

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLY MARIA WILKE RAMOS GOS

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DE  
PLANTAS MEDICINAIS DA MATA ATLÂNTICA PARANAENSE**

CURITIBA

2017

FRANCIELLY MARIA WILKE RAMOS GOS

**ISOLAMENTO E BIOPROSPECÇÃO DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS DE  
PLANTAS MEDICINAIS DA MATA ATLÂNTICA PARANAENSE**

Projeto de pesquisa de doutorado, apresentado ao programa de pós-graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, com ênfase em Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a seleção do doutorado.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Chirlei Glienke  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>Daiani C. Savi

CURITIBA

2017

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                           | <b>4</b>  |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                        | <b>6</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                            | <b>7</b>  |
| <b>4. METODOLOGIA</b>                          | <b>8</b>  |
| <b>5. RESULTADOS ESPERADOS</b>                 | <b>17</b> |
| <b>6. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO DE ATIVIDADES</b> | <b>18</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>              | <b>19</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica, apesar de possuir apenas parte de sua área coberta por florestas, assim como o Pantanal são biomas com grande diversidade ecológica (SILVA et al., 2000; ALHO, 2008; JORGE, 2004). Uma importante parcela de plantas medicinais destes biomas ainda não possuem a comunidade endofítica explorada, principalmente quanto aos actinomicetos. Os actinomicetos estão presentes em diversos ambientes como o solo (KIM et al., 1998, YASSIN et al., 2007), rios, lagoas e plantas (PASSARI et al.2015). Grande parte dos estudos sobre a região de mata atlântica relata a presença de actinomicetos do gênero *Streptomyces* isolados de solo (SEMEDO et al. 2004). Pouco são os estudos a respeito de actinomicetos endofíticos de plantas medicinais e quando disponíveis, são de áreas urbanas ou rurais, assim, estudos em áreas preservadas e longe da ação do homem se fazem necessários. Especialmente, porque segundo Strobel et al. (1999) as plantas medicinais abrigam microrganismos com alto potencial biotecnológico.

O Brasil é um país rico em biodiversidade e abriga inúmeras espécies de plantas medicinais. Entre elas, as plantas *Solanum paniculatum* e *Handroanthus albus* podem ser encontradas em regiões da Mata Atlântica. A planta *S.paniculatum* é utilizada no tratamento de febre e indigestão, como antiinflamatória e laxante, já a planta *H.albus* é utilizada no tratamento de febre, azias e vermes (POTT et al., 2004).

A produção de metabólitos com atividade biológica é importante em diferentes áreas, tais como indústrias farmacêutica e agroquímica, no controle biológico de patógenos e na biotecnologia (GOYAL, RAMAWAT e MÉRILLON, 2017).

Na saúde humana, o destaque deve-se principalmente pela alta incidência de bactérias resistentes a antimicrobianos em ambiente hospitalar, responsáveis por altos custos nos tratamentos bem como alta mortalidade (KAVITHA et al., 2010; SAVI et al., 2015; WHO, 2016). Bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima KPC (*K. pneumoniae* carbapemase), *Enterobacter cloacae* produtor da enzima VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase), foram citadas pela organização mundial da saúde em fevereiro de 2017 como as principais bactérias que necessitam urgentemente de novos antibióticos

para tratamento (WHO, 2017). A leishmaniose é considerada uma doença endêmica em diversos países, o tratamento é realizado por fármacos com alta toxicidade, alto custo e longa duração de tratamento (MELO-NETO et al., 2016).

O aparecimento de microrganismos resistentes a fungicidas também tem sido um problema para a agricultura (KLOSOWSKI et al., 2017; LUCAS, 2017; STEINBERG, SCHUSTER e KILARU, 2017; TORRIANI, et al., 2017), e a bioprospecção de compostos para o combate destes fitopatógenos, tem ganho espaço nos últimos anos (HOU, et al., 2017; SIEROTZKI et al., 2017; DAGUERRE, EDEL-HERMANN e STEINBERG, 2017). Culturas como citros e milho são acometidas por diversas doenças como a Mancha preta dos citros causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, podridão floral dos citros causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*, antracnose do milho causada pelo fungo *C. graminicola* e diversas outras doenças do milho causada por fungos do gênero *Fusarium sp.* geram grandes prejuízos econômicos (FAGAN; GOES, 2000; SCALOPPI, 2006; GLIENKE et al., 2011; FUNDECITRUS, 2017). O aparecimento de patógenos resistentes bem como a busca por alternativas de controle, tem sido frequentemente relatados (POSSIEDE et al., 2009; ADASKAVEG et al., 2017; KOCH et al., 2017; TORRIANI et al., 2017).

Outro problema emergente é a transmissão dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya pelo vetor *Aedes aegypti*, o vetor se desenvolve em ambientes de água limpa e parada, e muitos inseticidas utilizados possuem uma carga residual tóxica deixada no ambiente, além de já ser descrita a resistência a diferentes inseticidas, (Braga et al., 2004, Miresmailli & Isman 2014, Anholeti et al, 2015). Desta forma novas alternativas para o controle do vetor são necessárias.

