



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA VIEIRA DE BRITO

**ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOBACTÉRIAS DOS
GÊNEROS *STREPTOMYCES* (ACTB-77 E ACTB-242) E *AMYCOLATOPSIS* (ACTB-290)
NA INIBIÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

FORTALEZA

2021

MARIA VIEIRA DE BRITO

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOBACTÉRIAS DOS
GÊNEROS *STREPTOMYCES* (ACTB-77 E ACTB-242) E *AMYCOLATOPSIS* (ACTB-290)
NA INIBIÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B876c Brito, Maria Vieira de.
Estudo dos metabólitos secundários de actinobactérias dos gêneros *Streptomyces* (ACTB-77 e ACTB-242) e *Amycolatopsis* (ACTB-290) na inibição de fungos fitopatogênicos / Maria Vieira de Brito. – 2021. 147 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profª. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.
1. *Streptomyces*. 2. *Amycolatopsis*. 3. Atividade antifúngica. 4. COVs. 5. *Colletotrichum musae*. I. Título.

CDD 540

MARIA VIEIRA DE BRITO

ESTUDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ACTINOBACTÉRIAS DOS
GÊNEROS *STREPTOMYCES* (ACTB-77 E ACTB-242) E *AMYCOLATOPSIS* (ACTB-290)
NA INIBIÇÃO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___/___/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira
Universidade Federal do Goiânia (CRTI)

Profa. Dra. Lucília Kato
Universidade Federal do Goiânia (UFG)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos (Suplente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Fátima Miranda Nunes (Suplente)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir pensamento positivo de coragem e perseverança para concluir esse trabalho. “Lembre de Deus em tudo o que fizer, e ele lhe mostrará o caminho certo (pv 3.6)”.

Aos meus pais Francisco Cardoso e Francinete Maria por todo amor e incentivo emocional, que me fizeram acreditar no resultado positivo dessa carreira. Amo vocês e é por vocês que concluo essa jornada.

Aos meus irmãos Aurilene, Aurineide, Tarcísio, Francisco e Fábio, por acreditarem que esse objetivo seria alcançado, aos meus sobrinhos Giovanna, Murilo, Jordana, Lorenzo, Júlia, Samuel Vitória, Arthur e Heitor Gabriel e aos meus cunhados e cunhadas Juscelino, Ivanildo, Edna e Letícia.

Ao meu esposo, Antônio Aguiar Freitas por toda compreensão e paciência ao longo dessa jornada, a sua companhia foi fundamental no decorrer dessa etapa na minha vida. Amo-te e muito obrigada por se fazer presente em todos os momentos.

A minha orientadora Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira pela amizade, orientação, e por acreditar, confiar e me estimular a superar limites em que não seria capaz se não tivesse encontrado pessoas assim pelo caminho. Por tudo que foi me acrescentado de conhecimento científico e pessoal ao longo desses oito anos de convivência e por ter me apresentado pessoas que foram essenciais para conclusão desse trabalho.

Ao Dr. Marto Viana por ter sido a ponte de acesso para desenvolvimento desse trabalho na EMBRAPA, pela amizade e ensinamento ao longo dessa etapa (*In memoriam*).

Ao professor Dr. Jair Mafezoli pela amizade, paciência, e por todo o conhecimento compartilhando, ao qual irei levar ao longo de minha vida profissional.

A professora Dra. Vânia Bernades-Génisson pela orientação durante o período do doutorado Sanduíche na França.

Ao Professor Dr. Marcos Carlos de Mattos e ao Professor Dr. Geraldo Barbosa por sempre estarem disposto a contribuir ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

A Professora Dra Fátima Nunes, pela amizade e incentivo.

As Professora Dra Lucilia Kato e Dra Cecilia Maria, pela amizade, incentivo e por contribuírem na identificação dos compostos aqui descritos. Obrigada!

Ao grupo de pesquisa do SPCMIB da *University Paul Sabatier* em nome dos pesquisares Dr. Ivys Génisson e Dra. Stéphanie Ballereau. Obrigada pela receptividade e por todo conhecimento compartilhado.

Ao grupo de pesquisa do LCC-CNRS em nome dos pesquisadores Dr. Remi Chauvin e Dra. Valérie Maraval.

Aos colegas da EMBRAPA João, Regimara, Wéverson, Samara, Suane, Hilton, Dr Freire, Dr. Marllon, Dra Débora e Dra Celli pelas contribuições para construção desse trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Nesse trabalho apresentamos o estudo do potencial antifúngico de compostos orgânicos voláteis (COVs) e não voláteis produzidos por cepas actinobactérias da rizosfera de Caatinga contra fungos fitopatógenos, com foco especial em *Colletotrichum musae*. Nesse estudo vinte cepas foram selecionadas quanto à capacidade de produzir metabólitos secundários com potencial de inibição do crescimento (IC) contra *C. musae*. No capítulo um mostramos os resultados para os estudos com COVs, em que foi observado os maiores potenciais de IC para COVs produzidos pelas cepas ACTB-77 e ACTB-290, ambas identificadas por abordagem molecular como *Streptomyces* sp. e *Amycolatopsis* sp., respectivamente. O efeito dos COVs dessas cepas de actinobactérias na estrutura morfológica das hifas do fungo *C. musae* foi investigado por MEV e revelou deformação significativa dos filamentos celulares desse fungo, especialmente no caso do ACTB-290. Os COVs foram investigados sob condições de culturas axênicas e de co-cultura usando abordagens combinadas de HS-SPME-GCMS, e os dados foram analisados por estatística de reconhecimento de padrões. A maioria dos COVs foi identificada, representando 92-100% das áreas de picos totais. Linalol ($38,53 \pm 5,19$) e geosmina ($17,25 \pm 2,55$) foram os principais constituintes de COVs de ACTB-77, enquanto dissulfeto de dimetila ($48,49 \pm 3,48$) e trissulfeto de dimetila ($21,14 \pm 3,50$) foram os principais compostos de COVs produzidos por ACTB-290. No capítulo dois mostramos os resultados para os estudos com metabólitos secundários não voláteis, produzidos pelas cepas ACTB-242, identificadas por biologia molecular como *Streptomyces* sp., as porcentagens de inibição de crescimento para os *Fusarium Oxysporum*, *Colletotrichum brevisporum* e *C. musae* tratados com extratos produzidos por essa cepa variaram de 65 a 80%. Estudos de Desrepliação usando UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking foram utilizados na identificação de compostos da classe de isocumarinas e piericidinas. A exploração das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos preparados, sem resinas e com as resinas apresentaram inibição total de crescimento micelial para *C. musae* as concentrações de 250 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL.

Palavras-chave: *Streptomyces*; *Amycolatopsis*; COVs; isocumarinas; piericidina; *Colletotrichum musae*; atividade antifúngica.

ABSTRACT

In this work we present the study of the antifungal potential of volatile and non-volatile organic compounds (VOCs) produced by actinobacterial strains from the rhizosphere of Caatinga against phytopathogenic fungi, with a special focus on *Colletotrichum musae*. In this study, twenty strains were selected for their ability to produce secondary metabolites with potential for growth inhibition (CI) against *C. musae*. In chapter one, we show the results for studies with VOCs, in which the highest potential of IC for VOCs produced by strains ACTB-77 and ACTB-290, both identified by molecular approach as *Streptomyces* sp. and *Amycolatopsis* sp., respectively. The effect of VOCs from these strains of actinobacteria on the morphological structure of hyphae of the fungus *C. musae* was investigated by SEM and revealed a significant deformation of the cell filaments of this fungus, especially in the case of ACTB-290. VOCs were investigated under axenic culture and co-culture conditions using combined HS-SPME-GCMS approaches, and data were analyzed by pattern recognition statistics. The majority of VOCs have been identified, representing 92-100% of the total peak areas. Linalool (38.53 ± 5.19) and geosmin (17.25 ± 2.55) were the main constituents of ACTB-77 VOCs, while dimethyl disulfide (48.49 ± 3.48) and dimethyl trisulfide (21.14 ± 3.50) were the main compounds of VOCs produced by ACTB-290. In chapter two we show the results for studies with non-volatile secondary metabolites, produced by ACTB-242 strains, identified by molecular biology as *Streptomyces* sp., the growth inhibition percentages for *Fusarium Oxysporum*, *Colletotrichum brevisporum* and *C. musae* treated with extracts produced by this strain ranged from 65 to 80%. Dereplication studies using UHPLC-MS/MS associated with molecular networks networking were used to identify compounds from the class of isocoumarins and pteridines. The exploration of minimum inhibitory concentrations (MIC) of extracts prepared without resins and with resins showed total inhibition of mycelial growth for *C. musae* at concentrations of 250 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 31.25 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Streptomyces*; *Amycolatopsis*; VOCs; isocoumarins; pteridin; *Colletotrichum musae*; antifungal activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Batata dextrose
BDA	Batata- dextrose- ágar
<i>BB</i>	<i>Broad Band</i>
Δ	Deslocamento químico (ppm)
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CIM	Concentração inibitória mínima
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
GNPS	Global Natural Product Social Molecular Networking
HS-SPME	Microextração em fase sólida no headspace
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MHz	Megahertz
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PDMS/DVB/CAR	Polidimetilsiloxano-divenil-carboxeno
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano-divenil
PDMS/CAR	Polidimetilsiloxano-carboxeno
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
SPE	Extração em fase sólida
UPLC-HRMS	Ultraperformance Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.1	O gênero Streptomyces	14
1.2	O gênero Amycolatopsis	16
2	CAPÍTULO 1	25
3	CAPÍTULO 2	84
4	CONCLUSÃO	112
5	INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES	113
	REFÊRENCIAS	145
	APÊNDICE A - LISTA DE FIGURAS	145
	APÊNDICE B - LISTA DE TABELAS	145

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os produtos naturais são metabólitos secundários originários de uma miríade de fontes, incluindo plantas, animais, organismos marinhos, micro-organismos, vertebrados e invertebrados. Muitas dessas moléculas são usadas como fonte de medicamentos, especialmente nos países em desenvolvimento, devido ao seu baixo custo e disponibilidade.¹

A exploração dos micro-organismos como fonte de metabólitos secundários surgiu com a descoberta da penicilina do *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928. A partir de então, os compostos oriundos de micro-organismos passaram a ser utilizados na medicina, agricultura, indústria alimentícia, entre outros.²

Nesse cenário de exploração do micro-organismos como fonte de metabólitos secundários surge a importância das actinobactérias, bactérias Gram-positivas contendo alto teor de guanina + citosina. As actinobactérias apresentam estrutura morfológica de micélio complexo e forma aérea, com pigmentação e esporulação características. E um potencial biossintético robusto para produzir metabólitos secundários de uma ampla diversidade estrutural.³

As actinobactérias são fontes de dois terços de todos os antibióticos de origem natural e uma variedade de drogas anticâncer, antifúngicas e imunossupressoras, além de apresentarem bioatividades contra a maioria dos fitopatógenos, incluindo fungos e oomicetos. Estão abundantemente distribuídas no ambiente como solo, água doce, água do mar.⁴

1.1 O Gênero *Streptomyces*

As *Streptomyces* representam o maior gênero das actinobactérias, possuem forma filamentosa semelhante aos fungos. A morfologia de *Streptomyces* é caracterizada pelo desenvolvimento multicelular complexo, no qual seus esporos germinativos formam hifas septadas, criando uma cadeia de esporos não-nucleados, com micélio aéreo.⁵

Quando um esporo de *Streptomyces* encontra condições favoráveis de temperatura, nutrientes e umidade, o tubo germinativo é formado e as hifas se desenvolvem. A célula esporogênica pode conter cinquenta ou mais cópias de cromossomos. A ordem, posição e segregação dos cromossomos durante a esporulação é linear. Esse gênero de actinobactérias é responsável por produzir uma variedade de antibióticos, enzimas industriais e metabólitos secundários bioativos, incluindo herbicidas e fungicidas.^{5,6}

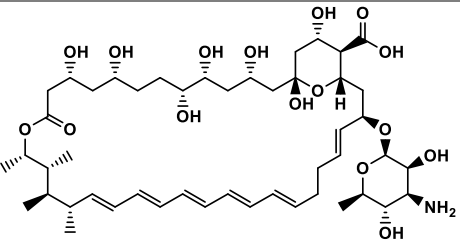
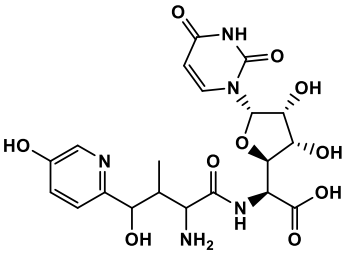
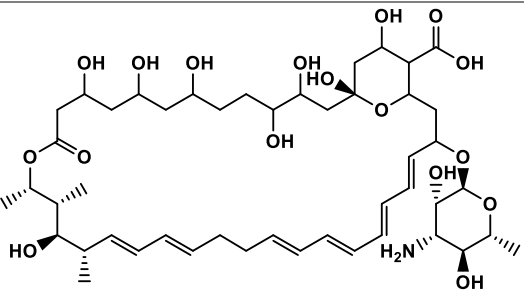
Figura 1-Culturas de cepas de *Streptomyces* sp.

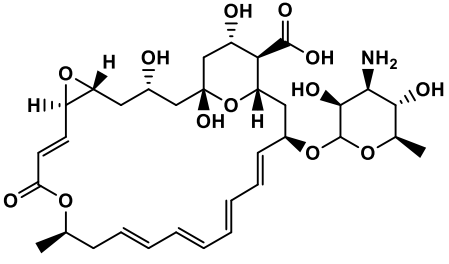
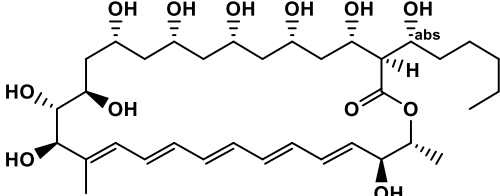
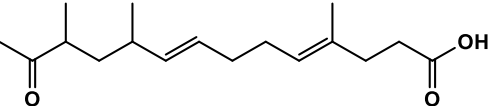
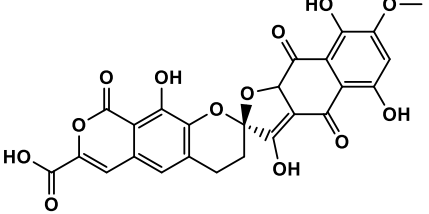


As *streptomyces* são fontes economicamente sustentáveis para a síntese de compostos antifúngicos. Esse gênero é considerado um dos mais importantes na biossíntese de compostos bioativos que inibem vários fungos patogênicos de plantas. Ele contribui com mais de 60% dos compostos antimicrobianos descritos na literatura até o momento.⁷

Os primeiros anos de pesquisa com antibióticos levaram a descoberta da estreptomicina de *Streptomyces griseus*, cloranfenicol de *Streptomyces venezuelae*, clortetraciclina de *Streptomyces aureofaciens*, cefalosporina de *Cephalosporin Cephalosporium*, eritromicina de *Saccharopolyspora erythraea*.⁸ Alguns exemplos de compostos com atividade antifúngica isolados de espécies de *Streptomyces* estão ilustrados a seguir.^{9,10}

Tabela 1-Exemplos de compostos com atividade antifúngica isolados do gênero *Streptomyces*.

Compostos	Origem (Espécie de <i>Streptomyces</i>)
 <p data-bbox="470 1265 678 1299">Anfotericina b</p>	<p data-bbox="1061 1176 1348 1209"><i>Streptomyces nodosus</i></p>
 <p data-bbox="462 1590 686 1624">Neopolioxina C</p>	<p data-bbox="1069 1489 1340 1523"><i>Streptomyces tendae</i></p>
 <p data-bbox="502 1960 638 1993">Nistatina</p>	<p data-bbox="1061 1814 1348 1848"><i>Streptomyces noursei</i></p>

 <p>Natamicina</p>	<p><i>Streptomyces sp.</i></p>
 <p>Pentamicina</p>	<p><i>Streptomyces pentaticus</i></p>
 <p>Estreptoone A</p>	<p><i>Streptomyces sp. SN0280</i></p>
 <p>Rubromicina CA2</p>	<p><i>S. hyaluromycini MB-PO13</i></p>

1.2 O gênero *Amycolatopsis*

O gênero *Amycolatopsis* foi proposto pela primeira vez por Lechevalier e colaboradores em 1986. Esses micro-organismos pertencem a família de actinomicetos, que atualmente inclui 94 espécies verificadas e 4 subespécies. E formam um ramo único na árvore evolutiva na família das Pseudonocardaceae, variando em suas características morfológicas, formando hifas aéreas de substrato ramificadas, que se fragmentam em formas quadrados ou de bastão, podendo suas cepas ser mesofílicas ou termofílicas.¹¹

As *Amycolatopsis* possuem um conteúdo de DNA composto de 66 a 73% molar de guanina + citosina. Este gênero pode ser separado de outros, usando características morfológicas, quimiotaxonômicas e análise da sequência do gene 16S rRNA.^{12, 13}

A maioria das *Amycolatopsis* colonizam uma grande variedade de solo árido ou hiperárido e têm estilos de vida quimio-organotróficos e facultativamente autotróficos. Elas sobrevivem em ambiente

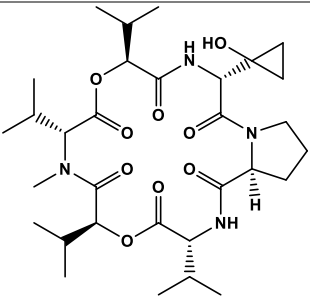
terrestre (inseto, líquen, ilha, planta) e marinho (esponja, sedimento). Os vários habitats em que elas são colonizadas, permitem que as *Amycolatopsis* produzam metabólitos secundários de classes variadas e abundantes.¹³

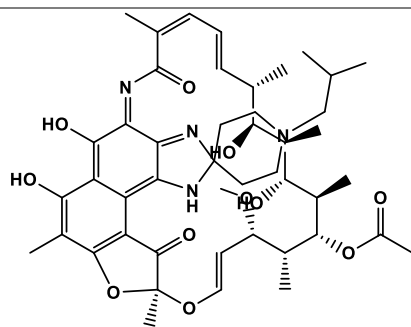
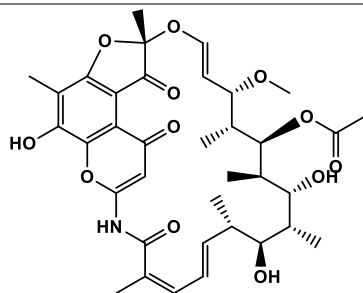
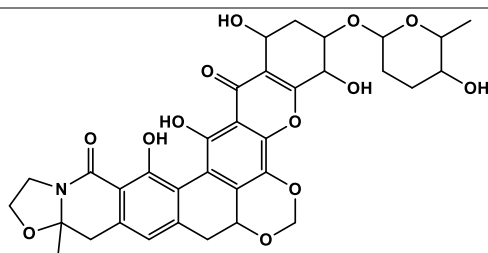
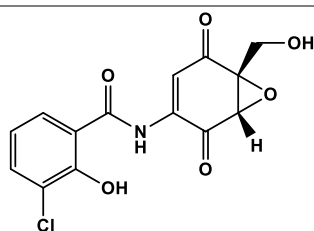
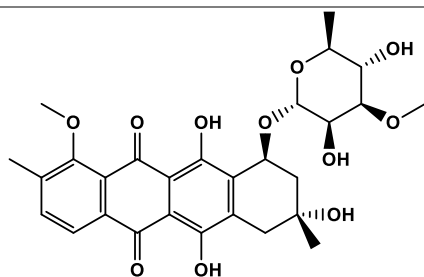
O gênero *Amycolatopsis* é considerado fonte de diversos metabólitos secundários bioativos valiosos, que abrangem muitos antibióticos. Os compostos encontrados para esse gênero em sua maioria são classificados em polifenóis, policetídeos lineares, macrolídeos, macrolactamas, peptídeos triazólicos, peptídeos cíclicos, glicopeptídeos, derivados de amida, derivados de glicosídeo e sesquiterpenos.¹⁴

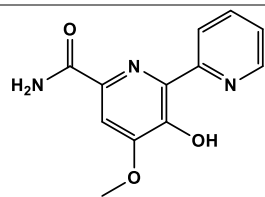
Algumas espécies de *Amycolatopsis* foram relatadas por produzirem vários tipos estruturais de antibióticos, a vancomicina e rifamicina em especial são considerados antibióticos de aplicação clínica comum.^{12,15}

As actinobactérias do gênero *Amycolatopsis* também são exploradas ainda que incipiente em estudo de controle biológico frente a fungos fitopatógenos. Estudos de relações antagônicas com cepas de *Amycolatopsis* BX17 frente a *Fusarium graminearum* RH1 inibiu em 100% o crescimento micelial desse micro-organismo pela secreção de compostos antifúngicos.¹⁶ Além disso, estudos direcionados com cepas de *Amycolatopsis* sp. foram descritos na literatura com concentração inibitória mínima de 6,25 g/L de extrato bruto na total inibição de crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*.¹⁷ Alguns exemplos de compostos biativos (antibióticos) isolados de espécies *Amycolatopsis* estão ilustrados a seguir (Tabela 2).¹²

Tabela 2 - Exemplos de compostos biativos isolados de espécies do gênero *Amycolatopsis*.

Compostos	Origem (Espécie de <i>Amycolatopsis</i>)
 <p data-bbox="459 1809 673 1848">Valgamicina C</p>	<p data-bbox="1011 1720 1382 1758"><i>Amycolatopsis</i> sp. ML1-hF4</p>

**Ansamicina***Amycolatopsis alba***16,17-Desidrorifamicina G***Amycolatopsis mediterranei***Kigamicina A***Amycolatopsis* sp. ML630-mF1**Epoxiquinomicina A***Amycolatopsis sulphurea***Mutactimicina A***Amycolatopsis* sp. 17128

**Dipiramicina B**

Amycolatopsis sp. K16-0194

Com base na importância das actinobactérias na bioprospecção de metabólitos secundários bioativos, surgiu o interesse em investigar o potencial bioativos contra fungo fitopatogênicos de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Amycolatopsis*.

Os capítulos que compõem esse trabalho estão descritos de acordo com os seguintes objetivos principais:

Capítulo 1-Identificar o perfil de compostos orgânicos voláteis das actinobactérias *Streptomyces* ssp. (ACTB-77) e *Amycolatopsis* spp. (ACTB-290) e avaliar o potencial de inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos via COVs, com foco especial na inibição de *Colletotrichum musae*.

Capítulo 2-Investigar os extratos produzidos pela actinobactéria *Streptomyces* ssp. (ACTB-242) por meio de análises de desreplicação na identificação de compostos pertencentes a classe das isocumarinas e piericidinas, assim como avaliar o potencial antifúngico desse extrato frente aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum brevisporum* e *Lasiodiplodia theobromae*.

2 REFERÊNCIAS

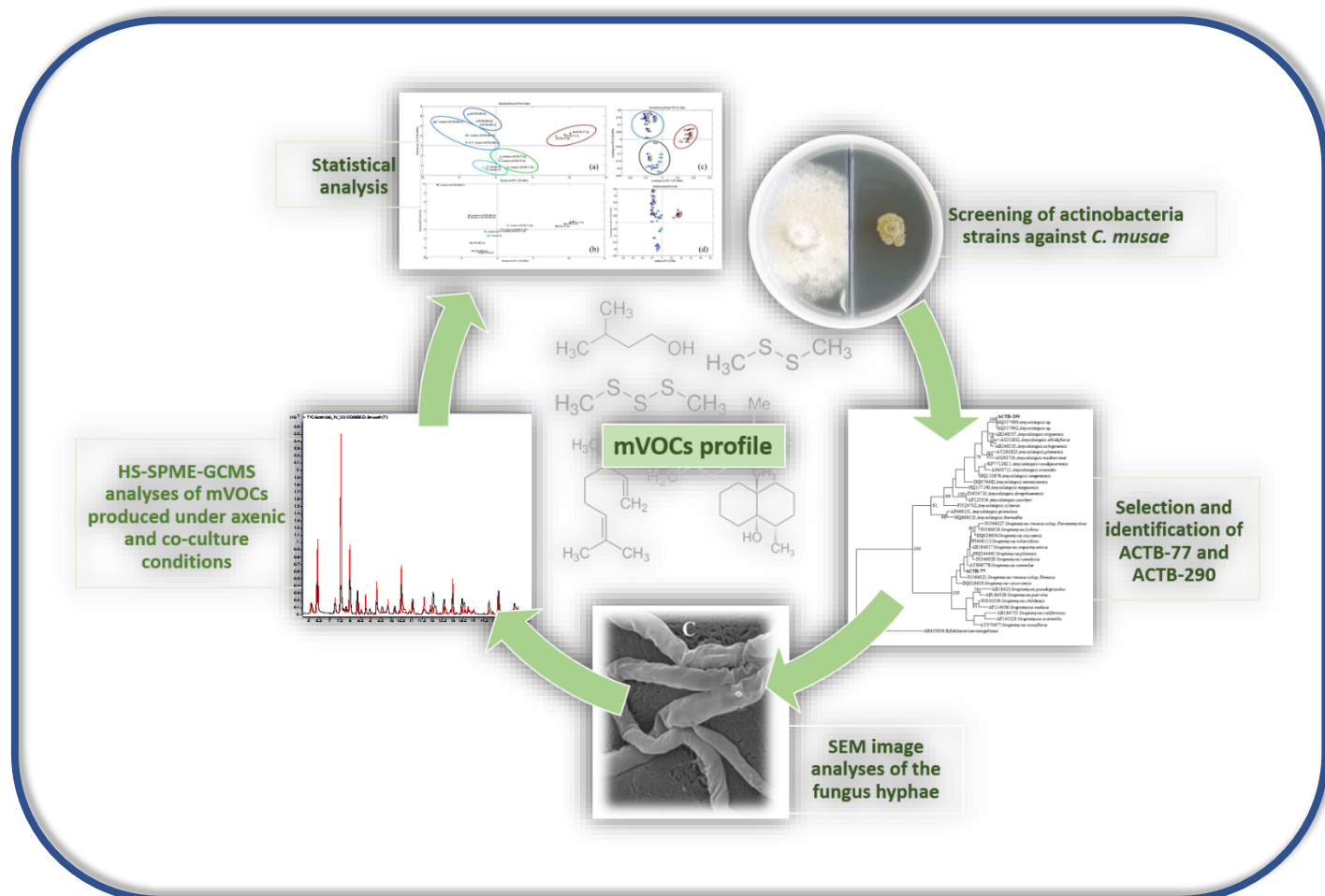
1. Abdel-Razek, A. S.; El-Naggar, M. E.; Allam, A.; Morsy, O. M.; Othman, S. I. Microbial Natural Products in Drug Discovery. **Processes**. v. 8, 2020.
2. Pham, J. V.; Yilma, M. A.; Feliz, A.; Majid, M. T.; Maffetone, N.; Walker, J. R.; Kim, E.; Cho, H. J.; Reynolds, J. M.; Song, M. C.; Park, S. R.; Yoon, Y. J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, 2019.
3. Wang, X.; Zhang, M.; Gao, J.; Pu, T.; Bilal, M.; Wang, Y.; Zhang, X. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. **Biological Control**. v. 127, 2018.
4. Jose, P. A.; Maharshi, A.; Jha, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**. v. 246, 2021.
5. Lima, P.; Rudi, E.; Silva, I. R.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L.; Araújo, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 16, p. 466–471, 2012.
6. Yepes-Garcão, J.; Caicedo-Montoya, C.; Pinilla, L.; Toro, L.F.; Rãos-Esteva, R. Morphological Differentiation of *Streptomyces clavuligerus* Exposed to Diverse Environmental Conditions and Its Relationship with Clavulanic Acid Biosynthesis. **Processes**. v. 8, 2020.
7. Nageh, S. E.; Sayed, A. M.; Mohamed Y.; Manal, M.; Ashraf, A. Antimicrobial quercetin 3-O-glucoside derivative isolated from *Streptomyces antibioticus* strain essamA8. **Journal of King Saud University – Science**. v. 3, p. 1838–1844, 2020.
8. Ham, J. V.; Yilma, M. A.; Feliz, A.; Majid, M. T.; Maffetone, N.; Walker, J. R.; Kim, E.; Cho, H. J.; Reynolds, J. M.; Song, M. C.; Park, S. R.; Yoon, Y. J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, 2019.

9. Jose, P. A.; Maharshi, A.; Jha, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**. v. 246, 2021.
10. Heard, S. C.; Wu, G.; Winter, J. M. Antifungal natural products. **Current Opinion in Biotechnology**. V. 69, p. 232–241, 2021.
11. Nattaporn, K.; Somboon, T.; Pattama, P.; Moriya, O.; Takuji K. *Amycolatopsis stemonae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 65, p. 3894–3899, 2021.
12. Song, Z.; Xu, T.; Wang, J.; Hou, Y.; Liu, C.; Liu, S.; Wu, S. Secondary Metabolites of the Genus *Amycolatopsis*: Structures, Bioactivities and Biosynthesis. **Molecules**. v. 26, 2021.
13. Nie, G. X.; Ming, H.; Li, S.; Zhou, E. M.; Cheng, J.; Tang, X.; Feng, H. G.; Tang, S. K.; Li, W. J. *Amycolatopsis dongchuanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 62, p. 2650–2656, 2012.
14. Sulejman, A.; Mirjana, B.; Ivaylo, J. E.; Antun, H.; Sanja, K.; Dijana, P.; Gordon, S.; Linda, T.; Dinko, Z. Current Trends in Macrocyclic Drug Discovery and beyond-Ro5. **Prog Med Chem**. v. 57, p. 113-233, 2018.
15. Kai, X.; Zheng, Y.; Jiang, J. X.; Jiang, R.; Huang, J.; He, S. H. W. A new phthalazinone derivative and a new isoflavonoid glycoside from lichen associated *Amycolatopsis* sp. **Fitoterapia**. v. 135, p. 85-89, 2019.
16. Rosina C.; Héctor G.; Eneas A.; Jesús, A.; Aldo, H. G. *Amycolatopsis* BX17: An actinobacterial strain isolated from soil of a traditional milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*. **Biological Control**, v. 147, 2020.

17. Sadeghian, M.; Shahidi, B.; Gholam, H.; Sharifi, S.; Gholam R. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. **Postharvest Biology and Technology**. v. 112, p. 46–54, 2016.

Capítulo 1

Biologically active volatile organic compounds (VOCs) produced by rhizospheric actinobacteria strains on growth inhibition of the phytopathogen *Colletotrichum musae*†



Biologically active volatile organic compounds (VOCs) produced by rhizospheric actinobacteria strains inhibit the growth of the phytopathogen *Colletotrichum musae*†

Maria V. de Brito,^a Wéverson L. Fonseca,^b Jair Mafezoli,^a Francisco G. Barbosa,^a Fátima M. Nunes,^a Marcos C. de Mattos,^a João E. A. dos Santos,^a Francisca S. A. Araujo,^c Regimara F. B. S. Vieira,^a Hilton C. R. Magalhães,^c Celli R. Muniz,^c Deborah S. Garruti,^c Marcio A. Ootani,^d José M. S. Netto,^e Licarion Pinto,^e Francisco M. P. Viana,^{c†} Maria C. F. Oliveira,^{a*}

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl. 940, Fortaleza-CE, 60.440-593, Brazil.

^b Colégio Técnico de Bom Jesus-CTBJ, Universidade Federal do Piauí, BR 135, km 3 - Planalto Horizonte, Bom Jesus-PI, 64900-000, Brazil.

^c EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Pernambuco 2270, Pici, Fortaleza-CE, 60511-110, Brazil.

^d Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luiz Freire - lado par, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-540, Brazil.

^e Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Metabolômica e Quimiometria, Av. Jornalista Anibal Fernandes s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-560, Brazil.

Abstract

The antifungal potential of volatile organic compounds (VOCs) produced by actinobacterial strains *Streptomyces* sp. (ACTB-77) and *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) from the rhizosphere of Caatinga plants against *Colletotrichum musae* was investigated. VOCs produced by these microorganisms (axenic and co-culture) were investigated using headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Although no exclusive VOC peaks were observed in the co-culture with ACTB-77, the same experiment involving ACTB-290 yielded five new peaks, including two identified alcohols, suggested as bioreductive products of the corresponding ketones by the fungus. Statistical analysis revealed that co-culture ACTB-77/*C. musae* has a closer similarity to the fungus than to the actinobacteria, while the co-culture ACTB-290/*C. musae* showed closer similarity to the actinobacteria. These confirmed the more pronounced antifungal activity of the ACTB-290 strain, as observed in the fungus growth inhibition experiments. The antifungal activity of ACTB-290 was

* Corresponding author: M. C. F. Oliveira (mcfo@ufc.br)

 <https://orcid.org/0000-0002-7445-2347>

† *In Memoriam*. This paper is dedicated to Dr. Francisco Marto Pinto Viana, Brazilian phytopathologist who motivated us to develop this research and passed away during the manuscript preparation.

associated to its sulfur-containing metabolites, while linalool was suggested as responsible for the ACTB-77 activity.

Keywords: VOCs, HS-SPME-GCMS, *Amycolatopsis*, *Streptomyces*, *Colletotrichum musae*, Antifungal.

1 INTRODUCTION

Colletotrichum species are recognized as phytopathogenic fungi accountable for anthracnose diseases in a great variety of crops distributed worldwide.¹ Among them, *C. musae* is known to be responsible for the main postharvest anthracnose in bananas. This quiescent fungus contaminates the fruit at preharvest stage, and the disease symptoms emerge at postharvest when the fruit achieved advanced stage of maturity.^{2,3} The use of fungicides to control *C. musae* has been considered an unfeasible approach because it demands multiple pulverizations.³ Moreover, it has been observed great demand for fruits with low pesticide residues by consumers. This has forced some countries to have more strict regulations on the maximum limits of pesticides in fruits for import and export.² Therefore, the use of biocontrol agents (BCA) in substitution of chemical fungicides is a greener and more efficient strategy to control phytopathogens, including *C. musae*.^{1,2,3}

Microorganisms present a sophisticated metabolism that is responsible for the production of a myriad of metabolites with diverse molecular structures. Many of the microbial produced compounds, especially those from the secondary metabolism, are known for their biotechnological potential.^{4,5} Besides producing non-volatile chemical structures, microorganisms can also provide volatile organic compounds (VOCs), also referred as microbial VOCs (mVOCs), which play important role in several microbe-microbe interactions.⁶

Microbial VOCs are composed by lipophilic chemical structures with high vapor pressure, which pass through biological membranes (live organism) to be released into the environment where the living organism is found.⁷ Many of these compounds are by-products of primary metabolism yielded through different pathways, such as fermentation, aerobic heterotrophy, amino acid catabolism, sulfur reduction, and terpenoid biosynthesis. It is known about 2,000 mVOCs, with the most common belonging to the chemical classes of alcohols, alkanes, alkenes, aromatic compounds, nitrogen- and sulfur-containing compounds, and terpenes.⁸

When subjected to co-culture techniques, microorganisms can activate silenced genes, leading to the production mVOCs.^{9,10} that will play important role in several microbe-microbe interactions, including antagonism. This latter relationship has been used in studies aiming to identify mVOCs responsible for performing inhibitory activity against phytopathogens.^{11,12} In this context, rhizosphere microorganisms, especially bacterial strains, play an important role in agriculture, protecting plants against phytopathogens,¹³ and being used as biological control agents in the effective management of

plant diseases.¹⁴ It is noteworthy the importance of actinobacteria (filamentous Gram-positive bacteria), which are rich sources of secondary metabolites,^{15,16} being responsible for the production of various VOCs.

Actinobacteria have great potential of VOCs production, with the most frequently identified compounds being butan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, 3-methylbut-3-en-1-ol, 3-methylbutan-1-ol, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 2-phenylethanol and geosmin.^{16,17} This latter mVOC is a sesquiterpene responsible for the “after-the-rain” smell. *Streptomyces* species are responsible for producing many VOCs, most of them derived from terpenoids with antifungal properties and biocontrol effectiveness. For example, methylvinylketone, produced by *S. griseoruber*, is reported to inhibit the germination of spores from the fungus *Cladosporium cladosporioides*.¹⁸ Likewise, VOCs produced by *S. alboflavus* and *S. philanthi* promoted growth inhibition of *Fusarium moniliforme*, *F. fujikuroi*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium citrinum*, *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*.¹⁹ Additionally, VOCs from *S. globisporus* inhibited the mycelial growth, spore germination and appressoria formation of *Botrytis cinerea* in tomato fruits and protected them against post-harvest gray mold caused by this fungus.²⁰

Studies on mVOCs highlight the use of headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME) as appropriate tool to obtain the compounds under relatively mild conditions. The extraction occurs in the absence of solvent, and it is based on the partition equilibrium of analytes between the sample matrix and the extraction phase.^{21,22} Different types of mixed fibers can be used as matrix, including polydimethylsiloxane-divinylbenzene-carboxene (PDMS/DVB/CAR), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS/DVB) and polydimethylsiloxane-carboxene (PDMS/CAR). Therefore, an effective extraction of VOCs using HS-SPME requires the optimization of the protocol, varying important parameters, such as fiber coating and headspace conditions (e.g., extraction time and temperature).²³ After HS-SPME procedure, the separation and identification of the extracted compounds is done through the hyphenated technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).^{24,25}

Comparative studies of mVOCs produced by actinobacteria strains from rhizosphere cultured under axenic and co-culture conditions to identify antifungal compounds are still incipient. Therefore, herein we report the results from the mVOCs produced by twenty actinobacteria strains, isolated from rhizosphere associated to Caatinga growing plants, with antagonist effect against the phytopathogen fungus *Colletotrichum musae*. It is noteworthy that Caatinga is a semi-arid ecosystem found exclusively in Brazil. Because *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) and *Streptomyces* sp. (ACTB-77) were the most promising strains against *Colletotrichum musae*, VOCs produced by these microorganisms under axenic and co-culture conditions were investigated.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Microorganisms and culture medium

Twenty strains of actinobacteria from the rhizosphere of Caatinga plants (**Table 1**) used in this work were obtained from the Laboratory of Phytopathology at Embrapa Tropical Agro-business (CNPAT, Fortaleza, Ceará, Brazil).

Table 1- Actinobacteria strains isolated from Caatinga plants and their respective geographic locations.

Strain code	Plant Source	Geographic location
ACTB-10	<i>Mimosa arenosa</i>	
ACTB-25	<i>M. arenosa</i>	4°11'26,62"S 38°29'50,78"O
ACTB-32	<i>Bauhinia forficata</i>	
ACTB-77	<i>Combretum leprosum</i>	6° 6'1.18"S 39°23'0.29"O
ACTB-166	<i>Sideroxylon obtusifolium</i>	4°33'4.44"S 39°37'53.18"O
ACTB-171	<i>Croton blanchetianus</i>	5°12'55.97"S 37° 0'57.07"O
ACTB-172	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	
ACTB-177	<i>Cordia trichotoma</i>	
ACTB-227	<i>C. trichotoma</i>	
ACTB-242	<i>Cereus jamacaru</i>	
ACTB-246	<i>C. jamacaru</i>	
ACTB0-282	<i>Commiphora leptophloeos</i>	4°33'4.44"S 39°37'53.18"O
ACTB-285	<i>Anadenanthera colubrina</i>	
ACTB-286	<i>A. colubrina</i>	
ACTB-290	<i>A. colubrina</i>	
ACTB-291	<i>A. colubrina</i>	
ACTB-292	<i>A. colubrina</i>	
ACTB-296	<i>A. colubrina</i>	
ACTB-299	<i>Croton blanchetianus</i>	
ACTB-305	<i>Licania rigida</i>	4°33'7.98"S 9°38'24.48"O

The strain of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum musae* (MMBF226/12) was donated by the Biologic Institute of São Paulo. *C. brevisporum* (CMM-1179), *Lasiodiplodia brasiliense* (strains CMM-2248 and CMM-2253), *L. theobramae* (CMM-22004), *L. hormozganensis* (CMM-2211) and *L. viticola* (CMM-2252) strains were from Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Collection of phytopathogenic fungi culture-Prof. Maria Menezes (CMM collection).

All microorganisms were cultured in commercially available potato dextrose agar medium (39.0 g L⁻¹), consisting of 84.4% of potato broth, 8.4% of dextrose and 7.2% of bacteriological agar.

2.2 Screening on actinobacteria producing VOCs with antifungal activity against *C. musae*

The selection of VOCs-emitting actinobacteria strains with antifungal activity followed the methodology described in literature²⁶ with *C. musae* was used as target fungus. The 20 strains of actinobacteria were grown, separately, in PDA for 5 days. Subsequently, a 5 mm disk of the culture of each of these microorganisms was transferred to one side of a bi-Petri Himedia® plate (Figure S1) and the plate was kept for 2 days under a static condition at 28 °C. After that, a 5 mm disk of mycelium of the *C. musae*, previously grown in PDA for 5 days, was inoculated on the other side of the bi-Petri plate (Figure S1). For each experiment, control plates were prepared containing only the *C. musae* (absence of actinobacteria). All the plates were wrapped with double layers of Kasvi® parafilm and incubated under static conditions at 28 °C for 5 days. The inhibition of mycelial growth of the fungus was expressed in percentage (%), Equation 1, considering the average diameters of the fungus growth in the control plate and in the experiment.²⁷ The diameters were measured with an 100mm electronic digital caliper ruler carbon fiber composite vernier. Bioassays were performed in triplicates and the obtained data were analyzed according to one-way ANOVA and the values were considered significant when $p < 0.05$ (GraphPad prism).

$$GI \% = \frac{\varnothing_c - \varnothing_e}{\varnothing_c} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

where \varnothing_c and \varnothing_e represent the average diameters of the growth fungus in the Petri dishes from the control (fungus only) and experimental sample with the actinobacteria, respectively.

2.3 Antifungal activity of VOCs produced by ACTB-290 and ACTB-77 strains against *C. musae*

The antifungal activity of VOCs emitted by actinobacteria *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) and *Streptomyces sp.* (ACTB-77) was assayed against the phytopathogenic fungus *C. musae* using Petri dish Kasvi® (80 mm diameter) and following the double-dishes method.²⁸ A cell suspension (10 µL) of the actinobacteria was inoculated in a Petri dish containing PDA culture medium. The plate was incubated for 48 h, at 28 °C, under static condition. After this period, a 5 mm disk of the previously cultured fungus mycelium (5 days old) was inoculated in the center of another 80 mm diameter Petri dish containing PDA (Figure S2). Then, the Petri dishes containing the microorganisms (actinobacteria and fungus) were placed inversely over each other without the lids to establish a double dish set, and immediately sealed with Kasvi® parafilm. In this case, the distance between the micro-organisms cultures was 1.5 cm (Figure S2). The double dish sets were disposed in manner that the fungus and actinobacteria cultures were disposed at up and down positions, respectively. The experiment was incubated under static conditions at 28 °C and for 5 days. As control experiment, Petri dishes were inoculated with the fungus exposed to

PDA culture medium only. The diameter (mm) of the fungus mycelium was measured daily until the fungus finished growing on the fifth day in the control experiment. Experiments were carried out in triplicate and all data obtained, using the computer GraphPad prism program²⁹, were analyzed according to one-way ANOVA, which determined a significant difference with $p < 0.05$.

2.4 Antifungal activity of VOCs produced by ACTB-290 strain against other phytopathogen fungi

The antifungal activity of VOCs emitted by actinobacteria *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) was assayed against the phytopathogenic fungal strains *C. brevisporum*, *Lasiodiplodia brasiliense*, *L. theobromae*, *L. hormozganensis*, *L. brasiliense* and *L. viticola*, following the same procedure aforescribed for *C. musae*. In this case, the diameter (mm) of each mycelium was measured daily until completed fungus growing in the control experiment, which varied as follows: *C. brevisporum* (8 days), *L. theobromae* (8 days), *L. brasiliense* (strain CMM-2248: 5 days; strain CMM-2253: 4 days), *L. hormozganensis* (4 days) and *L. viticola* (3 days).

2.5 Molecular identification of actinobacteria strains ACTB-290 and ACTB-77

The genomic DNA of all strains was extracted using the Bacterial Genomic DNA purification kit from HIMEDIA (Mumbai, India), following the manufacturer's instructions. DNA quantification was performed by the NanoDrop® 2000c spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), version 1.0, and the concentration of 10 ng μL^{-1} was then diluted and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The nucleotide sequence of the 16S genomic region of ribosomal DNA (rDNA) was amplified by a polymerase chain reaction (PCR) using primers 27F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The PCR mixtures (50 μL) contained 6.25 μL of genomic DNA (10 ng μL^{-1}), 10 μL of 5 x buffer, 1 μL of dNTP (10 mM), 2 μL of MgCl_2 (25 mM), 0.8 μL of each primer (10 mM), 0.5 μL of GoTaq polymerase (5 U μL^{-1}) and 28.65 μL of ultrapure sterile water.

A Flexigene thermal cycler from Techne (Woonsocket, USA) was used in the PCR amplifications, programmed as follows: initial denaturation step at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, followed by 35 denaturation cycles at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 s, annealing at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s and extension $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 s, with a final extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min.³⁰ The PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X Tris Borate EDTA buffer, stained with ethidium bromide (0.5 mg mL^{-1}) for 1 min and visualized under UV. After checking the amplified bands, 40 μL aliquots of each PCR product were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

The nucleotide sequences were edited using the BioEdit program version 7.0.5³¹ and were subjected to identity verification using the basic local alignment search tool (Basic Local

AlignmentSearch Tool = BLASTn) from GenBank³², followed by manually alignment using ClustalW³³ with strings previously published and deposited in GenBank (NCBI). The phylogenetic analyses of maximum parsimony were performed using the PAUP 4.0 program beta 10³⁴. For the analysis of maximum parsimony, the following options were selected: heuristic searches, tree-bisection-reconnection (TBR), branch swapping and MULTREES. The statistical support of the tree was tested using bootstrap analysis with 1,000 replicates.

