

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETÍCIA FERRAZ DE SENA AMORIM

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PRODUTO DE FERMENTAÇÃO
DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA DA
AMAZÔNIA**

Alfenas/MG

2018

LETÍCIA FERRAZ DE SENA AMORIM

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PRODUTO DE FERMENTAÇÃO
DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA DA
AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marília Caixeta Franco Ariosi
Co-orientadora: Dra. Patrícia Lunardelli Negreiros de
Carvalho

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

A524a Amorim, Leticia Ferraz de Sena
Avaliação do potencial bioativo do produto de fermentação de actinomicetos isolados de terra preta antropogênica da Amazônia/ Leticia Ferraz de Sena Amorim. -- Alfenas/MG, 2018.
95 f. : il. --

Orientadora: Marília Caixeta Franco Ariosa.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Microbiologia do Solo. 2. Fermentação. 3. Produtos com Ação Antimicrobiana. 4. Actinobacteria. 5. Antioxidantes. I. Ariosa, Marília Caixeta Franco. II. Título.

CDD-579.37



LETÍCIA FERRAZ DE SENA AMORIM

“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DO PRODUTO DE
FERMENTAÇÃO DE ACTINOMICETOS ISOLADOS DE TERRA PRETA ANTROPOGÊNICA
DA AMAZÔNIA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 23 de fevereiro de 2018.

Dra. Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Instituição: UFLA

Assinatura: 

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico, com amor: aos meus pais Humberto e
Claudia, à minha irmã Fernanda, e ao meu esposo
Habner.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Marília Caixeta Franco Ariosa, pela orientação e por não ter medido esforços para a realização deste trabalho. Agradeço por todo apoio e confiança, pela paciência e por todas as conversas; tudo isto foi muito importante para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desta caminhada.

À Dra. Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho, pelos ensinamentos, paciência e encorajamento que me ajudaram muito a enfrentar os desafios. Agradeço pela amizade que construímos e por sempre se dispor a me ajudar, nunca terei palavras suficientes para expressar toda a minha gratidão.

À Prof.^a Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz, pela colaboração, disposição e auxílio com a química.

Ao Prof. Dr. Severino Matias Alencar e sua equipe, pela colaboração com os experimentos de quantificação de antioxidantes.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e seu aluno mestrando Gabriel Augusto Pires de Souza, pela colaboração com os testes de citotoxicidade.

A Prof.^a Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan, pelas contribuições e ensinamentos de biologia molecular.

Ao doutorando Mateus de Souza Terceti pela coleta da TPA e isolamento dos micro-organismos utilizados no presente estudo.

À mestranda Isabela Victorino da Silva Amatto, que em sua iniciação científica realizou importantes testes prévios com alguns dos micro-organismos estudados.

Aos Professores Dr. Masaharu Ikegaki, Dra. Amanda Latercia Tranches Dias e Dra. Lilian Pereira Franco, que compuseram a banca examinadora do relatório de qualificação do presente trabalho, e contribuíram com importantes e valiosas sugestões para a melhoria do mesmo.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia (Unifal-MG): técnicos Marcelo Vieira de Souza e Antônio Bernardes de Souza pelo auxílio com materiais; e Franciene Maria das Neves da Mata pela amizade, apoio, grande ajuda com vidrarias, autoclavagem e limpeza do nosso local de trabalho. Também agradeço aos Professores que sempre utilizaram o laboratório durante este tempo, pelo convívio e ensinamentos diários, especialmente: Dr. Jorge Kleber Chavasco (*in memoriam*) e Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias.

À toda equipe do Laboratório de Bioprocessos (Unifal-MG) que gentilmente me permitiu utilizar os equipamentos e espaço do laboratório, especialmente ao técnico e doutorando Gustavo Silveira pela gentileza, auxílio e aprendizado com a química, e à funcionária Daniela Aparecida de Paulo Pinto, pela boa convivência e ajuda com vidrarias e limpeza do local.

Aos Professores Dr. Marcos José Marques e Dr. Fábio Antônio Colombo do Laboratório de Biologia Molecular (Unifal-MG), pelo convívio e aprendizado durante este período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Unifal-MG) pelo suporte necessário à realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro necessário ao desenvolvimento do presente trabalho, e à Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade de realização do Mestrado.

A Deus, por ter guiado e abençoado meus passos e por ter me dado forças para vencer os desafios.

Aos meus pais Humberto e Cláudia, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e que me ensinaram que o estudo é a melhor forma de crescer. Estes que me apoiaram em cada decisão e que, acima de tudo, demonstram carinho e amor por mim mesmo a alguns quilômetros de distância. Meus grandes exemplos de superação e confiança em Deus. A vocês, dedicarei todas as minhas conquistas.

Ao meu amor Habner, que me proporciona grandes alegrias a cada dia. Além de esposo, meu melhor amigo que fez com que meu percurso no Mestrado tenha sido mais leve. Obrigada por todo o seu carinho, cuidado e paciência em me ouvir, você é uma grande inspiração para mim.

À minha irmã Fernanda, pelo carinho e confiança. Você é meu presente, te ter como irmã faz a vida ser muito mais divertida.

A minha avó materna Teresinha, por sempre ter acreditado em mim e por tamanho orgulho que sente com minhas conquistas.

Ao meu avô materno Cleber (*in memoriam*), pelo amor que demonstrava por mim, mesmo com seu “jeito peculiar” de ser, e por também acreditar que, através do estudo, conquistaria meus sonhos.

Aos meus avós paternos Gilberto e Aidê, exemplos de força e luta, pelo carinho e orações.

Aos meus demais familiares, pelo apoio e convivência.

Aos amigos que ganhei no Laboratório de Microbiologia (Unifal-MG), pela amizade, ensinamentos e convívio diário: Daniel, Josidel, Camila, Naiara, Alexandre e Carla. Vocês fizeram meus dias de trabalho no laboratório serem muito mais felizes e dinâmicos.

Às amigas que fiz no Mestrado: Ana Luísa, Marina, Catherine e Patrícia, agradeço por tanto incentivo, conversas e risadas, pelos nossos encontros e amizade verdadeira que construímos.

Aos amigos antigos que continuam torcendo por mim, mesmo a distância, mas com o mesmo carinho de sempre.

RESUMO

A terra preta antropogênica da Amazônia (TPA), ou terra preta de índio, possui grande diversidade microbiana. Diante do aumento da resistência de micro-organismos patogênicos aos antibióticos disponíveis e da importância de antioxidantes na prevenção do dano oxidativo celular, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial bioativo de extratos provenientes do produto da fermentação de actinomicetos isolados de TPA. Cinco actinomicetos (FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5) não identificados, isolados de TPA da Amazônia Central, foram submetidos à fermentação e seus extratos foram obtidos com acetato de etila. Ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) foram realizados com os cinco extratos frente a três cepas microbianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os extratos que obtiveram os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), e fracionados em coluna Sephadex LH-20. As frações foram avaliadas por CCD com diferentes reveladores químicos e submetidas a ensaios de CIM e CMM contra a cepa que apresentou maior sensibilidade nos testes com os extratos brutos. A fração mais promissora foi submetida a ensaios de detecção e quantificação de fenólicos e atividade antioxidante, e também foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia no ultravioleta - visível. Frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram avaliadas quanto ao potencial de ação sinérgica em associação com a amoxicilina e quanto à sua citotoxicidade frente a células Vero. Experimentos para identificação dos actinomicetos considerados promissores foram iniciados com o sequenciamento do gene 16S do rRNA. As linhagens FL3 e FL4 se sobressaíram quanto ao potencial antimicrobiano frente a *S. aureus* e foram selecionadas, juntamente com seus respectivos extratos, para dar continuidade ao trabalho. O extrato FL3 apresentou CIM de 100-200 µg/mL, e o extrato FL4 apresentou CIM de 25-50 µg/mL e CMM de 100-200 µg/mL. O fracionamento do extrato FL3 resultou em quatro frações, sendo que duas delas, B3 e C3, apresentaram os melhores valores de CIM, entre 100-200 µg/mL. A partir do extrato FL4 foram obtidas seis frações, sendo relevante mencionar os melhores valores de CIM observados para B4 e D4: entre 50 e 100 µg/mL. Dentre estas, apenas a fração B4 apresentou atividade microbicida, com CMM de 100-200 µg/mL. Nos ensaios químicos preliminares das frações foi possível sugerir a presença de grupos cromóforos, aminas primárias, flavonoides e terpenos e substâncias com ação antioxidante. A fração D4 apresentou $140,71 \pm 4,0105$ mg de GAE/g de fração, e obteve promissores resultados de atividade antioxidante no método ORAC: 5581,85

± 515,1450 µmol de Trolox/g da fração. A associação entre as frações A3, B3 e D4 e o antimicrobiano amoxicilina potencializou a ação do fármaco em até quatro vezes. Na avaliação da citotoxicidade, as frações B3, B4, C4 e D4 foram consideradas mais efetivas do que tóxicas às células Vero (IS > 1). O sequenciamento do gene 16S, juntamente com a posição filogenética dos isolados FL3 e FL4 entre as espécies mais próximas, mostrou que ambos pertencem à família Streptomycetaceae, sendo prováveis espécies do gênero *Streptomyces*.

Palavras chave: Terra preta de índio. Fermentação. Potencial bioativo. Actinomicetos.

ABSTRACT

The *terra preta de índio* (TPI) has a great microbial diversity. In view of the increasing resistance of pathogenic microorganisms to the known antibiotics and the importance of antioxidant compounds in the prevention of cellular oxidative damage, the objective of this study was to evaluate the bioactive potential of extracts from the fermentation product of actinomycetes isolated from TPI. Unidentified five actinomycetes (FL1, FL2, FL3, FL4 and FL5), isolated from TPI of Central Amazonia, were undergone to fermentation, and their extracts were obtained with ethyl acetate. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) assays were performed with five extracts against three microbial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The extracts that had the best results of antimicrobial activity were characterized by thin-layer chromatography (TLC), and further fractionated by the Sephadex LH-20 column. The fractions were evaluated by TLC with different developers and submitted to MIC and MMC tests against the strain that showed the highest sensitivity in the tests with the crude extracts. The most promising fraction was submitted to assays of quantification phenolic compounds and antioxidant activity, and was also analyzed by high performance liquid chromatography and ultraviolet spectroscopy. Fractions that showed antimicrobial activity were evaluated about your potential of action synergistic in association with the amoxicillin and its cytotoxicity against Vero cells. Experiments to identify the actinomycetes considered promising were initiated with the sequencing of the 16S rRNA gene. The microbial lines FL3 and FL4 stood out for the antimicrobial potential against *S. aureus*; thus, these actinobacteria and their extracts were selected to continue the work. The extract FL3 presented MIC of 100-200 $\mu\text{g/mL}$ and MMC $> 400 \mu\text{g/mL}$, and the extract FL4 presented MIC of 25-50 $\mu\text{g/mL}$ and MMC of 100-200 $\mu\text{g/mL}$. Fractionation of the FL3 extract resulted in four fractions, two of which, B3 and C3, presented the best MIC values, between 100-200 $\mu\text{g/mL}$. From the FL4 extract, six fractions were obtained, being relevant to mention the best values of MIC observed for B4 and D4: between 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$. Among these, only fraction B4 presented microbicidal activity, with CMM of 100-200 $\mu\text{g/mL}$. In the preliminary chemical tests, using TLC, it was possible to suggest the presence of chromophore groups, primary amines, flavonoids, terpenes and antioxidant substances. The D4 fraction, submitted to phenolic quantification and antioxidant activity assays, presented 140.71 ± 4.0105 mg of GAE/g of fraction, and obtained promising results of antioxidant activity in the ORAC method: 5581.85 ± 515.11450 μmol of Trolox/g of

fraction. The association between the fractions A3, B3 and D4 and the antimicrobial amoxicillin potentiated the action of the drug by up to four times. In the evaluation of cytotoxicity, it was observed that fractions B3, B4, C4 and D4 were considered to be more effective than toxic to Vero cells ($IS > 1$). Sequencing of the 16S gene, together with the phylogenetic position of the FL3 and FL4 isolates, showed that both belong to the family Streptomycetaceae, being probable species of the genus *Streptomyces*.

Key words: *Terra preta de índio*. Fermentation. Bioactive potential. Actinomycetes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Comparação de perfis típicos de latossolo e de terra preta antropogênica. A: perfil típico de latossolo, no qual pode-se observar uma coloração marrom claro. A textura deste solo é argilosa ou arenosa e a estrutura é dominada por micro agregados estáveis. B: típico perfil de TPA, com coloração variando de cinza escuro a cor preta. Cacos, pequenos ossos, partículas de carvão, sinais de bioturbação e agregados de origem biogênica podem ser frequentemente encontrados. Terras pretas possuem, tipicamente, a mesma textura de outros solos circundantes 23
- Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida de actinomicetos produtores de esporos 26
- Figura 3 - Mapa da região amazônica que contém o município de Presidente Figueiredo delimitado em cor rosa. O ponto vermelho representa a área de coleta da TPA (1°50'12.8"S 60°11'05.6"W), a partir da qual os actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5 foram isolados 38
- Figura 4 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 associadas com o antimicrobiano comercial amoxicilina e o respectivo micro-organismo (*S. aureus* ATCC 6538) 48
- Figura 5 - Curvas de crescimento das linhagens FL3 e FL4 cultivadas em caldo Czapek durante 20 dias a 28°C em condição estática 56
- Figura 6 - Cromatografia em camada delgada das frações obtidas a partir dos extratos FL3 e FL4 (fase móvel: CHCl₃:MeOH:n.PrOH:H₂O 5:6:1:4, fase orgânica) reveladas com luz UV-254 nm (A), anisaldeído sulfúrico (B), DPPH^{*} (C) e ninhidrina (D) 61
- Figura 7 - Cromatografia em camada delgada dos padrões catequina (C), quercetina (Q), ácido tânico (T) e ácido gálico (G) revelados com luz UV-254 nm (esquerda) e anisaldeído sulfúrico (direita). Fase móvel: CHCl₃:MeOH:n.PrOH:H₂O 5:6:1:4, fase orgânica 62
- Figura 8 - Cromatogramas da fração D4 obtidos por CLAE, monitorados a 254 (A), 270 (B) e 300 (C) nanômetros 71

- Figura 9 - Espectros de absorção da luz ultravioleta visível dos picos I, II, III, IV e V pertencentes à fração D4 72
- Figura 10 - Árvore de *Neighbor-joining* calculada com base em sequências do gene 16S do rRNA (1372 pb), com aplicação do método de distância evolutiva *Tamura-Nei*, que mostra as relações entre as linhagens FL3 e FL4 e as linhagens Tipo de espécies de *Streptomyces* e *Kitasatospora* filogeneticamente próximas. Valores de *bootstrap* (1000 repetições) de 50% ou mais são mostrados. Barra: 0,01 substituições por posição de nucleotídeo 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de moléculas bioativas com ação antifúngica produzidas por espécies do filo Actinobacteria.....	30
Tabela 2 - Rendimentos (mg/L) dos extratos AcOEt provenientes da fermentação dos actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5.....	53
Tabela 3 - Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM), em µg/mL, observadas para extratos AcOEt provenientes da fermentação dos actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5, e para os antimicrobianos padrões (amoxicilina, estreptomicina e fluconazol) frente aos micro-organismos <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>E. coli</i> ATCC 25922 e <i>C. albicans</i> ATCC 10231	54
Tabela 4 - Rendimento (mg) das frações do extrato FL3	58
Tabela 5 - Rendimento (mg) das frações do extrato FL4	58
Tabela 6 - Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM), em µg/mL, observadas para as frações A3, B3, C3 e D3 obtidas do extrato bruto FL3 e para as frações A4, B4, C4, D4, E4 e F4 oriundas do extrato bruto FL4	59
Tabela 7 - Atividade antioxidante da fração D4 determinada pelos métodos DPPH [•] , ABTS ^{•+} , ORAC e FRAP, expressa em equivalente de µmol de padrão por grama da fração (µmol/g)	67
Tabela 8 - Resultados do teste de <i>checkerboard</i> , em µg/mL, realizado com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 em associação com a amoxicilina.....	73
Tabela 9 - Resultados do teste de citotoxicidade, em µg/mL, realizado com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 frente a células Vero	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH -	Dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidino-propano)
ABTS -	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
A _c -	Absorbância do controle
AcOEt -	Acetato de etila
AMB -	Anfotericina B
A _t -	Absorbância da amostra teste
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST -	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOD -	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CBM -	Concentração bactericida mínima
CC ₅₀ -	Concentração citotóxica para 50% do crescimento celular
CCD -	Cromatografia em camada delgada
CDA -	Antibiótico dependente de cálcio
CFM -	Concentração fungicida mínima
CIF _A -	Concentração inibitória fracionária do antimicrobiano
CIF _F -	Concentração inibitória fracionária da fração
CIM -	Concentração inibitória mínima
CIM _A -	Concentração inibitória mínima da amoxicilina
CIM _{CA} -	Concentração inibitória mínima da amoxicilina combinada com a fração
CIM _{CF} -	Concentração inibitória mínima da fração combinada com a amoxicilina
CIM _F -	Concentração inibitória mínima da fração
CLAE -	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI -	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH -	Caldo Mueller Hinton
CMM -	Concentração microbicida mínima
CSab -	Caldo Sabouraud
DMEM -	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMI -	Departamento de Microbiologia e Imunologia
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DPPH -	2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA -	Estados Unidos da América
ERO -	Espécie Reativa de Oxigênio
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
FRAP -	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GAE -	Ácido gálico
HPLC -	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICB -	Instituto de Ciências Biomédicas
ICIF -	Índice da concentração da concentração inibitória fracionária
IS -	Índice de seletividade
MCR -	<i>Mobilized Colistin Resistance</i>
MEGA -	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MLST -	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MNG -	Meio de cultura glicose nutriente modificado
MTCC -	<i>Microbial Type Culture Collection</i>
MTT -	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NCBI -	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PA -	Para análise
PCD -	<i>Programmed Cell Death</i>
PCR -	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
pb -	Pares de bases
ORAC -	Capacidade de absorção do radical oxigênio (do inglês <i>Oxygen radical absorbance capacity</i>)
RDP -	<i>Ribosomal Database Project</i>
RF -	Fator de retenção
RNA -	Ácido ribonucleico
rRNA -	Ácido ribonucleico ribossomal
SFB -	Soro fetal bovino
SOD -	Superóxido dismutase
TBE -	Tampão tris borato EDTA
TE -	Tampão tris EDTA
TPA -	Terra preta antropogênica
TPI -	Terra preta de índio

TPTZ - Tripiridiltiazina
UFC - Unidade formadora de colônia
UV - Ultravioleta
UV-Vis - Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	Terra Preta Antropogênica	22
2.2	Actinobactérias	25
2.3	Compostos bioativos produzidos por actinomicetos	26
2.3.1	Antimicrobianos	27
2.3.2	Antioxidantes.....	33
2.4	Gênero <i>Streptomyces</i>	35
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Obtenção dos micro-organismos	38
4.2	Processo de fermentação e obtenção de extratos brutos	39
4.3	Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)	39
4.3.1	Preparo das amostras	39
4.3.2	Preparo do inóculo.....	40
4.3.3	Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)	40
4.3.4	Determinação da CMM (Concentração Microbicida Mínima)	41
4.4	Curva de crescimento	41
4.5	Análise química e fracionamento dos extratos por técnicas cromatográficas	42
4.6	Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante	43
4.6.1	Determinação quantitativa de composto fenólicos	43
4.6.2	Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre (DPPH*).....	44
4.6.3	Atividade antioxidante pelo método do ABTS ^{•+}	45
4.6.4	Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP).....	46
4.6.5	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	46
4.7	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no ultravioleta - visível (UV-Vis)	47
4.8	Teste de <i>checkerboard</i>	47

4.9	Avaliação da citotoxicidade das frações	48
4.10	Identificação molecular dos micro-organismos promissores.....	50
4.10.1	Extração do DNA	50
4.10.2	Amplificação utilizando os iniciadores 27F e 1492R.....	50
4.10.3	Reação de sequenciamento e análise das sequências	51
4.10.4	Construção da árvore filogenética	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Fermentação e obtenção dos extratos brutos	53
5.2	Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)	53
5.3	Curva de crescimento das linhagens FL3 e FL4.....	56
5.4	Análise e fracionamento dos extratos FL3 e FL4 por técnicas cromatográficas.....	57
5.5	Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) das frações dos extratos FL3 e FL4.....	58
5.6	Avaliação química das frações por cromatografia em camada delgada	60
5.7	Quantificação de compostos fenólicos e de atividade antioxidante da fração D4	66
5.7.1	Determinação quantitativa de compostos fenólicos	66
5.7.2	Quantificação de atividade antioxidante da fração D4.....	67
5.8	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no ultravioleta - visível (UV-Vis)	70
5.9	Teste de <i>checkerboard</i>.....	73
5.10	Avaliação da citotoxicidade das frações	74
5.11	Identificação molecular dos actinomicetos FL3 e FL4.....	76
6	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

A terra preta antropogênica da Amazônia (TPA), ou terra preta de índio é encontrada em sítios arqueológicos nos quais viveram grupos pré-colombianos, por isso é chamada de antropogênica (GLASER, 2007; GLASER; ZECH; WOODS, 2004; NEVES et al., 2003; WOODS; DENEVAN, 2009). Segundo trabalhos de Glaser e colaboradores (2001), Glaser (2007) e de Glaser e Birk (2012), a TPA possui grandes reservas de matéria orgânica e altos níveis de nutrientes, fatores estes que contribuem para a grande diversidade microbiana presente neste solo. Recentemente alguns estudos têm focado na microbiologia da terra preta, os quais mostraram maior diversidade e riqueza de espécies microbianas em comparação com solos de referência (CID, 2015; KIM et al., 2007; O'NEILL et al., 2009; RUIVO et al., 2009; TSAI et al., 2009).

Actinomicetos são comumente encontrados em solos, e a TPA constitui uma fonte promissora para o isolamento destes micro-organismos. São bactérias Gram-positivas que podem desenvolver micélio, fato que as levou a serem inicialmente classificadas como fungos. Muitas apresentam ainda a formação de esporos aéreos dispostos em cadeia ou em esporângios. Este grupo de bactérias constitui uma proporção considerável dos micro-organismos do solo, embora também seja encontrado naturalmente em outros ecossistemas como lamas do fundo de rios ou lagos, água do mar, plantas e outros. Nos ambientes que habitam, desempenham papel fundamental na mineralização da matéria orgânica devido à sua capacidade de degradação de uma grande variedade de compostos. São, em sua maioria, micro-organismos aeróbios altamente oxidativos, que apresentam temperatura e pH ótimos de crescimento entre 25°C - 30°C e 6,5 - 8,0, respectivamente. Estes micro-organismos, especialmente espécies do gênero *Streptomyces*, possuem a capacidade de sintetizar vários metabólitos secundários ativos, como antitumorais, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos, enzimas, antimicrobianos e antioxidantes (RODRIGUES, 2006).

Dentro da perspectiva de agentes antimicrobianos, é importante salientar o crescente aumento e disseminação da resistência microbiana aos antibióticos disponíveis no mercado. O uso indiscriminado destes medicamentos é um grande problema, uma vez que este se constitui em um mecanismo capaz de acelerar o processo de seleção de micro-organismos patogênicos resistentes. Por esta razão, a busca por actinomicetos capazes de produzir metabólitos com ação antimicrobiana pode contribuir positivamente para a tentativa de suprir a necessidade mundial crescente de novos antimicrobianos.

Patologias crônicas, como doenças neurodegenerativas e câncer, muitas vezes estão associadas ao envelhecimento humano e consequente acúmulo de radicais livres no organismo (SER et al., 2017). Fatores como poluição ambiental, radiação ultravioleta, tabagismo e estresse aumentam o nível destas moléculas no corpo humano causando, portanto, o estresse oxidativo às células. Segundo Dey e colaboradores (2016), a patogênese mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma área de pesquisa em atual expansão na ciência médica, e alguns autores, como Griffiths e colaboradores (2016) e Prasad (2016), afirmam que a prevenção do acúmulo de radicais livres através de alta ingestão de compostos antioxidantes está relacionada a um risco reduzido de desenvolver doenças relacionadas com danos oxidativos. Neste aspecto, os antioxidantes ganham grande importância por reagirem com radicais livres e impedirem sua ação danosa ao organismo. Na literatura existem muitos relatos da produção natural de compostos antioxidantes por actinomicetos, e a descoberta de novas moléculas com esta característica de interesse, produzidas por estes micro-organismos, possui extrema relevância devido a importância da ação destes compostos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão do presente estudo está embasada em definições e exemplos, encontrados na literatura, que denotam a importância da Terra Preta Antropogênica, dos actinomicetos, bem como de compostos antimicrobianos e antioxidantes.

