

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR
ISOLADOS DO GÊNERO *Streptomyces* COM ATIVIDADE CONTRA FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

LUCIANA PASQUALINI MILAGRE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Van der Sand
Co-orientadora: Dr^a. Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre
Março/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS
POR ISOLADOS DO GÊNERO *Streptomyces* COM ATIVIDADE CONTRA
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Luciana Pasqualini Milagre
Bacharela em Biomedicina - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola
e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientadora: Prof^a. Dr. Sueli Van der Sand
Co-orientadora: Prof^a. Dr. Ana Paula Folmer Corrêa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Milagre, Luciana Pasqualini
Caracterização de metabólitos secundários
produzidos por isolados do gênero *Streptomyces* com
atividade contra fungos fitopatogênicos / Luciana
Pasqualini Milagre. -- 2017.

67 f.

Orientadora: Sueli Van der Sand.

Coorientadora: Ana Paula Folmer Correa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Actinomicetos. 2. Fungos fitopatogênicos. 3.
Controle biológico. 4. Purificação. I. Van der Sand,
Sueli, orient. II. Correa, Ana Paula Folmer,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Sueli Van der Sand pelos ensinamentos, confiança e oportunidades nestes sete anos de convívio.

À minha co-orientadora Dr^a Ana Paula Folmer Correa por toda a disponibilidade e ajudas sempre tranquilizantes.

Ao Fabiano Barreto da LANAGRO por todo auxílio nas análises com o HPLC .

Às amigas de todos os dias Ana Elisa Ballarini, Marcela Borba, Mariana Bahlis e Themis Collares Antunes por serem as melhores pessoas e parceiras de laboratório, de comidinhas, de cafés e de risadas.

Às colegas do laboratório Graciane Furini, Jussara Berger e Priscila Monteiro por desabafos e incentivos e por também tornar o ambiente mais divertido.

Ao aluno de iniciação científica e amigo João Paulo Witusk Duarte pela incansável disposição e envolvimento constante neste trabalho.

À minha mãe Marta Milagre e irmão Rodrigo Milagre pela tranquilidade que passam em todos os momentos e meu pai Antônio Milagre pela ajuda e paciência nos infinitos auxílios químicos ao longo do trabalho.

Ao Lucas Valério por toda a calma contagiante e por sempre tornar tudo mais fácil e leve.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR ISOLADOS DO GÊNERO *Streptomyces* COM ATIVIDADE CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Milagre, LP¹

Autora: Luciana Pasqualini Milagre

Orientadora: Prof^a. Dr. Sueli Van der Sand

Co-orientador(a): Prof^a. Dr. Ana Paula Folmer Corrêa

RESUMO

Agrotóxicos vêm sendo cada vez mais utilizados mundialmente para combater pestes e doenças causadas por microrganismos. Destacam-se as doenças causadas por fungos fitopatogênicos, que causam perdas consideráveis nas plantações e, conseqüentemente, um grande impacto econômico. Os fungicidas utilizados para combatê-las trazem diversos problemas tanto para o meio ambiente como para a saúde das pessoas. Uma alternativa viável e de menor impacto é a utilização de microrganismos biocontroladores. O grupo das actinobactérias é conhecido pelas espécies produtoras de metabólitos secundários com amplo espectro de atividade antimicrobiana e, dentre esse grupo, o gênero *Streptomyces* se destaca na produção destes compostos. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar metabólito(s) secundário(s) produzidos por dois isolados de *Streptomyces*, R18(6) e 6(4), com atividade contra fungos fitopatogênicos.. Para tanto, foi realizado teste de dupla-camada e difusão em poço de ágar utilizando o extrato bruto produzido em cultura submersa pelas actinobactérias contra 21 isolados de fungos. O extrato bruto do isolado 6(4) inibiu o crescimento de maior número de fungos e, portanto, foi selecionado para as próximas etapas do trabalho. O processo de purificação deu-se por extração líquido-líquido com acetato de etila. As fases orgânica e aquosa apresentaram atividade: a fase aquosa foi utilizada para cromatografia de gel-filtração (Sephadex G-50) e membranas de ultrafiltração (3 kDa, 10 kDa e 30 kDa), e a fase orgânica submetida à espectroscopia de infravermelho. Foram observados grupamentos característicos de proteína e a análise em HPLC demonstrou a necessidade de adicionais etapas de purificação.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (xx p.)
Março, 2017.

CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITES PRODUCED BY *Streptomyces* ISOLATES WITH ACTIVITY AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Author: Luciana Pasqualini Milagre

Advisor: Prof. Dr. Sueli Van der Sand

Co-Advisor: Prof. Dr. Ana Paula Folmer Correa

ABSTRACT

Over the last decades the use of pesticides to control pests and diseases caused by microorganisms has increased considerably worldwide. Diseases in plantation by phytopathogenic fungi are very important for causing substantial losses in agriculture and vast economic impact. Several damages not only to the environment, but also to human beings arise from the fungicides used to control them. A possible alternative, which causes less impact, is the use of microorganisms to control the fungi causing disease. Actinobacteria are known for being producers of secondary metabolites with broad-spectrum activity, and amongst them the species belonging to the *Streptomyces* genus stand out. The aim of this study was to extract secondary metabolites produced by two *Streptomyces* isolates, R18(6) and 6(4), test them against phytopathogenic fungi and characterize the compound responsible for the antifungal activity on it. Therefore, double-layer assay and agar well diffusion test with the actinobacteria extracts against 21 fungi were performed. Crude extract of the 6(4) isolate was most effective against the greater number of fungi isolates, so it was selected for further analysis. Liquid-liquid extraction using ethyl acetate formed two phases, the aqueous phase was used for gel-filtration chromatography (Sephadex G-50) and ultrafiltration membranes (3 kDa, 10 kDa and 30 kDa), and the organic phase was analyzed by infrared spectroscopy. Protein functional groups were observed and HPLC analysis showed the need for more purification steps.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (xx p.) february, 2017.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Agrotóxicos	4
3.2	Fungos fitopatogênicos	6
3.3	Controle biológico.....	8
3.4	Metabólitos secundários.....	9
3.5	Actinobactérias.....	12
3.6	Gênero <i>Streptomyces</i>	13
3.2	Purificação	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1	Isolados.....	16
4.1.1	Actinobactérias.....	16
4.1.2	Fungos	16
4.2	Produção dos inóculos fúngicos.....	16
4.3	Ensaio da dupla-camada.....	16
4.4	Produção de extrato bruto.....	17
4.5	Ensaio para avaliar atividade antifúngica dos extratos brutos e purificados.....	17
4.6	Avaliação da atividade de metabólitos secundários intracelulares	18
4.7	Precipitação com sulfato de amônio.....	18
4.8	Purificação do extrato centrifugado	18
4.8.1	Extração líquido-líquido.....	18
4.8.2	Cromatografia em coluna de gel-filtração.....	19
4.8.3	Membrana 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa	19
4.9	Espectroscopia.....	19
4.10	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	20
4.11	Extração de DNA fúngico	20
4.12	Sequenciamento dos isolados	21

5.	RESULTADOS	23
5.1	Isolados.....	22
5.1.1	Actinobactérias.....	22
5.1.2	Fungos.....	22
5.2	Ensaio da dupla-camada.....	24
5.3	Ensaio de difusão em poço de ágar.....	26
5.3.1	Extrato bruto.....	26
5.3.2	Metabólitos intracelulares.....	28
5.3.3	Precipitação com sulfato de amônio.....	28
5.3.4	Extração líquido-líquido.....	29
5.3.5	Cromatografia em coluna de gel-filtração.....	29
5.3.6	Membrana 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa.....	30
5.4	Espectroscopia de infravermelho.....	31
5.5	HPLC.....	32
5.6	MALDI-TOF.....	36
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÃO	45
8.	REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Benefícios dos biopesticidas.	6
Tabela 2: Resultado do sequenciamento dos isolados fúngicos.	23
Tabela 3: Médias dos tamanhos dos halos, colônias e índice de antibiose (IA) dos isolados R18(6) e 6(4) contra os 21 isolados fúngicos testados.	25
Tabela 4: Média dos tamanhos dos halos produzidos pelos extratos brutos dos isolados R18(6) e 6(4) no ensaio de difusão em poço de ágar após crescimento em cultivo submerso.	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribuição dos compostos bioativos descobertos e suas origens.	11
Figura 2. Ensaio da dupla-camada. Nas fotos A, B, C e D observa-se a formação de halo pelo isolado R18(6) contra os isolados <i>B. sorokiniana</i> , <i>B. sorokiniana</i> , <i>A. radicina</i> e <i>P. oryzae</i> , respectivamente. Fotos E e F com ambos R18(6) e 6(4) apresentando formação de halos nos isolados de <i>Penicillium</i> sp. e <i>Paecilomyces</i> sp., respectivamente.	24
Figura 3. Ensaio de difusão em poços de ágar. Nas fotos A, B, C, D e E observamos os halos formados apenas pelo 6(4) contra os isolados fúngicos <i>Paecilomyces</i> sp., <i>P. oryzae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>A. alternata</i> e <i>A. alternata</i> , respectivamente. A foto E representa o isolado <i>A. niger</i> sem formar halo contra as actinobactérias.	26
Figura 4. Ensaio de difusão em poço de ágar. Fotos A e B mostram ausência de formação de halo com o pellet rompido das actinobactérias contra os isolados <i>F. verticillioides</i> e <i>B. sorokiniana</i> , respectivamente. Fotos C e D também sem formação de halo nas diferentes faixas de precipitação utilizando-se o 6(4) contra o isolado fúngico <i>F. verticillioides</i> .	28
Figura 5. Formação de halo de inibição contra o isolado fitopatogênico <i>F. verticillioides</i> utilizando-se a fase aquosa e fase orgânica da actinobactéria 6(4) após extração com acetado de etila.	29
Figura 6. A) Membrana 3 kDa com atividade na porção retida; B) membrana 10 kDa com atividade na porção retida; C) membrana 30 kDa com atividade também no retido.	30
Figura 7. Gráfico representando o resultado da espectroscopia de infravermelho. Os eixos representam a transmitância em função dos comprimentos de onda analisados.	31
Figura 8. Curva HPLC para amostra do extrato bruto somente centrifugado.	33
Figura 9. Curva HPLC com amostra da fase orgânica.	34

Figura 10. Curva HPLC com amostra resultante do pool de alíquotas após passagem pela coluna de Sephadex G-50.	34
Figura 11. Curva HPLC com amostra da porção retida na membrana 3 kDa com atividade antifúngica.	35
Figura 12. Curva HPLC com amostra da porção filtrada da membrana 3 kDa e sem atividade antifúngica.	35
Figura 13. Análise MALDI-TOF. Os valores destacados estão em kDa.	36

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização indiscriminada de agrotóxicos em todo mundo tem trazido diversos problemas principalmente ao meio ambiente, mas também à saúde das pessoas e dos animais. Milhares de compostos químicos industriais como fungicidas e inseticidas acabam atingindo ambientes aquáticos causando graves problemas ao contaminá-los. Além da poluição ambiental, as ameaças toxicológicas à saúde humana são muito importantes. No entanto, esta prática acaba sendo a solução mais eficiente às inúmeras pestes e doenças, causadas tanto por parasitas quanto por microrganismos, que acarretam perdas nas plantações dos mais diversos cultivos e, conseqüentemente, um grande impacto econômico.

Dentre os microrganismos causadores de doenças em plantas, os fungos aparecem com bastante relevância onde perdas de até 50% dos cultivos são observados em países em desenvolvimento. A mancha marrom causada pelo fitopatógeno *Bipolaris sorokiana* em plantações de trigo e de cevada ocasiona perdas expressivas. O gênero *Fusarium* é responsável por grandes perdas em plantações de milho, sendo o patógeno que causa o maior impacto econômico na agricultura mundial.

Tendo em vista esses problemas, o controle biológico acaba surgindo como alternativa. Com a sua utilização, evita-se o impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado de pesticidas e ao mesmo tempo possibilita-se controlar as doenças causadas por fitopatógenos. O biocontrole normalmente utiliza microrganismos com ação mais específica ao patógeno em questão, gerando menos resíduos prejudiciais ao meio ambiente. Dentre os microrganismos com potencial para produção de compostos com atividade antimicrobiana se destacam as actinobactérias.

O grupo das actinobactérias abrange bactérias Gram-positivas, com alto conteúdo G+C em seu DNA, muito comumente encontradas em ambiente terrestre e com alta taxa de produção de metabólitos secundários de grande importância para a indústria de produtos farmacêuticos, agrícolas, entre outras. Esse grupo de microrganismos é responsável por 70% de todos os compostos produzidos até o momento utilizados na clínica, humana e veterinária, e 60% daqueles utilizados na agricultura, o que demonstra seu grande potencial. Dentre as actinobactérias, em

torno de 75% dos metabólitos secundários com atividade é produzido por espécies do gênero *Streptomyces*. Este gênero é bastante importante para os ambientes terrestres especialmente por participar do ciclo do carbono, além de relevante industrialmente pela produção de compostos bioativos.

Considerando esta problemática, o presente trabalho se propõe, primeiramente, a testar extratos produzidos por dois isolados do gênero *Streptomyces* contra diferentes fungos fitopatogênicos e, após, caracterizar eventuais moléculas presentes no extrato que sejam responsáveis por esta atividade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Extrair metabólitos secundários produzidos por isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces* para caracterização da(s) molécula(s) presente(s) com atividade biológica contra fungos fitopatogênicos.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Testar diferentes isolados fúngicos fitopatogênicos contra os isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) através do ensaio da dupla-camada;
- 2.2.2 Obtenção de extrato bruto dos isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4);
- 2.2.3 Purificar o extrato através de extração com solvente;
- 2.2.4 Avaliar a atividade do extrato bruto e purificado contra os isolados de fungos fitopatogênicos;
- 2.2.5 Purificar o extrato através de cromatografia de gel-filtração;
- 2.2.6 Avaliar ligações químicas presentes no extrato purificado pela técnica de espectroscopia de infravermelho;
- 2.2.7 Realizar técnica de HPLC;
- 2.2.8 Realizar técnica de espectroscopia por MALDI-TOF.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos são utilizados há mais de meio século no Brasil, mas passaram a ser empregados em maior quantidade na agricultura após os anos 1960. Estes produtos químicos biocidas podem causar danos à saúde das pessoas, dos animais e do meio ambiente, mas são amplamente utilizados para combater pragas e doenças das plantas (CEVS, 2005).

Durante o século 20, com o desenvolvimento excessivo da indústria petroquímica, foi alcançada a produção anual de 500 milhões de toneladas de derivados químicos distribuídos em diferentes produtos. Destes, aproximadamente 5 milhões de toneladas são pesticidas. Um dos principais problemas ambientais enfrentados nos dias de hoje é justamente a contaminação do meio ambiente, principalmente da água, por milhares de compostos químicos industriais, especialmente pesticidas, como herbicidas, fungicidas e inseticidas. Outras preocupações vão além da poluição ambiental, como a possibilidade de efeitos toxicológicos causados tanto na vida aquática quanto na saúde humana, mesmo quando da utilização destes químicos em baixas concentrações (Nasri *et al.*, 2016).