Grandes avanços tem sido feitos na busca e aplicação biotecnológica de metabólitos produzidos por microrganismos com diferentes atividades biológicas, como antitumoral, antioxidante, inibidor de colesterol, produtores de enzimas para uso industrial (MINOTTO et al. 2014; GOYAL, RAMAWAT e MÉRILLON, 2017) e na biodegradação de Hidrocarbonetos, nos tratamentos de resíduos de petróleo, asfaltos e solventes orgânicos (SANTANA, 2003). Outra aplicação descrita para os microrganismos é a biodegradação de sais como o carbonato de cálcio, importantes no tratamento de águas de caldeiras e tubulações industriais sendo uma alternativa para remoção de carepas formadas pelo acúmulo de sais (EROGLU et al., 2012).

O presente estudo tem como objetivos isolar, identificar e bioprospectar actinomicetos endofíticos de plantas medicinais da Mata atlântica Paranaense, ampliando o conhecimento sobre a comunidade endofítica de actinomicetos bem como seu potencial. Para tanto, será realizado o isolamento de microrganismos de plantas medicinais, a identificação por análises moleculares e morfológicas e a avaliação do potencial destes actinomicetos na produção enzimática e biodegradação. Por fim, será realizada a produção de extratos e a avaliação da atividade biológica contra patógenos clínicos, fitopatógenos e larvas de *Aedes aegypti*, bem como a elucidação química dos extratos que apresentarem atividade relevante.

## 2. JUSTIFICATIVA

Em trabalho prévio realizado por Gos (2017), o isolamento de actinomicetos da planta medicinal *Volchysia divergens* encontrada no Pantanal sul-matogrossense, apresentou grande riqueza dos gêneros isolados. Todos os 40 extratos produzidos a partir dos isolados apresentaram atividade biológica contra as bactérias resistentes *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC, *E. cloacae* produtor da enzima VIM e 18 extratos apresentaram valores superiores a 50% de inibição de crescimento micelial dos fitopatógenos *C. abscissum* e *P. citricarpa*. Na análise morfológica, alguns isolados apresentaram degradação de amido e carbonato de cálcio.

Outros trabalhos também evidenciam a importância da bioprospecção de endofíticos isolados de plantas medicinais de regiões isoladas e pouco exploradas, em que há maior probabilidade de isolar novas espécies de microrganismos produtoras de compostos com potencial biotecnológico (STROBEL et al., 2004; SAVI et al., 2015, 2016; HOKAMA et al., 2016). A bioprospecção de actinomicetos endofíticos de plantas medicinais têm se mostrado promissora na descoberta de novos compostos com atividade biológica para as diversas aplicações (GOYAL, RAMAWAT e MÉRILLON, 2017).

Vários estudos revelam a presença de fitoquímicos com potencial medicinal provenientes de várias plantas, porém, permanece desconhecida a comunidade

endofítica de actinomicetos de plantas como por exemplo *Solanum paniculatum*, *Byrsonima orbignyana*, *Jacaranda cuspidifolia*.

Com base nos dados apresentados, o projeto tem grande potencial biotecnológico e abrange várias áreas de conhecimento, se mostrando multidisciplinar, agregando conhecimento teórico e prático em relação as áreas estudadas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto tem como objetivos isolar, identificar e bioprospectar actinomicetos endofíticos de plantas medicinais da Mata atlântica paranaense, ampliando o conhecimento sobre a comunidade endofítica de actinomicetos bem como seu potencial biotecnológico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar actinomicetos endofíticos de plantas medicinais tais como *Solanum paniculatum*-Jurubeba, *Handroanthus albus* - Paratudo e *Jacaranda cuspidifolia* – Caroba, *Stryphnodendron adstringens* – Barba timão., entre outras.
- Identificar os microrganismos isolados em nível de gênero por meio de análise morfológica e sequenciamento do gene 16S rRNA;
- Avaliar o potencial dos isolados na produção de compostos bioativos e de interesse biotecnológico, como atividade enzimática, degradação de hidrocarbonetos, degradação de Carbonato de cálcio
- Otimizar a obtenção de metabólitos secundários dos isolados, utilizando diferentes condições de cultivo;
- Avaliar a atividade biológica dos metabólitos secundários obtidos, contra microrganismos de interesse clínico, agrônômico e larvas de *Aedes aegypti*;
- Identificar os compostos ativos de pelo menos dois extratos que apresentarem atividade biológica de interesse;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E ISOLAMENTO

