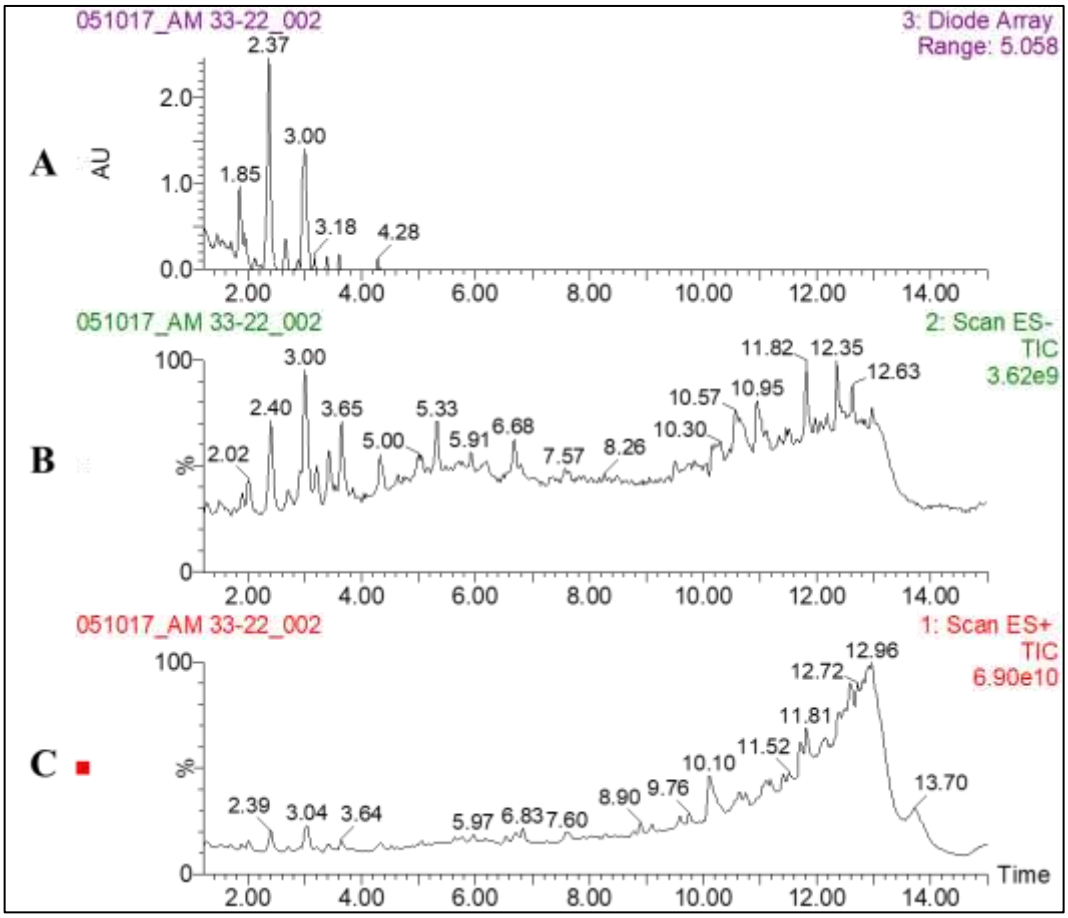
A partir do resultado de *screening* de atividade fitotóxica, o extrato bruto AM 33-22 também apresentou atividade fitotóxica contra *Lemna minor* (Figura 53) e também foi selecionado para o isolamento e identificação dos compostos ativos. Assim, uma fermentação em maior escala em meio de cultivo BD foi realizada para obtenção de massa de extrato bruto para fracionamento.

Figura 53. Bioensaio de fitotoxicidade para AM 33-22.



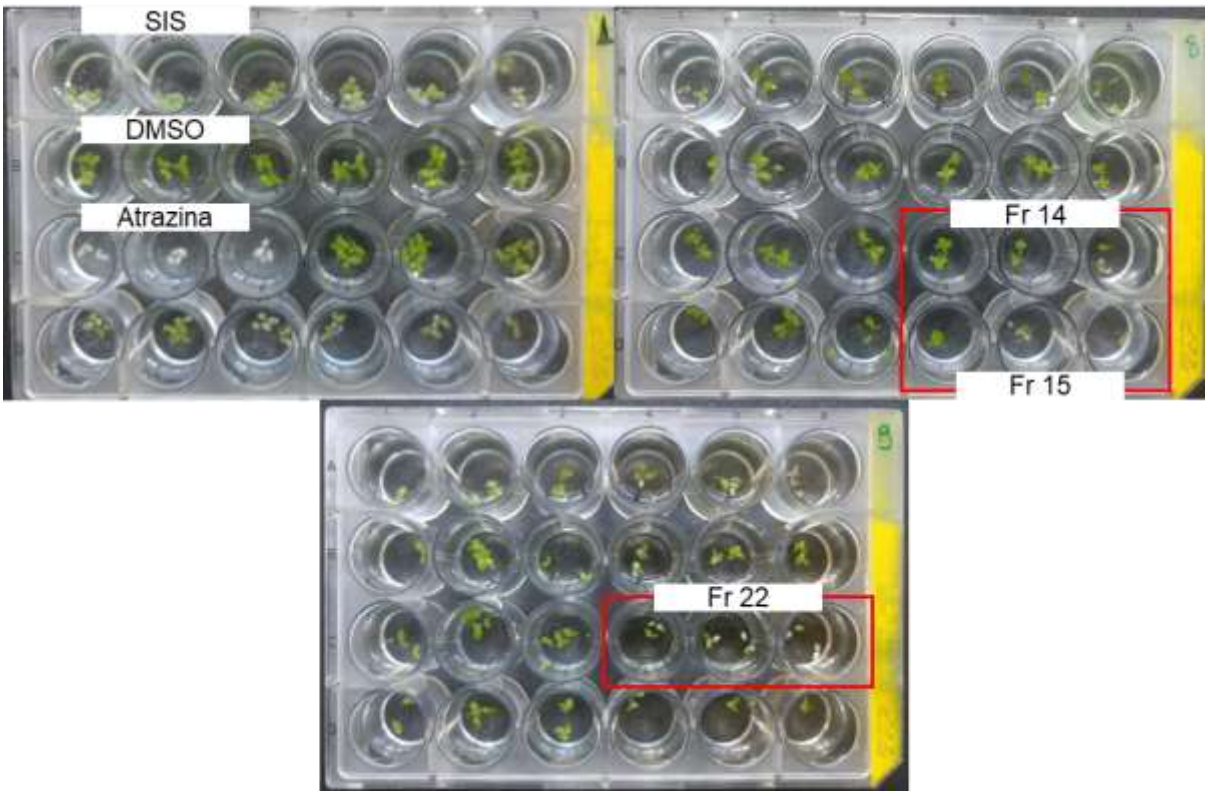
A análise do extrato bruto por sistema LC-MS, nas mesmas condições descritas previamente, possibilitou a visualização do perfil químico do extrato bruto, possibilitando a visualização de sinais mais intensos entre 2,0 e 9,0 minutos, principalmente em modo negativo, levando a suposição da presença de compostos com grande caráter ácido (Figura 54).