2.1 Terra Preta Antropogênica

A terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia, também conhecida como terra preta de índio, é caracterizada por cor escura (Figura 1 - B), como remete ao nome, e exibe propriedades diferentes da maioria dos solos da região amazônica. Este conjunto de solos possui grandes reservas de matéria orgânica e altos níveis de nutrientes (GLASER et al., 2001; GLASER, 2007; GLASER; BIRK, 2012). Após várias investigações pedológicas e arqueológicas, sabe-se que a origem da TPA é antropogênica, sendo encontrada em sítios arqueológicos nos quais viveram grupos pré-colombianos (GLASER, 2007; GLASER; ZECH; WOODS, 2004; NEVES et al., 2003; WOODS; DENEVAN, 2009).

De acordo com a base mundial de referências da classificação de solos, a terra preta pode ser definida como um antrossolo hórtico e térrico (SOMBROEK et al., 2002; KAMPF et al., 2003; TEIXEIRA; MARTINS, 2003). No entanto, uma classificação única ainda está ausente devido a grande variabilidade existente entre sítios de ocorrência deste solo (SOMBROEK et al., 2002; KAMPF et al., 2003). Tais variações são causadas por diferenças no tempo de ocupação antrópica e no uso da terra. No entanto, pode-se dizer que a terra preta típica é definida, de modo geral, como um solo que possui um horizonte superficial de vários decímetros de espessura contendo altos níveis de matéria orgânica estável, biocarvão e nutrientes (especialmente fósforo), além de artefatos arqueológicos de origem pré-colombiana (GLASER; BIRK, 2012).

Vários trabalhos na literatura abordam a ocorrência de sítios de terra preta ao longo da região amazônica (DENEVAN, 1996; GLASER, 2007; KERN et al., 2003; MCCANN; WOODS; MEYER, 2001; SMITH, 1980; SOMBROEK et al., 2002; WOODS; MCCANN, 1999). De acordo com Glaser e Birk (2012), um acúmulo de sítios é encontrado na Amazônia Central e na região do Alto Xingu, no Brasil e, em menor densidade, a TPA é encontrada em partes da Amazônia do Peru, Colômbia, sul da Venezuela e nas Guianas (DENEVAN, 1996; HECKENBERGER et al., 2003; KERN et al., 2003; SOMBROEK et al., 2002).



Figura 1 - Comparação de perfis típicos de latossolo e de terra preta antropogênica. A: perfil típico de latossolo, no qual pode-se observar uma coloração marrom claro. A textura deste solo é argilosa ou arenosa e a estrutura é dominada por micro agregados estáveis. B: típico perfil de TPA, com coloração variando de cinza escuro a cor preta. Cacos, pequenos ossos, partículas de carvão, sinais de bioturbação e agregados de origem biogênica podem ser frequentemente encontrados. Terras pretas possuem, tipicamente, a mesma textura de outros solos circundantes.

Fonte: GLASER et al., 2001.

Manchas de TPA são descritas variando em tamanho de menos de um hectare até vários quilômetros quadrados (KERN et al., 2003; MCCANN; WOODS; MEYER, 2001; SOMBROEK et al., 2002; WOODS; MCCANN, 1999). Grandes sítios de terra preta ocorrem em proximidade aos rios principais, enquanto que em áreas de captação superiores apenas pequenos sítios foram encontrados (GLASER; BIRK, 2012; KERN et al, 2003; SMITH, 1980; SOMBROEK et al, 2002).

Muita discussão tem sido associada com a biologia e especificamente a microbiologia da TPA (LEHMANN, 2009). Assume-se que os micro-organismos são responsáveis pela oxidação do biocarvão, fornecendo grupos funcionais para a retenção de nutrientes, e contribuindo significativamente para a formação da matéria orgânica estável deste solo (GLASER, 2007; GLASER; LEHMANN; ZECH, 2002). Estudos utilizando métodos de cultivo microbiano e metagenômica, mostraram que existe maior diversidade e riqueza de espécies

microbianas em solos de terra preta em comparação com solos de referência (KIM et al., 2007; O'NEILL et al., 2009; RUIVO et al., 2009; TSAI et al., 2009).

Um estudo realizado por Abegg e colaboradores (2016) mostrou, através de técnicas moleculares, gêneros bacterianos e fúngicos que compõem a estrutura microbiana da terra preta de um sítio arqueológico no Baixo Amazonas. Muitas espécies bacterianas foram encontradas, sendo elas pertencentes aos gêneros: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Leuconostoc* e actinobactérias como *Streptomyces* e *Microbacterium*. O gênero *Bacillus* é comumente encontrado em amostras de solo, e os gêneros *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Escherichia* também são encontrados naturalmente em solos, mas também em água e plantas; *Leuconostoc* e *Lactobacillus* não são comuns de serem encontrados em solos, no entanto sugeriu-se que foram identificados no estudo por suas espécies estarem associadas com plantas e frutas presentes na vegetação amazônica. As actinobactérias são gêneros colonizadores nos solos, muitas espécies produzem enzimas para degradação de celulose, quitina e amido. O gênero *Streptomyces* é foco de pesquisa devido às substâncias produzidas de interesse médico e biotecnológico. O gênero *Microbacterium* pode ser isolado do ar, do solo e da água; muitas espécies deste gênero desempenham um papel significativo na degradação de óleo, lactona e xilana, na produção de biossurfactantes, e como promotoras de crescimento em plantas (LIN et al., 2012). Os gêneros fúngicos encontrados foram: *Zygosaccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Cladosporium*, *Candida*, *Penicillium*, além de ascomicetos e zigomicetos não cultiváveis. Dentre os gêneros e espécies de fungos encontrados neste estudo, *Lachancea meyersii* é a primeira espécie do gênero coletada em solo amazônico. De acordo com Fell, Statzell-Tallman e Kurtzman (2004), todas as outras espécies de *Lachancea* foram isoladas de plantas, produtos vegetais, insetos associados a plantas, frutas ou alimentos. *Zygosaccharomyces* é um gênero de levedura que inclui organismos deteriorantes e osmotolerantes, sendo que estas características de resistência estão relacionadas à presença em solos com diversas particularidades, como a TPA. Segundo Mukherjee e Mittal (2005), o gênero *Cladosporium* constitui um dos maiores gêneros dentre os hifomicetos e dados de 2008 sugerem que estão presentes em amostras de solo (PAUL; YU, 2008). Com relação ao gênero *Candida*, estudos anteriores mostraram que representantes deste clado também são comumente encontrados em solos (MEYER; PAYNE; YARROW, 1998; SHIN et al., 2001).

2.2 Actinobactérias

O filo Actinobacteria é uma das maiores unidades taxonômicas entre as principais linhagens atualmente reconhecidas no grupo das bactérias (LUDWIG et al., 2012). A maioria das actinobactérias são organismos livres amplamente distribuídos em ecossistemas terrestres e aquáticos (incluindo marinhos) (MACAGNAN et al., 2006). São bactérias filamentosas Gram-positivas com elevado teor de guanina e citosina (G-C) em seus genomas, que crescem por uma combinação de extensão de suas extremidades e ramificação das hifas. Tradicionalmente, os actinomicetos eram considerados formas de transição entre fungos e bactérias. De fato, como os fungos filamentosos, muitas actinobactérias produzem micélio, e muitos destes actinomicetos miceliais reproduzem-se por esporulação (Figura 2). No entanto, a comparação com fungos é apenas superficial: como todas as bactérias, os actinomicetos possuem apenas um cromossomo organizado em um nucleóide procariótico e uma parede celular composta por peptideoglicano; além disso, as células são susceptíveis a agentes antibacterianos (BARKA et al., 2016). Fisiológica e ecologicamente, os actinomicetos podem ser heterotróficos ou quimioautotróficos, sendo a maioria quimioheterotrófica aeróbica capaz de usar uma ampla variedade de fontes nutricionais, incluindo vários polissacarídeos complexos (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1965; ZIMMERMANN, 1990). Actinobactérias podem ser habitantes do solo ou de ambientes aquáticos (por exemplo, espécies de *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* e *Salinispora*), simbioses de plantas (*Frankia* spp.), patógenos de plantas ou animais (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*), ou, ainda, comensais gastrointestinais (*Bifidobacterium* spp.) (BARKA et al., 2016).

A diversidade deste filo é grande e inclui muitas espécies benéficas, mas também algumas patogênicas. *Mycobacterium tuberculosis* é o agente causador da tuberculose, que ainda mata muitas pessoas a cada ano. Existem também os estreptomicetos causadores de escabiose, que têm uma ampla gama de hospedeiros, infectam plantas e são conhecidos pela capacidade de causar lesões necróticas em cultivos de raízes e tubérculos de importância econômica, como a batata (BARKA et al., 2016). Por outro lado, as actinobactérias geram muitos benefícios potenciais para os seres humanos como fontes de inúmeros metabólitos ativos que podem ser utilizados na medicina e na agricultura. Com o rápido desenvolvimento dos campos da genômica, da biologia sintética e da ecologia, e ainda, com a elevada demanda por novos compostos antimicrobianos no combate à resistência microbiana, a biologia das actinobactérias, bem como a busca por novas linhagens e espécies promissoras deste grupo, são campos de pesquisa altamente dinâmicos e importantes de serem estudados.

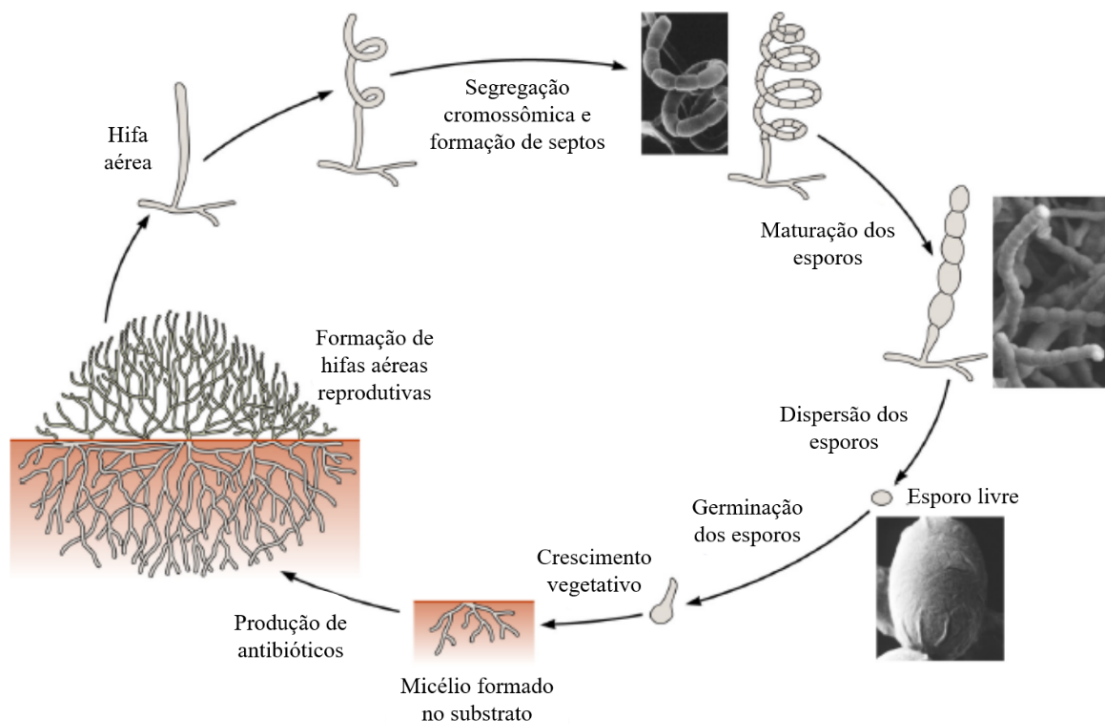


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida de actinomicetos produtores de esporos.

Fonte: BARKA et al., 2016 com modificações.

2.3 Compostos bioativos produzidos por actinomicetos

As actinobactérias possuem um extenso metabolismo secundário e produzem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo antivirais, antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, anti-helmínticos, imunossupressores e antioxidantes (BARKA et al., 2016; SER et al., 2017). Nos últimos anos, estimou-se que cerca dos 22.500 compostos ativos biológicos produzidos por micro-organismos conhecidos (incluindo herbicidas e inseticidas), 45% são produzidos por actinomicetos, 38% por fungos e 17% por bactérias unicelulares (BERDY, 2005; MAHYARUDIN; RUSMANA; LESTARI, 2015).

Os antimicrobianos se destacam devido à sua importância terapêutica (RODRIGUES, 2006) e os antioxidantes são importantes no retardo e prevenção do estresse oxidativo celular (CHEN et al., 2016). Diante da relevância e produção natural destes compostos por membros do filo Actinobacteria, os antimicrobianos e antioxidantes serão abordados a seguir.

2.3.1 Antimicrobianos

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas ou fungicidas, quando causam a morte do micro-organismo em questão, ou bacteriostáticos e fungistáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003a).

A maioria dos antimicrobianos utilizados atualmente foi descoberta por métodos que requerem a identificação e o cultivo de colônias de organismos produtores de antibióticos, principalmente a partir da seleção de amostras provenientes do solo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina em 1928, e a constatação de que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de micro-organismos, especialmente fungos e actinobactérias. A penicilina G, ou benzilpenicilina, foi descrita em 1929 como agente antibiótico, porém foi introduzida como agente terapêutico somente em 1940. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Durante os anos de 1940 a 1960 vários antibióticos foram descobertos por meio de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram-positivas: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida, trimetropim e metronidazol (FERNANDES, 2006).

Segundo Fernandes (2006), os antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos foram introduzidos no mercado entre os anos 1960-1980, os quais eram análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina e derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicilina). Entre os anos 1980 a 2000 as principais ferramentas utilizadas para a busca de novos antibióticos foram a genômica e as triagens de coleções de compostos em detrimento as de produtos naturais microbianos. Contudo, houve uma redução drástica na identificação de novos protótipos antibióticos, ao

mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Este período foi marcado pela modificação do mercado de antibióticos através da introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980, desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico. Alguns antibióticos baseados em protótipos naturais, como o imipenem (derivado β -lactâmico) e análogos da eritromicina (derivados macrolídeos) também foram introduzidos neste período. Além disto, a combinação de dois derivados semi-sintéticos de produtos naturais microbianos, quinupristina e dalfopristina, foi aprovada para uso em infecções causadas por *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina em 1999 pelo FDA - *Food and Drug Administration* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais voltaram a ser retomados em algumas indústrias farmacêuticas, o que levou, por exemplo, à aprovação do lipopeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). No período de janeiro de 2011 a dezembro de 2014 foram aprovadas nove drogas antibacterianas, classificadas como pequenas moléculas anti-infecciosas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Na atual problemática de resistência microbiana, este número pode, ainda, ser considerado insatisfatório, pois como reportado por Liu e colaboradores em 2015, a classe de compostos utilizada como último recurso em casos de progressão da infecção bacteriana (colistinas peptídicas), tem agora um determinante de resistência aparecendo em microorganismos de pacientes tratados, conhecido como MCR-1.

Com relação aos agentes antifúngicos, um longo período após a liberação dos primeiros agentes antifúngicos triazóis (fluconazol e itraconazol no início da década de 1990) e da anfotericina B (AMB) (meados dos anos 90), novos fármacos antifúngicos tornaram-se disponíveis. Estes incluíam membros da classe das equinocandinas e dos triazóis de segunda geração (CHEN; SORREL, 2007). Apenas dois compostos sintéticos foram aprovados no período de 2011 a 2014, o efinaconazol e o tavaborol (CAMP; GARAVELAS; CAMPITELLI, 2015; DOAK et al., 2014). Em contraste com os agentes antibacterianos, a maioria dos agentes antifúngicos aprovados entre os anos de 1981 a 2014 são de origem sintética. A escassez de fontes de produtos naturais pode ser observada nos regimes de tratamento que ainda utilizam agentes como anfotericina e griseofulvina, ambos lançados antes da década de 1980 (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Cerca de dois terços de todos os antibióticos oriundos de fontes naturais, em uso clínico atual, foram derivados do metabolismo de actinomicetos (BARKA et al., 2016). Os primeiros antimicrobianos descobertos produzidos naturalmente por membros do filo Actinobacteria,

foram a actinomicina, oriunda de uma cultura de *Streptomyces antibioticus* em 1940, descrita por Waksman e Woodruff, (1940); a estreptotricina, produzida por *Streptomyces lavendulae* em 1942, também descrita por Waksman e Woodruff (1942); e a estreptomicina, oriunda do metabolismo de *Streptomyces griseus* em 1944 (SCHATZ; WAKSMAN, 1944). Os estreptomicetos (espécies do gênero *Streptomyces*) têm sido a principal fonte de antibióticos clínicos e são responsáveis por mais de 80% de todos os antibióticos de origem actinobacteriana (BARKA et al., 2016; ILIC et al., 2007). Sugere-se que estes antibióticos citados tenham sido os primeiros a serem encontrados pela razão destas moléculas ocorrerem em frequências muito mais elevadas do que vários outros antibióticos descobertos posteriormente (BARKA et al., 2016). Por exemplo, a estreptotricina é encontrada em cerca de 10% de todos os estreptomicetos isolados aleatoriamente a partir do solo, a estreptomicina é encontrada em 1% e a actinomicina em 0,1%, enquanto que inversamente, a eritromicina e a vancomicina são encontradas a uma frequência muito baixa, em cerca de 10^{-5} isolados de solo, e a daptomicina em 10^{-7} (BALTZ, 2007). Segundo a revisão de Barka e colaboradores (2016), as principais classes de antibióticos clínicos produzidos por actinomicetos são as seguintes: aminoglicosídeos (neomicina, canamicina, estreptomicina), anguciclinas (auricina e antitumorais como a landomicina e a moromicina), ansamicinas (rifamicina, geldanamicina), antraciclinas (principalmente agentes antitumorais), β -lactâmicos (cefamicinas), cloranfenicol, glutarimidas (cicloheximida), glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina), lipopeptídeos (daptomicina), lantibióticos (mersacidina, actagardina), macrolídeos (claritromicina, eritromicina, tilosina), oxazolidinonas (cicloserina), estreptograminas e tetraciclinas. A capacidade de produção de antibióticos entre isolados de actinomicetos também pode variar enormemente, enquanto algumas espécies produzem um único antibiótico, outras produzem uma gama de compostos distintos (BARKA et al., 2016).

Assim como ocorre com os antibacterianos, espécies do gênero *Streptomyces* também são as principais responsáveis, entre as actinobactérias, pela produção de agentes antifúngicos. A Tabela 1, a seguir, mostra os principais antifúngicos produzidos por actinomicetos.

Tabela 1 - Exemplos de moléculas bioativas com ação antifúngica produzidas por espécies do filo Actinobacteria.

Produtores de antifúngicos	Agentes bioativos	Fonte ou referência
<i>Streptomyces anulatus</i>	Actinomicina	BISTER et al., 2004
<i>S. nodosus</i>	Anfotericina B	LINKE; MECHLINSKI; SCHAFFNER, 1974
<i>S. griseochromogenes</i>	Blasticidina	TAKEUCHI et al., 1958
<i>S. griséus</i>	Candicidina	ACKER; LECHEVALIER, 1954
<i>Streptomyces</i> spp.	Carboxamicina	HOHMANN et al., 2009
<i>S. venezuelae</i>	Cloranfenicol	MATSUOKA; YAGISHITA; UMEZAWA, 1953
<i>S. padanus</i>	Fungicromina	SHIH et al., 2003
<i>S. galbus</i>	Galbonolides A e B	FAUTH et al., 1986
<i>S. violaceusniger</i> YCED-9	Guanidilfungina	TREJO-ESTRADA; PASZCZYNSKI; CRAWFORD, 1998
<i>S. venezuelae</i>	Jadomicina	DOULL et al., 1993
<i>S. kasugaensis</i>	Kasugamicina	UMEZAWA et al., 1965
<i>Streptomyces</i> spp.	Kitamicina	HAYASHI; NOZAKI, 1999
<i>S. natalensis</i>	Natamicina	STRUYK et al., 1958
<i>S. tendae</i>	Nikomocina	BORMANN et al., 1985
<i>S. diastatochromogenes</i>	Oligomicina	SMITH; PETERSON; MCCOY, 1954
<i>S. humidus</i>	Fenilacetato de sódio	HWANG et al., 2001
<i>S. cacaoi</i>	Polioxina B	ISONO et al., 1965
<i>S. canus</i>	Resistomicina	ZHANG et al., 2013
<i>S. lavendulae</i>	Estreptotricina	WAKSMAN; WOODRUFF, 1942
<i>S. canus</i>	Tetracenomicina	ZHANG et al., 2013
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencina	HOSHINO et al., 2004
<i>S. hygroscopicus</i>	Validamicina	IWASA; YAMAMOTO; SHIBATA, 1970

Fonte: BARKA et al., 2016 com modificações.

Dentro da perspectiva de agentes antimicrobianos, é importante salientar o aumento de relatos de resistência microbiana aos antibióticos disponíveis no mercado. Na década de 1970, o principal problema era a resistência aos fármacos contra bactérias Gram-negativas. A partir da década de 1980, bactérias Gram-positivas também se tornaram preocupantes, incluindo estafilococos resistentes à metilicina, pneumococos resistentes à penicilina e enterococos resistentes à vancomicina (MOELLERING, 1998). As colistinas peptídicas são utilizadas como medicação de último recurso no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes, e recentemente foi detectado o determinante de resistência MCR-1 que é sintetizado pelo gene *mcr-1*, o qual já foi localizado em plasmídeos bacterianos de cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Klebsiella pneumoniae*. Em 2016, os Estados Unidos registraram o primeiro caso de paciente infectado com uma linhagem de *E. coli* que apresentava o gene *mcr-1* em seu plasmídeo (MCGANN et al., 2016). No Brasil, no mesmo ano, este gene

foi identificado pela primeira vez em cepas, também pertencentes à espécie *E. coli*, isoladas de paciente humano (FERNANDES et al., 2016). Bactérias multirresistentes também já foram encontradas em países da Europa, Ásia e África, e diante desta preocupante situação mundial, vêm crescendo o número de estudos e a caracterização de compostos provenientes de produtos naturais com propriedade antimicrobiana (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Em 2015, foi destacada pela Organização Mundial de Saúde a importância da regulação e promoção do uso racional de antibióticos com o propósito de prevenir e controlar as infecções, bem como impedir a resistência microbiana. O uso indiscriminado destes medicamentos é um grande problema, uma vez que este se constitui em um mecanismo capaz de acelerar o processo de seleção de micro-organismos patogênicos resistentes a sua ação. Assim, foi ressaltada a importância de incentivos às pesquisas que possibilitem descobrir novas moléculas com propriedades antimicrobianas (LETRA, 2015), uma vez que doenças infecciosas já lideram, em mortes, o primeiro lugar nos países subdesenvolvidos e o terceiro lugar em todo o mundo (WHO, 2011). Neste sentido, casos de resistência aos antimicrobianos agravam as estatísticas e advertem a necessidade de novas estratégias, como a terapia combinatória de moléculas que resulte em ação sinérgica e a busca por organismos capazes de produzir novos compostos com ação antimicrobiana.

Sabe-se que, por vezes, a utilização de um único antimicrobiano não produz o efeito inibitório efetivo desejado, mas uma combinação de compostos frequentemente exerce um efeito sinérgico que supera seu desempenho individual. O efeito sinérgico pode ocorrer devido a formações complexas entre as moléculas em associação que, juntas, se tornam mais eficazes na inibição de determinado micro-organismo. A associação de antimicrobianos com extratos ou compostos naturais, por exemplo, pode apresentar diferentes mecanismos de ação contra micro-organismos resistentes e, assim, levar a novas escolhas para o tratamento de doenças infecciosas. A terapia combinada pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, para evitar o surgimento de mutantes resistentes e para minimizar a toxicidade de determinado fármaco. O sinergismo é definido como uma interação positiva criada quando agentes diferentes são combinados e, juntos, exercem um efeito inibitório (nos organismos direcionados) que é maior do que a soma de seus efeitos individuais; o antagonismo ocorre quando o efeito desta associação é menor que o de cada um sozinho, e a indiferença quando nenhum efeito adicional desta combinação é exibido. Em vários tratamentos convencionais atuais, a administração concomitante de dois ou mais fármacos é, muitas vezes, essencial para se alcançar o objetivo terapêutico desejado ou para tratar doenças coexistentes. No entanto, as interações medicamentosas podem ter diferentes efeitos sobre o hospedeiro, bem como sobre os micro-

organismos infectantes. Os benefícios potenciais do uso de terapia combinatória de antimicrobianos estão relacionados com o tratamento de infecções mistas, aumento da atividade antimicrobiana, redução do tempo da terapia e prevenção do surgimento da resistência microbiana (CHANDA; RAKHOLIYA, 2011). A literatura possui exemplos de associações de compostos antimicrobianos naturais, produzidos por actinomicetos, que apresentaram ação sinérgica. Combinações de antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase (como o ácido clavulânico), produzidos por *Streptomyces clavuligerus*, são conhecidas por serem eficazes contra bactérias resistentes a β -lactâmicos em comparação com a administração de antibióticos β -lactâmicos sozinhos, devido à ação sinérgica desses metabólitos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Estreptograminas constituem uma família de antibióticos não relacionados estruturalmente, que podem agir sinergicamente inibindo a síntese de proteínas ribossômicas bacterianas (MCCAFFERTY et al., 1999). Vários estreptomicetos, como *S. pristinaespiralis*, *S. virginiae*, *S. mitakaensis*, *S. graminofaciens* e *S. loidensis*, são conhecidos por coproduzirem naturalmente as estreptograminas dos tipos A e B, que são quimicamente distintas. Enquanto as estreptograminas do tipo A ou B, sozinhas, são bacteriostáticas, a combinação de uma do tipo A com uma do tipo B é bactericida. Este aumento na eficácia antibacteriana se origina da ligação sinérgica das estreptograminas dos tipos A e B a locais distintos no ribossomo. Assim, a ligação de uma estreptogramina A ao ribossomo aumenta a afinidade de uma estreptogramina B com o ribossomo em até 40 vezes, tornando a ligação antibiótica dupla e irreversível (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Diante do exposto, a terapia combinatória de fármacos pode ser considerada como uma importante estratégia em casos de resistência microbiana, além de um potencial mecanismo para diminuição dos efeitos colaterais de determinado fármaco.