As coletas serão realizadas em pelo menos quatro regiões da Mata atlântica localizadas no Paraná, e serão realizadas entre os meses de agosto de 2017 a agosto de 2020. Inicialmente, serão coletadas folhas das plantas medicinais *Solanum paniculatum*-Jurubeba, *Handroanthus albus* - Paratudo e *Jacaranda cuspidifolia* – Caroba, *Stryphnodendron adstringens* – Barba timão, entre outras plantas a serem selecionadas, serão coletadas 10 folhas de 10 plantas de cada espécie vegetal selecionada em cada região. Para o isolamento serão coletadas folhas novas que não apresentem marcas, injúrias ou lesões. O processo de eliminação de microrganismos epifíticos será baseado na metodologia utilizada por Petrini (1986). Após a assepsia as folhas serão fragmentadas em partes de 8x8 mm e depositadas em placas de petri contendo meio de cultura AAC (Ágar amido caseína) (MOHSENI et al., 2013), acrescido de 50µg/mL de ácido nalidíxico e Oxacilina (para a inibição do crescimento bacteriano) e 50 µg/mL de ciclohexamida (para inibição do crescimento fúngico) 50µg/mL de Nistatina (para inibição de crescimento leveduriforme). As placas serão incubadas em estufa por 30 dias a 28°C, e com verificação diária do crescimento de actinomicetos. Os isolados que obtidos serão transferidos e mantidos em meio ISP2 e depositados na coleção de culturas do LabGeM, da Universidade Federal do Paraná (<http://www.labgem.ufpr.br/>).

A frequência de isolamento (FI) será obtida a partir do número de actinomicetos isolados em relação ao número de fragmentos semeados, conforme fórmula:

$$FI(\%) = \left( \frac{n^{\circ}actinomicetosisolados}{n^{\circ}defragmentossemeados} \right) \times 100$$

### 4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ACTINOMICETOS A ANTIBIÓTICOS

Os isolados serão inoculados em meio líquido ISP2, cultivados a 28°C, a 250 rpm, de 7 a 10 dias de acordo com a metodologia utilizada por PASSARI et al. (2015). O teste de sensibilidade será realizado utilizando a metodologia de disco difusão: os inóculos serão semeados com *swab* sobre a placa contendo meio ágar

Muller Hinton e discos impregnados com antibióticos serão dispostos sobre o inóculo. As placas serão incubadas a 36°C durante 24 h.

Os antibióticos utilizados serão: Aminoglicosídeos (Streptomicina, EST 10µg; Gentamicina, GEN 10µg), Anfencóis (Cloranfenicol, CLO 30µg), Carbapenem (Meropenem, MER 10µg), Cefalosporinas 3ªG (Ceftazidima, CAZ 30µg), Glicopeptídeos (Vancomicina, VAN, 30µg), Macrolídeo (Rifampicina, RIF 5µg), Penicilinas (Ampicilina, AMP 10µg; Oxacilina, OXA 1µg), Quinolonas (Ácido nalidíxico, NAL 30µg) e Tetraciclina (Tetraciclina, TET 30µg). A análise será realizada pela medida do halo de inibição, considerando: A – antibiótico com atividade (halo >0) e N – antibiótico sem atividade (halo=0).

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

A identificação dos actinomicetos será realizada por meio de análise morfológica e sequenciamento parcial do gene 16S do rDNA.

##### 4.3.1 Caracterização Morfológica

Para a avaliação morfológica serão utilizados quatro diferentes meios de culturas, a saber: ISP2 - Ágar extrato de levedura-malte; ISP3 - Ágar aveia; ISP4 - Ágar Amido e sais inorgânico; ISP5 - Ágar Glicerol-Asparagina, previamente descritos por Shirling e Gottlieb (1966). O repique será realizado através do estriamento do inóculo sobre a placa, as quais serão incubadas a 28°C e as características morfológicas serão avaliadas em 7, 14 e 21 dias. As características avaliadas serão crescimento, forma, margem, elevação, formação de esporos, cor do micélio aéreo, cor do micélio vegetativo, cor do esporo e outras observações de acordo com o protocolo descrito por Shirling e Gottlieb (1966).

##### 4.3.2 Caracterização molecular

O DNA genômico será extraído a partir de colônias com 3 a 5 dias de cultivo em meio ISP2, baseado no protocolo de Raeder e Broda (1985), com modificações realizadas por Glienke (1999). A concentração e qualidade do DNA serão

determinadas por eletroforese em gel de agarose 1%. A PCR do gene 16S do rRNA será realizada utilizando os oligonucleotídeos 9F (5'GAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1541R (5'AAGGAGGTGATCCAGCC3') (LEE et al., 2008), consistindo em desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 15s a 94°C, 45s a 93°C, 45s a 51°C, 2min a 72°C e extensão final de 5min a 72°C. A amplificação do fragmento desejado será confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed™, observado em transiluminador de luz ultravioleta e comparado com marcador de peso molecular de 100 pbLadder (Kasvi).