Figura 54. Perfil químico de LC-UV do extrato AM 33-22. A) UV-Vis; B) Cromatograma de íons em modo negativo; C) Cromatograma de íons em modo positivo.



Em seguida, foi realizado um fracionamento do extrato bruto em coluna de Sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente. Foram fracionados 41 mg do extrato bruto obtidos a partir de 2 L de fermentação. Foram coletadas frações a cada 20 min, gerando 48 frações, as quais foram, posteriormente, submetidas ao bioensaio de fitotoxicidade contra *Lemna minor*.

Figura 55. Bioensaio realizado contra *Lemna minor*, observa-se as frações ativas as quais foram analisadas.



Após o período de incubação em câmara de foto-período, foi observada atividade fitotóxica para as frações 14, 15, 22, 23, 24, 28, 29, 32, 34, 35, 44 e 46, sendo que mais pronunciadas foram as frações 15 e 22 (Figura 55).

4.6.1. Análises por LC-MS e GC-MS das frações ativas selecionas do extrato bruto AM 33-22

Analisando as frações por LC-MS, as frações 14 e 15 apresentaram mesmo perfil químico (Figura 56), bem como, as frações 22, 23 e 24 também apresentaram perfil químico similar (Figura 57). Porém, os sinais analisados não apresentaram correspondência significativa entre modos positivo e negativo, levando à suposição de não estar ocorrendo uma ionização adequada ou estar ocorrendo a supressão de ionização. Assim, as frações 14, 15 e 22 foram submetidas a análise por sistema GC-MS (GCMS-QP 2010 Plus – Shimadzu) a fim de se obter uma melhor análise de moléculas com baixa massa molecular que poderiam estar sendo suprimidas nas análises via LC-MS em razão do processo de ionização por ESI.

Figura 56. Cromatograma GC-MS das frações 14 (A) e 15 (B) do extrato AM 33-22.

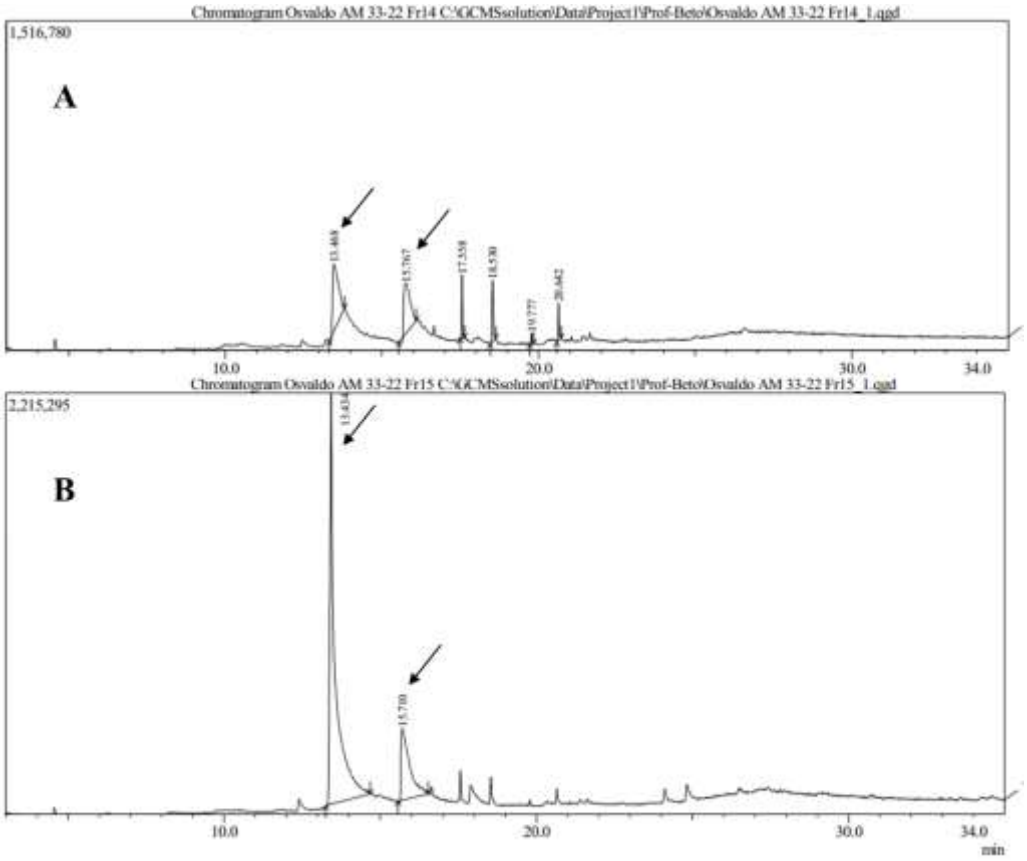
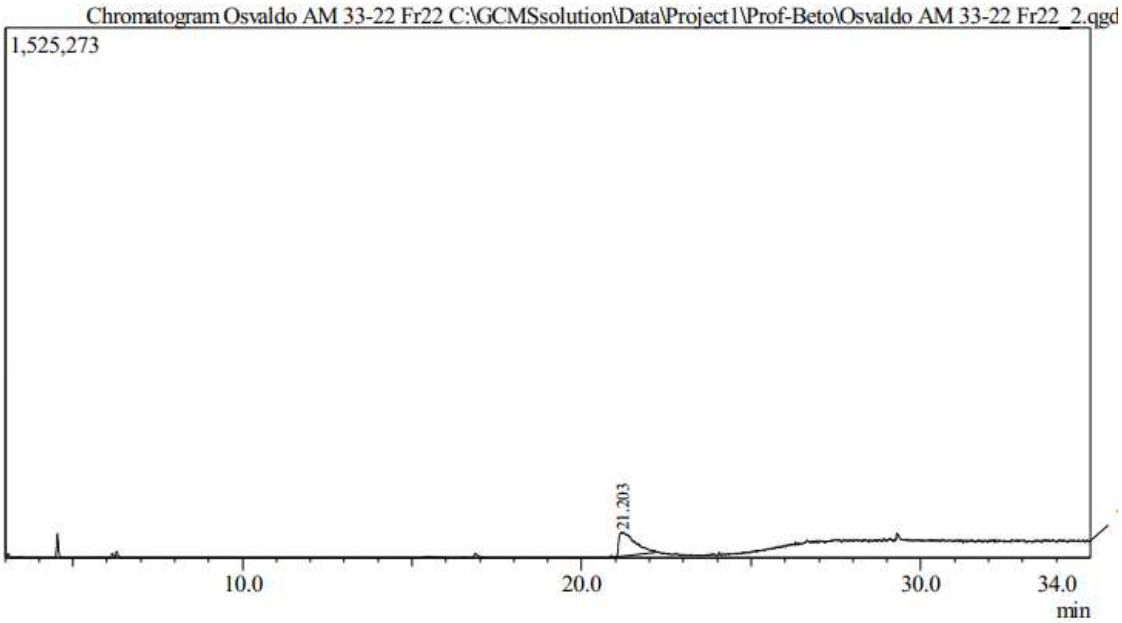