Os antimicrobianos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em patógenos (WALSH, 2003b). Neste contexto, nos últimos anos vários pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de ecossistemas intactos ou pouco conhecidos estão frequentemente associados à nova diversidade química (CLARDY; WALSH, 2004). Lewis (2016) aponta para a problemática atual da propagação de organismos resistentes, e constata que a substituição da procura de novos antibióticos produzidos por fontes naturais (com destaque para os actinomicetos de solo) pelo rastreamento de bibliotecas de compostos sintéticos, nas últimas décadas, não foi bem-sucedida. Segundo Newman e Cragg (2016) uma abordagem multidisciplinar para a descoberta de fármacos, envolvendo a geração de diversidade de moléculas novas a partir de fontes de produtos naturais (como micro-organismos), combinada com metodologias de síntese total e

combinatória, incluindo a manipulação de vias biossintéticas de compostos, irá fornecer a melhor solução para a atual crise de produtividade de fármacos. Sendo assim, uma ampla diversidade de organismos tem sido explorada nos mais diversos habitats, e dentro desta perspectiva, o isolamento de micro-organismos oriundos da TPA torna-se uma considerável estratégia na busca por novos antimicrobianos, já que este solo ainda foi pouco explorado em níveis de bioprospecção da sua microbiota, e constitui-se numa fonte promissora para a descoberta de novas espécies e linhagens de actinomicetos.

2.3.2 Antioxidantes

Os seres humanos possuem a expectativa de vida mais longa entre os primatas. Com o avanço nas terapias médicas e melhores condições de higiene, a expectativa de vida global de um ser humano aumentou de 66,4 anos em 2000 para 71,4 anos em 2015 (CHRISTENSEN et al., 2009; Organização Mundial de Saúde, 2016; SER et al., 2017). No entanto, admite-se que ainda é necessário melhorar o gerenciamento de doenças crônicas para reduzir a taxa de mortalidade e ampliar a expectativa de vida humana. A capacidade do corpo humano em lidar com mudanças externas e/ou estresses ambientais é reduzida no processo de envelhecimento, o que eventualmente leva ao desenvolvimento de patologias crônicas, como doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Parkinson e doença de Alzheimer), cardiovasculares e câncer (ABDOLLAHI et al., 2014; FISCHER; MAIER, 2015; LESZEK et al., 2016; SER et al., 2017).

Uma das principais causas que contribui para o desenvolvimento dessas doenças crônicas é o acúmulo de radicais livres no organismo ao longo do tempo, que pode causar vários efeitos deletérios aos componentes celulares e tecidos conjuntivos (SER et al., 2017). Os radicais livres são moléculas altamente reativas e instáveis que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, os quais, quando em excesso no organismo, podem prejudicar a função normal de lipídios celulares, proteínas e do DNA (HUSSAIN et al., 2003; VALKO et al., 2007). O dano oxidativo ao DNA pode causar modificações na sequência de bases nitrogenadas, além de rupturas e lesões em sua cadeia; a ocorrência destas modificações já foi associada à etiologia de vários cânceres humanos. Além de modificar proteínas e causar danos celulares, os radicais livres podem interferir na expressão de uma série de genes e vias de transdução de sinal, incluindo a estimulação das vias de proliferação celular e a inibição das vias de sinalização de apoptose que são comumente observadas em vários tipos de câncer (VALKO et al., 2006). A prevenção do acúmulo destas moléculas, por exemplo, através de alta ingestão de antioxidantes

tem sido associada com risco reduzido de desenvolver doenças crônicas e câncer (GRIFFITHS et al., 2016; PRASAD, 2016).

O oxigênio é inevitável para a vida aeróbica, mas durante o processo metabólico normal, mais de 5% do oxigênio inalado é transformado em espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\bullet). Estes ERO ocorrem como subprodutos naturais do metabolismo do oxigênio e desempenham vários papéis importantes na sinalização celular e na homeostase (DEVASAGAYAM et al., 2004). Existe um sistema de defesa natural contra estes radicais livres no organismo humano (ou seja, defesa primária), que consiste principalmente em três enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (PETERSON, 2001). Portanto, desde que haja um equilíbrio entre a produção de ERO e sua posterior eliminação pelas enzimas supracitadas, os radicais livres não são prejudiciais ao organismo. No entanto, fatores como poluição ambiental, radiação ultravioleta, tabagismo e estresse, aumentam significativamente o nível de ERO no corpo humano, causando, portanto, o estresse oxidativo. Com o desequilíbrio instalado entre a produção de ERO e o sistema de defesa primário, podem ocorrer vários danos ao organismo que favorecem o desenvolvimento de patologias crônicas, como as mencionadas nos parágrafos anteriores. Atualmente, a patogênese mediada por ERO é uma área de pesquisa em desenvolvimento e expansão na ciência médica (DEY et., 2016).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou prevenir o dano oxidativo através da reação com compostos oxidantes. A adsorção e eliminação destes radicais gerados pelo metabolismo celular (ou por fontes externas) constitui-se num mecanismo antirradicalar capaz de inibir o estresse oxidativo e, assim, evitar um maior prejuízo às moléculas biológicas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SINGH et al., 2016).

Na literatura existem vários relatos da produção natural de compostos antioxidantes por representantes do filo Actinobacteria, que corroboram com a afirmativa de que os actinomicetos também se constituem numa fonte promissora para a descoberta de novas substâncias com ação antioxidante. Neste contexto, pode-se citar os trabalhos dos seguintes autores: El-naggar e El-ewasy, (2017); Karthik, Kumar e Rao (2013); Kekuda, Shobba e Onkarappa (2009); Komiyama e colaboradores (1989); Lee e colaboradores (2014); Mesta e colaboradores (2017); Ravi, Rangunathan e Krishnan (2017); Subramanian e colaboradores (2017); Taechowisan, Chaisaeng e Phutdhawong (2017); Tan e colaboradores (2017).

Os compostos fenólicos constituem o principal grupo de antioxidantes devido às suas propriedades redox, capacidade de doação de elétrons e extinção de espécies reativas de oxigênio (SHOBHA; GAUTHAM; ONKARAPPA, 2012). Quimicamente, os fenólicos são

definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Possuem estrutura variável e, com isso, podem apresentar diversas aplicações biológicas. Existem milhares de fenóis, dentre os quais destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2006). Na literatura existem muitos trabalhos que descrevem a produção natural de compostos fenólicos com ação antioxidante por actinomicetos (JANARDHAN, et al., 2014; KARTHIK; KUMAR; RAO, 2013; KAWAHARA et al., 2012; KOMIYAMA et al., 1989; NARENDHRAN et al., 2014; SAVI, et al., 2015; TAECHOWISAN; CHAISAENG; PHUTDHAWONG, 2017; ZHONG et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

Dentre os compostos fenólicos, a classe dos flavonoides possui grande importância, uma vez que, além de seu reconhecido potencial antioxidante, seus representantes também podem apresentar outras funções biológicas, tais como: antimicrobiana, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória (SIMÕES et al., 2007). São substâncias aromáticas largamente distribuídas no reino vegetal, presentes em diferentes tecidos de plantas, e possuem baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono organizados na configuração C6–C3–C6 (ANGELO; JORGE, 2006). Além das plantas, fungos e actinomicetos também são conhecidos por produzirem flavonoides (MAMEDE, 2015; LEI et al., 2016). Flavonoides com atividades antitumoral, antioxidante, antibacteriana e antifúngica já foram isolados por diferentes linhagens do gênero *Streptomyces* (BALACHANDRAN et al., 2014; KOMIYAMA et al., 1989; TAECHOWISAN et al., 2014a; TAECHOWISAN et al., 2014b), demonstrando que estudos de bioprospecção com actinobactérias podem ser relevantes para a descoberta de novos compostos bioativos desta classe fenólica.

2.4 Gênero *Streptomyces*

Os vários gêneros miceliais do filo Actinobacteria possuem algumas das bactérias conhecidas mais complexas, como *Streptomyces*, *Thermobifida* e *Frankia*. Dos três gêneros, *Streptomyces* recebe atenção especial por diversas razões, dentre elas pode-se destacar duas principais: os estreptomicetos são abundantes e importantes no solo, onde desempenham papel fundamental no ciclo do carbono presente em detritos orgânicos insolúveis graças à produção de diversas exoenzimas hidrolíticas; e dentre as actinobactérias, os estreptomicetos produzem a maioria dos antibióticos conhecidos, sendo muito importantes no combate aos patógenos emergentes multirresistentes (BARKA et al., 2016).

No ciclo de vida dos estreptomicetos, foi observado que em condições adversas, como a depleção de nutrientes, o micélio vegetativo se diferencia para formar hifas aéreas produtoras de esporos. Este é o momento do ciclo de vida no qual a maioria dos antibióticos são produzidos (BIBB, 2005; VAN WEZEL; MCDOWALL, 2011). Quando ocorre esta diminuição de nutrientes, o micélio é degradado por um mecanismo de morte celular programada (PCD, do inglês *Programmed Cell Death*) que disponibiliza os componentes necessários para a formação de um novo micélio aéreo. Segundo Rigali e colaboradores (2006), o PCD resulta no acúmulo de aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e lipídios em torno do micélio lisado, que inevitavelmente atrai micróbios competitivos; desta maneira, assume-se que os antibióticos são produzidos neste momento para proteger os nutrientes (BARKA et al., 2016).

Além da produção de compostos antimicrobianos, espécies do gênero *Streptomyces* também são conhecidas por apresentarem outros diversos potenciais bioativos, como a produção natural de compostos antioxidantes já abordada anteriormente e exemplificada a seguir. El-Naggar e El-Ewasy (2017) identificaram e isolaram grande quantidade de pigmento melanina, que apresentou atividades antioxidante e anticancerígena, a partir do cultivo de *S. glaucescens* NEAE-H isolada de solo na Arábia Saudita. Ser e colaboradores (2017) discutiram acerca de duas linhagens de *Streptomyces* (MUSC 137T e MUM 256), isoladas de sedimentos de mangue na Malásia Peninsular, que demonstraram potentes atividades antioxidantes e citotóxicas contra várias linhagens celulares de câncer humano; estes autores afirmam que esses resultados ilustram a importância dos estreptomicetos de regiões pouco exploradas.

Streptomyces coelicolor é o modelo de estudo para a produção de antibióticos, e já foi relatado que esta espécie produz actinorodina, undecilprodigiosina, antibiótico dependente de cálcio (CDA) e metilenomicina (BARKA et al., 2016). No entanto, com a publicação da sequência do genoma de *S. coelicolor*, verificou-se que o verdadeiro potencial dessa espécie, como produtora de substâncias naturais, tinha sido subestimado: mais de 20 grupos de genes biossintéticos, que codificam a produção de metabólitos secundários, foram identificados (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Além disto, já foi mostrado que alguns estreptomicetos abrigam mais de 50 grupos diferentes de genes que também codificam metabólitos secundários (IKEDA et al., 2003; OHNISHI et al., 2008; OLIYNYK et al., 2007; UDWARY et al., 2007). Sendo assim, o potencial desses organismos para a produção de compostos bioativos é muito maior do que o originalmente previsto; a pesquisa e o desenvolvimento de métodos que ativem a expressão destes genes podem ser de grande valia na descoberta de novos antimicrobianos, antioxidantes e outras substâncias de interesse.

3 OBJETIVOS

Os objetivos traçados para o presente estudo serão relatados a seguir.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial bioativo de extratos provenientes do produto de fermentação de actinomicetos isolados de Terra Preta Antropogênica da Amazônia (TPA).

3.2 Objetivos específicos

- a) Obter extratos AcOEt a partir da fermentação de actinomicetos isolados de TPA;
- b) Realizar ensaios de determinação da concentração inibitória mínima e microbicida mínima com os extratos brutos e, assim, selecionar os actinomicetos mais promissores;
- c) Avaliar o crescimento dos actinomicetos selecionados nas mesmas condições fermentativas;
- d) Analisar e fracionar os extratos mais promissores por técnicas cromatográficas;
- e) Realizar ensaios de determinação da concentração inibitória mínima e microbicida mínima com as frações obtidas;
- f) Detectar e quantificar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de uma ou mais frações;
- g) Analisar a fração mais promissora por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia no ultravioleta - visível;
- h) Estudar o efeito da associação de frações com um fármaco padrão;
- i) Avaliar a citotoxicidade de frações com atividades antimicrobiana e/ou antioxidante;
- j) Iniciar a identificação taxonômica dos actinomicetos mais promissores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para cumprimento dos objetivos propostos para este trabalho, foram realizados diferentes ensaios e métodos que serão discutidos em sequência.

4.1 Obtenção dos micro-organismos

Para os ensaios foram utilizados cinco actinomicetos não identificados (linhagens denominadas pelos códigos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5) isolados da Terra Preta Antropogênica (TPA) coletada pelo doutorando Mateus de Souza Terceti no município de Presidente Figueiredo ($1^{\circ}50'12.8''S$ $60^{\circ}11'05.6''W$), mostrado na Figura 2, situado no estado do Amazonas, região da Lagoa Balbina (Amazônia Central). Os isolados microbianos encontram-se preservados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (DMI/ICB) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG).

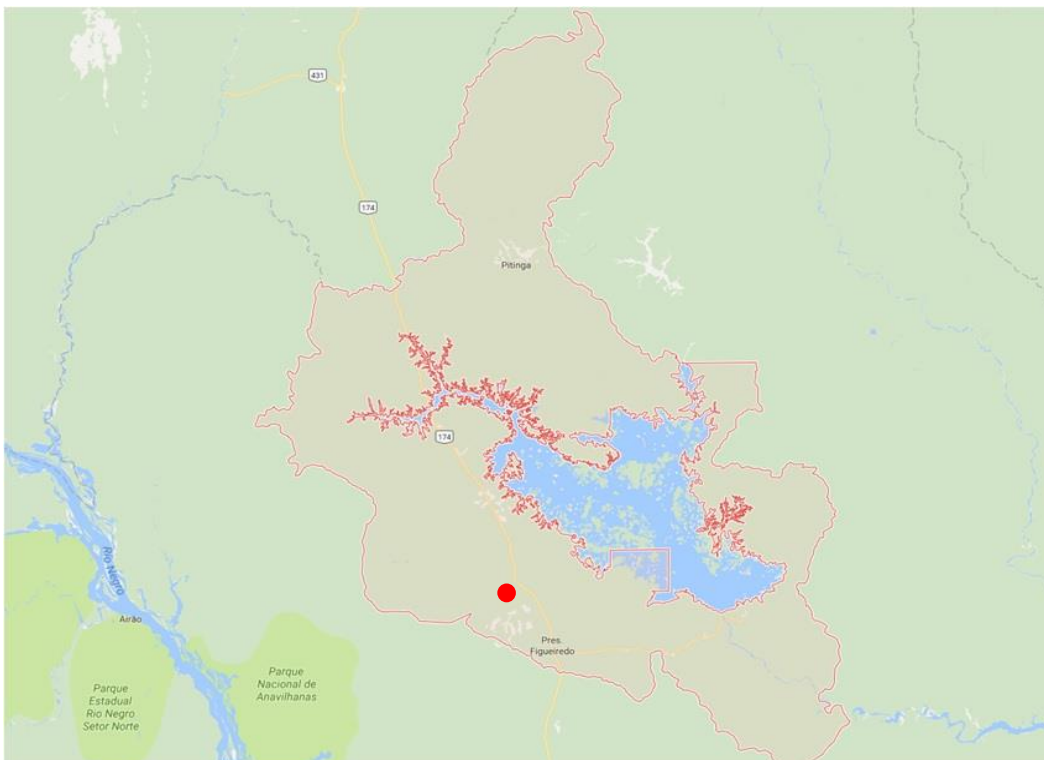


Figura 3 - Mapa da região amazônica que contém o município de Presidente Figueiredo delimitado em cor rosa. O ponto vermelho representa a área de coleta da TPA ($1^{\circ}50'12.8''S$ $60^{\circ}11'05.6''W$), a partir da qual os actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5 foram isolados.

Fonte: Da autora.

4.2 Processo de fermentação e obtenção de extratos brutos

Para a obtenção dos extratos, todos os isolados microbianos foram submetidos à fermentação conforme descrito por Carvalho e colaboradores (2012). Com esta finalidade, os isolados foram anteriormente repicados em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud e posteriormente incubados em estufa BOD a 28°C, até a obtenção de crescimento satisfatório. Sequencialmente, em cada placa contendo crescimento microbiano recente, foi estabelecida uma área circular de 4 cm de diâmetro (correspondendo a aproximadamente 10⁸ UFC/mL), a partir da qual foram cortados fragmentos menores, de 0,5 cm x 0,5 cm, que foram transferidos assepticamente para frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de caldo Czapek [glicose: 30,0 g; NaNO₃: 2,0 g; K₂HPO₄: 1,0 g; MgSO₄-7H₂O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO₄-7H₂O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada – q.s.p. 1000mL] (RAPER; FENNEL, 1965 com modificações). Cada isolado foi inoculado para fermentar 1 litro de caldo Czapek.

As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por 20 dias, em condição estática. Após o período de incubação, os micro-organismos foram separados do caldo fermentativo por filtração a vácuo. Posteriormente, os filtrados obtidos foram extraídos três vezes com o solvente acetato de etila totalizando a proporção 1:1. A fase orgânica foi coletada e o solvente foi removido em evaporador rotativo à vácuo a 40°C, obtendo-se assim os extratos brutos secos, os quais foram utilizados para realização de testes de atividade e para dar prosseguimento a etapa de separação. Ao final, todos os extratos tiveram o rendimento determinado e expresso em miligramas por litro (Tabela 2). Após os resultados dos ensaios de CIM e CMM, os extratos considerados potencialmente promissores na produção de substâncias antimicrobianas foram inoculados em 3 litros de meio Czapek, seguindo as mesmas condições iniciais de fermentação.

4.3 Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM)

Para a realização destes ensaios foi adotado o procedimento descrito por CLSI (2015) para bactérias e CLSI (2008) para leveduras, com algumas modificações.

4.3.1 Preparo das amostras

Em tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL foi preparada a solução de cada extrato ou fração teste, com 1 mg do extrato ou fração dissolvido em 125 µL de álcool etílico absoluto, sendo a concentração final de 8 mg/mL.

4.3.2 Preparo do inóculo

Para os testes de determinação de atividade antimicrobiana (CIM e CMM), as linhagens de micro-organismos utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231. Com o auxílio de alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos micro-organismos citados que se encontravam em caldo Mueller Hinton (CMH – *S. aureus* e *E. coli*) ou Caldo Sabouraud (CSab – *C. albicans*), foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada, gerando uma suspensão que foi padronizada em espectrofotômetro, 660 nm e 75% de transmitância, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foi transferido 1 mL de cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9%, da qual foram retirados 2 mL, transferidos para 10 mL de CMH ou CSab. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo que foram adicionadas aos respectivos poços após diluição seriada do extrato ou da fração teste e antimicrobiano padrão.

4.3.3 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio CMH ou CSab em cada poço de amostra. A seguir, 20 µL da amostra solubilizada em etanol e 80 µL de meio de cultura foram adicionados ao primeiro poço de cada fileira da placa, sendo que cada fileira correspondeu a uma amostra diferente. A diluição da amostra na microplaca começou a partir da transferência de 100 µL do primeiro poço para os poços consecutivos, até o último poço, onde 100 µL foram desprezados, para que todos os poços contivessem 100 µL. Após a diluição, 80 µL de meio CMH ou CSab e 20 µL do inóculo previamente preparado, foram transferidos para todos os poços, exceto para os controles. O volume final em cada poço foi de 200 µL, e a maior concentração utilizada de cada extrato ou fração, no 1º poço da diluição seriada, foi de 400 µg/mL.

Alguns orifícios da placa foram utilizados como controles de crescimento do inóculo, de esterilidade do meio de cultura e de toxicidade do solvente. Nos poços de controle de esterilidade, foram adicionados apenas 200 µL de meio CMH ou CSab. Nos poços para controle de crescimento dos micro-organismos avaliados, foram adicionados 180 µL de meio CMH ou CSab e 20 µL do inóculo previamente preparado. Os orifícios correspondentes ao controle do solvente foram montados da mesma maneira que os poços contendo as amostras testadas, com a única diferença de serem adicionados 20 µL de etanol puro (sem a presença das amostras)

para posterior diluição seriada. Além disto, uma fileira de poços foi utilizada como controle de sensibilidade dos micro-organismos a antimicrobianos padrões (amoxicilina para *S. aureus*, estreptomicina para *E. coli* e fluconazol para *C. albicans*), onde foram adicionados 200 µL da solução antimicrobiana ao 1º poço e nos demais poços, 100 µL de meio CMH ou CSab para diluição seriada, conforme realizado com as amostras. Para cada antimicrobiano comercial foi utilizada uma concentração de partida (maior concentração do 1º poço), sendo para amoxicilina e estreptomicina 10 µg/mL, e para fluconazol 256 µg/mL.

As microplacas foram seladas com plástico filme e incubadas a 37°C por 22 horas (*S. aureus* e *C. albicans*) ou por 20 horas (*E. coli*). Após estes períodos de tempo, foi adicionado o revelador resazurina 0,2% (adição de 40 µL por poço), e feita nova incubação a 37°C por 2 horas (totalizando 24 horas de incubação para *S. aureus* e *C. albicans* e 22 horas para *E. coli*). Após a incubação das microplacas, a presença de coloração azul foi indicativa de amostra com ação bacteriostática/fungistática frente ao micro-organismo testado. Coloração púrpura, rosa ou incolor, evidenciaram resistência do micro-organismo à concentração testada do extrato ou da fração em estudo (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.3.4 Determinação da CMM (Concentração Microbicida Mínima)

Uma alíquota de 25 µL foi retirada dos poços que apresentaram coloração azul e do primeiro poço que apresentou coloração rosa/púrpura, e esta foi aplicada sobre a superfície de uma placa contendo ágar Mueller Hinton (para *S. aureus* e *E. coli*) ou ágar Sabouraud (para *C. albicans*). Cada placa foi incubada a 37°C por 24 horas e a leitura foi posteriormente realizada.

O crescimento sobre a placa indicou que o extrato ou a fração não exerceu ação bactericida (CBM) / fungicida (CFM). No caso contrário (ausência de crescimento) foi indicativo da ação bactericida/fungicida sobre o micro-organismo testado.

4.4 Curva de crescimento

Os actinomicetos FL3 e FL4 foram submetidos a novos cultivos em caldo Czapek, nas mesmas condições dos ensaios fermentativos realizados, para avaliação do crescimento e viabilidade destes micro-organismos durante 20 dias de cultivo, tempo este inicialmente padronizado para as fermentações anteriormente realizadas. Para a titulação das células durante este período, foram retiradas alíquotas do caldo fermentado de 24 em 24 horas, com início no

dia do inóculo e término no vigésimo dia de cultura, em que 100 µL de cada alíquota foram diluídos em 900 µL de solução salina 0,9% estéril. A partir desta solução (1:10), foi realizada diluição seriada e 100 µL de cada diluição foram inoculados e espalhados, com auxílio de alça de Drigalski, em meio Sabouraud sólido. Após 48 horas de cultivo no meio sólido, as colônias formadas eram contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro de meio de cultura (UFC/mL).

4.5 Análise química e fracionamento dos extratos por técnicas cromatográficas

As análises químicas por CCD e o fracionamento dos extratos foram realizados no Laboratório de Bioprocessos, em colaboração com a Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz do Instituto de Química/Unifal-MG.