O processo de produção agrícola vem sofrendo diversas mudanças ao longo do tempo no sentido, principalmente, de aumentar a produtividade e controlar doenças que ocasionam perdas econômicas. Essas mudanças acarretam a inserção de novas tecnologias que envolvem também uma extensiva utilização de agrotóxicos (Ministério do Meio Ambiente). Nos últimos 40 anos, a utilização de pesticidas em plantações aumentou três vezes e, se as práticas de agricultura envolvendo agrotóxicos continuarem inalteradas, a previsão é de que seu uso seja triplicado até 2050. Com a intensificação da agricultura, os solos acabam perdendo matéria orgânica e se tornando menos férteis, o que acaba acarretando uma maior utilização de agrotóxicos assim como de fertilizantes sintéticos (Fox *et al.*, 2007).

Por outro lado, as plantações passam por diversos problemas como pestes e doenças causadas por fungos, ervas daninhas e insetos que acabam ocasionando perdas econômicas consideráveis. Os pesticidas aparecem como uma solução e de fato resolvem este problema sendo efetivos e rápidos na redução das

perdas por doenças em plantas, mas a partir da sua aplicação surgem outros problemas (Yoon *et al.*, 2013). O desenvolvimento de resistência por parte dos fungos é um dos problemas e seu uso ao longo de décadas acaba perturbando os sistemas biológicos naturais (Yoon *et al.*, 2013). A poluição da água subterrânea e a degradação dos solos acabam resultando em uma terra com deficiências nutricionais e improdutivas, o que traz outros problemas importantes para a agricultura (Gupta & Dikshit, 2010).

Em resposta a estas dificuldades expressivas surgem propostas de alternativas: i) devido a sua alta toxicidade e baixa taxa de biodegradação, a maioria dos resíduos de agrotóxicos necessita ser tratado e removido após a utilização, o que requer desenvolvimento de métodos próprios para alcançar este objetivo. Segundo Wang *et al.* (2016), um método bastante promissor é a utilização de semicondutores para realizar fotocatalise destes resíduos; ii) outra abordagem seria o desenvolvimento de cultivares resistentes aos patógenos, ainda que a utilização de transgênicos seja controversa e apresente falhas por falta de expressão de resistência no caso de alguns cultivares (Manhas and Kaur, 2016). De acordo com Dzhavakhiya *et al.* (2012), aplicação dos fungicidas juntamente com alguns ácidos fenólicos ou benzo-análogos com alvo no sistema de resposta ao estresse oxidativo celular, também é utilizada para aumentar a atividade antifúngica destes fungicidas.

A alternativa ecologicamente mais favorável que surge é a utilização de biopesticidas ou pesticidas biológicos, sendo os microrganismos os mais comumente utilizados nesta abordagem. Esses microrganismos são patogênicos para a peste a ser combatida e, além de acabarem causando menos danos à população e ao meio ambiente, afetam apenas a peste de interesse ou algumas vezes mais de um organismo alvo (Gupta & Dikshit, 2010; Al-Samarrai *et al.*, 2012). Os biopesticidas, além de microrganismos, também podem ser substâncias produzidas por plantas ou pesticidas bioquímicos, compostos que ocorrem naturalmente e controlam pestes por mecanismos não-tóxicos. Os biopesticidas apresentam diversos benefícios como citados por Gupta & Dikshit (2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Benefícios dos biopesticidas (Gupta & Dikshit, 2010).

Fatores	Benefícios dos Biopesticidas
Custo	Mais caro, mas número de aplicações reduzido
Persistência e efeito residual	Baixa e maior parte biodegradável
Ressurgimento da peste	Menor frequência
Resistência	Menor propensão
Efeitos na flora benéfica	Menores efeitos
Especificidade de alvo	Mais específico para o hospedeiro
Natureza do controle	Preventivo
Vida de prateleira	Menor

3.2 Fungos fitopatogênicos

As plantações estão sempre ameaçadas por uma variedade de microrganismos patogênicos e doenças causadas por bactérias, fungos e vírus responsáveis por perdas na produção agrícola mundial (Choi *et al.*, 2008). Doenças causadas por fungos representam uma preocupação de importância mundial para a agricultura uma vez que as perdas causadas por estes microrganismos podem variar de 25% a 50% nos países ocidentais e países em desenvolvimento, respectivamente (Shrivastava *et al.*, 2015). O controle destas doenças se torna imprescindível na provisão de alimentos para uma população em crescimento (Shrivastava *et al.*, 2015).

Os fungos apresentam um papel bastante importante em diversos ambientes, entre eles o estabelecimento de relações tanto mutualísticas quanto patogênicas com plantas hospedeiras. Estes microrganismos são capazes de secretar proteínas chamadas efetoras enquanto estão infectando um hospedeiro. Essas moléculas possuem ações sob o sistema imune e fisiológico do organismo infectado, fazendo com que os fungos consigam, por exemplo, suprimir as defesas das plantas ou até induzir a morte de células vegetais (Xu *et al.*, 2016).

O gênero *Alternaria* inclui espécies tanto saprófitas quanto patogênicas, sendo um dos fungos mais comumente associado às doenças alérgicas e respiratórias crônicas, como asma e sinusite crônica. Além disso, também fazem

parte do gênero diversas espécies patogênicas de plantas. Doenças causadas por *Alternaria* são comuns em uma variedade de culturas, matando as células hospedeiras e se desenvolvendo a partir do conteúdo das células mortas. Para isto, produzem diversos fatores patogênicos como compostos extracelulares e enzimas que degradam a parede celular para penetrar na célula e consumir os nutrientes (Guillemette *et al.*, 2014).

De acordo com Basler *et al.* (2016), um dos cultivos de maior relevância mundial é o milho, alcançando áreas de milhões de hectares plantados na Europa e sendo apenas menos frequente do que a soja no Brasil. Seus maiores mercados são o consumo humano, alimentação de animais e bioenergia. Na União Europeia, o gênero *Fusarium* é considerado o patógeno de maior impacto econômico nestas plantações causando podridão da espiga, do colmo e das raízes. Este gênero possui espécies também patogênicas para humanos sendo causadoras de micoses, infecções oculares e infecções em pacientes imunodeprimidos (Campos-Macias *et al.*, 2013; Czembor *et al.*, 2015).

Além do milho, o *Fusarium* também infecta arroz, cana de açúcar, centeio, trigo, aspargo e sorgo. A espécie *F. verticillioides* chega a causar perdas econômicas de até 50% dependendo do cultivo que está infectando (Chen *et al.*, 2012). Segundo Chen *et al.* (2012), sua patogenicidade está relacionada com a produção de uma grande quantidade de um hormônio de crescimento da planta, a giberelina, que causa atrofia delas. Este hormônio também é produzido e comercializado como um agroquímico. Destaca-se a infecção em cultivos de arroz causando a doença “Bakanae”, caracterizada pela aparição de plantas altas e finas que acabam crescendo mais do que as plantas que não foram infectadas. Além disso, infecta as sementes causando apodrecimento e manchas, o que reduz sua germinação. Pode, também, trazer problemas para saúde humana e animal pela produção de toxinas que não são facilmente retiradas dos grãos caso sejam consumidas (Chen *et al.*, 2012).

No caso de plantações de trigo e cevada, se destaca o agente *Bipolaris sorokiniana*. O fitopatógeno em questão é causador da podridão das raízes, mancha marrom, ponto preto nas sementes e morte de plântulas, representando perdas bastante significativas na produção (Mishra *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2016; Mcdonald *et al.*, 2017). Segundo Kumar *et al.* (2002) este fitopatógeno passa por duas fases principais de crescimento, começando pela penetração da cutícula e

parede celular da planta, com o desenvolvimento de hifas no tecido invadido, e depois pela invasão das hifas no mesófilo que ocasiona morte celular e o colapso da célula hospedeira. No processo de infecção, utiliza toxinas para enfraquecer ou matar as células vegetais e enzimas hidrolíticas que degradam celulose.

As estratégias utilizadas para controlar o crescimento de *B. sorokiniana* no trigo e cevada incluem criação de cultivares resistentes, controle químico, manejo do solo e resíduo e rotação de culturas, mas no geral estas abordagens ainda se mostram insuficientes (Kumar *et al.*, 2002).

O fungo *Macrophomina phaseolina* é outro patógeno necrotrófico causador da podridão do carvão em mais de 500 espécies diferentes de plantas, incluindo cultivos como soja, sorgo, milho, alfafa e algodão. A doença já foi descrita em áreas tropicais e subtropicais e pode ser controlada através da aplicação de brometo de metila no solo, embora este método seja cada vez mais caro e bastante prejudicial ao meio ambiente (Sharivastava *et al.*, 2015).

3.3 Controle biológico

A utilização indiscriminada de antibióticos para tratar doenças infecciosas, assim como seu uso amplamente difundido na agricultura e indústria alimentícia, tem causado um aumento na resistência de patógenos que se apresentam como um problema de saúde pública global pelo aumento de taxas de mortalidade e custos nos cuidados de saúde (Al-Amoudi *et al.*, 2016). Os problemas de resistência a drogas impulsiona cada vez mais a busca de novos compostos antimicrobianos por todo o mundo. Para que se possa combater organismos resistentes, é essencial que se introduzam compostos oriundos de novas fontes (Arasu *et al.*, 2009).

O controle biológico começou a aparecer em estudos no Brasil na década de 50, mas apenas em 1987 o primeiro produto comercial foi liberado. *Trichoderma viride* foi disponibilizado para o controle de *Phytophthora cactorum* em macieiras. Atualmente há uma diversidade crescente de produtos biológicos disponíveis no mercado brasileiro para serem utilizados com este fim. No entanto, as iniciativas governamentais para o incentivo ao uso destes compostos e práticas ecologicamente sustentáveis ainda são restritas (Bettiol e Morandi, 2009). Métodos alternativos de controle fitossanitário ainda passam por dificuldades relacionadas à sua regulamentação e comercialização, mas lentamente vêm surgindo alguns

avanços na legislação e organizações como a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico) que aparecem para impulsionar cada vez mais este mercado (Bettioli e Morandi, 2009).

Os fungicidas, utilizados na agricultura, são responsáveis por inúmeros problemas relacionados ao meio ambiente, toxicidade aos humanos, surgimento de cepas de patógenos resistentes e efeitos adversos em populações de plantas que não são o alvo do fungicida. Neste cenário, surge a demanda por novos métodos para controle de doenças, dentre eles o controle biológico que aparece como uma opção viável ao uso de químicos sintéticos em prol de uma agricultura mais sustentável. A maioria dos agentes biocontroladores são altamente adaptáveis ao ambiente no qual são utilizados e interagem com os organismos de maneira complexa, envolvendo inúmeros mecanismos de supressão de doença (Manhas & Kaur, 2016). Acredita-se que os agentes biocontroladores sejam uma opção com maior durabilidade do que a utilização de compostos sintéticos e prejudiciais ao meio ambiente (Manhas & Kaur, 2016).

3.4 Metabólitos secundários

A produção de metabólitos secundários cumpre muitas funções que beneficiam o organismo que os produz. Agem tanto como agentes químicos na destruição de outros microrganismos e no aumento da sobrevivência do organismo produtor no ambiente, quanto no transporte de metais ou como efetores no processo de diferenciação de bactérias produtoras de esporos (Bervanakis, 2008).

Diferentemente dos conhecidos processos anabólicos e catabólicos do metabolismo primário, que são essenciais para o crescimento das células e conservados em diferentes espécies, o metabolismo secundário produz moléculas de adaptação que evoluíram para funções diferentes daquelas do metabolismo primário. Cada espécie ou gênero produz compostos específicos em seu metabolismo secundários servindo estes tanto para funções fisiológicas quanto predatórias ou de interação entre microrganismos (O'Brien and Wright, 2011).

Desde a sua descoberta nos anos 1920, metabólitos secundários apresentam um importante impacto na saúde humana, na nutrição e na sociedade como um todo. Já foram utilizados para inúmeras aplicações como antiparasitários, antimalária, imunossuppressores, anticâncer e antimicrobianos (Purves *et al.*, 2016).

Com o aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos disponíveis, há uma maior motivação na busca de compostos bioativos desconhecidos (Purves *et al.*, 2016). Nos anos 1990, observou-se uma diminuição na pesquisa de novos metabólitos, pois muitas indústrias farmacêuticas fecharam seu setor de produtos naturais devido às dificuldades de se encontrar novas fontes produtoras de compostos ainda não conhecidos. Juntamente com isto, começa a se observar um aumento do acesso às tecnologias de sequenciamento, o que facilita a identificação e o estudo com genes produtores de compostos bioativos, fazendo com que trabalhos relacionados a produtos biológicos voltem a ser recorrentes (O'Brien and Wright, 2011).

Bactérias do solo e fungos têm sido muito importantes na descoberta de novos antibióticos, sendo que o número de espécies de microrganismos no solo varia diretamente com as condições ambientais como a disponibilidade de nutrientes, textura do solo e tipo de vegetação (Arasu *et al.*, 2009).

A maioria das moléculas orgânicas que são produzidas por microrganismos são metabólitos secundários e estes apresentam diferentes estruturas químicas, assim como atividades biológicas variadas (Bervanakis, 2008). Estes compostos podem ser peptídeos, policetídeos, carboidratos, lipídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides, etc (O'Brien and Wright, 2011).

Como podemos observar esquematizado na Figura 1, mais de um milhão de compostos naturais já foram descritos e descobertos através de métodos genéticos e *screening*, dos quais 500.000-600.000 são produzidos por plantas. Destes, 200.000-250.000 apresentam atividade biológica e 50.000 são de origem microbiana, sendo 22.000 compostos com atividade antimicrobiana. Daqueles de origem microbiana e considerados agentes biocontroladores, 10.100 (45%) são produtos da fermentação de actinobactérias; 3.800 (17%) são metabólitos de outros grupos bacterianos; e 8.600 (38%) são de origem fúngica. Dentre as actinobactérias, 7.600 (75%) são produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (Solecka *et al.*, 2012).

Cada vez mais, encontram-se desafios na busca de novos compostos com atividade antimicrobiana, principalmente por não ser infrequente a redescoberta de antibióticos já existentes (Higginbotham & Murphy, 2010). Mesmo assim, a busca contínua de metabólitos secundários produzidos por microrganismos ainda representa uma importante fonte de compostos com potente atividade biológica

contra diversos microrganismos patogênicos (Arasu *et al.*, 2009).