2.6 Scanning Electron Microscope (SEM) imaging of *C. musae* hyphae

Morphological analyses of *C. musae* was performed in a scanning electron microscope (SEM), model 940 A, from Zeiss DSM (Jena, Germany), at an acceleration voltage of 15 kV. Samples (1-5 mm cubes) of PDA containing the fungus hyphae were transferred to a 2 mL Eppendorf vial already containing 1mL of Karnovsky solution³⁵. After 1 h at room temperature under static conditions, the Karnovsky solution was removed, and samples were washed for 10 min with 0.1 M phosphate buffer solution (3 x 2mL). An aliquot (enough to cover the samples) of 1% solution of OsO₄ was added to the Eppendorf vial and maintained for 1 h at room temperature under static condition. After removing the solution, the samples were washed three times (15 min between each washing) with distilled water, followed by dehydration with increasing concentration of ethanol solution (20, 40, 60, 80 and 100%). Subsequently, the samples were brought to the critical drying point in a critical point drying apparatus, model K850, from Quorum Technologies (Laughton, England), then placed in metallic sample holders (stabs). After being coated with a gold layer, the samples were analyzed in SEM equipment.

2.7 Optimization of mVOCs extraction by HS-SPME

The experiment to optimize mVOCs extraction by HS-SPME was carried out with the actinobacteria *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) and it was based on a similar experiment described in the literature.³⁶ The following Supelco® (Pennsylvania, USA) solid phase microextraction fibers (SPME), needle size 24ga and fiber length 1 cm, were used: polydimethylsiloxane-divinylbenzene-carboxen (PDMS/DVB/CAR; dr: 50/30 µm), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS/DVB; dr: 65 µm) and polydimethylsiloxane-carboxen (PDMS/CAR; dr: 85 µm). The fibers were conditioned prior to use following the manufacturer's recommendations.

The actinobacteria strain was inoculated into Petri dishes containing PDA medium and incubated for 7 days at 28 °C under static condition. Subsequently, 10 mL of the still liquid PDA medium was added to a 20 mL vial. After solidification of the medium in the vial, a 5 mm disk of the previously

inoculated actinobacteria was added. The vial containing the inoculum was immediately closed with silicone septum, closed with a threaded cap and maintained 5 days at 28 °C under static condition. Then, the vial was placed in a water bath (at 30 or 50 °C) and, after 5 min, a fiber was inserted through a hole in the septum (1 cm above the microorganism), Figure S3. The time of VOCs extraction varied from 10 to 40 min. After each extraction time, the fiber was removed from the vial, and inserted into a gas chromatograph (GC-FID) injector model QP-2010s (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) for 5 min at 250 °C (splitless mode) for thermal desorption of the analytes. The GC-FID was equipped with a DB-5MS capillary column (film thickness: 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) from Agilent J&W GC Columns (Santa Clara, USA). Analytical conditions were: GC oven temperature 40 °C for 2 min; 10 °C/min up to 195 °C; 7 °C/min. up to 220 °C; 10 °C/min up to 260 °C. Volumetric flow of the mobile phase (helium gas) of 0.59 mL/min; detector temperature was 250 °C. All experiments were carried out in triplicate, resulting in 72 analyses. Number of peaks and areas were presented as total mean values of all compounds. The obtained data were analyzed using the free software for statistical computing, R Program.³⁷

2.8 HS-SPME and GC-MS analysis of VOCs produced by *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) and *Streptomyces sp.* (ACTB-77) under axenic culture and co-culture with *C. musae*

2.8.1 mVOCs Extraction by HS-SPME

Experiments of VOCs extraction were performed with the actinobacteria *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) and *Streptomyces sp.* (ACTB-77) under axenic culture and co-cultured with *C. musae*. All microorganisms were previously grown, separately, in Petri dishes containing PDA medium for 5 days at 28 °C under static condition. Microbial VOCs extraction by HS-SPME was carried out using the optimized conditions (fiber: PDMS/DVB/CAR; extraction time: 30 min; extraction temperature: 50 °C).

Three 20 mL EPA Sigma Aldrich® vials (PTFE/silicone septum) were used, two for axenic cultures (actinobacteria and fungus) and one for co-culture (actinobacteria together with fungus). PDA medium (10 mL) was added to each vial of axenic culture and the microorganisms (actinobacteria and fungus) were inoculated in the center of each vial. In the case of the co-culture experiment, 3 mL of the culture medium was added to one side of the vial in a horizontal position. After solidification of the PDA medium, an additional 3 mL of the medium was added on the opposite side of the same vial (Figure S4). Initially, a 5 mm disk of the actinobacteria strain previously inoculated in the Petri dish was added to the vial corresponding to its individual culture and another 5mm disk to one side of the vial of the co-culture experiment. After 48 h, a 5 mm disk of the fungus previously inoculated in the Petri dish was added to

the flask corresponding to the individual culture experiment and another 5 mm disk to the other side of the flask of the co-culture experiment (opposite side of the actinobacteria strain).

After 5 days of microorganisms' inoculation, all vials were placed in water bath at 30 °C and, 5 min later, the PDMS/DVB/CAR fiber was inserted through a hole in the septum (1 cm above the microorganism). Microbial VOCs were extracted for 30 min at 30 °C. Then, the fiber was removed and inserted into the GC-MS injector using the same conditions previously described in the experimental optimization of mVOCs extraction by HS-SPME. The experiments were carried out in triplicate and PDA medium (without microorganism) was used as control, resulting in 18 analyses (3 axenic culture of ACTB-290; 3 axenic culture of ACTB-77; 3 axenic culture of *C. musae*; 3 co-culture of ACTB-290 + *C. musae*; 3 co-culture of ACTB-77 + *C. musae*; 3 control).

2.8.2 mVOCs Analysis by GC-MS

Extracted mVOCs were analyzed in a gas chromatograph (GC model 7890B) coupled to a mass spectrometer (MS model 5977A MSD) from Agilent Technologies Spain (Madrid, Spain). Compounds were separated in GC using the same conditions previously described in the experimental optimization of mVOCs extraction by HS-SPME. Electron impact (70 eV) MS data were recorded with m/z from 50 to 500 Daltons at intervals of 0.5s.

Compound identification was carried out by comparison of the mass spectra obtained for each compound with the one reported in mass spectral libraries,³⁸ including NIST 05 and NIST 27 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA),³⁹ as well as PUBCHEM⁴⁰. Additionally, the Kovats index was calculated for each compound using a mixture of saturated *n*-alkanes C7-C30.

2.9 Statistical analysis of the experiments

The data matrices were used in the present work for pattern recognition statistical analysis after a pretreatment. This latter corresponds to the integrated peaks of the major compounds after removing all peaks of the control experiments (culture medium blank) and baseline (noise and low concentration peaks).

Matrix 1 refers to *C. musae*, ACTB-77 and their co-culture (*C. musae* and ACTB-77); matrix 2 refers to *C. musae*, ACTB-290 and their co-culture (*C. musae* and ACTB-290); matrix 3 refers all samples used in matrices 1 and 2. For all these matrices, lines correspond to these samples and columns correspond to the mVOCs peaks after the pretreatment. The organized matrices were autoscaled and then subjected to a principal component analysis (PCA) to observe differences and similarities between the

samples. For matrix 1 and 2, two principal components (PC) were used while three PCs were used for matrix 3. PCA calculations were performed using PLS-ToolBox 5.2⁴¹ and Matlab® 2010⁴².

The significant differences between each group were calculated with a t-test using the scores values of each individual class, similar to what was initially used in the SIMCA (Soft Independent Method of Class Analogy) models.⁴³

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Screening on actinobacteria producing VOCs with antifungal activity against *C. musae*

Twenty strains of actinobacteria isolated from rhizosphere of plants from Caatinga biome (**Table 1**) were assayed for their ability to produce VOCs capable to inhibit the growth of *C. musae*, a phytopathogen fungus responsible for causing anthracnosis in banana culture.² Experiments were performed in bi-Petri dishes (**Figure 1**) and growth inhibition (GI) was recorded after 5 days of culturing. GI percentages were calculated through comparison between the control experiments (fungus only; GI 0%) and experiments with both microorganisms (fungus and actinobacteria). **Figure 1** shows that all actinobacteria strains assayed promoted fungal growth inhibition (GI 50.3-73.7%) and, among them, ACTB-77 (GI 68.0%) and ACTB-290 (GI 73.7%) promoted the highest inhibitory effect. Therefore, these two strains were selected for molecular identification and further VOCs investigation under axenic and co-culture conditions.

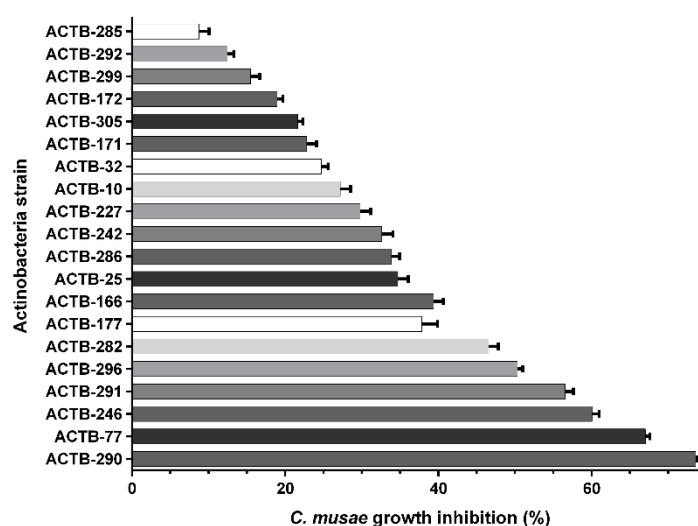


Figure 1- Growth inhibition (%) of *C. musae* by volatile organic compounds (VOCs) produced by the twenty actinobacteria strains assayed, calculated through comparison of the control experiments (fungus only; GI 0%) and experiments with both microorganisms (fungus and actinobacteria).

3.2 Molecular identification of strains ACTB-77 and ACTB-290

The promising antifungal potential of VOCs produced by strains ACTB-77 and ACTB-290 in the growth inhibition of *C. musae* motivated their identification by molecular approach. Strains ACTB-77 and ACTB-290 showed 99% similarity to *Streptomyces* spp. and *Amycolatopsis* spp., respectively. According to the most parsimonious phylogenetic tree (Figure 2) obtained from the 16S sequence data set of strains of the genus *Amycolatopsis*, the sequence of strain ACTB-290 was grouped in a clade with strains of *Amycolatopsis* sp. with 100% bootstrap support, strain while ACTB-77 was grouped in a distinct clade of the genus *Streptomyces* sp.

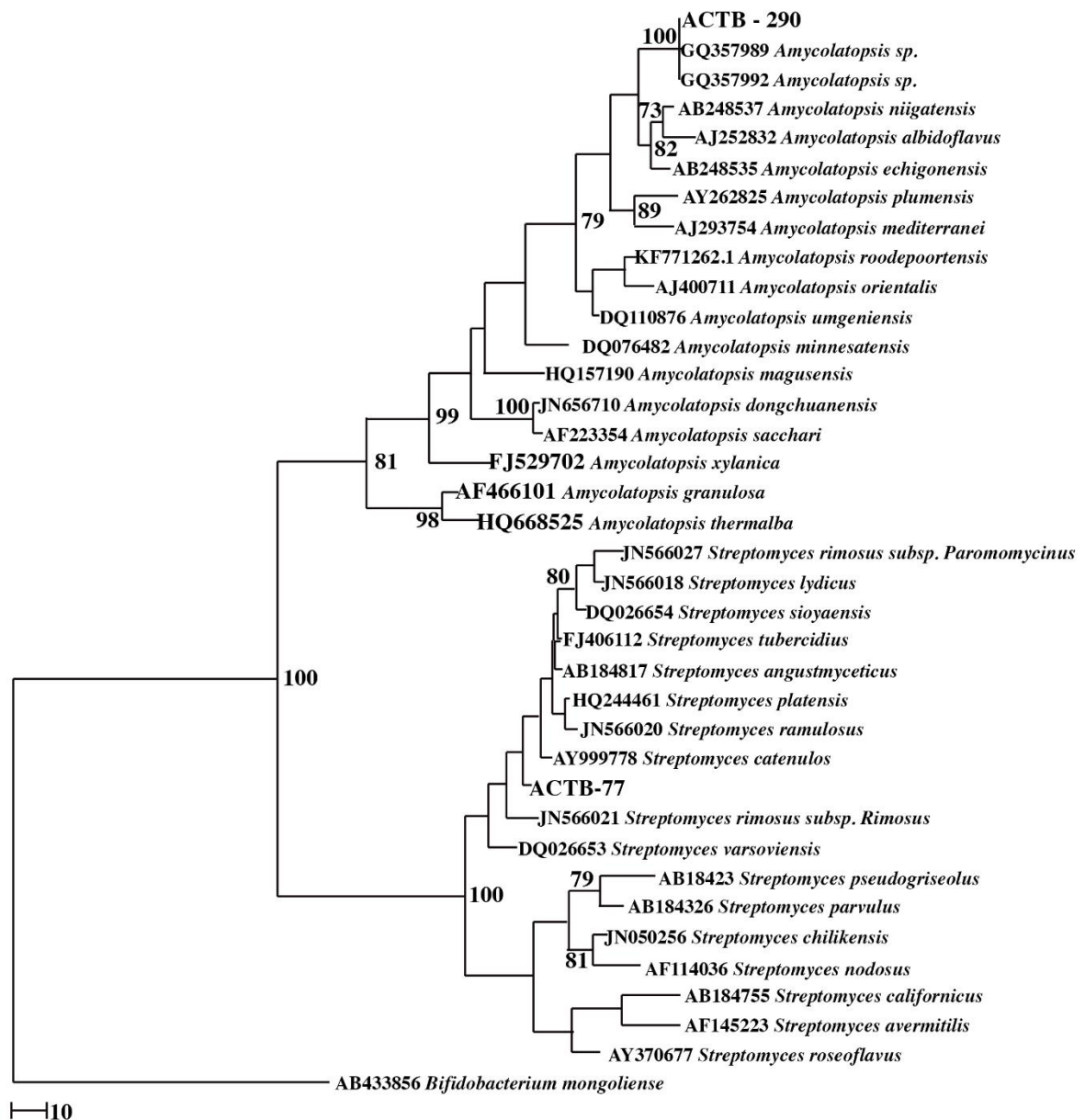


Figure 2- Phylogenetic tree inferred by maximum parsimony (MP) of data from the 16S genomic region of the rDNA for sequences of the genera *Amycolatopsis* and *Streptomyces*. Bootstrap values (> 70%) with 1000 repetitions are shown in the

respective branch. *Bifidobacterium mongoliense* was used as an external group. The sequences in this study are highlighted in bold.

3.3 Antifungal activity of VOCs from *Streptomyces* sp. (ACTB-77) and *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) against *C. musae*

To evaluate the antifungal activity of VOCs produced by the two selected strains in more detail, a new experiment was carried out to monitor the growth inhibition starting from the first day of microbial inoculation until the fifth day of experiment when the control fungus strain occupied 100% of the Petri dish. As observed in **Figure 3**, the two strains promoted similar growth inhibitions of the fungus, which initiated from the second day of incubation and continued until the end of the experiment.

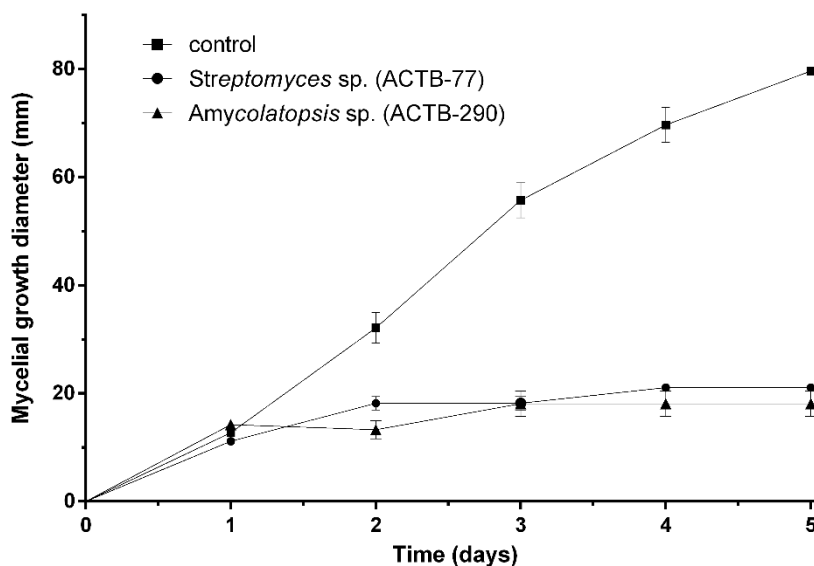


Figure 3 -Results from the antifungal activity of *Streptomyces* sp. (ACTB-77) and *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) against *C. musae*.

3.4 SEM imaging of *C. musae* hyphae

The Petri dishes from the fifth day of the afore mentioned assays (control and co-culture) were used to investigate the mVOCs effects on the morphological structure of the fungus hyphae by scanning electron microscopy (SEM), **Figure 4**.

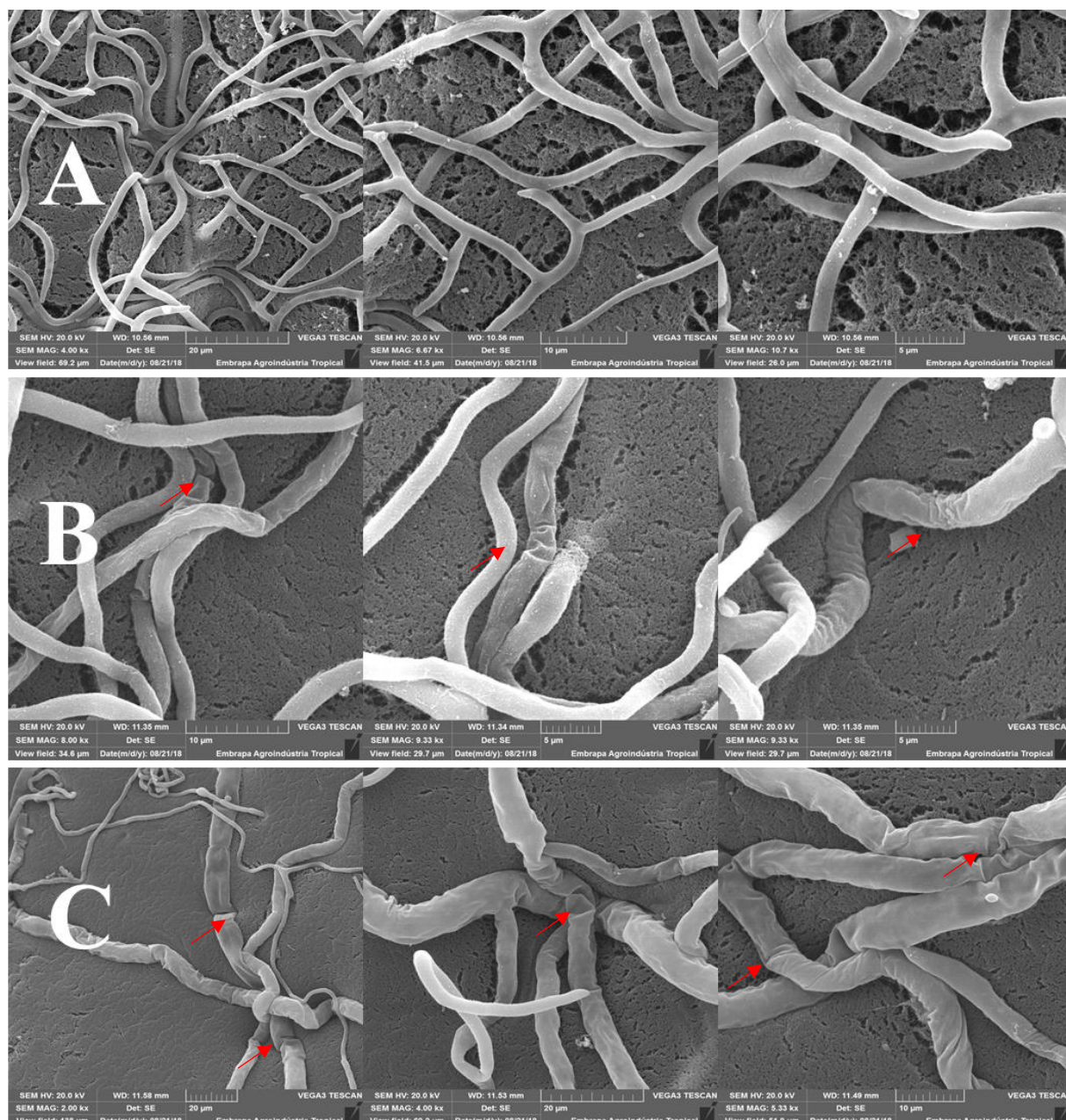


Figure 4 -SEM imaging (20 μ M) of *C. musae* hyphae in the fifth day of experiment: (A) under axenic culture (control); (B) in co-culture with *Streptomyces* sp.; (C) in co-culture with *Amycolatopsis* sp.

Figure 4A shows the perfect stage of *C. musae* hyphae under axenic cultured (control), with fungal cell structure having straight, cylindrical and long hyaline (non-septate hyphae), and their walls remaining smooth and shiny.⁴⁴ The effect of VOCs from actinobacteria ACTB-77 strain on *C. musae* hyphae is observed in **Figure 4B**. Although most of the hyphae showed wrinkled and withered aspects, a small portion of cell filaments was partially unharmed, and no breakage of the hyphae was observed. SEM image of fungus hyphae from co-culture experiment with ACTB-290 strain is depicted in **Figure 4C**. In this case, it was observed the deformation of all filaments of residual cells, with wrinkled, withered (loss of turgor) and brittle aspects, suggesting a possible leakage of the intracellular material.

Thus, SEM imaging analysis of *C. musae* hyphae revealed that VOCs produced by the actinobacteria strains during co-culture experiments promote deformation of the fungal cell filaments. The highest antifungal activity of VOCs from *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) was corroborated through the greatest damage observed in the fungal hyphae image.

3.5 Antifungal activity of VOCs from Amycolatopsis sp. (ACTB-290) against Lasiodiplodia and Colletotrichum strains

The antifungal potential of VOCs from *Amycolatopsis sp.* against *C. musae* motivated the investigation of the activity of this strain against other species of phytopathogenic fungi, one from *Colletotrichum* genus (*C. brevisporum*) and five species of *Lasiodiplodia* (*L. brasiliense*, *L. theobramae*, *L. harmozganensis*, *L. brasiliense* and *L. viticola*), Figure 5.

Among the tested fungal strains, the VOCs of ACTB-290 presented significant growing inhibition (GI > 50%) of *C. brevisporum* (GI 76.0%), *L. theobramae* (GI 68.0%) and *L. harmozganensis* (GI 54.4%). Comparison of these results with those obtained previously against *C. musae* (GI 80.5%) suggests that the actinobacteria is more selectivity to *Colletotrichum* species.

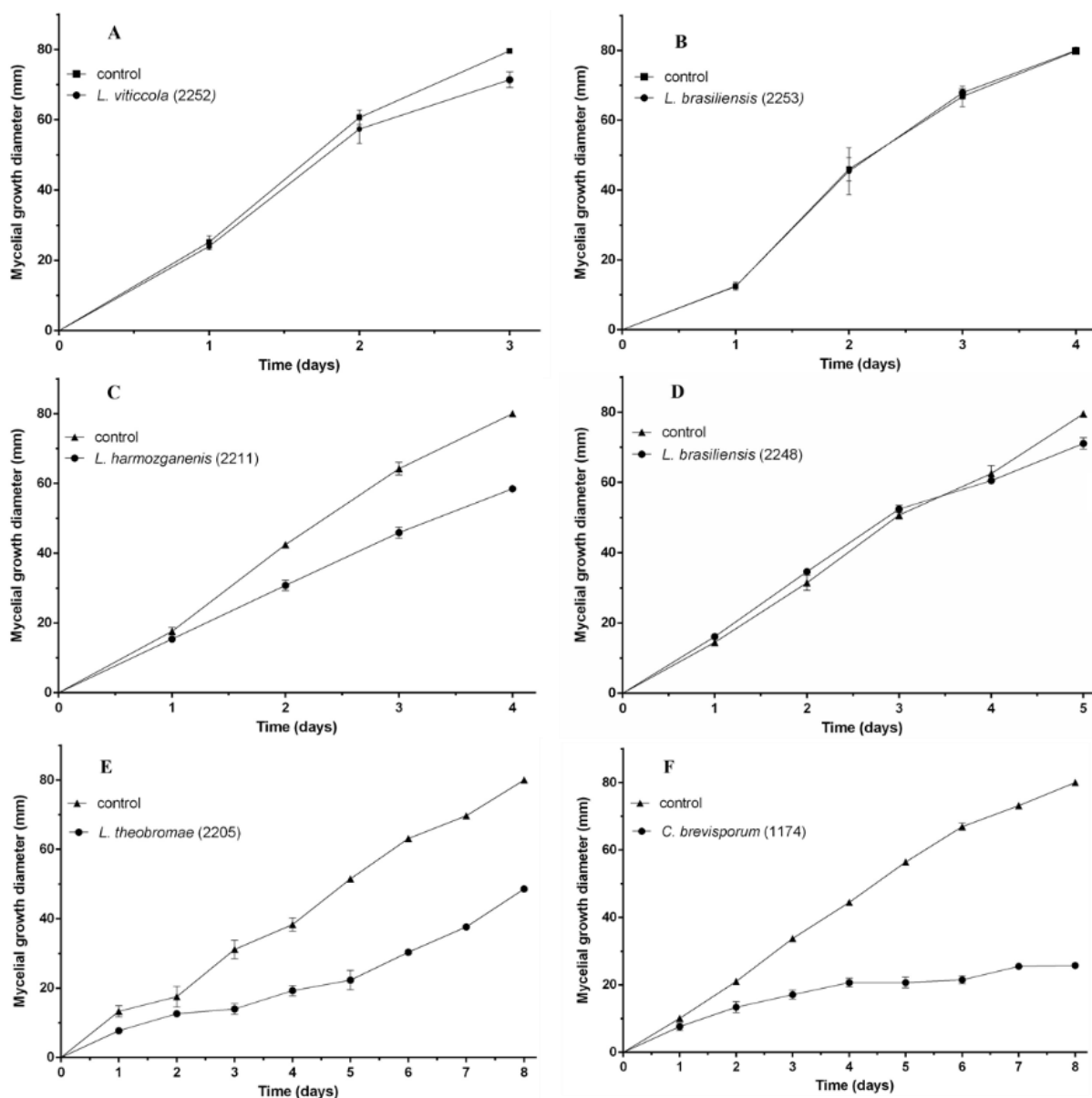


Figure 2 -Results from the antifungal activity of *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) against: (A) *Lasiidiplodia viticola*; (B) *L. brasiliensis*-2253; (C) *L. brasiliensis*-2248; (D) *L. theobromae*; (E) *Colletotrichum brevisporum*. Fungus strain under axenic culture is the control experiment.

3.6. Identification of VOCs produced by *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) and *Streptomyces* sp. (ACTB-77) under axenic culture and co-culture with *C. musae*

3.6.1 Optimization of the VOCs extraction from *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) by HS-SPME

As already mentioned, studies on mVOCs first require the experiment optimization by varying fiber coating and headspace conditions.²³ Thus, experiment optimization involved the actinobacteria ACTB-290 by varying fiber coating (PDMS/DVB/CAR, PDMS/DVB and PDMS/CAR), the extraction

time (10, 20, 30 and 40 min) and temperature (30 and 50 °C). Microbial VOCs were analyzed by GC-MS and evaluated in relation to the quantity and area of the peaks in each experiment. Based on the variation of the observed error, it was concluded that temperature is a significant factor, being more important than the extraction time. However, when analyzing the interactions between fiber, extraction time and temperature, it was noticed that, for this matrix, these variables are independent. After all data analyses of the optimization experiments of the mVOC extraction of ACTB-290 by HS-SPME, the optimum conditions were established as: fiber coating PDMS/DVB/CAR, extraction time 30 min and extraction temperature 50 °C.

3.6.2. Identification of VOCs produced by the microorganisms

The actinobacteria strains, *Streptomyces sp.* (ACTB-77) and *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290), and the phytopathogen fungus *C. musae* were cultured (axenic and co-culture conditions) in PDA medium for mVOCs production. For all microorganisms, HS-SPME experiments were performed using the optimized conditions (PDMS/DVB/CAR, 50 °C and 30 min). Analyses of their respective VOCs were done by GC-MS and their composition are displayed at **Table 2**. Mass spectra of the microbial produced compounds are available in Figure S5.

Table 2. Volatile organic compounds (VOCs) produced by the rhizosphere actinobacteria *Streptomyces sp.* (ACTB-77) and *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) strains, and the phytopathogen fungus *Colletotrichum musae* (CM) under axenic and co-culture conditions. Compounds listed and numbered (column Nr.) by crescent order of their RI.

Compound			Axenic culture				Co-culture	
Nr	Name	RI	RI*	Peak area (% ± SD)			Peak area (% ± SD)	
				CM	ACTB-77	ACTB-290	CM+ ACTB-77	CM+ ACTB-290
1	3-Methyl-butan-1-ol	731	731	23.82 ± 2.07	1.77 ± 0.11	-	6.42 ± 0.75	5.76 ± 0.09
2	2-Methyl-butan-1-ol	732	732	5.85 ± 0.31	0.98 ± 0.08	-	2.43 ± 0.26	2.51 ± 0.02
3	3-Methyl-pentan-2-one	747	750	-	2.03 ± 0.04	-	-	-
4	Dimethyl disulfide	752	751	-	-	48.49 ± 3.48	-	2.18 ± 0.68
5	3-Methylbutan-1-ol acetate	869	869	0.96 ± 0.04	-	-	-	-
6	2,4-Dithiapentane	893	892			4.32 ± 0.85		0.58 ± 0.11
7	6-Methyl-heptan-2-one	947	949	-	-	2.47 ± 0.07	-	0.77 ± 0.06
8	Dimethyl trisulfide	976	976			21.14 ± 3.50		0.76 ± 0.25
9	β-Myrcene	980	988	1.14 ± 0.22	4.95 ± 0.65		1.33 ± 0.02	0.66 ± 0.07
10	Not identified	985				0.94 ± 0.04		0.36 ± 0.05
11	2-Methylenebornane	990	(n.f)*			1.13 ± 0.04		0.78 ± 0.20
12	α-Phellandrene	994	1002	8.09 ± 1.72	-	-	11.94 ± 0.39	11.91 ± 0.65
13	α-Terpinene	1008	1014	3.43 ± 0.74	-	-	4.22 ± 0.05	6.02 ± 0.21
14	p-Cymene	1017	1020	3.16 ± 0.47	-	-	3.50 ± 0.11	3.47 ± 0.28
15	β-Phellandrene	1023	1025	28.38 ± 4.89	-	-	43.01 ± 1.53	44.71 ± 2.61
16	2-Methyl-2-bornene	1023	1021			2.42 ± 0.26		
17	trans-β-Ocimene	1042	1044		2.41 ± 0.35	-	-	-
18	Methyl 2-ethylhexanoate	1048	1043			2.49 ± 0.04		0.53 ± 0.01
19	Not identified	1058				2.13 ± 0.74		1.29 ± 0.54

20	1-Octanol	1064	1063		1.52 ± 0.24			
21	Linalool	1092	1095		38.53 ± 5.19		6.08 ± 0.49	
22	2-Nonanone	1094	1090			1.14 ± 0.24		2.40 ± 0.10
23	2-Nonanol	1102	1097					0.47 ± 0.04
24	Phenylethyl alcohol	1106	1107	7.44 ± 0.62			1.97 ± 0.32	3.31 ± 0.30
25	<i>allo</i> -Ocimene	1123	1127		0.71 ± 0.11			
26	Not identified	1129			1.7 ± 0.23			
27	Methyl(methylthio)methyl disulfide	1135	1134			1.95 ± 0.07		
28	<i>p</i> -Menthone	1148	1148	0.97 ± 0.26			1.26 ± 0.10	1.93 ± 0.06
29	<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	1160	1165	0.72 ± 0.06			0.43 ± 0.08	
30	2-Decanone	1162	1167			0.80 ± 0.07		0.92 ± 0.12
31	Menthol	1166	1167	1.39 ± 0.15			0.31 ± 0.03	0.58 ± 0.11
32	2-Methylisoborneol	1177	1180			2.27 ± 0.05		1.51 ± 0.24
33	Not identified	1182				0.76 ± 0.09		
34	<i>p</i> -Mentha-1(7),2-dien-8-ol	1184	1186	1.64 ± 0.15				0.62 ± 0.15
35	α -Terpineol	1186	1186		1.10 ± 0.63		1.68 ± 0.08	
36	Thymol methyl ether	1228	1230		5.06 ± 0.55		0.95 ± 0.05	
37	Carvacrol methyl ether	1235	1240		4.24 ± 0.68		0.64 ± 0.03	
38	Geraniol	1249	1249		1.86 ± 0.43		0.49 ± 0.03	
39	Not identified	1254			1.55 ± 0.25		0.80 ± 0.09	
40	Not identified	1261				1.64 ± 0.17		0.42 ± 0.09
41	1-Decanol	1264	1266		0.79 ± 0.07			
42	Not identified	1284			0.75 ± 0.04		0.23 ± 0.01	
43	2-Undecanone	1296	1293			0.93 ± 0.11		0.35 ± 0.05
44	2-Undecanol	1303	1301					0.65 ± 0.05
45	Not identified	1330			0.52 ± 0.05			
46	Silphinene	1335	1339	0.42 ± 0.06			1.33 ± 0.49	0.43 ± 0.02
47	Not identified	1337			0.71 ± 0.10			
48	2-Dodecanone	1362	1361			1.45 ± 0.05		0.19 ± 0.05
49	Not identified	1370				0.87 ± 0.04		0.48 ± 0.05
50	Not identified	1375						0.28 ± 0.03
51	Not identified	1401			1.69 ± 1.19		0.66 ± 0.05	
52	Geosmin	1410	1399		17.25 ± 2.55		3.08 ± 0.16	
53	Not identified	1446						0.30 ± 0.04
54	2-Tridecanone	1464	1467			0.67 ± 0.04		0.31 ± 0.07
55	Not identified	1470			1.03 ± 0.14			
56	Not identified	1470						0.39 ± 0.03
57	β -Chamigrene	1476	1476	0.91 ± 0.19			0.48 ± 0.05	0.39 ± 0.05
58	γ -Gurjunene	1479	1479		0.39 ± 0.08			
59	Aristolochene	1486	1487	7.56 ± 1.41			3.50 ± 0.19	
60	α -Selinene	1498	1498	3.60 ± 0.75			1.76 ± 0.21	1.54 ± 0.20
61	Viridiflorene	1501	1497		0.39 ± 0.06			
62	Not identified	1515			0.73 ± 0.13			
63	7- <i>epi</i> - α -Selinene	1522	1520	0.53 ± 0.11			0.47 ± 0.05	0.20 ± 0.02
64	Selina-3,7(11)-diene	1539	1542		6.92 ± 0.09		1.43 ± 0.12	
65	2-Tetradecanone	1565	1570			1.02 ± 0.03		
66	(<i>Z</i>)-8-Dodecen-1-ol acetate	1588	1588			0.13 ± 0.02		
67	1-Tetradecanol	1643	1647			0.83 ± 0.07		
68	α -Eudesmol	1647	1652		0.26 ± 0.02			
69	Mint sulfide	1738	1740		0.2 ± 0.02			

RI: retention index; RI*: retention index from literature³⁸; n.f.: not found; SD: standard deviation; a Although the RI* from literature is missing for compound 11, it was identified by comparison of its mass spectra with that published in the literature³⁸ for the compound 2-methylenbornane.

3.6.3 mVOCs profile under axenic culture

3.6.3.1 Fungus *C. musae*

The study on VOCs produced by *C. musae* under axenic culture resulted in 18 recorded peaks, all of them identified by GC/MS analysis (Table 2). Among them, 3-methyl-butan-1-ol (**1**) and β -phellandrene (**15**) were found as the main compounds. These two compounds, together with α -phellandrene (**12**), phenylethyl alcohol (**24**) and aristolochene (**59**) represent *ca.* 75% of the mVOCs peak area. Constituents from *C. musae* were distributed into three different cases, non-terpenoids (4 compounds; *ca.* 38% total area), monoterpenes (9 compounds; *ca.* 49% total area); sesquiterpenes (5 compounds; *ca.* 13% total area). No reports on VOCs produced by either *C. musae* or any other congener species were found in the literature for comparison purposes. Instead, the literature reports studies on VOCs either from bacteria strains with inhibition of *Colletotrichum* species.^{45, 46} or from plants/fruits contaminated with some fungus strains.^{47, 48}

3.6.3.2 Actinobacteria *Streptomyces* sp. (ACTB-77)

The study on VOCs produced by ACTB-77 strain under axenic culture yielded 27 peaks recorded in the GC chromatogram (Table 2). Among them, 70% of the compounds (19 peaks) were identified, together representing *ca.* 91% of the total area of all recorded peaks. The monoterpene linalool (**21**) and the sesquiterpene geosmin (**52**) were found as the main constituents, these two compounds accounting for *ca.* 56% of the mVOCs peak area. The identified compounds included non-terpenoids (6 compounds; *ca.* 8% total area), monoterpene (9 compounds; *ca.* 76% total area) and sesquiterpene (5 compounds; *ca.* 8% total area). Sesquiterpene mint sulfide (**69**) was the only sulfur-containing compound produced by ACTB-77.

Some of these non-terpenoid compounds have been reported as by-products from primary metabolic pathways of actinomycetes.⁸ Previous investigations of VOCs profiling of *Streptomyces* isolates were reported in literature.^{17,49} A total of twenty-six *Streptomyces* strains were assayed for their ability to produce VOCs.¹⁷ In this study, 53 compounds were identified out of the 120 detected peaks. The compounds were classified as alkanes, alkenes, alcohols, esters, ketones, sulfur-compounds, and terpenes. As for ACTB-77, 3-methyl-butan-1-ol (**1**), 2-methyl-1-butanol (**2**), and geosmin (**52**) are among the most frequent compounds produced by the microorganisms. A similar study involved VOCs production of twelve *Streptomyces* strains, eleven of them from rhizosphere. Besides the presence of alcohols, aldehydes and terpenes, geosmin (**52**) was the common constituent to all isolates.⁴⁹

The production of the monoterpene linalool (**21**) as major constituent by ACTB-77 called special attention in this work since similar result was found only in previous studies on VOCs produced by two strains of *S. philanathi*, RM-1-138.¹⁹ and RL-1-178,⁵⁰ both isolated from the rhizosphere soil of chili peppers in Thailand. Among the 39 mVOCs produced by RL-1-178 strain under axenic cultured in wheat seed medium, linalool (**21**; 13.55%) and geosmin (**52**; 13.75%) were also found as the major compounds.⁵⁰ Linalool (**21**; 9.06%) was the main compound produced by RM-1-138 strain under the same experimental conditions, while geosmin (**52**) was found in only 1.23%.

S. clavuligerus linalool synthase (bLinS) was discovered and identified as catalysts for linalool production using metabolic engineering platform.⁵¹ The use of bLinS in metabolically engineered monoterpene-producing *E. coli* strains yielded a 300-fold higher linalool production compared with the corresponding linalool synthase from plant. Therefore, the identification of this monoterpene as major constituent produced by ACTB-77 and *S. philanathi* (RM-1-138 and RL-1-178 strains),^{19,50} may represent examples of linalool synthase expression in *Streptomyces* strains. It is worth highlighting that linalool has high commercial value since it is used in fragrance, cosmetic and non-cosmetic products, as well as intermediate in organic syntheses. Thus, the use of commercial linalool reaches more than 1,000 metric ton/year worldwide.⁵¹

Comparison between VOCs produced by the actinobacteria ACTB-77 and those identified for the fungus *C. musae*, revealed compounds 3-methyl-butan-1-ol (**1**), 2-methyl-butan-1-ol (**2**) and β -myrcene (**9**) as the only chemical constituents common to both the microorganisms. Nevertheless, despite the alcohol **1** is a major compound produced by the fungus (23.82 \pm 2.07%), it is found in only 1.77 \pm 0.11% in the actinobacteria VOCs peak area. Both microorganisms produced β -myrcene (**9**) in low concentrations, 1.14 \pm 0.22% (*C. musae*) and 4.95 \pm 0.65% (ACTB-77 strain).

3.6.3.3 Actinobacteria *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290)

The study on VOCs produced by ACTB-290 strain under axenic culture provided 22 peaks recorded in the GC chromatogram (**Table 2**). From these, 17 peaks (82% of the peaks) were identified, accounting for *ca.* 94% of the total area of all recorded peaks. Dimethyl disulfide (**4**) and dimethyl trisulfide (**8**) were the major compounds, together representing *ca.* 70% of the VOCs peak area. Besides these two, 2,4-dithiapentane (**6**) and methyl(methylthio)methyl disulfide (**27**) were also identified as sulfur-containing compounds. The identified compounds included four sulfur-derivatives (*ca.* 76% total area), nine non-terpenoids (*ca.* 12% total area) and three bicyclic monoterpenes (*ca.* 6% total area).

Actinobacteria from *Streptomyces* and *Amycolatopsis* genera are known to be prolific sources of non-volatile antibiotic compounds.⁵² Nevertheless, different from *Streptomyces* that has a VOCs profile reported from some of its species, no study on VOCs identification of *Amycolatopsis* species was

found in the literature. A significant difference was clearly observed between the VOCs profile of these two actinobacteria strains. While *Streptomyces* sp. (ACTB-77) produced terpenes (**21** and **52**) as main constituents, *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290) yielded sulfur-containing compounds (**4** and **8**) as predominant in its VOCs peak area. It should be said that, although dimethyl disulfide (**4**) and dimethyl trisulfide (**8**) were not produced by *Streptomyces* sp. (ACTB-77), they have been included as two common constituents on the list of putative VOCs from eleven *Streptomyces* strains isolated from a *Rhizoctonia*-suppressive soil, as well as from a strain of *S. lividans*.⁴⁹ Additionally, comparison between VOCs profiles of actinobacteria ACTB-290 and *C. musae* showed no common compounds for these two microorganisms.

3.6.4 mVOCs profile under co-culture

3.6.4.1 Co-culture of ACTB-77 and *C. musae*

During the co-culture experiment for mVOCs extraction by HS-SPME it was clearly observed the inhibition of the fungus growing, corroborating the already discussed antifungal activity of ACTB-77 against *C. musae*. GC/MS analysis of the VOCs produced by the microorganisms in the co-culture experiment yielded 26 peaks (**Table 2**). Among them, only 3 compounds (*ca.* 1.7% of the total area) were not identified.

As already mentioned, compounds 3-methyl-butan-1-ol (**1**), 2-methyl-butan-1-ol (**2**) and β -myrcene (**9**) were the only VOCs produced by both microorganisms under axenic culture. These three compounds were also identified in the co-culture. Excluding these compounds, comparison of the VOCs profile of the actinobacteria under axenic culture (24 exclusive peaks) and that from the co-culture with the fungus revealed only ten compounds from ACTB-77. These were: linalool (**21**), α -terpineol (**35**), thymol methyl ether (**36**), carvacrol methyl ether (**37**), geraniol (**38**), geosmin (**52**) and selina-3,7(11)-diene (**64**), besides three non-identified. Therefore, fourteen VOCs produced by the actinobacteria under axenic culture were not detected in the co-culture experiment. It is worth highlighting that, **21** and **52**, both major compounds produced by the actinobacteria under axenic culture, showed a low percentage of peak area in the co-culture.

α -Phellandrene (**12**) and β -phellandrene (**15**), both compounds identified as *C. musae* VOCs under the axenic culture, were the major constituents in the co-culture. In this latter experiment, a considerable increment in the production of **15** by the fungus was observed. Studies from the literature revealed the antibacterial activity of fruit and plant essential oils with high content of the sesquiterpene **15**.^{53, 54} This suggests that the increment of this compound in the co-culture may be a fungal defense.

The antifungal activity of VOCs produced by *Streptomyces sp.* (ACTB-77), may be due to the presence of monoterpenes (especially linalool, **21**) with the bioactivity already reported in the literature.^{55,56,57,58,59}

3.6.4.2 Co-culture of ACTB-290 and *C. musae*

As observed for the co-culture experiment of ACTB-77 and *C. musae*, during the VOCs extraction of ACTB-290 co-cultured with the same fungus it was observed inhibition of the fungus growing. GC/MS analysis of the VOCs produced in the co-culture experiment recorded 36 peaks, with 29 of them (81%; *ca.* 96% of the total area) being identified (**Table 2**). Comparison of the peaks recorded in this experiment with those from the axenic cultures of the microorganisms, it was observed that 16 peaks (4 non-identified compounds) were related to compounds produced by the actinobacteria, 15 peaks were produced by the fungus, and 5 peaks (3 non-identified compounds) were related exclusively to the co-culture.

Among the 22 VOCs produced by the actinobacteria ACTB-290 cultured under axenic condition, only 2-methyl-2-bornene (**16**), methyl(methylthio)methyl disulfide (**27**), 2-tetradecanone (**65**), (Z)-8-dodecen-1-ol acetate (**66**) and 1-tetradecanol (**67**), besides one of the non-identified compounds (RT 10.87 min.), were not observed in the co-culture. Concerning to *C. musae*, only compounds 3-methylbutan-1-ol acetate (**5**), *p*-menta-1,5-dien-8-ol (**29**) and aristolochene (**59**), which were produced by the fungus under axenic culture, were not detected in the co-culture. Again, the fungal VOCs α -phellandrene (**12**) and β -phellandrene (**15**) were the major constituents in the co-culture. There was a significant increase in peak area the fungal compound α -terpinene (**13**) in the co-culture, compared with the axenic culture.