Figura 57. Cromatograma da fração 22 do extrato AM 33-22.



Pela análise dos perfis cromatográficos foi confirmada a similaridade do perfil entre as frações 14 e 15, assim como o diferente perfil da fração 22.

Utilizando o banco de dados NIST (*National Institute of Standards and Technology*) contido no sistema GC-MS foram obtidas as correlações de similaridades dos compostos presentes nas frações analisadas.

Figura 58. Espectro de massas (EI) do Ácido Benzoacético, presente nas frações 14 e 15 em 13,5 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados.

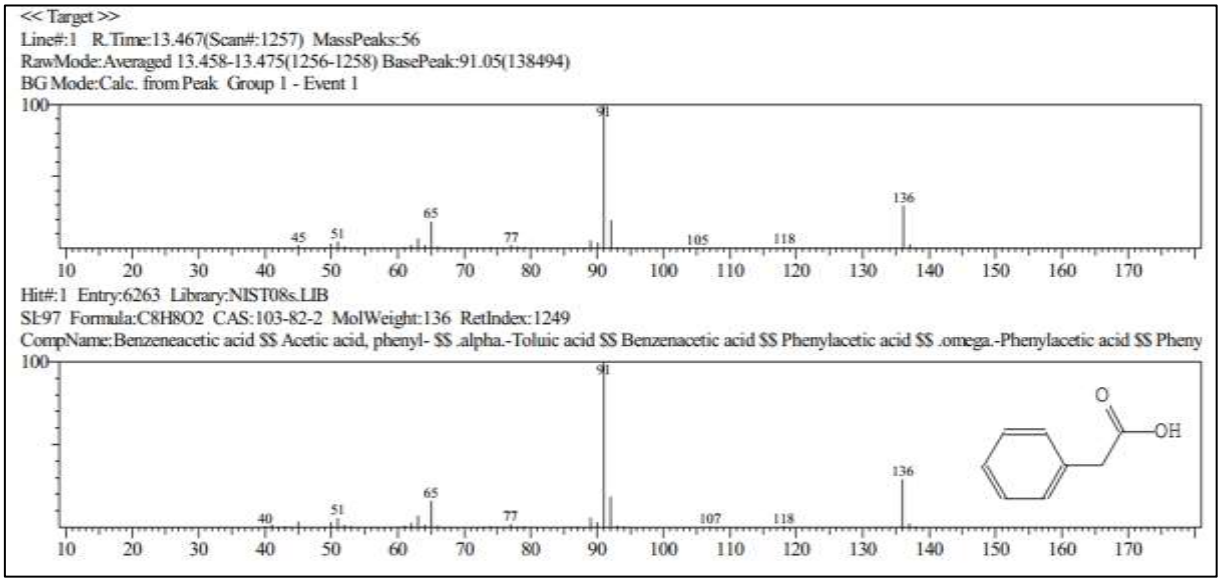


Figura 59. Espectro de massas (EI) de Benzoacetamida, presente nas frações 14 e 15 em 15,7 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados.