Os extratos brutos que apresentaram as melhores atividades antimicrobianas detectadas nos ensaios de CIM e CMM foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se diferentes reveladores. A CCD é um método de monitoramento da substância de interesse que possui a vantagem de poder ser executada em poucos minutos sem a necessidade de utilização de aparelhos que demandam um tempo bem maior para se verificar os resultados. Para as análises qualitativas em CCD foram usadas cromatofolhas de Sílica-gel 60 com indicador de ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm. As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob a luz ultravioleta (UV) em 254 nm, além de serem usados os seguintes reagentes como reveladores químicos: solução de 0,2 g de ninhidrina em 100 mL de etanol PA, aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias; solução de 20% de ácido fosfomolibdico em etanol PA aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa à 120°C, para a identificação qualitativa de substâncias redutoras; e solução do reagente de Dragendorff preparada segundo o procedimento descrito por Merck (1980) para identificação qualitativa de aminas terciárias.

A avaliação por CCD foi feita utilizando-se diferentes misturas de eluentes (acetato de etila e metanol em diferentes concentrações) para que fosse possível verificar qual deles promoveria a melhor separação dos compostos presentes no extrato. Os resultados das análises por CCD foram necessários para a seleção da técnica cromatográfica mais adequada para a separação dos compostos presentes nos extratos estudados (HOSTETTMANN; HOSTETTMANN; MARSTON, 1998). Após a etapa de CCD, os extratos foram fracionados através de cromatografia por exclusão de tamanho, em coluna Sephadex LH-20 condicionada com metanol.

Sequencialmente ao fracionamento, as frações similares de cada extrato foram reunidas mediante nova análise por CCD. As frações resultantes foram analisadas com diferentes fases móveis (mistura binária de acetato de etila com metanol e quaternária de clorofórmio, metanol, n-propanol e água) e com os seguintes reveladores: luz UV-254 nm e soluções de ninhidrina, anisaldeído sulfúrico e DPPH* (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). O revelador anisaldeído sulfúrico foi preparado misturando-se inicialmente 0,25 mL de anisaldeído com 5 mL de ácido acético glacial e posteriormente foi adicionado 42,5 mL de metanol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem, conforme descrito por Wagner e Bladt (1996); a revelação ocorreu com o aquecimento das cromatofolhas em estufa a 70°C por aproximadamente 5 minutos. A solução de DPPH* foi preparada na concentração de 0,2% p/v, onde 0,2 g do radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila foi solubilizado em metanol, resultando num volume final de 100 mL de solução (SOUZA et al., 2007); a revelação aconteceu em temperatura ambiente logo após a aplicação. O anisaldeído sulfúrico pode revelar substâncias de diferentes classes químicas, como compostos fenólicos, terpenos e saponinas; a solução de DPPH* indica a presença de substâncias com atividade antioxidante (BASTOS, 2016). Todas as classes de compostos foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura por Simões e colaboradores (2007) e por Wagner e Bladt (1996) e, ainda, com algumas substâncias padrões de identificação de compostos químicos. Para isto, soluções de padrões autênticos (Sigma®) (1 miligrama do padrão por mililitro de metanol) – catequina, quercetina, ácido tânico e ácido gálico – foram aplicadas em cromatofolhas nas mesmas condições das amostras, e revelados com luz UV-254 nm e anisaldeído sulfúrico.

4.6 Quantificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante

Estes ensaios foram realizados apenas com uma fração (D4) em colaboração com o Prof. Dr. Severino Matias Alencar no Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba.

4.6.1 Determinação quantitativa de composto fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos totais da fração D4 foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-

Raventós (1999), com modificações. Para este teste, o composto fenólico ácido gálico foi utilizado como padrão e os pontos de sua curva analítica foram preparados nas concentrações de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 $\mu\text{g/mL}$. A fração D4 foi solubilizada em álcool etílico absoluto na concentração de 5 mg/mL e, a partir desta solução, diferentes diluições foram preparadas em água destilada. Para o controle negativo, a amostra foi substituída por igual volume de álcool etílico absoluto e para o branco utilizou-se solução de álcool etílico e água destilada. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, e em cada poço adicionou-se 20 μL da amostra, do padrão ou do controle, 100 μL da solução de Folin Ciocalteau 10% e, após 5 minutos, 75 μL de solução de carbonato de sódio 7,5%. A microplaca foi inserida na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) para agitação e posteriormente retirada e mantida por 40 minutos ao abrigo da luz para que ocorresse a reação. Após o período de incubação, a leitura foi realizada a 740 nm na mesma leitora citada. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/ g da fração).

4.6.2 Atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre (DPPH^{*})

Este método de quantificação de antioxidantes é baseado no princípio do DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), um radical estável de coloração púrpura/violeta, ser reduzido a DPPH (difenil-picril-hidrazina), um composto de coloração amarela, quando recebe a doação de hidrogênio ou elétron advindos de um composto antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SILVA, 2014). O DPPH^{*} apresenta absorção máxima na faixa de 515-529 nm e sua redução é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação com um composto antirradicalar (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Portanto, na presença de um doador de elétron ou hidrogênio, a intensidade da absorção diminui e a solução com o radical perde a sua coloração violeta, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (MOLYNEUX, 2004).

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com modificações. A amostra foi preparada solubilizando a fração D4 em álcool etílico absoluto na concentração de 1,25 mg/mL e a solução de DPPH^{*} foi preparada com álcool etílico absoluto. Como padrão foi utilizado o Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E, em diferentes concentrações para gerar a curva analítica do mesmo. Em tubos de ensaio foram adicionados 500 μL da amostra ou da curva padrão, 300 μL de DPPH^{*} e 3 mL de etanol. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto e para o branco utilizou-se apenas álcool etílico absoluto. Os tubos foram

agitados e mantidos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 45 minutos para que ocorresse a reação e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. As amostras contendo a fração D4 foram diluídas na proporção de 1:10 para a leitura da absorbância, fazendo com que a concentração final desta fração tenha sido de 125 µg/mL. O ensaio foi realizado em triplicata. O resultado foi expresso equivalente a Trolox (µmol de Trolox/g de fração) e também na capacidade de sequestro do radical DPPH' através da equação: Atividade de redução do DPPH' (%) = $[(A_c - A_t) \div A_c] \times 100$, onde A_c é o valor da absorbância do controle e A_t é o valor da absorbância da amostra teste.

4.6.3 Atividade antioxidante pelo método do ABTS^{•+}

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) baseia-se na geração do radical ABTS^{•+}, de cor azul esverdeado, por meio da reação com o persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, promovendo a perda da cor do meio reacional. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS^{•+} é determinada em função do Trolox, padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. É um dos testes mais rápidos e reprodutíveis, apresentando boa solubilidade, permitindo a análise de compostos hidrofílicos e lipofílicos (RE et al., 1999).

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Al-Duais e colaboradores (2009), com algumas modificações. A amostra foi preparada solubilizando a fração D4 em álcool etílico absoluto a uma concentração de 5 mg/mL e posteriormente diluída em tampão fosfato de potássio em diferentes proporções para análise. Utilizou-se o padrão Trolox e os pontos da curva analítica foram preparados a partir de diferentes concentrações do mesmo. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se apenas tampão fosfato. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, sendo adicionado em cada poço 20 µL da amostra ou do padrão e 220 µL de solução do radical ABTS^{•+} (produzido pela reação aquosa de ABTS^{•+} a 7 mM com persulfato de potássio a 140 mM, armazenada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas e ajustada na absorbância de $0,7 \pm 0,02$ antes do uso). A placa foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) e mantida ao abrigo da luz por 6 minutos para que ocorresse a reação. Posteriormente realizou-se a leitura a 734 nm na leitora supracitada. O teste foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos equivalentes ao Trolox (µmol de Trolox/g de fração).

4.6.4 Atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)

Este método é baseado na medida direta da habilidade de um antioxidante reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), inicialmente de cor amarelo ferrugem, em Fe^{2+} /TPTZ, de intensa cor azul (BENZIE; STRAIN, 1996).

Para a quantificação do poder de redução do ferro, foi utilizada a metodologia descrita por Müller e colaboradores (2010) com algumas modificações. A amostra foi preparada solubilizando a fração D4 em álcool etílico absoluto na concentração de 5 mg/mL e, posteriormente, diluída em água destilada em diferentes concentrações para análise. Como padrão foi utilizado uma solução de sulfato ferroso 2,5 mM, a partir da qual foi preparado os pontos para a curva analítica. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 50 mL de tampão acetato de potássio (0,3 M, pH 3,6), 5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 5 mL de cloreto férrico (20 mM) em água destilada. O controle negativo foi feito substituindo-se a amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se água destilada no lugar da amostra. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados, em cada poço, 20 μL da amostra, do padrão, de água (branco) ou de álcool etílico absoluto (controle), 30 μL de água destilada e 200 μL do reagente FRAP. A placa foi inserida em equipamento para agitação e incubação a 37°C por 8 minutos e a leitura foi realizada a 595 nm na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em equivalente sulfato ferroso ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ da fração).

4.6.5 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Este ensaio mede a degradação oxidativa da molécula fluorescente “fluoresceína”, após ser misturada com geradores de radicais livres como o AAPH (dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidino-propano)). O AAPH produz radicais peroxila por aquecimento, os quais oxidam a sonda fluorescente. Assim, a intensidade de fluorescência decresce com o processo oxidativo. Na presença de antioxidantes a taxa de oxidação da fluoresceína é retardada. Logo, quanto maior a atividade antioxidante, menor a oxidação e maior a fluorescência (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993).

O método ORAC utilizado foi uma adaptação ao descrito por Chisté e colaboradores (2011). A amostra foi preparada solubilizando a fração D4 em álcool etílico absoluto na concentração de 5 mg/mL e posteriormente diluída em tampão fosfato de potássio em diferentes

concentrações. Para este teste também foi utilizado o padrão Trolox e o controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se apenas tampão fosfato de potássio. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados, em cada poço, 30 µL da amostra, do padrão ou do controle, 60 µL de fluoresceína (508,25 nM) e 110 µL da solução de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)) na concentração de 76 nM. Colocou-se a placa na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) para agitação e incubação a 37°C, a mesma foi programada para realizar a leitura a cada minuto durante duas horas, no comprimento de onda de emissão de 528 nm e excitação de 485 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A proteção fornecida pela fração ou padrão foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo *software*, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica do Trolox e os resultados da atividade antioxidante foram, então, expressos em equivalente Trolox (µmol de Trolox/g da fração).

4.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no ultravioleta - visível (UV-Vis)

A fração D4 também foi avaliada no equipamento PROMINENCE (Shimadzu) com detector espectrofotométrico UV – visível. A análise foi monitorada nos comprimentos de onda de 254, 270 e 300 nm. Foram avaliadas separações utilizando coluna Shim Pack CLC-ODS(M) (25cm, 4,6mm, 5µm), em gradiente com as seguintes condições: 5 a 100% v/v de acetonitrila em água acidificada com 0,1% v/v de ácido acético em 30 minutos e em acetonitrila 100% por 15 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.

4.8 Teste de *checkerboard*

Para avaliar se a combinação das frações (que apresentaram atividade antimicrobiana e possuíam massa suficiente para o teste) com o antimicrobiano utilizado nos testes de concentração inibitória - amoxicilina - produz ação sinérgica, foi utilizado o ensaio de *checkerboard*, conforme a técnica descrita por White e colaboradores (1996), com modificações.

Após a determinação da CIM de cada fração e a CIM da amoxicilina para o micro-organismo teste (*S. aureus*), foram realizadas diluições em série associando a fração teste com o agente antimicrobiano (amoxicilina) e a suspensão microbiana. O ensaio foi realizado em triplicata, conforme esquema metodológico apresentado na Figura 4.

O efeito das combinações foi obtido a partir do cálculo da concentração inibitória fracionária (CIF) para cada agente nas concentrações utilizadas de acordo com os cálculos 1, 2 e 3 a seguir:

$$\text{ICIF (índice da concentração inibitória fracionária)} = \text{CIF}_F + \text{CIF}_A \text{ (Cálculo 1)}$$

$$\text{CIF}_F \text{ (concentração inibitória fracionária da fração)} = \text{CIM da fração com o antimicrobiano} \div \text{CIM da fração sozinha (Cálculo 2)}$$

$$\text{CIF}_A \text{ (concentração inibitória fracionária do antimicrobiano)} = \text{CIM do antimicrobiano com a fração} \div \text{CIM do antimicrobiano sozinho (Cálculo 3)}$$

Os índices obtidos foram interpretados como sinérgico quando $\text{ICIF} \leq 0,5$; parcialmente sinérgico quando $0,5 < \text{ICIF} < 1$; aditivo quando $\text{ICIF} = 1,0$; e indiferente quando $1,0 < \text{ICIF} < 4,0$, de acordo com Timurkaynak e colaboradores (2006).

Teste de <i>Checkerboard</i> com <i>S. aureus</i> ATCC 6538												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fração 400 Ant 0,039	Fração 200 Ant 0,039	Fração 100 Ant 0,039	Fração 50 Ant 0,039	Fração 25 Ant 0,039	Fração 12,5 Ant 0,039	Fração 400 Ant 0,009	Fração 200 Ant 0,009	Fração 100 Ant 0,009	Fração 50 Ant 0,009	Fração 25 Ant 0,009	Fração 12,5 Ant 0,009
B	Fração 400 Ant 0,039	Fração 200 Ant 0,039	Fração 100 Ant 0,039	Fração 50 Ant 0,039	Fração 25 Ant 0,039	Fração 12,5 Ant 0,039	Fração 400 Ant 0,009	Fração 200 Ant 0,009	Fração 100 Ant 0,009	Fração 50 Ant 0,009	Fração 25 Ant 0,009	Fração 12,5 Ant 0,009
C	Fração 400 Ant 0,039	Fração 200 Ant 0,039	Fração 100 Ant 0,039	Fração 50 Ant 0,039	Fração 25 Ant 0,039	Fração 12,5 Ant 0,039	Fração 400 Ant 0,009	Fração 200 Ant 0,009	Fração 100 Ant 0,009	Fração 50 Ant 0,009	Fração 25 Ant 0,009	Fração 12,5 Ant 0,009
D	Fração 400 Ant 0,019	Fração 200 Ant 0,019	Fração 100 Ant 0,019	Fração 50 Ant 0,019	Fração 25 Ant 0,019	Fração 12,5 Ant 0,019	CIM Fração 400	CIM Fração 200	CIM Fração 100	CIM Fração 50	CIM Fração 25	CIM Fração 12,5
E	Fração 400 Ant 0,019	Fração 200 Ant 0,019	Fração 100 Ant 0,019	Fração 50 Ant 0,019	Fração 25 Ant 0,019	Fração 12,5 Ant 0,019	CIM Fração 400	CIM Fração 200	CIM Fração 100	CIM Fração 50	CIM Fração 25	CIM Fração 12,5
F	Fração 400 Ant 0,019	Fração 200 Ant 0,019	Fração 100 Ant 0,019	Fração 50 Ant 0,019	Fração 25 Ant 0,019	Fração 12,5 Ant 0,019	CIM Fração 400	CIM Fração 200	CIM Fração 100	CIM Fração 50	CIM Fração 25	CIM Fração 12,5
G	CIM Ant 10	CIM Ant 5	CIM Ant 2,5	CIM Ant 1,25	CIM Ant 0,625	CIM Ant 0,312	CIM Ant 0,156	CIM Ant 0,078	CIM Ant 0,039	CIM Ant 0,019	CIM Ant 0,009	CIM Ant 0,004
H	Controle Mcg	Controle Mcg	Controle Mcg	Controle Mcg	Controle Mcg	Controle Mcg	Controle Meio	Controle Meio	Controle Meio	Controle Meio	Controle Meio	Controle Meio

Figura 4 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 associadas com o antimicrobiano comercial amoxicilina e o respectivo micro-organismo (*S. aureus* ATCC 6538).

Fonte: Da autora.

Nota: Ant: antimicrobiano; CIM: concentração inibitória mínima; Controle Mcg: controle de crescimento do micro-organismo teste; Controle Meio: controle de esterilidade do meio de cultura.

4.9 Avaliação da citotoxicidade das frações

Este teste foi realizado em colaboração com Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho no Laboratório de Vacinas do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Unifal-MG. O

ensaio experimental foi conduzido com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 que possuíam massa suficiente para realização dos experimentos.

A avaliação da citotoxicidade das frações foi realizada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o metabólito MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), segundo metodologia utilizada por Brandão e colaboradores (2010). Este método mede a atividade das desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, em clivarem o anel de tetrazólio do MTT, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan, que são cristais insolúveis em soluções aquosas (ABREU, 2008). Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. O parâmetro final de avaliação foi estabelecido em valores de CC_{50} (concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular).

Células vero foram cultivadas em meio DMEM contendo 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) durante 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, estas células foram submetidas ao tratamento com as frações em microplacas de 96 poços contendo 6×10^3 células por poço, onde foram adicionados 100 µL de meio DMEM com 5% de SFB em todos os orifícios. A seguir, 10 µL da amostra solubilizada em etanol e 90 µL de meio de cultura foram adicionados ao primeiro poço de cada fileira da placa, sendo que cada fileira correspondeu a uma amostra (fração) diferente. A diluição das amostras na microplaca começou a partir da transferência de 100 µL dos primeiros poços para os poços consecutivos, até o último poço, onde 100 µL foram desprezados, para que todos os poços contivessem 100 µL de solução. O volume final em cada poço foi de 100 µL, e a maior concentração utilizada de cada fração, no 1º poço da diluição seriada, foi de 500 µg/mL. Alguns orifícios da placa foram utilizados como controles de crescimento das células Vero e da citotoxicidade do solvente: os poços de controle de crescimento celular continham apenas as células e 100 µL de meio de cultura. Os orifícios correspondentes ao controle do solvente foram montados da mesma maneira que os poços contendo as amostras testadas, com a única diferença de serem adicionados 10 µL de etanol absoluto puro (sem a presença das amostras) para posterior diluição seriada.

Após a montagem das microplacas, estas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas. Passado este período, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (1mg/mL) em todos os poços, e as microplacas foram novamente incubadas nas condições supracitadas por 4 horas. Findo este tempo, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente de todos os orifícios da placa e 100 µL de DMSO foram adicionados em cada poço, para solubilização dos cristais de formazan. As microplacas foram agitadas durante 10 minutos em agitador orbital e a absorbância foi medida em leitor de microplacas (Anthos Zenith 200rt) a 570 nm.

4.10 Identificação molecular dos micro-organismos promissores

Os actinomicetos, cujos extratos apresentaram as melhores atividades antimicrobianas, tiveram um fragmento do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) amplificado e sequenciado, conforme descrito a seguir.

4.10.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar nutriente por 24 horas a 28°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em microtubos contendo 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005M, NaCl 0,1M e SDS 1%) e incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Decorrida essa etapa do processo, foram adicionados 200 µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro microtubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos para que ocorresse a precipitação do DNA. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e, ao *pellet* formado, foram acrescentados 200 µL de etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado por inversão. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente *overnight* para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão Tris EDTA 0,1M (TE) pH 8,0 e estocado a -20°C.

4.10.2 Amplificação utilizando os iniciadores 27F e 1492R

Os actinomicetos tiveram um fragmento do gene 16S do rRNA amplificado com a utilização dos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') descritos por Weisburg e colaboradores (1991). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de mix para PCR (*GoTaq*[®] *Colorless Master Mix* - Promega, EUA), 1 µL de cada iniciador a 10 pmoles, 2 µL de DNA a 40 ng/µL, e o volume final foi completado com água Milli-Q estéril. As reações foram realizadas utilizando o termociclador Amplitherm (*Thermo Fisher*). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 60

segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento dos iniciadores a 57°C e 2 minutos de extensão a 72°C, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente 60 minutos a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de brometo de etídeo e os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel *DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS* (Bioamerica Inc.).

4.10.3 Reação de sequenciamento e análise das sequências

As amostras foram sequenciadas pela empresa *Myleus Biotechnology*, em Belo Horizonte - Minas Gerais, por meio de eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e kit *BigDye* versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA). Para o sequenciamento, além dos iniciadores 27F e 1525R citados anteriormente, os iniciadores 1212R (5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3') - descrito por Rintala e colaboradores em 2001 - e 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') - descrito por Weisburg e colaboradores (1991) - também foram utilizados. Após o sequenciamento e construção dos *contigs* de cada linhagem, outros dois iniciadores (F: 5'-CCTTATGTCTTGGGCTGCAC-3' e R: 5'-CAATATCCCCACTGCTGCC-3') foram utilizados para recuperação e sequenciamento das extremidades das sequências que não ficaram com qualidade desejada no primeiro sequenciamento. Estes iniciadores foram desenhados com base nos *contigs* de ambas linhagens, com auxílio do programa desenvolvido pela *Thermo Fisher* para desenho de oligonucleotídeos, disponível na página eletrônica: <https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/#/selection>.

As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* - versão 2.5.0 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) desenvolvido por Altschul e colaboradores (1997), para comparação com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank*; e o programa *Sequence Match*, disponível no portal RDP (*The Ribosomal Database Project*) desenvolvido por Cole e colaboradores (2013), também foi utilizado para comparação com sequências disponíveis no banco de dados de genes 16S rRNAs.

4.10.4 Construção da árvore filogenética

A região do gene 16S do rRNA foi utilizada para construção do filograma que inclui as linhagens FL3 e FL4 e as respectivas espécies próximas destes isolados (que apresentaram similaridade de 99% para a região sequenciada de acordo com a análise realizada através do BLASTn, e com os valores de *score* mais altos obtidos na análise do *Sequence Match*). A árvore filogenética (Figura 10) foi gerada com o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA - 6.06* desenvolvido por Tamura e colaboradores (2013), e foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* através do modelo *Tamura-Nei*, que considera as diferenças na taxa de substituição entre nucleotídeos (transição entre purinas e transversão entre pirimidinas) e a desigualdade de frequências dos mesmos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com as diferentes metodologias empregadas neste estudo serão expressos e discutidos nesta seção.

5.1 Fermentação e obtenção dos extratos brutos

Os rendimentos referentes aos filtrados fermentados extraídos com acetato de etila estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos (mg/L) dos extratos AcOEt provenientes da fermentação dos actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5.

Micro-organismo fermentador	Rendimento do extrato (mg/L)
Actinomiceto FL1	80,0
Actinomiceto FL2	79,4
Actinomiceto FL3	25,8
Actinomiceto FL4	38,9
Actinomiceto FL5	55,6

Fonte: Da autora.

5.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) dos extratos brutos

Foram realizados testes de CIM e CMM com todos os extratos brutos obtidos, os respectivos resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM), em $\mu\text{g/mL}$, observadas para extratos AcOEt provenientes da fermentação dos actinomicetos FL1, FL2, FL3, FL4 e FL5, e para os antimicrobianos padrões (amoxicilina, estreptomicina e fluconazol) frente aos micro-organismos *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231.

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
FL1	200-400	N.A.				
FL2	200-400	N.A.				
FL3	100-200	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
FL4	25-50	100-200				
FL5	N.A.	N.A.				
Amoxicilina	0,019-0,039	0,315-0,630	N.D.	N.D.	N.D.	
Estreptomicina	N.D.	N.D.	2,5-5,0	2,5-5,0	N.D.	N.D.
Fluconazol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	64-128	

Fonte: Da autora.

Nota: N.A.: Não ativo para as concentrações estudadas (0,195 a 400 $\mu\text{g/mL}$). N.D.: Não definido no presente estudo.

É importante ressaltar que cada extrato foi preliminarmente nomeado com o mesmo nome de seu respectivo micro-organismo fermentador (exemplo: extrato FL1 proveniente da fermentação da actinobactéria FL1). De acordo com a Tabela 3 é possível observar que, dentre todos os extratos testados, aqueles provenientes da fermentação realizada pelos actinomicetos FL3 e FL4 tiveram as melhores atividades contra *S. aureus* ATCC 6538, em que FL3 apresentou CIM de 100-200 $\mu\text{g/mL}$, e o extrato FL4 apresentou CIM de 25-50 $\mu\text{g/mL}$ e CMM de 100-200 $\mu\text{g/mL}$. Segundo o critério de Holetz e colaboradores (2002), a ação antimicrobiana pode ser classificada como forte quando o extrato apresenta atividade menor que 100 $\mu\text{g/mL}$, moderada entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$, fraca entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ e inativa quando maior ou igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sendo assim, pode-se destacar que o extrato FL3 apresentou atividade moderada frente à *S. aureus* (100-200 $\mu\text{g/mL}$) e o extrato FL4 apresentou forte atividade antimicrobiana contra o mesmo micro-organismo (25-50 $\mu\text{g/mL}$).

Arasu e colaboradores (2009) isolaram uma linhagem de *Streptomyces* sp. (ERI-3) de solo rochoso na Índia, e conduziram experimentos similares aos deste trabalho. Algumas diferenças podem ter influenciado significativamente na obtenção dos resultados encontrados pelo referido grupo de pesquisa, como o meio de cultura utilizado para a fermentação do isolado, o MNG (glicose-nutriente modificado), e o tempo de fermentação correspondente a 4 dias. As cepas de *Staphylococcus aureus* utilizadas pelos pesquisadores foram ATCC 25923 e ATCC 29213, e o extrato AcOEt obtido pelo grupo apresentou CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e de 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. No presente estudo, entretanto, para a cepa utilizada (ATCC 6538),

foi obtido CIM entre 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato FL4 e entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato FL3, considerados, portanto, mais promissores.