O produto da PCR será purificado utilizando as enzimas Exo1 e FastAP™ (GE Healthcare, USA). Para reação de sequenciamento será utilizado o Kit BigDye® Terminator v3.1. O produto da reação de sequenciamento será purificado utilizando o polímero Sephadex G50. A leitura da reação de sequenciamento será realizada em sequenciador automático ABI3500® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências obtidas serão analisadas e alinhadas utilizando os softwares Mega 6.06 (TAMURA et al., 2013) e BioEdit (HALL, 1999), e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Todas as sequências obtidas serão depositadas no GenBank. As sequências das linhagens de referência serão obtidas no banco de dados LPSN (List of prokaryotic Names with Standing Nomenclature – <http://www.bacterio.net/>). Para a análise de Inferência Bayesiana será utilizado o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), para gerar as árvores filogenéticas com valores de probabilidade posteriori usando o software MrBayesv3.2.6 x86 (Ronquist et al., 2011). O modelo evolutivo será determinado usando o Akaike Information Criterion (AIC) calculado no software R (R Studio Team, 2015), com o pacote phangorn (SCHLIEP, 2011).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ISOLADOS

##### 4.4.1. Avaliação da produção de enzimas de interesse

Será avaliada a capacidade dos isolados produzirem enzimas de interesse, como amilase, pectinase, celulase, lipase, esterase, protease/caseinase, gelatinase e catalase, conforme descrito Minotto et al. (2014)

#### Produção de amilase

Os isolados serão inoculados em meio ágar contendo 0,2% de amido, incubados a 30°C por 3-4 dias. Será aplicada sobre as colônias solução de iodine, os isolados que apresentarem formação de halo transparente ao redor da colônia, será característico de degradação do amido.

#### Produção de pectinase

Será avaliada pela inoculação dos isolados em meio TSA suplementado com 1% de pectina cítrica. Será adicionado a incubação a solução de lugol sobre as colônias, os isolados que apresentarem formação de halo transparente ao redor da colônia, será indicação de hidrólise de pectina.

#### Produção de celulase

Será avaliada utilizando o meio de Czapek sal mineral, com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC). Será adicionado após incubação a solução de 0,1% de vermelho Congo sobre as colônias, os isolados que apresentarem formação de halo laranja ao redor da colônia, será indicativo de produção de celulase.

#### Produção de lipase e esterase

Será avaliada utilizando o meio de cultura contendo Tween 20 (monolaurato de polioxietilenosorbitano) e Tween 80 (monooleato de polioxietilenosorbitano). Após a incubação, as placas serão armazenadas a 4°C por 48h, os isolados que apresentarem formação de halo esbranquiçado, será indicativo de produção de lipase e esterase.

#### Produção de protease/caseinase

Será avaliada utilizando o meio skim milk. Os isolados que apresentarem formação de halo transparente ao redor da colônia, será indicativo de produção de protease.

#### Produção de gelatinase

Será avaliada utilizando o meio agar de gelatina em tubos contendo 4mL do meio. Após o período de incubação os tubos serão armazenadas a 4°C por 2h, se o meio de cultura permanecer líquido a hidrólise da gelatina será confirmada.

#### Produção de catalase

Será realizada utilizando o meio de cultura NYDA (nutritivo de levedura dextrose ágar), Após incubação de 7 dias, será adicionado a solução de peróxido

de hidrogênio a 3% sobre as colônias, os isolados que apresentarem formação de bolhas, será indicativo de reação positiva.

#### 4.4.2 Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos

Será utilizada a metodologia descrita por Hanson et al. (1993) pela técnica de Redox e será utilizado como indicador DCPIP (2,6 di-Clorofenolindolfenol). Os isolados serão cultivados em meio líquido LB a 200rpm e 30°C por 3 dias. Do préinóculo será retirado 1mL, e adicionados em tubos de 1,5mL previamente tarados, e serão centrifugados a 10.000rpm por 20min. O sobrenadante será desprezado e o pellet deverá ser lavado duas vezes com 1ml de água estéril. Os tubos, contendo a massa celular, serão novamente pesados e a concentração final de células será de 200µg/L do isolado em água. O ensaio será realizado em placas multipoços, utilizando óleo diesel como fonte de Carbono e como reagente indicador DCPIP em Meio mineral BH e a biomassa previamente obtida. Em cada poço serão adicionados 300µL de meio BH, 10µL de óleo diesel, 3µL de Indicador DCPIP e 50µL da biomassa em suspensão. A placa será incubada a 30°C e será observada a mudança de coloração após 12, 16, 18 e 24 Horas. Os isolados que apresentarem descoloração serão considerados como potenciais para a degradação de Hidrocarbonetos.