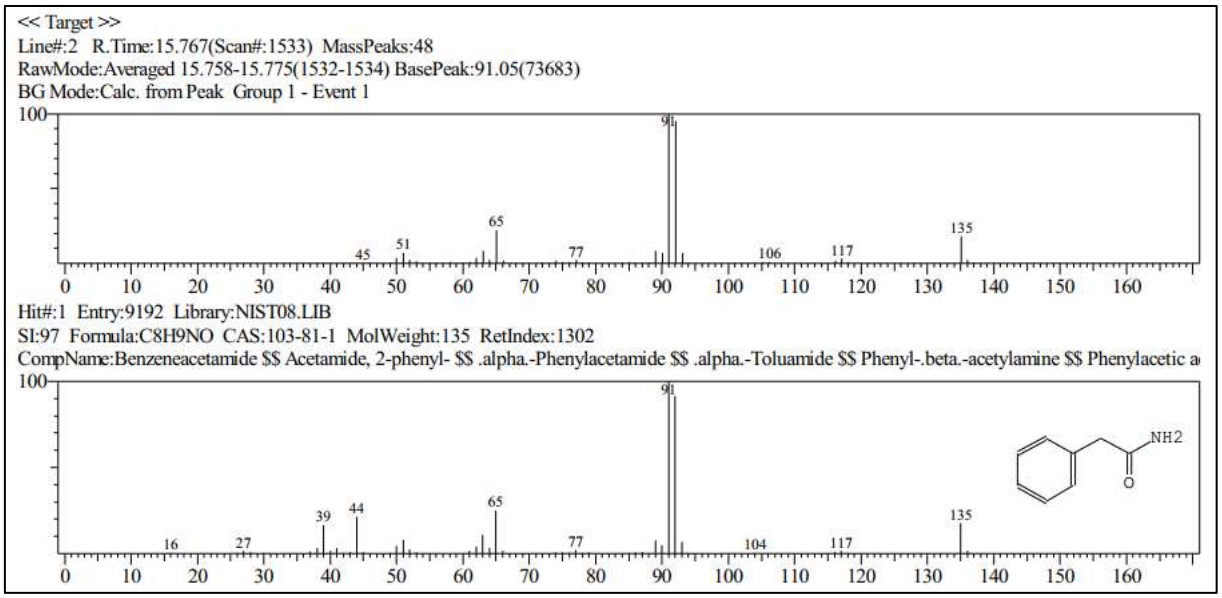
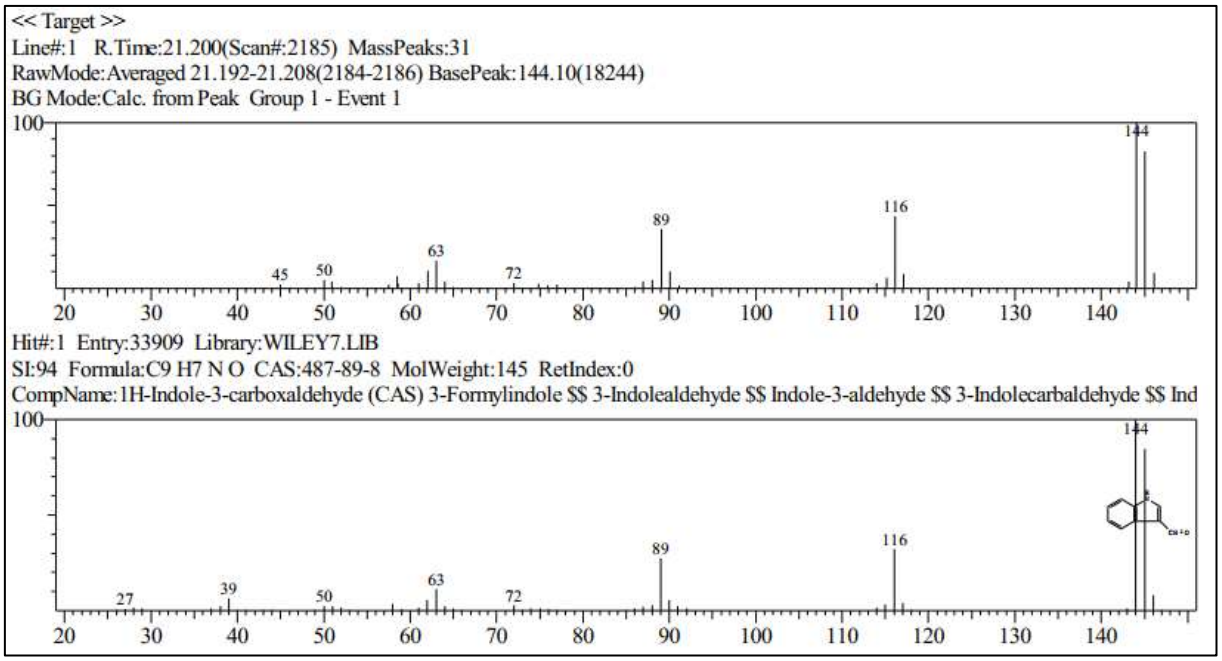


Figura 60. Espectro de massas (EI) do Indol-3-carboxaldeído, presente na fração 22 em 21,0 minutos, em comparação com o espectro do banco de dados.



Através da comparação do perfil de fragmentação por índice de similaridade entre os espectros, foram identificados os compostos presentes nas frações como sendo: nas frações 14 e 15 o ácido benzoacético (97% de similaridade) (Figura 58) e a benzoacetoamida (97% de similaridade) (Figura 59), e na fração 22 o indol-3-carboxaldeído (94% de similaridade) (Figura 60). Na literatura são encontrados relatos da produção desses compostos por *Streptomyces*[119–123], mas sem relação com ação fitotóxica, com exceção para o Indol-3-carboxaldeído[124].

O efeito fitotóxico desses compostos pode ser explicado por serem conhecidos promotores de crescimento em plantas, assim apresentando o mesmo efeito fitotóxico das auxinas quando aplicadas em maiores concentrações, assim, inibindo seu crescimento pelo efeito de feedback das moléculas envolvidas[49,125–129].

5. CONCLUSÃO

De um total de 166 extratos brutos obtidos, 27 (16%) apresentaram algum nível de atividade fitotóxica com *Lemna minor*. Dentre eles, o extrato CAAT 7-52 (MIC = 6,25 µg) apresentou atividade fitotóxica mais pronunciada, o qual foi submetido ao fracionamento

guiado por bioensaio para desreplicação dos compostos ativos por espectrometria de massas, onde foi observada a presença de dois compostos ativos os quais foram caracterizados como sendo o ácido 3-hidroxibenzóico presente na fração 15, e a Albociclina presente na fração 30 (MIC = 3,12 µg). Ambos os compostos não possuem relatos na literatura sobre possuírem atividade fitotóxica. O extrato CAAT 7-52 também apresentou atividade de inibição de germinação contra sementes de alface, rúcula e buva, todas dicotiledôneas, esta última sendo a mais promissora em razão de seu difícil controle. A actinobactéria CAAT 7-52 foi identificada através do sequenciamento do gene 16S rRNA apresentando um valor de identidade de sequência de 99% com *Streptomyces actinomycinicus*. Também foi verificada a atividade do meio de cultivo fermentado, sem extração com solventes orgânicos, o qual apresentou atividade fitotóxica até uma proporção de 20%, sendo de interesse em razão de possível utilização em teste para controle direto de plantas-daninhas. Ocorre a produção seletiva da albociclina quando utilizado o meio de cultivo PMB e Czapeck com xarope de glicose e a produção seletiva dos análogos da Albociclina em meio de cultivo ISP-2, sendo que ambos os extratos apresentaram atividade fitotóxica significativa. A partir do monitoramento da massa micelial e da produção de Albociclina, foi apresentado um máximo de produção de Albociclina em torno de 21 dias. Foram identificados os compostos indol-3-carboxaldeído, ácido benzacético e benzacetamida nas frações 14, 15 e 22 do extrato AM 33-22, os quais apresentaram atividade fitotóxica em grau moderado contra *Lemna minor*. Ainda que mais experimentos e otimizações necessitem ser realizados, tais resultados mostram o enorme potencial de aplicação biotecnológica das actinobactérias e de seus metabólitos secundários, como os obtidos nesse trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.* **77,** 7–24 (2005).

2. Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2,** 303–336 (2012).

3. Kaur, P. K., Kaur, J. & Saini, H. S. Antifungal potential of Bacillus vallismortis R2 against different phytopathogenic fungi. *Spanish J. Agric. Res.* **13,** 1–11 (2015).

4. Suma, K. L. S., Dev, A. & Florence, E. J. M. Identification and Characterization of Lipopeptides from Bacillus subtilis B1 Against Sapstain Fungus of Rubberwood Through MALDI-TOF-MS and RT-PCR. *Curr. Microbiol.* **73,** 46–53 (2016).

5. Zarins-Tutt, J. S. *et al.* Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. *Nat. Prod. Rep.* **33,** 54–72 (2016).

6. Terhonen, E., Sipari, N. & Asiegbu, F. O. Inhibition of phytopathogens by fungal root endophytes of Norway spruce. *Biol. Control* **99,** 53–63 (2016).

7. Lu, Y. H. *et al.* Isolation, identification, derivatization and phytotoxic activity of secondary metabolites produced by Cladosporium oxysporum DH14, a locust-associated fungus. *J. Integr. Agric.* **15,** 832–839 (2016).

8. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. *Br. J. Exp. Pathol.* **10,** 226–236 (1929).

9. Dembitsky, V. M., Savidov, N., Poroikov, V. V, Gloriozova, T. A. & Imbs, A. B. Naturally occurring aromatic steroids and their biological activities. 4663–4674 (2018).

10. Popova, V. *et al.* Biologically active components in seeds of three Nicotiana species. *Ind. Crops Prod.* **117,** 375–381 (2018).

11. Liu, X. *et al.* Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *J. Antibiot. (Tokyo).* **63,** 415–422 (2010).

12. Jensen, P. R. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical

space. *Metabolomics* (2016). doi:10.1007/s11306-016-1087-5

13. Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. & Rajnisz, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sci.* **7,** 373–390 (2012).

14. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **43,** 155–176 (2016).

15. Dougherty, T. J. & Pucci, M. J. *Antibiotic Discovery and Development*. *Antibiotic Discovery and Development* (Springer Science+Business Media, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-1400-1

16. White, R. J. The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled. in *Antibiotic Discovery and Development* (eds. Dougherty, T. J. & Pucci, M. J.) 3–31 (Springer Science+Business Media, 2014).

17. Bills, G. F. & Gloer, J. B. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol. Spectr.* **4,** (2016).

18. CropLife. 4,500 Years of Crop Protection. *Crop Life International* (2017). Available at: https://croplife.org/news/4500-years-of-crop-protection/. (Accessed: 6th June 2018)

19. University, C. The History of Integrated Pest Management. *Cornell University* Available at: https://courses.cit.cornell.edu/ipm444/lec-notes/extra/ipm-history.html. (Accessed: 6th June 2018)

20. Vats, S. Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. in *Sustainable Agriculture Reviews* (ed. Lichtfouse, E.) **15,** (Springer International Publishing Switzerland, 2015).

21. Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **61,** 49–64 (2010).

22. Alterman, M. K. & Neptune, A. M. L. Efeito do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) na Absorção do Fósforo (32P) pelo Trigo (Triticum aestivum., L) e a Sua Distribuição na Planta. *An. da Esc. Super. Agric. 'Luiz Queiroz'* **34,** 10 (1977).

23. Sparks, T. C., Hahn, D. R. & Garizi, N. V. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest Manag. Sci.* **73,** 700–715 (2017).

24. Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. (2018). Available at: www.weedscience.org. (Accessed: 12th June 2018)

25. Mahmood, Q., Bilal, M. & Jan, S. *Herbicides, Pesticides, and Plant Tolerance: An Overview. An Overview. Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Biological Techniques* **1,** (Elsevier Inc., 2014).

26. Tanaka, Y. & Omura, S. Agroactive Compounds of Microbial Origin. *Annu. Rev. Microbiol* **47,** 57–87 (1993).

27. Ujváry, I. *Pest Control Agents from Natural Products*. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* **Volume 1,** (Elsevier Inc., 2010).

28. Hoerlein, G. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **138,** 73–145 (1994).

29. Duke, S. O. The history and current status of glyphosate. *Pest Manag. Sci.* (2017). doi:10.1002/ps.4652

30. Dekker, J. & Duke, S. O. Herbicide-Resistant Field Crops. *Adv. Agron.* **54,** 69–116 (1995).

31. Duke, S. O. & Powles, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* **64,** 319–325 (2008).

32. Moss, S. Herbicide Resistance in Weeds. in *Weed Research: Expanding Horizons* (eds. Hatcher, P. E. & Froud-Williams, R. J.) 181–214 (John Wiley & Sons Ltd., 2017).

33. Benbrook, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* **28,** 15 (2016).

34. Adegas, F. S. *et al.* Impacto econômico da resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil Introdução. *Circ. Técnica* **132,** 12 (2017).

35. Lanfranconi, L. E. & Gazziero, D. L. P. Herbicide resistant weeds. *CropLife Latin America* Available at: https://www.croplifela.org/en/diseases/herbicide-resistant-weeds. (Accessed: 18th June 2018)

36. Embrapa. Bayer e Embrapa pesquisam plantas daninhas resistentes a herbicidas. *Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação* (2018). Available at: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31269822/bayer-e-embrapa-

pesquisam-plantas-daninhas-resistentes-a-herbicidas. (Accessed: 18th June 2018)

37. Heap, I. & Duke, S. O. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag. Sci.* **74,** 1040–1049 (2018).

38. Duke, S. O., Owens, D. K. & Dayan, F. E. The growing need for biochemical bioherbicides. *ACS Symp. Ser.* **1172,** 31–43 (2014).

39. Taketani, R. G., Kavamura, V. N. & Santos, S. N. Diversity and Technological Aspects of Microorganisms from Semiarid Environments. in *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (eds. de Azevedo, J. L. & Quecine, M. C.) 1–439 (Springer International Publishing AG, 2017). doi:10.1007/978-3-319-55804-2

40. Kavamura, V. N., Taketani, R. G., Ferreira, C., de Melo, I. S. & Mendes, R. The role of species turnover in structuring bacterial communities in a local scale in the cactus rhizosphere. *Plant Soil* **425,** 101–112 (2018).