Outro trabalho isolou uma linhagem marinha de *Streptomyces* (AP-123) e obteve o extrato AcOEt pelo mesmo processo fermentativo do trabalho de Arasu e colaboradores em 2009, porém conduzido por tempo maior, de 5 dias (ARASU; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2013). O extrato AcOEt obtido pela fermentação desta linhagem obteve CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa ATCC 25923, porém a atividade do extrato FL4 ainda se mostrou mais promissora nesta comparação. Os trabalhos do grupo de Arasu citados (2009 e 2013) podem ter obtido resultados diferentes devido às divergentes condições fermentativas entre os dois trabalhos, não deixando de ressaltar as possíveis diferenças entre as linhagens de *Streptomyces* utilizadas. Um fator que também cabe ser destacado é a expressiva diferença entre os tempos de fermentação utilizados pelos trabalhos citados (4 e 5 dias) e pelo presente estudo (20 dias). O maior tempo de fermentação pode estar relacionado com melhor atividade antimicrobiana devido ao fato de metabólitos secundários serem produzidos a partir da ativação de vias bioquímicas do micro-organismo sob condições de estresse. Um exemplo disto foi citado na revisão do presente trabalho: assume-se que os estreptomicetos produzem antibióticos quando há depleção de nutrientes no meio que se encontram. Além disto, a condição de fermentação estática também pode ter contribuído para o melhor valor de CIM obtido neste estudo, já que acarreta em uma baixa oferta de oxigênio para o micro-organismo em questão e pode ativar, portanto, vias secundárias do metabolismo microbiano.

Além da obtenção do extrato com acetato de etila, solvente muito utilizado para a extração de metabólitos devido à sua polaridade intermediária, vários trabalhos também utilizaram outras frações obtidas do caldo fermentado extraídas com solventes como hexano, metanol, clorofórmio, éter e outros (ARASU et al., 2008; 2009; ARASU; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2013; CASTILLO et al., 2002). Estas frações apresentam resultados diferentes de CIM, já que geralmente extraem compostos distintos. Isto aponta para a importância de mais estudos serem realizados com os isolados FL3 e FL4, tanto a fim de se otimizar os parâmetros fermentativos para uma melhor produção de agentes antimicrobianos, quanto de extrair frações com outros solventes com o objetivo de encontrar novos metabólitos ativos produzidos por estas linhagens.

5.3 Curva de crescimento das linhagens FL3 e FL4

As curvas de crescimento microbiano dos isolados FL3 e FL4 apresentaram uma típica curva de crescimento de actinomicetos com dois estágios (FONDI et al., 2017) consistindo em um estágio inicial de crescimento rápido (fase exponencial com pico máximo de unidades formadoras de colônias em 24 horas); uma fase de transição com declínio no número de células viáveis a partir do dia 1, observado até o dia 5 para a linhagem FL3 e até o dia 4 para FL4; e uma fase de crescimento secundário até o dia 7 para FL3 e até o dia 5 para o isolado FL4. A fase estacionária foi observada logo após a fase de crescimento secundário para ambas linhagens até o dia 20, quando voltou a ter um discreto declínio do número celular. Todas estas considerações podem ser observadas no gráfico da Figura 5, que apresenta o número de unidades formadoras de colônias por mililitro de caldo Czapek em cada dia de cultivo, durante um total de 20 dias.

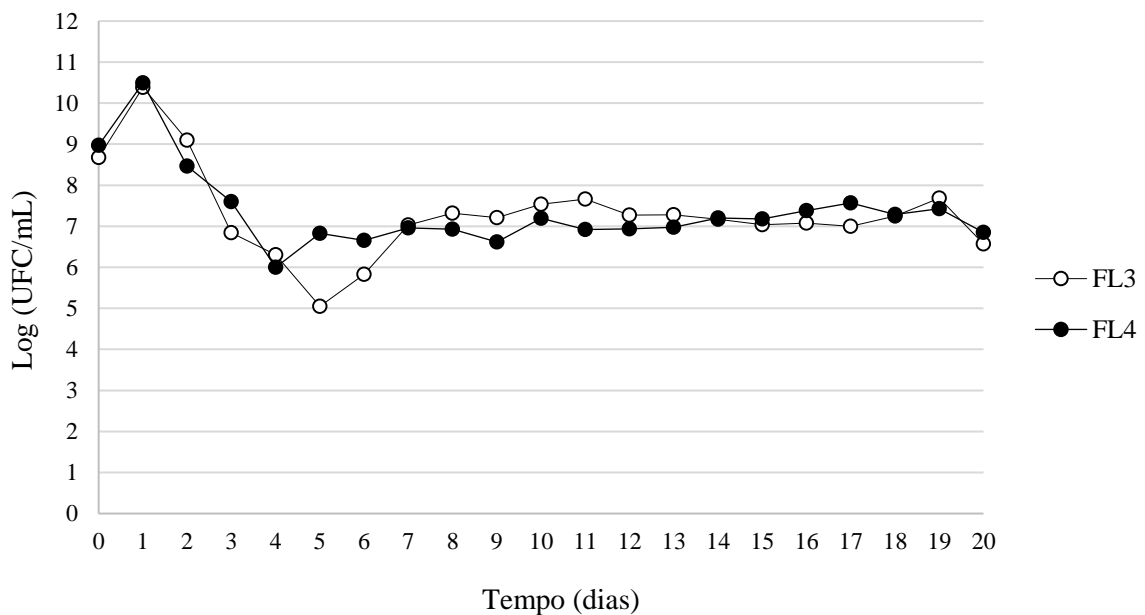


Figura 5 - Curvas de crescimento das linhagens FL3 e FL4 cultivadas em caldo Czapek durante 20 dias a 28°C em condição estática.

Fonte: Da autora.

Os dados observados na Figura 5 permitem afirmar que, nestas condições experimentais, por um período de fermentação de 20 dias em caldo Czapek (28°C, condição estática), os actinomicetos FL3 e FL4 podem apresentar considerável número de células viáveis no meio de cultivo durante todo o processo fermentativo e, ainda, permanecer em fase estacionária pela maior parte do tempo. Na literatura existem muitos relatos da produção de compostos bioativos

por actinomicetos ser favorecida e/ou aumentada na fase estacionária do crescimento, principalmente em meio de cultivo líquido (ALAM et al., 2010; BARKA et al., 2016; GRAMAJO; TAKANO; BIBB, 1993; HUANG et al., 2001; VAN DISSEL; CLAESSEN; VAN WEZEL, 2014; VAN WEZEL; MCKENZIE; NODWELL, 2009). Segundo Alam e colaboradores (2010), na fase exponencial do crescimento as células bacterianas produzem metabólitos necessários para o crescimento e, assim, crescem rapidamente; quando os nutrientes essenciais vão sendo esgotados, as células mudam para a fase estacionária e reorganizam seu metabolismo energético e muitas vezes, a partir deste momento, começam a produzir um novo conjunto de metabólitos secundários, incluindo compostos antioxidantes e antimicrobianos. A morfologia é um fator intrinsicamente relacionado com as alterações do metabolismo de actinomicetos na fase estacionária, e em cultivos submersos (cultura em meio líquido) a formação de grumos ou *pellets*, típica desta fase do crescimento, pode favorecer a produção de antibióticos (BARKA et al., 2016; VAN DISSEL; CLAESSEN; VAN WEZEL, 2014; VAN WEZEL; MCKENZIE; NODWELL, 2009). Isto pode ser exemplificado pelo trabalho de Yin e colaboradores (2008), que verificou uma maior produção de avermectina por *Streptomyces avermitilis* quando se formam pequenos grumos densos, e pela formação de *pellets* da espécie *S. lividans* ter sido um pré-requisito para a produção de um antibiótico híbrido (SARRÀ et al., 1999). Diante do exposto, o tempo de cultivo juntamente com a fase estacionária majoritária do crescimento das linhagens FL3 e FL4, bem como a condição submersa dos processos fermentativos, podem ter favorecido a produção dos compostos antimicrobianos e antioxidantes presentes nos extratos obtidos destes isolados.

5.4 Análise e fracionamento dos extratos FL3 e FL4 por técnicas cromatográficas

O estudo químico foi iniciado por meio da cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar o comportamento dos extratos FL3 e FL4 em diferentes misturas de eluentes e analisar a presença de classes de compostos com o uso de reveladores distintos; este passo foi importante para definir as etapas seguintes de trabalho referentes ao fracionamento dos extratos. Como eluentes foram testadas nas proporções 9:1, 8:2 e 6:4 da mistura acetato de etila com metanol (AcOEt:MeOH). O melhor eluente foi AcOEt:MeOH na proporção 9:1. Dentre os reveladores inicialmente empregados, apenas dois apresentaram-se mais apropriados para a detecção dos compostos presentes nos extratos em estudo: a luz ultravioleta no comprimento de onda 254 nm que revelou grupos cromóforos e a ninhidrina que revelou aminas primárias.

Para o fracionamento dos extratos FL3 e FL4 foi escolhido o método de cromatografia por exclusão de tamanho, uma vez que os valores correspondentes às massas dos extratos eram de 77,4 e 116,7 mg, respectivamente, e este método geralmente garante um maior rendimento e recuperação de massa do que outras cromatografias comumente utilizadas. Sendo assim, os extratos foram introduzidos em coluna Sephadex LH-20 condicionada com metanol, e as frações foram coletadas de 20 em 20 mL, aproximadamente. Foram coletadas dez frações do extrato FL3 e doze provenientes do extrato FL4, as quais foram analisadas por CCD, cujas fases móveis empregadas foram soluções de AcOEt:MeOH nas proporções 9:1, 8:2 e 6:4, com revelação por ninhidrina e luz ultravioleta. As análises dos perfis cromatográficos por CCD permitiram reunir as frações semelhantes, resultando, finalmente, em quatro frações do extrato FL3 e seis provenientes do extrato FL4. As frações reunidas e suas respectivas massas estão contidas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Rendimento (mg) das frações do extrato FL3.

Frações reunidas	Nova fração	Rendimento (mg)
1-4	A3	37,0
5-7	B3	19,7
8-9	C3	1,7
10	D3	1,0

Fonte: Da autora.

Tabela 5 - Rendimento (mg) das frações do extrato FL4.

Frações reunidas	Nova fração	Rendimento (mg)
1-3	A4	4,3
4	B4	17,8
5-6	C4	49,1
7-8	D4	20,4
9-10	E4	2,8
11-12	F4	1,6

Fonte: Da autora.

5.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) das frações dos extratos FL3 e FL4

Novos ensaios de concentração inibitória mínima e microbicida mínima foram realizados com as frações dos extratos FL3 e FL4 frente à cepa *S. aureus* ATCC 6538, a fim de

se avaliar o potencial antimicrobiano de cada fração contra este micro-organismo. Dentre as frações do extrato FL3, as frações B3 e C3 tiveram as melhores atividades, ambas com CIM de 100-200 $\mu\text{g/mL}$; a fração A3 obteve valor de CIM entre 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ e a fração D3 não foi ativa contra *S. aureus* nas concentrações testadas (0,195 a 400 $\mu\text{g/mL}$). Nenhuma das frações provenientes de FL3 exibiram atividade microbicida.

Com relação às frações obtidas a partir do extrato FL4, as frações B4 e D4 apresentaram as melhores atividades bacteriostáticas, ambas com valores de CIM entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, B4 também apresentou atividade bactericida, com CMM de 100-200 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que a fração D4 não se mostrou microbicida nas concentrações testadas. A fração C4 também exibiu atividade bactericida, porém em concentrações maiores (CMM de 200-400 $\mu\text{g/mL}$), e sua concentração inibitória mínima foi observada no intervalo de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, o mesmo obtido pela fração E4. Finalmente, a fração A4 apresentou CIM de 200-400 $\mu\text{g/mL}$ e a fração F4 não foi ativa nas concentrações testadas. Todos os resultados citados estão resumidos na Tabela 6 a seguir.

Tabela 6 - Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM), em $\mu\text{g/mL}$, observadas para as frações A3, B3, C3 e D3 obtidas do extrato bruto FL3 e para as frações A4, B4, C4, D4, E4 e F4 oriundas do extrato bruto FL4.

	Fração	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CMM ($\mu\text{g/mL}$)
Frações FL3	A3	200-400	
	B3	100-200	
	C3	100-200	N.A.
	D3	N.A.	
Frações FL4	A4	200-400	
	B4	50-100	100-200
	C4	100-200	200-400
	D4	50-100	
	E4	100-200	N.A.
	F4	N.A.	

Fonte: Da autora.

Nota: N.A.: Não ativo para as concentrações estudadas (0,195 a 400 $\mu\text{g/mL}$).

Após o fracionamento dos extratos FL3 e FL4, as frações B3 e C3 mantiveram a mesma atividade do extrato bruto FL3 para *S. aureus* (CIM de 100-200 $\mu\text{g/mL}$), porém nenhuma das frações provenientes do extrato FL4 apresentaram atividade igual ou melhor que o extrato bruto (Tabelas 3 e 6). Uma hipótese para as frações do extrato FL3 não terem melhorado a atividade,

pode estar relacionada com a possibilidade deste fracionamento não ter sido suficiente para concentrar o(s) composto(s) alvo a ponto de o valor de concentração inibitória mínima diminuir para a cepa Gram-positiva testada. Já para as frações FL4, pode-se supor que o actinomiceto FL4 produza compostos que atuam sinergicamente contra *S. aureus*, e quando ocorreu o fracionamento, estes componentes se separaram, aumentando, assim, o valor de CIM em relação ao extrato bruto. Sabe-se que uma mesma espécie de actinomiceto pode produzir mais de um antibiótico, dentre outros compostos bioativos, dependendo das condições e sinais que ativem os genes codificadores destes metabólitos (BARKA et al., 2016; CHALLIS; HOPWOOD, 2003; XIE et al., 2012). Exemplo disto é a espécie *Streptomyces griseoviridis* que produz os antibióticos griseoviridina e viridogriseina, o último muitas vezes referido como etamicina. Ambos produtos naturais pertencem à família Estreptogramina, e cada um representa uma subclasse diferente dentro da família; contudo, demonstraram se comportar sinergicamente, com melhora da atividade antimicrobiana, quando comparada às atividades apresentadas por cada composto separadamente (XIE et al., 2012).

Challis e Hopwood, em 2003, discutiram que a comum prevalência da produção múltipla de metabólitos secundários por espécies de actinobactérias pode estar num contexto de prováveis vantagens seletivas, já que existem vários exemplos de um único actinomiceto produzir dois metabólitos quimicamente diferentes que atuam de forma sinérgica contra um micro-organismo alvo ou de forma contingente para superar a concorrência por nutrientes com outros micro-organismos. Estes autores argumentam que a sinergia ou contingência na ação de metabólitos individuais contra concorrentes biológicos pode, em alguns casos, ser uma poderosa força motriz para a evolução da produção múltipla de metabólitos bioativos.

5.6 Avaliação química das frações por cromatografia em camada delgada

As novas frações foram analisadas por CCD, desta vez utilizando as fases móveis AcOEt:MeOH na proporção 9:1 e a fase orgânica da mistura quaternária Clorofórmio:Metanol:n-Propanol:Água (CHCl₃:MeOH:n.PrOH:H₂O) na proporção 5:6:1:4. Esta última foi considerada melhor para a distinção e separação dos compostos presentes nas frações. Os reveladores utilizados foram luz UV-254 nm, ninhidrina, anisaldeído sulfúrico e DPPH'. É possível observar perfis cromatográficos distintos entre as frações (Figura 6), os quais foram analisados através da comparação das colorações das manchas observadas nas placas, após a aplicação do revelador, com as colorações das classes descritas na literatura (SIMÕES et al., 2007; WAGNER; BLADT, 1996). Para a comparação e identificação das amostras na

revelação por anisaldeído sulfúrico foram também utilizados os padrões catequina, quercetina, ácido tânico e ácido gálico. Os perfis cromatográficos dos padrões podem ser observados na Figura 7.

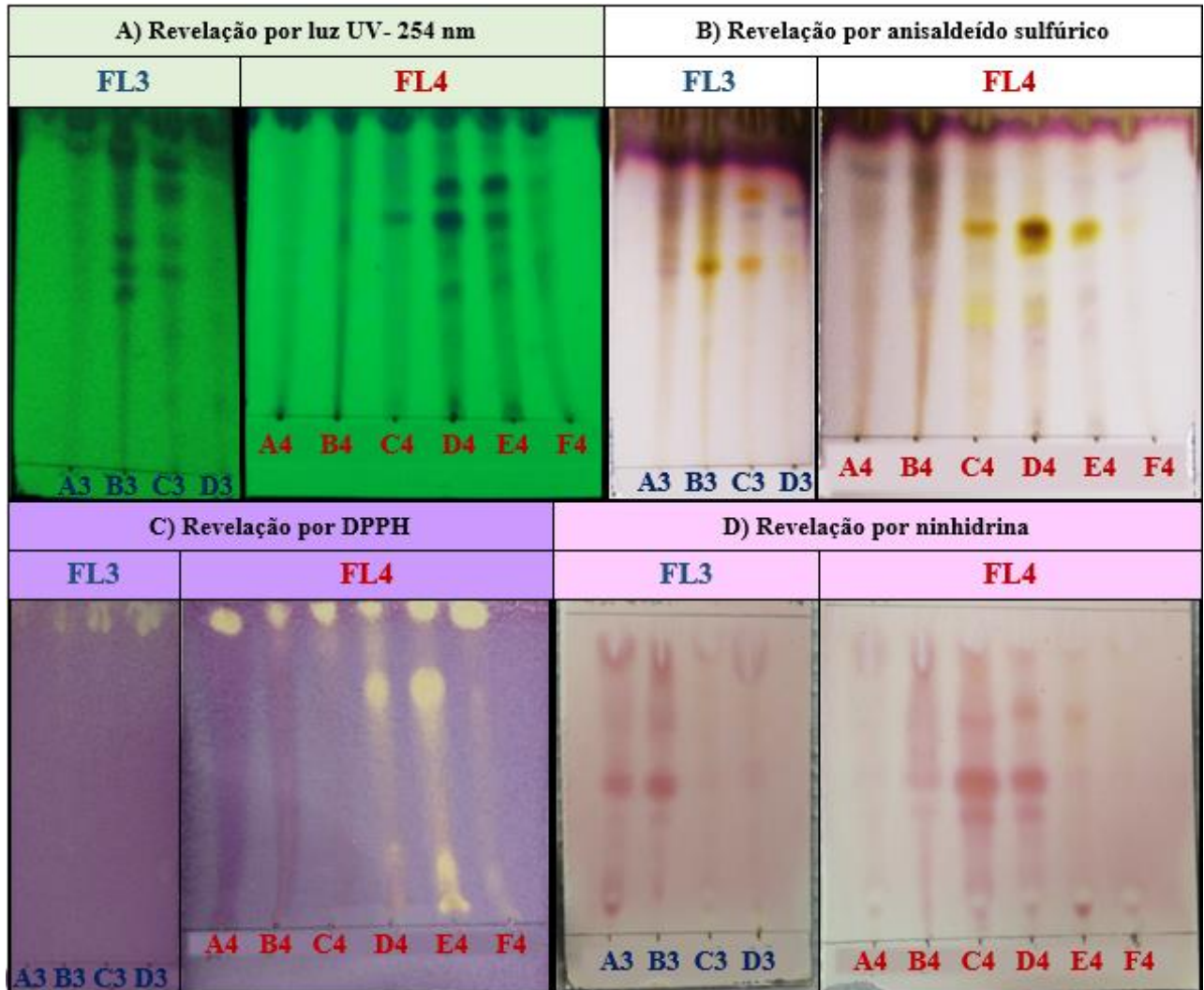


Figura 6 - Cromatografia em camada delgada das frações obtidas a partir dos extratos FL3 e FL4 (fase móvel: CHCl_3 :MeOH:n.PrOH:H₂O 5:6:1:4, fase orgânica) reveladas com luz UV-254 nm (A), anisaldeído sulfúrico (B), DPPH[•] (C) e ninhidrina (D).

Fonte: Da autora.

A luz UV-254 nm revelou bandas referentes aos compostos cromóforos que apresentam ligações duplas conjugadas, observadas nas frações A3, B3, C3, B4, C4, D4, E4 e F4 (Figura 6 - A), e substâncias pertencentes à classe dos flavonoides são exemplos que possuem este tipo de ligação em sua estrutura (WAGNER; BLADT, 1996). É relevante ressaltar este fato, uma vez que as frações B3, C4, D4 e E4 apresentaram bandas reveladas à luz UV-254 nm nos mesmos pontos de retenção de bandas amarelas indicativas de flavonoides na revelação por anisaldeído sulfúrico (as cromatofolhas reveladas em luz UV foram as mesmas utilizadas para

a revelação com anisaldeído sulfúrico), podendo deduzir que sejam bandas referentes aos mesmos compostos (vide Figura 6 - A e B). Foi possível sugerir que estas manchas sejam indicativas de flavonoides através da comparação de cor com o padrão quercetina (Figura 7) e também por comparação com as colorações de flavonoides reveladas por anisaldeído sulfúrico descritas na literatura (BASTOS, 2016; SIMÕES et al., 2007; WAGNER; BLADT, 1996). Flavonoides constituem uma classe de compostos fenólicos que possuem representantes com potencial bioativo relatado para diversas atividades biológicas, mencionadas na revisão do presente estudo. Muito conhecidos como metabólitos secundários de plantas, compostos desta classe química também já foram detectados como produtos do metabolismo de actinomicetos, conforme será exemplificado a seguir.

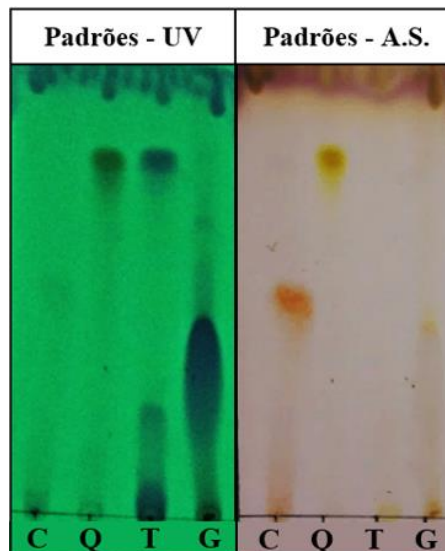


Figura 7 - Cromatografia em camada delgada dos padrões catequina (C), quercetina (Q), ácido tânico (T) e ácido gálico (G) revelados com luz UV-254 nm (esquerda) e anisaldeído sulfúrico (direita). Fase móvel: CHCL₃:MeOH:n.PrOH:H₂O 5:6:1:4, fase orgânica.

Fonte: Da autora.

Taechowisan e colaboradores (2014a) isolaram uma linhagem de *Streptomyces* endofítica oriunda de tecido radicular do vegetal *Boesenbergia rotunda*, e identificaram a produção de flavonoides com ação antibacteriana. Os metabólitos secundários deste isolado foram obtidos a partir de fermentação e extraídos com acetato de etila, tal qual o presente estudo. Estes autores isolaram seis diferentes compostos da classe dos flavonoides, que evidenciaram atividade antimicrobiana mais pronunciada para as bactérias Gram-positivas testadas (*S. aureus*, *Bacillus cereus* e *B. subtilis*) do que para as bactérias Gram-negativas (*E.*

coli e *Pseudomonas aeruginosa*). O trabalho destes pesquisadores corrobora com o presente estudo, apontando para a possibilidade dos prováveis flavonoides presentes nas frações dos extratos FL3 e FL4 serem também responsáveis pela atividade antimicrobiana das frações B3, C4, D4 e E4, observada contra *S. aureus*. Balachandran e colaboradores (2014) extraíram um flavonoide produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. ERINLG-4 que apresentou atividade antitumoral com indução da apoptose de células humanas cancerosas de pulmão, através da liberação de p53 e citocromo C por uma via caspase - dependente. Os resultados obtidos por estes autores intensificam a importância de mais testes serem realizados com os metabólitos produzidos pelas linhagens FL3 e FL4, a fim de encontrar outras atividades biológicas de interesse, além da antimicrobiana já observada.

Além de flavonoides, o anisaldeído sulfúrico também revelou outras classes de compostos: as discretas bandas de coloração azul evidenciadas nas frações C3, D3, A4, E4 e F4, dispostas em fatores retenção (RF) próximos ao limite da corrida da fase móvel, indicam compostos pertencentes à classe dos terpenos; as duas bandas alaranjadas observadas na fração C3, e uma mais fraca na fração D3, sugerem a presença de compostos fenólicos, sendo que esta coloração de bandas em extratos de plantas geralmente é sugestiva da presença de catequinas (vide Figura 7 para comparação com o padrão). A coloração marrom/caramelo vista em manchas que percorrem toda a corrida das frações A3, B3, A4, B4 e C4 também é indicativa de compostos fenólicos, e em extratos vegetais esta coloração indica a presença de compostos da classe dos taninos. Todas estas constatações podem ser observadas na Figura 6 - B.