Differently from what had been observed in the co-culture of the fungus and the actinobacteria ACTB-77, the study involving strain ACTB-290 yielded five exclusive peaks, that include the two identified mVOCs 2-nonanol (**23**) and 2-undecanol (**44**). Interestingly, these alcohols may be thought as bioreduction products of the respective C₉ and C₁₁ ketones (VOCs from actinobacteria) from the fungus. Thus, the antifungal activity of *Amycolatopsis sp.* (ACTB-290) against *C. musae* may be associated to its sulfur-containing metabolites dimethyl disulfide (**4**) and dimethyl trisulfide (**8**), both previously reported as potent fungicides.^{60, 61}

3.7 Statistical analysis of the experiments

The statistical analysis discussed herein is related to the comparison between the relative concentrations of the peak areas of each compound produced by the microorganisms under axenic culture

and those produced in the co-culture (*ACTB-77* and *C. musae*; *ACTB-290* and *C. musae*). A principal component analysis (PCA),⁶² was performed, which is an unsupervised pattern recognition algorithm used to represent a high number of results through two graphics called scores and loadings. The scores graph presents the similarity/differences between each culture while the loadings graphic displays the constituent that is important for differences and similarities between each group. In summary, all peaks are converted into new variables, called PCs, each one accounting for the data variability. Thus, similar samples are close in the scores graphic while different samples are distant. The relative concentration of each constituent is displayed in loadings graphics, which have the same axes presented in the scores graphics. When the scores and loadings graphics are overlaid, it is possible to deduce that the relative concentration of a constituent will be higher for the sample with high scores. Each number displayed in loadings graphics represents a peak which it is identified in **Table 2**, and which was listed in increasing order of the retention index.

3.7.1 *ACTB-77, C. musae and their co-culture*

PC1 and PC2 explain 80.36% of the data variance (**Figure 6**), being possible to analyze all constituents in the samples using only these two variables. It was observed a natural separation tendency of the groups, which are represented by red (*ACTB-77* strain), dark blue (*C. musae* strain) and light blue (co-culture) colors (**Figure 6a**). In this case, the highest separation was observed for the samples from the axenic culture of the actinobacteria since these samples presented the highest scores values in PC1 (**Figure 6a**). The relative concentrations of the constituents are represented in the loadings graph (**Figure 6b**) by circles with three different colors, where red, dark blue and light blue are associated to the highest concentration constituents from the actinobacteria (*ACTB-77*), *C. musae* and co-culture, respectively.

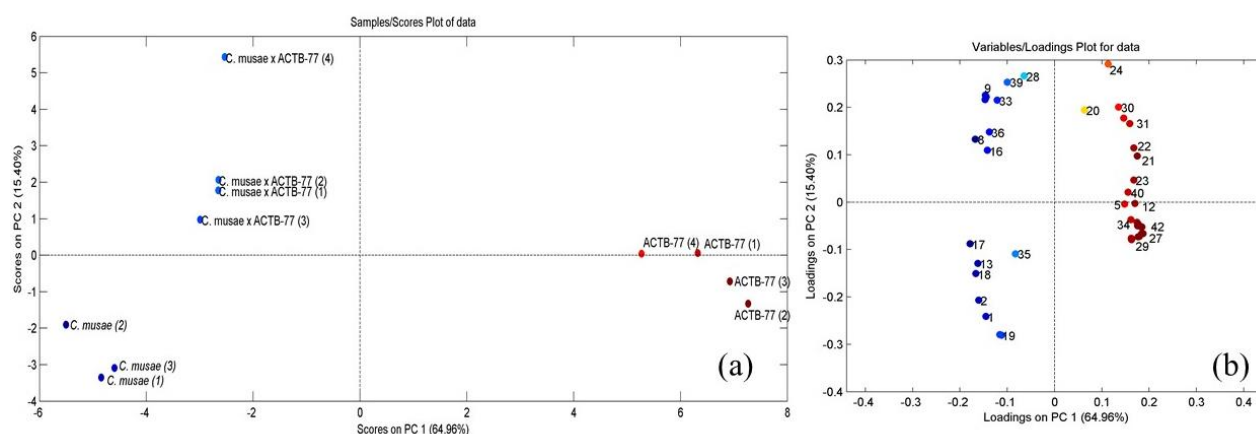


Figure 6- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples of *ACTB-77* (red), *C. musae* (dark blue) and the co-culture (light blue).

Figure 6b shows 3-methyl-butan-1-ol (**1**), 2-methyl-butan-1-ol (**2**), α -phellandrene (**12**), β -phellandrene (**15**), phenylethyl alcohol (**24**), *p*-mentha-1,5-dien-8-ol (**29**), menthol (**31**) and aristolochene (**59**) as constituents from the *C. musae* group with the highest relatively concentrations. Among them, compounds **1**, **12**, **15**, **24** and **59** represent *ca.* 75% of the VOCs peak area of the fungus. Concerning the constituents from the ACTB-77 group, geraniol (**38**), 1-decanol (**41**), not-identified (**47**), geosmin (**52**), γ -gurjunene (**58**) and mint sulfide (**69**) are displayed in **Figure 6b** as those mVOCs with the highest relatively concentrations. Although **38** and **52** are found in both co-culture and ACTB-77 axenic culture, these constituents are represented in higher concentrations in the latter experiment. It worth highlighting that α -phellandrene (**12**), β -phellandrene (**15**) and silphinene (**46**), already found in axenic culture of *C. musae*, had their relative concentrations intensified in the co-culture experiment (**Figure 6b**).

PC1 scores were not significant to differentiate samples of *C. musae* and co-culture, since it is possible to observe a correlation between the variables highlighted in blue (dark and light) in the loadings graph (**Figure 6b**). It is noteworthy that 3-methyl-butan-1-ol (**1**) and β -phellandrene (**15**), both found as main VOCs produced by *C. musae*, are the most important constituents for distinguishing the fungus from the co-culture. These two chemical constituents are not correlated, and they present significant difference in their relative concentrations in the two groups (*C. musae* and co-culture). The differentiation between *C. musae* and co-culture groups can be observed through the different values of their PC2 scores (**Figure 6a**).

In order to confirm the differences between the groups, a t-test was performed using the scores of PC1 and PC2. In this case, it was observed that *C. musae*, ACTB-77 and their co-culture have statistically significant differences between them.

3.7.2 ACTB-290, *C. musae* and their co-culture

Together, PC1 and PC2 explain 76.84% of the data variance (**Figure 7**), making possible the analysis of similarities/differences of the groups using only these two variables. Comparison of this study with the previously discussed for the experiments involving actinobacteria ACTB-77 revealed a higher separation tendency of the groups for the studies with ACTB-290, that are represented by dark blue (ACTB-290 strain), dark red (*C. musae* strain) and three different colors (light and dark orange; green) for co-culture (**Figure 7a**). The use of three colors for co-culture experiments were needed to indicate different composition in their replicates.

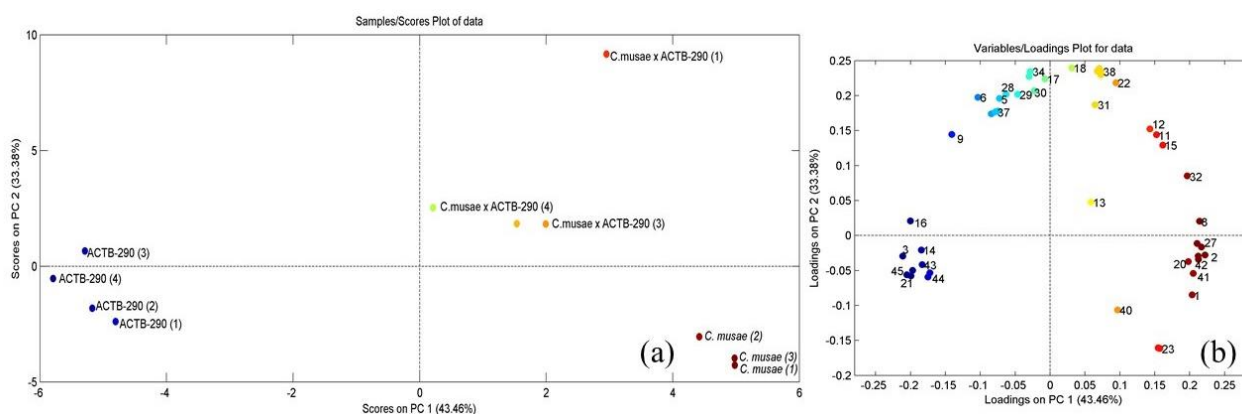


Figure 7- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples of ACTB-290 (dark blue), *C. musae* (dark red) and the co-culture (light orange, dark orange and green).

As observed in the loadings graph (**Figure 7b**), the lowest scores of PC1 are the variables highlighted in dark blue, which are related to the axenic culture of ACTB-290. In this graph, dimethyl disulfide (**4**), dimethyl trisulfide (**8**) and methyl 2-ethylhexanoate (**18**), **Table 2**, are significant variables to distinguish ACTB-290 from the other two groups (*C. musae* and co-culture). Additionally, these three chemical constituents are found in relatively higher concentrations in the actinobacteria axenic culture when comparing with the co-culture. α -Phellandrene (**12**), α -terpinene (**13**) and β -phellandrene (**15**), **Table 2**, which are represented in the loadings graph (**Figure 7b**) with dark red circles, present positive values of scores in PC2. This agrees with the fact of these mVOCs had a significant increasing in the co-culture experiment when compared to the axenic culture of the fungus.

The sulphur-containing compounds dimethyl disulfide (**4**), dimethyl trisulfide (**8**) and methyl(methylthio)methyl disulfide (**27**), in **Table 2**, all VOCs exclusively produced by the actinobacteria ACTB-290, are reported as potent fungicides. Interestingly, no correlation between these compounds and the alcohols (**23** and **44**, **Table 2**) recorded exclusively in the co-culture experiment was observed in the correlation map (Figure S6). This suggest that these alcohols are products of bioreduction of actinobacteria produced ketones **22** and **43**, respectively, by fungus strain.

A t-test was also performed at the scores and revealed that ACTB-290 strain is statistically different from the fungal strain. This latter microorganism presented a significant difference when compared to the co-culture (*C. musae*/ACTB-290) at the PC2 score, but not at PC1 ($t=1,6696/t_{crit}=2.447$ and $p=0,1460$). This corroborates the result already discussed, which showed that the co-culture (*C. musae*/ACTB-290) is very similar to the axenic culture of ACTB-290, especially for the compounds highlighted in PC1.

3.7.3 Global analysis

A global analysis of the aforementioned experiments was performed since, opposite to a non-statistical approach, PCA allows to evaluate all samples (ACTB-77, ACTB-290, fungus and co-cultures) grouped in the same graphs (**Figure 8**). In this case, PC1, PC2 and PC3 explain 75.83% of the data variance, allowing the analysis of similarities/differences of the groups using these three variables. It was observed a high separation tendency of the groups, that are represented by dark red (ACTB-77), dark blue (ACTB-290), cyan (*C. musae*) and green (ACTB-77/*C. musae*) and light blue (ACTB-290/*C. musae*) colors in the scores graphs depicted in **Figure 8a** (PC1 vs. PC2) and **Figure 8b** (PC1 vs. PC3). The ellipses are arbitrarily included to indicate the differences between the classes, and the statistically differences were calculated using t and F hypothesis test.

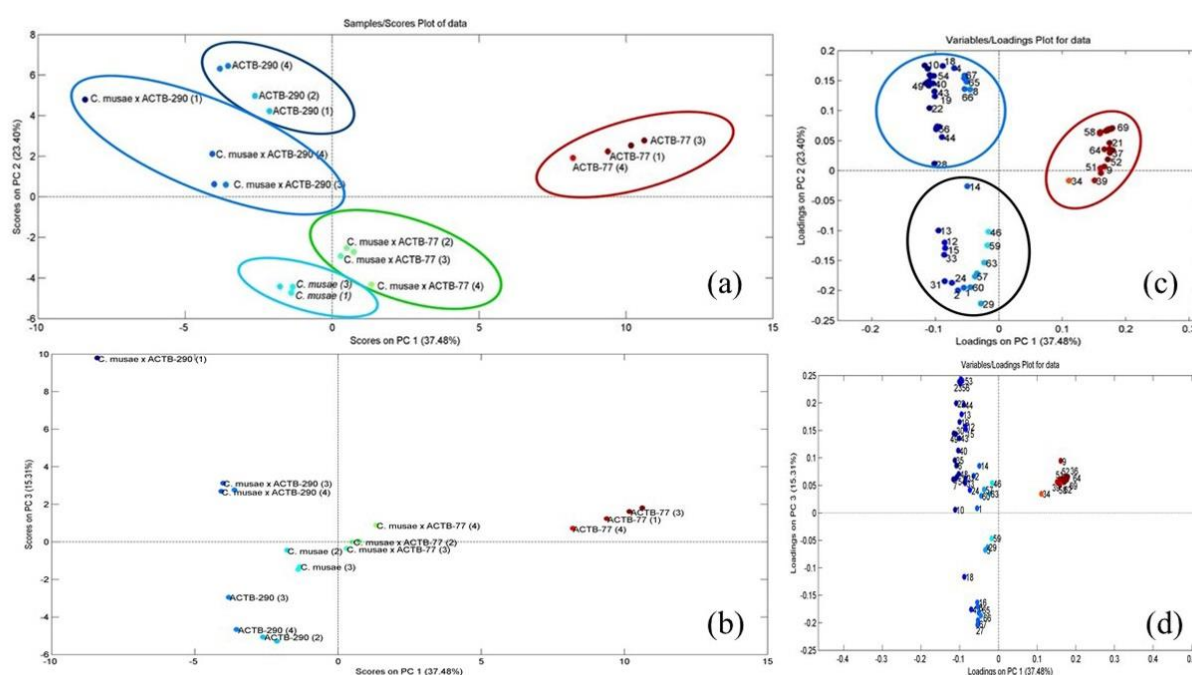


Figure 8- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples ACTB-77 (dark red), ACTB-290 (dark blue), *C. musae* (cyan) and co-cultures ACTB-77/ *C. musae* (green) and ACTB-290/*C. musae* (light blue). Scores (c) and loadings (d) graphs obtained by PC1 and PC3 for the same samples.

As observed in **Figures 8a** and **8b**, co-culture ACTB-77/*C. musae* has greater similarity with the fungus group than with the actinobacteria group. Concerning the co-culture involving the actinobacteria ACTB-290 (ACTB-290/*C. musae*), it was observed greater similarity with the actinobacteria group than the fungus group. These suggest a more pronounced antifungal activity for ACTB-290 strain, which agrees with the SEM images of the fungus filaments after its inhibition by ACTB-290 previously discussed.

The loadings graphs displayed in **Figure 8c** (PC1 vs. PC2) and **Figure 8d** (PC1 vs. PC3) show that mVOCs inside the red circle (**Figure 8c**) present significantly higher concentration for ACTB-77

samples when compared with the other groups, besides higher loadings values in PC1. The mVOCs inside the blue circle present a significant higher concentration for both ACTB-290 and the co-culture (ACTB-290/*C. musae*), indicating that these two groups present similar mVOCs.

Dimethyl disulfide (**4**), 2-undecanone (**43**) and 2-tridecanone (**54**), **Table 2**, are present in significantly lower concentration in the co-culture ACTB-290/*C. musae* when compared with the axenic culture of the actinobacteria (**Figures 8c** and **8d**). Ketones **43** and **54** are those produced exclusively by the actinobacteria, while dimethyl disulfide (**4**) is a potent fungicide.

A t-test was performed using PC2 scores, it was observed that there are no statistically significant differences between the ACTB-290 group and the *C.musae*/ACTB-290 group ($t=-0.3265/t_{crit}= 2.447$ and $p=0.7551$). Since these groups have similar values of scores in PC2, the same occurs to PC1. This fact corroborates the result already discussed that the co-culture (*C.musae*/ACTB-290) is very similar to the axenic culture of the actinobacteria. However, when both PC1 and PC2 are used, the variance hypothesis test indicates statistically differences between them. This last approach is similar to the one used in Soft Independent Method of Class Analogy (SIMCA).⁴³

A correlation map of mVOCs produced in all experiments is presented in **Figure S7**, where each axis represents the constituents numbered according to **Table 2**. The correlation is calculated pair by pair using the mVOCs, and represented by squares in the map, in which dark blue means an inverse correlation ($r = -1$) and dark red means a direct correlation ($r = +1$). The closer to $+1/-1$ become, the higher the correlation between the peaks will be. Analysis of this map reveals that the ketones **22** and **43**, which were suggested to be reduced by the fungus, present an inverse correlation with their respective alcohols **23** and **44** (**Table 2**), confirming the biotransformation occurrence in the co-culture. In addition, there is a slightly positive correlation between these ketones and the sulphur-containing compound **4**, suggesting that when the ketones concentrations reduce, the concentration of **4** also reduces.

In summary, these analyses lead to the conclusion that the ACTB-290 strain presents a powerful and specific fungicide effect against *C. musae*. This gives rise to the hypothesis that the sulphur-containing constituents are responsible for their bioactivity.

4 CONCLUSION

In summary, rhizosphere soil of plants from Caatinga biome was shown to be source of actinobacteria strains that produce volatile organic compounds (VOCs) with antifungal activity against the phytopathogen *C. musae*. Among the investigated strains, the most active were *Streptomyces* sp. (ACTB-77) and *Amycolatopsis* sp. (ACTB-290). The latter presented the highest growing inhibition of the fungus, a behavior corroborated by the greatest damage of its VOCs on the fungal hyphae morphology. HS-SPME-GCMS analyses of VOCs produced by ACTB-77 and ACTB-290, revealed linalool and geosmin as major constituents for ACTB-77, and dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide

as major VOCs compounds produced by ACTB-290. No exclusive VOCs were observed in the co-culture experiment involving ACTB-77, while co-culture with ACTB-290 yielded five new peaks, two of them (alcohols) suggested as products of ketone bioreduction by the fungus. Statistical analysis showed that co-culture ACTB-77/*C. musae* was the most similar to the fungus, while co-culture ACTB-290/*C. musae* showed greater similarity with the actinobacteria. The more pronounced antifungal activity of ACTB-290 was suggested that it was associated to its sulfur-containing metabolites, since this class of compounds is known as a potent antifungal. Additionally, linalool was suggested as responsible for the ACTB-77 activity.

Acknowledgement

The authors are thankful to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) for the sponsorships of M. V. Brito (Process: 88887.319063/2019-00) and M. S. Netto (Process: 88887.479095/2020-00), and financial support (Finance Code 001- PROEX 23038.000509/2020-82. Nº AUXPE: 1227/2020). M. C. F. de Oliveira (Process: 310881/2020-0) and M. C. de Mattos (Process: 306043/2018-1) thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for their research sponsorships. L. Pinto thank the Brazilian funding agency Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE 14/2019 - INOVA IAM; Process: APQ-0437-1.06/19). The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSA dip - TESL (Cambridge University)

Author contributions

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed as follows:

Maria V. de Brito, Wéverson L. Fonseca, Jair Mafezoli, Francisco G. Barbosa, Fátima M. Nunes, Marcos C. de Mattos, João E. A. dos Santos and Maria C. F. Oliveira – Culture of the microorganisms, VOCs extractions and analyses (HS-SPME-GCMS), actinobacteria molecular identification, manuscript writing and revision.

Francisca S. A. Araujo, Regimara F. B. S. Vieira, Hilton C. R. Magalhães, Celli R. Muniz and Deborah S. Garruti – SEM image analysis, GCMS equipment operation and microorganisms preservation.

Marcio A. Ootani and Francisco M. P. Viana – Isolation of actinobacteria strains from rhizosphere associated to Caatinga plants and *Colletotrichum musae* from infected plant.

José M. S. Netto and Licarion Pinto – Statistical analyses.

The first draft of the manuscript was written by Maria C. F. Oliveira (corresponding author) and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

5 SUPPLEMENTARY INFORMATION

Biologically active volatile organic compounds (VOCs) produced by rhizospheric actinobacteria strains inhibit the growth of the phytopathogen *Colletotrichum musae*†

Maria V. de Brito¹ • Wéverson L. Fonseca² • Jair Mafezoli¹ • Francisco G. Barbosa¹ • Fátima M. Nunes¹ • Marcos C. de Mattos¹ • João E. A. dos Santos¹ • Francisca S. A. Araujo³ • Regimara F. B. S. Vieira³ • Hilton C. R. Magalhães³ • Celli R. Muniz³ • Deborah S. Garruti³ • Marcio A. Ootani⁴ • José M. S. Netto⁵ • Licarion Pinto⁵ • Francisco M. P. Viana^{3,†} • Maria C. F. Oliveira^{1,*}

¹ Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl. 940, Fortaleza-CE, 60.440-593, Brazil.

² Colégio Técnico de Bom Jesus-CTBJ, Universidade Federal do Piauí, BR 135, km 3 - Planalto Horizonte, Bom Jesus-PI, 64900-000, Brazil.

³ EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Pernambuco 2270, Pici, Fortaleza-CE, 60511-110, Brazil.

⁴ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luiz Freire - lado par, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-540, Brazil.

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Metabolômica e Quimiometria, Av. Jornalista Anibal Fernandes s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-560, Brazil

*Corresponding author: M. C. F. Oliveira (mcfo@ufc.br)

† *In Memoriam*. This paper is dedicated to Dr. Francisco Marto Pinto Viana, Brazilian phytopathologist who motivated us to develop this research and passed away during the manuscript preparation.

Figure S1. Representation of the experimental procedure of the screening on actinobacteria producing VOCs with antifungal activity against *C. musae*.

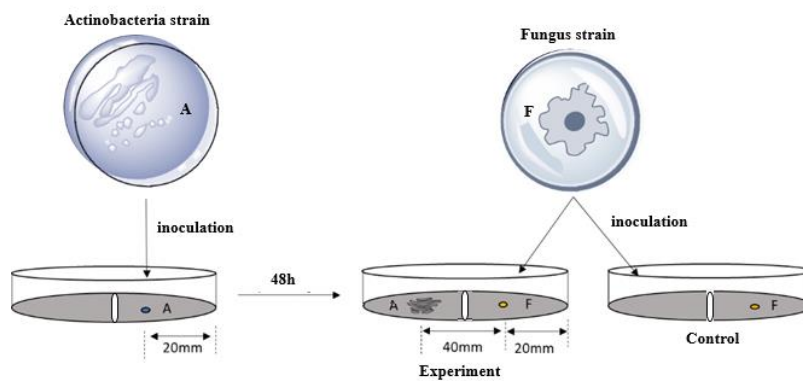


Figure S2. Representation of the experimental procedure of the antifungal activity of VOCs produced by ACTB-290 and ACTB-77 strains against *C. musae*.

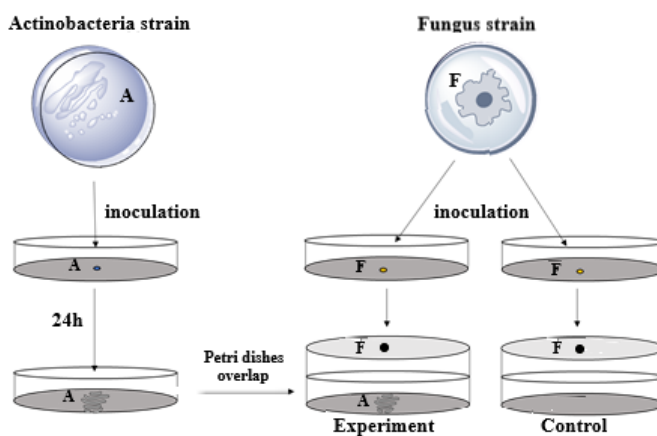


Figure S3. Representation of the experimental procedure of VOCs extraction by HS-SPME.

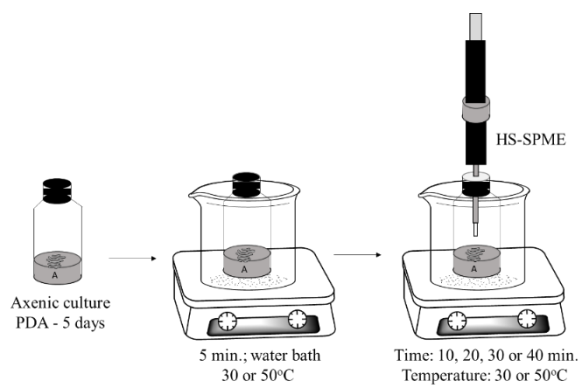


Figure S4. Representation of the experimental procedure of HS-SPME and GC-MS analysis of VOCs produced by *Amycolatopsis sp.* (ACTB 290) and *Streptomyces sp.* (ACTB 77) under axenic culture and co-culture with *C. musae*.

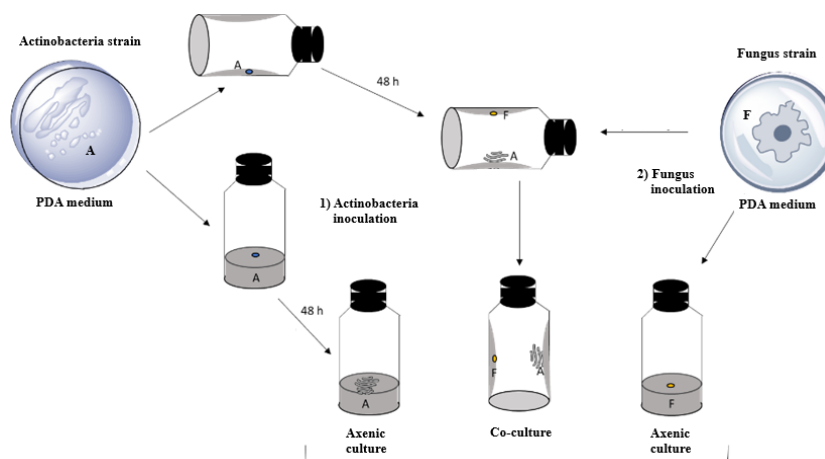
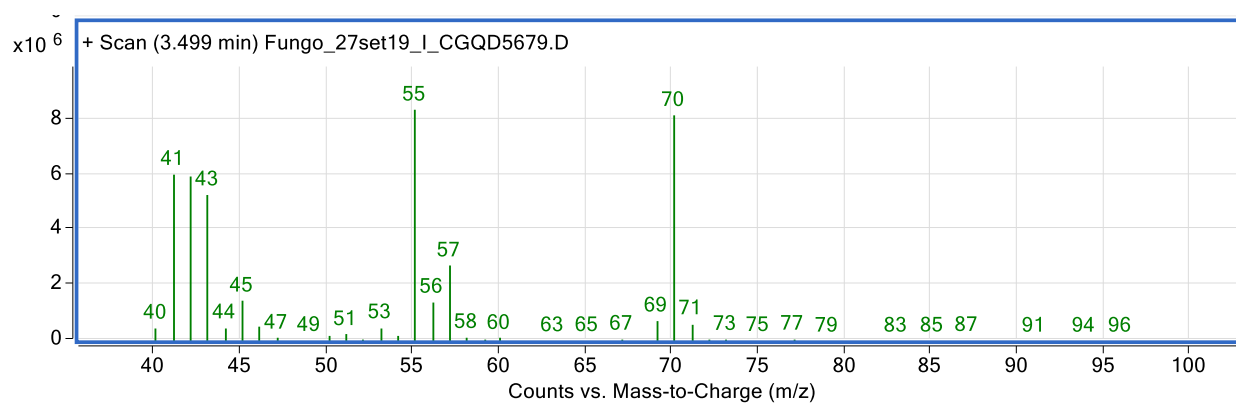
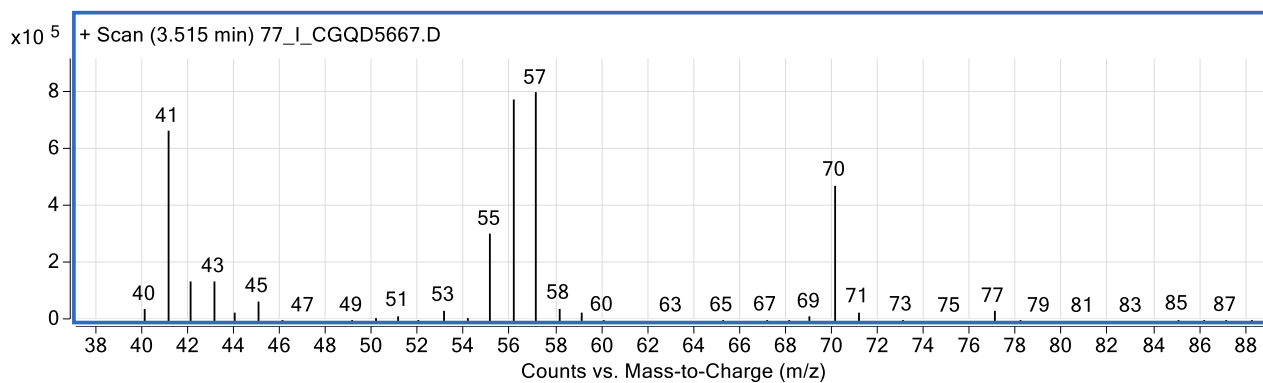


Figure S5. Mass spectra of the identified compounds (EI, 70 eV).

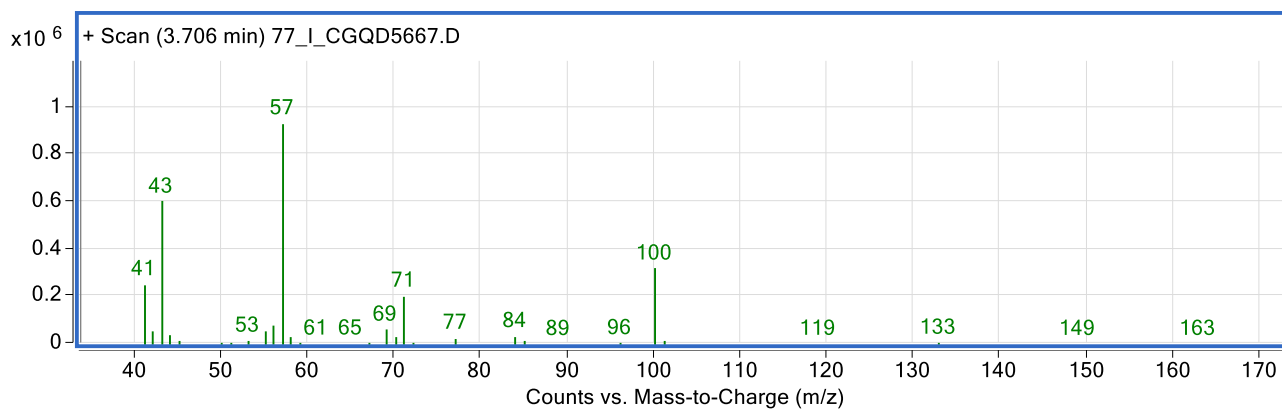
S5.1. 3-Methyl-butan-1-ol (**1**)



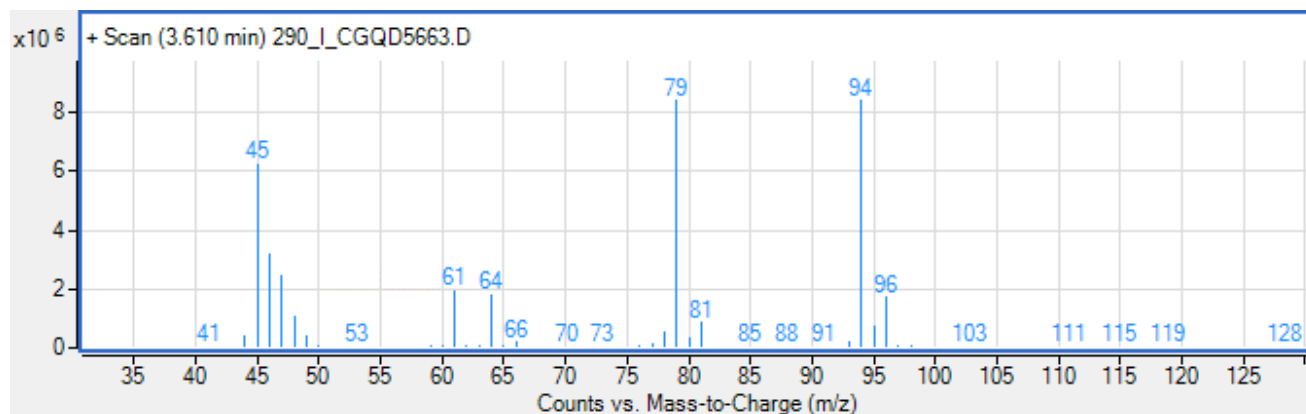
S5.2. 2-Methyl-butan-1-ol (2)



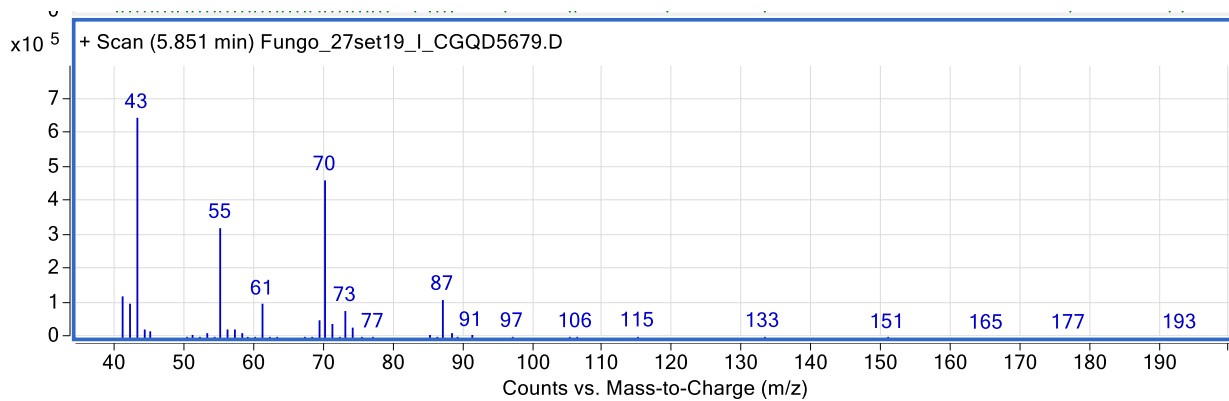
S5.3. 3-Methyl-pentan-2-one (3)



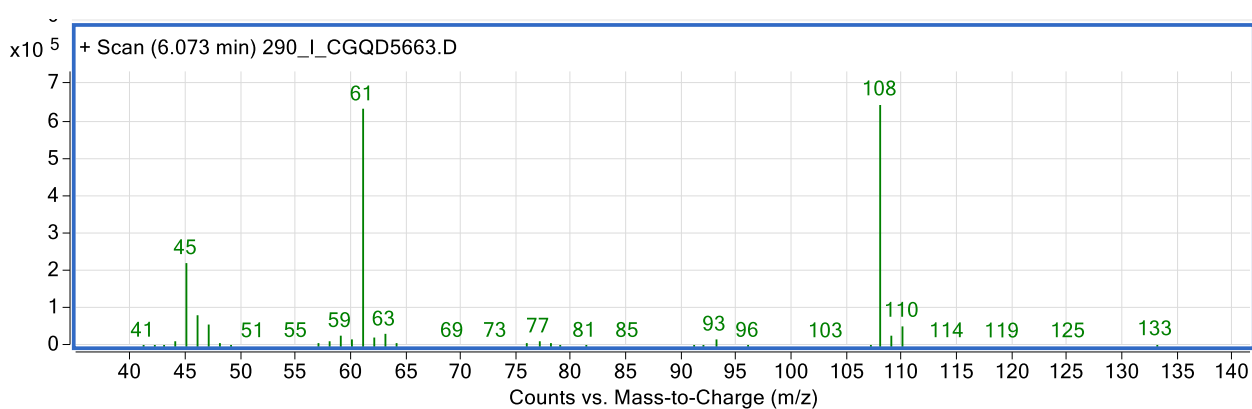
S5.4. Dimethyl disulfide (4)



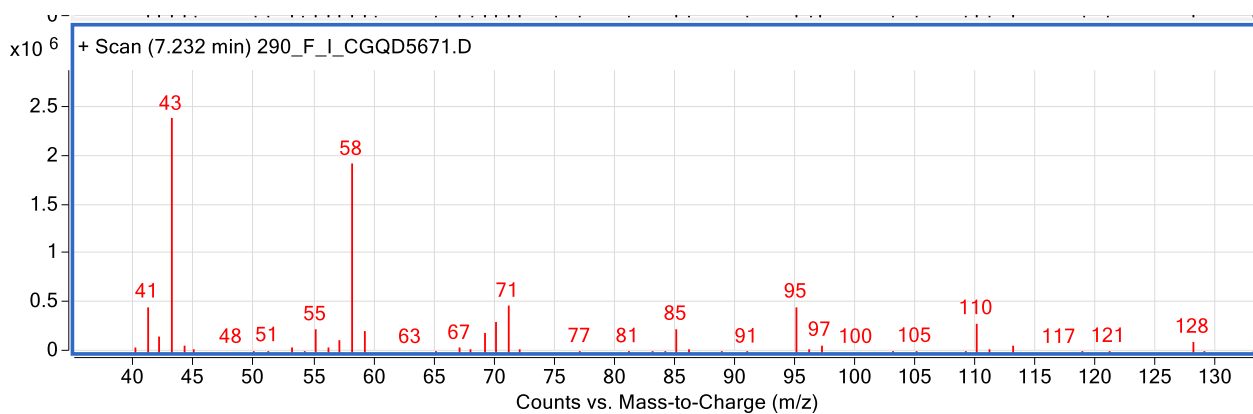
S5.5. 3-Methylbutan-1-ol acetate (5)



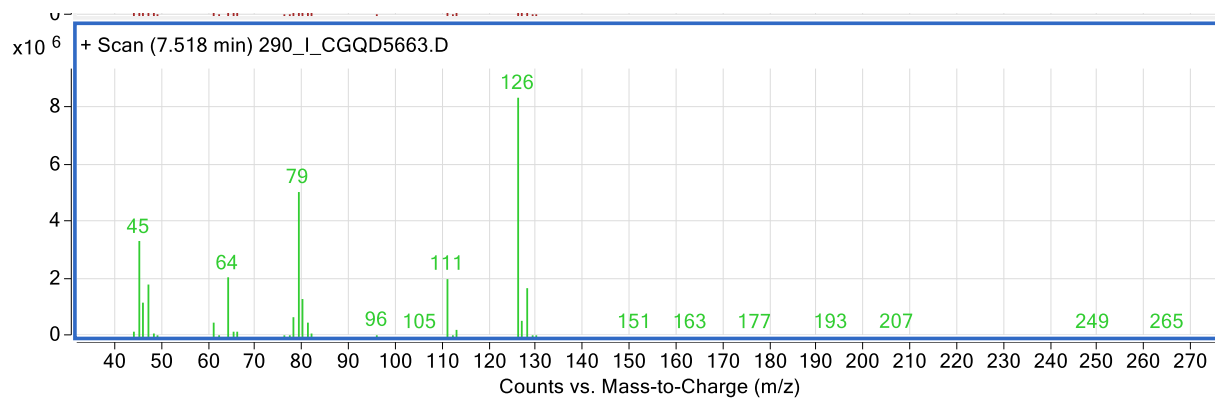
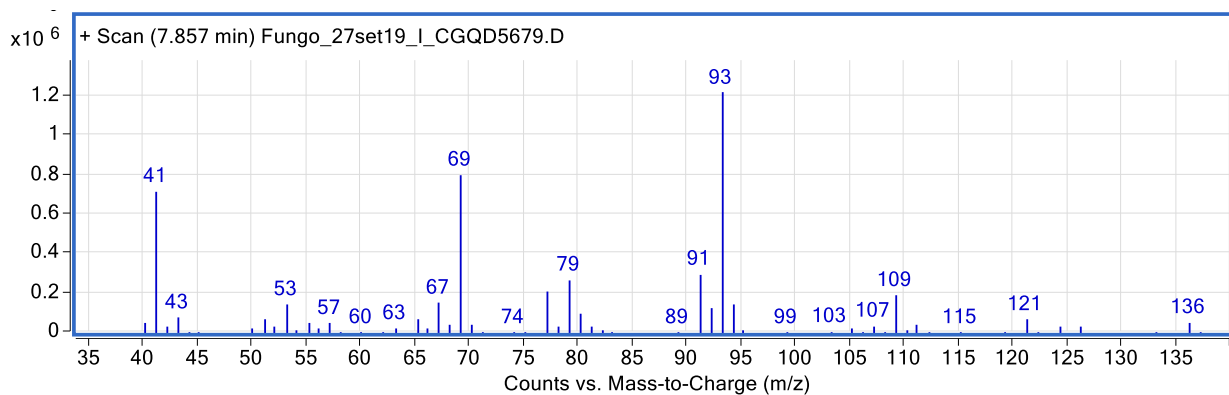
S5.6. 2,4-Dithiapentane (6)



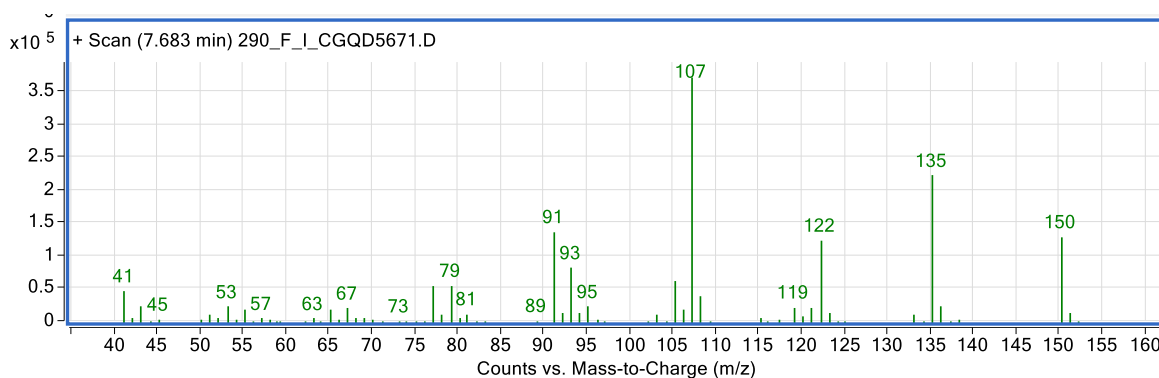
S5.7. 6-Methyl-heptan-2-one (7)



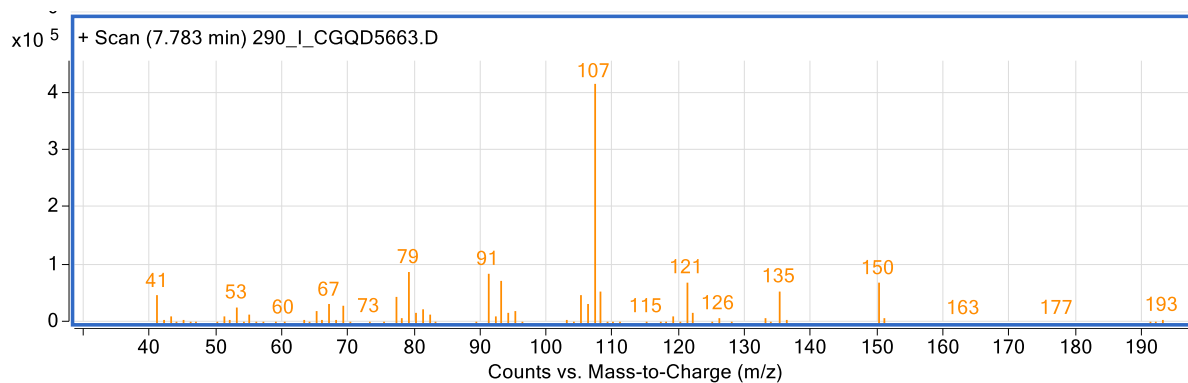
S5.8. Dimethyl trisulfide (8)

S5.9. β -Myrcene (9)

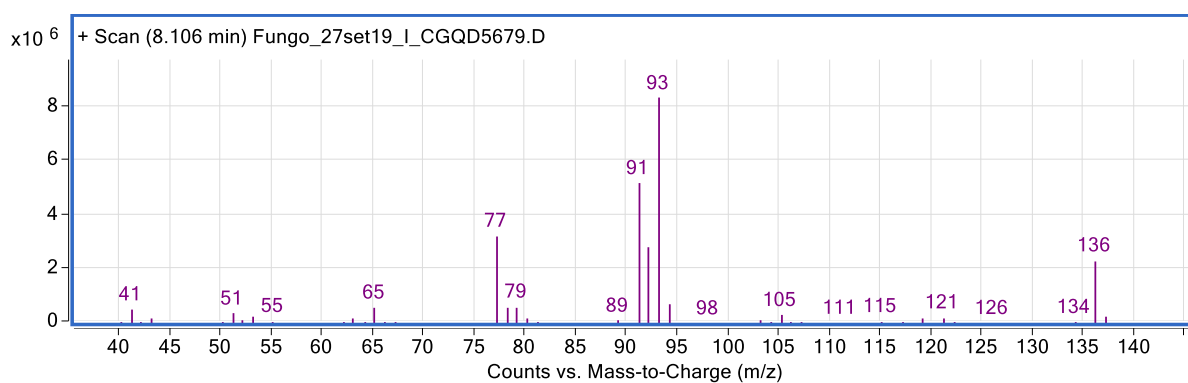
S5.10. Not identified (10)



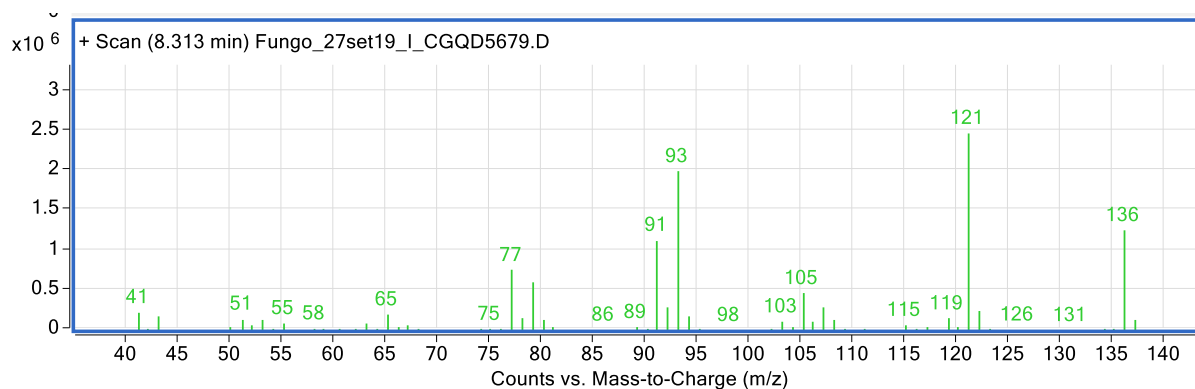
S5.11 2-Methylenebornane (11)