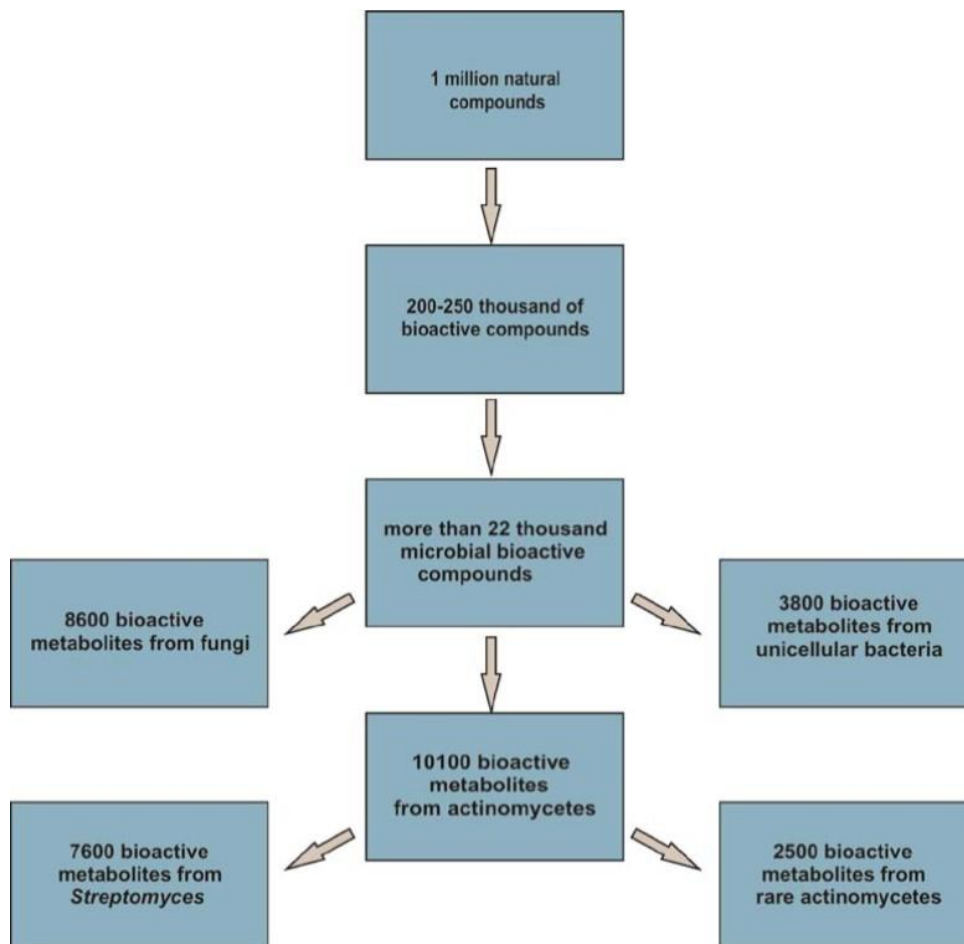


Figura 1. Distribuição dos compostos bioativos descobertos e suas origens (Solecka *et al.*, 2012).

Um dos metabólitos mais conhecidos produzidos por actinobactérias é a anfotericina B, que apresenta atividade antifúngica. Anfotericina B é um antibiótico macrolídeo com grande espectro de atividades, mas também com muitos efeitos colaterais que acabam limitando sua aplicação clínica (Solecka *et al.*, 2012). Existem outros antibióticos bastante relevantes originados do metabolismo secundário de actinobactérias como a tetraciclina, eritromicina, vancomicina e estreptomicina, além de outros compostos com diferentes atividades também de importância clínica (Weber *et al.*, 2014).

3.5 Actinobactérias

Actinobactérias são pertencentes à ordem *Actinomycetales* que é composta de aproximadamente 80 gêneros. Caracterizam-se pelo alto conteúdo de guanina e citosina em seu DNA, variando de 51% em algumas corinebactérias até mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Formam micélio vegetativo e aéreo quando cultivadas em meio sólido e apresentam, em sua maioria, genoma circular com transcrição de 3300 genes ou mais, sendo que a maior parte codifica sequências utilizadas em complexas diferenciações morfológicas e biossíntese de metabólitos secundários. Além disso, possuem plasmídeos lineares, que são elementos de DNA extracromossômico, envolvidos na transferência de genes de metabólitos secundários e de resistência a antibióticos (Ventura *et al.*, 2007; Bervanakis, 2008; Chaudhary *et al.*, 2013).

Quase todos os gêneros pertencentes a ordem *Actinomycetales* habitam o solo, onde vivem como saprófitas, a água e colonizando plantas (Chaudhary *et al.*, 2013). As actinobactérias são comumente isoladas da rizosfera, região do solo muito influenciada pelas raízes de plantas, o que proporciona máxima atividade microbiana e alta diversidade de espécies. São bactérias Gram-positivas, aeróbias e produtoras de compostos voláteis, como geosimina, que lhes confere um odor característico de terra molhada (Silva-Lacerda *et al.*, 2016). Segundo Ventura *et al.* (2007), sua presença no solo se torna importante na medida que são essenciais na reciclagem de biomateriais refratários através de decomposição e também na formação do húmus. Além disso, muitas bifidobactérias são utilizadas como ingredientes ativos em alimentos funcionais pelas suas propriedades probióticas, como proteção contra patógenos, modulação do sistema imune e aderência ao epitélio intestinal.

Este filo apresenta propriedades bastante diversas tanto fisiológicas como metabólicas e se associa a ele a habilidade de produzir um grande número de metabólitos secundários quimicamente diferentes, sendo conhecido pela vasta gama de produtos naturais produzidos. São amplamente utilizados na indústria farmacêutica e de biotecnologia como agentes antitumorais, anti-inflamatórios, além de antibióticos (Ventura *et al.*, 2007; Arasu *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2011; Abdelmohsen *et al.*, 2015; Atta, 2015). Ganham importância por serem a mais potente fonte produtora de antibióticos e outros metabólitos com atividade biológica. Cada cepa de actinobactéria apresenta potencial genético para produzir de 10 a 20

compostos secundários (Arasu *et al.*, 2009). Aproximadamente 70-80% dos metabólitos secundários relevantes, disponíveis comercialmente para uso humano e veterinário, além de cerca de 60% dos antimicrobianos utilizados na agricultura são produzidos por actinobactérias habitantes do solo (Cho *et al.*, 2011; Chaudhary *et al.*, 2013).

Diversos metabólitos secundários codificados pelos genomas de actinobactérias ainda não foram descobertos pelo fato desses genes muitas vezes não serem transcritos sob condições convencionais de laboratório. Existem modelos matemáticos que preveem milhares de compostos antimicrobianos desconhecidos contidos nos genomas de actinobactérias (Abdelmohsen *et al.*, 2015).

3.6 Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* é especialmente produtivo, sendo suas espécies amplamente reconhecidas por produzir diversos tipos de metabólitos secundários singulares, incluindo moléculas com atividade antifúngica, antiviral, antitumoral, anti-hipertensiva, antibióticos e imunossupressores (Arasu *et al.*, 2009; Procópio *et al.*, 2012; Atta, 2015). São bastante importantes industrialmente e uma fonte muito rica de novos compostos com aplicação na clínica, na agricultura e uso veterinário (Higginbotham & Murphy, 2010; Dalisay *et al.*, 2013).

São bactérias Gram-positivas com capacidade de formação de uma camada de hifas e cadeias de esporos, processo peculiar entre bactérias deste grupo e que requer um metabolismo especializado e coordenado. Este desenvolvimento multicelular é complexo, apresentando esporos que germinam formando hifas com micélio aéreo multinucleado, que forma septos em intervalos regulares criando uma cadeia de esporos uninucleados. Quando estes esporos se encontram em condições ambientais de temperatura, nutrientes e umidade que os favoreçam, forma-se um tubo germinativo e temos o desenvolvimento das hifas (Procópio *et al.*, 2012). Segundo Procópio *et al.* (2012), a pigmentação e aroma dos esporos de algumas espécies pode estimular o desenvolvimento celular e produção de metabólitos secundários, fazendo com que estes esporos consigam sobreviver melhor em ambientes hostis.

Os estreptomicetos estão entre as bactérias mais complexas e sua produção de enzimas hidrolíticas extracelulares faz com que elas tenham acesso a

nutrientes presos em polímeros no ambiente terrestre. No momento em que o micélio percebe a limitação de nutrientes em determinado local começa a apresentar duas propriedades de extrema importância a este gênero de bactérias: a produção de antibióticos e outros metabólitos secundários e a formação de filamentos aéreos reprodutivos (Chater & Chandra, 2006).

Apesar da maioria dos genomas das actinobactérias ser circular, o gênero *Streptomyces* apresenta genoma linear. No solo, onde são bastante abundantes, realizam o ciclo do carbono preso em detritos orgânicos principalmente de plantas e fungos através da produção de diversas enzimas hidrolíticas. Além disso, secretam proteínas que possuem como característica a digestão de lignocelulose e quitina (Ventura *et al.*, 2007; Procópio *et al.*, 2012). A maioria dos isolados deste gênero com capacidade de produzir moléculas antimicrobianas foi isolada de ambientes terrestres (Dalisay *et al.*, 2013).

Quando espécies do gênero *Streptomyces* estão associadas a plantas, a simbiose existente entre estes dois organismos acaba sendo um processo bastante importante na produção de antibióticos. Isto porque a planta produz exudatos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento destas bactérias e, por outro lado, os estreptomicetos acabam protegendo a planta pela alta taxa de produção de compostos antimicrobianos (Procópio *et al.*, 2012).

3.7 Purificação de metabólitos

Existe grande interesse no desenvolvimento de técnicas para purificação de compostos biológicos sendo necessário o estabelecimento de estratégias eficientes para atingir este objetivo. Quando consideramos o custo dos bioprocessos percebemos a importância de estratégias de purificação, que representam aproximadamente 80% desses gastos (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2012).

A abordagem tradicional para a descoberta de novas moléculas produzidas por microrganismos como no caso das actinobactérias, normalmente envolve o cultivo destas bactérias em diferentes meios de cultura e sob condições diversas, a extração de metabólitos e a análise da atividade do extrato obtido. Quando se observa que esta atividade está presente, passa-se a uma análise mais detalhada frequentemente envolvendo separações dos constituintes através de cromatografias (Weber *et al.*, 2014).

A cromatografia é um método físico-químico bastante utilizado para separação de moléculas, dependendo das características que estas apresentam. O princípio básico é baseado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, ou seja, um extrato contendo uma mistura de moléculas será aplicado a uma fase estacionária e elas irão se separar umas das outras enquanto passam ao longo do sistema, com auxílio de uma fase móvel. Fatores determinantes farão com que alguns componentes da mistura fiquem por mais tempo na fase estacionária e se movam com mais lentidão, enquanto outros passarão rapidamente com a fase móvel e deixarão o sistema primeiro. Os fatores podem ser diferenças no peso molecular, afinidade com alguma das fases, adsorção ou partição. Cromatografias baseadas no método de partição são úteis quando se têm moléculas pequenas, como aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos. Cromatografias de afinidade, como as de troca-iônica, são mais utilizadas na separação de macromoléculas, ácidos nucleicos e proteínas, também separadas por cromatografias no papel (Degani *et al.*, 1998; Coskun, 2016).

Quando se trata de cromatografia em coluna, a cromatografia líquida clássica é muito utilizada para a purificação de compostos naturais. Podem ser utilizadas fases estacionárias sólidas, que levam a separação por adsorção, e fases estacionárias líquidas, que separam por partição. O avanço em técnicas desta área permitiu o surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência, com a utilização de suportes com partículas muito pequenas, responsáveis pela eficiência e que tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para eluição da fase móvel (Degani *et al.*, 1998). Esta técnica apresenta bons resultados na separação e identificação de aminoácidos, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, esteroides, entre outras moléculas biologicamente ativas (Coskun, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados

4.1.1 Actinobacterias

O presente trabalho utilizou dois isolados de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, R18(6) e 6(4), pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental. Ambos foram isolados em trabalho anterior de raízes de tomateiro (Margaroni, 2009) e foram selecionados dentre outros por apresentarem maior potencial de inibição contra diferentes patógenos (Spadari, 2013; Carvalho, 2016; Minotto, 2016;).

4.1.2 Fungos

Foram utilizados 21 isolados de fungos fitopatogênicos, sendo cinco cedidos para o estudo pela FEPAGRO, quatro pelo Dr. Marcelo Gravina, Departamento de Fitossanidade/UFRGS, um pela EMBRAPA e outros 11 pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFRGS.

4.2 Produção dos inóculos fúngicos

Para realização dos testes de atividade foi necessária a produção de uma suspensão de esporos fúngicos. Para tanto, os isolados de fungos fitopatogênicos foram crescidos em meio SNA (1 g KH_2PO_4 ; 1 g KNO_3 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KCl; 0,2 g glicose; 0,2 g sacarose; 20 g ágar; 1 L água destilada) por 10 a 15 dias em germinador J. Prolab JP-100 com fotoperíodo de 12 horas a 28°C com o objetivo de promover a formação de esporos. Após este período, foi adicionado 5 mL de solução salina (0,85%) e Tween 20 na superfície do ágar. A solução foi espalhada com alça de Drigalski e a partir da suspensão resultante foi realizada a contagem de esporos, sendo esta ajustada para 10^5 esporos/mL.

4.3 Ensaio da dupla-camada

O ensaio foi realizado para testar a atividade dos dois isolados de *Streptomyces* R18(6) e 6(4) contra os 25 fitopatógenos selecionados. Para isso, as actinobactérias foram inoculadas, pelo método de picada, em placas contendo 15 mL de meio ACA (ágar amido caseína) (2 g KNO_3 ; 2 g NaCl; 2 g HK_2PO_4 ; 0,05 g

MgSO₄; 0,02 g CaCO₃; 0,01 g FeSO₄; 10 g amido; 0,3 g caseína; 15 g ágar; 1 L água destilada) e estas foram incubadas por 7 dias a 28°C. Uma suspensão fúngica de esporos de cada fitopatógeno contendo 10⁵ esporos/mL foi adicionada a 15 mL de meio BDA (ágar batata dextrose) fundido, e este foi vertido sobre a camada de ACA contendo as colônias de actinobactérias. Após incubação a 28°C por 4 dias para o crescimento fúngico, os halos foram medidos e o índice de antibiose calculado (IA = diâmetro do halo/diâmetro da colônia) para facilitar a comparação entre isolados. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4 Produção de extrato bruto

Os isolados de *Streptomyces* foram inoculados em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura amido caseína (caldo AC) sob agitação de 115 rpm para produção do pré-inóculo. O isolado R18(6) foi incubado a uma temperatura de 25°C e o 6(4) a 30°C por 48 horas e após foi retirada uma alíquota de 5 mL do pré-inóculo e adicionada em 50 mL de caldo AC permanecendo cada isolado sob as mesmas condições de agitação e temperatura descritos por mais 72 h, no caso do R18(6), e 96 h no caso do 6(4). As culturas foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para outro tubo, sendo que este constituiu o extrato bruto a ser avaliado. O pellet foi reservado para teste posterior (item 4.6).

4.5 Ensaio para avaliar atividade antifúngica dos extratos brutos e purificados

Os extratos brutos e purificados foram testados contra os isolados de fitopatógenos utilizando o ensaio de difusão em poços de ágar. Placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) foram inoculadas com 100 µL de uma suspensão contendo 1 x 10⁵ esporos/mL de cada isolado de fungo a ser testado. Utilizando um cilindro de metal com 8 mm de diâmetro foram feitos poços no ágar, onde se adicionou 100 µL do extrato em questão. As placas foram incubadas a 4°C por 24 h para difusão de metabólitos no meio de cultura e após incubadas a 28°C por 4 dias para crescimento fúngico. A atividade antifúngica foi avaliada de acordo com a medida dos halos de inibição em centímetros. O teste foi realizado em triplicata. Em todas as etapas de purificação dos extratos, estes foram testados quanto a sua ação antifúngica utilizando a mesma metodologia.

4.6 Avaliação da atividade de metabólitos secundários intracelulares

Para testar a atividade de eventuais metabólitos intracelulares produzidos pelos isolados 6(4) e R18(6) foi utilizado o pellet previamente preparado através da centrifugação da cultura líquida das actinobactérias. Foram realizadas três lavagens do pellet com tampão PBS para eliminar quaisquer resíduos do meio de cultura presente junto às células. As células dos pellets foram rompidas utilizando-se um sonicador. Submeteu-se as células a três tratamentos de 15 minutos, com intervalos de 5 minutos, sendo as amostras sempre mantidas refrigeradas em banho de gelo. Após, as amostras foram centrifugadas e a atividade do sobrenadante foi novamente testada através do teste de difusão em poços de ágar (item 4.5).