A classe dos terpenos é composta por vários produtos naturais que podem apresentar atividades biológicas (RABE; CITRON; DICKSCHAT, 2013). Inicialmente conhecidos por serem produzidos essencialmente por plantas, hoje sabe-se que micro-organismos como fungos e bactérias, principalmente actinomicetos, produzem um grande número de terpenos estruturalmente diversos (RABE; CITRON; DICKSCHAT, 2013; YAMADA et al., 2015). Estes compostos podem apresentar atividade antimicrobiana, uma vez que possuem propriedades lipofílicas que possibilitam sua interação com a bicamada fosfolipídica da membrana celular de bactérias (DORMAN; DEANS, 2008). Os terpenos presentes nos extratos FL3 e FL4 podem estar atuando em sinergismo com outras substâncias presentes nestes extratos, aumentando assim, a atividade antimicrobiana observada para ambos extratos brutos. Este sinergismo pode ser proposto devido à banda indicativa de compostos terpênicos não estar necessariamente implicada em atividade bacteriostática: a fração C3, por exemplo, apresentou CIM de 100-200 µg/mL, enquanto a fração D3 (que também possui banda indicativa de terpenos) não apresentou ação antibacteriana nas concentrações testadas. O mesmo ocorreu no

extrato FL4, onde houveram frações com indícios de terpenos que apresentaram ação antimicrobiana evidenciada (A4 e E4), mas também teve uma fração com esta mesma característica cromatográfica que não evidenciou tal ação nas concentrações testadas (fração F4). Caso esta hipótese não seja verdadeira, outras possíveis razões podem explicar os resultados obtidos: existência de terpenos diferentes nas frações citadas, fazendo com que os valores de CIM encontrados tenham sido divergentes; possibilidade das substâncias terpênicas presentes nas frações D3 e F4 estarem em concentrações mais baixas e por isto não evidenciaram atividade contra *S. aureus*, ou estarem sendo suprimidas por razão de antagonismo com outras moléculas presentes nas respectivas frações; e, ainda, existe a chance dos terpenos presentes nos extratos FL3 e FL4 não apresentarem atividade antimicrobiana contra a cepa bacteriana testada, sendo as atividades observadas relacionadas à presença de outros compostos bioativos nas frações.

As catequinas são flavonoides polifenóis que podem ser precursoras de outros flavonoides biologicamente ativos ou de taninos condensados (CHEMLER, 2010; SIMÕES et al., 2007). Encontradas como produtos do metabolismo vegetal, as catequinas já foram produzidas por cepas de *E. coli* modificadas por engenharia metabólica através da expressão de genes de plantas envolvidos com vias sintéticas de flavonoides (CHEMLER, 2007; CHEMLER, 2010; WANG; CHEN; YU, 2011). Trabalhos de Hwang e colaboradores (2003) e de Wang, Chen e Yu (2011), já identificaram enzimas necessárias à via de biossíntese das catequinas em *Streptomyces coelicolor*, no entanto ainda não há relatos da produção natural desta classe de polifenóis por actinomicetos, apesar de outros compostos flavonoides já terem sido identificados como produtos destas bactérias. Os taninos são compostos fenólicos classificados em dois grupos de acordo com sua estrutura química: hidrolisáveis, caracterizados por um poliálcool central (geralmente β -D-glicose) cujas hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico; e condensados, que são polímeros formados por duas ou mais unidades de monômeros flavonoides, como a catequina (SIMÕES et al., 2007). Desta maneira, a produção de catequinas por determinada espécie pode estar envolvida na precursão da produção de taninos, sendo um possível indicador da síntese destas substâncias pela espécie em questão. Além de vegetais, os taninos já foram isolados do metabolismo de fungos dos gêneros *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma* e *Phycomyces* (DEVI; PRABAKARAN; WAHAB, 2012; DHANKHAR et al., 2012; KUMARESAN et al., 2015; SIMÕES et al., 2007). Devido ao teste químico realizado ter sido preliminar e sugestivo, não refinado a ponto de determinar o composto exato, e ao fato de não existirem registros na literatura que denotam a produção das substâncias supracitadas por actinomicetos, mais testes precisam ser realizados para descobrir,

com alto grau de confiabilidade, quais são os compostos destacados na cromatografia. As catequinas e os taninos são conhecidos por serem bioativos, com destaque para a atividade antimicrobiana. Se houver a confirmação de que os compostos sugeridos pela análise de CCD realmente pertencem a estes grupos, será a primeira vez que taninos e catequinas serão reportados como produtos naturais do metabolismo de actinobactérias, no caso, das linhagens FL3 e FL4.

O DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical estável de cor púrpura, que, após ser reduzido por um composto antirradicalar, forma o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (SILVA, 2014). Desta maneira, o DPPH^{*} revelou, em coloração amarelo fluorescente, substâncias com ação antioxidante, que podem ser observadas em manchas das frações D4 e E4 (Figura 6 - C). Estas bandas reveladas estão situadas no mesmo local de retenção das bandas sugestivas de flavonoides, o que é importante de ser destacado pelo fato de vários compostos desta classe serem conhecidos por também possuírem atividade antioxidante (SIMÕES et al., 2007). Komiyama e colaboradores em 1989, identificaram isoflavonoides oriundos do metabolismo da linhagem *Streptomyces* sp. OH-1049, isolada de solo no Japão, que apresentaram atividades antimicrobiana e antioxidante, simultaneamente. Kekuda, Shobha e Onkarappa (2010) encontraram duas linhagens de *Streptomyces* provenientes de solo na Índia, cujos extratos apresentaram atividade antioxidante e anti-helmíntica. Mais um exemplo de atividade antioxidante observada em actinomicetos foi relatado por Karthik, Kumar e Rao (2013), que isolaram uma linhagem de estreptomiceto marinha cujo extrato apresentou tal característica de interesse. Estes relatos na literatura, juntamente com os resultados deste trabalho, apontam para um potencial antioxidante de isolados do filo Actinobacteria que pode ser melhor investigado.

A revelação por ninhidrina resultou em bandas de forte coloração rosa nas frações A3, B3, C4 e D4, e de coloração mais fraca nas frações C3, D3, A4, B4 e E4, todas indicando a presença de aminas primárias (Figura 6 - D). Aminas primárias são encontradas, por vezes, em compostos produzidos por actinobactérias (HUGHES et al., 2009; JUN'ICHI; AKIEA; HIDEO, 1968; KAHAN et al., 1978; SUGIYAMA et al., 2002). A bleomicina A, um antitumoral oriundo do metabolismo de *Streptomyces verticillus* possui aminas primárias em sua estrutura (SUGIYAMA et al., 2002). Hughes e colaboradores (2009) também isolaram compostos anticancerígenos, denominados amosamidas, que possuem aminas primárias características dessas moléculas. Outro composto que possui amina primária em sua estrutura é o antimicrobiano tienamicina, descoberto como produto metabólico de *Streptomyces cattleya* (KAHAN et al., 1978). Diante dos exemplos apresentados, é possível afirmar a comum

produção de metabólitos, contendo aminas primárias em suas estruturas, por linhagens de actinomicetos, especialmente do gênero *Streptomyces*, que podem inclusive apresentar potencial ativo de interesse médico/biotecnológico.

Os perfis cromatográficos observados na Figura 6 fortalecem ainda mais a hipótese de um possível sinergismo entre os compostos presentes no extrato FL4, uma vez que as frações B4 e D4, que obtiveram os melhores valores de CIM (entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram padrão de bandas significativamente distintos (principalmente para as revelações com luz UV-254 nm, anisaldeído sulfúrico e DPPH^{*}) que pode estar relacionado com a presença de substâncias diferentes que atuam em sinergismo quando juntas. Já as frações B3 e C3 apresentaram algumas bandas comuns e outras divergentes, o que pode indicar a presença de um ou mais compostos ativos, que, mesmo separados, não foram suficientemente concentrados a ponto de aumentar a atividade antimicrobiana.

5.7 Quantificação de compostos fenólicos e de atividade antioxidante da fração D4

A fração D4 foi escolhida para realização destes testes devido aos seus resultados positivos para flavonoides e atividade antioxidante nas CCDs reveladas com soluções de anisaldeído sulfúrico e DPPH^{*}, respectivamente.

5.7.1 Determinação quantitativa de compostos fenólicos

O conteúdo total de compostos fenólicos foi dado em uma média das medidas em triplicata cujo resultado foi de 140,71 miligramas de ácido gálico (GAE) por grama da fração D4, com desvio padrão de $\pm 4,0105$. Ao comparar este resultado com os obtidos por outros extratos de actinomicetos na literatura, é possível afirmar que esta fração possui conteúdo fenólico significativo, superior ao encontrado por Karthik, Kumar e Rao (2013), cujo extrato bruto apresentou 22 $\mu\text{g GAE/g}$; por Manasa e colaboradores (2012) que obtiveram quantificação de 59 mg GAE/g do extrato AcOEt; por Gautham e Onkarappa (2013) que quantificaram um total de 1,23 mg GAE/g do extrato n-butanólico; e por Lee e colaboradores (2014) que obtiveram 8,8 $\mu\text{g GAE/g}$ do extrato AcOEt. Todos os extratos obtidos pelos trabalhos supracitados foram oriundos do metabolismo de diferentes linhagens do gênero *Streptomyces*. O conteúdo de fenólicos da fração D4 pode estar estreitamente relacionado com as atividades antioxidantes quantificadas (que serão abordadas adiante), uma vez que vários

compostos desta categoria são conhecidos por possuírem propriedades antirradicais, tendo como exemplo os flavonoides que foram discutidos anteriormente.

5.7.2 Quantificação de atividade antioxidante da fração D4

De acordo com a literatura, a maneira mais eficaz de avaliar e estimar a atividade antioxidante de uma amostra é realizada através da combinação de ensaios que abrangem distintos mecanismos de reações entre compostos antioxidantes e radicais alvo (TAN; LIM, 2015). Sendo assim, a fração D4 foi testada por diferentes metodologias, descritas anteriormente no presente estudo, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividade antioxidante da fração D4 determinada pelos métodos DPPH^{*}, ABTS^{*+*}, ORAC e FRAP, expressa em equivalente de μmol de padrão por grama da fração ($\mu\text{mol/g}$).

Fração	DPPH ^{**}	ABTS ^{*+*}	ORAC [*]	FRAP ^{**}
D4	467,82 \pm 66,2914	1813,27 \pm 34,0286	5581,85 \pm 515,1450	886,27 \pm 34,3495

Fonte: Da autora.

Nota: Os valores representam a média das medidas em triplicata \pm o desvio padrão. * Atividade antioxidante equivalente em Trolox (μmol de Trolox/g da fração). ** Atividade antioxidante equivalente em sulfato ferroso (μmol de Fe^{2+} /g da fração).

O método DPPH^{*} constitui-se num ensaio simples e rápido considerado adequado para triagens de amostras. Sua maior desvantagem constitui-se na utilização de um radical (DPPH^{*}) considerado “não-fisiológico” (que não é encontrado em mamíferos e tem pouca semelhança com seus radicais biológicos homólogos), o que torna este método incapaz de refletir a atividade antioxidante em modelos *in vivo*. Contudo, sua recorrente utilização pode ser justificada com base em sua finalidade de classificação da atividade antioxidante de amostras *in vitro*. (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; TAN; LIM, 2015). A fração D4, na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, apresentou 30,60% de capacidade de redução do DPPH^{*}, atividade considerada moderada de acordo com Gautham e Onkarappa (2013). Estes autores observaram uma atividade antioxidante também moderada de 33,33% para o extrato n-butanólico proveniente do metabolismo da linhagem *Streptomyces fradiae* GOS₁, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Tan e colaboradores (2017) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico oriundo do isolado *Streptomyces* sp. MUM212 e observaram atividade inferior à obtida pelo presente trabalho: 22,03% de capacidade de sequestro do DPPH^{*} na concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Comparando o resultado obtido pela fração D4 com sete variantes de própolis brasileiras (produtos naturais reconhecidos por seu potencial antioxidante), cujos resultados

variaram de 380 a 10 $\mu\text{mol Trolox/g}$, descritos por Tiveron e colaboradores (2016), também foi possível afirmar que a amostra D4 apresentou maior potencial antioxidante (467,82 $\mu\text{mol Trolox/g}$) no ensaio de DPPH \cdot . Contudo, quando o resultado de atividade antioxidante da fração D4 obtido pelo método DPPH \cdot é comparado com o ABTS $^{+\cdot}$, percebe-se que o valor do segundo é maior que o primeiro. Uma explicação provável para este fenômeno é o fato de que o radical ABTS $^{+\cdot}$ é solúvel em água, bem como em solventes orgânicos, permitindo a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. Em contraste, a eliminação de radicais DPPH \cdot é geralmente avaliada em solventes orgânicos, principalmente alcoólicos, o que pode restringir a atividade antioxidante de alguns compostos (GÜLÇİN, 2012; TIVERON et al., 2016).

Devido às várias facilidades operacionais e a alta solubilidade do radical utilizado, o método ABTS $^{+\cdot}$ ainda é muito utilizado em pesquisas laboratoriais. Assim como o método DPPH \cdot , o ABTS $^{+\cdot}$ é considerado um teste simples, mas também incapaz de refletir modelos *in vivo* por utilizar um radical não fisiológico que têm pouca semelhança com suas contrapartes biológicas (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; TAN; LIM, 2015). Jaivel e colaboradores (2014) isolaram três metabólitos do extrato AcOEt de *Streptomyces* sp. TC1 que apresentaram valores de atividade por ABTS $^{+\cdot}$ significativamente mais altos do que o encontrado para a fração D4 (1813,27 $\mu\text{mol Trolox/g}$): aproximadamente 6736,5 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ da amostra 1; 4016,9 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ da amostra 2 e 4093,9 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ da amostra 3. No entanto, quando o resultado da fração D4 é comparado com alguns trabalhos de própolis, é possível perceber que a amostra D4 apresentou atividade considerável por este método, uma vez que a mesma apresentou valor superior aos encontrados para as própolis de origens: argentina em diferentes épocas do ano (valores de 867,85 a 809,58 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ de amostra nos meses de outubro a dezembro e de 570 a 600 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ de amostra nos meses de abril a julho); espanhola (560 a 1430 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ do extrato etanólico de própolis); e também brasileira, produzida pela espécie de abelha nativa *Frieseomelitta varia*, que apresentou variação de 107,88 a 166,22 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ de amostra dependendo da época e local de coleta (BONVEHÍ; GUTIÉRREZ, 2011; HIPÓLITO, 2013; ISLA et al., 2009).

O método FRAP também possui as vantagens de ser rápido e relativamente simples, entretanto mede apenas a capacidade de redução do íon férrico, o que também pode não ser relevante para medir a atividade antioxidante fisiológica *in vivo* (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O uso desta metodologia pode ser justificado por ser adequado para triagens e classificação da atividade antioxidante *in vitro*, assim como os testes de DPPH \cdot e ABTS $^{+\cdot}$ (TAN; LIM, 2015). O trabalho de Jaivel e colaboradores (2014), citado anteriormente, também

realizou ensaios pelo método FRAP com as 3 amostras oriundas do extrato AcOEt de *Streptomyces* sp. TC1, em que as amostras 1, 2 e 3 apresentaram 6031,1 mmol de Fe²⁺/g, 4373,3 mmol de Fe²⁺/g e 3787,8 mmol de Fe²⁺/g, respectivamente. Comparando-se com o resultado obtido pela fração D4 (886,27 μmol de Fe²⁺/g) é possível perceber que a mesma apresentou atividade consideravelmente inferior. No entanto, cabe ressaltar que este método pode apresentar erros dependendo do tempo de incubação da reação, e isto também é válido para a metodologia de ABTS. Os ensaios de FRAP e ABTS⁺⁺ contam com a hipótese de que as reações redox prosseguem tão rapidamente que todas as reações estão completas dentro de 4 e 6 minutos, respectivamente, mas isso nem sempre é verdade. Os resultados do FRAP podem variar muito dependendo da escala de tempo da análise. Fenóis de reação rápida são analisados de forma mais eficaz em curtos períodos de reação, por exemplo 4 minutos. No entanto, alguns polifenóis reagem mais lentamente e exigem tempos de reação mais longos para detecção de sua atividade, por exemplo, 30 minutos. A ordem de reatividade de uma série de antioxidantes pode variar enormemente e até mesmo inverter, dependendo do tempo de análise (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) examinaram o teste FRAP de polifenóis e observaram que a absorção aumentou lentamente para os ácidos cafeico, tânico, ferúlico, ascórbico e para a quercetina, mesmo após várias horas de reação, mostrando que um único ponto de análise da absorção pode não representar uma reação completa. Jaivel e colaboradores (2014) utilizaram um período de 30 minutos de incubação para a reação ocorrer, já o presente estudo utilizou apenas 8 minutos de incubação; este fato pode ter contribuído para o resultado de atividade da fração D4, pelo método FRAP, ter sido expressivamente menor do que os obtidos pelas amostras estudadas por estes pesquisadores.

Ao contrário dos ensaios previamente citados, o grande diferencial do método ORAC está no fato de envolver radicais de relevância fisiológica, que atuam na oxidação lipídica em alimentos e, ainda, que exercem ação constante no organismo humano: os radicais peroxila (PRIOR, 2015; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015). O resultado de atividade da fração D4 para o teste de ORAC (5581,85 ± 515,1450 μmol de Trolox/g de fração) pode ser considerado promissor e superior a vários produtos naturais, como: própolis vermelha (19,779 μmol de Trolox/g de extrato), própolis da abelha sem ferrão *Friseomellita varia* (182,76 μmol de Trolox/g de extrato), própolis chilena (42,73 μmol de Trolox/g de extrato), e sete amostras de própolis orgânicas brasileiras que tiveram variação de 500 a 1950 μmol de Trolox/g de extrato (HIPÓLITO, 2013; MOURÃO, 2013; NINA et al., 2015; TIVERON et al., 2016). Além das própolis citadas, pode-se mencionar outros produtos naturais, tais como mel e tecido vegetal. Silva (2017) avaliou a atividade de oito extratos de méis orgânicos brasileiros e os mesmos

apresentaram valores entre 835,54 e 1785,35 μmol de Trolox/g de extrato; Merlin (2017) analisou a atividade antioxidante de diferentes extratos de folhas da espécie vegetal *Moringa oleifera*, e o extrato AcOEt obteve atividade de 855,30 μmol de Trolox/g de extrato, também inferior ao apresentado pela fração D4.

As divergências entre os resultados de atividade antioxidante obtidos para a fração D4, através das quatro metodologias utilizadas, podem estar relacionadas às diferenças na natureza dos radicais e na forma como são gerados em cada ensaio. O radical utilizado no teste ORAC possui alta reatividade com compostos aromáticos e substâncias que não agem como doadoras de elétrons; em contrapartida, nos testes DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$ e FRAP, a atividade antioxidante é medida justamente pela capacidade da amostra em doar elétrons. Além disto, as discrepâncias observadas entre os resultados também podem ser concernentes com o fato do método ORAC considerar a ação cinética dos antioxidantes, o que não ocorre nos demais ensaios citados.

5.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no ultravioleta - visível (UV-Vis)

Para investigação da composição química da fração D4, uma análise foi realizada em CLAE/UV-Vis, cujos cromatogramas monitorados nos comprimentos de onda de 254, 270 e 300 nm estão dispostos na Figura 8. É possível observar a presença de cinco picos majoritários (I, II, III, IV e V) correspondentes a compostos distintos pertencentes à fração D4, sendo que os picos III, IV e V são visíveis nos comprimentos de 254 e 270 nm. Os picos I e II, entretanto, são mais discretos nos comprimentos de onda de 254 e 270 nm, e majoritários em 300 nm.

Os cinco picos apresentados na Figura 8 foram monitorados e submetidos à avaliação da absorção da luz ultravioleta visível, cujos espectros são mostrados na Figura 9. Conforme mencionado anteriormente, a amostra D4 apresentou conteúdo fenólico significativo (140,71 mg GAE/g) e revelou bandas características de flavonoides, o que pode estar relacionado com os picos que apresentaram absorção da luz UV entre 220 e 350 nm, principalmente, que segundo Mabry, Markham e Thomas (1970) constitui uma faixa de comprimento de onda típica de absorção da luz UV por compostos fenólicos. Os espectros UV da maioria dos flavonoides consistem em dois maiores máximos de absorção, um dos quais ocorre na faixa de 240 - 285 nm e o outro na faixa de 300 - 400 nm (HARBORNE, 1967). Diante do exposto, pode-se inferir que foram detectados picos de absorção típicos para fenólicos totais e flavonoides na fração D4, que podem ser observados no pico I nas absorções de 276 e 304 nm, no pico II nos máximos

de absorção de 228 e 266 nm, no pico III em 284 nm, no pico IV em 256 nm e, por fim, no pico V que apresentou o máximo de absorção da luz UV em 269 nm.

A Instrução Normativa nº3 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que regulamenta produtos de *Apis mellifera*, determina que os picos característicos dos principais tipos de flavonoides ocorrem entre os comprimentos de onda de 200 e 400 nm. Seguindo esta referência, as absorções da luz UV em 205, 207 e 216 nm observadas nos picos I, III e V, respectivamente, podem ser englobadas como sugestões de serem relacionadas com compostos fenólicos, neste caso, específicos da classe dos flavonoides.

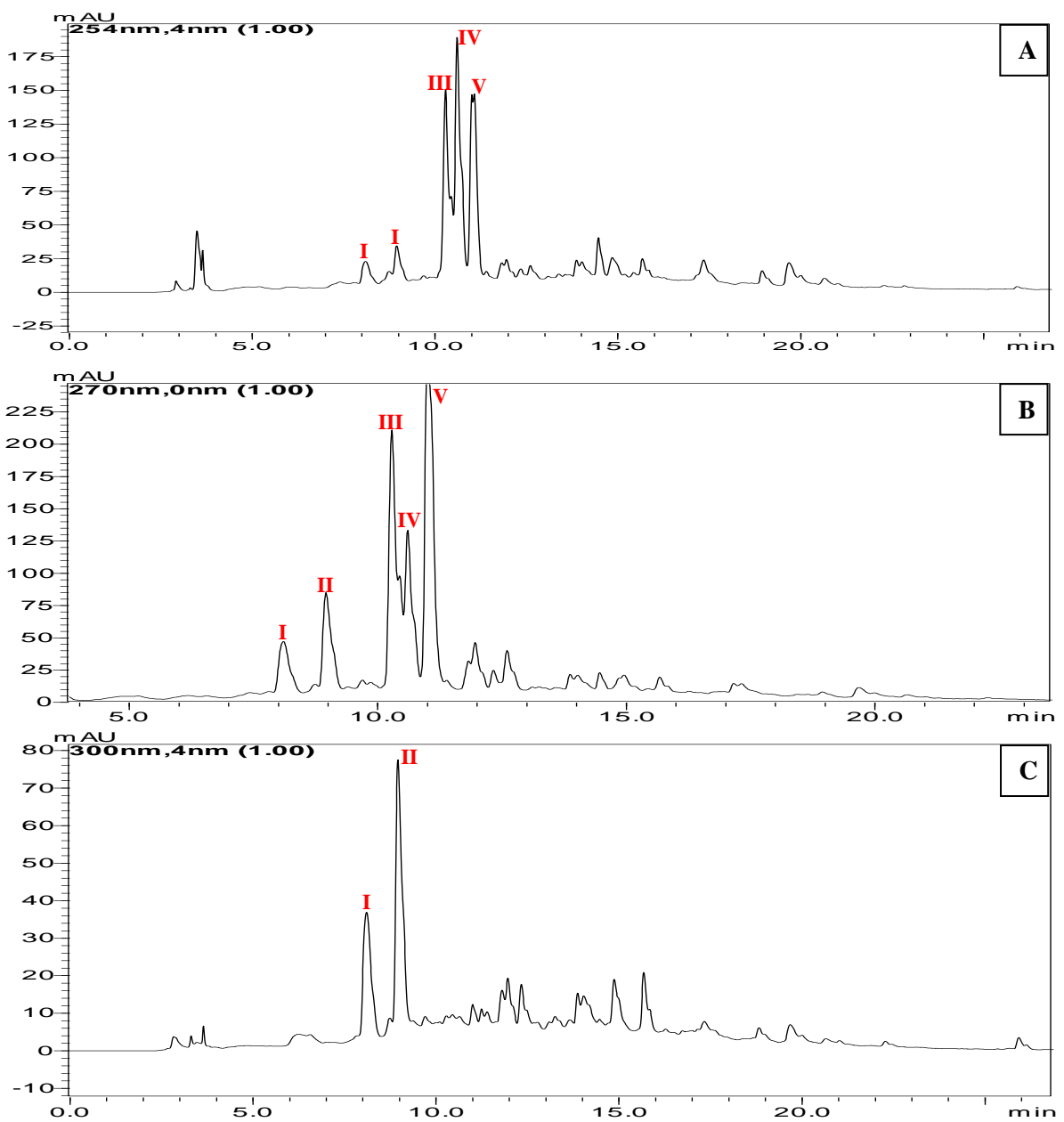


Figura 8 - Cromatogramas da fração D4 obtidos por CLAE, monitorados a 254 (A), 270 (B) e 300 (C) nanômetros.