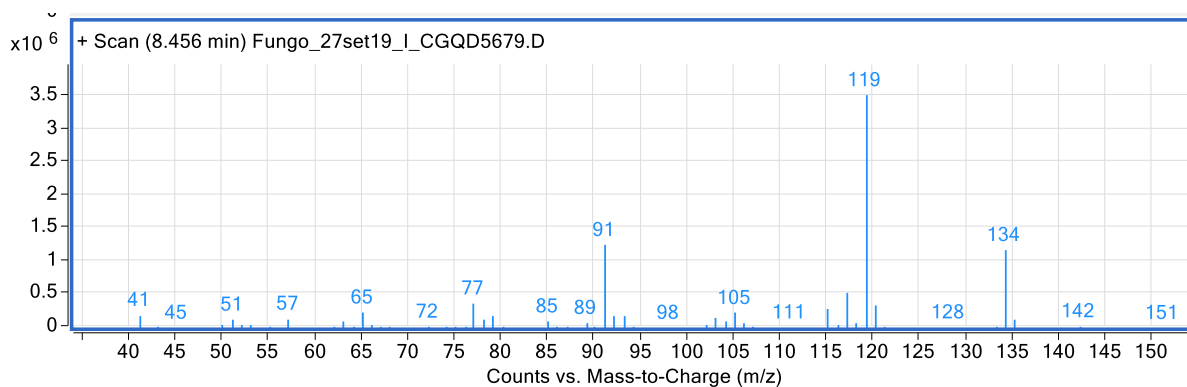
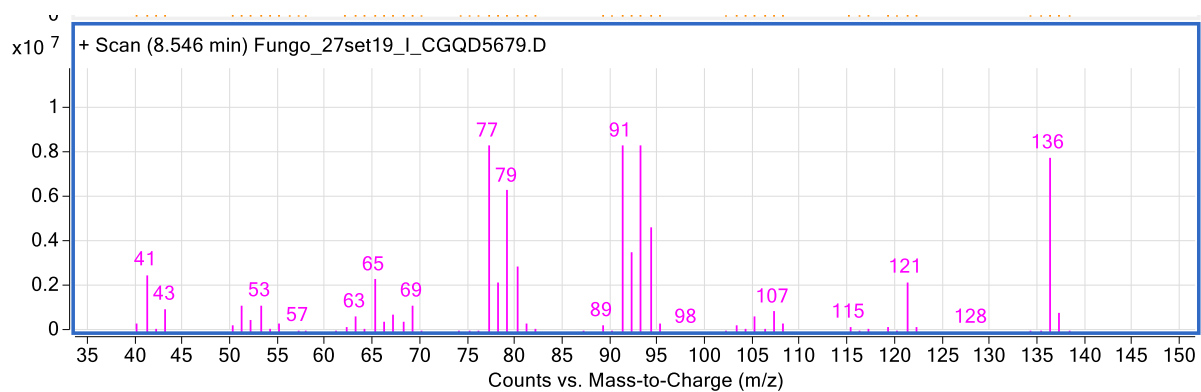
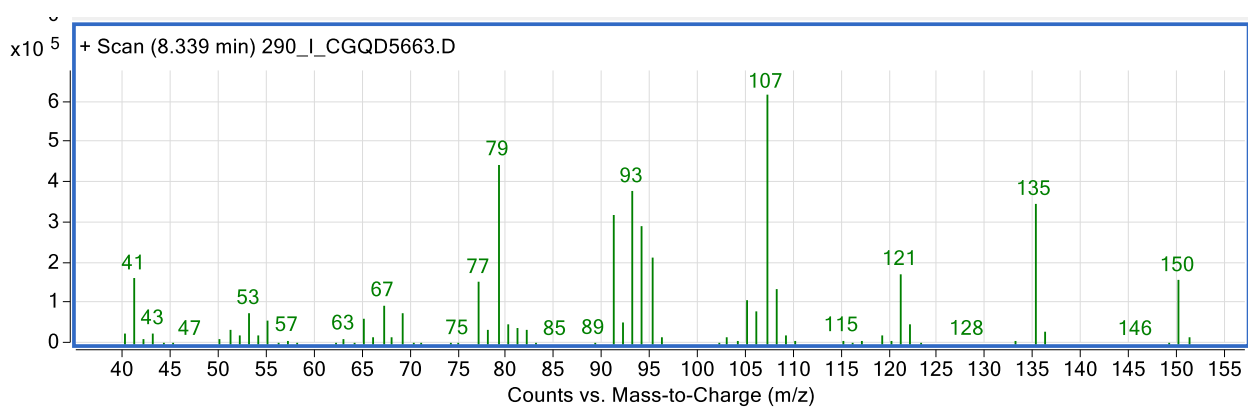
S5.12. α -Phellandrene (**12**)

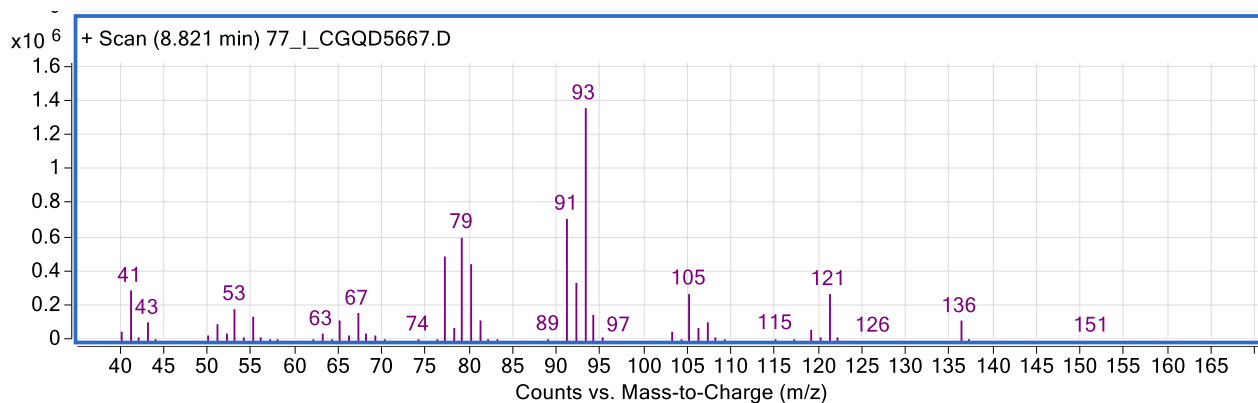


S5.13. α -Terpinene (**13**)

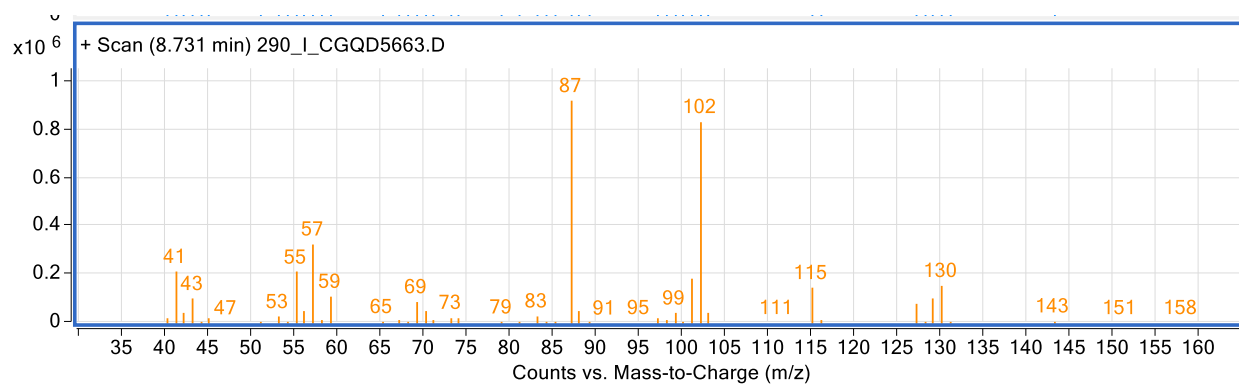


S5.14. *p*-Cymene (**14**)

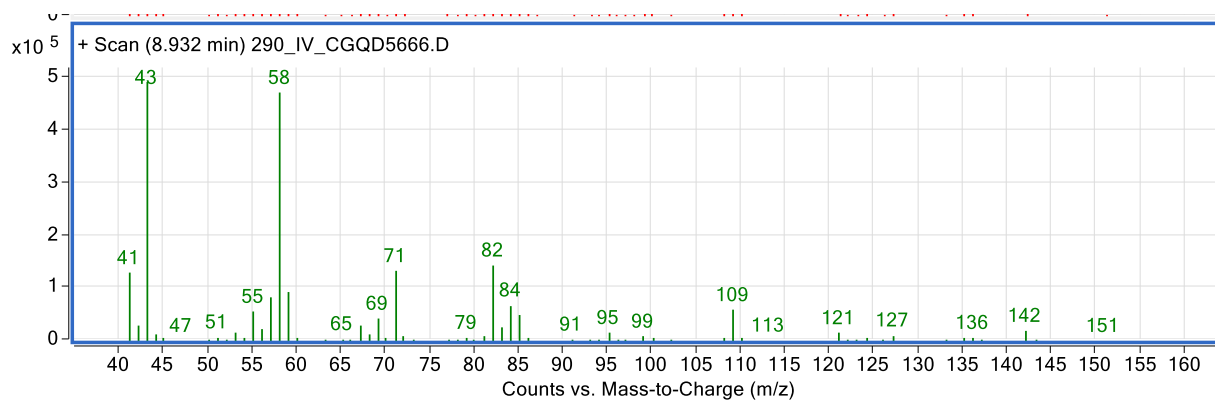
S5.15. β -Phellandrene (**15**)S5.16. 2-Methyl-2-bornene (**16**)S5.17. trans- β -Ocimene (**17**)



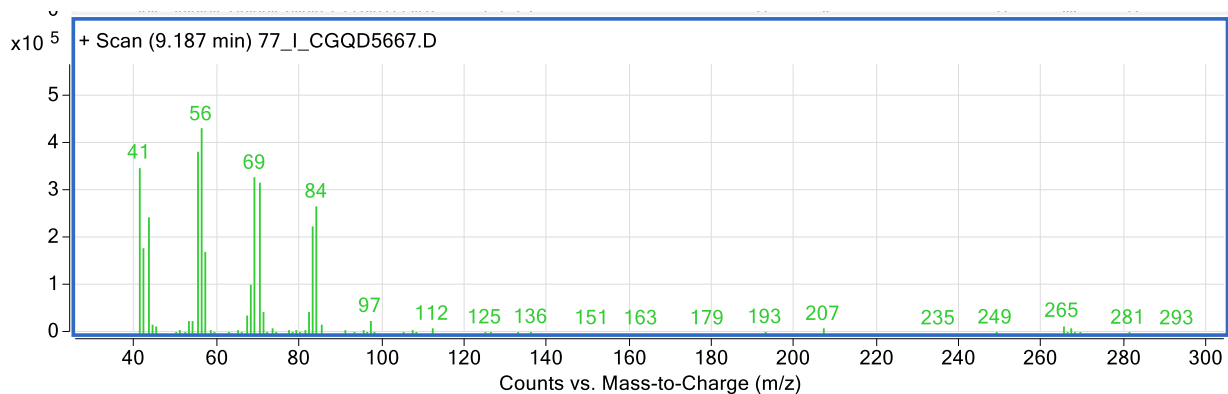
S5.18. Methyl 2-ethylhexanoate (18)



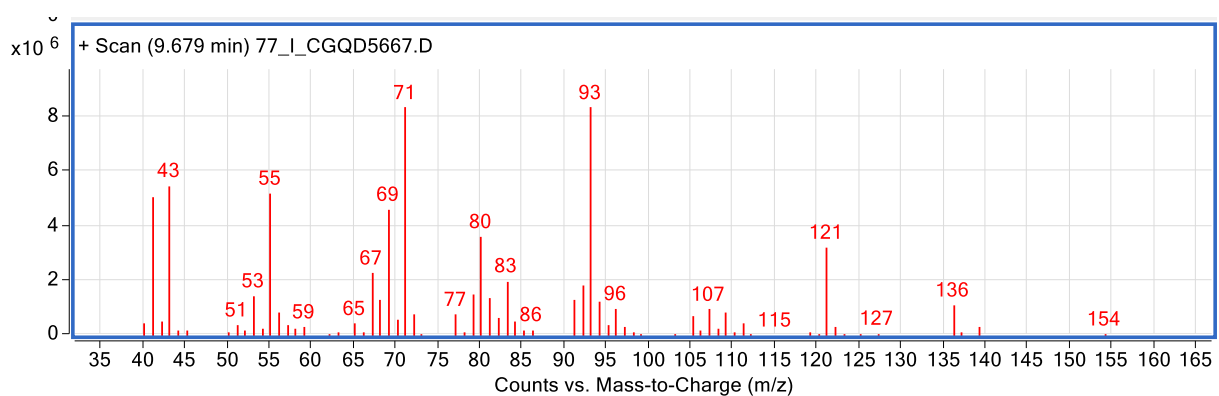
S5.19. not identified (19)



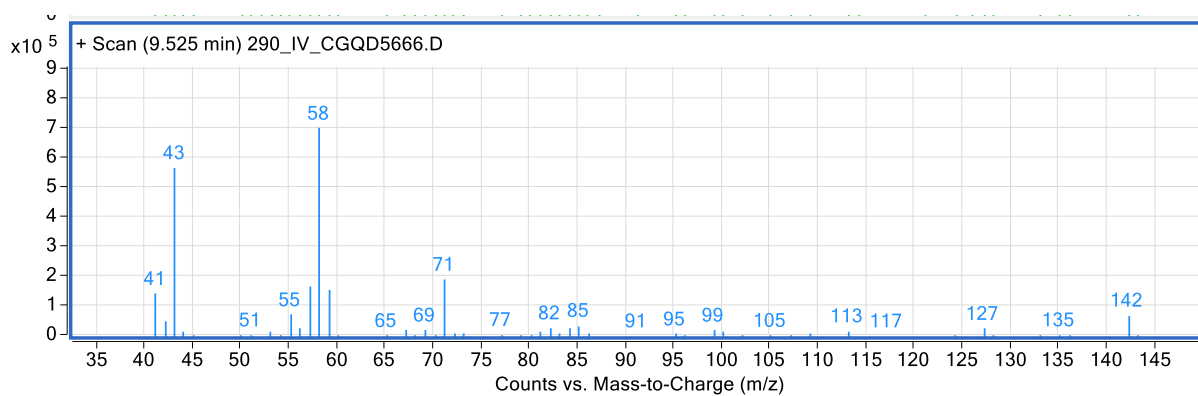
S5.20. 1-Octanol (20)



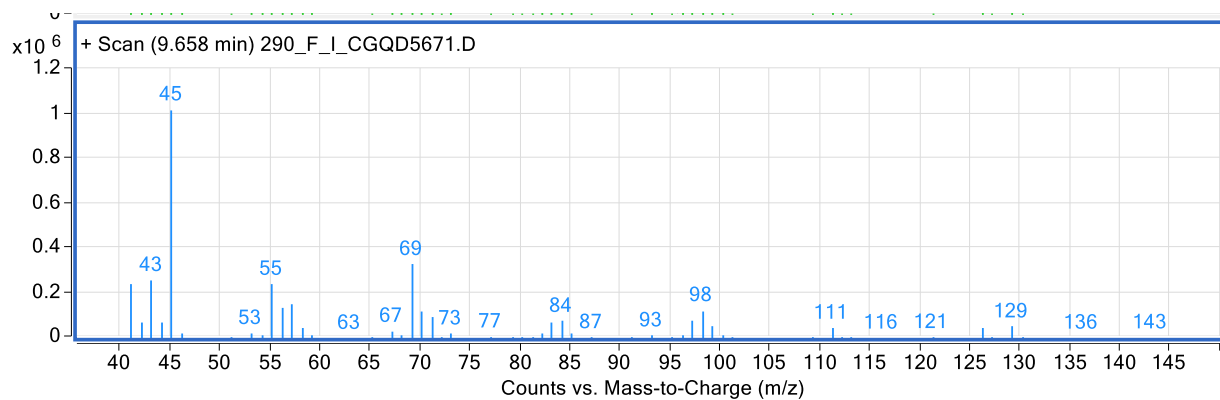
S5.21. Linalool (21)



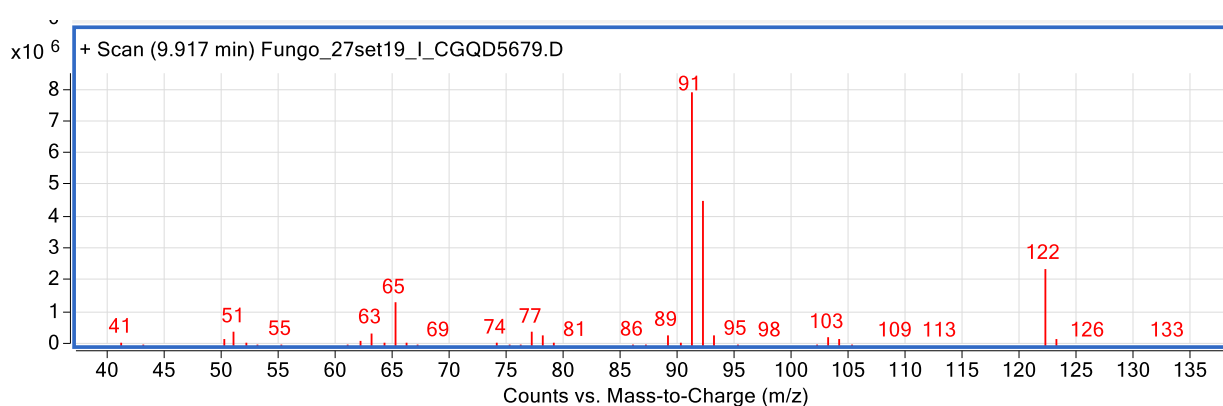
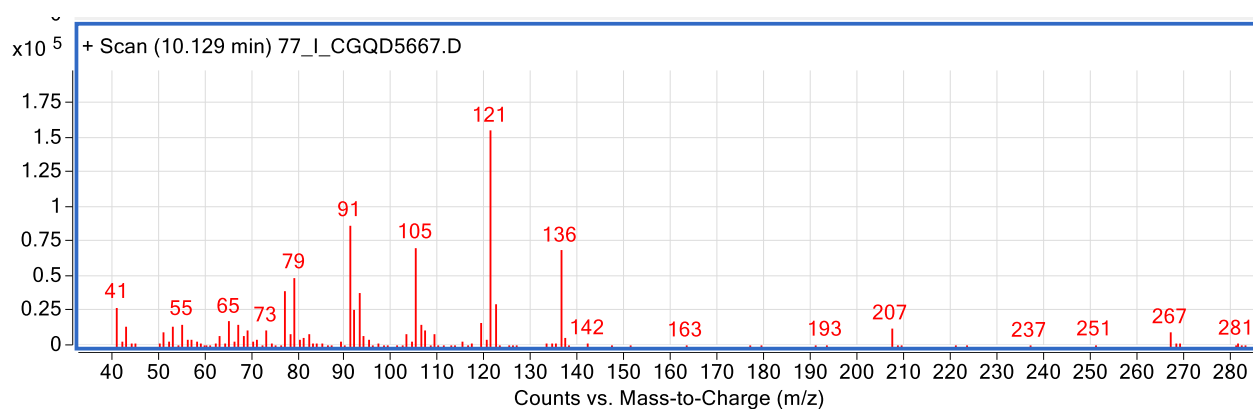
S5.22. 2-Nonanone (22)



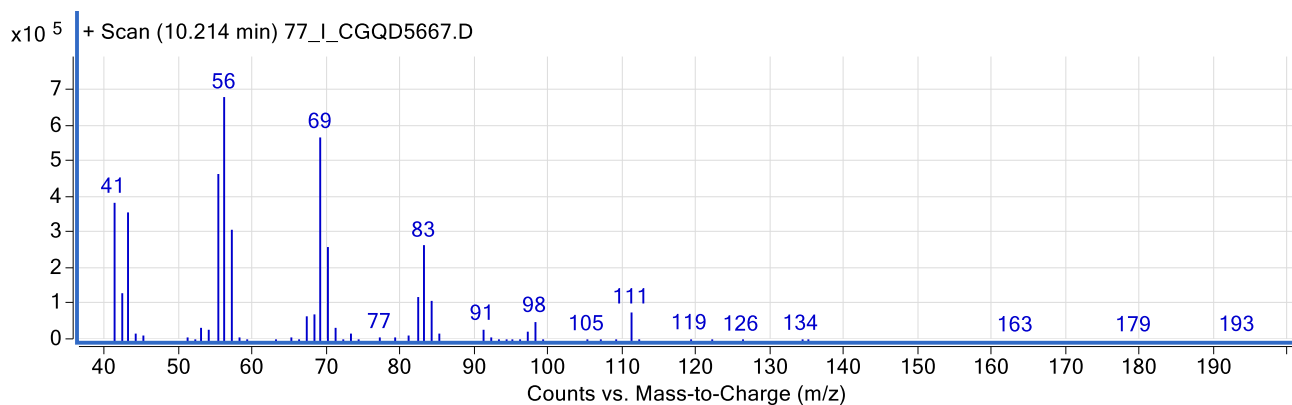
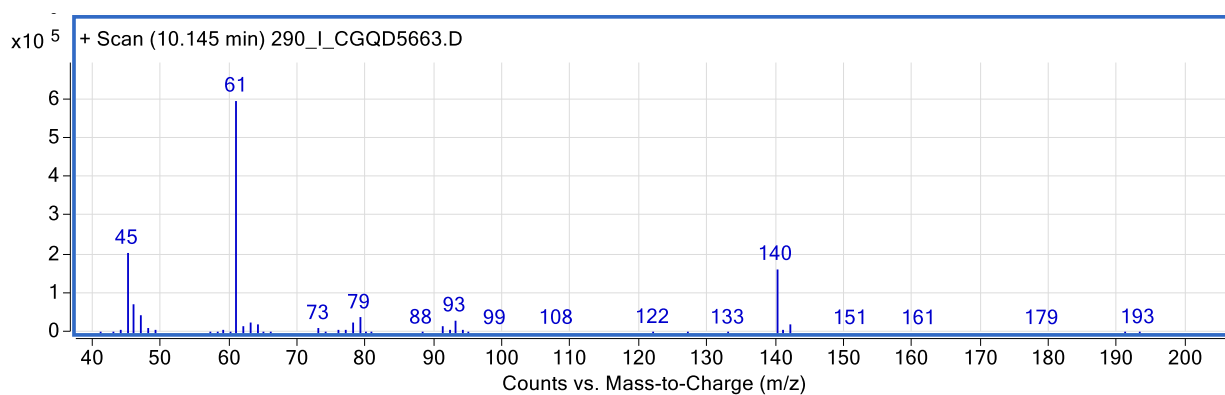
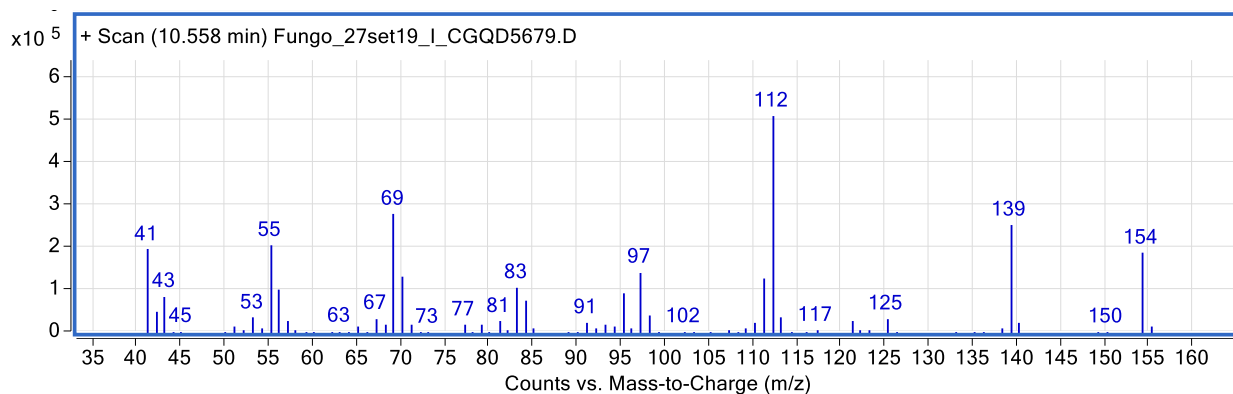
S5.23. 2-Nonanol (23)

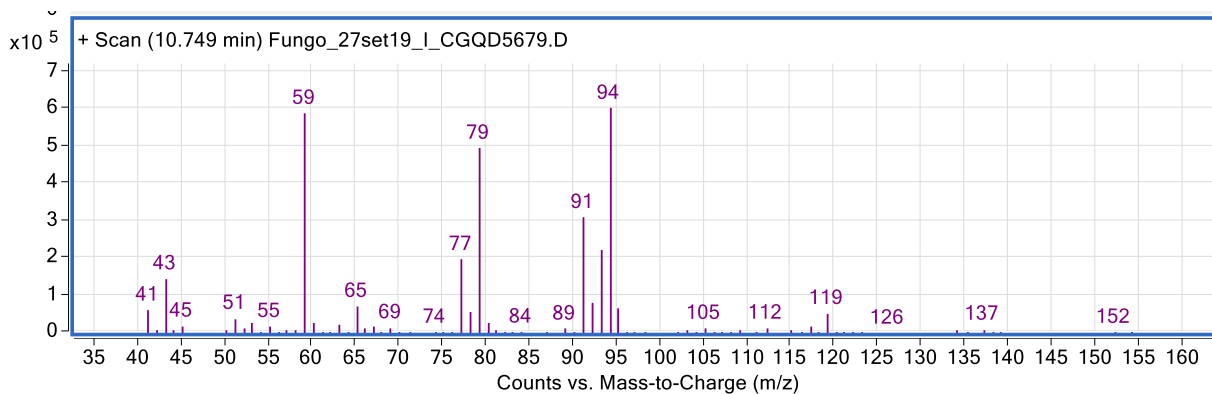


S5.24. Phenylethyl Alcohol (24)

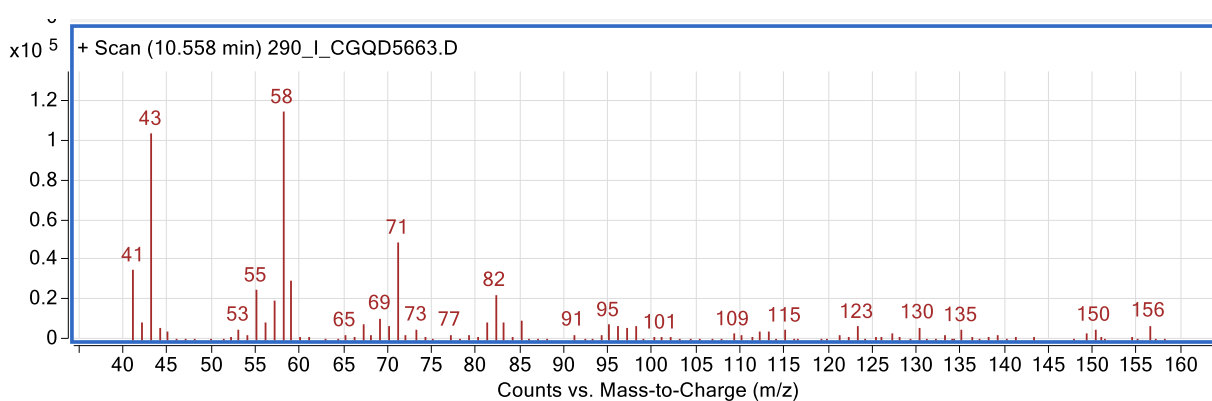
S5.25. *allo*-Ocimene (25)

S5.26. Not identified (26)

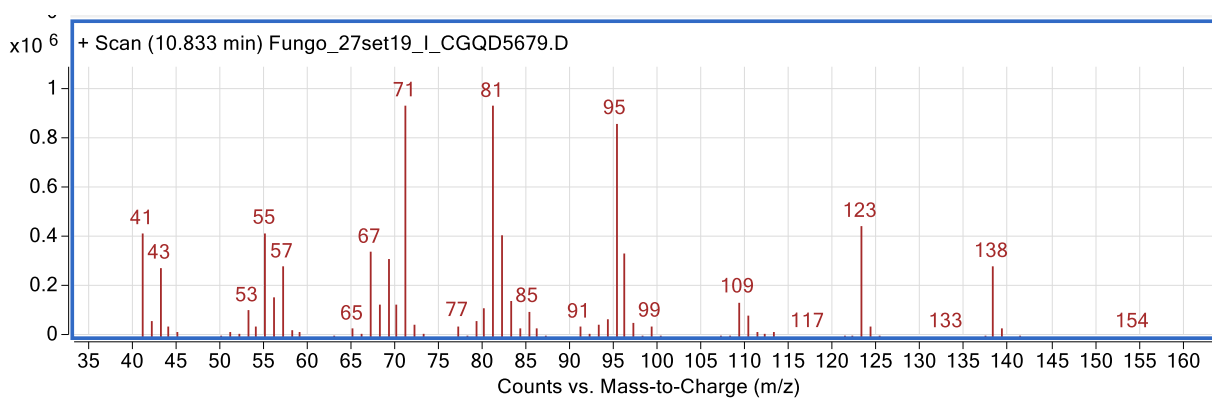
S5.27. Methyl(methylthio)methyl disulfide (**27**)S5.28. *p*-Menthone (**28**)S5.29. *p*-Mentha-1,5-dien-8-ol (**29**)



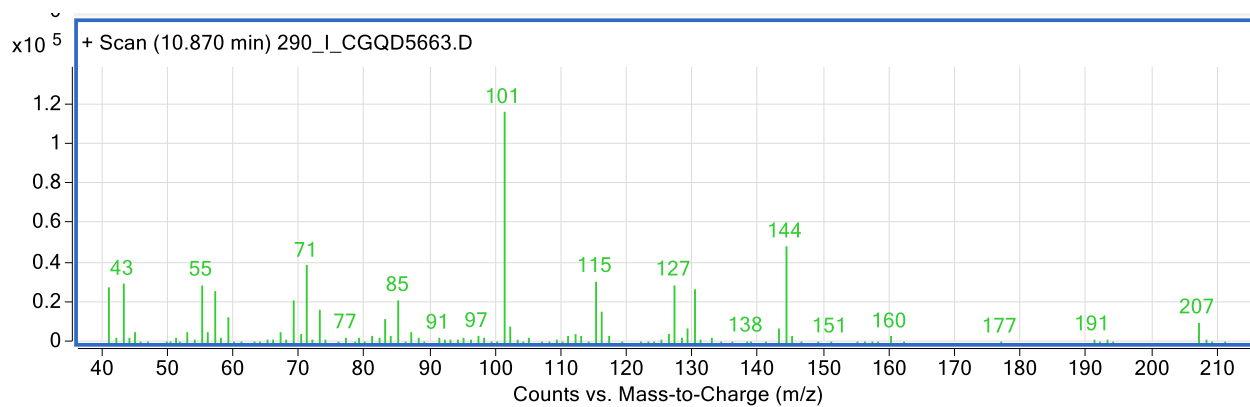
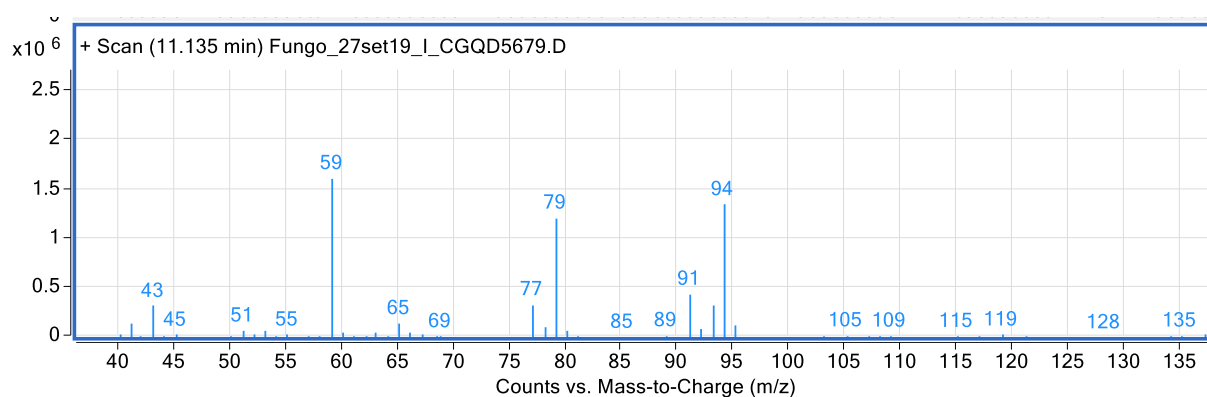
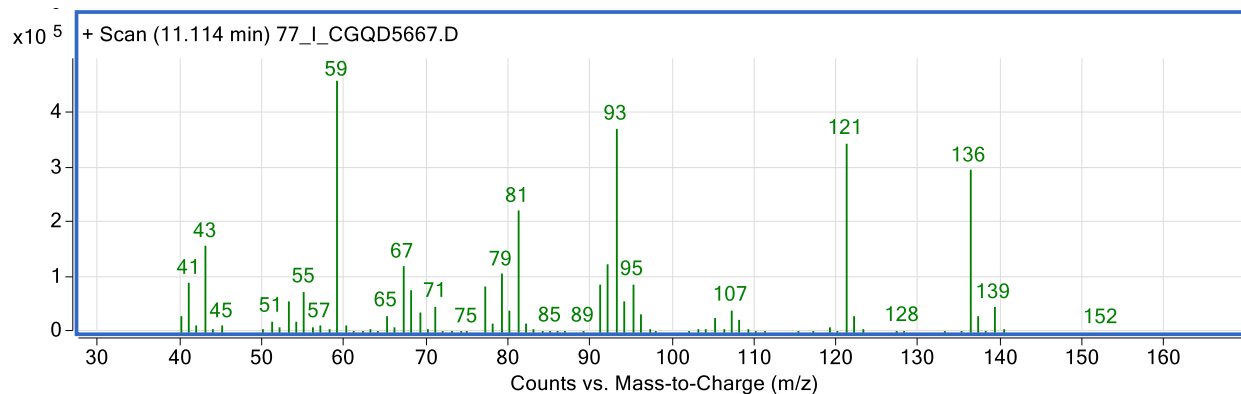
S5.30. 2-Decanone (30)

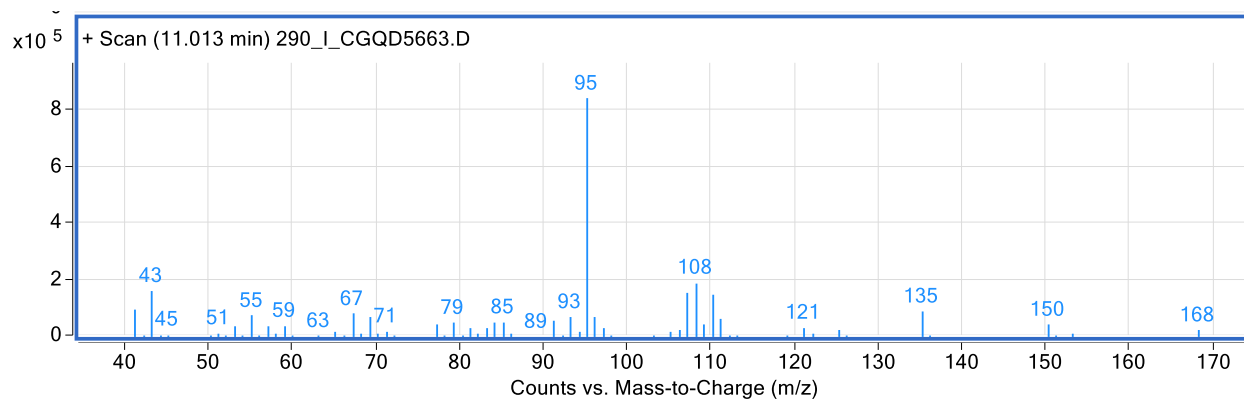
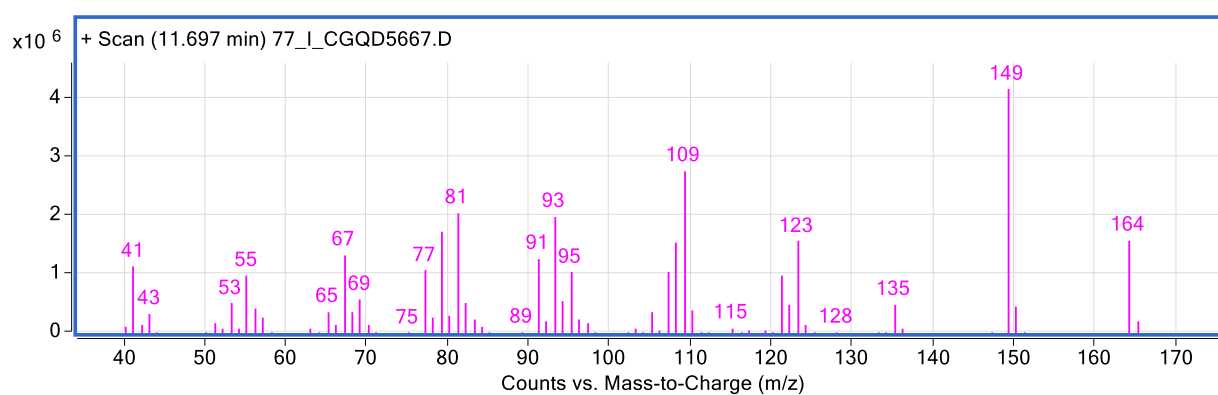
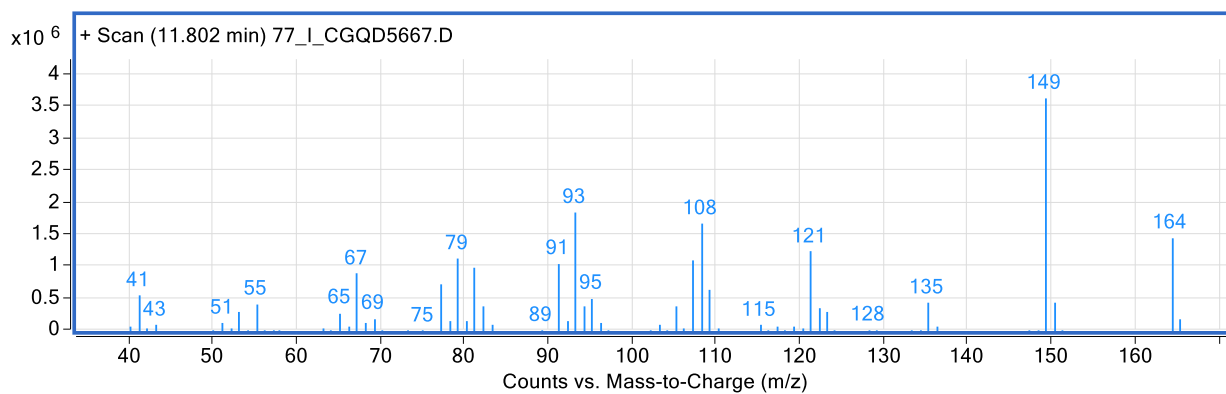


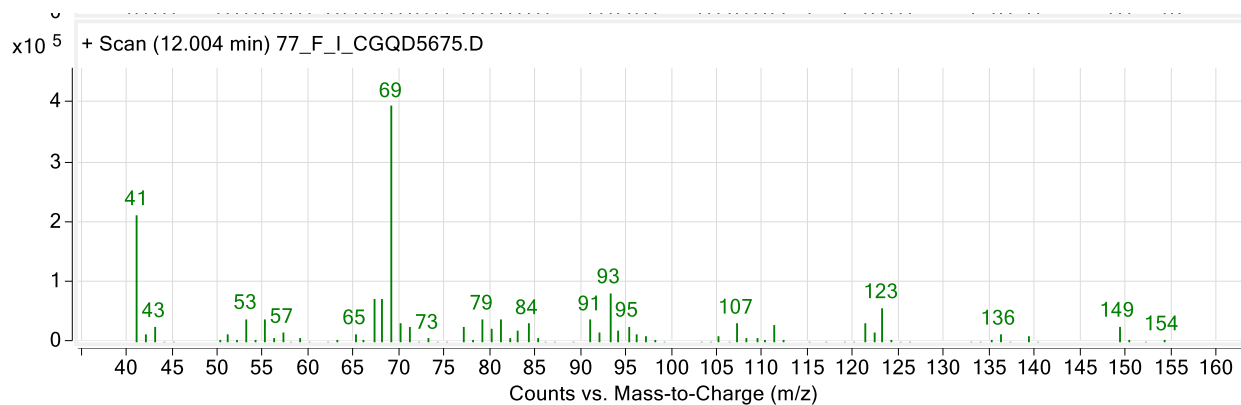
S5.31. Menthol (31)



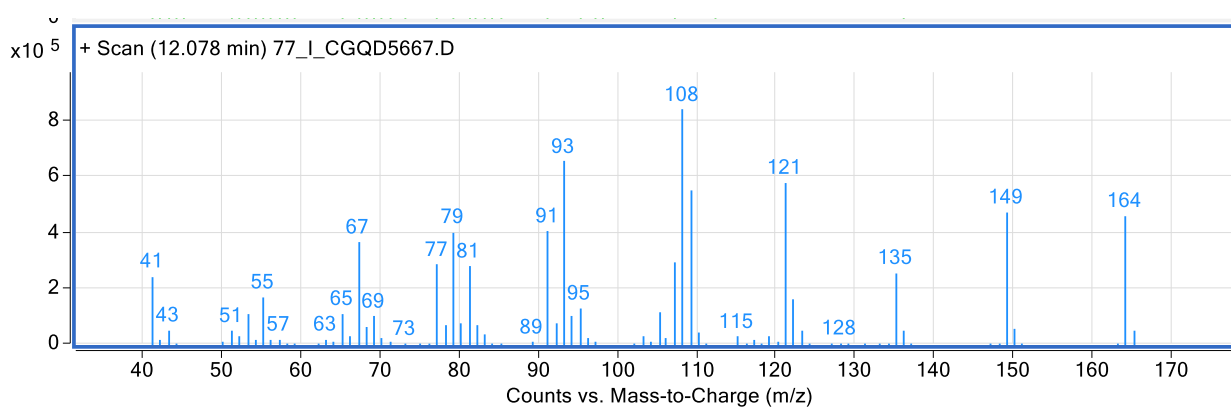
S5.32. Not identified (32)

S5.33. *p*-Mentha-1(7),2-dien-8-ol (**33**)S5.34. α -Terpineol (**34**)S5.35. 2-Methylisoborneol (**35**)

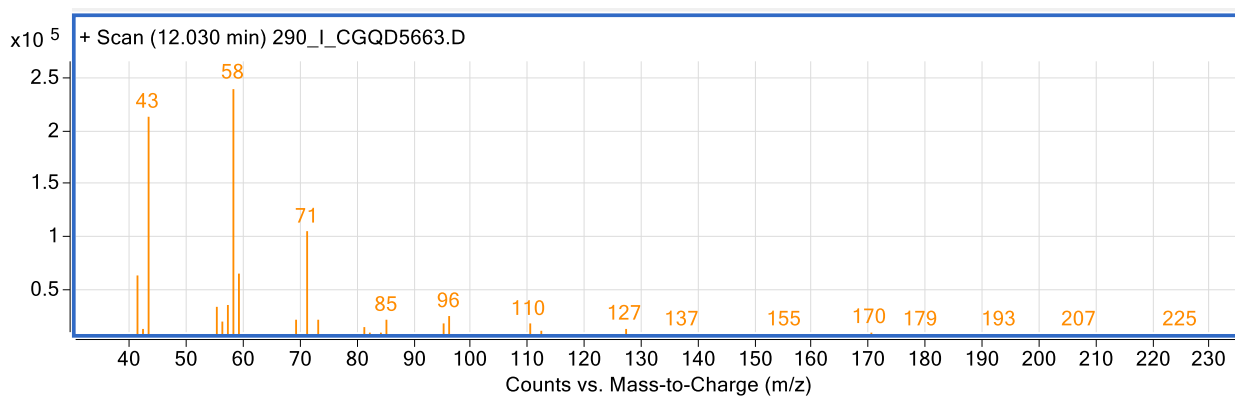
S5.36. Thymol methyl ether (**36**)S5.37. Carvacrol methyl ether (**37**)S5.38. Geraniol (**38**)



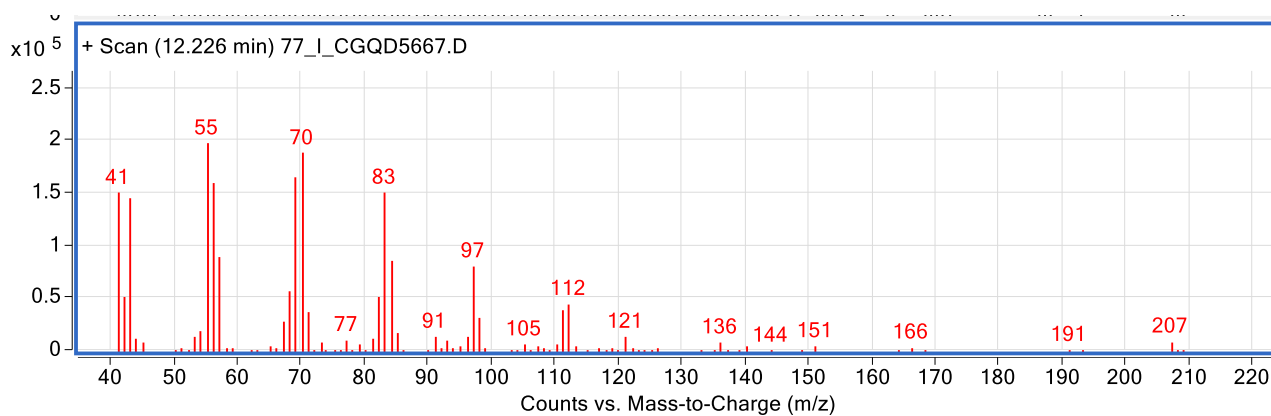
S5.39. Not identified (39)