41. Araújo, E. L., Castro, C. C. & Albuquerque, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga – A Review Concerning the Plants , Environment and People. *Funct. Ecosyst. Communities* **1,** 15–28 (2007).

42. Kavamura, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga : promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. (Universidade de São Paulo - ESALQ, 2012).

43. Taketani, R. G. *et al.* Dry Season Constrains Bacterial Phylogenetic Diversity in a Semi-Arid Rhizosphere System. *Microb. Ecol.* **73,** 153–161 (2017).

44. Kavamura, V. N. *et al.* Water Regime Influences Bulk Soil and Rhizosphere of Cereus jamacaru Bacterial Communities in the Brazilian Caatinga Biome. *PLoS One* **8,** (2013).

45. Taketani, R. G., Kavamura, V. N., Mendes, R. & Melo, I. S. Functional congruence of rhizosphere microbial communities associated to leguminous tree from Brazilian semiarid region. *Environ. Microbiol. Rep.* **7,** 95–101 (2015).

46. Romagnoli, E. M. & Andreote, F. D. Rizosfera. in *Microbiologia do Solo* (eds. Cardoso, E. J. B. N. & Andreote, F. D.) 47–60 (ESALQ, 2016). doi:10.11606/97858481567

47. Barka, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80,** 1–43 (2016).

48. Anandan, R., Dharumadurai, D. & Manogaran, G. P. An Introduction to Actinobacteria. in *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications* (ed. Dharumadurai, D.) 3–38 (IntechOpen, 2016). doi:10.5772/32009

49. El Euch, I. Z. *et al.* Bioactive secondary metabolites from new terrestrial Streptomyces sp. TN82 strain: Isolation, structure elucidation and biological activity. *Med. Chem. Res.* 1–8 (2018). doi:10.1007/s00044-017-2130-4

50. Adegboye, M. F. & Babalola, O. O. Actinomycetes : a yet inexhaustive source of bioactive secondary metabolites. *Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ.* 786–795 (2013).

51. Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. *Exp. Biol. Med.* **45,** 609–614 (1940).

52. Kominek, L. A. Biosynthesis of novobiocin by Streptomyces niveus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1,** 123–134 (1972).

53. Umezawa, H. *et al.* Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot* **10,** 181–188 (1957).

54. Dulmage, H. T. The production of neomycin by Streptomyces fradiae in synthetic media. *Appl. Microbiol.* **1,** 103–6 (1953).

55. Margalith, P. & Beretta, G. Rifomycin. IX. Taxonomic study on Streptomyces mediterranei nov. sp. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **13,** 321–330 (1960).

56. Schatz, A. & Waksman, S. A. Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon Mycobacterium tuberculosis and Related Organisms.,. *Exp. Biol. Med.* **57,** 244–248 (1944).

57. Linke, H. A. B., Mechlinski, W. & Schaffner, C. P. Production of amphotericin B-14c by Streptomyces nodosus fermentation, and preparation of the amphotericin B-14c-methyl-ester. *J. Antibiot. (Tokyo).* **27,** 155–160 (1974).

58. Matsuoka, M., Yagishita, K. & Umezawa, H. Studies on the intermediate metabolism of chloramphenicol production. *Japanese J. Med. Sci. Biol.* **6,** 161–169 (1953).

59. Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin. *J. Bacteriol.* **44,** 373–84 (1942).

60. Omura, S. *et al.* Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of Streptomyces. *J. Antibiot. (Tokyo).* **32,** 255–261 (1979).

61. Õmura, S. & Crump, A. The life and times of ivermectin — a success story. *Nat. Rev. Microbiol.* **2,** 984–989 (2004).

62. Box, S. J., Cole, M. & Yeoman, G. H. Prasinons A and B: potent insecticides from Streptomyces prasinus. *Appl Microbiol* **26,** 699–704 (1973).

63. Burg, R. W. *et al.* Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents: Producing Organism and Fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15,** 361–367 (1979).

64. Cerdeño, A. M., Bibb, M. J. & Challis, G. L. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of Streptomyces coelicolor A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem. Biol.* **8,** 817–829 (2001).

65. Maskey, R. P. *et al.* Anti-cancer and Antibacterial Trioxacarcins with High Anti-malaria Activity from a Marine Streptomycete and their Absolute Stereochemistry. *J. Antibiot. (Tokyo).* **57,** 771–779 (2004).

66. Vino, S. & Lokesh, K. R. Borrelidin: a promising anticancer agent from Streptomyces species. *Adv Biotech* 22–26 (2008).

67. Arcamone, F. *et al.* Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic fromS. Peucetius var.caesius. *Biotechnol. Bioeng.* **11,** 1101–1110 (1969).

68. Uyeda, M., Mizukami, M., Yokomizo, K. & Suzuki, K. Pentalenolactone I and Hygromycin A, Immunosuppressants produced by Streptomyces filipinensis and Streptomyces hygroscopicus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65,** 1252–1254 (2001).

69. Shapiro, S. *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*. (CRC Press, 1989).

70. Hynes, R. K. & Boyetchko, S. M. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. **38,** 845–849 (2006).

71. Chavan, D. V, Mulaje, S. S. & Mohalkar, R. Y. A Review on actinomycetes and their biotechnological applications. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **4,** 1730–1742 (2013).

72. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery : past , present , and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2016). doi:10.1007/s10295-015-1723-5

73. Chervin, J. *et al.* Targeted Dereplication of Microbial Natural Products by High-

Resolution MS and Predicted LC Retention Time. *J. Nat. Prod.* **80,** 1370–1377 (2017).

74. Crevelin, E. J., Crotti, A. E. M., Zucchi, T. D., Melo, I. S. & Moraes, L. A. B. Dereplication of Streptomyces sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **49,** 1117–1126 (2014).

75. Carnevale Neto, F. *et al.* Dereplication of Natural Products Using GC-TOF Mass Spectrometry: Improved Metabolite Identification by Spectral Deconvolution Ratio Analysis. *Front. Mol. Biosci.* **3,** 1–13 (2016).

76. Niessen, W. M. A. State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **856,** 179–197 (1999).

77. Bouslimani, A., Sanchez, L. M., Garg, N. & Dorrestein, P. C. Mass spectrometry of natural products: Current, emerging and future technologies. *Nat. Prod. Rep.* **31,** 718–729 (2014).