Fonte: Da autora.

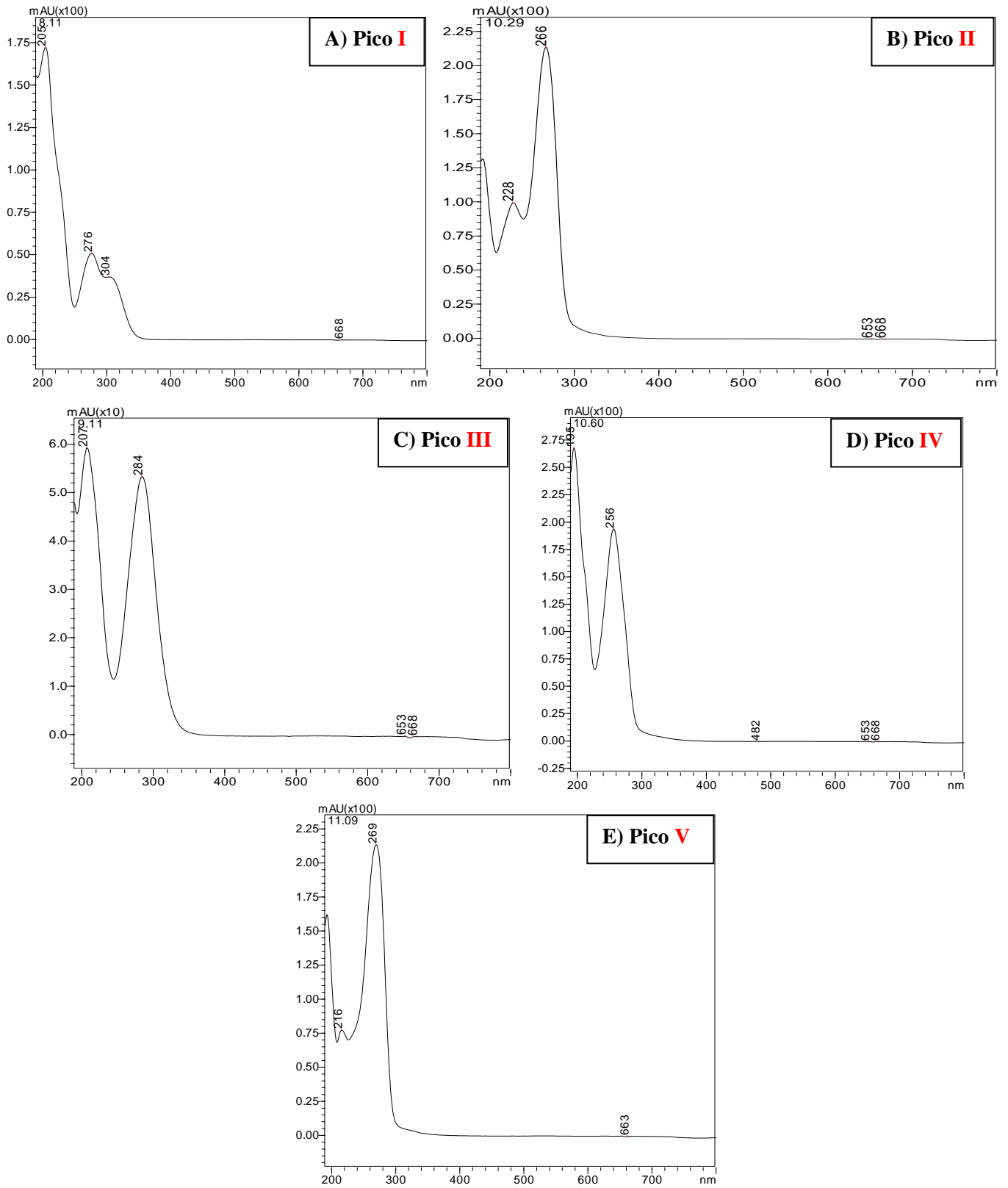


Figura 9 - Espectros de absorção da luz ultravioleta visível dos picos I (A), II (B), III (C), IV (D) e V (E) pertencentes à fração D4.

Fonte: Da autora.

5.9 Teste de *checkerboard*

Este teste foi realizado com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 que apresentaram atividade antimicrobiana nos ensaios de concentração inibitória e também possuíam massa suficiente para realização dos experimentos. O micro-organismo utilizado foi a cepa ATCC 6538 de *S. aureus*, que foi sensível à ação das frações supracitadas nos ensaios de CIM. Os resultados estão expressos na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Resultados do teste de *checkerboard*, em $\mu\text{g/mL}$, realizado com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 em associação com a amoxicilina.

Fração	CIM _F	CIM _A	CIM _{CF}	CIM _{CA}	CIF _F	CIF _A	ICIF*
A3	400		200	0,009		0,230	0,730 parcialmente sinérgico
B3	200		100	0,019		0,487	0,987 parcialmente sinérgico
B4	100	0,039	50	0,039	0,5	1	1,5 indiferente
C4	200		100	0,039		1	1,5 indiferente
D4	100		50	0,009		0,230	0,730 parcialmente sinérgico

Fonte: Da autora.

Nota: CIM_F: concentração inibitória mínima da fração. CIM_A: concentração inibitória mínima da amoxicilina. CIM_{CF}: concentração inibitória mínima da fração combinada com a amoxicilina. CIM_{CA}: concentração inibitória mínima da amoxicilina combinada com a fração. CIF_F: concentração inibitória fracionária da fração. CIF_A: concentração inibitória fracionária da amoxicilina. ICIF*: índice da concentração inibitória fracionária de acordo com a classificação de Timurkaynak e colaboradores (2006).

De acordo com os resultados observados na Tabela 8, foi possível constatar efeito parcialmente sinérgico na associação da amoxicilina com as frações A3, B3 e D4. Na combinação das frações A3 e D4 com o antibiótico, a ação da amoxicilina foi potencializada em aproximadamente 4 vezes, sendo a CIM do antimicrobiano reduzida de 0,039 $\mu\text{g/mL}$ para 0,009 $\mu\text{g/mL}$; já a combinação da fração B3 com a amoxicilina potencializou a ação do antimicrobiano em aproximadamente 2 vezes, em que o valor da concentração inibitória do antibiótico foi reduzida de 0,039 $\mu\text{g/mL}$ para 0,019 $\mu\text{g/mL}$. Estes dados podem ser promissores dentro do cenário de multirresistência aos antimicrobianos, uma vez que a terapia combinatória de fármacos pode evitar ou retardar a resistência microbiana e, ainda, minimizar os efeitos colaterais através da possibilidade da administração de doses menores dos fármacos (SILVEIRA et al., 2006).

Existem exemplos de associações da amoxicilina com outros antimicrobianos que exibiram ação sinérgica e apresentaram e/ou apresentam efeitos positivos, como a clássica combinação clavulanato - amoxicilina, que ainda hoje se constitui numa opção eficiente contra

muitas infecções bacterianas (SILVEIRA et al., 2006). Outro exemplo foi publicado por Gonzalo e Drobniowski em 2013, referente à combinação múltipla de amoxicilina, clavulanato e meropeném que se mostrou ativa, em ensaios *in vitro*, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a vários fármacos. Estes autores sugeriram que esta terapia tripla pode ser útil no tratamento de tuberculoses multirresistentes e, possivelmente, ajudar a reduzir o desenvolvimento de mais resistência. Descourouez e colaboradores (2013) também avaliaram combinações de compostos antimicrobianos, e mostraram que a associação de fosfomicina (um derivado de ácido fosfônico isolado de culturas de espécies de *Streptomyces*) com amoxicilina ou daptomicina, apresentou ação sinérgica contra linhagens de enterococos resistentes à vancomicina (ERV). Estas cepas de enterococos foram isoladas de pacientes com infecção urinária e eram resistentes a vários antimicrobianos além da vancomicina, inclusive à amoxicilina em monoterapia; este fato é interessante de ser destacado, uma vez que a amoxicilina combinada a outro antibiótico, no caso a fosfomicina, foi potente no combate da infecção por estes isolados. Desta maneira, os autores deste trabalho propuseram que as combinações de antimicrobianos supracitadas podem ser opções eficientes para o tratamento de infecções urinárias causadas por ERV.

A amoxicilina pode apresentar efeitos colaterais que surgem do uso racional e/ou irracional deste medicamento a depender da sensibilidade do paciente, em que se pode citar: diarreia, indigestão, sensação de mal-estar, aftas na língua ou na boca, prurido, erupções na pele, hematomas ou sangramentos anormais, pele ou olhos amarelados, urina escura e fezes esbranquiçadas (MEDEIROS; PEREIRA; MEDEIROS, 2011). Diante destes efeitos indesejáveis e de relatos de hipersensibilidade de pacientes a este antibiótico, os resultados de potencialização da ação antimicrobiana da amoxicilina em associação com as frações A3, B3 e D4 podem ser promissores, uma vez que o efeito bacteriostático seria o mesmo, mas com a possibilidade de diminuição dos efeitos colaterais ao paciente em tratamento devido a administração de dosagens do fármaco em menor concentração.

5.10 Avaliação da citotoxicidade das frações

Conforme mencionado na metodologia, este ensaio foi realizado com as mesmas frações do teste de *checkerboard* (A3, B3, B4, C4 e D4). A Tabela 9 mostra os valores de CC_{50} que cada fração apresentou frente às células Vero. Para avaliar se uma fração foi mais seletiva do que citotóxica foi calculado o índice de seletividade (IS), segundo Nguta e colaboradores (2016), cujo valor é resultado da divisão do valor de CC_{50} pelo valor de CIM da amostra - neste

caso, como os resultados de CIM foram apresentados em intervalos, apenas o maior valor do intervalo foi utilizado para o cálculo de IS. Foi considerado que, quando o valor de IS se apresentasse igual ou acima de 1, a fração seria mais efetiva contra o micro-organismo testado (*S. aureus*) do que tóxica às células Vero; por outro lado, quando o valor fosse abaixo de 1, a amostra apresentaria maior citotoxicidade e baixa prioridade para atividade antibacteriana.

Tabela 9 - Resultados do teste de citotoxicidade, em $\mu\text{g/mL}$, realizado com as frações A3, B3, B4, C4 e D4 frente a células Vero.

Fração	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	IS
A3	145	400	0,3625
B3	1132	200	5,6550
B4	193	100	1,9300
C4	306	200	1,5300
D4	246	100	2,4600

Fonte: Da autora.

Nota: CC₅₀: concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular. CIM: concentração inibitória mínima para *S. aureus* ATCC 6538. IS: índice de seletividade = $\text{CC}_{50} \div \text{CIM}$.

Conforme observado na Tabela 9, a fração A3 foi a única que apresentou índice de seletividade menor que 1, sendo considerada, portanto, mais citotóxica do que efetiva para *S. aureus*. Em contrapartida, as frações B3, B4, C4 e D4 foram consideradas mais efetivas na ação antimicrobiana do que tóxicas para as células Vero.

Arasu e colaboradores (2013) isolaram um policetídeo, a partir do metabolismo de um estreptomiceto marinho, que apresentou forte atividade bacteriostática contra *S. aureus* (CIM de $37,5 \mu\text{g/mL}$), mas foi considerado potencialmente citotóxico para as linhagens de células empregadas no estudo. Este composto obteve CC₅₀ de $18 \mu\text{g/mL}$ para células Vero, o que significa que o índice de seletividade deste metabólito foi menor que 1 (0,48) sendo considerado, portanto, mais tóxico para as células do que seletivo para o micro-organismo. Outro trabalho de 2013, de Karthik, Kumar e Rao, também isolou uma linhagem de *Streptomyces* marinha cujo extrato bruto apresentou atividade antioxidante, mas se mostrou altamente tóxico a embriões de *Artemia salina* (crustáceo utilizado em ensaios de toxicidade) com CC₅₀ de $31,17 \mu\text{g/mL}$. Comparando o presente estudo com os trabalhos supracitados, é possível sugerir que as frações B3, B4, C4 e D4 contém compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes mais ativos do que tóxicos, promissores para futuros testes *in vivo*.

5.11 Identificação molecular dos actinomicetos FL3 e FL4

O alinhamento das sequências da região 16S do rRNA das linhagens FL3 e FL4 com as disponíveis nos bancos de dados *GenBank* e *Ribosomal Database Project*, juntamente com a posição filogenética das mesmas (Figura 10), permite sugerir que estes isolados sejam prováveis espécies do gênero *Streptomyces*. Apesar do alinhamento e similaridade com membros do gênero *Kitasatospora*, a filogenia apresentada na Figura 10 agrupa os isolados FL3 e FL4 como sendo mais próximos, filogeneticamente, às espécies relacionadas pertencentes a *Streptomyces*. De acordo com Labeda e colaboradores (2016), os gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora* são pertencentes a família Streptomycetaceae, e possuem espécies morfológicamente semelhantes segundo Takahashi (2017), cujas sequências do gene 16S do rRNA nem sempre fornecem informação suficiente para distinguir estes gêneros (LABEDA et al., 2016). Um dos critérios mais importantes para identificação e distinção do gênero *Kitasatospora* é a composição química da parede celular, que contém os ácidos LL - diaminopimélico e meso - diaminopimélico (TAKAHASHI, 2017). Sendo assim, testes quimiotaconômicos para determinação da composição da parede celular são muito importantes para a identificação e diferenciação dos gêneros supracitados. Outra técnica que tem sido cada vez mais utilizada para identificação de *Streptomyces* e *Kitasatospora* é a tipagem ou análise de sequências baseadas em multilocus - MLST (*Multi locus Sequence Typing*) (LABEDA et al., 2016). Este método consiste num procedimento inequívoco para caracterização de espécies bacterianas através de sequências de fragmentos internos de diferentes genes *house-keeping* (geralmente 5 ou 7 genes). Para cada gene, as diferentes sequências de uma espécie bacteriana são atribuídas como alelos distintos e, para cada isolado, os alelos em cada um dos loci definem o perfil alélico ou a tipagem da sequência (ST). Cada isolado de uma espécie é, portanto, inequivocamente caracterizado por este perfil de vários alelos (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003). Este teste, além de distinguir os gêneros da família Streptomycetaceae, também demonstrou proporcionar uma melhor resolução taxonômica das espécies pertencentes a este clado, bem como a compreensão das relações evolutivas entre elas (LABEDA et al., 2016).

O sequenciamento da região do gene 16S gerou sequências confiáveis de 1480 nucleotídeos para o isolado FL3 e 1489 para FL4. Em termos de semelhança de sequências de bases, FL3 e FL4 formam um subclado separado, e possuem 100% de similaridade entre as sequências geradas, o que pode indicar a possibilidade destas linhagens serem pertencentes a mesma espécie. As espécies mais similares às amostras deste estudo são *S. purpureus* e *S.*

chrysomallus (que juntas formam um subclado na árvore), em que ambas possuem 7 substituições nucleotídicas no domínio 16S em relação aos isolados FL3 e FL4. Estas espécies, para análise do gene 16S, são as mais próximas em similaridade e filogenia das linhagens estudadas no presente trabalho.

De acordo com os dados apresentados e com a discussão baseada na literatura para identificação de espécies da família Streptomycetaceae, outros testes, envolvendo ensaios de quimiotaxonomia e MLST, serão necessários para a identificação completa das linhagens FL3 e FL4, não sendo descartada a possibilidade de pertencerem a uma nova espécie.

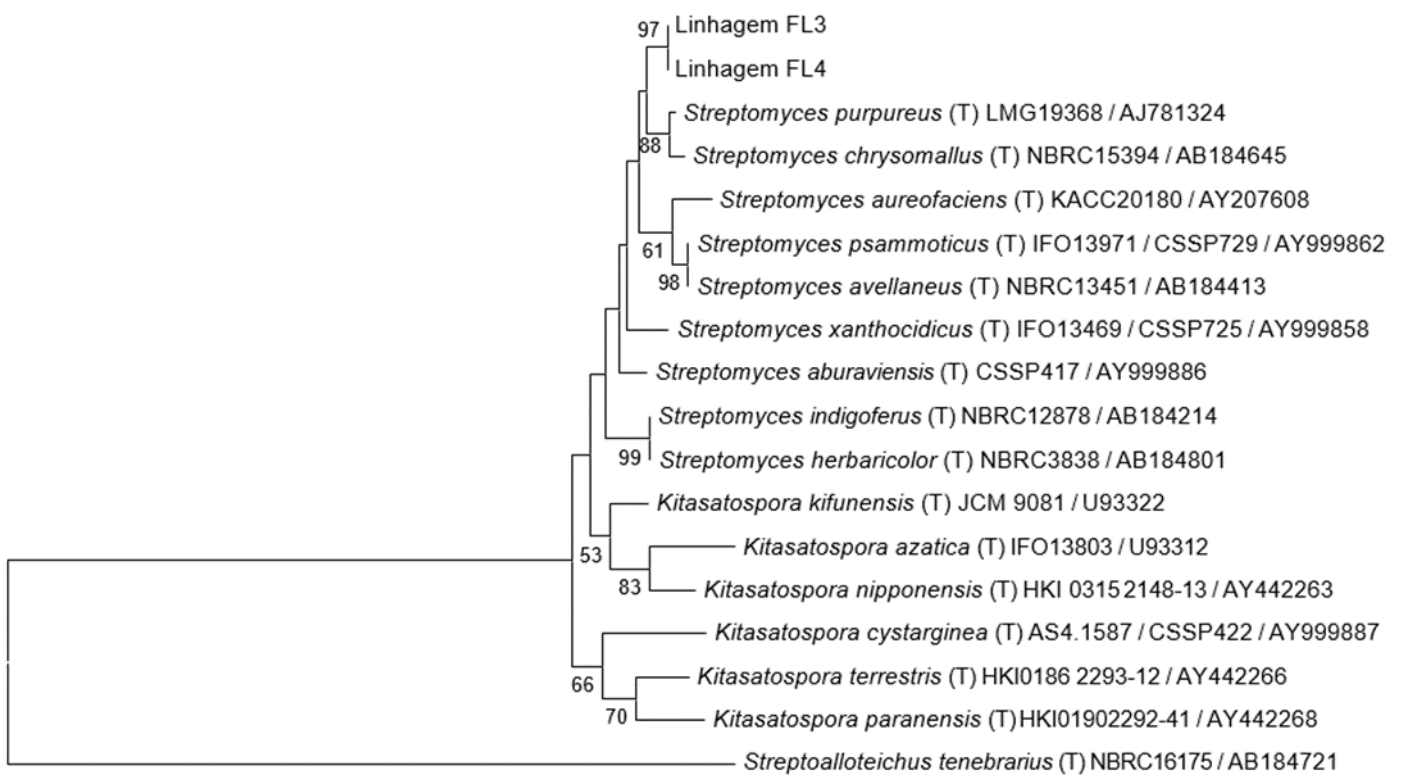


Figura 10 - Árvore de *Neighbor-joining* calculada com base em sequências do gene 16S do rRNA (1372 pb), com aplicação do método de distância evolutiva *Tamura-Nei*, que mostra as relações entre as linhagens FL3 e FL4 e as linhagens Tipo de espécies de *Streptomyces* e *Kitasatospora* filogeneticamente próximas. Valores de *bootstrap* (1000 repetições) de 50% ou mais são mostrados. Barra: 0,01 substituições por posição de nucleotídeo.

Fonte: Da autora.

6 CONCLUSÕES

Dentre os cinco extratos brutos obtidos no presente estudo, aqueles oriundos da fermentação dos actinomicetos FL3 e FL4 se sobressaíram quanto ao potencial antimicrobiano frente à cepa *S. aureus* ATCC 6538.

As curvas de crescimento das linhagens FL3 e FL4 apresentaram duradoura fase estacionária e considerável número de células viáveis durante todo o período de cultivo.

Os ensaios de CIM realizados com as frações dos extratos FL3 e FL4 apontaram para possíveis associações sinérgicas existentes entre compostos presentes nos extratos brutos.

As análises por CCD permitiram sugerir a presença de diferentes compostos pertencentes aos extratos FL3 e FL4: flavonoides, terpenos, substâncias contendo ação antioxidante, ligações duplas conjugadas e/ou aminas primárias.

A fração D4 obteve resultados promissores nos ensaios de quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes. Dentre as várias metodologias empregadas para avaliação da atividade antioxidante, o melhor valor foi obtido pelo método ORAC.

A associação entre as frações A3, B3 e D4 e o antimicrobiano amoxicilina potencializou a ação do fármaco em até quatro vezes.

Na avaliação de citotoxicidade, as frações B3, B4, C4 e D4 foram consideradas mais efetivas na ação antimicrobiana do que tóxicas para as células Vero utilizadas.

O sequenciamento do gene 16S do rRNA permitiu identificar as linhagens FL3 e FL4 como membros da família Streptomycetaceae, filogeneticamente mais próximas a espécies do gênero *Streptomyces*.

REFERÊNCIAS

- ABEGG, M. A. et al. Microbial community structure and chemical composition from dark earth in a native archaeological site of the lower Amazon. **African Journal of Microbiology Research**, Nigéria, v. 10, p. 1548-1554, 2016.
- ABDOLLAHI, M. et al. Oxidative stress in aging. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Egito, v. 2014, p. 1-2, 2014.
- ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- ACKER, R. F.; LECHEVALIER, H. Some nutritional requirements of *Streptomyces griseus* 3570 for growth and candicidin production. **Applied Microbiology**, EUA, v. 2, p. 152-157, 1954.
- ALAM, M. T. et al. Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. **BMC genomics**, Reino Unido, v. 11, n. 1, p. 202, 2010.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European food research and technology**, Alemanha, v. 228, n. 5, p. 813-821, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2006.
- ARASU, M. V. et al. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, França, v. 18, n. 3, p. 147-153, 2008.
- ARASU, M. V. et al. *In vitro* antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, França, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009.
- ARASU, M. V.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. **Chemosphere**, Reino Unido, v. 90, n. 2, p. 479-487, 2013.
- BALACHANDRAN, C. et al. A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspase dependant pathway. **Chemico-Biological Interactions**, Holanda, v. 224, p. 24-35, 2014.
- BALTZ, R. H. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. **Microbe**, EUA, v. 2, p. 125-131, 2007.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, EUA, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BASTOS, R. G. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas de *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae)**. 2016. 180f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, EUA, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites: a personal view. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 58, p. 1-26, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, Holanda, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2005.

BISTER, B. et al. Abyssomicin C: a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosispora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. **Angewandte Chemie International Edition**, Reino Unido, v. 43, p. 2574-2576, 2004.

BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, EUA, v. 88, p. 1387-1395, 2011.

BORMANN, C. et al. Metabolic products of microorganisms. 228. New nikkomycins produced by mutants of *Streptomyces tendae*. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 38, p. 9-16, 1985.

BRANDÃO, G. C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, Holanda, v. 17, n. 12, p. 926-929, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT-Food Science and Technology**, EUA, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução normativa nº 3**, Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, DF, 2001.

CAMP, D.; GARAVELAS, A.; CAMPITELLI, M. Analysis of physicochemical properties for drugs of natural origin. **Journal of Natural Products**, EUA, v. 78, n. 6, p. 1370-1382, 2015.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free radical biology and medicine**, Holanda, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993.

CARVALHO, P. L. N. et al. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities an endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, [S.l.], v. 1, p. 172-176, 2012.

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

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 100, n. s2, p. 14555-14561, 2003.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Microbiology Book Series**, [S.l.], p. 520-529, 2011.

CHEMLER, J. A. et al. Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering. **Metabolic engineering**, EUA, v. 12, n. 2, p. 96-104, 2010.

CHEMLER, J. A. et al. Standardized biosynthesis of flavan-3-ols with effects on pancreatic beta-cell insulin secretion. **Applied Microbiology and biotechnology**, Alemanha, v. 77, n. 4, p. 797-807, 2007.

CHEN, S. C. A.; SORREL, T. C. Antifungal agents. **Medical Journal of Australia**, Austrália, v. 187, n. 7, p. 404, 2007.

CHEN, W. et al. Natural products for the prevention of oxidative stress-related diseases: Mechanisms and strategies. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Egito, v. 2016, 2016.

CHISTÉ, R. C. et al. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Holanda, v. 127, n. 2, p. 419-426, 2011.

CHRISTENSEN, K. et al. Ageing populations: the challenges ahead. **The lancet**, Reino Unido, v. 374, n. 9696, p. 1196-1208, 2009.