4.7 Precipitação com sulfato de amônio

Utilizando-se o extrato bruto do isolado 6(4) previamente preparado realizou-se a precipitação de proteínas com sulfato de amônio. As faixas de saturação utilizadas para verificar possível proteína com atividade foram 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100%, e para cada uma delas foi calculada a quantidade de sulfato de amônio a ser adicionado, segundo Scopes (1994). A precipitação foi realizada em banho de gelo, sob agitação e o sulfato de amônio foi adicionado lentamente ao extrato centrifugado até que chegasse na quantidade adequada para cada intervalo. As suspensões foram mantidas por uma hora sob agitação e refrigeração. Foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos, e o precipitado ressuspenso em 2 mL de tampão fosfato salino (PBS – phosphate buffered saline). As cinco amostras resultantes, correspondentes a cada faixa de saturação, foram submetidas ao ensaio de difusão em poço de ágar para verificar atividade contra os fungos (item 4.5).

4.8 Purificação do extrato centrifugado

4.8.1 Extração líquido-líquido

O extrato bruto do isolado com melhor atividade nos ensaios anteriores foi selecionado para os ensaios de purificação. Este extrato bruto passou por extração líquido-líquido com acetato de etila. Para tanto, foram realizadas três lavagens consecutivas com o solvente na proporção 1:1 (v:v). As fases orgânica e aquosa foram separadas em um funil de decantação, sendo a fase aquosa armazenada para

posterior teste de difusão em poço de ágar e purificações. A fase orgânica foi submetida ao rota-vapor sob temperatura de 40°C com velocidade de 100m/s para evaporação do acetato de etila. O produto final foi ressuspendido em tampão PBS e testado contra os fitopatógenos (item 4.5).

4.8.2 Cromatografia em coluna de gel-filtração

Cromatografia em coluna de gel-filtração foi realizada utilizando-se a resina Sephadex G-50 (1,5-30 kDa). Uma alíquota de 1 mL da fase aquosa do isolado preparada anteriormente, liofilizada e concentrada 10x, foi adicionada na coluna contendo a resina. O tampão de eluição escolhido foi o PBS, mesmo utilizado para dissolver a resina. Foram coletadas 50 alíquotas de 1 mL, que foram liofilizadas e ressuspendidas em 200 µL de água destilada estéril. As alíquotas foram testadas contra os fungos fitopatogênicos (item 4.5) e com aqueles que apresentaram atividade fez-se um *pool* das alíquotas.

4.8.3 Membrana 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa

O pool de alíquotas com atividade antifúngica foi passado na membrana de 3kDa para se ter ideia do tamanho da(s) molécula(s) com atividade em questão. Para isto se adicionou 500 µL do pool no microtubo contendo a membrana. Este foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 minutos sob refrigeração, sendo a porção filtrada contendo moléculas menores que 3 kDa, transferida para um novo microtubo. Uma nova centrifugação foi feita a 1.000 rpm por 5 minutos, invertendo-se a membrana para retirar-se a porção retida, com moléculas maiores que 3 kDa, que também foi transferida a outro novo microtubo. As duas porções foram testadas segundo ensaio item 4.5. Repetiu-se o mesmo procedimento utilizando membranas de 10 kDa e 30 kDa.

4.9 Espectroscopia

A fase orgânica foi utilizada para análise no espectrômetro de infravermelho. O espectro FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) foi coletado em transmitância no intervalo de 350-4000 cm⁻¹ e adquiridos com 64 varreduras utilizando brometo de potássio (KBr) como meio transmissor de pressão. Os resultados foram interpretados e o gráfico foi gerado utilizando o programa Origin®8.

Além disso, também foi realizada análise em espectrômetro de massas MALDI-TOF Autoflex Speed utilizando matriz composta por ácido alfa-ciano-4-hidroxiâmico. Para esta análise foi utilizada a porção retida na membrana de 3 kDa e, portanto, com atividade antifúngica e mais purificada.

4.10 HPLC

A técnica de HPLC foi realizada para comparar as amostras com atividade em suas diferentes fases de purificação. Foram testadas e comparadas 6 alíquotas do extrato do isolado de interesse: 1) extrato centrifugado do isolado; 2) fase orgânica; 3) fase aquosa; 4) fase aquosa concentrada 10x; 5) pool de alíquotas com atividade após coluna Sephadex G-50; 6) alíquota sem atividade após coluna.

O método utilizado foi o de cromatografia líquida por exclusão molecular (SEC), que separa as moléculas por tamanho. A coluna utilizada foi a Zorbax GF-250, com sistema de bombeamento isocrático e fase móvel constituída de acetonitrila. A detecção foi feita por espectrofotometria no UV em comprimento de onda de 205 nm. O volume de injeção foi de 100 µL com tempo de corrida de 20 minutos e fluxo de injeção de 1 mL por minuto.

4.11 Extração de DNA fúngico

A extração do DNA foi realizado com base em protocolo desenvolvido por Ashktorab and Cohen (1992), com adaptações. Os isolados fúngicos foram crescidos em Erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido BD (batata dextrose) sob agitação de 115 rpm e temperatura de 30°C por 7-10 dias. O micélio, lavado com água destilada e secado para remoção do excesso de água utilizando-se papel filtro, foi pesado e 100 mg foram utilizados para a extração. Com nitrogênio líquido, o micélio foi macerado e reduzido a pó e transferido para um tubo, onde se adicionou 1,5 mL/g de tampão de lise-extração (200mM Tris-HCl, pH 8.0; 250mM NaCl; 25mM EDTA, pH 8.0; 2% SDS), 10 µL/mL de β-mercaptoetanol e 50 µg/mL de proteinase K (4 mg/mL). Os tubos foram incubados a 65°C em banho de água durante uma hora, sendo agitados a cada 10 minutos e após centrifugados a 8.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e passou por diversas etapas de extração: uma extração com 1 volume de fenol (pH 8.0), três com 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1 v/v), e uma extração final com 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v). A cada extração, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5

minutos e a fase aquosa transferida para um tubo novo e submetida a próxima extração. Ao final desse processo, RNase (50 µg/mL) foi adicionada a fase aquosa e incubada em banho de água a 37°C por 20 minutos. DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de isopropanol -20°C, incubada a -20°C por 16-18h. O DNA foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (v/v). Após ser centrifugado novamente a 8.000 rpm por 10 minutos, foi deixado secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em tampão TE (5 mM Tris; 0,5 mM EDTA) e armazenado a -20°C. A concentração do DNA foi medida utilizando o Nano Espectrofotômetro KASVI (K23-0002 versão 01/13) e sua qualidade foi observada em gel de agarose 0,8%.

4.12 Sequenciamento dos isolados

A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizada para posterior sequenciamento e identificação dos isolados fúngicos. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL, sendo 2,5 µL tampão da reação (10x), 1 µL de MgCl₂ 2mM, 1 µL de cada dNTP 2,5 mM (dTTP, dATP, dCTP e dGTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990), 1 U de Taq DNA polimerase, 50 ng de DNA e água destilada autoclavada para completar o volume final da mistura. A reação de amplificação foi realizada com 35 ciclos no termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto e terminando com uma extensão a 72°C por 5 minutos, antes de resfriar o produto final amplificado a 4°C. O resultado da PCR foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% e registrados pelo gerador de imagens SmartView Pro (UVC1 1200 – Major Science).

As amplificações foram repetidas com volume final de 50 µL, passaram por protocolo de purificação utilizando o kit PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) e foram submetidas para sequenciamento dos nucleotídeos. O sequenciamento foi realizado na empresa Ludwig Biotec em equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas no programa Chromas (Technelysium) e

comparadas com sequencias homólogas depositadas no MycoBank (<http://www.mycobank.org>), na CBS Database (<http://cbs.knaw.nl>) e no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

5. RESULTADOS

5.1 Isolados

5.1.1 Actinobactérias

Os isolados de actinobactérias utilizados, R18(6) e 6(4), foram recuperados de conservação em glicerol utilizando-se meio de cultura ACA. Estes isolados foram sequenciados em trabalho anterior (Borba, 2016). Ambos foram identificados como espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

5.1.2 Fungos

Os isolados fúngicos utilizados para a realização do presente estudo foram sequenciados e os resultados seguem na tabela 2. A maioria dos isolados apresentaram identidade alta com sequências depositadas nos bancos de dados e puderam ser identificados em nível de espécie. Todas as sequências do Genbank relacionadas à identidade dos isolados basearam-se em trabalhos publicados em revista científica para maior confiabilidade no resultado.

No caso do isolado 7, houve uma alta similaridade com 4 espécies diferentes do gênero *Fusarium*, sendo elas *F. napiforme*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. oxysporum*. Já o isolado 12 apresentou alta identidade com diferentes espécies do gênero *Penicillium*, sendo elas *P. thomii*, *P. rudallense*, *P. lapidosum* e *P. Purpurascens*, o mesmo acontecendo com o isolado 13. O isolado 14 não foi sequenciado, portanto sua identificação foi baseada na morfologia dos seus conídios em microcultivo e características da colônia sendo identificado como pertencente ao gênero *Paecilomyces*.

Tabela 2. Resultado do sequenciamento dos isolados fúngicos.

Isolados	Identificação	Sequência Genbank	Identidade	Overlap	Origem
01	<i>Alternaria alternata</i>	HQ115732	100%	100%	
02	<i>Aspergillus unguis</i>	KU866670	100%	100%	
03	<i>Fusarium</i> sp.				
04	<i>Alternaria radicina</i>	DQ394073	99%	99%	Cenoura
05	<i>Alternaria alternata</i>	HM210840	100%	100%	Couve-flor
06	<i>Fusarium verticillioides</i>	JQ724391	100%	97,8%	Abacaxi
07	<i>Fusarium</i> sp.	EF453140	100%	100%	Amora-preta
08	<i>Fusarium proliferatum</i>	KP132230	100%	100%	Palmeira jussara
09	<i>Exserohilum rostratum</i>	KT833227	99%	99%	
10	<i>Alternaria alternata</i>	KF876819	100%	99%	
11	<i>Aspergillus niger</i>				
12	<i>Penicillium</i> sp.	KC966728	100%	99%	
13	<i>Penicillium</i> sp.	KC966728	100%	100%	
14	<i>Paecilomyces</i> sp.	Não seq.			
15	<i>Macrophomina phaseolina</i>	JX945170	99,8%	99,6%	Arroz
16	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KC311473	100%	99,6%	Trigo
17	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KC311473	100%	97,9%	Trigo
18	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KC311473	100%	100%	Trigo
19	<i>Aspergillus puniceus</i>	KP329834	100%	99%	Feijão
20	<i>Macrophomina phaseolina</i>	FJ395233	100%	100%	Feijão
21	<i>Pyricularia oryzae</i>	JQ747492	99%	100%	Arroz

5.2 Ensaio da dupla-camada

Ao testar os dois isolados de actinobactérias contra os 21 isolados de fungos fitopatogênicos observou-se que os mesmos apresentaram atividade antifúngica contra algumas espécies (Figura 2). O isolado R18(6) apresentou atividade contra 80% dos fungos testados, o que corresponde a 17 fungos. O índice de antibiose apresentado, relação entre tamanho do halo e tamanho da colônia, variou de 1,4 a 7,4, sendo que em 82% das espécies suscetíveis o índice de antibiose foi superior a 3,0. Já o isolado 6(4) foi capaz de formar halos em 33% dos fungos testados, com índices de antibiose variando entre 2,0 e 6,2. Destes, 57% apresentou IA superior a 3,0.

A tabela 3 mostra os índices de antibiose apresentados contra cada fitopatógeno. Os índices de antibiose foram calculados para que se permitisse uma comparação entre tamanhos de halos, considerando as diferenças nos tamanhos das colônias das actinobactérias. Os isolados R18(6) e 6(4) cresceram em todas as placas testadas, mas não apresentaram halo de inibição contra todos os isolados fúngicos.

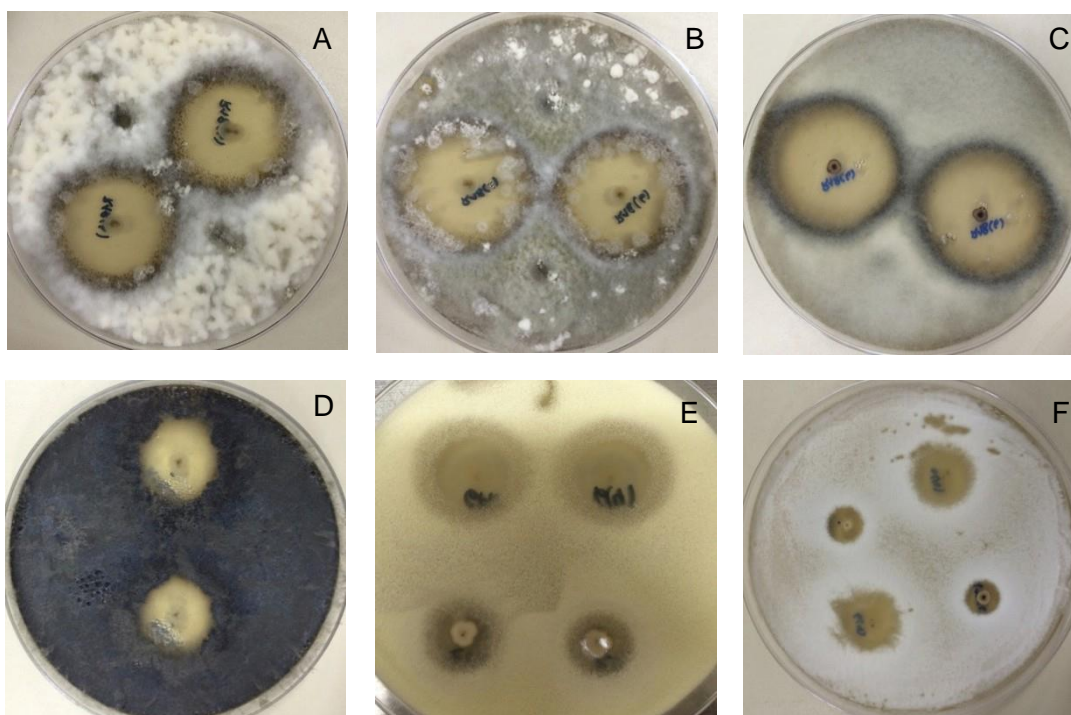


Figura 2. Ensaio da dupla-camada. Nas fotos A, B, C e D observa-se a formação de halo pelo isolado R18(6) contra os isolados *B. sorokiniana*, *B. sorokiniana*, *A. radicina* e *M. phaseolina*, respectivamente. Fotos E e F com ambos R18(6) e 6(4) apresentando formação de halos nos isolados de *Paecilomyces* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente.

Tabela 3. Médias dos tamanhos dos halos, colônias e índice de antibiose (IA) dos isolados R18(6) e 6(4) contra os 21 isolados fúngicos testados.