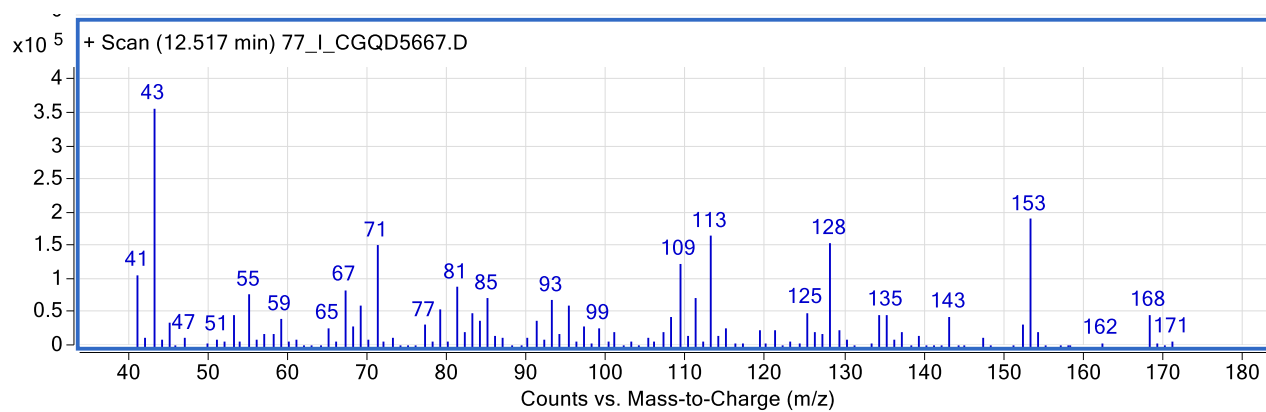
S5.40. Not identified (40)



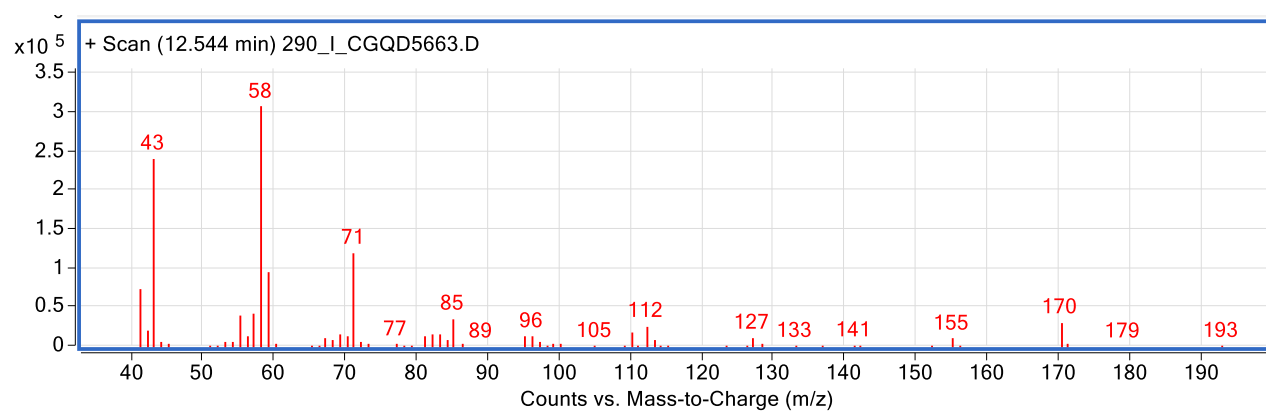
S5.41. 1-Decanol (41)



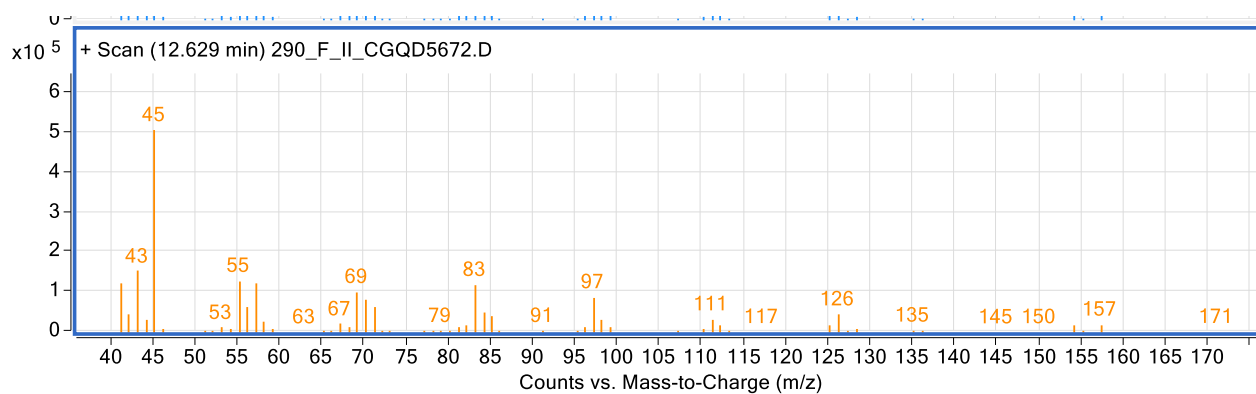
S5.42. Not identified (42)



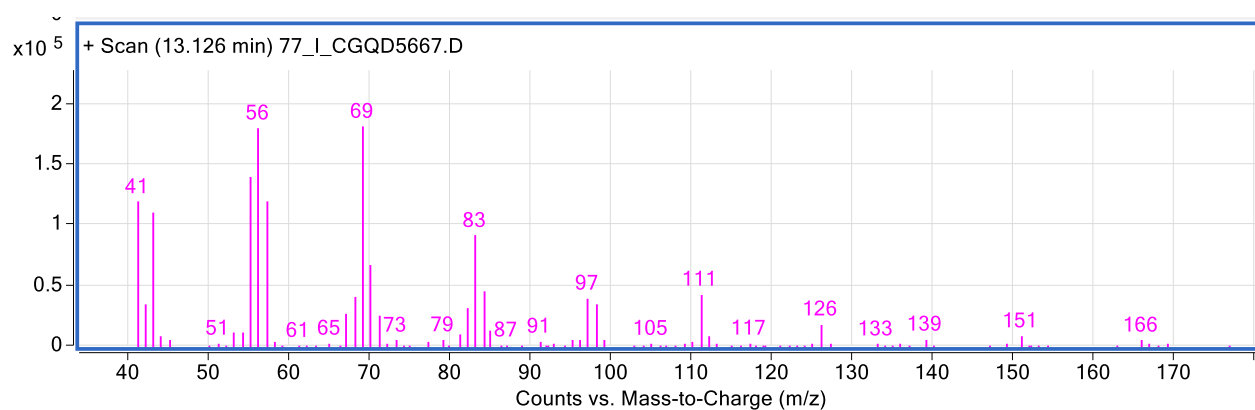
S5.43. 2-Undecanone (43)



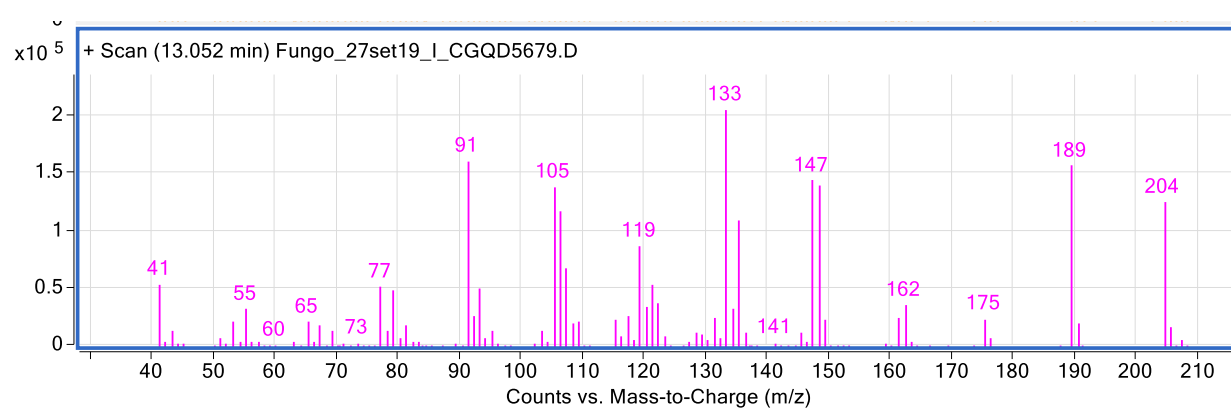
S5.44. 2-Undecanol (44)



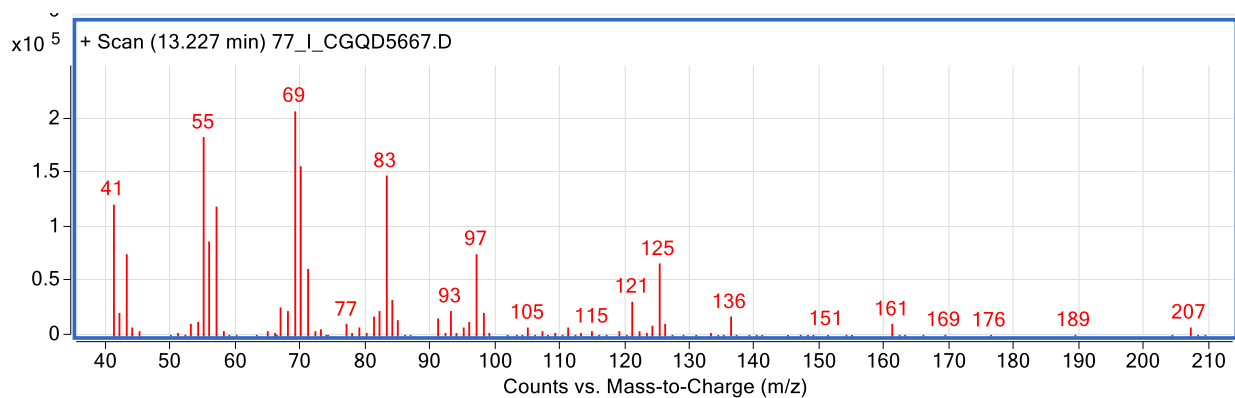
S5.45. Not identified (45)



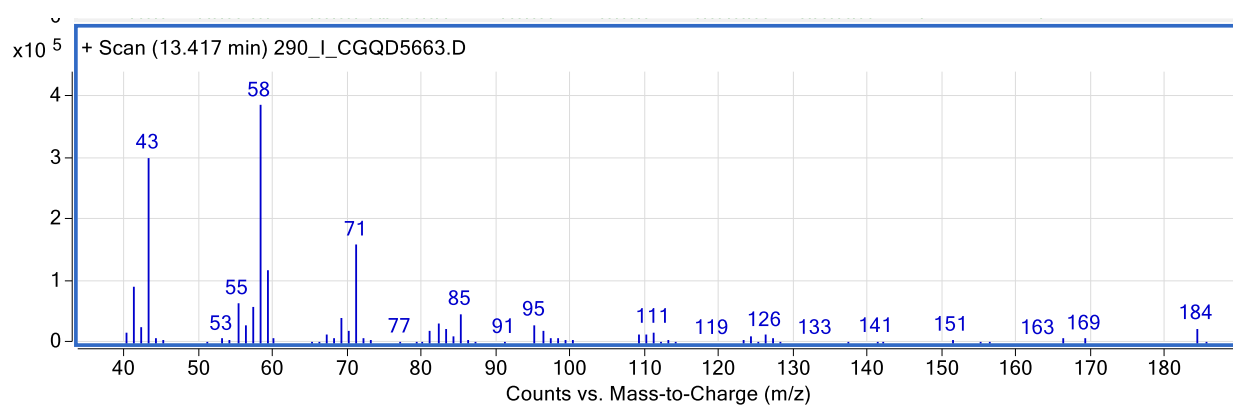
S5.46. Silphinene (46)



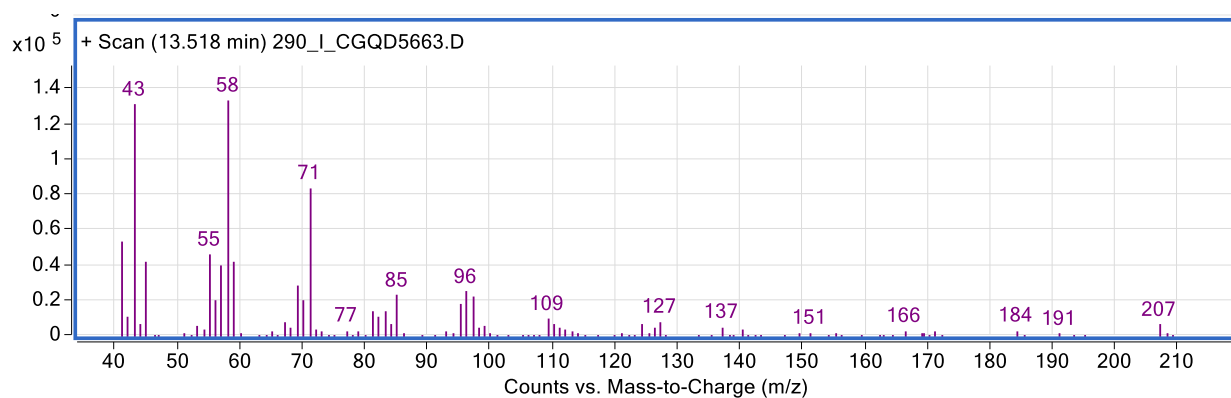
S5.47. Not identified (47)



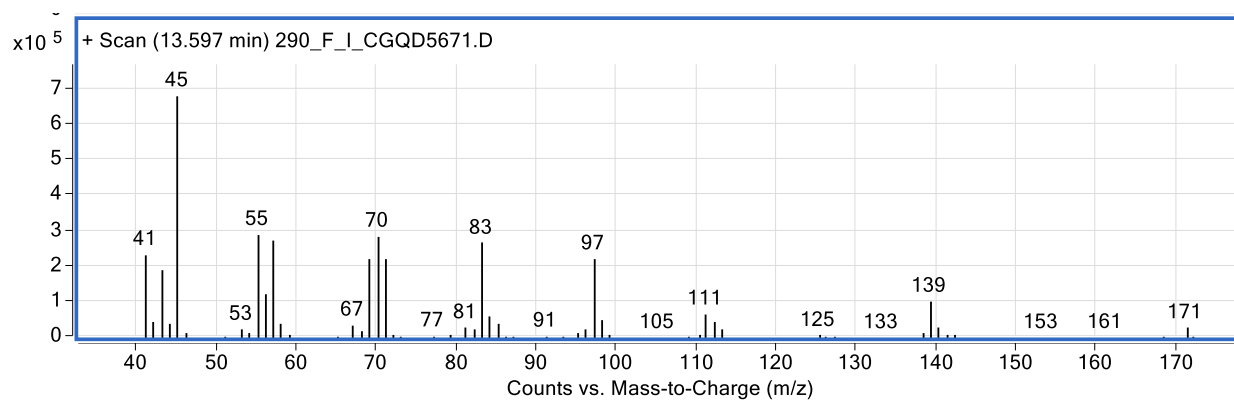
S5.48. 2-Dodecanone (48)



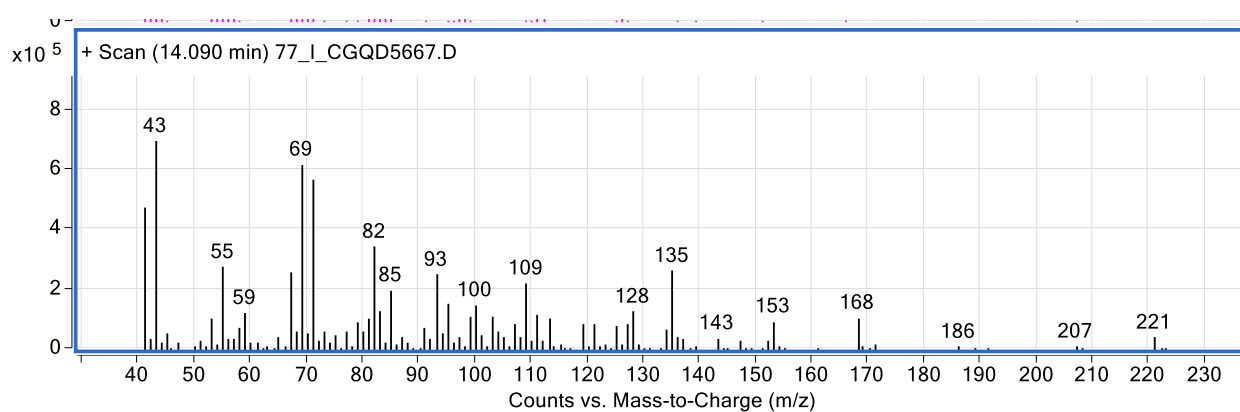
S5.49. not identified (49)



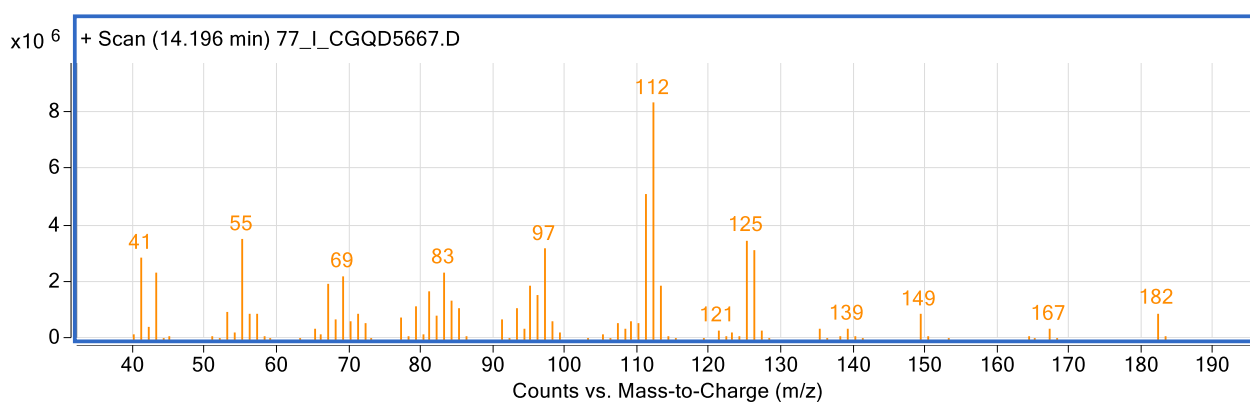
S5.50. Not identified (50)



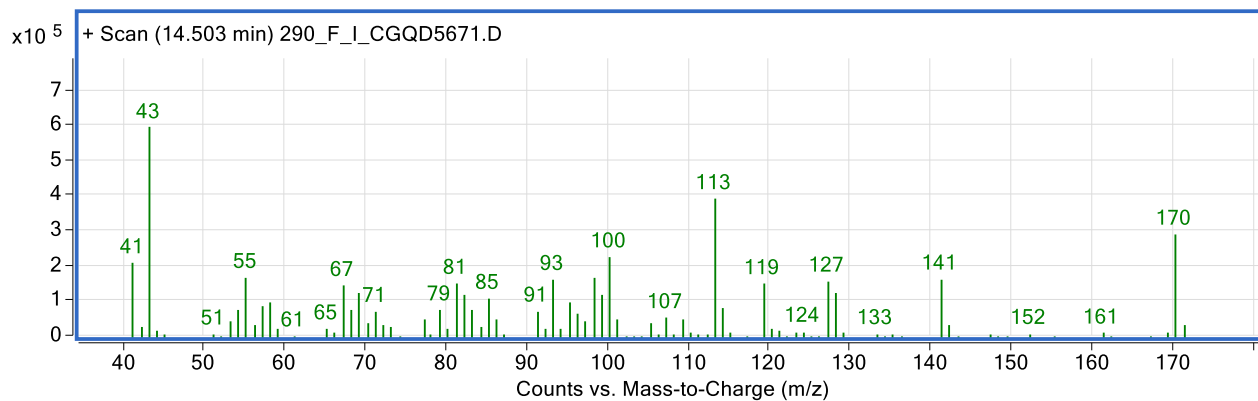
S5.51. not identified (51)



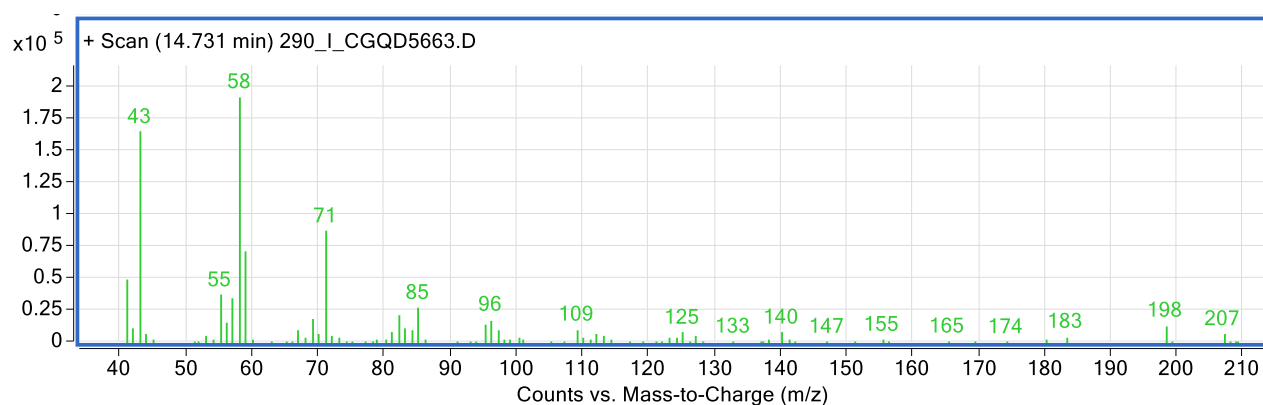
S5.52. Geosmin (52)



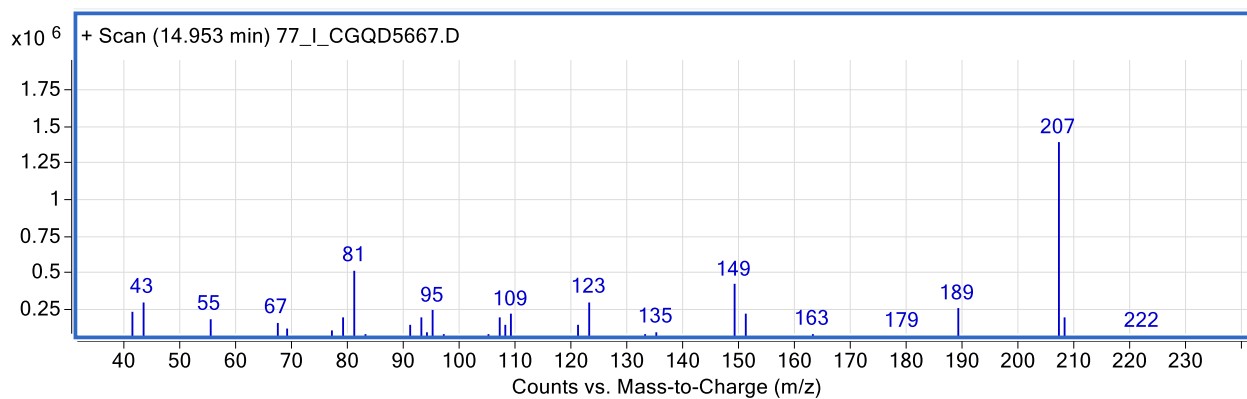
S5.53. not identified (53)



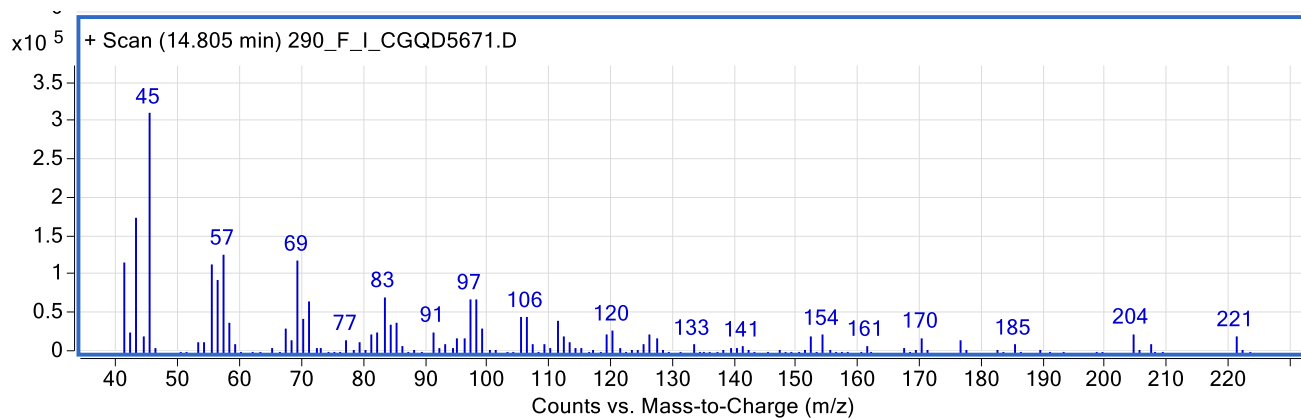
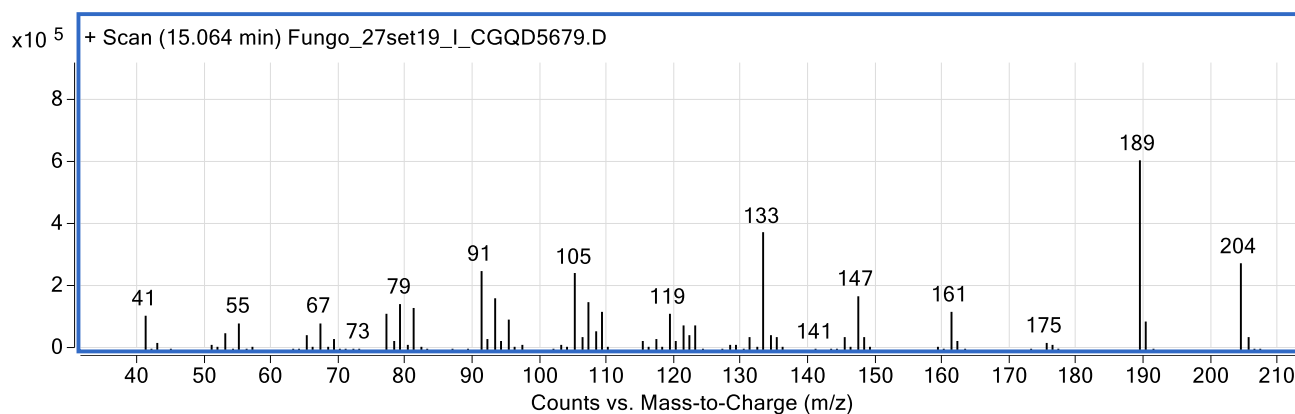
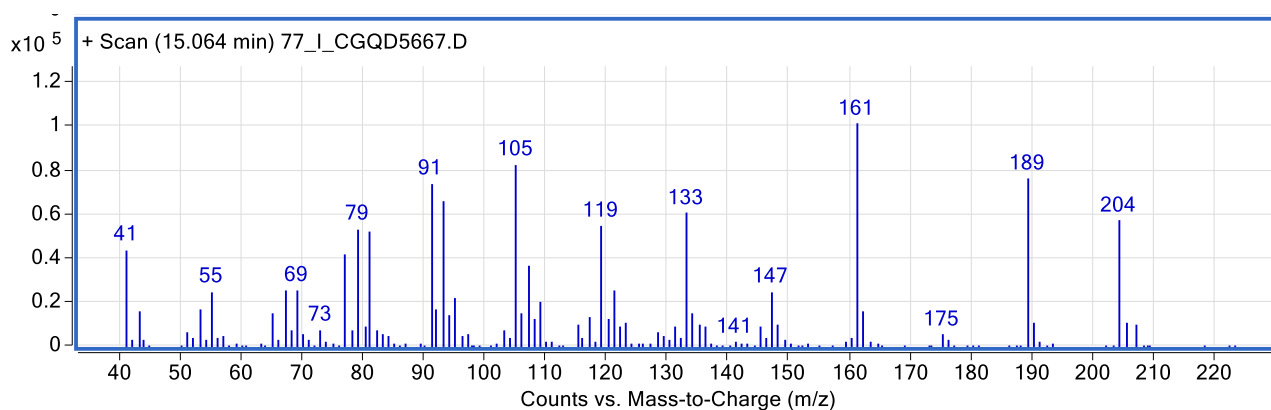
S5.54. 2-Tridecanone (54)



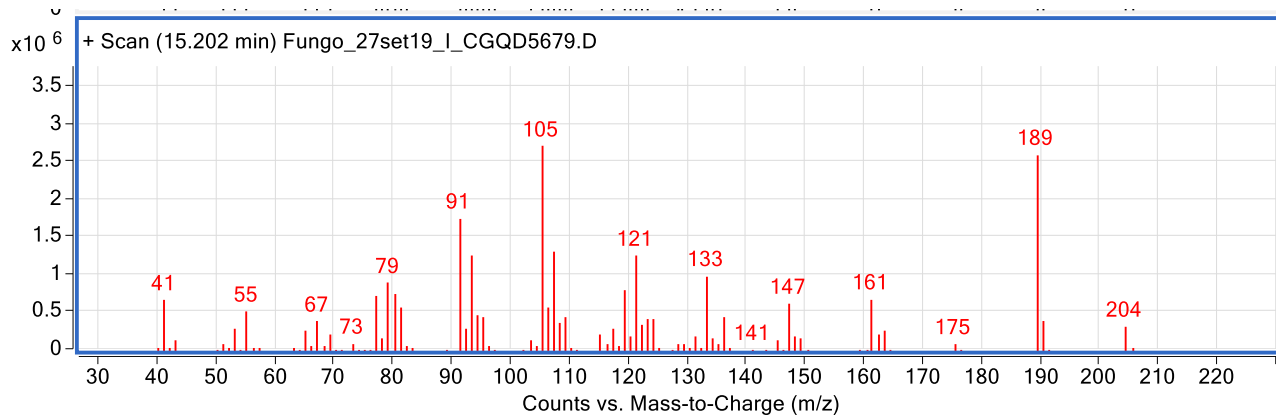
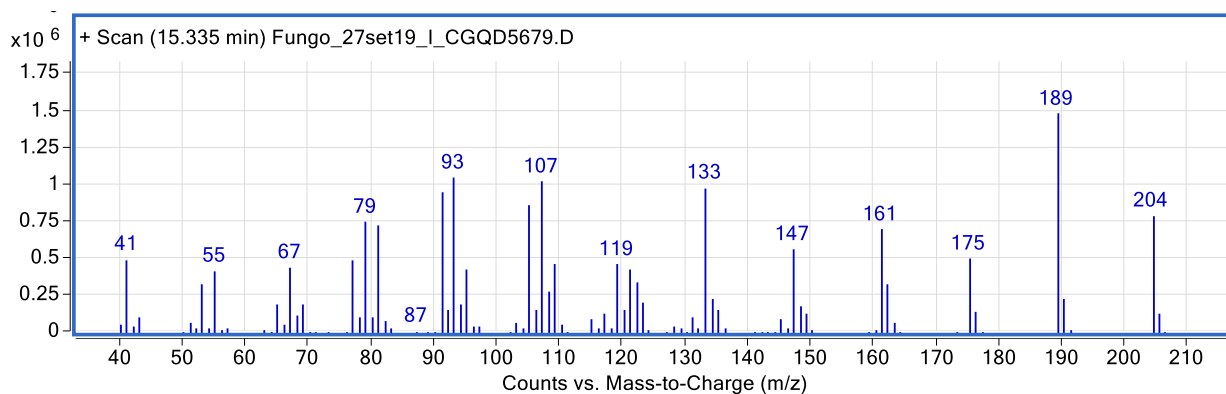
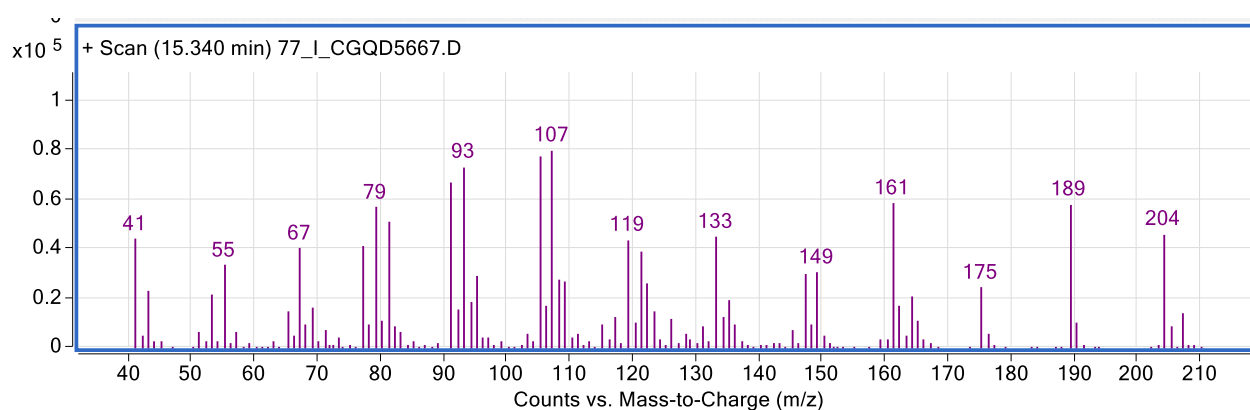
S5.55. not identified (55)

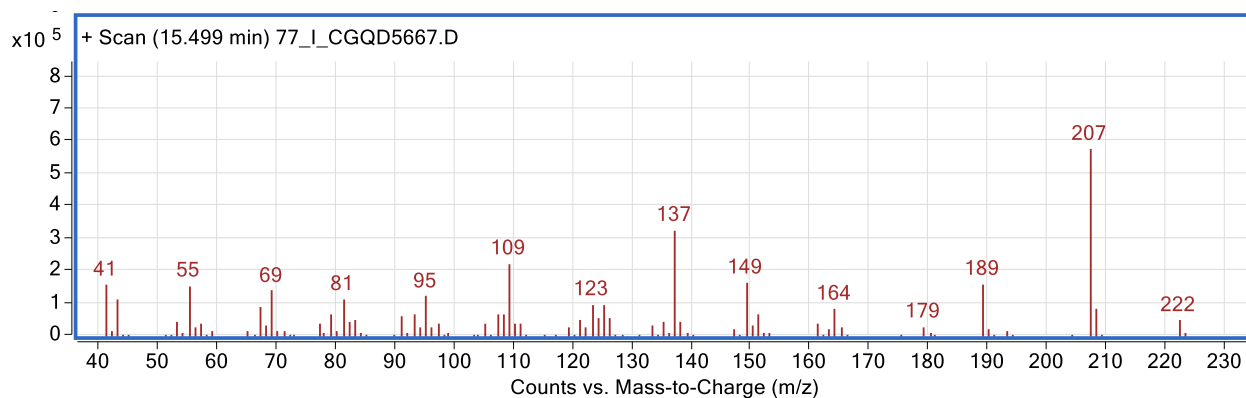
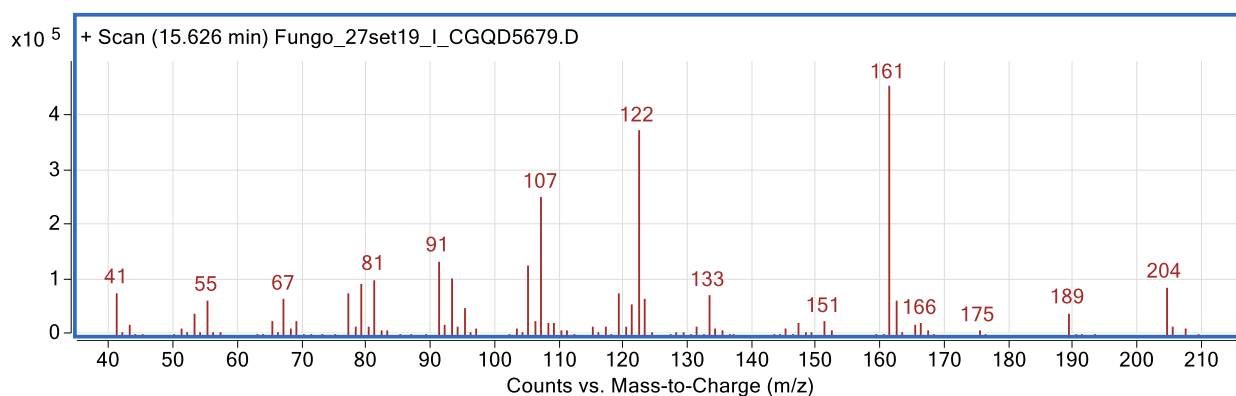
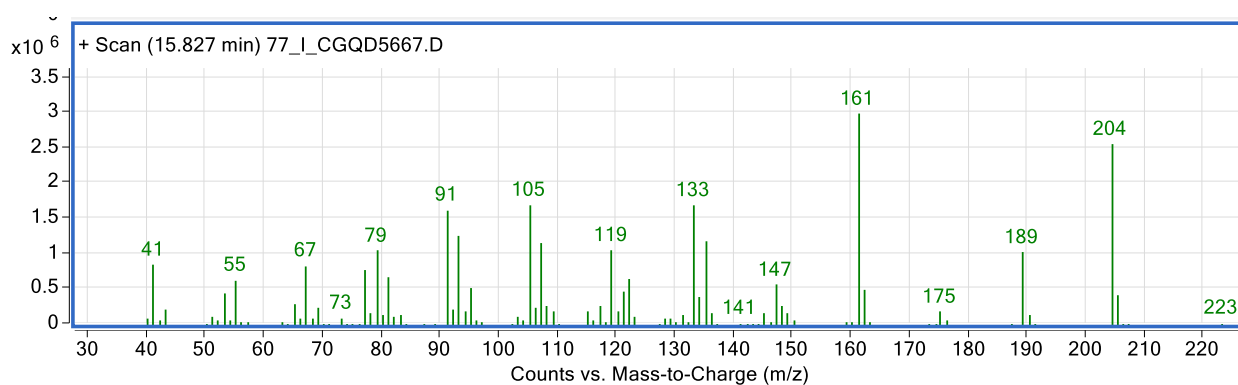


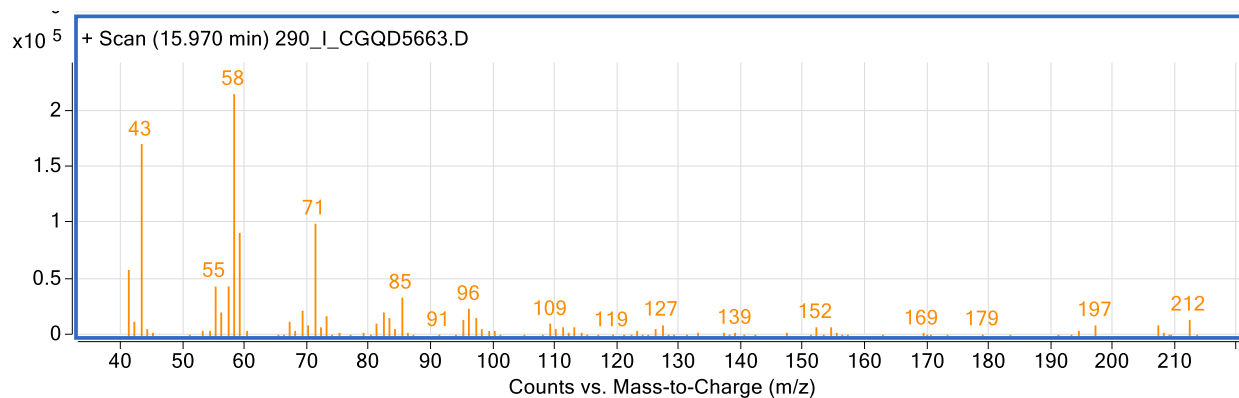
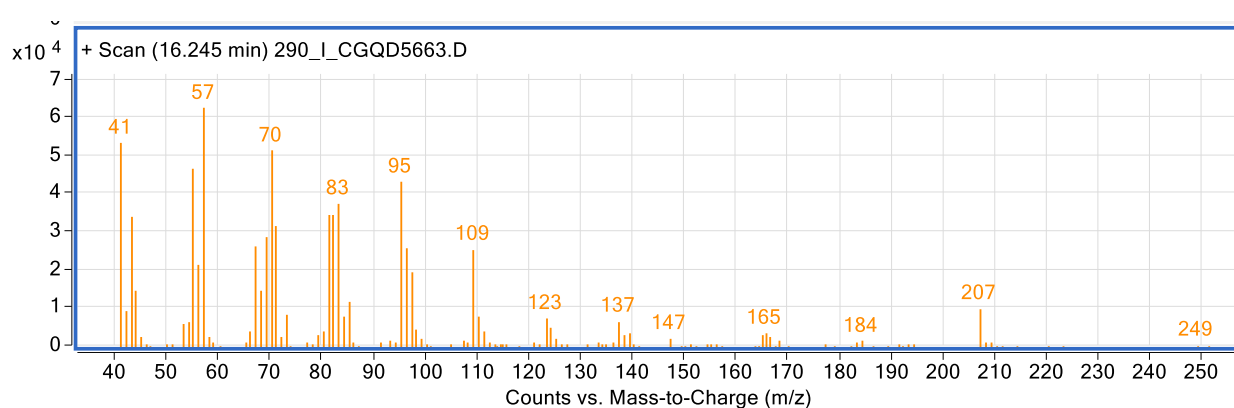
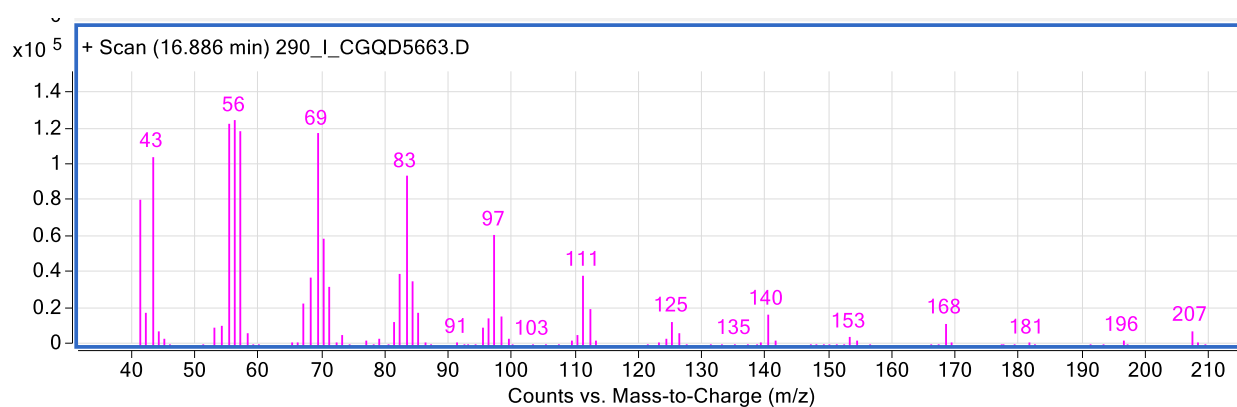
S5.56. not identified (56)

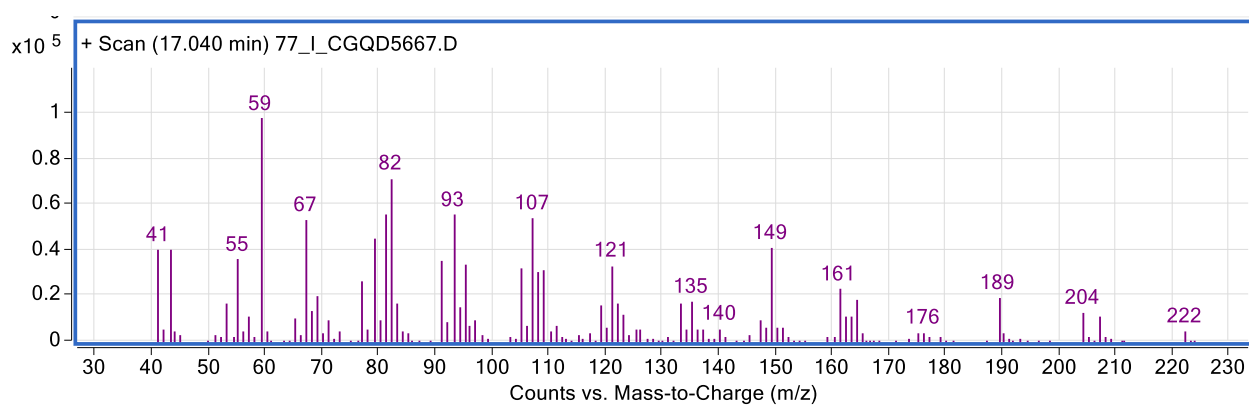
S5.57. β -Chamigrene (57)S5.58. γ -Gurjunene (58)

S5.59. Aristolochene (59)

S5.60. α -Selinene (**60**)S5.61. Viridiflorene (**61**)S5.62. not identified (**62**)

S5.63. 7-*epi*- α -Selinene (**63**)S5.64. Selina-3,7(11)-diene (**64**)S5.65. 2-Tetradecanone (**65**)

S5.66. (Z)-8-Dodecen-1-ol acetate (**66**)S5.67. 1-Tetradecanol (**67**)S5.68. α -Eudesmol (**68**)



S5.69. Mint sulfide (69)

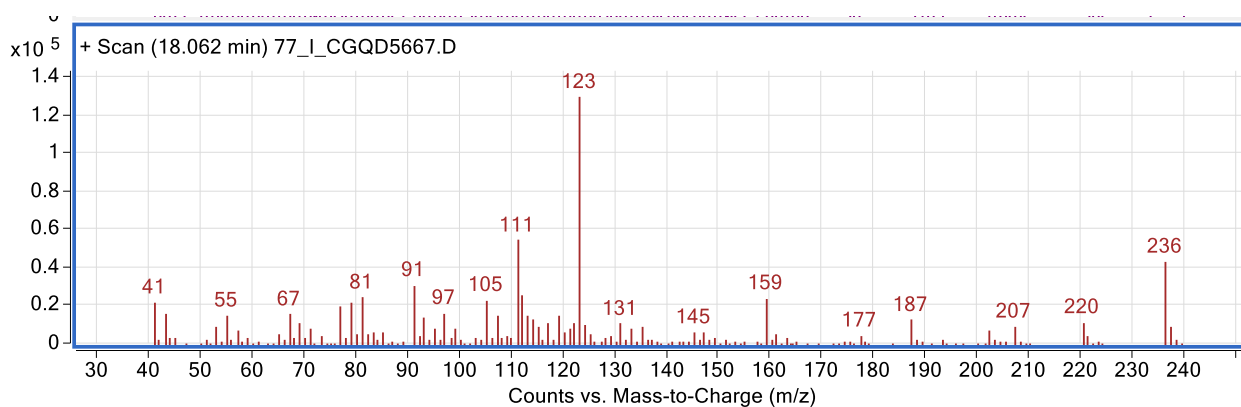


Figure S6. Correlation map for the VOCs analysis of axenic cultures (*ACTB-290/C. musae*) and co-culture (*ACTB-290/C. musae*). Squares in dark blue refers to the high inverse correlation ($r = -1$) and the one in dark red are related to high direct correlation ($r = +1$). Correlations from -1 to $+1$ are represented in gradient colors between dark blue and dark red as can be seen at the vertical color bar on the right.