#### 4.4.3 Avaliação da capacidade de degradação de carbonato de cálcio

Será avaliado consumo de  $\text{CaCO}_3$  por meio da técnica de gravimetria por cinzas. O ensaio será realizado pelo cultivo dos microrganismos em meio líquido SG acrescido de 3 diferentes concentrações conhecidas de  $\text{CaCO}_3$ , sendo incubados por 7 dias a 180 RPM. O cultivo será transferido para capsula de porcelana previamente seca e com o peso conhecido e será submetido a evaporação em banho maria até 10% do volume inicial, posteriormente será seca em estufa até completa evaporação. Será então submetido a mufla com temperatura 550°C por 4h, será esfriado e pesado (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

## 4.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 4.5.1. Produção dos extratos

Os isolados serão inoculados em 50 mL de meio líquido SG (SHAABAN et al., 2011), incubados por 3 dias a 28°C, em 180rpm. Deste pré-cultivo 1mL será inoculado em 100 mL dos meios ISP2 (Shirling e Gottlieb, 1966) e R5A (FERNANDEZ, 1998), e incubados por 5, 10 e 15 dias a 28°C em 180rpm.

Após o período de incubação será realizada a filtração do cultivo em papel filtro Whatman nº4 para separar o meio fermentado da massa celular. Para a obtenção do extrato, ao volume de filtrado obtido será adicionado o mesmo volume de acetato de etila e particionado 3 vezes, com o auxílio de um balão de separação (SAVI et al., 2015). A rotaevaporação do solvente será realizada a 45°C e o resíduo da evaporação será transferido para um recipiente previamente pesado para determinação da concentração do extrato seco. Os extratos serão pesados e diluídos em metanol em concentração final de 10mg/mL.

### 4.5.2 Atividade dos extratos contra fitopatógenos

A atividade antifúngica será avaliada contra os fitopatógenos *Colletotrichum abscissum*, *C. graminicola*, *Phyllosticta citricarpa*, *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* e *F. meridionale*.

A avaliação será realizada pela adição de 100 µL do extrato obtido sobre uma placa de meio BDA com auxílio da alça de drigalski e discos de colônias do fitopatógeno serão dispostos no centro da placa. Será utilizado como controle negativo fungicida Derosal ® (1,0 mg/mL) e como controle do solvente metanol (solvente no qual os extratos serão diluídos). As placas serão incubadas em BOD a 28°C por 7 dias para todos os fitopatógenos exceto para *P. citricarpa* que necessita de 21 dias para crescimento. O crescimento em cada tratamento será avaliado por comparação com os valores obtidos nos controles negativo (sem extrato) e contendo somente o solvente (SAVI et al., 2015; HOKAMA et al. 2016).

Os extratos que apresentarem melhor atividade serão selecionados para as análises de CIM segundo a metodologia descrita por Tonial et al. (2017) e

determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) descrita por (SANTOS et al. 2015).

A CIM será realizada em placa de microdiluição, em cada poço será adicionado 90 µL de caldo de Batata Dextrose, 10 µL do tratamento a ser avaliado (realizado com diluições em série) e 50 µL de uma suspensão conidial de *P. citricarpa* com  $6 \times 10^5$  conídios/mL. As placas serão incubadas a 28°C por 21 dias. A ausência de crescimento fúngico no poço será considerada resultado positivo. Como controle positivo somente o patógeno inoculado, como controle negativo glufosinato (10 mg/mL) e Metanol (utilizado como solvente dos extratos).

Para determinação de CFM, 50 µL dos cultivos que não apresentarem crescimento a partir da CIM serão inoculados em placa com meio BDA e incubados por 21 dias à 28°C. A ausência completa de crescimento caracteriza a concentração mínima fungicida (CMF) (SANTOS et al. 2015).

#### 4.5.3 Atividade antibacteriana contra patógenos de interesse clínico

A atividade antibacteriana será avaliada pelo teste de difusão em disco e posteriormente determinada a Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM). Serão utilizados os patógenos *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina (SASM) (ATCC 25923), *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM)(BACHC-MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Acinetobacter baumannii* (BACHC-ABA), *Klebsiella pneumoniae* produtor da enzima carbapenase (KPC) (BACHC-KPC), *Stenotrophomonas maltophilia* (BACHC-SMA) e *Enterobacter cloacae* produtor da enzima VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) (BACHC-VIM), *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente (BACHC-EFV). As linhagens com o código BACHC pertencem ao Banco de Cepas usadas no controle de qualidade de meios e testes fenotípicos e moleculares do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPR, e estão disponível para o desenvolvimento deste trabalho.

Os patógenos serão inoculados em 7 mL de caldo TSB e incubados a 37°C, 180 rpm por 10 a 12 horas. Após o cultivo será realizada a diluição de  $10^8$  UFC/mL baseado na escala McFaland n°0,5, inoculado em placa de ágar Mueller-Hinton com

auxílio de *swab* de algodão e sobre estas placas serão posicionados discos impregnados de cada extrato. As placas serão incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo será utilizado disco com antibiótico de ação contra a bactéria testada e como controle positivo metanol (solvente de diluição do extrato). Após a incubação, será avaliada a formação de halo, comparando o tratamento com os controles (SAVI et al., 2015 e CLSI, 2015).

Os extratos que apresentarem melhor atividade serão selecionados para as análises de CIM e será baseado na metodologia descrita por Ostrosky et al. (2008), com leitura da absorbância realizada em leitor de Elisa em 490nm.