78. Gilbert, J. R., Lewer, P., Duebelbeis, D. O. & Carr, A. W. The Central Role of Mass Spectrometry in Natural Products Discovery. *Integr. Strateg. drug Discov. using mass Spectrom.* 149–188 (2005). doi:10.1002/0471721034.ch6

79. De Hoffmann, E. Tandem mass spectrometry: A primer. *J. Mass Spectrom.* **31,** 129–137 (1996).

80. Gross, J. H. *Mass Spectrometry*. *Springer* (2011). doi:10.1201/9781420040340.axa

81. Hoffmann, E. De & Stroobant, V. *Mass Spectrometry - Priniples and Applications. Mass spectrometry reviews* **29,** (2007).

82. States, U. & Substances, T. Ecological Effects Test Guidelines Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp ., Tiers I and II. *Environ. Prot.* (1996).

83. Crevelin, E. J. *et al.* Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by streptomyces sp. AMC 23 from red mangrove (Rhizophora mangle). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171,** 1602–1616 (2013).

84. Souza, D. T. *et al.* Saccharopolyspora spongiae sp. nov., a novel actinomycete isolated from the marine sponge scopalina ruetzleri (wiedenmayer, 1977). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67,** 2019–2025 (2017).

85. Lane, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. in *Nucleic Acid Techniques in Bacterial*

Systematic (eds. Stackebrandt, E. & Goodfellow, M.) 115–175 (John Wiley and Sons, 1991).

86. Wright, E. S., Yilmaz, L. S. & Noguera, D. R. DECIPHER, a Search-Based Approach to Chimera Identification for 16S rRNA Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **78,** 717–725 (2012).

87. Kim, O.-S. *et al.* Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62,** 716–721 (2012).

88. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22,** 4673–80 (1994).

89. Tamura, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28,** 2731–2739 (2011).

90. Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17,** 368–376 (1981).

91. Fitch, W. M. Toward Defining the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology. *Syst. Zool.* **20,** 406 (1971).

92. SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4,** 406–425 (1987).

93. Felsenstein, J. Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution (N. Y).* **39,** 783–791 (1985).

94. Havlíková, L., Matysová, L., Hájková, R., Šatínský, D. & Solich, P. Advantages of pentafluorophenylpropyl stationary phase over conventional C18 stationary phase—Application to analysis of triamcinolone acetonide. *Talanta* **76,** 597–601 (2008).

95. Corporation, W. MassLynx 4.1: Getting Started Guide. *ReVision* 94 (2005).

96. Vechia, J. F. Della, Cruz, C., Silva, A. F., Cerveira Jr., W. R. & Garlich, N. Macrophyte Bioassay Applications for Monitoring Pesticides in the Aquatic Environment. *Planta Daninha* **34,** 597–603 (2016).

97. Wang, W. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* **52,** 7–22 (1990).

98. Brain, R. A. & Solomon, K. R. PROTOCOL A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with Lemna gibba. **2,** (2007).

99. Zoche, S. Uso de tecnologias diminui infestação de buva na lavoura de soja. *Embrapa* (2011). Available at: https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18153589/uso-de-tecnologias-diminui-infestacao-de-buva-na-lavoura-de-soja-.

100. Holmes, J. L. & Benoit, F. The mass spectra of carboxylic acids—III: The structures of molecular and fragment ions in benzoic acid and related molecules. *Org. Mass Spectrom.* **4,** 97–107 (1970).

101. Dictionary of Natural Products. *Chapman & Hall Chemical Dictionaries* Available at: http://dnp.chemnetbase.com.

102. Gao, Y. *et al.* Comparative phytotoxicity of usnic acid, salicylic acid, cinnamic acid and benzoic acid on photosynthetic apparatus of Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiol. Biochem.* **128,** 1–12 (2018).

103. War, A. R., Paulraj, M. G., War, M. Y. & Ignacimuthu, S. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal. Behav.* **6,** 1787–1792 (2011).

104. Zucchi, T. D., Almeida, L. G., Moraes, L. A. B. & Cônsoli, F. L. Albocycline, the main bioactive compound from Propionicimonas sp. ENT-18 against Sclerotinia sclerotiorum. *Ind. Crops Prod.* **52,** 264–268 (2014).

105. Taddei, A. & Zeeck, A. Biosynthesis of Albocycline: Origin of the Carbon Skeleton. *J. Antibiot. (Tokyo).* **50,** 1–3 (1997).

106. Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M. & Thomas, M. G. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. *Nat. Prod. Rep.* **26,** 90–114 (2009).

107. Harborne, J. B. Dictionary of Natural Products. *Phytochemistry* **38,** 279 (1995).

108. Reusser, F. Mode of Action of Albocycline , an Inhibitor of Nicotinate Biosynthesis. **100,** 11–13 (1969).

109. Taguchi, H., Nishitani, H., Okumura, K., Shimabayashi, Y. & Iwai, K. Biosynthesis and Metabolism of Trigonelline in *Lemna paucicostata* 151. *Agric. Biol. Chem.* **53,** 2867–

2871 (1989).

110. Sasamoto, H. & Ashihara, H. Effect of nicotinic acid, nicotinamide and trigonelline on the proliferation of lettuce cells derived from protoplasts. *Phytochem. Lett.* **7,** 38–41 (2014).

111. Mizuno, K. *et al.* Conversion of nicotinic acid to trigonelline is catalyzed by N-methyltransferase belonged to motif B??? methyltransferase family in Coffea arabica. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **452,** 1060–1066 (2014).

112. Disaccharide. *Encyclopædia Britannica, inc.* (2015). Available at: https://www.britannica.com/science/disaccharide.

113. Monosaccharide. *Encyclopædia Britannica, inc.* (2018). Available at: https://www.britannica.com/science/monosaccharide.

114. Kim, H. J. *et al.* A single module type I polyketide synthase directs de Novo macrolactone biogenesis during galbonolide biosynthesis in Streptomyces galbus. *J. Biol. Chem.* **289,** 34557–34568 (2014).

115. Nguyen, H. C., Darbon, E., Thai, R., Pernodet, J. L. & Lautru, S. Post-PKS tailoring steps of the spiramycin macrolactone ring in streptomyces ambofaciens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57,** 3836–3842 (2013).