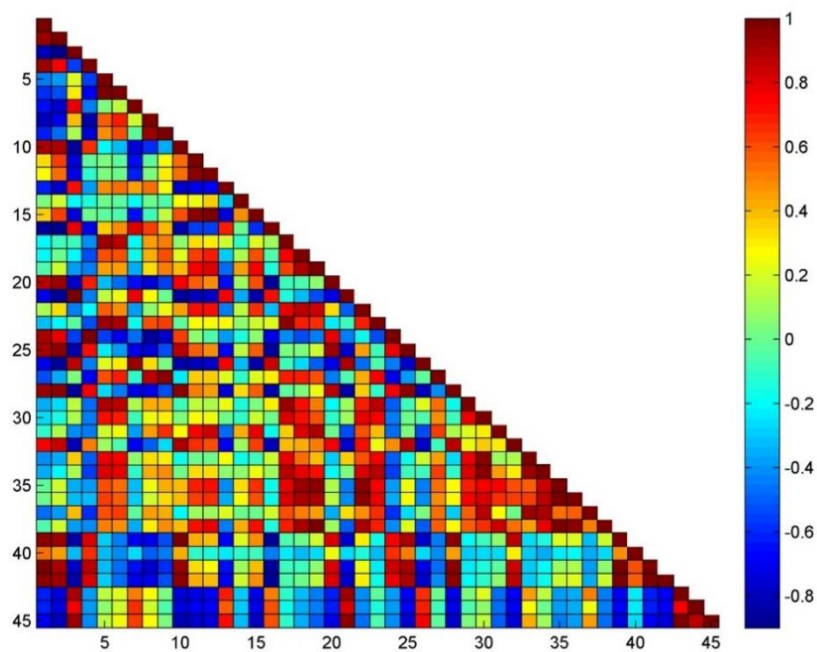
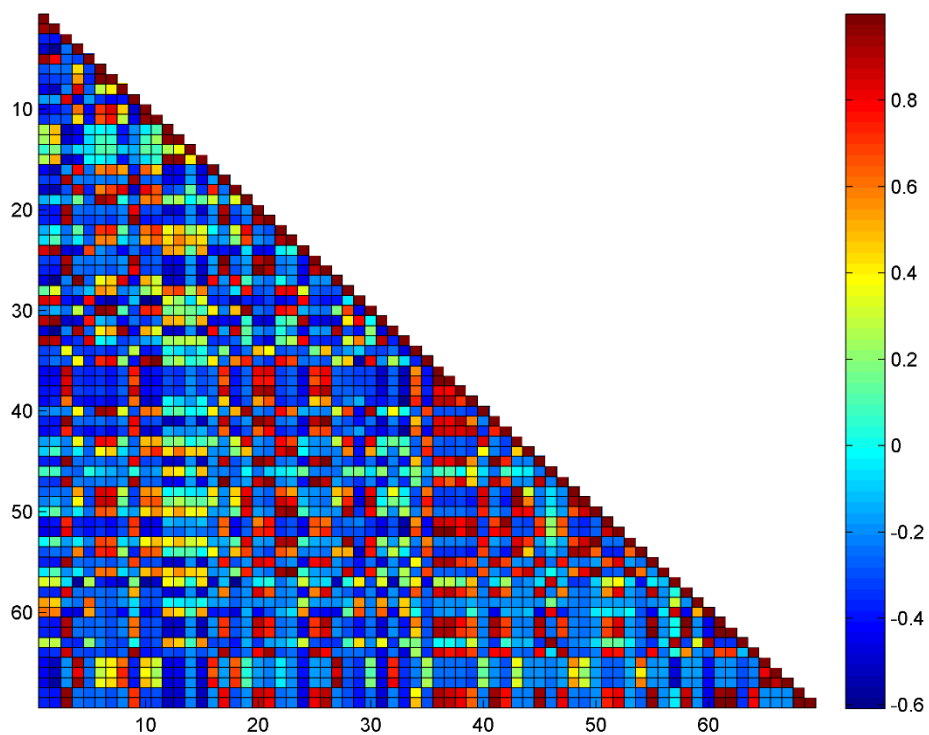


Figure S7. Correlation map for VOCs of the samples ACTB-77, ACTB-290, *C. musae* and co-cultures ACTB-77/*C. musae* and ACTB-290/*C. musae*. The correlation goes from -1 (dark blue) to 1 (dark red) scale and it was calculated pair by pair.



REFERENCES

1. Costa, A.C.; Miranda, R.F.; Costa, F.A.; Ulhoa, C.J.; *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2021**, *34*, 102.
2. Vilaplana, R.; Pazmiño, L.; Valencia-Chamorro, S.; *Postharvest Biol Technol.* **2018**, *138*, 56.
3. Damasceno, C. L.; Duarte E. A. A.; Santos L. B. P. R.; Oliveira T. A. S.; Jesus, F. N.; Oliveira, L. M.; Góes-Neto, A.; Soares, A. C. F.; *Biol. Control.* **2019**, *137*, 104.
4. Harir, M.; Bendif, H.; Bellahcene, M.; Zohra, F.; Rebecca, P.; *Basic Biol. Appl. Actino.* **2018**, *6*,100.
5. David, B.; Wolfender, J. L.; Dias, D. A.; *Phytochem Rev.* **2015**, *14*, 299.
6. Schulz-Bohm, K.; Martín-Sánchez, L.; Garbeva, P.; *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 24.
7. Mari, M.; Bautista-Baños, S.; Sivakumar, D.; *Postharvest Biol. Tech.* **2016**, *122*, 70.
8. Choudoir, M.; Rossabi, S.; Gebert, M.; Helmig, D.; Fierer, N.; *mSystems.* **2019**, *4*, 1.
9. Ross, C.; Opel, V.; Scherlach, K.; Hertweck, C.; *Mycoses.* **2014**, *57*,1.
10. Brakhage, A. A.; Schoroeckh, V.; *Fungal Genet. Biol.* **2011**, *48*, 15.
11. Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K.; Wolfender, J.L.; *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1180.
12. Bertrand, S.; Schumpp, O.; Bohni, N.; Monod, M.; Gindro, K.; Wolfender, J. L.; *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1157.
13. Deng, X.; Zhang, N.; Shen, Z.; Zhu, C.; Li, R.; Salles, J.F.; Shen, Q.; *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *30*, 1.
14. Bonfante, P.; Anca, I. A.; *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 363.
15. Yadav, A. K.; Srivastava, A. K.; Yandigeri, M. S.; Kashyap, S. K.; Modi, D. R.; Arora, D. K.; *Ann. Microbiol.* **2010**, *60*, 605.
16. Sharma, M.; Dangi, p.; Choudhary, M.; *Int. j. curr. microbiol. appl. sci.* **2014**, *3*, 801.
17. Scholler, C. E. G.; Gurtler, H.; Pedersen, R.; Molin, S.; Wilkins, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2615.

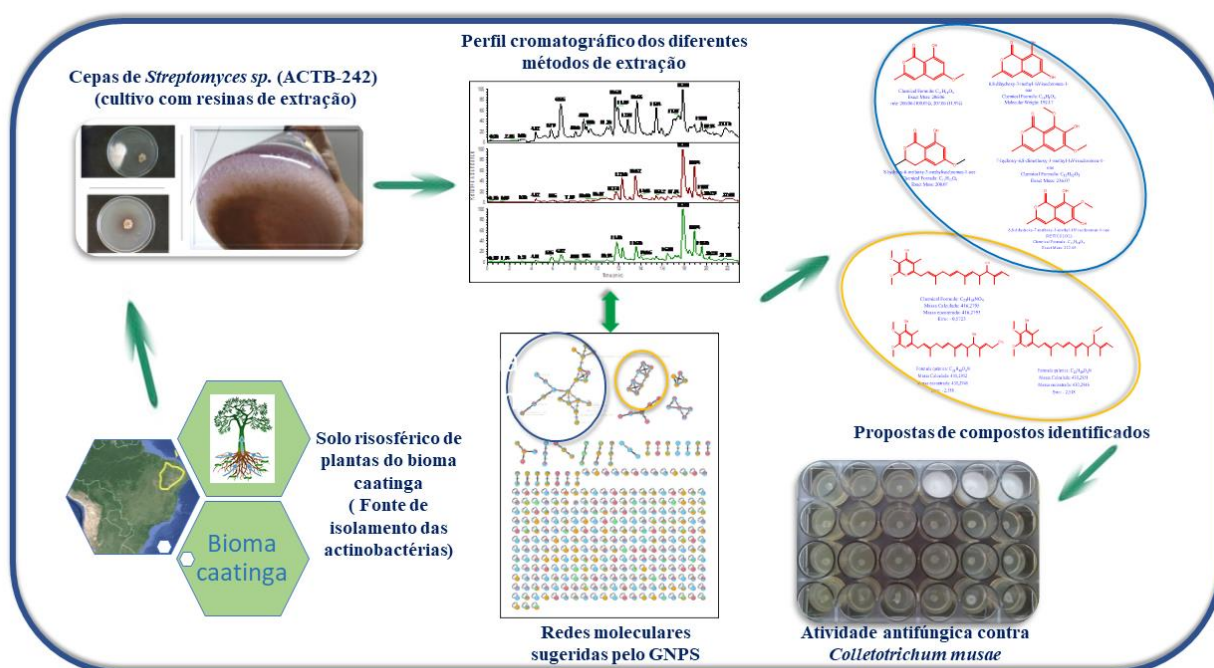
18. Sharma, V.; Salwan, R. In: New and future developments in microbial biotechnology and 720 bioengineering; Singh, J. S. ed.; Elsevier, India, 2018, ch. 6.
19. Boukaew, S.; Plubrukam, A.; Prasertsan, P.; *BioControl*. **2013**, *58*, 471.
20. Li, Q.; Ning, P.; Zheng, L.; Huang, J.; Li, G.; Hsiang, T.; *Biol. Control*. **2012**, *61*, 113.
21. Nzekoue, F. K.; Caprioli, G.; Fiorini, D.; Torregiani, E.; Vittori, S.; Sagratin, G.; *Food Res. Int.* **2019**, *12*, 730.
22. Maia, R.; Correia, M.; Pereira, I. M. B.; Beleza, V. M.; *Microchem.* **2014**, *112*, 164.
23. Gherghel, S.; Morgan, R.M.; Arrebola-Liébanas, J.; Romero-González, R.; Blackman, C.S.; Garrido-Frenich, A.; *Forensic Sci.* **2018**, *290*, 207.
24. Hantao, L.W.; Aleme, H. G.; Passador, M. M.; Furtado, E. L.; Ribeiro, F. A. L.; Poppi, R. J.; Augusto, F.; *J. Chromatogr. A*. **2013**, *1279*, 86.
25. Oliveira, F. C.; Barbosa, F. G.; Mafezoli, J.; Oliveira, M. C. F.; Camelo A. L. M.; Longhinotti, E.; Lima, A. C. A.; Câmera, M. P. S.; Gonçalves, F. J. T.; Freire, F. C. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 2189.
26. Lazazzara, V.; Perazzolli, M.; Pertot, I.; Biasioli, F.; Puopolo, G.; Cappellin, L.; *Microbiol. Res.* **2017**, *201*, 52.
27. Amini, J.; Agapoor, Z.; Ashengroph, M.; *J. Plant Prot. Res.* **2016**, *56*, 254.
28. Zhang, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Zhang, L.; Jiang, D.; Chen, W.; Li, G.; *Biol. Control*. 2014, *72*, 98.
29. Motulsky, H.; Graphpad prism 6.01; Scientific 2D graphing and statistics software; University of California San Diego, California, 1989.
30. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K.; *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870.
31. Hall, T. A; Nucleic Acids Symp. Ser. **1999**, *41*, 95.
32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, accessed in July 2020.
33. Higgins, D.; Sievers, F.; Dineen, D.; Wilm, A.; ClustalW 2.0.12; Multiple sequence alignments; Bioinformatics Institute Cambridge, United Kingdom, 1994.

34. Swofford, D. I.; PAUP 4.0 program beta 10; Phylogenetic Analysis Using PAUP; University of Massachusetts, United States, 2002.
35. Asahi, Y.; Miura, J.; Tsuda, T.; Kuwabata, S.; Tsunashima, K.; Noiri, Y.; Sakata, T.; Ebisu, S.; Hayashi, M.; *AMB Expr.* **2015**, *5*, 6.
36. Sawoszczuk, T.; Sygula-Cholewinska, J.; Hoyo-Meléndez, J. M. D.; *J. chromatogr. A.* **2015**, *1409*, 30.
37. Chambers, J. M.; R Programming language; R foundation for statistical computing; Lucent Technologies, Vienna; Austria, 1993.
38. Adams, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Carol Stream: Illinois, USA, 2017.
39. <https://webbook.nist.gov/chemistry>, accessed in June 2020.
40. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed in June 2020.
41. Wise, B. M.; Gallagher N. B.; Bro, R.; Shaver, J. M.; Windig, W.; Scott, R.; KochPLS Toolbox Version 5.2 for use with MATLAB™, Eigenvector Research, Wenatchee, 2009.
42. MATLAB . version 7.10.0 (R2010a). Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.; 2010
43. Brereton, R. G.; *J. Chemom.* **2011**, *25*, 225.
44. Couto, E. F., Menezes, M., *Fitopatol. Bras.* **2005**, *29*, 406.
45. Jayakumar, V.; Ramesh, S.A.; Viswanathan, R.; *Sugar Tech.* **2021**, *23*, 94.
46. Zhao, P.; Li, P.; Wu, S.; Zhou, M.; Zhi, R.; Gao, H.; *AMB Express.* **2019**, *9*, 1.
47. Quintana-Rodriguez, E., Morales-Vargas, A.T., Molina-Torres, J., Ádame-Alvarez, R.M., Acosta-Gallegos, J. A.; Heil, M.; *J. Ecol.* **2014**, *103*, 250.
48. Rojas-Flores, C.; Ventura-Aguilar, R. I.; Bautista-Baños, S.; Revah, S.; Saucedo-Lucero, J. O.; *Microbiol. Res.* **2019**, *228*, 2.
49. Cordovez, V.; Carrion, V.J.; Etalo, D.W.; Mumm, R.; Zhu, H.; Wezil, G. P.V.; Raaijmakers, J. M.; *Front. Microbiol.* 2015, *6*, 1.
50. Boukaew, S.; Prasertsan, P.; *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 652.

51. Karuppiyah, V.; Ranaghan, K. E.; Leferink, N. G. H.; Johannissen, L. O.; Shanmugam, M.; Cheallaigh, A. N.; Bennett, N. J.; Kearsley, L. J.; Takano, E.; Gardiner, J. M.; Van der Kamp, M. W.; Hay, S.; Mulholland, A. J.; Leys, D.; Scrutton, N.S.; *ACS Catalysis*. **2017**, *7*, 6268.
52. Zhao, P.; Xue, Y.; Gao, W.; Li, J.; Zu, X.; Fu, D.; Feng, S.; Bai, X.; Zuo, Y.; Li, P.; *Peptides*. **2018**, *103*, 48.
53. Lan-Phi, N. T.; Vy, T. T.; *Int. Food Res.* **2015**, *22*, 2426.
54. Mohammadhosseini, M.; *Asian J. Chem.* **2012**, *24*, 3814.
55. Oliveira, L. M. I.; Araújo, M. A. C.; Souza, S. K. V.; Cardoso, G. N.; Oliveira, L. E.; Oliveira, P. F.; *J. Mycol. Med.* **2017**, *27*, 195.
56. Dias, I. J.; Trajano, E.; Castro, R. D.; Ferreira, G. L. S.; Medeiros, H. C. M.; Gomes, D. Q. C.; *Braz. J. Biol.* **2017**, *78*, 368.
57. Zhou, H.; Tao, N.; Jia, L.; *Food Control*. **2014**, *37*, 277.
58. Lira, M. H. P.; Andrade Júnior, F. P.; Moraes, G. F. Q.; Macena, G. S.; Pereira, F. O.; Lima, I. O.; *J. Essent. Oil Res.* **2020**, *32*, 187.
59. Elshafie, H. S.; Mancini, E.; Sakr, S.; De Martino, L.; Mattia, C. A.; De Feo, V.; Camele, I.; *J. Med. Food*. **2015**, *18*, 929.
60. Wang, C.; Wang, Z.; Qiao, X.; Li, Z.; Li, F.; Chen, M.; Wang, Y.; Huang, Y.; Cui, H.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *341*, 45.
61. Wang, Z.; Zhong, T.; Chen, K.; Du, M.; Chen, G.; Chen, X.; Wang, K.; Zalan, Z.; Takacs, K.; Kan, J.; *Food Control*. **2021**, *120*, 1
62. Bro, R.; Smilde A.K.; *Anal. Methods*. **2014**, *6*, 2812.

Capítulo 2

Identificação de compostos da classe de piericidinas e isocumarinas produzidos por *Streptomyces* (ACTB-242) usando a técnica UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking



Identificação de compostos da classe de piericidinas e isocumarinas produzidos por *Streptomyces* (ACTB-242) usando a técnica UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking

Maria V. de Brito,^a Wéverson L. Fonseca,^b Marcio A. Ootani,^d Suane O. S. Brasil,^e Francisco M. P. Viana,^{c†} Maria C. F. Oliveira,^{a*} Cecília M. A. Oliveira,^f Lucília Kato.^f

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl. 940, Fortaleza-CE, 60.440-593, Brazil.

^b Colégio Técnico de Bom Jesus-CTBJ, Universidade Federal do Piauí, BR 135, km 3 - Planalto Horizonte, Bom Jesus-PI, 64900-000, Brazil.

^c EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Pernambuco 2270, Pici, Fortaleza-CE, 60511-110, Brazil.

^d Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luiz Freire - lado par, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-540, Brazil.

^e Cargill - EWOS 7721 132 St, Surrey, BC V3W 4M8, Canadá.

^f Universidade Federal de Goiânia, Avenida Esperança, s/n- Chácara de Recreio Samambaia, Goiânia-GO, 74690-9000

Resumo

Nesse capítulo mostramos os resultados para os estudos com metabólitos secundários não voláteis, produzidos pelas cepas ACTB-242, identificada por biologia molecular como *Streptomyces* sp. As porcentagens de inibição de crescimento para os *Fusarium Oxysporum*, *Colletotrichum brevisporum* e *C. musae* tratados com extratos produzidos por essa cepa variaram de 65 a 80% a concentração única de 0,5 mg/mL. Estudos de “desrepliação” usando UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking foram utilizados na identificação de seis compostos da classe de isocumarinas e 12 da classe de piericidinas. A exploração das concentrações inibitória mínima (CIM) dos extratos ACTB-242-SR, ACTB-242-HP-20 e ACTB-242-XAD16N apresentaram inibição total de crescimento micelial nas concentrações de 250 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente para *C. musae*.

Palavras-chaves: Isocumarinas, Piericidinas, *Streptomyces*, Molecular networking, Antifúngica.

* Corresponding author: M. C. F. Oliveira (mcfo@ufc.br)

 <https://orcid.org/0000-0002-7445-2347>

1 INTRODUÇÃO

A maioria das doenças que acomete as safras economicamente importantes na agricultura são ocasionadas por ataques de fitopatógenos, sendo que cerca de 85% dessas pragas são conhecidas como fungos.¹ A ocorrência de fitopatógenos fúngicos tais como *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium moniliforme*, *Cercospora beticola*, *Colletotrichum acutatum*, *Rhizoctonia oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum musae*, *Cladosporium herbarum* entre outros micro-organismos resistentes, apresentam grande ameaça à segurança alimentar mundial, pois mais de 20% dessas doenças afetam drasticamente as colheitas todo ano.^{2,3}

O uso de pesticidas sintéticos no combate de fitopatógenos tem sido uma das poucas vias de tratamento desse problema na agricultura. No entanto a aplicação contínua tem gerado resistência em fitopatógenos a fungicidas tradicionais.⁴ Assim a aplicação de pesticidas em lavouras tem sido uma solução inviável na agricultura, tanto do ponto de vista de resistência dos micro-organismos, como do ponto de vista da toxicidade, acarretando problemas futuros a saúde humana e ao meio ambiente. Logo, o uso de tais produtos químicos devem ser restritos em campos agrícolas.⁵

Considerando-se que as doenças de plantas e frutos precisam ser controladas para manter a qualidade e a abundância dos alimentos.⁴ Assim, o controle biológico tornou-se uma abordagem opcional e promissora no tratamento dessas doenças, devido à sua compatibilidade ambiental. Buscas por novos compostos bioativos, que leve a redução ou eliminação do uso de agrotóxicos são incessantes por pesquisadores da comunidade científica química e agrônoma.⁶

Os micro-organismos da rizosfera, zona que é diretamente influenciada pelas raízes das plantas, abrigam comunidades microbianas complexas sustentadas por exsudatos liberados das raízes, e tem se mostrado fonte motivadora na busca por substratos naturais que substitua os pesticidas químicos. O fato da existência de uma infinidade de interações, entre micro-organismos da rizosfera desencadeia um caminho de investigação, dentro de rol de interações antagonicas, nos quais provem controle biológico frente a patógenos, parasitas ou outros predadores, promovendo a redução dessa população e consequentemente a atividade patogênica desses organismos.^{7,8}

Entre os micro-organismos rizosféricos atuantes no biocontrole de fitopatógenos destacam-se os actinomicetos, que são bactérias filamentosas quimio-organotróficas que formam esporos assexuados. Grandes concentrações de populações dessas bactérias, são encontradas em solos rizosféricos se comparados com solos não rizosféricos.^{9,10}

As actinobacterias do gênero *Streptomyces* em especial, são constantemente estudadas com relação à produção de metabólitos secundários biativos, que incluem antiprotozoários, antibacterianos, antifúngicos, antivirais e agrobiológicos como inseticidas, pesticidas e herbicidas.¹¹

Metabólitos bioativos sintetizados biologicamente por *Streptomyces* são frequentemente biodegradáveis e podem ser úteis para o desenvolver fungicidas agrícolas específicos, com efeitos colaterais mínimos ao ecossistema. Estudos atuais exibem um vasto campo de atuação de metabólitos antifúngicos produzidos por *Streptomyces* na inibição de crescimento de fungos fitopatogênicos que atacam plantações de produção alimentícias ou frutos pós-coleta.^{12,13,14,15}

Com exemplo específicos de aplicação na agricultura cita-se: geldanamicina e nigericina, antibióticos produzidos por *Streptomyces* sp. no tratamento de fitopatógenos.¹⁶ Além desses, um antibiótico importante de ampla aplicação, incluindo a agrícola é a “rapamicina” isolada de *Streptomyces hygroscopicus*, cujos relatos da literatura descrevem sua atividade contra *Candida albicans* e outros fungos. Posteriormente, estudos revelaram a aplicação desse antibiótico na inibição contra *Mucor circinelloides* e *Rhizopus oryzae*, responsáveis por doenças pós-colheita em frutas.¹⁷

Um outro antibiótico de destaque é a oligomicina A isolada de *Streptomyces diastatocromogenes* e responsável pela inibição de fitopatógenos, incluindo *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger*, *Cladosporium cucumerinum*, *Magnaportheoryzae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum lagenarium*, *Phytophthora capsici*.¹⁸

O interesse em investigar a presença de compostos com potencial atividade antifúngica tem estimulado a busca por estratégias rápidas e eficientes na identificação de perfis de metabólitos bioativos. Estratégias de desrepliação que incluem técnicas sofisticadas tais como HPLC-NMR, HPLC-MS, HPLC-NMR-MS e HPLC-MS/MS associadas ao uso de redes moleculares,¹⁹ tem sido usado como procedimentos de desrepliação ampla, rápido e eficiente na localização e caracterização de metabólitos conhecidos em extratos de matrizes biológicas complexas.²⁰

A obtenção de redes moleculares que auxiliem no processo de identificação de compostos requer o uso de dados MS/MS destes para construí-las. Para a identificação de compostos no processo de desrepliação, os dados de MS/MS deverão estar integrados ao site Molecular Global Natural Products Social (GNPS), que inclui um conjunto de bibliotecas contendo um grande número de espectros MS/MS de produtos naturais conhecidos.²¹

Neste trabalho se descreve o perfil de duas classes de metabólitos secundários presentes no extrato de *Streptomyces* sp. (ACTB-242), identificados por meio de desrepliação através da técnica de *UHPLC-MS/MS*, utilizando-se uma abordagem de redes moleculares. E a atividade antifúngica, frente a fungos fitopatogênicos, foi determinada para os extratos contendo a mistura dos metabólitos secundários identificados.

2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1 Origem dos micro-organismos e meios de cultura

Vinte cepas de actinobactérias da rizosfera de plantas da Caatinga (Tabela 1, IS), pertencentes ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agropecuária Tropical (CNPAT, Fortaleza, Ceará, Brasil) foram investigadas.

A cepa do fungo fitopatogênico *Colletotrichum musae* (MMBF226/12) foi doada pela Micoteca do Instituto Biológico São Paulo. As cepas dos fungos *C. Brevisporum* (CMM-1174), *L. Theobramae* (CMM-2199) são de procedência da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Coleção de cultura de fungos fitopatógenos Profa. Maria Menezes-(CMM).

Todos os experimentos de inoculação dos micro-organismos foram realizados utilizando os meios de cultura batata dextrose (BD) e batata-dextrose-ágar (BDA) comercial da Kasvi[®]. O meio BD foi preparado com 200 g de batata inglesa, 20 g de glicose da Sigma-Aldrich[®] e 1 L de água destilada. Para o BDA empregou-se 39,0 gL⁻¹ do meio comercial contendo a composição de 84,4% de caldo de batata, 8,4% de dextrose e 7,2% de ágar bacteriológico.

2.2. Estudo das relações antagonistas entre actinobactérias e *Colletotrichum musae*

A cepa do fungo *C. musae* foi escolhida como fungo de interesse para realização dos testes de antagonismo, devido sua patogenicidade em plantas e frutos pós-coleta. Esse experimento foi realizado com base no método de culturas pareadas.^{22,23} As 20 cepas de actinobactérias e do fungo *C. musae* foram cultivadas separadamente em BDA durante 5 dias. Em uma placa de Petri de 80 mm, contendo meio BDA, depositou-se um disco de 5 mm da actinobactéria a uma distância de 20 mm da borda da placa. Após 48h de incubação sob condição estática a 28 °C, um disco de 5 mm do micélio do fungo foi depositado na placa, sendo este a 20 mm da borda da placa e 40 mm da actinobactéria. Para cada experimento, placas controle foram preparadas contendo somente o fungo. As placas foram envolvidas com duplas camadas de parafilme Kasvi[®] e incubadas sob condições estáticas a uma temperatura de 28 °C por 5 dias (Figura 1). Os diâmetros foram medidos com um paquímetro digital, modelo DANIU (100mm), da Vernier Compostos de Fibra de Carbono de Alta Precisão. Os bioensaios foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram analisados segundo a *one-way* ANOVA, o que determinou diferença significativa com $p < 0,05$ empregando-se o programa computacional GraphPad *prism*.

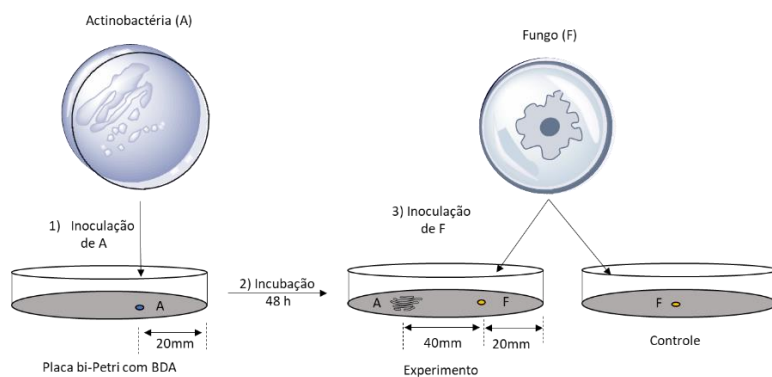


Figura 1- Representação da metodologia de triagem de actinobactérias produtoras de metabólitos secundários com potencial antifúngico.

2.3 Cultivo e obtenção dos extratos da actinobactéria ACTB-242

Na obtenção dos fermentados biológicos em pequena escala da cepa ACTB-242 a ser investigada, a cultura pura da actinobactéria em BDA (3 discos de 5 mm) foi inoculada em 3 Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura BD (batata, dextrose) cada. Os frascos foram mantidos durante 14 dias a temperatura de 28 °C, sob agitação de 150 rpm em mesa agitadora CT-165 da Cientec. Após esse período, a fase aquosa de cada frasco foi separada da biomassa por filtração simples e, separadamente, submetida à partição com AcOEt (3 x 50 mL). As frações orgânicas foram destiladas em evaporador rotativo, gerando seus respectivos extratos brutos. A massa obtida para um frasco de experimento do cultivo foi 4,5 mg.

2.4 Potencial biológico do extrato ACTB-242 a fungos fitopatógenos a concentração única.

Os experimentos foram realizados em placas de 24 poços por meio da técnica de difusão em meio de cultura BDA, usando uma concentração única de 500 ppm (500 mg/L) para o extrato testados em triplicata. Em cada poço da placa foi utilizado 1,5 mL de meio de cultura, assim foi utilizado 0,75 mg de extrato dissolvidos em 30 µL de DMSO (menos de 2%). Essas soluções em DMSO foi dispersa em cada um dos 24 poços da placa contendo 1,5 mL de BDA. No controle positivo usou-se o fungicida Folicur® 200 EC Bayer S/A (Tebuconazol a 200 g/L-20% m/v, d=1,0237 g/mL), a concentração única 100 ppm (100 mg/L), que corresponde 0,733 µL por poço. No preparo do controle negativo usou-se apenas 30 µL de DMSO em cada 1,5 mL de meio de cultura por poço. Após completa solidificação dos meios na placa de poços, depositou-se um disco de 3 mm de cada um dos micro-organismos testados em cada um dos poços da placa. A placa foi incubada a 28 °C por 48 horas. Os resultados foram analisados considerando o diâmetro de crescimento micelial dos fungos ensaiados com os extratos de interesse em comparação com o

crescimento dos fungos no controle negativo. A inibição de crescimento dos fungos foi calculada de acordo com a fórmula matemática em $CMI (\%) = (dc - df/dc) \times 100$, onde dc (mm) é o diâmetro médio da colônia no controle e df (mm) é o diâmetro médio da colônia de cada tratamento.²⁴

2.5 Extração do DNA genômico, PCR e análises filogenéticas da cepa ACTB-242

O DNA genômico da cepa foi extraído usando o kit *Bacterial Genomic DNA purification* (HIMEDIA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific), versão 1.0, sendo então diluído a concentração de 10 ngL^{-1} e armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. A sequência nucleotídica da região genômica 16S do DNA ribossômico (rDNA), foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers 27F (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). As misturas de PCR (50 μL) continham 6,25 μL de DNA genômico ($10 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), 10 μL de buffer 5x, 1 μL de dNTP (10 mM), 2 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,8 μL de cada iniciador (10 mM), 0,5 μL de GoTaq polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e 28,65 μL de água ultrapura estéril. O programa de termociclador Flexigene® usado na amplificação dos produtos de PCR incluiu uma etapa desnaturação inicial a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 s, anelamento a $56 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 s e extensão 72 durante 60 s, com uma extensão final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min.²⁵ Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris Borato EDTA 1X, corados com brometo de etídio ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) durante 1 min e visualizados sob transluminador UV. Após verificação das bandas amplificadas, alíquotas de 40 μL de cada produto de PCR foram purificadas e sequenciadas pela empresa MacroGen Inc., Coreia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

As sequências nucleotídicas foram editadas usando o programa BioEdit versão 7.0.5,²⁶ foram sujeitas à verificação da identidade através da ferramenta básica de busca de alinhamento local de nucleotídeos (*Basic Local Alignment Search Tool = BLASTn*) do GenBank alinhadas manualmente usando ClustalW com sequências previamente publicadas e depositadas no GenBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As relações filogenéticas foram inferidas pela análise de máxima parcimônia (MP) e realizadas através de uma opção de busca heurística por *tree-bisection-reconnection* (TBR) no programa MEGA 7.²⁵ O suporte estatístico da árvore foi testado usando análise de *bootstrap* com 1.000 repetições.

2.6 Cultivo de *Streptomyces* (ACTB-242) com e sem resina

A cepa da *Streptomyces sp.* ACTB-242 foi cultivada com resinas de extração para fins de comparação de rendimento com as extrações realizadas com acetato de etila, além da busca por seletividade de compostos extraídos durante o cultivo. O cultivo da actinobactéria (com e sem resina) foi realizado em pequena escala (500 mL de meio de cultura) e em grande escala (10 L de meio de cultura).

Na obtenção dos fermentados biológicos em pequena escala, a cultura pura de *Streptomyces sp.* ACTB-242 em BDA (3 discos de 5 mm) foi inoculada em 3 Erlenmeyers de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura BD (batata, dextrose) cada. Em dois dos frascos foram adicionadas 10 g das resinas Diaion (HP-20) e Amberlite (XAD16N) Sigma-Aldrich®, sendo uma resina por frasco. Os Erlenmeyers foram mantidos em mesa de agitação (150 rpm), durante 14 dias a temperatura de 28 °C. Após esse período, as resinas de cada experimento foram separadamente filtradas com gases, lavadas com água desionizada e eluídas com acetona. O solvente orgânico foi destilado sob pressão reduzida, e a solução aquosa resultante foi extraída com AcOEt (3 x 25 mL). O cultivo do experimento sem adição de resina foi submetido diretamente ao procedimento de partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 50 mL). Após esses processos, o solvente orgânico de cada experimento foi destilado em evaporador rotativo e forneceu os seguintes extratos: ACTB-242-SR-1 (14,0 mg), ACTB-242-HP-20-1 (76,8 mg) e ACTB-242-XAD16N-1 (66,3 mg).

O cultivo em grande escala foi realizado em frascos Erlenmeyers de 500 mL, usando um volume de 250 mL de meio BD. Foram preparados 30 L de meio de cultura, sendo 10 L para cada experimento (cultivos sem resina, com XAD16N e com HP-20). Foram empregados 10 g da resina/500 mL de meio de cultura. Os frascos foram mantidos por um período de 14 dias a temperatura de 28 °C e sob agitação de 150 rpm. Em seguida, no experimento sem resina, o meio de cultura foi extraído com AcOEt (3 x 250 mL). Nos dois outros experimentos, as resinas foram separadas da biomassa e extraídas com 2 L de acetona. Esta fase orgânica foi destilada em evaporador rotativo e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (3 x 100 mL). Após destilação do AcOEt de cada fração, os seguintes extratos foram gerados: ACTB-242-SR-2 (1,2 g), ACTB-242-HP-20-2 (4,0 g) e ACTB-242-XAD16N-2 (3,4 g).

Os extratos foram analisados em *UPLC-HRMS* e o estudo de fragmentação dos metabólitos secundários foi realizado utilizando o experimento PRM (*Parallel Reaction Monitoring* – Monitoramento de Reações Paralelas). Os dados analíticos foram processados na plataforma de gerenciamento de dados *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS).

2.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ACTB-242-SR, ACTB-242-HP-20 e ACTB-242-XAD16N contra *C. musae*.

Os valores de CIM para *C. musae* foram determinados usando um método de diluição seriada em placas de 24 poços, soluções contendo 4 mL de BDA com as respectivas concentrações (250, 125, 62,5,

31,25, 15,63 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos solúveis em 50 μL DMSO (menos de 2%) foram dispersas em cada poço da placa em triplicatas (1 mL de solução por poço). Discos de 3 mm de diâmetro com micélio de *C. musae* foram colocados na superfície do meio de cultura com as respectivas concentrações dos extratos. O crescimento micelial foi avaliada durante o intervalo de 12 até 48 horas de incubação à 28 °C. Os experimentos foram avaliados com base no experimento controle negativo, sendo encerrado ao total crescimento do micro-organismo nos poços contendo apenas o meio BDA com 12,5 μL DMSO. A concentração inibitória mínima (CIM) foi calculada de acordo com a fórmula matemática em $\text{CIM (\%)} = (dc - df/dc) \times 100$, onde dc (mm) é o diâmetro médio da colônia no controle e df (mm) é o diâmetro médio da colônia de cada tratamento. A menor concentração que inibiu completamente o crescimento do fungo foi considerado a concentração inibitória mínima (CIM).^{27,28}

2.8 Extração em fase sólida (SPE)

As extrações em fase sólida foram realizadas em cartuchos de fase reversa (Supelclean™ ENVI™-18 SPE Tube bedwt. 1 g, volume 6 mL e porosidade 20 μm) da Supelco Sigma-Aldrich®. O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente com metanol, seguida de acondicionamento com água desionizada (Milli-Q), utilizando um volume equivalente a três vezes o do cartucho.

2.9 Fracionamento cromatográfico do extrato ACTB-242-HP-20-2 e isolamento de 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina (1).

Uma porção (250 mg) do extrato ACTB-242-HP-20-2 foi dividido em 5 porções de 50 mg e cada porção foi dissolvida em 6 mL de MeOH/H₂O nas proporções em volumes descrito na tabela 1. Essas soluções foram adicionadas a um cartucho Supelclean® ENVI®-18, previamente ativado e equilibrado com a fase móvel. O cartucho foi eluído com as misturas dos solventes H₂O e MeOH, como indicado na Tabela 1. Foram geradas 5 frações de aproximadamente 100 mL cada. A fração 3 apresentou-se como um sólido cristalino amarelado, sendo constituída exclusivamente por 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina.

Tabela 1- Fracionamento cromatográfico do extrato ACTB-242-HP-20-2.

Eluente H ₂ O:MeOH (v/v)	Fração	Massa (mg)	Rend. (%)
1:0	1	21,0	14,0
7:3	2	8,4	5,6
1:1	3	35,7	23,8
3:7	4	43,5	29,0
0:1	5	14,6	9,7
TOTAL		123,2	82,1

2.10 Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-MS/MS Orbitrap FT-MS)

Nas análises dos extratos foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, ThermoScientific, com coluna Zorbax Eclipse Plus fenil hexil – Agilent (4,6 x 100mm; 3,5 µm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, ThermoScientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo e negativo, utilizando voltagem do spray 3,5 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 350°C, temperatura de gás auxiliar 250 °C, tube lens55 e faixa de massas m/z 150-850.

A análise por CLAE foi realizada com água desionizada, acidificada com 0,1% de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v), e acetonitrila acidificada com 0,1% ácido fórmico (Fase móvel B – v/v). A programação do gradiente iniciou com 70:30 (A:B %), 50:50 (A:B %) em 5 minutos, 30:70 (A:B %) em 3 minutos, 20:80 (A:B %) em 2 minutos, 100 (B %) em 3 minutos, permaneceu por 3 minutos, 30:70 (A:B %) em 2 minutos, permanecendo por 5 minutos.

O tempo de corrida foi de 23 minutos com fluxo de 0,3 mL/min, volume injeção 5 µL e temperatura da coluna 20 °C. Para o estudo de fragmentação foi utilizado o experimento PRM (Parallel Reaction Monitoring – Monitoramento de Reações Paralelas) com energias de colisão igual a 15, 30, 40 e 50 (NCE), usando como critério de seleção a abundância íons (picos mais intensos) presentes na amostra. Nos dados obtidos com energia de colisão de 30, foi encontrado os melhores perfis de fragmentação dos compostos, sendo esses processados no software Xcalibur™. os compostos foram identificados com base em seus tempos de retenção, fórmula molecular, padrão de fragmentação em comparação com dados da literatura e com auxílio da investigação de rede molecular networking.

2.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN ^{13}C), foram obtidos em um espectrômetro Bruker, modelo Avance DPX-300, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Os espectrômetros foram operados nas frequências de 300 MHz (^1H), 75 MHz (^{13}C), sob um campo magnético de 11,744 T e 7,05 T, respectivamente. A amostra foi dissolvida em 600 μL de metanol deuterado (CD_3OD) e analisada em tubo de 5 mm (WilmadLabglass, New Jersey, EUA). As multiplicidades das bandas de absorção dos prótons nos espectros de RMN- ^1H foram indicadas como: singlete (*s*), duplete (*d*), tripleto (*t*) e multiplete (*m*). Os dados espectrométricos referentes aos espectros de RMN ^1H e ^{13}C estão designados na forma de deslocamento químico (δ).

2.12 Descrição dos parâmetros utilizados na construção da rede molecular networking

As redes moleculares networking são ferramentas que vem sendo bastante utilizadas nos estudos de desrepliação de metabólitos secundários. A formação de uma rede molecular depende do fato de que os metabólitos estruturalmente semelhantes têm padrões de fragmentação MS/MS semelhantes, permitindo uma identificação instantânea de moléculas, análogos ou famílias de compostos. Nas redes moleculares cada nó corresponde a um espectro coerente de MS/MS, e é normalmente rotulado com a massa neutra do íon precursor.

Os nós com padrões de fragmentação são conectados com bordas (linhas), essas linhas nos fornecem valores de cosseno. Os valores de cosseno próximos de um, indica um excelente grau de semelhança com os compostos conectados entre os nós em uma rede molecular. Compostos presente na amostra e sugeridos pela biblioteca do GNPS, com cosseno próximo ou igual a um indica confiabilidade entre os dados da amostra com os da biblioteca. Neste estudo os nós foram exibidos como um gráfico de pizza, referindo-se a abundância relativa de cada íon nos extratos obtido, pelo diferentes métodos de extração.

As redes moleculares foram criadas analisando o perfil de metabólitos secundários presente nos extratos ACTB-242-SR, ACTB-242-HP-20 e ACTB-242-XAD16N, usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Todos os arquivos brutos de LCMS foram convertidos para o formato mzXML usando MSconvert “ProteoWizard 2.1” e exportados para a plataforma GNPS, no qual forneceram informações necessárias para a análise.

A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 0,02 Da e uma tolerância de fragmento de íon MS/MS de 0,02 Da. Uma rede foi criada onde as bordas (cosseno), foram obtidas apenas para valores de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós eram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós aparecesse em cada um dos 10 nós mais semelhantes.

O tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS.

Os resultados das redes moleculares obtidas foram exportados para serem visualizados em Software Cytoscape 3.7.2 [<https://cytoscape.org>]. As bibliotecas espectrais do GNPS forneceram o suporte necessário para a identificação de duas classes de compostos. Os espectros de MS/MS dos compostos obtidos foram comparados aos espectros de MS/MS de compostos presentes na biblioteca espectral da plataforma do GNPS.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Relações antagonicas entre *C. musae* e espécies de actinobactérias

Com relação à investigação da presença de metabólitos secundários com potencial antifúngico, foi empregado o método de culturas pareadas (cultivo direto), que consiste em estudar a interação entre dois tipos de micro-organismos distintos sob condições controladas, com culturas compatíveis para ambos os parceiros. Nessa metodologia, a difusão de metabólitos primários e secundários é observada pela formação de uma distância de inibição entre os micro-organismos.³⁰

A Figura 2 mostra a distância de inibição (mm) entre os micro-organismos após 5 dias de exposição aos tratamentos com as cepas de actinobactérias em placas de Petri (cultivo direto). As cepas ACTB-242, ACTB-77 e ACTB-290 promoveram as maiores distâncias de crescimento entre os micro-organismos (26,52; 24,20 e 21,74 mm, respectivamente), sendo selecionadas ACTB-242 (26,24 mm) para o cultivo e produção de extratos por desempenhar o maior efeito antagonico.