Isolados	R18(6)			6(4)		
	Colônia	Halo	IA	Colônia	Halo	IA
<i>A. alternata</i>	0,5	1,5	3,0	0,5	-	-
<i>A. unguis</i>	0,4	1,9	4,75	0,5	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	0,5	2,6	5,2	0,4	-	-
<i>A. radicina</i>	0,5	3,7	7,4	0,5	-	-
<i>A. alternata</i>	0,4	0,8	2,0	0,5	-	-
<i>F. verticillioides</i>	0,4	1,9	4,75	0,5	1,4	2,8
<i>Fusarium</i> sp.	0,4	1,6	4,0	0,5	1,1	2,2
<i>F. proliferatum</i>	0,4	1,4	3,5	0,4	-	-
<i>E. rostratum</i>	0,5	-	-	0,5	-	-
<i>A. alternata</i>	0,5	2,0	4,0	0,6	1,2	2,0
<i>A. niger</i>	0,5	-	-	0,5	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	0,5	0,7	1,4	0,6	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	0,5	1,2	2,4	0,5	1,6	3,2
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,4	2,0	5,0	0,5	1,9	3,8
<i>M. phaseolina</i>	0,6	-	-	0,4	-	-
<i>B. sorokiniana</i>	0,6	2,1	3,5	0,5	-	-
<i>B. sorokiniana</i>	0,5	1,6	3,2	0,5	-	-
<i>B. sorokiniana</i>	0,7	2,6	3,7	0,5	-	-
<i>A. puniceus</i>	0,5	3,4	6,8	0,6	3,7	6,2
<i>M. phaseolina</i>	0,6	1,9	3,2	0,5	-	-
<i>P. oryzae</i>	0,6	-	-	0,6	3,4	5,7

5.3 Ensaio de difusão em poço de ágar

5.3.1 Extrato bruto

Ambos os isolados R18(6) e 6(4) foram utilizados no ensaio de difusão em poço de ágar após terem crescido em cultura submersa para produção dos metabólitos secundários. Diferentemente do resultado no ensaio da dupla-camada, onde o isolado R18(6) se destacou pela inibição de maior número de fungos, o isolado 6(4) apresentou melhor resultado neste ensaio (Figura 3). O R18(6) apresentou formação de halo em apenas um dos isolados fúngicos, enquanto o 6(4) inibiu o crescimento de 19 fungos, correspondendo a 90% dos isolados. Destes 19, (47%) apresentaram halo de inibição igual ou maior a 2,0 cm. O índice de antibiose não foi calculado neste ensaio pelo fato dos poços no ágar apresentarem tamanho padronizado em todos os testes, com 8 mm de diâmetro. A tabela abaixo mostra as médias dos diâmetros dos halos medidos em duas direções para cada um dos isolados testados (Tabela 4). A partir deste resultado e pelo destaque do isolado 6(4) quando crescido em cultivo submerso, o mesmo foi selecionado para os ensaios posteriores.

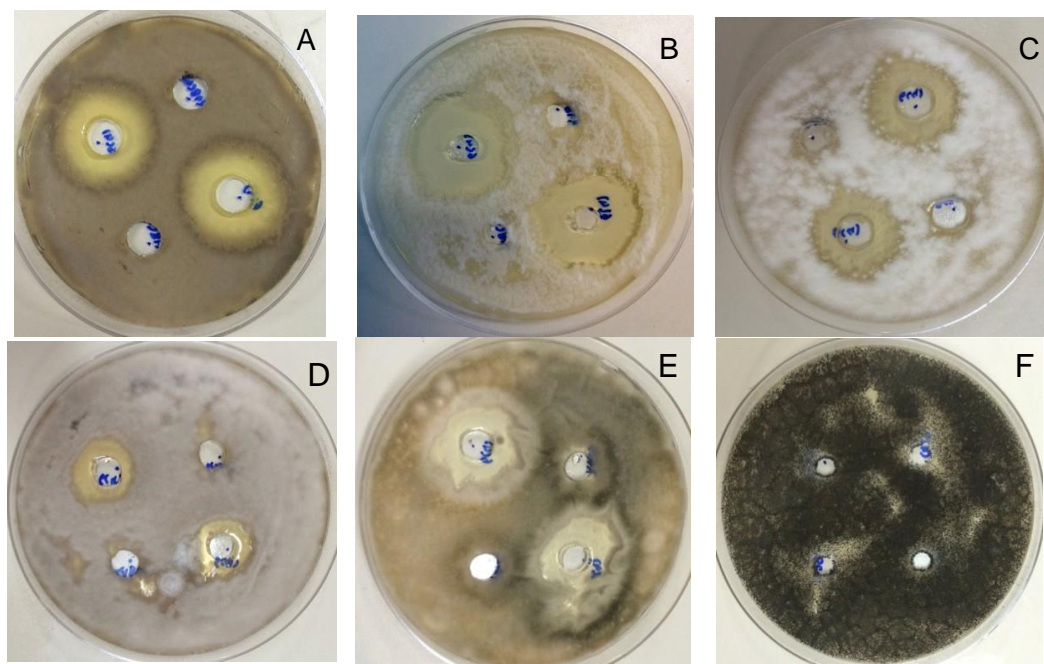


Figura 3. Ensaio de difusão em poços de ágar. Nas fotos A, B, C, D e E observamos a atividade antifúngica do isolado 6(4) contra as cepas de *Paecilomyces* sp., *P. oryzae*, *Fusarium* sp., *A. alternata* e *A. alternata*, *A. niger*, respectivamente.

Tabela 4. Média dos tamanhos dos halos produzidos pelos extratos brutos dos isolados R18(6) e 6(4) no ensaio de difusão em poço de ágar após crescimento em cultivo submerso.

Isolados	R18(6)	6(4)
	Halo	Halo
<i>A. alternata</i>	-	1,8
<i>A. unguis</i>	-	1,5
<i>Fusarium</i> sp.	-	1,5
<i>A. radicina</i>	1,3	1,2
<i>A. alternata</i>	-	1,5
<i>F. verticillioides</i>	-	2,1
<i>Fusarium</i> sp.	-	2,2
<i>F. proliferatum</i>	-	1,6
<i>E. rostratum</i>	-	1,3
<i>A. alternata</i>	-	1,8
<i>A. niger</i>	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	1,6
<i>Paecilomyces</i> sp.	-	2,1
<i>M. phaseolina</i>	-	2,5
<i>B. sorokiniana</i>	-	2,1
<i>B. sorokiniana</i>	-	2,0
<i>B. sorokiniana</i>	-	2,0
<i>A. puniceus</i>	-	2,8
<i>M. phaseolina</i>	-	1,4
<i>P. oryzae</i>	-	2,7

5.3.2 Metabólitos intracelulares

Para testar a presença de possíveis metabólitos intracelulares foram utilizados ambos os isolados de actinobactérias contra dois isolados fúngicos, *Fusarium verticillioides* e *Bipolaris sorokiniana*. Ao testar o pellet dos isolados 6(4) e R18(6), após rompimento das células em sonicador, contra os isolados 6 e 18 não foi observada formação de halo. As fotos A e B (Figura 4) demonstram a formação de halo apenas quando utilizado o extrato bruto do isolado 6(4) contra os fungos.

5.3.3 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação foi realizada com o extrato bruto do isolado 6(4) utilizando sulfato de amônio. Após ressuspensão dos precipitados, estes foram testados por ensaio de difusão em poço contra os isolados *F. verticillioides* e *B. sorokiniana*. Não se observou formação de halo em nenhuma das faixas de precipitação do 6(4) contra os dois isolados fúngicos. As fotos C e D (Figura 4) mostram a ausência de halo de inibição nas diferentes faixas de precipitação.

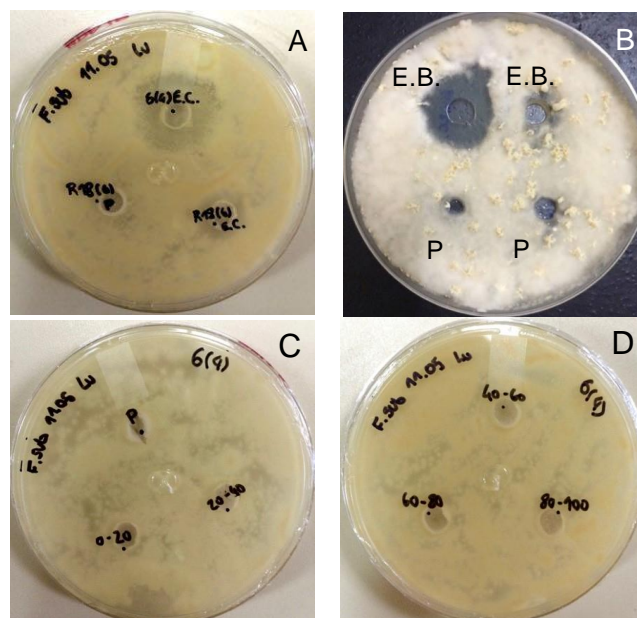


Figura 4. Ensaio de difusão em poço de ágar. Fotos A e B mostram ausência de formação de halo com o pellet rompido das actinobactérias (P 6(4) e P R18(6)) contra os isolados *F. verticillioides* e *B. sorokiniana*, respectivamente. E. B. representa o extrato bruto dos isolados. Fotos C e D também sem formar halo nas diferentes faixas de precipitação utilizando-se o 6(4) contra o isolado fúngico *F. verticillioides*.

5.3.4 Extração líquido-líquido

O extrato bruto produzido em cultura submersa do isolado 6(4) foi submetido a extração líquido-líquido com o objetivo de purificar o metabólito com atividade contra os isolados fitopatogênicos. O isolado fúngico *F. verticillioides* foi selecionado pela suscetibilidade ao 6(4) nos ensaios de dupla-camada e difusão em poço. Após extração do extrato bruto com acetato de etila foi possível observar a formação de duas fases (orgânica e aquosa). A fase orgânica, contendo o solvente, foi evaporada em rota-vapor e ressuspensa em tampão PBS. O produto final foi testado em ensaio de difusão em poço de ágar e se observou a formação de um halo com 2,0 cm de diâmetro. Já a fase aquosa foi testada diretamente após a extração e também apresentou a formação de um halo de 2,0 cm de diâmetro (Figura 5).



Figura 5. Formação de halo de inibição contra isolado o fitopatogênico *F. verticillioides* utilizando-se a fase aquosa e fase orgânica da actinobactéria 6(4) após extração com acetado de etila.

5.3.5 Cromatografia em coluna de gel-filtração

Após a extração líquido-líquido, a fase aquosa foi passada em coluna de Sephadex G-50 para separar as moléculas presentes no extrato por tamanho. Selecionou-se a fase aquosa por esta ter apresentado atividade antifúngica e por ser obtida em quantidade suficiente para utilização na coluna. Depois de passar por liofilização e ser concentrada 10 vezes, uma alíquota de 1 mL foi passada na coluna. Foram retiradas 50 alíquotas de 1 mL e estas, após liofilizadas e ressuspensas em 200 μ L, foram testadas, através do teste de difusão em poço, contra o fitopatógeno *F. verticillioides*. Foi observado que as frações com atividade correspondiam aos tubos 11, 12, 13, 14 e 15, variando de acordo com a altura da resina presente na

coluna. Assim, fez-se um *pool* das frações que apresentaram atividade antifúngica e este foi utilizado para ensaios posteriores com as membranas de filtração e HPLC.

5.3.6 Membrana 3 kDa, 10 kDa e 30 kDa

O *pool* das frações com atividade antifúngica após passadas na coluna de Sephadex G-50 foi utilizado para ensaio com as membranas para separação do metabólito conforme sua massa molecular. Primeiro foi utilizada a membrana de 3 kDa e a fração se dividiu na porção filtrada, com moléculas menores de 3 kDa, e a porção retida, com moléculas maiores de 3 kDa. Ambas as porções foram testadas contra o isolado *Paecilomyces* sp., que apresentou suscetibilidade ao 6(4) nos ensaios anteriores. Foi observada atividade antifúngica apenas na porção retida, significando que a molécula de interesse apresenta massa maior do que 3 kDa. Para tentar se chegar a uma faixa mais precisa de massa molecular, foi realizado o novo teste utilizando-se uma membrana de 10 kDa. Novamente observou-se atividade apenas na porção retida, demonstrando que a molécula com atividade antifúngica apresenta massa molecular maior que 10 kDa. A última membrana testada foi a de 30 kDa, e observou-se atividade na porção retida, indicando que a molécula possui massa molecular maior que 30 kDa.

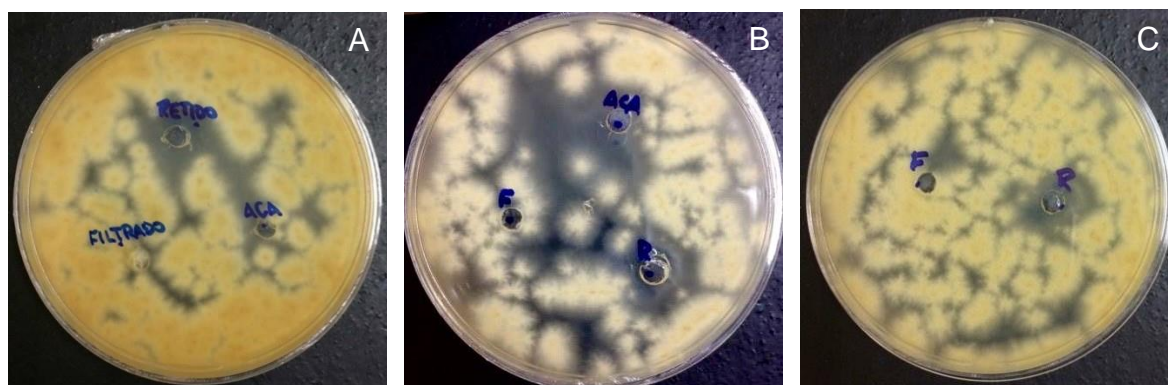


Figura 6. A) Membrana 3 kDa com atividade na porção retida; B) membrana 10 kDa com atividade na porção retida; C) membrana 30 kDa com atividade também no retido.

5.4 Espectroscopia de infravermelho

O resultado da espectroscopia de infravermelho está demonstrado no gráfico abaixo (Figura 7). Os picos representam comprimentos de onda onde houve absorção e, portanto, ligações químicas presentes na fase orgânica analisada. Cada comprimento de onda se relaciona com uma ligação presente em moléculas

orgânicas, possibilitando a caracterização de grupamentos específicos.

Uma primeira análise foi realizada com base em esquema de interpretação de um espectro de infravermelho realizado por Lopes e Fascio (2004) e, após, segundo Forato *et al.* (Embrapa, 2010). Segundo Lopes e Fascio (2004), bandas entre 1630-1820 cm^{-1} indicam presença de ligação dupla entre carbono e oxigênio e, juntamente com a banda entre 3200-2500 cm^{-1} indicaria grupo carboxila. Já a banda presente entre 3500-3070 cm^{-1} é indício da presença de grupamento amida ou amina. De acordo com Forato *et al.* (2010), bandas presentes em 3300 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} são típicas de proteínas. Com base nos resultados analisados através do gráfico, assumimos a possibilidade da molécula em questão se tratar de uma proteína.