116. Tang, L., Fu, H., Betlach, M. C. & McDaniel, R. Elucidating the mechanism of chain termination switching in the picromycin/methymycin polyketide synthase. *Chem. Biol.* **6,** 553–558 (1999).

117. Mitchison, J. M. *The Biology of the Cell Cycle*. (Cambridge University Press, 1972).

118. Ruiz, B. *et al.* Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol.* **36,** 146–167 (2010).

119. Pu, X. *et al.* A new cyclododeca[d]oxazole derivative from Streptomyces spp. CIBYL1. *Nat. Prod. Res.* **27,** 603–608 (2013).

120. Hwang, B. K. *et al.* Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from Streptomyces humidus Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from Streptomyces humidus. *Appl. Environ. Microbiol.* **67,** 3739–3745 (2001).

121. Sri Andayani, D. G., Sukandar, E. Y., Sukandar, U. & Ketut Adnyana, I. Isolation, identification of phenylacetic acid from Streptomyces galbusTP2 strain and its toxicity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6,** 643–646 (2014).

122. Sajid, I., Shaaban, K. A. & Hasnain, S. Identification,Isolation and optimization of antifungal metabolites from the Streptomyces malachitofuscus CTF9. *Brazilian J. Microbiol.* **42,** 592–604 (2011).

123. Yang, S. W. & Cordell, G. A. Metabolism studies of indole derivatives using a staurosporine producer, Streptomyces staurosporeus. *J. Nat. Prod.* **60,** 44–48 (1997).

124. Li, Z. H. *et al.* Biological activity and quantification of potential autotoxins from Picea schrenkiana leaves. *Allelopath. J.* **27,** 245–262 (2011).

125. Anaya, A. L., Hernandez-Bautista, B. E., Jimenez-Estrada, M. & Velasco-Ibarra, L. Phenylacetic acid as a phytotoxic compound of corn pollen. *J. Chem. Ecol.* **18,** 897–905 (1992).

126. Bartz, F. E., Glassbrook, N. J., Danehower, D. a. & Cubeta, M. a. Elucidating the role of the phenylacetic acid metabolic complex in the pathogenic activity of Rhizoctonia solani anastomosis group 3. *Mycologia* **104,** 793–803 (2012).

127. Cardellina, J. H., Nigh, D. & Van Wagenen, B. C. Plant Growth Regulatory Indoles from the Sponges Dysidea Etheria and Ulosa Ruetzleri. *J. Nat. Prod.* **49,** 1065–1067 (1986).

128. Kaufman, D. D. Biodegradation and persistence of several and organophosphate pesticide combinations. *Soil Biol. Biochem.* **9,** 49–57 (1966).

129. Wang, C. *et al.* Enantioselective Phytotoxicity and the Relative Mechanism of Current Chiral Herbicides. *Curr. Protein Pept. Sci.* **18,** 15–21 (2016).

ANEXO A

MEIOS DE CULTIVO

SIS (*Swedish Standard*)

O meio SIS é preparado pela adição de 10 mL da solução estoque 1; 5,0 mL das soluções estoque 2, 3, 4 e 6 e 1,0 mL da solução estoque 5 em balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume final com água deionizada, o volume final é filtrado com membrana de porosidade 0,22 µm e feito ajuste de pH para 6,5±0,2. As soluções estoque devem ser armazenas na geladeira, no escuro e possuem validade de 6 meses, com exceção da solução 6 que tem de apenas 1 mês.

	Solução Estoque	**Massa dos reagentes/Litro**	**Volume para 1 Litro**
1)	$NaNO_3$	8,5 g	10 mL
	KH_2PO_4	1,34 g	
2)	$MgSO_4.7H_2O$	15 g	5 mL
3)	$CaCl_2.2H_2O$	7,2 g	5 mL
4)	Na_2CO_3	4 g	5 mL
5)	H_3BO_3	1,0 g	
	$MnCl_2.2H_2O$	0,2 g	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,01 g	1 mL
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,05 g	
	$CuSO_4.5H_2O$	0,005 g	
	$CoCl_2$	0,01 g	
6)	$FeCl_3.6H_2O$	0,17 g	5 mL
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,28 g	

BD (Batata-Dextrose)

200 mL de caldo de batata

20,0 g de dextrose (Difco)

800 mL de água

Caldo de batata: Cozinhar 400 g de batatas picadas e descascadas em 1000 mL de água deionizada. Após o cozimento, filtrar o caldo e corrigir o volume.

BDA (Batata-Dextrose-Ágar)

39,0 g de Batata Dextrose Ágar (Difco)

3,0 g de ágar (Difco)

1000 mL água deionizada

Czapeck

30,0 g de sacarose

1,0 g de K_2HPO_4 (Synth)

0,5 g de $MgSO_4.7H_2O$ (Synth)

0,01 g de $FeSO_4.7H_2O$ (Synth)

3,0 g de $NaNO_3$ (Synth)

1000 mL de água deionizada

Meio sólido: adicionar 18,0 g de ágar.L^{-1}

Czapeck-GL

30,0 g de xarope de glucose

1,0 g de K_2HPO_4

0,5 g de $MgSO_4.7H_2O$

0,01 g de $FeSO_4.7H_2O$

3,0 g de $NaNO_3$

1000 mL de água deionizada

GYE (*Glucose Yeast Extract*)

10,0 g de extrato de levedura (Oxoid)

10,0 g de dextrose (Difco)

1000 mL água deionizada

Meio sólido: adicionar 18,0 g de ágar.L^{-1}

ISP-2 (*International Streptomyces Project*)

4,0 g de extrato de levedura

10,0 g de extrato de malte

4,0 g de dextrose

1000 mL de água deionizada

Meio sólido: adicionar 18,0 g de ágar.L^{-1}

PMB (*Postgate's Medium B*)

1,0 g de extrato de carne (Kasvi)

2,0 g de extrato de levedura (Oxoid)

2,0 g triptose (Fluka)

10,0 g de dextrose (Difco)

0,1 g de amido de milho

0,1 g de $CaCO_3$

0,1 mL de solução de sais

1000 mL de água deionizada

Meio sólido: adicionar 18,0 g de ágar.L^{-1}

Solução de sais: 0,2 g de $FeSO_4.7H_2O$

0,2 g de $MnCl.4H_2O$

0,2 g de $ZnSO_4.7H_2O$

10 mL de água deionizada