Para determinação de CBM, 50 µL dos cultivos que não apresentarem crescimento a partir da CIM serão inoculados em placa com TSA e incubados por 24h a 37°C. A ausência completa de crescimento caracteriza a concentração mínima bactericida (CMB) (SOLTANI; MOGHADDAM, 2014).

#### 4.5.4 Atividade antiprotozoária contra *Leishmania brasiliensis*

O teste de atividade leishmanicida será realizado em parceria com o laboratório de parasitologia molecular, serão utilizadas as formas amastigota e promastigota do parasita, por teste em microdiluição em caldo utilizando microplacas 96 poços. Será utilizado o meio de cultura RPMI ou Schneider's acrescido de 1% de DMSO e será utilizada a concentração  $1 \times 10^8$  parasitas por mL, as placas serão incubadas a 32°C por 72h e a viabilidade celular será avaliada usando a técnica de MTT (Methylthiazolyltetrazolium). O resultado será calculado pelos valores de absorbância obtidos de acordo com Campos et al. (2015).

#### 4.5.5. Avaliação da atividade biológica contra larvas de *Aedes aegypti*

O teste contra as larvas do mosquito será realizado em parceria com o laboratório de parasitologia molecular, com larvas nos instars III e IV. Serão utilizadas 25 larvas para 25mL de água destilada com a adição do extrato, incubado a 23°C por 24h e 48h, em 4 replicas por tratamento. Após os períodos de incubação serão avaliadas as taxas de mortalidade das larvas, comparados com os controles sem tratamento e com Malathion (WHO, 1981).

### 4.6 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS ATIVOS

A identificação química dos compostos será realizada a partir da análise do extrato bruto em que o fracionamento será realizado por cromatografia em coluna de fase reversa C18, para a produção das frações que serão purificadas em HPLC e Sephadex LH-20. Os espectros de RMN serão medidos utilizando espectrômetro Vnmr 400 (1H, 399,8 MHz, 13C, 100,5 MHz) de Varian (Palo Alto, CA) onde os valores de  $\delta$  serão referenciados aos respectivos sinais de solvente [CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$ H3,31 ppm,  $\delta$ C49,15 ppm; DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ H2,50 ppm,  $\delta$ C 39,51 ppm]. Para a técnica de espectrometria de massa serão utilizadas todas as frações e será realizada em HPLC-MS (Cromatografo líquido de alta performance acoplado a espectrometro de massas), as frações solubilizadas em metanol e injetadas no equipamento, serão

caracterizadas pelo tempo de retenção e o perfil de fragmentação por impactos de elétrons (SAVI et al. 2015).

## **5. RESULTADOS ESPERADOS**

Neste trabalho esperamos dar continuidade aos resultados previamente obtidos por Gos (2017), isolando diferentes gêneros e espécies de actinomicetos produtores de metabólitos secundários com atividade biológica e otimizando as condições de cultivo (meios de cultura e tempo de cultivo), bem como identificar compostos ativos selecionados.

Identificar isolados com potencial para produção de enzimas e biodegradação de hidrocarbonetos e cloreto de cálcio, para ampliar o conhecimento da capacidade biotecnológica destes microrganismos e buscar possíveis aplicações industriais.

## **6. VIABILIDADE FINANCEIRA E DE INFRAESTRUTURA PARA EXECUÇÃO DA PROPOSTA**

Grande parte dos materiais e insumos necessários para a execução do projeto encontram-se disponíveis em estoque no LabGeM (Laboratório de genética de microrganismos) da UFPR. Os demais materiais e insumos serão financiados por projeto já aprovado do CNPq. Parte da pesquisa será realizada em período de doutorado sanduíche na Universidade de Kentucky

Parceiros para a realização deste trabalho:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Yvelize Maria Possiede (Departamento de biologia – UFMS)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Magda Vieira da Costa (Departamento de patologia básica - UFPR)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elide Pereira dos Santos (Departamento de botânica –UFPR)

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jurgen Rohr (Departamento de farmácia – UK)



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J.E., FÖRSTER, H., HAO, W., GRAY, M., **Potassium Phosphite Resistance and New Modes of Action for Managing Phytophthora Diseases of Citrus in the United States**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 205-210. 2017

ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology, Revista Brasileira de Biologia**, 68 (4, Suppl), 957–966, 2008.

ANHOLETI, M. C., DUPRAT, R.C., FIGUEIREDO, M. R., et al. 'Biocontrol Evaluation of Extracts and a Major Component, Clusianone, from *Clusia Fluminensis* Planch. & Triana against *Aedes Aegypti*', **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, 629–35 (2015)

BRAGA I.A., LIMA, J.B.P., SOARES, S.S., VALE, D... *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99: 199-203, 2004.

CAMPOS, F.F., SALES JUNIOR, P.A., ROMANHA, A.J., et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. p.1-10, 2015.