CID, W. S. **Diversidade microbiana e atividade enzimática de fungos provenientes de terra preta antropogênica do Baixo Amazonas**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2015.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, Reino Unido, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria**. Approved Standard, 10th ed. M07-A10. EUA, CLSI, v. 35, n. 2, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard, 3rd ed. M27-A3. EUA, CLSI, v. 28, n. 14, 2008.

COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2013.

DANIEL, H-M. et al. Yeast diversity of *Ghanaian cocoa* bean heap fermentations. **FEMS Yeast Research**, Reino Unido, p. 774-783, 2009.

DENEVAN W. M. A bluff model of riverine settlement in prehistoric Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Reino Unido, v. 86, n. 4, p. 654-681, 1996.

DEVI, N. N.; PRABAKARAN, J. J.; WAHAB, F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Holanda, v. 2, n. 3, p. S1280-S1284, 2012.

DEY, T. B. et al. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid-state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Holanda, v. 53, p. 60-74, 2016.

DESCOUROUEZ, J. L. et al. Fosfomicin synergy *in vitro* with amoxicillin, daptomycin, and linezolid against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from renal transplant patients with infected urinary stents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, EUA, v. 57, n. 3, p. 1518-1520, 2013.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, Índia, v. 52, n. 10, p. 794-804, 2004.

DHANKHAR, S. et al. Antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Salvadora oleoides* Decne. **International Journal of Pharmaceutics**, Holanda, v. 4, n. 2, p. 380-385, 2012.

DOAK, B. C. et al. Oral druggable space beyond the rule of 5: insights from drugs and clinical candidates. **Chemistry and Biology**, EUA, v. 21, n. 9, p. 1115-1142, 2014.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 88, p. 308-316, 2008.

DOULL, J. L. et al. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 46, p. 869-871, 1993.

EL-NAGGAR, N. E. A.; EL-EWASY, S. M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. **Scientific Reports**, Reino Unido, v. 7, n. 42149, p. 1-19, 2017.

FAUTH, U. et al. Galbonolides A and B: two non-glycosidic antifungal macrolides. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 39, p. 1760-1764, 1986.

FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A.; KURTZMAN, C. P. *Lachanceameyersii* sp. nov., an ascosporegenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. **Studies in Mycology**, Holanda, v. 50, p. 359-363, 2004.

FERNANDES, M. R. et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, EUA, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, 2016.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Egito, v. 2015, p.1-18, 2015.

FONDI, M. et al. Time-Resolved Transcriptomics and constraint-based modeling identify system-level metabolic features and overexpression targets to increase spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 8, 2017.

GAUTHAM, S. A.; ONKARAPPA, R. *In vitro* antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. **International Journal of Drug Development and Research**, Índia, v. 5, n.1, p. 235-244, 2013.

GLASER, B.; BIRK, J. J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (*terra preta de índio*). **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Reino Unido, v. 82, p. 39-51, 2012.

GLASER, B. et al. The “*terra preta*” phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. **Naturwissenschaften**, Alemanha, v. 88, n.1 p. 37-41, 2001.

GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Alemanha, v. 35, n. 4, p. 219-230, 2002.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of Central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the 21st century? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Reino Unido, v.362, n. 1478, p. 187–196, 2007.

GLASER, B.; ZECH, W.; WOODS, W. I. History, current knowledge and future perspectives of geocological research concerning the origin of Amazonian Anthropogenic, Dark Earths (*terra preta*). In: **Amazonian Dark Earths: Explorations in Space, Time** (eds. B. Glaser and W. I. Woods). Springer, Alemanha, p. 9-18, 2004.

GONZALO, X.; DROBNIIEWSKI, F. Is there a place for β -lactams in the treatment of multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis? Synergy between meropenem and

amoxicillin/clavulanate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Reino Unido, v. 68, n. 2, p. 366-369, 2013.

GRAMAJO, H. C.; TAKANO, E.; BIBB, M. J. Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) is transcriptionally regulated. **Molecular Microbiology**, Reino Unido, v. 7, n. 6, p. 837-845, 1993.

GRIFFITHS, K. et al. Food antioxidants and their anti-inflammatory properties: a potential role in cardiovascular diseases and cancer prevention. **Diseases**, Suíça, v. 4, n. 3, p. 28, 2016.

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

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, Alemanha, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of flavonoids - V.: Luteolin 5-glucoside and its occurrence in the umbelliferae. **Phytochemistry**, Holanda, v. 6, n. 11, p. 1569-1573, 1967.

HAYASHI, K. I.; NOZAKI, H. Kitamycins, new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 52, n. 3, p. 325-328, 1999.

HECKENBERGER, M. J. et al. Amazonia 1492: Pristine forest or cultural parkland. **Science**, EUA, v. 301, n. 5640, p. 1710–1714, 2003.

HIPÓLITO, T. M. M. **Própolis de abelha nativa sem ferrão da espécie *Frieseomelitta varia*: determinação da composição química e atividades biológicas**. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

HOHMANN, C. et al. Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 62, n. 2, p. 99-104, 2009.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOSHINO, Y. et al. Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis*. II. Structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, Japão, v. 57, n. 12, p. 797-802, 2004.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. Preparative pressure liquid chromatography. In: **Preparative Chromatography Techniques: Applications in natural products isolation**, Alemanha, Springer-Verlag, p. 71-80, 1998.

HUANG, J. et al. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. **Genes & Development**, EUA, v. 15, n. 23, p. 3183-3192, 2001.

HUGHES, C. C. et al. The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived *Streptomyces* species. **Angewandte Chemie International Edition**, Reino Unido, v. 48, n. 4, p. 725-727, 2009.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nature Reviews Cancer**, Reino Unido, v. 3, n. 4, p. 276-285, 2003.

HWANG, B. K. et al. Isolation and in vivo and *in vitro* antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 67, n. 8, p. 3739-3745, 2001.

HWANG, E. I. et al. Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 69, n. 5, p. 2699-2706, 2003.

IKEDA, H. et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 21, n. 5, p. 526-531, 2003.

ILIC, S. et al. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in streptomycete isolates. **Microbiology**, Reino Unido, v. 76, n. 4, p. 480-487, 2007.

ISLA, M. I. et al. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. **Journal of Medicinal Food**, EUA, v. 12, n. 6, p. 1334-1342, 2009.

ISONO, K. et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyoxins A and B. **Agricultural and Biological Chemistry**, Japão, v. 29, n. 9, p. 848-854, 1965.

IWASA, T.; YAMAMOTO, H.; SHIBATA, M. Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin - producing organism. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 23, n. 12, p. 595-602, 1970.

JAIVEL, N. et al. Natural occurrence of organofluorine and other constituents from *Streptomyces* sp. TC1. **Journal of Natural Products**, EUA, v. 77, n. 1, p. 2-8, 2014.

JANARDHAN, A. et al. Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. **Biotechnology research international**, [S.l.], v. 2014, 2014.

JUN'ICHI, K.; AKIEA, K.; HIDEO, O. Siolipin A: A new lipoamino acid ester isolated from *Streptomyces sioyaensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism**, [S.l.], v. 152, n. 4, p. 808-810, 1968.

KAHAN, J. S. et al. Thienamycin, a new β -lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 32, n. 1, p. 1-12, 1979.

KÄMPF, N. et al. Classification of Amazonian Dark Earths and ancient anthropic soils. In: **Amazonian Dark Earth: Origin, Properties, Management** (ed. J. Lehmann et al.). Kluwer Academic Publishers, Holanda, p. 77-104, 2003.

- KARTHIK, L.; KUMAR, G.; RAO, K. V. B. Antioxidant activity of newly discovered lineage of marine actinobacteria. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, Holanda, v. 6, n. 4, p. 325-332, 2013.
- KAWAHARA, T. et al. JBIR-94 and JBIR-125, antioxidative phenolic compounds from *Streptomyces* sp. R56-07. **Journal of Natural Products**, EUA, v. 75, n. 1, p. 107-110, 2012.
- KEKUDA, P. T. R.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soil of Agumbe, Karnataka. **Journal of Pharmacy Research**, Índia, v. 3, n. 1, p. 26-29, 2010.
- KERN, D. C. et al. Distribution of Amazonian Dark Earths (*terra preta*) in the Brazilian Amazon. In: **Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management** (ed. J. Lehmann et al.). Kluwer Academic Publishers, Holanda, p. 105-124, 2003.
- KIM, J. S. et al. Bacterial diversity of *terra preta* and pristine forest soil from the western Amazonia. **Soil Biology and Biochemistry**, Reino Unido, v. 39, n.2, p. 684-690, 2007.
- KOMIYAMA, K. et al. Isolation of isoflavonoids possessing antioxidant activity from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 42, n. 9, p. 1344-1349, 1989.
- KUMARESAN, S. et al. Biochemical Constituents and Antioxidant potential of endophytic fungi isolated from the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Chennai, India. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)**, [S.l.], v. 3, n. 8, p. 355, 2015.
- LABEDA, D. P. et al. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Holanda, v. 110, n. 4, p. 563-583, 2016.
- LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. **Annales de l'Institut Pasteur**, Holanda, v. 108, p. 662-673, 1965.
- LEE, D. R. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, Holanda, v. 7, n. 12, p. 962-967, 2014.
- LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Holanda, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.
- LEHMANN, J. *Terra preta* Nova – Where to from here? In: **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroeks Vision** (ed. W. I. Woods). Springer, Alemanha, p. 473–486, 2009.
- LEI, W. et al. Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. **Chinese journal of natural medicines**, China, v. 14, n. 2, p. 117-123, 2016.

LESZEK, J. et al. Inflammatory mechanisms and oxidative stress as key factors responsible for progression of neurodegeneration: role of brain innate immune system. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, Emirados Árabes Unidos, v. 15, n. 3, p. 329-336, 2016.

LETRA, L. **OMS: Resistência a antibióticos é o maior desafio contra doenças infecciosas.** Rádio das Nações Unidas (ONU), Nova York, 2015. Disponível em: <<http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2015/04/oms-resistencia-a-antibioticos-e-o-maior-desafio-contra-doencas-infecciosas/#.Vouu9VIuTJm>>. Acesso em: 01 jul. 2016.

LEWIS, K. New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical Pharmacology**, Holanda, v. 134, p. 87-98, 2016.

LIN, L. et al. The Actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. **Applied Microbiology and biotechnology**, Alemanha, v. 93, n. 3, p. 1185-1195, 2012.

LINKE, H. A.; MECHLINSKI, W.; SCHAFFNER, C. P. Production of amphotericin B-¹⁴C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the amphotericin B-¹⁴C-methyl-ester. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 27, n. 3, p. 155-160, 1974.

LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The lancet Infectious Diseases**, Reino Unido, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2015.

LUDWIG, W. et al. Road map of the phylum Actinobacteria. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology** (eds. Goodfellow, M. et al.), EUA, Springer-Verlag, v. 5, p. 1-28, 2012.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids.** Alemanha, Springer-Verlag, 1970.

MACAGNAN, D. et al. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches' broom and black pod pathogens. **Phytoparasitica**, Israel, v. 3, n. 2, p. 122-132, 2006.

MAHYARUDIN; RUSMANA, I.; LESTARI, Y. Metagenomic of Actinomycetes Based on 16S rRNA and *nifH* Genes in Soil and Roots of Four Indonesian Rice Cultivars Using PCR-DGGE. **Hayati Journal of Biosciences**, Indonésia, v. 22, n. 3, p. 113-121, 2015.

MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Reino Unido, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MAMEDE, A. C. P. B. **Atividade biológica do fungo *Pisolithus microcarpus*.** 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MANASA, M. et al. Antimicrobial and antioxidant potential of *Streptomyces* sp. RAMPP-065 isolated from Kudremukh soil, Karnataka, India. **Science, Technology and Arts Research Journal**, África, v. 1, n. 3, p. 39-44, 2012.

MATSUOKA, M.; YAGISHITA, K.; UMEZAWA, H. Studies on the intermediate metabolism of chloramphenicol production. II. On the carbohydrate metabolism of *Streptomyces venezuelae*. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, Japão, v. 6, n. 2, p. 161-169, 1953.

MCCAFFERTY, D. G. et al. Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, Holanda, v. 3, n. 6, p. 672-680, 1999.

MCCANN, J. M.; WOODS, W. I.; MEYER, D. W. Organic matter and Anthrosols in Amazonia: interpreting the Amerindian legacy. In: **Sustainable Management of Soil Organic Matter** (ed. M. Rees et al.). CABI Publishing, Reino Unido, p. 181-189, 2001.

MCGANN, P. et al. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, EUA, v. 60, n. 7, p. 4420-4421, 2016.

MEDEIROS, R. A.; PEREIRA, V. G.; MEDEIROS, S. M. Vigilância em saúde na enfermagem: o caso das medicações sem prescrição em crianças. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, Brasil, v. 15, n. 2, p. 233-237, 2011.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel. **Darmstadt, Merck**, [S.l.], s.d. v.1, 1980.

MERLIN, N. **Isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Moringa oleífera***. 2017. 102f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

MESTA, S. C. et al. Screening of antimicrobial and antioxidant activities of endophytic actinomycetes isolated from *Rhizophora mucronata* and *Sonneratia caseolaris*. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, [S.l.], v. 8, n. 04, p. 22-28, 2017.

MEYER, S. A.; PAYNE R, W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: **The Yeasts, a Taxonomic Study**. (ed. C. P. Kurtzman, J. W. Fell). Holanda, Elsevier, p. 454-573, 1998.

MOELLERING, R. C. Jr. Introduction: Problems with antimicrobial resistance in Gram-positive cocci. **Reviews of Infectious Diseases**, Reino Unido, v. 26, n. 5, p. 1177-1178, 1998.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín Journal Science Technology**, Tailândia, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOURÃO, L. R. M. B. **Estudo *in vivo* da atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira**. 2013. 93f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MUKHERJEE, I; MITTAL, A. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Alemanha, v.75, n. 5, p. 1034-1040, 2005.

MÜLLER, L. et al. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT-Food Science and Technology**, EUA, v. 43, n. 6, p. 992-999, 2010.

NARENDHRAN, S. et al. Spectroscopic analysis of bioactive compounds from *Streptomyces cavouresis* KU-V39: evaluation of antioxidant and cytotoxicity activity. **International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Índia, v. 6, p. 319-322, 2014.

NEVES, E. G. et al. Historical and socio-cultural origins of Amazonian Dark Earths. In: **Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management** (ed. J. Lehman et al.). Holanda, Kluwer Academic Publishers, p. 29-50, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, EUA, v. 79, n. 3, p. 629-666, 2016.

NGUTA, J. M. et al. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. **Journal of ethnopharmacology**, Holanda, v. 182, p. 10-15, 2016.

NINA, N. et al. Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, central Chile. **Molecules**, Suíça, v. 20, n. 10, p. 18144-18167, 2015.

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

OLIYNYK, M. et al. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. **Nature Biotechnology**, Reino Unido, v. 25, n. 4, p. 447-453, 2007.

O'NEILL, B. et al. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial Ecology**, Alemanha, v. 58, n. 1, p. 23-35, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dados de: **World Health Statistics: Life Expectancy**, 2016. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/view.main.SDG2016LEXREGv?lang=en>>. Acesso em: 06 dez. 2017.

PAUL, N. C.; YU, S. H. Two Species of Endophytic *Cladosporium* in Pine Trees in Korea. **Mycobiology**, Coreia do Sul, v.36, n. 4, p. 211-216, 2008.

PETERSON, D. M. Oat antioxidants. **Journal of cereal science**, EUA, v. 33, n. 2, p. 115-129, 2001.

PRASAD, K. N. Simultaneous activation of Nrf2 and elevation of dietary and endogenous antioxidant chemicals for cancer prevention in humans. **Journal of the American College of Nutrition**, Reino Unido, v. 35, n. 2, p. 175-184, 2016.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, Holanda, v. 18, p. 797-810, 2015.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RABE, P.; CITRON, C. A.; DICKSCHAT, J. S. Volatile terpenes from actinomycetes: a biosynthetic study correlating chemical analyses to genome data. **ChemBioChem**, Reino Unido, v. 14, n. 17, p. 2345-2354, 2013.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **The Williams and Wilkins Co.** EUA, p. 56-57, 1965.

RAVI, L.; RAGUNATHAN, A.; KRISHNAN, K. Antidiabetic and Antioxidant Potential of Gancidin W from *Streptomyces paradoxus* VITALK03. **The Open Bioactive Compounds Journal**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 31-42, 2017.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, Holanda, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

RIGALI, S. et al. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. **Molecular Microbiology**, Reino Unido, v. 61, n. 5, p. 1237-1251, 2006.

RINTALA, H. et al. PCR primers targeting the 16S rRNA gene for the specific detection of streptomycetes. **Molecular and cellular probes**, EUA, v. 15, n. 6, p. 337-347, 2001.

RODRIGUES, K. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RUIVO, M. L. P. et al. Microbial population and biodiversity in Amazonian Dark Earth soils. In: **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision** (ed. W. I. Woods). Springer, Alemanha, p. 351-362, 2009.

SANZ ALONSO, M. A. et al. Epidemiology of invasive fungal infections due to *Aspergillus* spp. and Zygomycetes. **Clinical Microbiology and Infection**, Reino Unido, v. 12, n. s7, p. 2-6, 2006.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, Reino Unido, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SARRÀ, M. et al. A simple structured model for continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* pellets in a fluidized-bed bioreactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, EUA, v. 80, n. 1, p. 39-50, 1999.

SAVI, D. C. et al. Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic actinomycetes isolated from *Vochysia divergens*. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, [S.l.], v. 5, n. 1, 2015.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of functional foods**, Holanda, v. 14, p. 111-125, 2015.

SCHATZ, A.; WAKSMAN, S. A. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, [S.l.], v. 57, n. 2, p. 244-248, 1944.

SHOBHA, K. S.; GAUTHAM, S. A.; ONKARAPPA, R. *In vitro* Antioxidant Activity of a metabolite from *Streptomyces* species KSRO-04. **International Journal of Pharmacy and Medical Sciences**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 07-13, 2012.

SER, H. L. et al. Focused Review: Cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 8, n. 2065, 2017.

SHIH, H. D. et al. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 51, n. 1, p. 95-99, 2003.

SHIN, K. S. et al. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reino Unido, v. 51, n. 6, p. 2167-2170, 2001.

SILVA, A. F. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades biológicas de *Raphanus sativus* var. *oleiferus* Metzg.** 2014. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

SILVA, C. F. **Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro.** 2017. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, Brasil, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIMÕES, C. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC**, Brasil, p. 724, 2007.

SINGH, J. P. et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT-Food Science and Technology**, EUA, v. 65, p. 1025-1030, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, EUA, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMITH, N. J. H. Anthrosols and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Reino Unido, v. 70, n. 4, p. 553–566, 1980.

SMITH, R. M.; PETERSON, W. H.; MCCOY, E. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. **Antibiotics and Chemotherapy**, Suíça, v. 4, p. 962-970, 1954.

SOMBROEK, W. et al. *Terra preta* and *Terra mulata*: pre-Columbian Amazon kitchen middens and agricultural fields, their sustainability and their replication. In: **17th World Congress of Soil Science**, Tailândia, 2002.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana de casca de *Styphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007.

STRUYK, A. P. et al. Pimaricin, a new antifungal antibiotic, In: **Antibiotics annual 1957-1958, Medical Encyclopedia** (eds. Welch, H.; Marti-Ibanez, F.). EUA, p. 878–885, 1958.

SUBRAMANIAN, D. et al. Isolation, Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Marine Actinomycete, *Streptomyces carpaticus* MK-01, against Fish Pathogens. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasil, v. 60, p. 1-9, 2017.

SUGIYAMA, M. et al. The 1.6-Å crystal structure of the copper (II)-bound bleomycin complexed with the bleomycin-binding protein from bleomycin-producing *Streptomyces verticillus*. **Journal of Biological Chemistry**, EUA, v. 277, n. 3, p. 2311-2320, 2002.

TAECHOWISAN, T.; CHAISAEANG, S.; PHUTDHAWONG, W. S. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. **Food and Agricultural Immunology**, Reino Unido, v. 28, n. 6, p. 1330-1346, 2017.

TAECHOWISAN, T. et al. Antibacterial activity of new flavonoids from *Streptomyces* sp. BT01; an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Índia, v. 4, n. 4, p. 8-13, 2014a.

TAECHOWISAN, T. et al. Antibacterial and Anticandidal Activities of New Flavonoids from *Streptomyces* sp. HK17, an Endophyte in *Curcuma longa* Linn. **British Journal of Pharmaceutical Research**, Reino Unido, v. 4, n. 20, p. 2357-2369, 2014b.

TAKAHASHI, Y. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. **The Journal of Antibiotics**, Japão, v. 70, n. 5, p. 506-513, 2017.

TAKEUCHI, S. et al. Blasticidin S, a new antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 11, n. 1, p. 1-5, 1958.

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

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, Holanda, v. 172, p. 814-822, 2015.

TAN, L. T. H. et al. *Streptomyces* sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. **Frontiers in pharmacology**, Suíça, v. 8, 2017.

TEIXEIRA, W. G.; MARTINS, G. C. Soil physical characterization. In: **Amazonian Dark Earths: Origin, Properties, Management** (ed. J. Lehmann et al.). Kluwer Academic Publishers, Holanda, p. 271-286, 2003.

TIMURKAYNAK, F. et al. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Holanda, v. 27, n. 3, p. 224-228, 2006.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, EUA, v. 11, n. 11, p. e0165588, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed, Porto Alegre, 10. ed., p. 934, 2012.

TREJO-ESTRADA, S.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusnuger* YCED-9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 21, n. 1, p. 81-90, 1998.

TSAI, S. M. et al. The microbial world of *terra preta*. In: **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision** (ed. W. I. Woods). Springer, Alemanha, p. 299-308, 2009.

UDWARY, D. W. et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 104, n. 25, p. 10376-10381, 2007.

UMEZAWA, H. et al. A new antibiotic, kasugamycin. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 18, p. 101-103, 1965.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. J. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, Holanda, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Irlanda, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Holanda, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DISSEL, D.; CLAESSEN, D.; VAN WEZEL, G. P. Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. **Advances in Applied Microbiology**, EUA, v. 89, p. 1-45, 2014.

VAN WEZEL, G. P.; MCDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. **Natural Product Reports**, Reino Unido, v. 28, n. 7, p. 1311-1333, 2011.

VAN WEZEL, G. P.; MCKENZIE, N. L.; NODWELL, J. R. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics. **Methods in enzymology**, EUA, v. 458, p. 117-141, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**, Alemanha, Springer, 2ed., p. 359, 1996.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil *Actinomyces*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, EUA, v. 45, n. 2, p. 609-614, 1940.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. **Journal of Bacteriology**, EUA, v. 44, n. 3, p. 373-384, 1942.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **American Society for Microbiology Press**, EUA, 2003(a).

WALSH, C. Where will new antibiotics come from?. **Nature Reviews Microbiology**, Reino Unido, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2003(b).

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and biotechnology**, Alemanha, v. 91, n. 4, p. 949-956, 2011.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, EUA, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITE, R. L. et al. Comparison of Three Different *in vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E-test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, EUA, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

WHO. World Health Organization. **The top 10 causes of death**, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 20 maio 2017.

WOODS, W. I.; DENEVAN, W. M. Amazonian Dark Earths: the first century of reports. In: **Amazonian Dark Earths: Wim Sombroek's Vision** (ed. W. I. Woods et al.), Alemanha, Springer, p. 1-14, 2009.

WOODS, W. I.; MCCANN, J. M. The anthropogenic origin and persistence of Amazonian Dark Earths. In: **The Yearbook of the Conference of Latin Americanist Geographers 25** (ed. C. Caviedes). University of Texas Press, EUA, p. 7-14, 1999.

XIE, Y. et al. Identification of the biosynthetic gene cluster and regulatory cascade for the synergistic antibacterial antibiotics griseoviridin and viridogrisein in *Streptomyces griseoviridis*. **ChemBioChem**, Reino Unido, v. 13, n. 18, p. 2745-2757, 2012.

YAMADA, Y. et al. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, EUA, v. 112, n. 3, p. 857-862, 2015.

YIN, P. et al. Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, China, v. 39, n. 6, p. 609-615, 2008.

ZHANG, Y. L. et al. Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, EUA, v. 61, n. 7, p. 1521-1524, 2013.

ZHONG, K. et al. Isolation and characterization of a novel *Streptomyces* strain Eri11 exhibiting antioxidant activity from the rhizosphere of *Rhizoma curcuma* Longae. **African Journal of Microbiology Research**, Nigéria, v. 5, n. 11, p. 1291-1297, 2011.

ZHOU, H. et al. Metabolites of *Streptomyces* sp., an endophytic actinomycete from *Alpinia oxyphylla*. **Natural product research**, Reino Unido, v. 28, n. 4, p. 265-267, 2014.

ZIMMERMANN, W. Degradation of lignin by bacteria. **Journal of Biotechnology**, Holanda, v. 13, n. 2-3, p. 119-130, 1990.