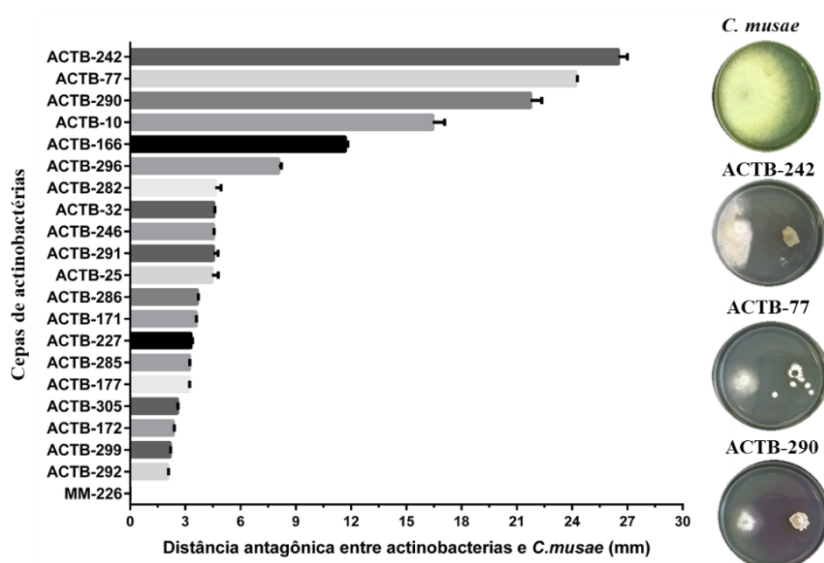


Figura 2-Distância de inibição entre micro-organismos antagonicos pelo método de culturas pareadas (cultivo direto).

3.2 Potencial inibitório do extrato de *Streptomyces* ACTB-242 contra os fungos fitopatogênicos *L. theobromae*, *C. brevisporum* e *C. musae*.

A atividade inibitória do extrato de *Streptomyces* ACTB-242 (Figura 3) foi testada contra os fungos fitopatogênicos *L. theobromae*, *C. brevisporum* e *C. musae*, em relação ao controle negativo (DMSO+meio de cultura). Os valores encontrados foram de 65% para *L. theobromae*, de 80% *C. brevisporum* e *C. musae* (a uma concentração de 0,5 mg/mL).

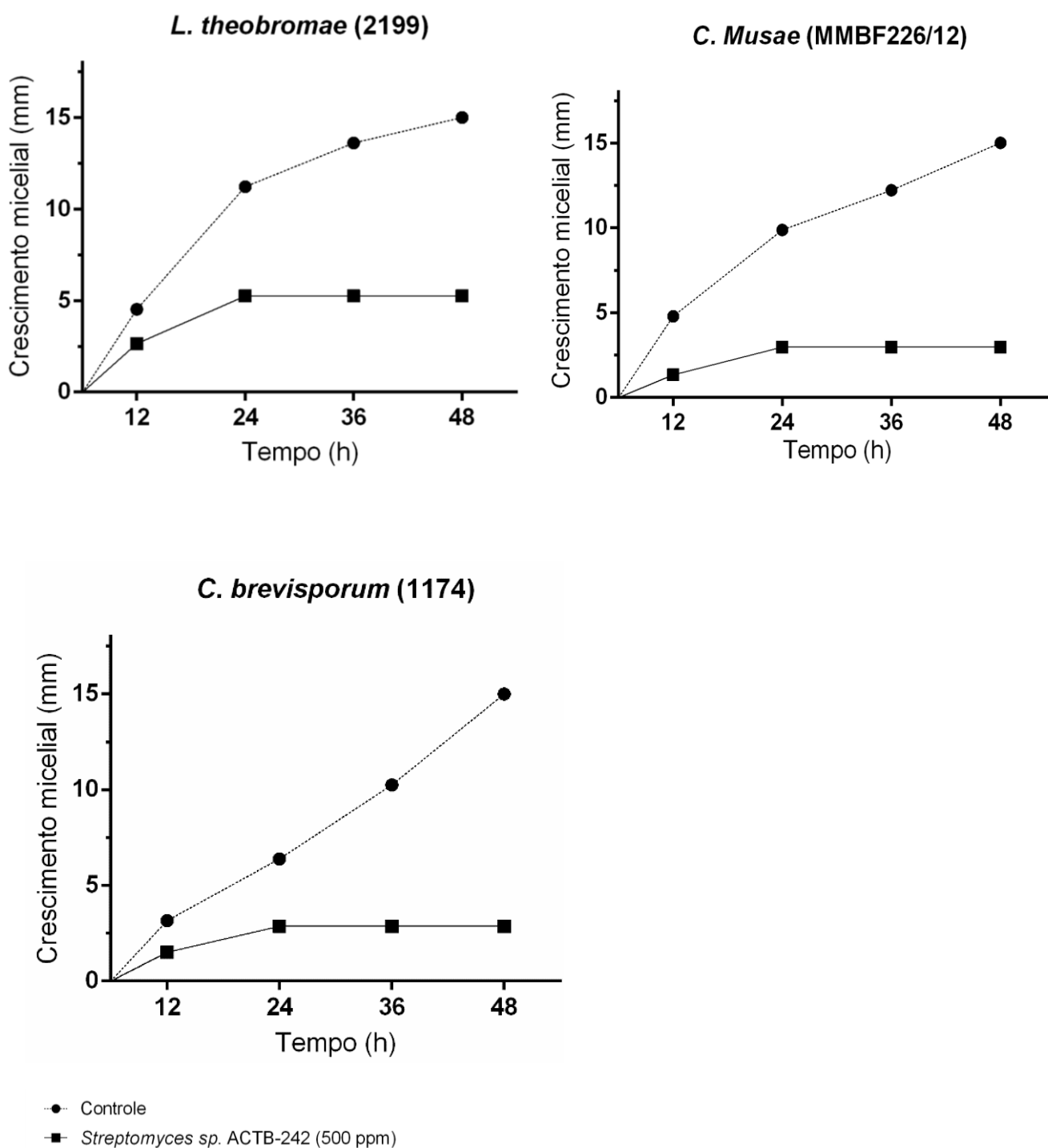


Figura 3- Atividade antifúngica de extratos de *Streptomyces* sp. (ACTB-242) a concentração de 0,5mg/mL.

3.3 Identificação molecular da cepa ACTB-242

A cepa ACTB-242 apresentou 99% de similaridade com *Streptomyces* spp., através da árvore filogenética mais parcimoniosa (Figura 4), obtida a partir do conjunto de dados de sequências 16S do rDNA de cepas do gênero *Streptomyces*. A sequência da cepa ACTB-242 agrupou-se em um clado próximo à *Streptomyces mobaraensis* (com 99,4 % de similaridade). Portanto, por meio da caracterização molecular a cepa ACTB-242 pertence ao gênero *Streptomyces*.

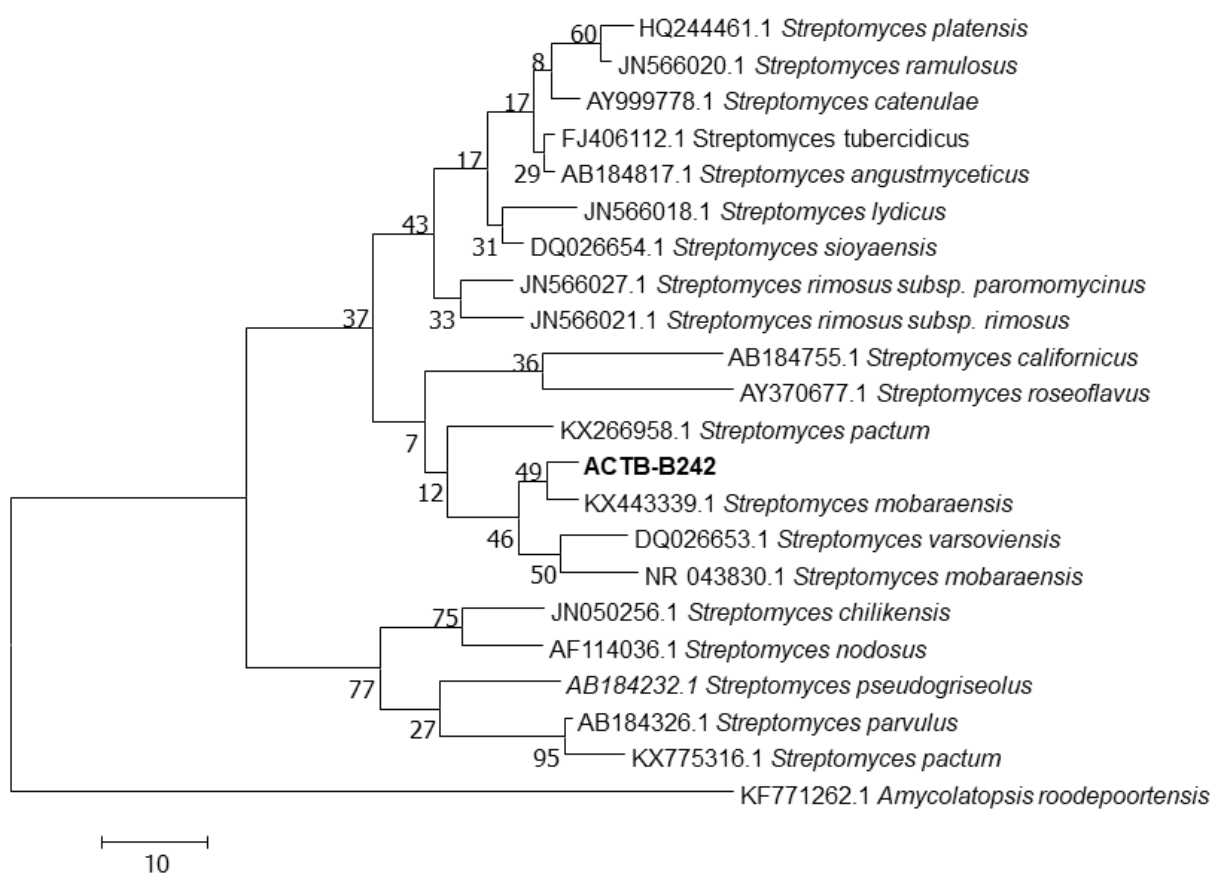
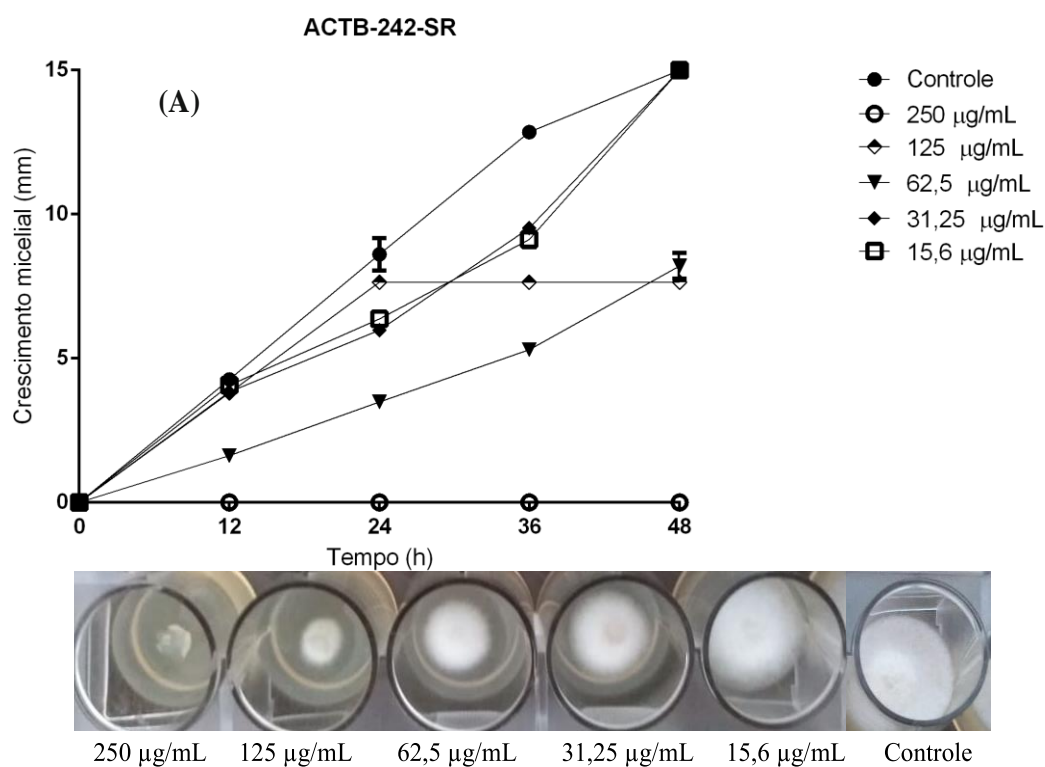


Figura 4- Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) de dados da região genômica 16S do rDNA para sequências do gênero *Streptomyces*. Os valores de bootstrap com 1000 repetições são mostrados no respectivo ramo. *Amycolatopsis roodepoortensis* foi usado como grupo externo. A sequência deste estudo está destacada em negrito.

3.4 Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ACTB-242-SR, ACTB-242-XAD16N e ACTB-242-HP20 contra *C. musae*

Nos ensaios de CIM para o extrato ACTB-242-SR (Figura 5), observou-se que o crescimento do fungo começou a diminuir a partir da concentração de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 45%, sendo que a inibição completa

do crescimento micelial ocorreu na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nos tratamentos com o extrato ACTB-242-XAD16N, o crescimento micelial do fungo diminuiu 66% na concentração de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 71% na concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, somente na concentração $62,5 \mu\text{g/mL}$ ocorreu a inibição total do crescimento micelial do fungo. Para o tratamento com o extrato ACTB-242-HP20, observou-se a inibição do crescimento micelial de 72% na concentração de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, com total inibição de crescimento micelial na concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, o extrato ACTB-242-HP20 foi mais ativo na inibição de *C. muse*, em comparação com os extratos obtidos sem resina e com a resina XAD16N.



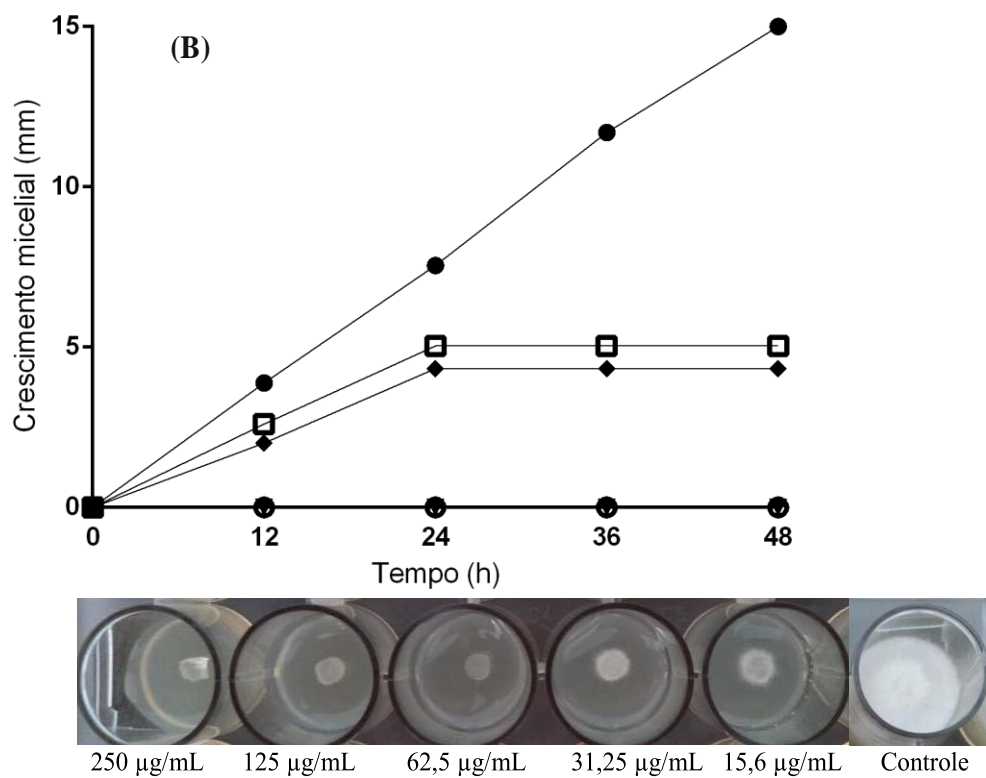
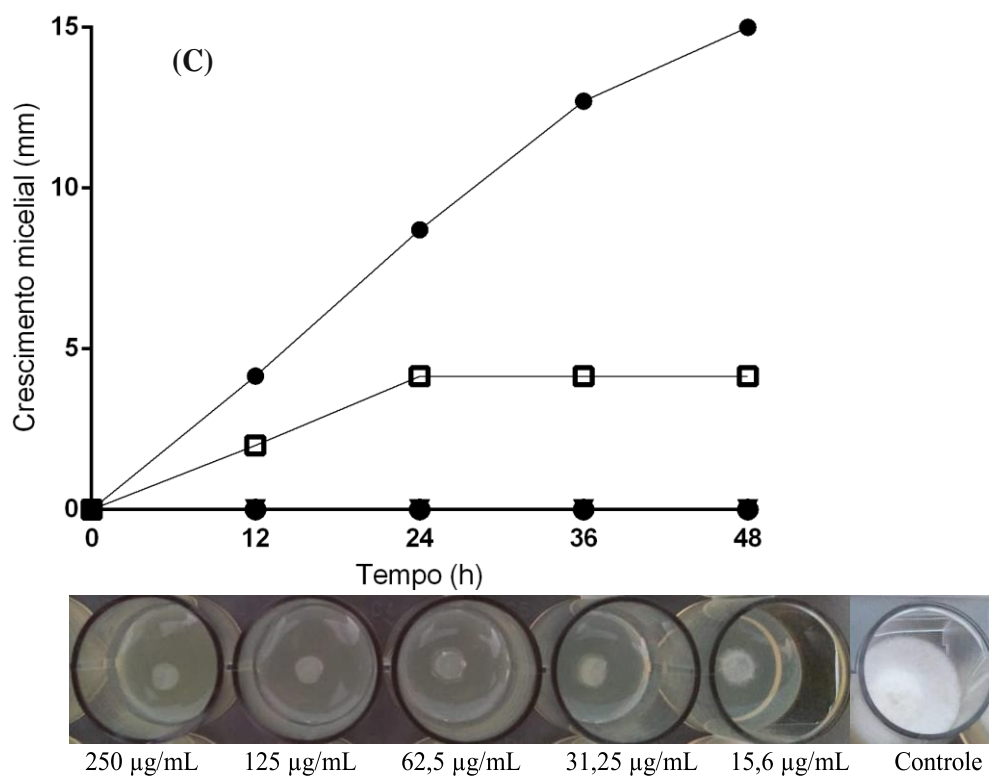
ACTB-242-XAD16N**ACTB-242-HP-20**

Figura 5-Gráficos da relação crescimento do fungo (*C. Musae*) × tempo de incubação com diferentes concentrações do extrato de *Streptomyces* sp (ACTB-242) a diferentes condições de extração (A) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-SR, (B) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-XAD16N e (C) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-HP20.

3.5 Estudo de desrepliação dos extratos de *Streptomyces* sp. ACTB-242 cultivada com e sem resinas de extração

O processo de desrepliação dos extratos obtidos de *Streptomyces* sp. ACTB-242 cultivada com e sem resinas de extração foram realizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-HRMS), conforme descrito no item 2.10, p. 93. A análise dos resultados obtidos desse processo permitiu verificar um perfil semelhante entre os extratos obtidos nos cultivos com resinas, sendo estes seletivos para compostos que apresentaram tempo de retenção superiores a 11 minutos, quando comparados ao perfil cromatográfico do extrato obtido com acetato de etila (Figura 6).

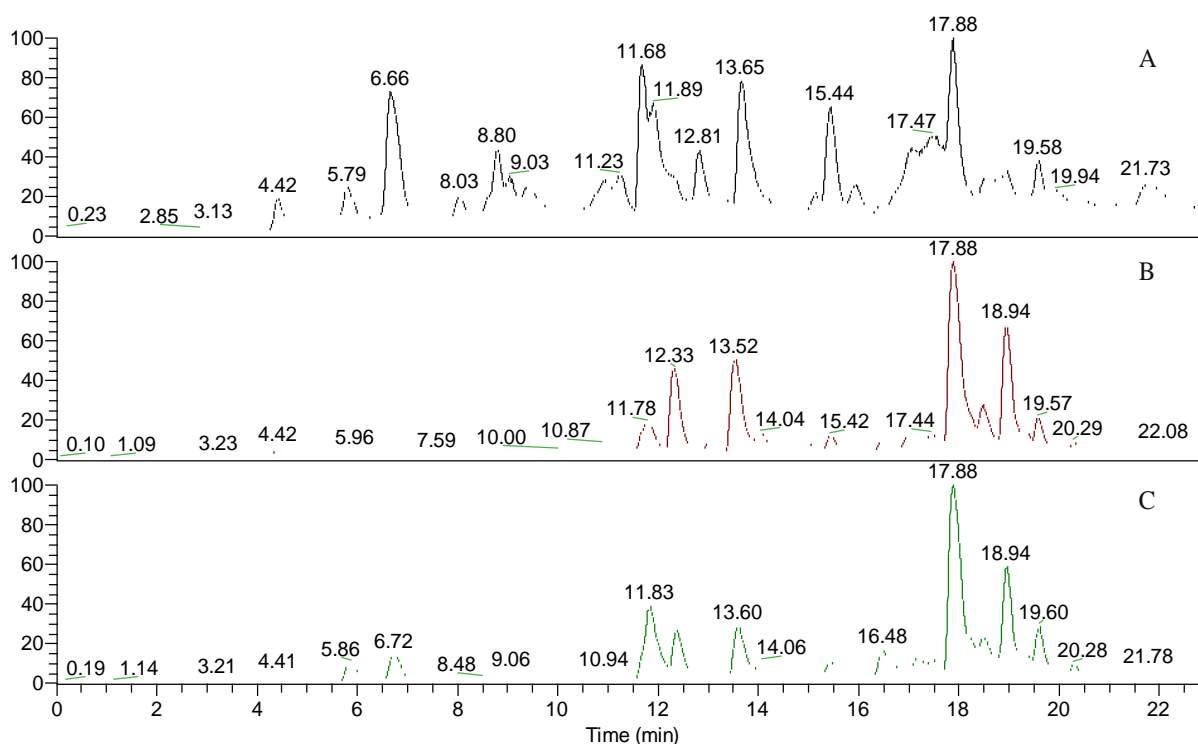


Figura 6-Cromatogramas dos extratos AcOEt obtidos do cultivo de *Streptomyces* sp. ACTB-242 sem resinas (A) e com XAD16N (B) e HP20 (C).

Conforme descrito no item 2.12, p. 94, os cromatogramas obtidos do cultivo de *Streptomyces* sp. ACTB-242 por UPLC-HRMS foram submetidas a um processo de tratamento de dados usando a plataforma GNPS. Três substâncias ou anotações (isocumarina (1), piericidina A e reticulol) foram identificadas por semelhança espectral na biblioteca GNPS. A partir da análise dos íons principais obtidos

dos cromatogramas foi possível gerar duas redes separadamente, uma para o modo negativo e outra para o modo positivo de ionização (Figura 7). As redes criadas permitiram a investigação de duas diferentes classes de compostos e seus análogos. Na rede negativa foi observado a formação do cluster denominado de **A**, no qual foi identificado uma classe de isocumarinas e seus análogos e na rede positiva observou formação do cluster denominado de **B** com identificação da substância piericidina A.

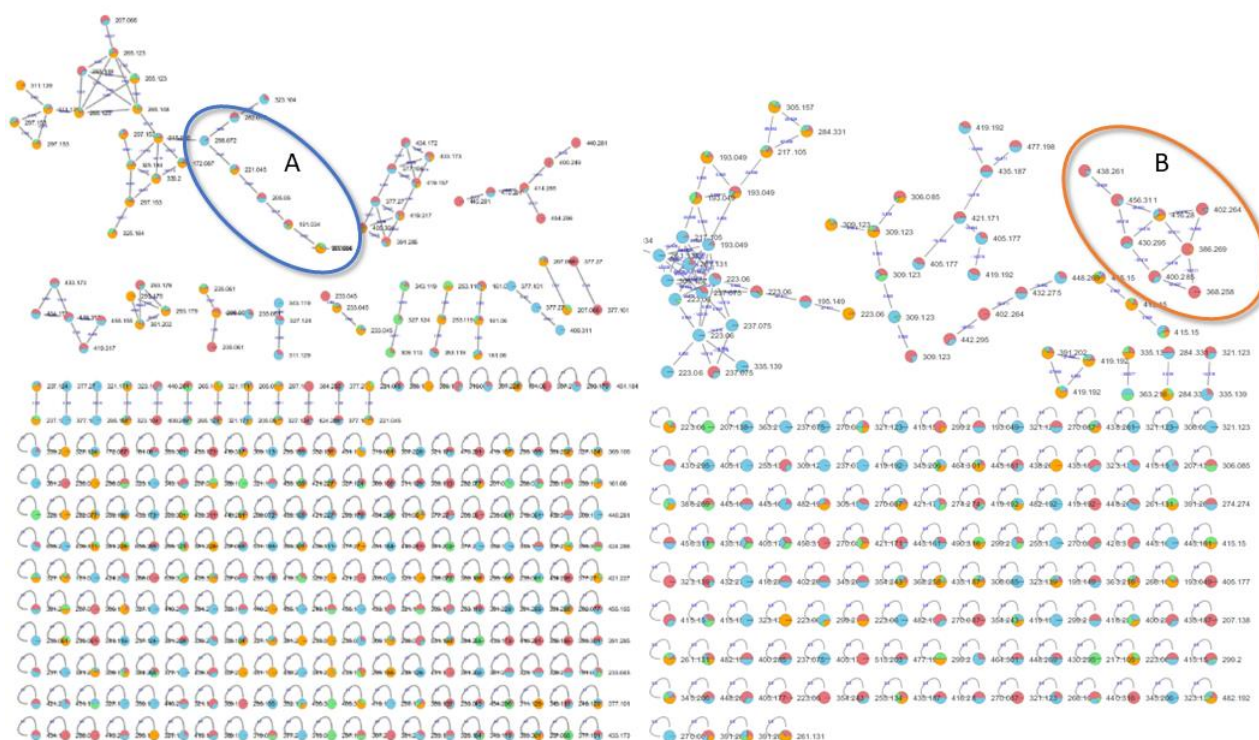


Figura 7- Redes moleculares de dados de MS/MS obtidos a partir dos extratos de *Streptomyces* sp, modo negativo e positivo usando um corte de similaridade de cosseno de 0,7.

3.5.1 Identificação de compostos da classe das isocumarinas detectados no modo negativo

Isocumarinas são lactonas de ocorrência natural, encontradas abundantemente em bactérias, fungos e plantas. Trabalhos de revisão recentes revelaram a descoberta de inúmeras isocumarinas farmacologicamente importantes.^{31,32} Wu e colaboradores (2019) descreveram a atividade das isocumarinas contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Penicillium italicum* e *Fusarium graminearum*, em comparação com o triadimefon (fungicida). A maior atividade inibitória foi apresentada contra *Fusarium oxysporum*.³³

Os extratos obtidos de *Streptomyces* sp. ACTB-242 estudados nesse trabalho, apresentaram atividade de inibição de crescimento contra fungos fitopatógenos superior a 65% (Item 3.2, p. 96). A presença das isocumarinas tornou-se um fator significativo na justificativa dessa atividade. A análise de

desrepliação dos extratos por UPLC-HRMS levou a identificação de cinco isocumarinas. O isolamento e a determinação estrutural da isocumarina 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina (1, Figura 8) do extrato ACTB-242HP-20 auxiliou na identificação dessa classe de compostos no processo de desrepliação. Essa isocumarina foi previamente isolada de *Streptomyces* sp. MBT76 e *Streptomyces* sp. CMU-MH021.^{34,35}

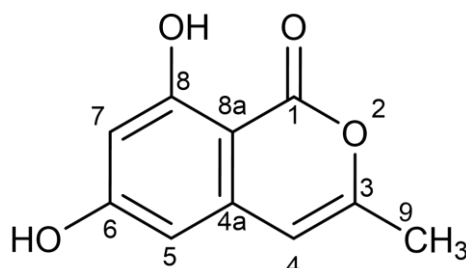


Figura 8-Representação estrutural de 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina (1).

O espectro de massas de alta resolução (Figura 1 IS) mostrou um pico de íon *quasi*-molecular correspondente à molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 191,03397 (Calculado: m/z 192, 03397, erro-0,085 ppm), indicando a fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$.

O espectro de RMN 1H (CD_3OD , 300 MHz, (Figura 2 IS) descrito na tabela 3 mostrou sinais de hidrogênio característicos de um anel aromático dissubstituído para dois hidrogênios na faixa δ_H 6,27 e δ_H 6,28 (H-5 e H-7), um sinal de hidrogênio olefínico em 6,24 (*d*, H-4) e um sinal em δ_H 2,21 para três hidrogênio metílicos.

O espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz, Figura 3 IS, Tabela 2) exibiu 10 sinais de carbono bem definidos, com um carbono metílico, três metínicos e seis de carbonos sp^2 não hydrogenados, incluindo uma carbonila de éster em δ_C 166,61 (C-1).

Tabela 2- Dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) de (1).

C	δ_C	Literatura	δ_H (multiplicidade, $J_{H,H}$)
1	166,61		-
3	154,30		-
4	104,29	6,4 (<i>d</i> , $J = 2,4$, 1H)	6,26 (<i>d</i> , $J=3$, 1H)
5	102,20	6,28	6,29 (<i>m</i> , 1H)
6	166,06		-
7	101,21	6,27	6,29 (<i>m</i> , 1H)
8	163,58		-
4a	140,21		-
8a	98,28		-
9	17,96	2,21 (<i>d</i> , $J = 1,2$, 3H)	2,22 (<i>s</i>), 3H

As informações de isolamento e a caracterização de **1**, permitiu explorar a rede molecular formada no cluster A (figura 9). O estudo do cluster A, confirmou as estruturas dos compostos 6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina (**1**) e reticulol (**4**), através da comparação do perfil de fragmentação presentes na biblioteca do GNPS. As estruturas dos demais compostos foram identificadas pela análise dos fragmentos de massas.

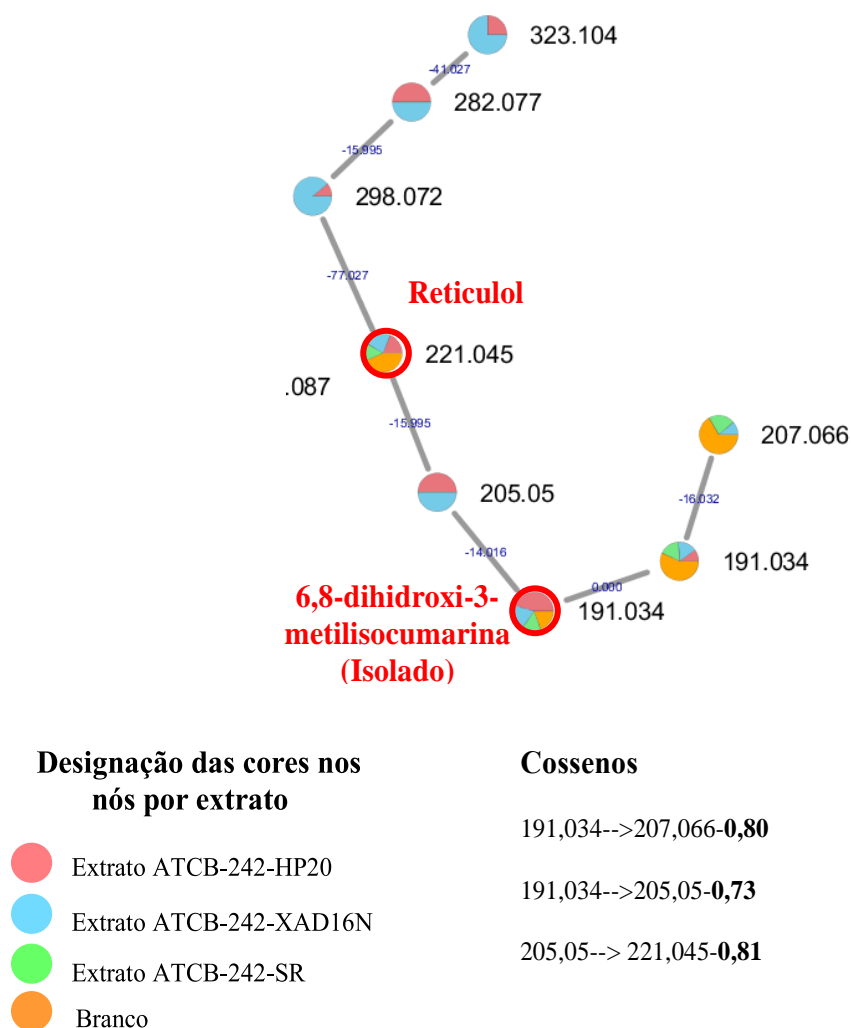


Figura 9-Rede molecular dos compostos (Cluster A) para o modo negativo ionização com anotações do GNPS dos íons de massa precursora m/z 191,03397 e m/z 221,0449.

A identificação dos compostos com esqueleto de isocumarinas foi realizada com base na massa do íon precursor m/z 191,034 (6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina, **1**), que coincidiu com a anotação pela biblioteca espectral do GNPS. Nos nós presentes no cluster A foram encontradas combinações com padrões de isocumarinas ($[M-H]^-$ m/z 205,04898 e $[M-H]^-$ m/z 207,0656), descritos recentemente na

literatura em cultura do fungo endofítico *Xylomelasma* sp.³⁶ Esses nós encontram-se altamente agrupados com grau de similaridade de cosseno superior a 0,73 ao se combinar com m/z 191,03397.

A estrutura do análogo **2** (Figura 11), identificada no pico com tempo de retenção de 8,93 min, foi sugerida como sendo a 8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina. Esse análogo **2** foi detectado no espectro de massas na forma desprotonada com m/z 205,0498 [M-H]⁻, referente a fórmula molecular C₁₁H₉O₄, com erro de 1,291 ppm (Figura 4 IS). Para a identificação desse composto levou-se em consideração a diferença entre o m/z 205,04898 de **2** e o m/z 191,03397 de **1**, que diferem entre si em 14 Da, sugerindo a troca do hidrogênio por um grupo metila. As análises dos espectros de MS/MS forneceram os fragmentos principais que justificam essa proposta, com a presença dos íons m/z 190,0137 (C₁₀H₆O₄) correspondente a perda do fragmento 15,0362 Da [M-H-CH₃], m/z 174,0551 (C₁₀H₆O₃) para a perda do fragmento de 30,9948 Da [M-H-CH₃O] e m/z 162,0186 (C₁₀H₁₀O₂) para a perda do fragmento de 43.9900 Da [M-H-CO₂].

Para o análogo **3** (Figura 11), identificado no pico com tempo de retenção 9,10 min, foi sugerida a estrutura da 8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocroman-1-ona, sendo detectada no espectro de massa na forma desprotonada com m/z 207,0652 [M-H]⁻, referente a fórmula molecular C₁₁H₁₁O₄, com erro de 2,003 ppm (Figura 5 IS). A identificação desse composto foi guiada pela diferença entre o m/z 207,0652 de **3** e o m/z 191,03397 de **1**, os quais diferem entre si em 16 Da. Essa diferença se explica pela troca do hidrogênio pelo grupo metila e a ocorrência de uma possível redução da dupla ligação. As análises dos espectros de MS/MS forneceram os fragmentos principais m/z 192,1260 (C₁₀H₈O₄), correspondente a perda do fragmento 14,9396 Da [M-H-CH₃], m/z 190,0138 (C₁₁H₁₀O₃) para a perda do fragmento de 17,0519 Da [M-H-OH] e m/z 163,0754 (C₁₀H₁₁O₂) para a perda do fragmento de 43.9902 Da [M-H-CO₂], os quais corroboram com essa proposta.

O composto **4** (reticulol, Figura 11) apresentou m/z 221,0449 referente a fórmula molecular C₁₁H₉O₅ com erro 1.9282 ppm (Figura 6 IS) e foi identificado no pico com tempo de retenção 11,78 min. Sua estrutura foi confirmada pela biblioteca espectral do GNPS com a nomenclatura 6,8-dihidroxi-7-metoxi-3-metilisocumarina (reticulol). Na rede molecular o composto **4** estava diretamente relacionado ao composto **2** com m/z 205,04898, diferindo entre si por 15,995 Da. Essa diferença pode ser justificada pela adição de uma hidroxila na posição de um hidrogênio. A Comparação dos espectros de fragmentos de **4** com espectro referência do reticulol da biblioteca do GNPS apresentou cosseno de 0,88 (Figura 10), confirmando tratar-se da mesma substância. O estudo do perfil de fragmentação forneceu como íons principais m/z 206,0210 (C₁₀H₆O₅) correspondente a perda do fragmento 15,0238 Da [M-H-CH₃], m/z 190,0262 (C₁₀H₆O₄) para a perda do fragmento de 31,0186 Da [M-H-OCH₃] e m/z 177,0295 (C₁₀H₁₀O₃) para a perda do fragmento de 44,0154 Da [M-H-CO₂]. Esses dados corroboram com os dados descrito na literatura para esse composto, recentemente isolado do meio aquoso de *Streptomyces* sp. MBT76.³⁴

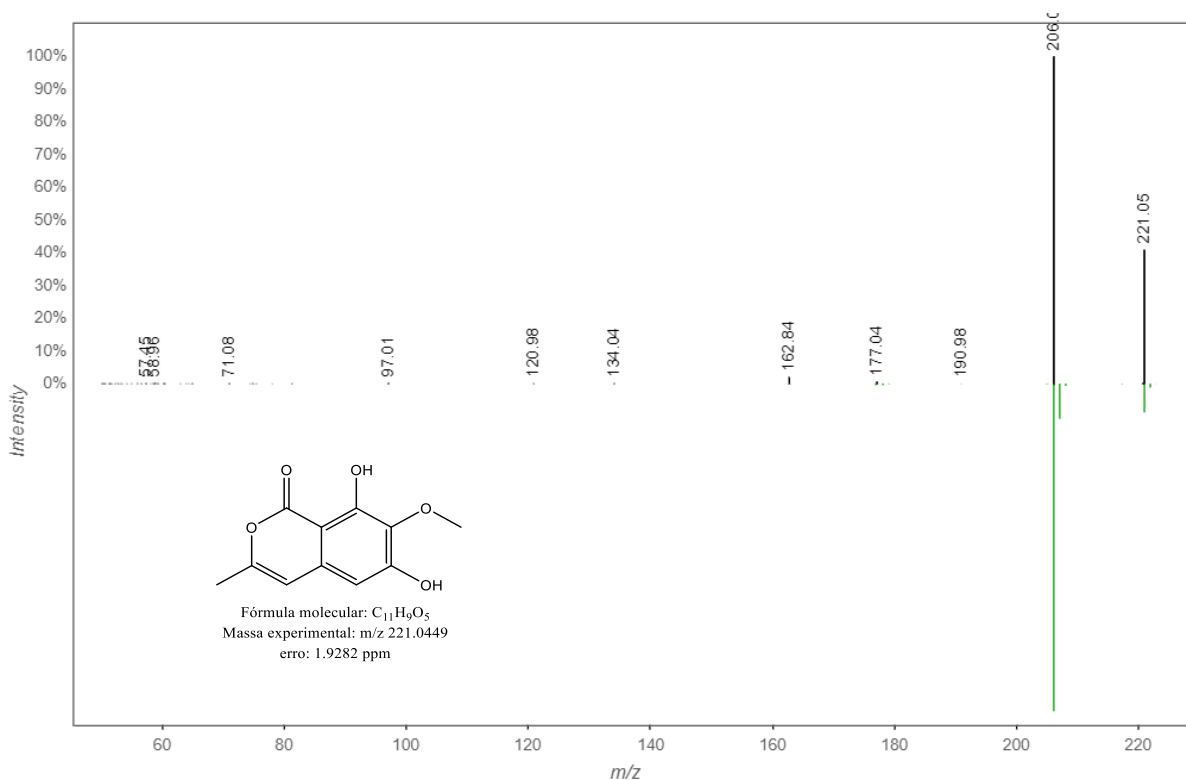


Figura 10-Comparação dos espectros de fragmentos de m/z 221,0449 anotado como reticulol com cosseno de 0,88 com espectro referência da biblioteca do GNPS. O espectro superior (amostra) e o espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).

O composto **5** (Figura 11) foi identificado, a partir das análises de fragmentação de MS/MS, no pico com tempo de retenção 8,68 min, na forma de um íon desprotonado com m/z 235,0607 [M-H]⁻ referente a fórmula molecular C₁₂H₁₁O₅ e com erro de 2.468 ppm (Figura 7 IS), indicando a presença da 8-hidroxi-5,6-dimetoxi-3-metilisocumarina (**5**). O perfil de fragmentação exibiu os íons principais m/z 221,0450 [M-H-CH₃], m/z 205,0498 [M-H-OCH₃] e m/z 191,0341 [M-H-CO₂], estando de acordo como descrito por Wu e colaboradores.³⁷

O composto proposto com sendo 3-acetil-6-hidroxi-8-metoxi-1H-isocromen-1-ona (**6**, Figura 11), presente no pico com tempo de retenção de 10,72 min, foi detectado na forma de um íon desprotonado com m/z 233,0449 [M-H]⁻ referente a fórmula molecular C₁₂H₉O₅ e com erro de 2.0909 ppm (Figura 8 IS). As análises dos espectros de MS/MS forneceram os fragmentos principais m/z 219,0291 [M-H-CH₃], m/z 190,0257 [M-H-C₂H₃O] e m/z 189,0548 [M-H-CO₂]. No entanto, não foi encontrado na literatura dados comparativos que justifiquem a identificação desse composto. Na figura 11 encontram-se as estruturas dos todos os compostos identificados (**1-6**). A tabela 4 resume todos as informações de fragmentação de massas para os compostos **1-6**, identificados na classe das isocumarinas.

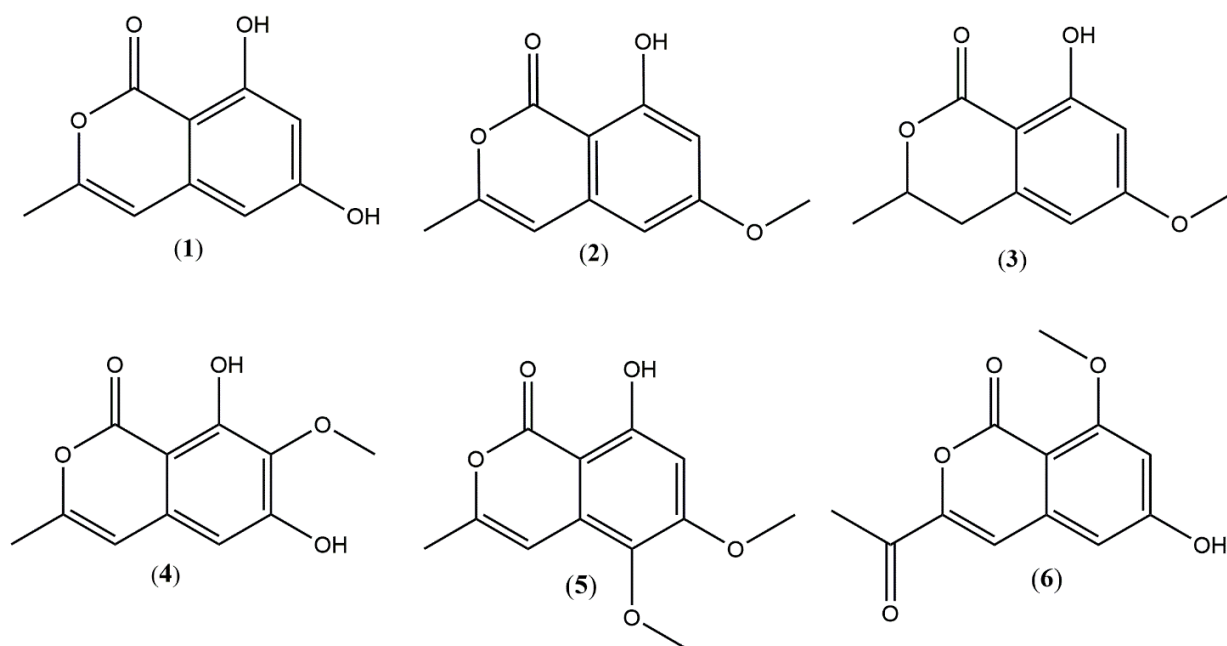


Figura 11- Estrutura dos compostos da classe das isocumarinas identificados no modo negativo de ionização.

Tabela 3- Compostos identificados por UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking no modo negativo de ionização.

Nr	Rt/min	Estrutura proposta	Detectad o [M-H] ⁻	MS/MS	Fórmula molecular	Erro (ppm)
1	11,83	6,8-dihidroxi-3-metilisocumarina	191,0339	176,0103; 149,0231; 123,0438	C ₁₀ H ₈ O ₄	0,085
2	8,93	8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocumarina	205,0498	190,0137; 174,0551; 162,0186	C ₁₁ H ₉ O ₄	1,291
3	9,10	8-hidroxi-6-metoxi-3-metilisocroman-1-ona	207,0652	192,1260; 190,0138; 163,0754	C ₁₁ H ₁₁ O ₄	2,003
4	11,78	6,8-dihidroxi-7-metoxi-3-metilisocumarina	221,0449	206,0210; 190,0262; 177,0295	C ₁₁ H ₉ O ₅	1,9282
5	8,68	7-hidroxi-6,8-dimetoxi-3-metilisocumarina	235,0607	221,0450; 205,0498; 191,0341	C ₁₂ H ₁₁ O ₅	2,468
6	10,72	3-acetil-6-hidroxi-8-metoxi-1H-isocromen-1-ona	233,0449	219,0291; 190,0257; 189,0548	C ₁₂ H ₉ O ₅	2,090

3.5.2 Desreplicação dos compostos da classe das piericidina presentes no modo positivo

As piericidinas pertencem a uma família de compostos estruturalmente relacionados, que inclui um grupo de antibióticos, os quais são produzidas predominantemente pela biossíntese de várias espécies de actinobactérias do gênero *Streptomyces*.³⁸ Os compostos presentes na classe das piericidinas apresentam diversas atividades biológicas, incluindo pesticida, antifúngica, antimalárica e antineoplásica.³⁹

O estudo do cluster B (Figura 12), sugeriu a estrutura do composto Piericidina A (7), através da comparação do perfil de fragmentação presentes na biblioteca do GNPS (Figura 13). As estruturas dos 11 compostos análogos foram identificadas pela análise dos fragmentos de massas como pertencentes a classe das piericidinas.