CLSI publication M100-S25 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2015.

DAGUERRE, Y., EDEL-HERMANN, V., STEINBERG, C.. Fungal Genes and Metabolites Associated with the Biocontrol of Soil-borne Plant Pathogenic Fungi. **Fungal Metabolites, Reference Series in Phytochemistry, Springer**, (2017)

EROGLU, S., SAHIN, U., TUNC, T., SAHIN, F. 'Bacterial Application Increased the Flow Rate of CaCO<sub>3</sub>-Clogged Emitters of Drip Irrigation System', **Journal of Environmental Management**, 98, 37–42, 2012.

FAGAN, C.; GOES, A.; Efeito da mancha preta dos frutos cítricos causada por *Guignardia citricarpa* nas características tecnológicas do suco de frutos de laranjas 'Natal' e 'Valência'. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.122, 2000.

FERNÁNDEZ, E.; WEIßBACH, U.; REILLO, C. S.; et al. Identification of two genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug Mithramycin. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.18, 4929–4937, 1998.

FUNDECITRUS. **Doenças e Pragas: Pinta Preta**. 2017. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/pintapreta/12>>. Acesso em: 19/03/2017

GLIENKE, CHIRLEI. **Guignardia citricarpa Kiely**: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 1999.

GLIENKE, C., PEREIRA, O. L., STRINGARI D., FABRIS J., CUNNINGTON, J., SHIVAS, R. G., et al. 'Endophytic and Pathogenic Phyllosticta Species , with Reference to Those Associated with Citrus Black Spot', **Persoonia** 47–56, 2011

GOS, F.M.W.R., **Isolamento E Bioprospecção De Actinomicetos Endofíticos De Vochysia divergens Pohl**, Dissertação, UFPR, 2017

GOYAL, S., RAMAWAT, K.G., MÉRILLON, J.-M. **Different Shades of Fungal Metabolites: An Overview**. *Fungal Metabolites, Reference Series in Phytochemistry*, Springer, (2017)

HOKAMA, Y.; SAVI, D.C.; ASSAD, B.; ALUIZIO, R.; et al. Endophytic Fungi Isolated from *Vochysiadivergens* in the Pantanal, Mato Grosso do Sul: Diversity, Phylogeny, and Biocontrol of *Phyllostictacitricarpa*. *Endophytic Fungi: Diversity, Characterization and Biocontrol*. 4ed. **Hauppauge: Nova Publishers**, v. 4, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**/coordenadores Odair Zenebon, NeusSadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo:Instituto Adolfo Lutz, 1ªedição digital, 2008

JORGE, M. H. A. As plantas medicinais no Pantanal. **Embrapa**, n.70, p.1–3, 2004.

HALL, T. A. **BioEdit4.8**. Raileigh, 1997-2001. 1 arquivo (11,5M); Disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html> BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windons 95/98/NT

HANSON, K.G., DESAI, J.D., DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol tech**. v.7, p. 745-748, 1993.

HOU, Y.; ZHENG, Z.; LI, B.; LIU, X.; ZHOU, M. . **Myosin as a selective target for the fungicide phenamacril**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 51-60. 2017.

KAVITHA, A., PRABHAKAR, P., NARASIMHULU, M.; Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardialevis* MK-VL\_113.**Microbiological Research**. v.165, n.3, p.199–210, 2010.

KIM, S.B.; FALCONER, C.; WILLIAMS, E.; GOODFELLOW, M.; *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov.and *Streptomyces thermocarboxydus* sp. nov.,two moderately thermophilic carboxydrotrophic species from soil, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p. 59-68, 1998.

KLOSOWSKI et al., **Detection of Mutations in CYP51 and CYTB Genes of Phakopsora pachyrhizi Isolates and Competitive Fitness of Mutated and Wild Type Isolates**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 233-238. 2017.

KOCH, A., BIEDENKOPF, D., FURCH, A., WEBER, L., **An RNAi-based Control of Fusarium graminearum Infections Through Spraying of Long dsRNAs**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 63-66. 2017

LEE, S. O.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JONG, K. S.;et al. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophorabrassicae*.**Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.11, p.1741–1746, 2008.

LUCAS JA. Resistance Management: **We know why but do we know how?** In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 3-14. 2017

MELO NETO, B., LEITÃO, J. M. S. R., OLIVEIRA, L.G. C. 'Inhibitory Effects of Zanthoxylum Rhoifolium Lam . ( Rutaceae ) against the Infection and Infectivity of Macrophages by Leishmania Amazonensis', **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; 1–11,2016.

MINOTTO, E., MILAGRE, L. P.; OLIVEIRA, M. T.; VAN DER SAND, S. T., 'Enzyme Characterization of Endophytic Actinobacteria', **Journal of Advanced Scientific Research**, 5), 16–23, 2014

MIRESMALLI, S., ISMAN, M.B., . Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. **Trends Plant Sci** 19: 29-35, 2014.