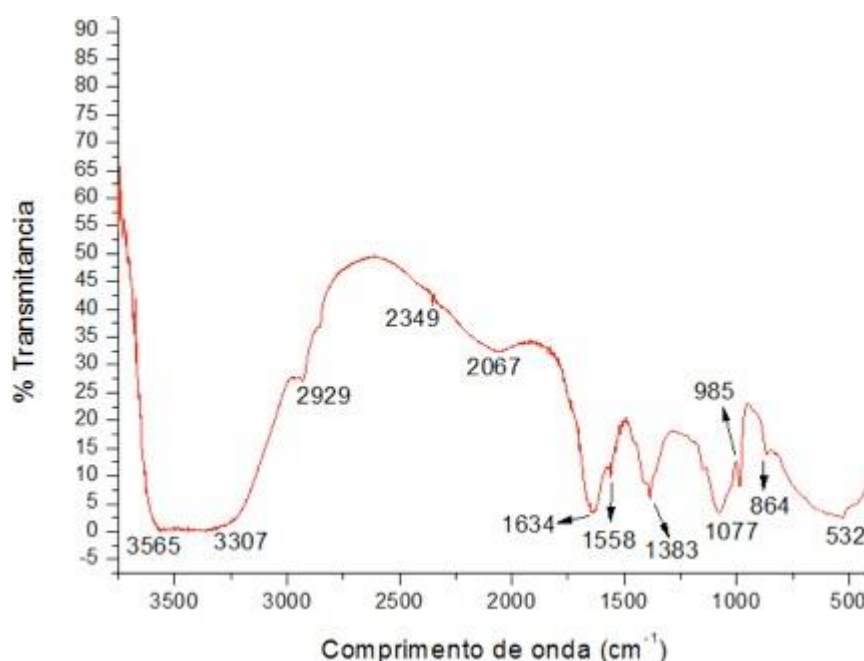


Figura 7. Gráfico representando o resultado da espectroscopia de infravermelho. Os eixos representam a transmitância em função dos comprimentos de onda analisados.

5.5 HPLC

Os resultados do HPLC referentes às amostras estão representados nas figuras 8-12. A coluna utilizada separa as moléculas de acordo com seus tamanhos, sendo que moléculas maiores saem antes da coluna, apresentando tempos de retenção menores, enquanto moléculas menores demoram mais tempo para serem eluídas.

A figura 8 representa amostra que corresponde ao extrato centrifugado, portando o menos purificado; figura 9, amostra da fase orgânica; figura 10, amostra que corresponde ao pool de alíquotas com atividade após coluna Sephadex G-50; a figura 11 representa a porção retida na membrana de 3 kDa com atividade; e a figura 12, a porção filtrada na membrana de 3 kDa, sem atividade.

Podemos observar um pico comum em todas as amostras entre 12,5 e 15 minutos de retenção, inclusive naquela sem atividade, portanto não representando a molécula de interesse. Na figura 10 ficam mais evidentes outros dois picos, um na região de 10 minutos de tempo de retenção e outro próximo aos 7,5 minutos. Estes mesmos picos são observados na figura 11 e estão ausentes na figura 12, indicando a possibilidade de representarem a(s) molécula(s) com a atividade antifúngica.

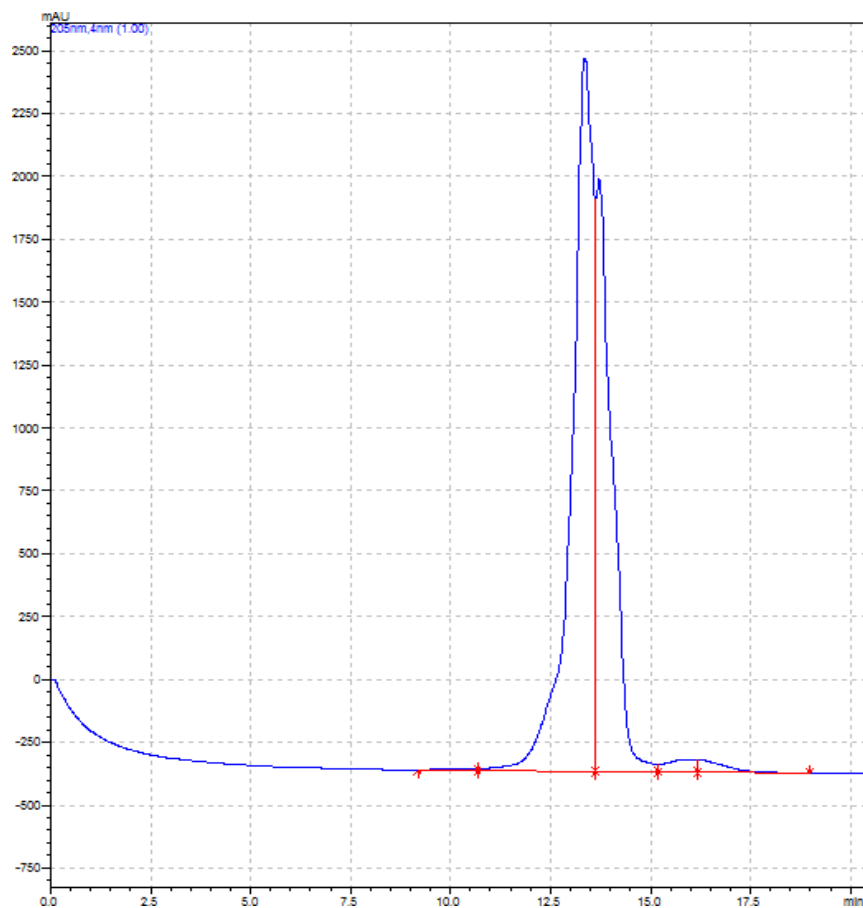


Figura 8. Curva HPLC para amostra do extrato bruto somente centrifugado.

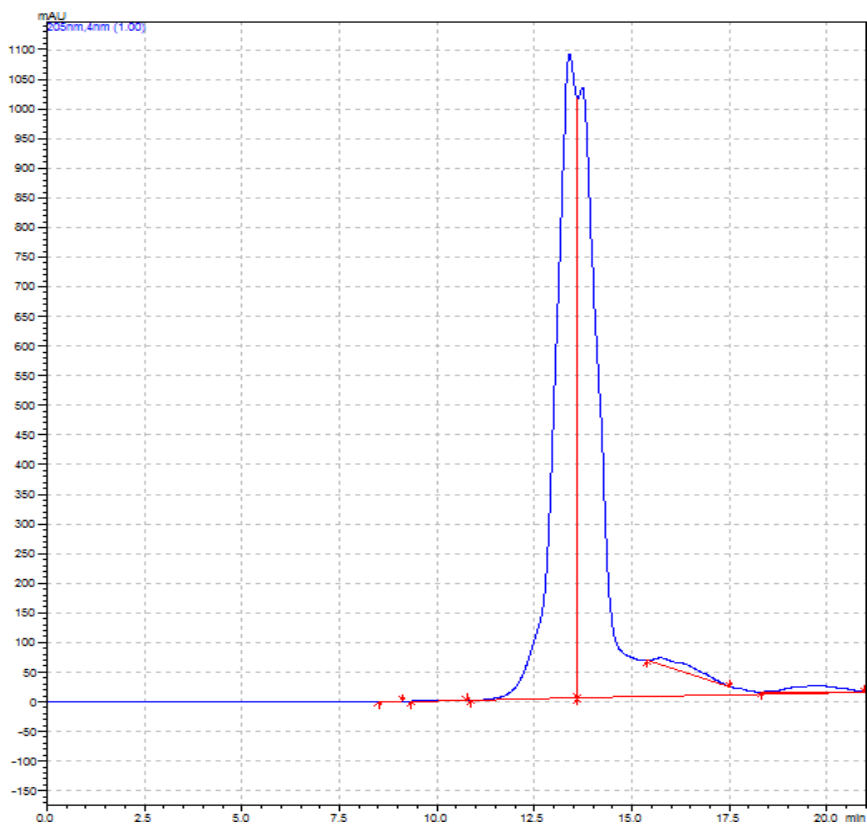


Figura 9. Curva HPLC com amostra da fase orgânica.



Figura 10. Curva HPLC amostra resultante do pool de alíquotas após passagem pela coluna de Sephadex G-50.

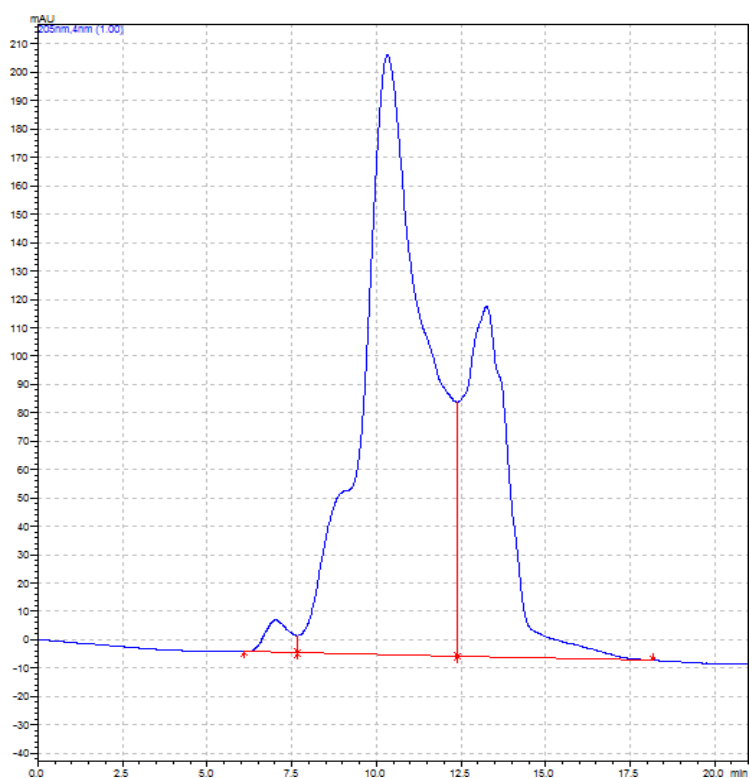


Figura 11. Curva HPLC amostra da porção retida na membrana 3 kDa com atividade antifúngica.

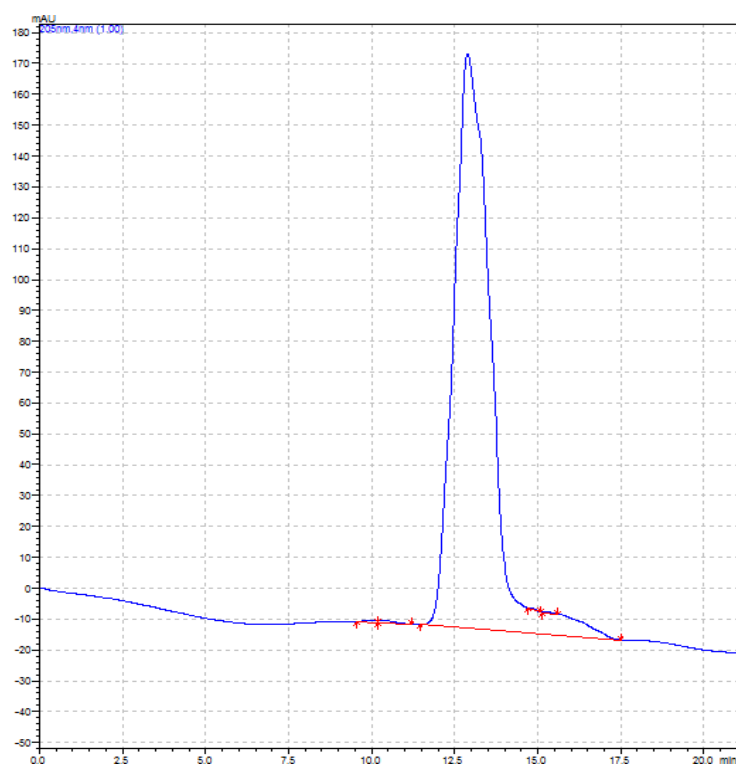


Figura 12. Curva HPLC amostra da porção filtrada da membrana 3 kDa e sem atividade antifúngica.

5.6 MALDI-TOF

O resultado obtido no MALDI-TOF é referente à amostra da porção retida na membrana de 3 kDa com atividade e está representado na figura 13. Podemos observar a detecção de algumas moléculas com massas moleculares na faixa de 5 a 9 kDa, além de outra com 2,5 kDa.

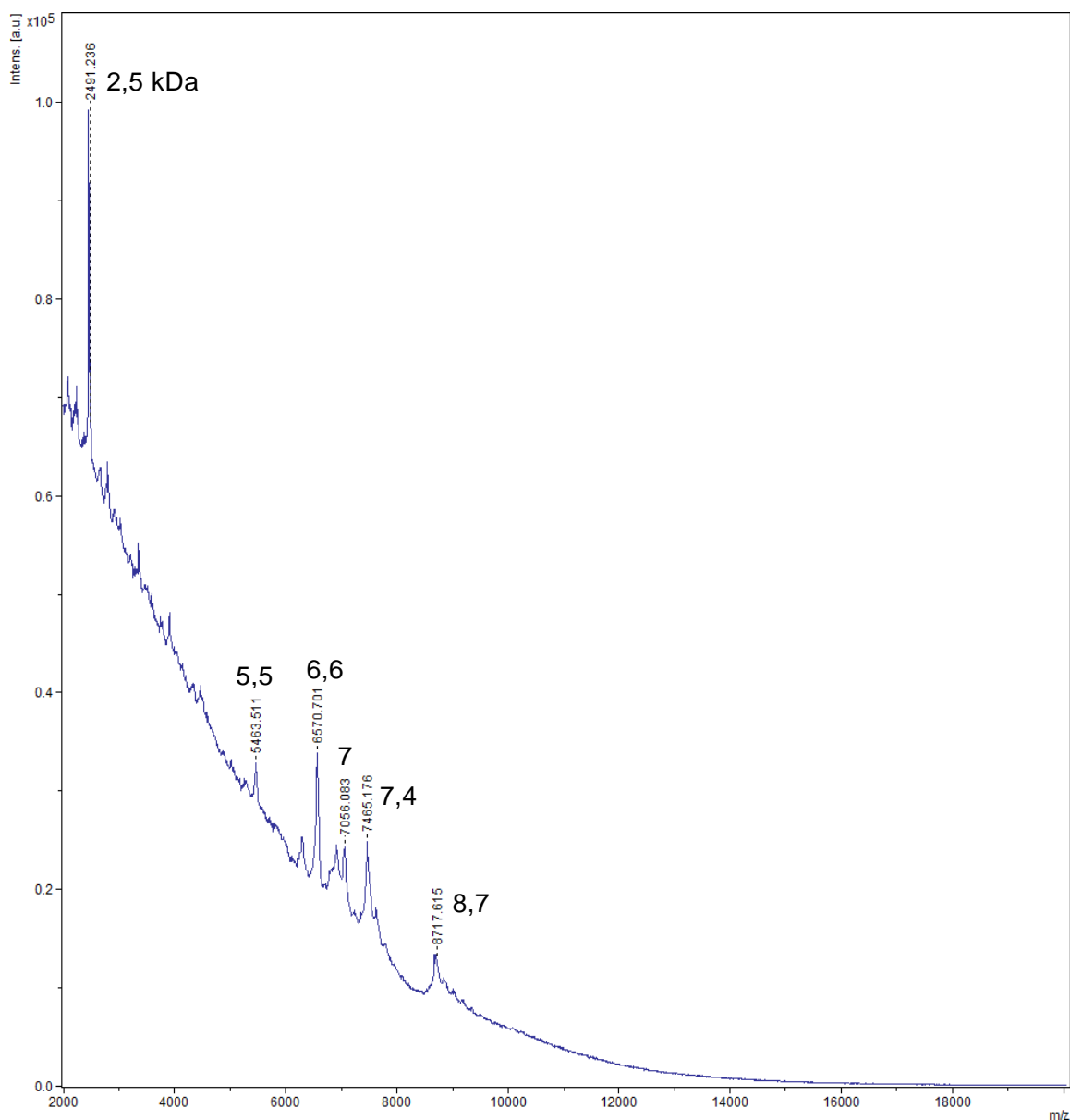


Figura 13. Análise MALDI-TOF. Os valores destacados estão em kDa.