MOHSENI, M.; NOROUZI, H.; HAMED, J.; ROOHI, A.; Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspiansea. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v.2, n.2, p.64–71, 2013.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; et al. Divulgação Da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de Plantas Mediciniais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.301–7, 2008.

PASSARI, A. K., MISHRA, V. K., SAIKIA, R.; et al. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1–13, 2015.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. **Microbiology of the Phyllosphere**. p.175-87, 1986.

POSSIEDE, Y. M., GABARDO, J., KAVA-CORDEIRO, V., GALLI-TERASAWA, L. V., AZEVEDO, J. L., & GLIENKE, C. (2009). Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 308–313.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOBRINHO, A. A. B.; Plantas Úteis à Sobrevivência No Pantanal. **IV Simpósio Sobre Recursos Naturais E Sócio-Econômico Do Pantanal**, 1–16, 2004.

RAEDER, U., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, n.1, p.17-20, 1985.

RStudio Team *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA  
URL <http://www.rstudio.com/>. 2015.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.; TESLENKO, M.; MrBayes version 3.2 **Manual: Tutorials and Model Summaries**, 2011.

SANTOS, I. P.; SILVA, L. C. N. Da; SILVA, M. V. da; et al. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi from Leaves of *Indigofera Suffruticosa* Miller (Fabaceae)'. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1–7, 2015.

SANTANA, J. A. **Potencial de degradação hidrocarbonetos por fungos isolados poços e borra de petróleo**, dissertação, UFPE, 2003.

SAVI, D. C., SHAABAN, K. A., VARGAS, N.; et al. *Microbispora* sp. LGMB259 Endophytic Actinomycete Isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) Producing  $\beta$ -Carbolines and Indoles with Biological Activity. **Current Microbiology**, v.70, n.3, p.345–354, 2015.

SAVI, D.C.; MEIRA D. A.; GLIENKE, C.; Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic actinomycetes isolated from *Vochysia divergens*. **International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences**, v.5, p.347-356, 2015.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GALLI-TERASAWA, L.; KAVA, V.; GLIENKE, C. 16S-gyrB-rpoB multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 2016.

SCALOPPI, E. M. T. **Determinação do efeito curativo de infecções de *Guignardia citricarpa* em frutos cítricos mediante o emprego de fungicidas sistêmicos e mesostêmicos**. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

SCHLIEP K.P., **Phangorn: phylogenetic analysis in R**. *Bioinformatics* 27:592–593, 2011.

SEMÊDO, L. T. A. S, GOMES, R. C., LINHARES, A. A, et al. Streptomyces drozdowiczii Sp . Nov ., a Novel Cellulolytic Streptomyces from Soil in Brazil' **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1323–28, 2017.

- SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.16, n.3, p.313–340, 1966.
- SIEROTZKI, H., HAAS, U.-H., OOSTENDORP, M., STIERLI, D., AND NUNINGER, C.. **ADEPIDYNTM Fungicide: A New Broad Spectrum Foliar Fungicide for Multiple Crops**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 77-83. 2017
- SILVA, M. P. DA; MAURO, R.; MOURÃO, G.; COUTINHO, M. Distribuição e quantificação de classes de vegetação do Pantanal através de levantamento aéreo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n.2, p.143–152, 2000.
- SOLTANI, J.; MOGHADDAM, M. S. H. Diverse and bioactive endophytic Aspergilli inhabit Cupressaceae plant family. **Archives of Microbiology**. v. 196, n. 9, p. 635–644 , 2014.
- STEINBERG, G, SCHUSTER, M; KILARU, S. University., **Live Cell Imaging Provides Novel Insights into Fungicide Mode of Action**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 15-24. 2017
- Strobel, G. A., Miller, R. V., Martinez-Miller, C., Condrón, M. M., Teplow, D. B., and Hess, W. M. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf *quercina*. *Microbiology* 145, 1919–1926. doi: 10.1099/13500872-145-8-1919
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v..67, n.2, p.257–268, 2004.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Kumar, S.; **Software MEGA6.06**, 2013.
- TONIAL, F.; SALES MAIA, B. H. L N.; Savi, D. C.; Biological activity of *Diaporthe terebinthifolii* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. **FEMS Microbiology Letter**, v.1, p.1, 2017.
- TORRIANI, S.F.F., FREY, R., BUITRAGO, C. et al., **Succinate-Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Resistance Evolution in Plant Pathogens**. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 89-94. 2017
- WHO. **Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticides**. Geneva: World Health Organization, 1981 Contract No.: WHO/VBC/81.807
- WHO – World Health Organization, **Antimicrobial resistance**, Fact sheet. 2016.
- WHO – World Health Organization, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, 2017b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>, acesso em: 29/03/2017
- YASSIN, A. F.; YOUNG, C.C.; LAI, W. A.; et al. *Williamsia serinedens* sp. Nov., Isolated from an Oil-Contaminated Soil, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p.558–61, 2007.