6. DISCUSSÃO

Nos dias de hoje, a utilização de agrotóxicos vem sendo cada vez mais questionada. Apesar de potencializar o crescimento de plantações através da supressão de pestes e doenças que ocasionam grandes perdas na agricultura, acabam também causando diversos problemas que culminam, principalmente, em graves complicações ao meio ambiente e relevantes problemas de saúde para a população. Segundo Paisani *et al.* (2012), o uso de pesticidas é a estratégia mais utilizada no momento para garantir o suprimento de alimentos para uma população em constante crescimento, mas a maioria dos químicos utilizados são tóxicos e seu uso indiscriminado pode causar diversas doenças, assim como envenenamento.

Um estudo realizado nos Estados Unidos, aponta que a presença de pesticidas tem se espalhado de maneira alarmante em ambientes aquáticos e que em 90% das bacias hidrográficas do país e em mais de 50% dos poços de água subterrânea a presença desses compostos foi detectado (Staley *et al.*, 2015). Já no Brasil, um dos países que mais utiliza pesticidas no mundo, mais de 90% dos agricultores depende da sua utilização para o manejo de pestes e doenças nas plantações e aproximadamente 50% dos produtos pesticidas registrados foram classificados como extremamente ou altamente tóxicos para humanos (classes I e II) (Paisani *et al.*, 2012).

Nesse contexto, torna-se imprescindível a busca por novas alternativas menos prejudiciais tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde humana. Dentre essas alternativas, o controle biológico surge com um potencial bastante promissor.

Segundo a ABCBio (2016), entre 2011 e 2014, houve um crescimento médio de 15,3% ao ano no mercado mundial de produtos biológicos. No caso do Brasil, o crescimento das vendas de biofungicidas chegou a 20% no ano de 2015. A indústria agrobiológica mundial movimenta em torno de 2,3 bilhões de dólares anualmente. No entanto, o uso de vírus, bactérias e parasitoides como biocontroladores representa apenas 1% a 2% do mercado brasileiro devido, principalmente, a grande utilização de produtos agroquímicos (ABCBio, 2016). Na Europa, este número chega entre 14% a 16% e nos Estados Unidos 6% (ABCBio, 2016). As empresas brasileiras que possuem registros de agentes

biocontroladores representam apenas 1,7% das formuladoras de biológicos no mundo, enquanto os Estados Unidos possuem 50,4% desse mercado e 41% das patentes destes produtos (ABCBio, 2016).

Baseado nesses dados, observa-se o grande potencial da utilização do controle biológico, especialmente considerando o crescimento apresentado por este mercado nos últimos anos. Os produtos biológicos são bastante incentivados, apesar de ainda existir uma extensiva legislação e barreiras na regulação que acabam dificultando o seu registro e comercialização devido ao longo tempo de espera. Ainda assim, esta solução se apresenta como sustentável e rentável, além de menos prejudicial à saúde humana.

Diversos trabalhos demonstram o potencial de inibição de actinobactérias quando testadas contra diferentes microrganismos, incluindo fungos (Chaudhary *et al.*, 2013; Atta, 2015; Shrivastava *et al.*, 2015; Dalitz *et al.*, 2016). O presente estudo utilizou dois isolados de *Streptomyces* previamente isolados de raízes de tomateiro (Oliveira *et al.*, 2010) que foram selecionados por apresentarem maior potencial de inibição contra isolados de *B. sorokinana* (Minotto *et al.*, 2016).

Os fungos selecionados para realização do trabalho estavam previamente identificados com base em avaliação morfológica e taxonômica. Ao realizarmos o sequenciamento foi possível observar que vários deles acabaram sendo identificados de maneira incorreta apenas com base em morfologia, o que demonstra a grande importância da complementariedade com técnicas moleculares para realizar a identificação de fungos. Um exemplo é o fungo *Alternaria alternata*, previamente identificado como *Bipolaris cynodontis*.

No ensaio de dupla-camada, observou-se alta taxa de inibição pelo isolado R18(6), com atividade contra 80% dos fungos testados e sendo 82% dos suscetíveis com índice de antibiose superior a 3,0, enquanto o isolado 6(4) apresentou atividade contra apenas 33% dos fungos. Thakur *et al.* (2007) testaram o potencial de inibição de actinobactérias e observaram um percentual de 60% dos isolados com atividade antifúngica. Já estudo realizado por Salamoni *et al.* (2010), encontrou apenas 8% de actinobactérias com atividade antifúngica, o que demonstra o potencial dos isolados selecionados no presente trabalho.

Nestes isolados - 6(4) e R18(6) - ao serem submetidos ao crescimento em cultura submersa, foi observado um aumento na taxa de inibição do isolado 6(4),

chegando a 90% dos isolados fúngicos e aproximadamente 50% dos suscetíveis com halo de inibição maior que 2,0 cm. Segundo Chaudhary *et al.* (2013) foram considerados altamente ativos aqueles isolados apresentando atividade antimicrobiana que demonstraram halos com diâmetro variando entre 10 mm e 20 mm, sendo os valores máximos encontrados de 24 mm e 21 mm. Em outro estudo, Benouagueni *et al.* (2015) consideraram altamente ativo o isolado que apresentou halo de 25 mm contra *Staphylococcus aureus*. Estes estudos demonstram a relevância do tamanho dos halos encontrados no presente trabalho. Já o isolado R18(6), que havia apresentado os melhores resultados no ensaio da dupla-camada, formou halo contra apenas um dos fungos testados, o isolado *Alternaria radicina*, quando crescido em cultura submersa. Considerando que o extrato bruto passa por centrifugação e utiliza-se apenas o sobrenadante, surge como hipótese a possibilidade do composto com atividade produzido pelo R18(6) ser intracelular e, por isso, a diminuição da taxa de inibição ao se utilizar o extrato bruto. Entretanto, não se observou atividade no ensaio de difusão em poço após rompimento das células para nenhuma das actinobactérias, indicando neste ensaio a ausência de atividade do isolado R18(6) e que a molécula com atividade produzida pelo 6(4) seja possivelmente um composto extracelular. Alguns estudos demonstraram perda de atividade quando o cultivo ocorre em meio líquido quando comparado com meio sólido (Thakur *et al.*, 2007; Anibou *et al.*, 2008; Salamoni *et al.*, 2010; Spadari *et al.*, 2013). Salamoni *et al.* (2010) descreve perda de atividade em mais da metade das actinobactérias quando testadas em cultura submersa e, mesmo aquelas que se mantiveram ativas apresentaram halos menos significativos. A produção de compostos antimicrobianos normalmente se mostra mais eficiente em meio sólido do que em meio líquido (Anibou *et al.*, 2008).

Minotto *et al.* (2016) utilizou os mesmos isolados de actinobactéria e também foi observada uma diminuição na atividade do isolado R18(6) e um aumento na atividade do 6(4) quando crescidos em meio líquido. As temperaturas e tempo de crescimento em meio líquido selecionadas para este trabalho se basearam nas melhores condições observadas para cada um dos dois isolados segundo Minotto *et al.* (2016). Este aumento na atividade do isolado 6(4) pode se dar devido às condições mais favoráveis para produção do composto quando em meio líquido, como agitação constante ou temperatura

mais adequada.

Pelo fato do isolado 6(4) ter apresentado atividade contra o maior número de isolados fúngicos em meio líquido quando comparado com o R18(6), este foi selecionado para as subseqüentes etapas de purificação. Devido às menores quantidades de extrato disponíveis após purificações, um isolado fúngico foi selecionado para os próximos ensaios de difusão em poço baseado em sua suscetibilidade ao 6(4) tanto no ensaio da dupla-camada, quanto contra o extrato bruto, além da capacidade de esporular em menor período de tempo.

A precipitação com sulfato de amônio foi realizada utilizando-se o extrato bruto do isolado 6(4) por este ser um método bastante utilizado para precipitar proteínas presentes em uma amostra. Este método baseia-se no fato de que em altas concentrações de sal, a solubilidade das proteínas normalmente diminui fazendo com que precipitem, o que chamamos *salting-out* (Wingfield, 2001). Moléculas com menores pesos moleculares precisam de concentrações maiores de sal para precipitar do que moléculas maiores (Wingfield, 2001). O isolado 6(4) foi testado com cinco faixas de precipitação diferentes, variando de 0 a 100% e em nenhuma o produto apresentou inibição contra o isolado fúngico. Apesar disso, não se exclui a possibilidade da molécula em questão ser uma proteína pois, além do sulfato de amônio, existem outros sais que podem ser utilizados para precipitação de diferentes proteínas, assim como solventes que também são utilizados para a precipitação. Segundo Ito & Lin (2009) o método de precipitação com sulfato de amônio é utilizado pelo menos uma vez em 80% dos procedimentos de purificação de proteínas, mas este é normalmente acompanhado de precipitação com outros sais.

O solvente orgânico acetato de etila, utilizado para extração do composto com atividade antifúngica, foi selecionado por ser o mais eficiente em trabalho anterior quando comparado com hexano, metanol, acetona, álcool isoamílico, isobutanol, clorofórmio, butanol/ácido acético/água (Minotto, 2014).

No presente trabalho, as fases aquosa e orgânica formadas após extração com acetato de etila foram testadas e ambas apresentaram atividade antifúngica. Uma explicação possível seria a insuficiente separação dos constituintes do extrato bruto, fazendo com que a molécula de interesse não ficasse exclusivamente em uma das fases.

Outra possibilidade seria a molécula apresentar uma porção mais polar e

outra porção menos polar, ou até caracterizar-se como um complexo constituído da associação de moléculas, e que, devido ao coeficiente de partição, acabam se dividindo entre as duas fases com polaridades diferentes.

O acetato de etila é um solvente menos polar do que a água, principal componente da fase aquosa. De acordo com Yilmaz *et al.* (2008), pode-se dizer que muitos metabólitos possuem propriedades de ácidos fracos e, por este motivo, podem se apresentar como sais com maior solubilidade em água do que nos solventes orgânicos. Seria interessante, em futuros estudos, ajustar para mais ácido o pH da fase aquosa, fazendo com que o sais convertam-se em ácidos e realizar nova extração para maior eficiência conforme Yilmaz *et al.*, (2008).

Outro ponto importante a ser considerado é que ao se tratar de uma molécula orgânica maior, é mais provável que esta não apresente solubilidade em água. Por outro lado, se a molécula em questão apresenta peso molecular mais baixo, pode-se presumir que será pelo menos um pouco solúvel em água por não conseguir mover-se completamente para a fase orgânica, ficando parcialmente dissolvida na fase aquosa (CHEM, 2013).

Devido a pequena quantidade adquirida de fase orgânica após extração, evaporação do solvente e ressuspensão, e pelo fato de ambas as fases terem apresentado atividade antifúngica, optou-se por realizar a etapa da coluna cromatográfica utilizando a fase aquosa após esta ser liofilizada e concentrada dez vezes.

A cromatografia de gel-filtração separa moléculas em uma solução de acordo com seus tamanhos ao passar pela coluna empacotada. Moléculas menores passam por dentro dos poros da resina, levando mais tempo para chegarem ao final da coluna, enquanto moléculas maiores não entram nos poros e passam direto juntamente com o eluente (NCHU, 2014). A resina escolhida foi a Sephadex G-50. Esta resina possui poros por onde passam moléculas com peso molecular na faixa entre 1 kDa a 30 kDa (NCHU, 2014). O critério para seleção da resina foi o tamanho de moléculas antifúngicas já existentes, pois a maioria se apresenta como moléculas pequenas. Na classe dos polienos, a anfotericina B é o antifúngico mais conhecido e utilizado, e este apresenta peso molecular de 924 Da, ou 0,9 kDa (ChemIDplus). Já no caso dos antifúngicos azólicos, seus pesos moleculares variam desde 705 Da, no caso do itraconazol,

531 Da, no caso do cetoconazol, até a faixa de 300 Da, no caso do fungicida tebuconazol ou do fluconazol (ChemIDplus). No presente trabalho foi observada atividade antifúngica com as alíquotas 11 até 15 retiradas da coluna, dependendo da altura da resina ao ser ressuspensa e utilizada, e com elas fez-se um *pool* de frações com atividade. O *pool* das alíquotas com atividade, por já se tratar de uma amostra mais purificada, pode ser utilizado para passar nas membranas e possibilitar uma verificação mais precisa do tamanho da molécula em questão. Por acreditar-se que se tratava de uma molécula pequena, primeiramente foi utilizada uma membrana de 3 kDa, mas, após teste com outras duas membranas, de 10 kDa e 30 kDa, acabou sendo verificado que a molécula com atividade antifúngica apresenta massa molecular maior do que 30 kDa. Este resultado acaba descartando a possibilidade pensada anteriormente de se tratar de uma molécula pequena e nos remete à possibilidade de ser um complexo constituído de uma associação de moléculas com partes apresentando diferentes polaridades e, por isso, dividindo-se pelo coeficiente de partição em ambas as fases orgânica e aquosa após extração com solvente. Também deve-se atentar ao fato de, apesar da alta atividade antifúngica, provavelmente não se assemelha aos antifúngicos e fungicidas mais utilizados no mercado atualmente.

Ao analisarmos juntamente o resultado obtido na espectroscopia de infravermelho temos uma ideia das ligações químicas presentes no extrato analisado. Devemos lembrar que a fase orgânica foi selecionada para esta análise, portanto não está totalmente purificada. Seguindo a chave proposta por Lopes e Fascio (2004) e Forato *et al.* (Embrapa, 2010) chegamos a algumas conclusões. Observamos a presença de bandas no gráfico que se relacionam com ligações características, como ácido carboxílico (-COOH), amidas e aminas (-NH), anel aromático, álcool ou fenol (-OH) e CH₃.

Segundo Neda *et al.* (*Analytical Chemistry*, 2012), a espectroscopia de infravermelho se baseia nas vibrações moleculares que são características de ligações químicas específicas ou grupamentos. Apesar disso, alguns modos de vibração não representam apenas um tipo de ligação, mas dependem fortemente das ligações e grupos funcionais vizinhos (Neda *et al.*, 2012). O estudo analisa identificação de aminoácidos e peptídeos por infravermelho em diferentes trabalhos e apresenta um espectro feito a partir da fase aquosa de

extrato produzido por *Chelidonium majus L.* após algumas extrações que se assemelha bastante com o espectro do presente trabalho. Este apresenta absorções em: 3405 cm^{-1} (OH), 2975 cm^{-1} (CH_2 e CH_3), 1644 cm^{-1} (C=C) e 1382 cm^{-1} (C–O), enquanto aqui foram observadas nos comprimentos de onda 3427 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} e 1383 cm^{-1} , respectivamente. Outro estudo realizado por Venil *et al.* (2016) que caracteriza o pigmento flexirrubina também mostra um espectro de infravermelho com algumas semelhanças, como as bandas presentes em 3454 cm^{-1} correspondendo a ligação O–H, 1643 cm^{-1} do grupamento C=C e 1365 cm^{-1} da ligação C–O.

A partir destas informações, podemos assumir se tratar de uma proteína, tanto pela presença de ácido carboxílico e amina, que representam os pontos terminais da cadeia primária de proteínas, quanto pelo tamanho elevado. Além disso, em trabalhos anteriores o extrato do mesmo isolado utilizado neste estudo apresentou perda da atividade antifúngica quando submetido a temperaturas acima de 40°C por 4 horas e a partir de 60°C já apresentava apenas 50% de atividade residual já na primeira hora (Minotto, 2014).

Apesar disso, deve-se considerar que o método de infravermelho é mais eficiente quando se trata de moléculas pequenas. Isso se deve ao fato de que todas as ligações polares contribuem para absorção no infravermelho, sendo esta a grande vantagem, mas também um problema nesta análise, de acordo com Barth (2007). Segundo o autor, o ponto positivo seria que quase todas as biomoléculas absorvem radiação infravermelha, mas o espectro de moléculas maiores acaba apresentando algumas sobreposições pelo excesso de informações e algumas bandas podem acabar escondidas atrás de outras.

Os resultados obtidos no HPLC mostram picos em tempos de retenção diferentes e também podemos observar a existência de picos que se sobrepõem. Isso provavelmente se deve ao fato da molécula com atividade antifúngica não estar totalmente purificada. Para melhor conhecer a molécula em questão são necessárias mais etapas de purificação.

Ao analisarmos a amostra 5 (Figura 13), porção retida na membrana de 3 kDa, após detecção de massas por MALDI-TOF observamos algumas moléculas com massas menores quando comparado com o resultado obtido após teste com a membrana de ultrafiltração de 30 kDa. Pela atividade ter sido observada na porção retida, se esperava que a massa da molécula em questão

fosse maior do que 30 kDa. Surgem algumas possíveis hipóteses, como o fato da molécula possuir alguma afinidade com a membrana utilizada para teste, composta de celulose degenerada, e, por este motivo, acabar ficando presa na porção retida mesmo possuindo tamanho menor. Outra explicação nos remete novamente à possibilidade de se tratar de uma associação de moléculas que, quando juntas não conseguem passar pela membrana de ultrafiltração, mas que durante análise tanto no MALDI-TOF quanto no HPLC, acabam sendo separadas e aparecem com suas respectivas massas quando não associadas.

7. CONCLUSÃO

Os isolados de actinobactéria testados foram eficientes em inibir o crescimento de diferentes isolados de fungos fitopatogênicos.

No ensaio de dupla-camada o isolado R18(6) produziu halo em maior número de fungos do que o isolado 6(4). Já quando crescidos em cultura submersa, o isolado 6(4) apresentou melhores resultados, sendo selecionado para as próximas etapas.

Não se observou atividade antifúngica de nenhum dos isolados após rompimento das células.

O extrato bruto do isolado 6(4) passou por extração com o solvente acetato de etila e se observou atividade antifúngica em ambas as fases.

A partir do ensaio utilizando as três membranas de ultrafiltração se observou atividade apenas na fase retida. A molécula em questão apresenta massa molecular maior do que 30 kDa ou apresenta afinidade com a membrana utilizada fazendo com que não consiga atravessá-la.

Na espectroscopia de infravermelho foram observados alguns grupamentos característicos de moléculas proteicas. No HPLC observamos alguns picos que possivelmente correspondem à(s) molécula(s) de interesse, porém adicionais etapas de purificação serão necessárias para obtenção de picos isolados para que as massas das moléculas em questão possam ser inferidas, e o mesmo a análise realizada em MALDI-TOF.

8. REFERÊNCIAS

ABCBio. (2016). Incentivos aos produtos biológicos. Agroanalysis. São Paulo.

Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*, 33(6), 798–811.

Al-Amoudi, S., Essack, M., Simões, M. F., Bougouffa, S., Soloviev, I., Archer, J. A. C., Lafi, F. F., Bajic, V. B. (2016). Bioprospecting red sea coastal ecosystems for culturable microorganisms and their antimicrobial potential. *Marine Drugs*, 14(9), 1–14.

Al-Samarrai, G., Singh, H., Syarhabil, M. (2012). Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(4), 673–676.

Anibou, M., Chait, A., Ziad, A., Taourirt, M., Ouhdouch, Y., Benherref, A. (2008). Actinomycetes from Moroccan habitats: Isolation and screening for cytotoxic activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 2019–2025.

Arasu, M. V, Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Journal de Mycologie Medicale*, 19, 22–28.

Ashktorab H, Cohen RJ (1992) Facile isolation of genomic DNA from filamentous fungi. *Bioresour Technol* 13:198-200.

Atta, H. M., El-Sayed, A. S., El-Desoukey, M. A., Hassan, M., El-Gazar, M. (2015). Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(4), 360–371.

Atta, H. M. (2012). Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19, 12–22.

Basler, R. (2016). Diversity of *Fusarium* species isolated from UK forage maize and the population structure of *F. graminearum* from maize and wheat. *PeerJ*, 2148, 1–18.

Benouagueni, S., Ranque, S., Gacemi Kirane, D. (2015). A non-polyenic antifungal produced by a *Streptomyces yatensis* strain isolated from Mellah Lake in El Kala, North-East of Algeria. *Journal de Mycologie Medicale*, 25(1), 2–10.

Bervanakis, G. (2008). Detection and Expression of Biosynthetic Genes in Actinobacteria. A thesis submitted for the degree of Masters of Science. Flinders University.

Bettiol, W. & Morandi, M. A. (2009). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.

Campos-Macías, P., Arenas-Guzmán, R., Hernández-Hernández, F. (2013). *Fusarium subglutinans*: A new eumycetoma agent. *Medical Mycology Case Reports*, 2(1), 128–131.

Carvalho, T.; Van der Sand, S. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of the endophytic actinomycete R18(6) against multiresistant Gram-negative bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(1).

Chater, K. F. & Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), 651–672.

CHEM – Penn State Department of Chemistry. Liquid/Liquid Extraction (2013). Pennsylvania, EUA 2013. Disponível em: http://courses.chem.psu.edu/chem36/Experiments/PDF's_for_techniques/Liquid_Liquid.pdf. Acesso em: 01/02/2017.

ChemIDplus: a TOXNET database. NIH, U.S National Library of Medicine. Disponível em: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>. Acesso em: 12/02/2017.

Chaudhary, H. S., Yadav, J., Shrivastava, A. R., Singh, S., Singh, A. K., Gopalan, N. (2013). Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(2), 118–23.

Cho, S. S., Choi, Y. H., Simkhada, J. R., Mander, P., Park, D. J., & Yoo, J. C. (2012). A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1–2), 247–254.

Choi, N. H., Choi, G. J., Min, B. S., Jang, K. S., Choi, Y. H., Kang, M. S., Park, M. S., Choi, J. E., Bae, B. K., Kim, J. C. (2009). Effects of neolignans from the stem bark of *Magnolia obovata* on plant pathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2057–2063.

Claverías, F. P., Undabarrena, A., González, M., Seeger, M., Cámara, B. (2015). Culturable diversity and antimicrobial activity of Actinobacteria from marine sediments in Valparaíso bay, Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–11.

Coskun, O. (2016). Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160.

Couillerot, O., Loqman, S., Toribio, A., Hubert, J., Gandner, L., Nuzillard J. M., Ouhdouch, Y., Clément, C., Barka, E. A., Renault, J. H. (2014). Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 944, 30–34.

Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M., Fornes, F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*, 95: 280–284.

Czembor, E., Stępień, Ł., & Waśkiewicz, A. (2015). Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. *PLoS ONE*, 10(7), 1–18.

Dalisay, D. S., Williams, D. E., Wang, X. L., Centko, R., Chen, J., Andersen, R. J. (2013). Marine Sediment-Derived *Streptomyces* Bacteria from British Columbia, Canada Are a Promising Microbiota Resource for the Discovery of Antimicrobial Natural Products. *PLoS ONE*, 8(10), 1–14.

Dalitz, C. de A., Porsani, M. V., Figel, I. C., Pimentel, I. C., Dalzoto, P. R. (2016). Potential for biocontrol of melanized fungi by actinobacteria isolated from intertidal region of Ilha Do Mel, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–5.

Degani, A. L. G., Cass, Q. B., Vieira, P. C. (1998). Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova*, 7, 21–25.

Dutta, S. & Campus, K. (2015). Biopesticides : an Ecofriendly Approach for Pest, 4(6), 250–265.

Dzhavakhiya, V., Shcherbakova, L., Semina, Y., Zhemchuzhina, N., Campbell, B. (2012). Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. *Frontiers in Microbiology*, 3: 1–9.

Fialho de Oliveira, M., Germano da Silva, M., Van Der Sand, S. T. (2010). Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. *Research in Microbiology*, 161(7), 565–572.

Fonseca, E., Fábria, S., Sander, H. (2006). Synthesis and Characterization of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels and Hybrids for rMPB70 Protein Adsorption. *Materials Research*, 9(2), 185–191.

Forato, L. A.; Filho, R. B.; Osiro, D.; Bicudo, T. C.; Colnago, L. A. A Espectroscopia na região do infravermelho e algumas aplicações. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2010.

Fox, J. E., Gullledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M. E., McLachlan, J. A. (2007). Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10282–7.

Guillemette, T., Calmes, B., Simoneau, P. (2013). Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence*, 5(2), 357–364.

Higginbotham, S. J. & Murphy, C. D. (2010). Identification and characterization of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Research*, 165(1), 82–86.

Ito, Yoichiro & Lin, Q. (2010). Centrifugal precipitation chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(2), 1–29.

Jain, P. K. & Jain, P. C. (2007). Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS 1322. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45, 203–206.

Jayasinghe, B. A. T. D. & Parkinson, D. (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*, 38(2), 109–118.

Jensen, B., Lubeck, P. S. & Jorgensen, H. J. L. (2016). *Clonostachys rosea* reduces spot blotch in barley by inhibiting prepenetration growth and sporulation of *Bipolaris sorokiniana* without inducing resistance. *Pest Management Science*, 72(12), 2231–2239.

Kumar, J.; Schafer, P.; Hückelhoven, R.; Langen, G.; Baltruschat, H.; Stein, E.; Kogel, K. H. (2002) *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3(4): 185–195.

Lanças, F. M. (2009). A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, 5(1), 27–46.

Lopes, W. & Fascio, M. (2004). Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, 27(4), 670–673.

Loqman, S., Barka, E. A., Clément, C., Ouhdouch, Y. (2009). Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 81–91.

Manhas, R. K. & Kaur, T. (2016). Biocontrol Potential of *Streptomyces hydrogenans* Strain DH16 toward *Alternaria brassicicola* to Control Damping Off and Black Leaf Spot of *Raphanus sativus*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–13.

Mcdonald, M. C., Ahren, D. A. G., Simpfendorfer, S., Milgate, A., Solomon, P. S. (2017). The discovery of the virulence gene ToxA in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Molecular Plant Pathology*, 2–26.

Ministério do Meio Ambiente. Segurança química: Agrotóxicos. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em: 20/01/2017.

Minotto, E., Milagre, L., Spadari, C., Feltrin, T., Ballarini, A. E., Germani, J. C., Salamoni, S. P., Van Der Sand, S. (2016). Screening endophytic actinobacteria with potential antifungal activity against *Bipolaris sorokiniana* and growth promotion of wheat seedlings. *African Journal of Microbiology Research*, 10(36), 1494–1505.

Minotto, E. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 177p. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Março/2014.

Mishra, S., Singh, B. R., Singh, A., Keswani, C., Naqvi, A. H., & Singh, H. B. (2014). Biofabricated silver nanoparticles act as a strong fungicide against *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch disease in wheat. *PLoS ONE*, 9(5).

Nasri, A., Valverde, A., Roche, D., Desrumaux, C., Clair, P., Beyrem, H., Chaloin, L., Ghysen, A., Perrier, V. (2016). Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2137.

Neda, I., Vlazan, P., Pop, R. O., Sfarloaga, P., Grozescu, I., Segneanu, A. E. (2012). Peptide and Amino Acids Separation and Identification from Natural Products. In *Analytical Chemistry*, p 135–146.

O'Brien, J. & Wright, G. D. (2011). An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(4), 552–558.

Pasiani, J. O., Torres, P., Silva, J. R., Diniz, B. Z., Caldas, E. D. (2012). Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(9), 3051–3068.

Procópio, R. E. L., Silva, I. R., Martins, M. K., Azevedo, J. L., Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazillian Journal of Infectious Diseases*, 16(5): 466-471.

Purves, K., Macintyre, L., Brennan, D., Hreggviðsson, G., Kuttner, E., Ásgeirsdóttir, M., Young, L. C., Green, D. H., Edrada-Ebel, R., Duncan, K. R. (2016). Using Molecular Networking for Microbial Secondary Metabolite Bioprospecting. *Metabolites*, 6(2), 1-18.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde / Agrotóxicos: impactos à saúde e ao meio ambiente. Porto Alegre, CEVS, 2005.

Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Aguilar, O., Rito-Palomares, M. (2012). Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. *Journal of Chromatography A*, 1244, 1–13.

Salamoni, S. P., Mann, M. B., Campos, F. S., Franco, A. C., Germani, J. C., Van der Sand, S. T. (2010). Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1847–1856.

Sathish Kumar, S. R., & Rao Bhaskara, K. V. (2012). In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(10), 787–792.

Scopes, R. K. Protein purification: principles and practice. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

Shrivastava, P., Kumar, R., & Yandigeri, M. S. (2015). In vitro biocontrol activity of halotolerant *Streptomyces aureofaciens* K20: A potent antagonist against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 192–199.

Silva-Lacerda, G. R., Santana, R. C. F., Vicalvi-Costa, M. C. V, Solidonio, E. G., Sena, K. X. F. R., Lima, G. M. S., Araujo, J. M. (2016). Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 1–12.

Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from *Actinomycetes*. Central European Journal of Biology, 7(3), 373–390.

Spadari, C., Antunes, T., Teixeira, R., Minotto, E., Fuentefria, A. M., Van der Sand, S. (2013). Antifungal activity of actinobacteria against fungus isolates of clinical importance. Brazilian Journal of Biosciences, 11(4), 439–443.

Staley, Z. R., Harwood, V. J., Rohr, J. R. (2013). A Synthesis of the Effect of Pesticides on Microbial Persistence in Aquatic Ecosystems. Critical Reviews in Toxicology, 45(10), 813–836.

Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B. K., Bora, T. C. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. Journal de Mycologie Medicale, 17(4), 242–249.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(3), 495–548.

Venil, C. K.; Sathishkumar, P.; Malathi, M.; Usha, R.; Jayakumar, R.; Yusoff, A. R. M.; Ahmad, W. A. (2016). Synthesis of flexirubin-mediated silver nanoparticles using *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497 and investigation of its anticancer activity. Materials Science and Engineering C, 59, 228-234.

Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., Lee, S. Y. (2015). Metabolic engineering of antibiotic factories: New tools for antibiotic production in actinomycetes. Trends in Biotechnology, 33(1), 15–26.

Wingfield, P. T. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. Current Protocols in Protein Science, 1–10.

Xu, X., He, Q., Chen, C., Zhang, C. (2016). Differential communications between fungi and host plants revealed by secretome analysis of phylogenetically related endophytic and pathogenic fungi. *PLoS ONE*, 11(9), 1–16.

Yilmaz, E. I., Yavuz, M., Kizil, M. (2008). Molecular characterization of rhizospheric soil streptomyces isolated from indigenous Turkish plants and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1461–1470.

Yoon, M. Y., Cha, B., & Kim, J. C. (2013). Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal*, 29(1), 1–9.