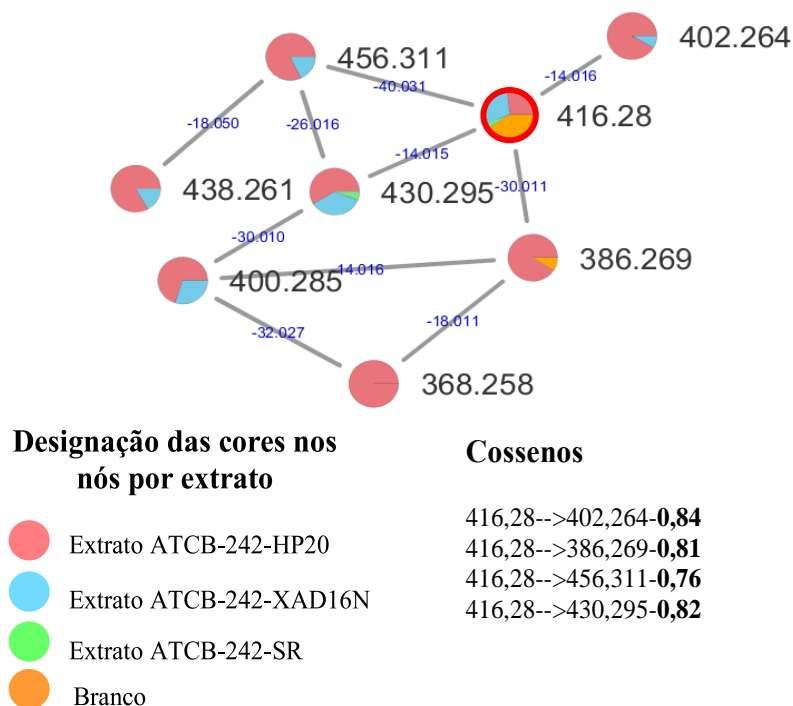


Figura 12- Rede molecular dos compostos (Cluster B) para o modo positivo de ionização com anotação pelo GNPS da piericidina A, íon de massa precursora m/z 416,2792.

O composto (7) foi encontrado no pico com tempo de retenção 17,88 min, na forma de um íon protonado com m/z 416,2792 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{25}H_{38}O_4N$ e com erro de 0,57237 (Figura 9 IS). Análise do espectro de MS/MS corroborou a estrutura da piericidina A, pela presença dos fragmentos principais m/z 398,2690 ($C_{25}H_{36}O_3N$), correspondente a perda do fragmento 18 Da $[M+H-H_2O]$, m/z 182,0806 ($C_9H_{12}O_3N$) para a perda do fragmento de 234,1982 Da $[M+H-C_{16}H_{25}O]$ e m/z 85,0653 (C_5H_9O) para a perda do fragmento de 331,2140 Da $[M+H-C_{20}H_{29}O_3N]$. A análise comparativa do espectro obtido experimentalmente com espectro da biblioteca do GNPS (Figura 13) confirmou o perfil de fragmentação da piericidina A com valor de cosseno de 0,75. Este composto foi descrito inicialmente por Takahashi e colaboradores como um novo metabólito inseticida produzido por culturas de *Streptomyces mobaraensis*.⁴⁰ A estrutura da piericidina A foi completamente proposta em 1965 com base em estudos de RMN de 1H . Estudos recentes relataram a presença dessa molécula em espécies de *Streptomyces* sp. IT-143, *Streptomyces* sp. e *Streptomyces* sp. ML5521.^{41,42,43}

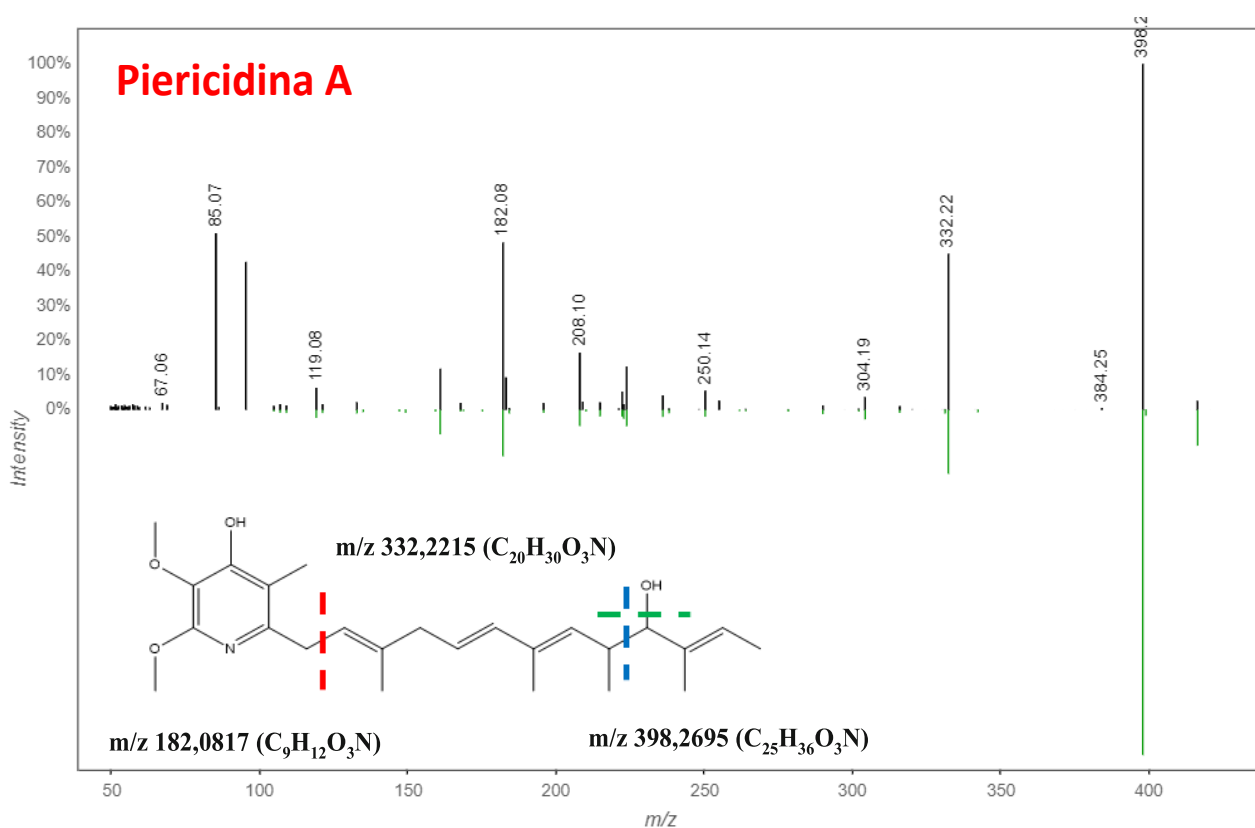


Figura 13- Comparação dos espectros de fragmentos de m/z 416,2792 anotado como piericidina A com cosseno de 0.75, com espectro referência da biblioteca do GNPS. O espectro superior (amostra) e o espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).

O composto **8** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 19,56 min como íon protonado m/z 430,2946 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{26}H_{40}O_4N$ e com erro de 1,2503 (Figura 10 IS). O estudo das redes moleculares mostrou a presença da piericidina B1 (**8**), análoga a piericidina A (**7**), pelo agrupamento do fragmento m/z 416,2792 com diferença de 14,015 Da em relação a m/z 430,2946, levando a sugestão de uma substituição um hidrogênio da hidroxila em C-10 por uma metila. No espectro de MS/MS foi observado presença dos fragmentos principais m/z 398,2684 ($C_{25}H_{36}O_3N$), correspondente a perda do fragmento 32,0264 Da $[M+H-CH_3OH]$, m/z 182,0809 ($C_9H_{12}O_3N$) para a perda do fragmento de 248,2137 Da $[M+H-C_{17}H_{28}O]$, m/z 99,0807 ($C_6H_{11}O$) para a perda do fragmento de 331,2140 Da $[M+H-C_{20}H_{29}O_3N]$ e m/z 304,1901 ($C_{18}H_{26}O_3N$) correspondente a perda do fragmento 128,1045 Da $[M+H-C_8H_{14}O]$. Esses dados estão de acordo com os descritos anteriormente na literatura.^{44,45}

No pico com tempo de retenção 18,64 min observou-se um íon protonado com m/z 430,2947 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{26}H_{40}O_4N$ e com erro de 1,0375 (Figura 11 IS), o que indica a presença da substância conhecida na literatura por Piericidina A5 (**9**, Figura 14). No espectro de MS/MS observou a presença dos fragmentos principais m/z 412,2843 ($C_{26}H_{38}O_3N$) correspondente

a perda do fragmento 18 Da [M+H-H₂O], m/z 330,2059 (C₂₀H₂₈O₃N) para a perda do fragmento de 100 Da [M+H-C₆H₁₂O], m/z 99,0806 (C₆H₁₁O) para a perda do fragmento de 331,2140 Da [M+H-C₂₀H₂₉O₃N] e m/z 182,0809 (C₉H₁₂O₃N) correspondente a perda do fragmento 248,2140 Da [M+H-C₁₇H₂₈O], de acordo com os dados descrito na literatura.⁴⁶

Os compostos **8** e **9** apresentaram o mesmo perfil de fragmentação, o que sugere a presença de isômeros com diferença em relação a posição da metila na cadeia. Essa diferença foi observada na detecção do fragmento m/z 412,2840.

O composto **10** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 13,56 min como íon protonado com m/z 426,3000 [M+H]⁺ referente a fórmula molecular C₂₇H₄₀O₃N e com erro de 0,6634 (Figura 12 IS). A presença dos fragmentos principais m/z 408,2894 (C₂₇H₃₈NO₂) correspondente a perda do fragmento 18 Da [M+H-H₂O], m/z 300,1953 (C₁₉H₂₆NO₂) para a perda do fragmento de 126,1040 Da [M+H-C₈H₁₄O], m/z 193,1096 (C₁₁H₁₅NO₂) para a perda do fragmento de 233,1904 Da [M+H-C₁₆H₂₅O], m/z 153,0784 (C₈H₁₁O₂N), para a perda do fragmento de 273,2217 Da [M+H-C₁₉H₂₉O] e m/z 125,0961 (C₈H₁₃O) correspondente a perda do fragmento 301,2029 Da [M+H-C₁₉H₂₇NO₂] levaram a identificação desse composto. Esses dados não foram comparados com a literatura, visto que não foi encontrado molécula com mesmo perfil estrutural.

O composto **11** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 16,14 min na forma de íon protonado com m/z 432,2737 [M+H]⁺ referente a fórmula molecular C₂₅H₃₈NO₅ e com erro de 1,4704 (Figura 13 IS). A presença dos fragmentos principais m/z 414,2636 (C₂₅H₃₆NO₄) correspondente a perda do fragmento 18 Da [M+H-H₂O], m/z 330,2059 (C₂₀H₂₈NO₃) para a perda do fragmento de 102,0678 Da [M+H-C₅H₁₀O₂], m/z 290,1748 (C₁₇H₂₄NO₃), para a perda do fragmento de 142,0990 Da [M+H-C₈H₁₄O₂] e m/z 182,0809 (C₉H₁₂NO₃) correspondente a perda do fragmento 250,1928 Da [M+H-C₁₆H₂₆O₂], encontrados no espectro de MS/MS permitiram a hipótese da existência dessa molécula. Para essa estrutura não foram encontrados dados na literatura que justificasse a descrição desse composto anteriormente.

O composto **12** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 14,43 min na forma de íon protonado com m/z 432,2735 [M+H]⁺ referente a fórmula molecular C₂₅H₃₈NO₅ com erro de 2,1970 (Figura 14 IS) e conhecido na literatura de piericidina C1.⁴⁷ A presença dessa molécula é justificada pelos seguintes fragmentos principais m/z 414,2632 (C₂₅H₃₆NO₄) correspondente a perda do fragmento de 18 Da [M+H-H₂O], m/z 330,2059 (C₂₀H₂₈NO₃) para a perda do fragmento de 102,0675 Da [M+H-C₅H₁₀O₂], m/z 222,1121 (C₁₂H₁₆NO₃) para a perda do fragmento de 210,1614 Da [M+H-C₁₃H₂₂O₂], m/z 209,1538 (C₁₃H₂₁O₂), para a perda do fragmento de 223,1197 Da [M+H-C₁₂H₁₇NO₃] e m/z 182,0809 (C₉H₁₂NO₃) correspondente a perda do fragmento 250,1926 Da [M+H-C₁₆H₂₆O₂] encontrados no espectro de MS/MS. Observa-se que os dois compostos **11** e **12** são isômeros, apresentando mudanças de posição das duas ligações duplas nos carbonos 4 e 6 para 5 e 7 na cadeia lateral.

No pico com tempo de retenção 14,03 min observou-se o íon protonado com m/z 440,3156 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{28}H_{42}NO_3$ e com erro de -0,8378 (Figura 16 IS), indicando a presença do composto **13** (Figura 14). A existência desse composto foi justificada pela presença dos fragmentos principais m/z 422,3049 ($C_{28}H_{40}NO_2$) correspondente a perda do fragmento de 18 Da $[M+H-H_2O]$, m/z 300,1952 ($C_{19}H_{26}NO_2$) para a perda do fragmento de 140,1204 Da $[M+H-C_9H_{16}O]$, m/z 192,1017 ($C_{11}H_{14}NO_2$) para a perda do fragmento de 248,2139 Da $[M+H-C_{17}H_{28}O]$, m/z 153,0782 ($C_8H_{11}NO_2$) correspondente a perda do fragmento de 287,2374 Da $[M+H-C_{20}H_{31}O]$ e m/z 109,1013 (C_8H_{13}) correspondente a perda do fragmento de 331,2142 Da $[M+H-C_{20}H_{29}NO_3]$ encontrados no espectro de MS/MS. No entanto, não foi encontrado na literatura relato desse composto.

O composto **14** (Figura 14) foi encontrado no pico com tempo de retenção 18,75 min na forma de um íon protonado com m/z 442,2948 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{27}H_{40}NO_4$ e com erro de 0,9404 (Figura 17 IS). Este foi caracterizado pelo perfil MS/MS presente nos fragmentos principais m/z 424,2841 ($C_{27}H_{38}NO_3$) correspondente a perda do fragmento de 18 Da $[M+H-H_2O]$, m/z 330,2059 ($C_{20}H_{28}NO_3$) para a perda do fragmento de 112,0888 Da $[M+H-C_7H_{12}O]$, m/z 182,0809 ($C_9H_{12}NO_3$) para a perda do fragmento de 260,2139 Da $[M+H-C_{18}H_{28}O]$ e m/z 113,0962 ($C_7H_{13}O$) correspondente a perda do fragmento de 329,1986 Da $[M+H-C_{20}H_{27}NO_3]$. Não foram encontrados dados sobre este composto na literatura.

O composto **15** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção de 19,20 min e apresentou o fragmento protonado com m/z 456,3106 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{28}H_{42}NO_4$ e com erro de 0,4314 (Figura 18 IS), designado na literatura pelo código de IT143B por ter sido isolado de *Streptomyces* IT143.⁴² Esse composto foi justificado pela exploração da rede molecular com o agrupamento do fragmento m/z 416,2792 e diferença de 40,031 Da em relação ao m/z 456,3106, indicando a incorporação do grupamento *sec-but-2-enila*. Os fragmentos principais m/z 438,3000 ($C_{28}H_{40}NO_3$) correspondente a perda do fragmento de 18 Da $[M+H-H_2O]$, m/z 330,2058 ($C_{17}H_{24}NO_3$) para a perda do fragmento de 166,1362 Da $[M+H-C_{11}H_{18}O]$, m/z 182,0861 ($C_9H_{12}NO_3$) correspondente a perda do fragmento de 274,2297 Da $[M+H-C_{19}H_{30}O]$ e m/z 125,0962 ($C_8H_{13}O$) para a perda do fragmento de 331,2146 Da $[M+H-C_{20}H_{29}NO_3]$ foram encontrados no espectro de MS/MS.

O composto **16** (Figura 14) encontrado no pico com tempo de retenção 17,35 min, apresentou íon protonado com m/z 402,2637 $[M+H]^+$ referente a fórmula molecular $C_{24}H_{36}NO_4$ e com erro de 0,4541 (Figura 19 IS). Esta substância é designada na literatura como de-Me-piericidina A1.⁴⁵ Esse composto foi agrupado diretamente com m/z 416,2792 com diferença de 14,016 Da em relação ao fragmento m/z 402,2637, através da troca do grupo metila por hidrogênio na posição C-9 da cadeia lateral. A presença dessa molécula é também justificada pelo perfil de fragmentação m/z 384,32529 ($C_{24}H_{34}NO_3$) correspondente a perda do fragmento de 18 Da $[M+H-H_2O]$, m/z 318,2059 ($C_{19}H_{28}NO_3$) para a perda do fragmento de 84,0578 Da $[M+H-C_5H_8O]$, m/z 182,0810

(C₉H₁₂NO₃) correspondente a perda do fragmento de 220,1827 Da [M+H-C₁₅H₂₄O] e *m/z* 85,0652 (C₅H₉O) para a perda do fragmento de 317,1985 Da [M+H-C₁₉H₂₇NO₃] encontrados no espectro de MS/MS.

O composto **17** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 12,19 min e apresentou o íon protonado com *m/z* 386,2687 [M+H]⁺ referente a fórmula molecular C₂₄H₃₆NO₃ e com erro de 0,6814 (Figura 20 IS). Este composto foi descrito na literatura com código Mer- (A2026B), sendo isolado de *Streptomyces pactum* Me2108.⁴⁸ A presença dessa molécula é justificada pelo perfil de fragmentação encontrado no espectro de MS/MS com os principais fragmentos em *m/z* 368,2581 (C₂₄H₃₄NO₂) correspondente a perda do fragmento de 18 Da [M+H-H₂O], *m/z* 300,1952 (C₁₉H₂₆NO₂) para a perda do fragmento de 86,0735 Da [M+H-C₅H₁₀O], *m/z* 192,1052 (C₁₉H₂₆NO₂) correspondente a perda do fragmento de 194,1670 Da [M+H-C₁₃H₂₂O] e *m/z* 85,0653 (C₅H₉O) para a perda do fragmento de 301,2035 Da [M+H-C₁₉H₂₇NO₂].

O composto **18** (Figura 14) foi detectado no pico com tempo de retenção 16,62 min, apresentou o íon protonado com *m/z* 448,2691 [M+H]⁺, referente a fórmula molecular C₂₅H₃₈NO₆ e com erro de -0,5011 (Figura 21 IS). A presença dessa molécula é justificada pelo perfil de fragmentação encontrado no espectro de MS/MS tendo com íons principais *m/z* 430,2575 (C₂₅H₃₆NO₅), correspondente a perda do fragmento de 18 Da [M+H-H₂O], *m/z* 236,1278 (C₁₃H₁₈NO₃) para a perda do fragmento de 212,1414 Da [M+H-C₁₂H₂₀O₃], *m/z* 208,0967 (C₁₁H₁₄NO₃) correspondente a perda do fragmento 194,1670 Da [M+H-C₁₃H₂₂O] e *m/z* 85,0653 (C₅H₉O), para a perda do fragmento de 301,2035 Da [M+H-C₁₉H₂₇NO₂]. É válido ressaltar que não foi encontrado na literatura a descrição desse composto que justifique essa estrutura. Na figura 14 encontram-se as estruturas dos todos os compostos identificados (**7-18**). A tabela 4 resume todas as informações de fragmentação de massas para os compostos **7-18**, identificados na classe das piericidina.

Tabela 4- Compostos identificados por UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking no modo positivo de ionização.

Nr.	Rt/min	Estrutura proposta	Detectado [M+H] ⁺	MS/MS	Fórmula molecular	Erro (ppm)
7	17,88	Piericidina A	416,2792	398,2690; 182,0806; 85,0653	C ₂₅ H ₃₈ O ₄ N	0,5723
8	19,56	Piericidina B1	430,2946	398,2684; 304,1901; 182,0809; 99,0807	C ₂₆ H ₄₀ O ₄ N	1,2503
9	18,64	Piericidina A5	430,2947	412,2843; 330,2059; 182,0809; 99,0806	C ₂₆ H ₄₀ O ₄ N	1,0375
10	13,56	Composto (10)	426,3000	408,2894; 300,1953; 193,1096; 153,0784; 125,0961	C ₂₇ H ₄₀ O ₃ N	0,6634

11	16,14	Composto (11)	432,2737	414,2636; 330,2059; 290,1748; 182,0809	$C_{25}H_{38}NO_5$	1,4704
12	14,43	Piericidina C1a	432,2735	414,2632; 330,2059; 222,1121; 209,1538; 182,0809	$C_{25}H_{38}NO_5$	2,1970
13	14,03	Composto (13)	440,3156	422,3049; 300,1952; 192,1017; 153,0782; 109,1013	$C_{28}H_{42}NO_3$	0,8378
14	18,75	Composto (14)	442,2948	424,2841; 330,2059; 182,0809; 113,0962	$C_{27}H_{40}NO_4$	0,9404
15	19,20	IT143B	456,3106	438,3000; 330,2058; 182,0861; 125,0962	$C_{28}H_{42}NO_4$	0,4314
16	17,35	De-Me- piericidina A1	402,2637	384,32529; 318,2059; 182,0810; 85,0652	$C_{24}H_{36}NO_4$	0,4541
17	12,19	Mer-(A2026B)	386,2687	368,2581; 300,1952; 192,1052; 85,0653	$C_{24}H_{36}NO_3$	0,6814
18	16,62	Composto (18)	448,2691	430,2575; 236,1278; 208,0967; 85,0653	$C_{25}H_{38}NO_6$	0,5011

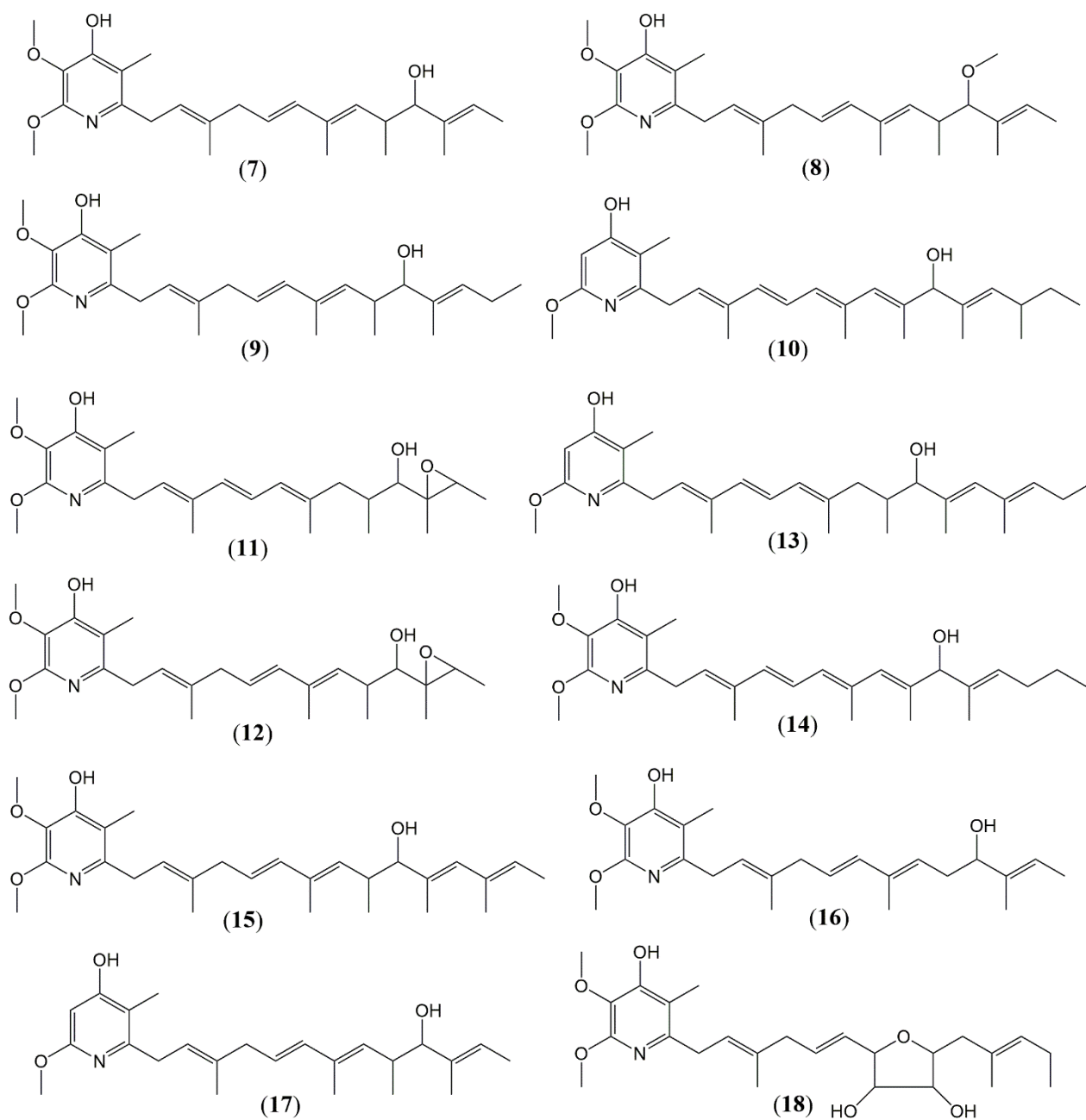


Figura 14- Estrutura dos compostos da classe das piericidinas identificados no modo positivo de ionização.

4 CONCLUSÃO

As informações expostas nesse trabalho, permitem-nos concluir que o solo da rizosfera de plantas do bioma Caatinga é fonte promissora de actinobactérias antagônicas, produtoras de metabólitos secundários com atividade antifúngica contra o fitopatógeno *F. oxysporum*, *C. brevisporum* e *C. musae*, para esse últimos sendo potencialmente mais ativo. Os extratos preparados com a resina XAD16N e HP-20 mostraram seletividade na extração para os compostos da classe de isocumarinas e piericidinas presentes nesses extratos. As análises de UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking permitiu a identificação de 6 isocumarinas e 12 piericidinas, sendo esses os possíveis compostos responsáveis pela atividade antifúngica. A exploração das CIM dos extratos preparados sem resinas com as resinas XAD16N e HP-20 apresentaram total inibição do crescimento micelial para *C. musae* as concentrações de 250 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente. Esse estudo sugere a investigação de outras relações antagônicas através da inoculação de cepas do isolado *Streptomyces* sp. ACTB-242 em solos de plantações afetadas por outras espécies de fitopatogênos no campo agrícola, além da tentativa de biocontrole pela aplicação direta da biomassa de *Streptomyces* sp. ACTB-242 no solo de plantações infectadas pelo fitopatogênos *F. oxysporum*, *C. brevisporum* e *C. musae*.

5 INFORMAÇÕES SUPLEMENTARES

Identificação de compostos da classe de piericidinas e isocumarinas produzidos por *Streptomyces* (ACTB-242) usando a técnica UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking

Maria V. de Brito,^a Wéverson L. Fonseca,^b Marcio A. Ootani,^d Suane O. S. Brasil,^e Francisco M. P. Viana,^{c†} Maria C. F. Oliveira,^{a*} Cecília M. A. Oliveira,^f Lucília Kato.^f

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl. 940, Fortaleza-CE, 60.440-593, Brazil.

^b Colégio Técnico de Bom Jesus-CTBJ, Universidade Federal do Piauí, BR 135, km 3 - Planalto Horizonte, Bom Jesus-PI, 64900-000, Brazil.

^c EMBRAPA Agroindústria Tropical, Rua Pernambuco 2270, Pici, Fortaleza-CE, 60511-110, Brazil.

^d Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE, Av. Prof. Luiz Freire - lado par, Cidade Universitária, Recife-PE, 50.740-540, Brazil.

^e Cargill - EWOS 7721 132 St, Surrey, BC V3W 4M8, Canadá.

^f Universidade Federal de Goiás, Avenida Esperança, s/n- Chácara de Recreio Samambaia, Goiânia-GO, 74690-9000

* Corresponding author: M. C. F. Oliveira (mcfo@ufc.br)

 <https://orcid.org/0000-0002-7445-2347>

Tabela 1. Cepas de actinobactérias da rizosfera da Caatinga estudadas e suas procedências.

Código das cepas	Planta de origem	Local no Ceará	Localização geográfica	Cor da cepa
ACTB-10	<i>Mimosa arenosa</i>	Serra das Almas	4°11'26,62"S	Amarelo opaco
ACTB-25	<i>M. arenosa</i>		38°29'50,78"O	Amarelo opaco
ACTB-32	<i>Bauhiniaforficata</i>			Branco
ACTB-77	<i>Combretumleprosum</i>	Quixeramobim	6° 6'1.18"S 39°23'0.29"O	incolor
ACTB-166	<i>Sideroxylobotusifolium</i>	Itatira	4°33'4.44"S 39°37'53.18"O	Amarelo
ACTB-171	<i>Crotonblanchetianus</i>	Itatira	5°12'55.97"S 37° 0'57.07"O	Marrom
ACTB-172	<i>Myracrodruonurundeuva</i>			Amarelo-Branco
ACTB-177	<i>Cordiatrichotoma</i>			Amarelo
ACTB-227	<i>C.trichotoma</i>			Amarelo-Branco
ACTB-242	<i>Cereus jamacaru</i>			Amarelo escuro
ACTB-246	<i>C. jamacaru</i>			Branco
ACTB0-282	<i>Commiphoraleptophloeos</i>		4°33'4.44"S	creme
ACTB-285	<i>Anadenanthera colubrina</i>	Itatira	39°37'53.18"O	Branco
ACTB-286	<i>A. colubrina</i>			Branco
ACTB-290	<i>A. colubrina</i>			Marrom
ACTB-291	<i>A. colubrina</i>			Amarelo Claro
ACTB-292	<i>A. colubrina</i>			Marrom
ACTB-296	<i>A. colubrina</i>			Branco
ACTB-299	<i>Crotonblanchetianus</i>			Branco
ACTB-305	<i>Licaniarigida</i>	Itatira	4°33'7.98"S 9°38'24.48"O	Rosa

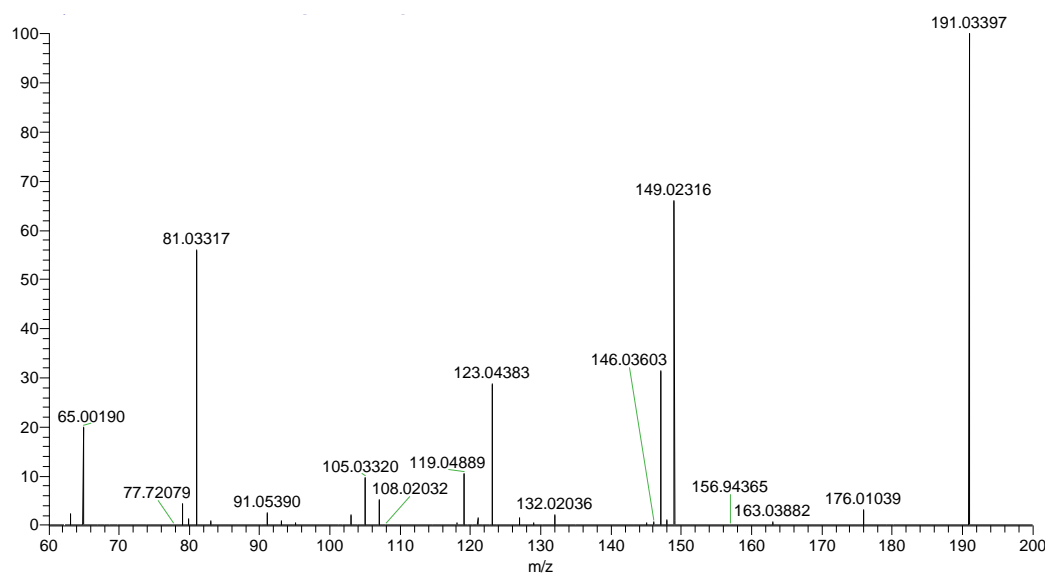
Figura 1 IS. Espectro de massas (modo negativo) de alta resolução de (1).

Figura 2 IS. Espectro de ^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) de (1).

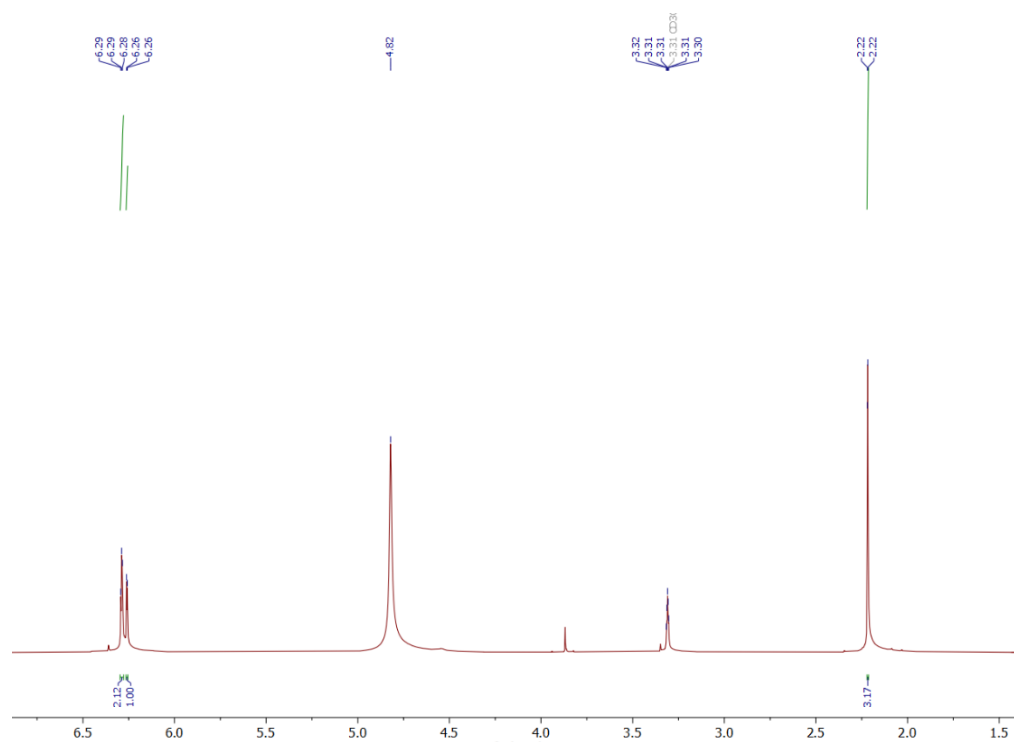


Figura 3 IS. Espectro de ^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz) de (1).

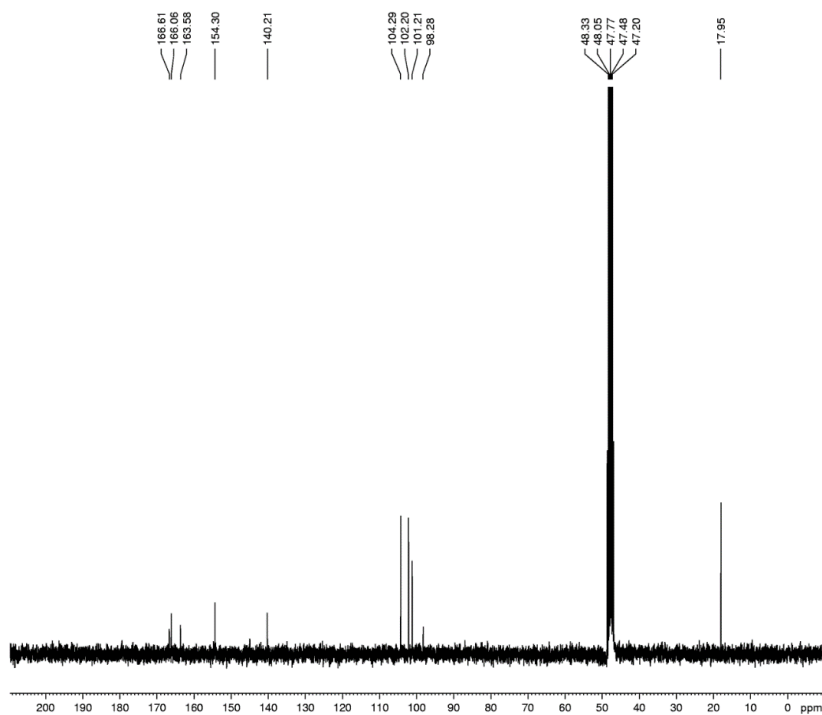
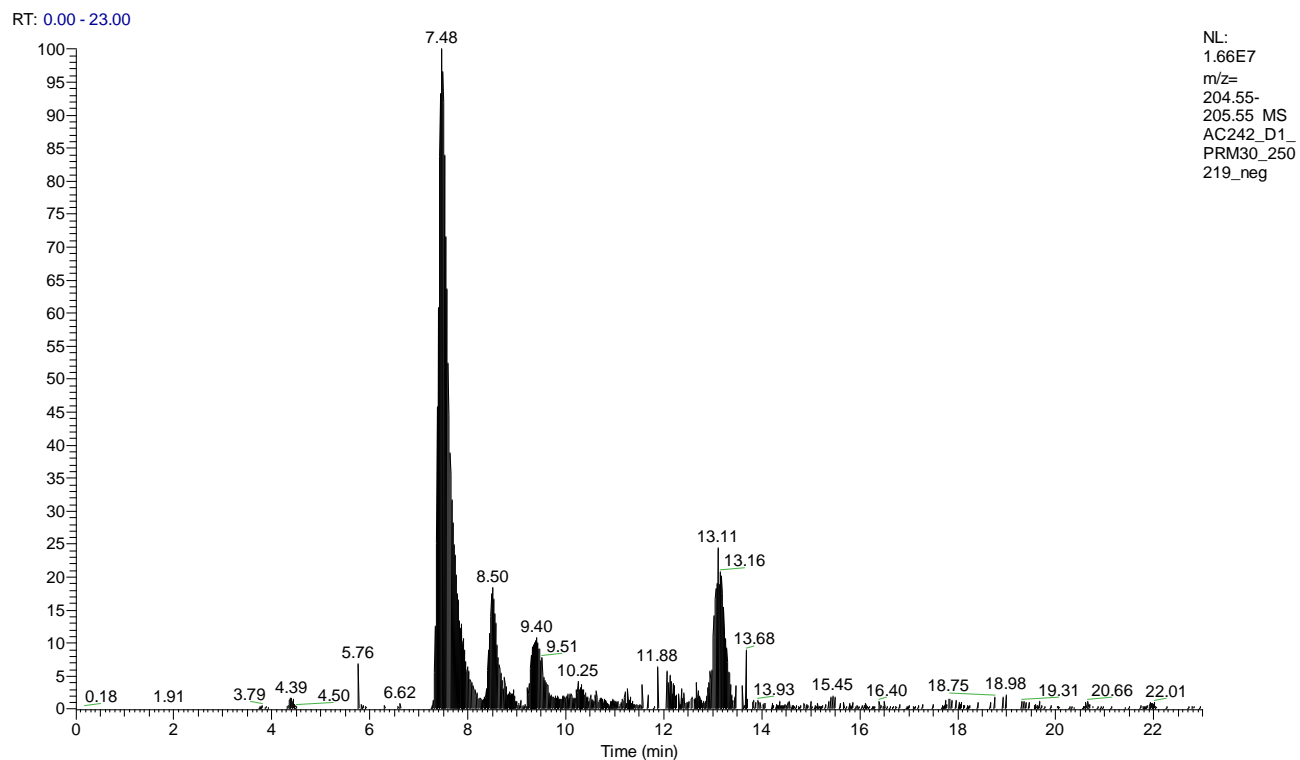


Figura 4 IS. Espectros de massas modo negativo dos fragmentos MS/MS de (2).



AC242_D1_PRM30_250219_neg #1657 RT: 7.39 AV: 1 NL: 7.54E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]

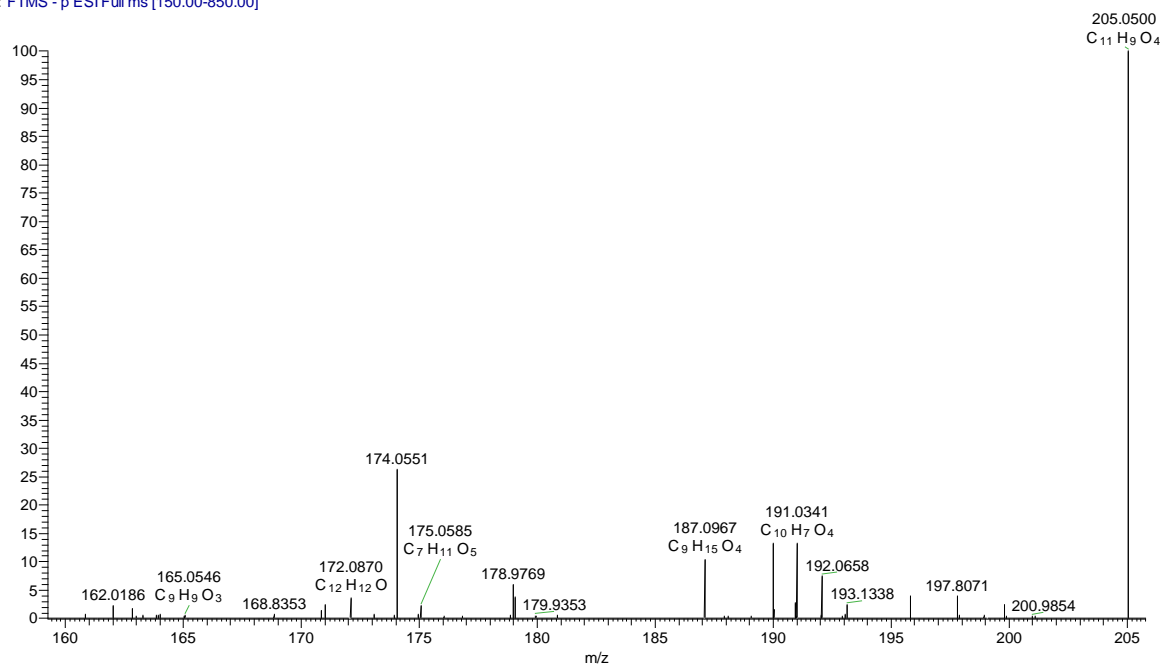
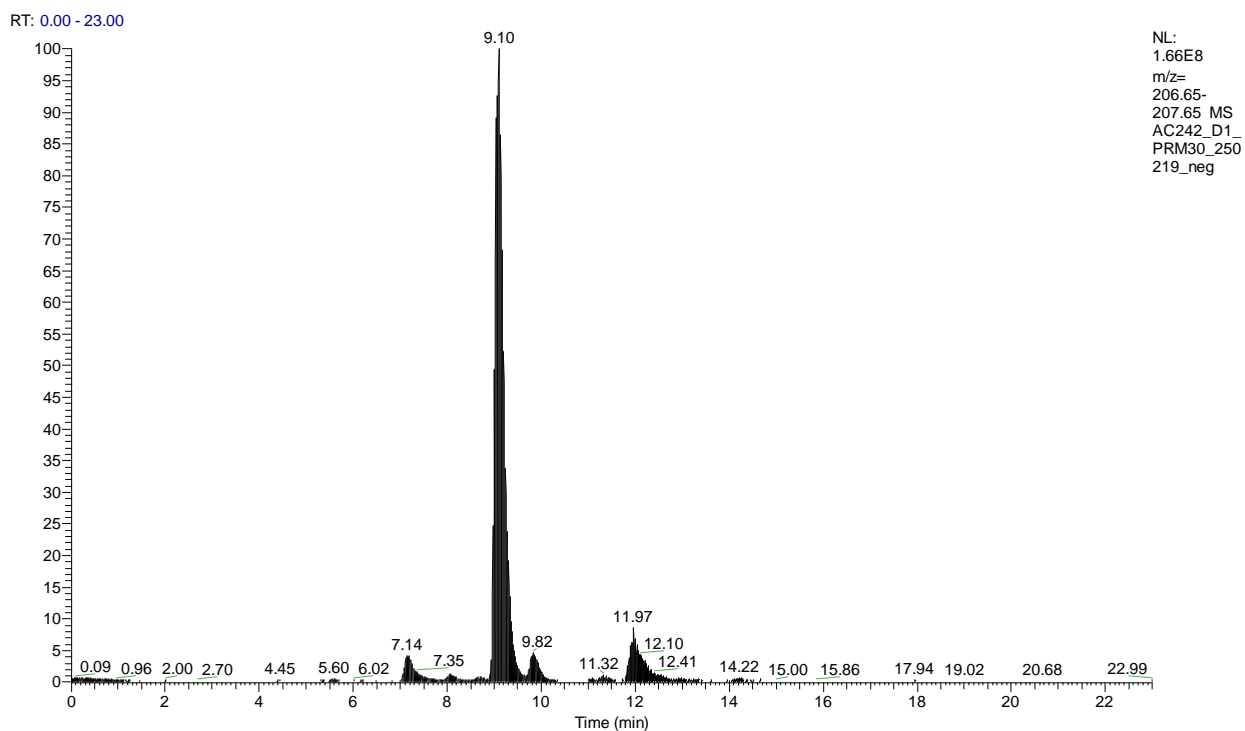


Figura 5 IS. Espectros de massas modo negativo dos fragmentos MS/MS de (3).



AC242_D1_PRM30_250219_neg #2041 RT: 9.10 AV: 1 NL: 1.61E8
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]

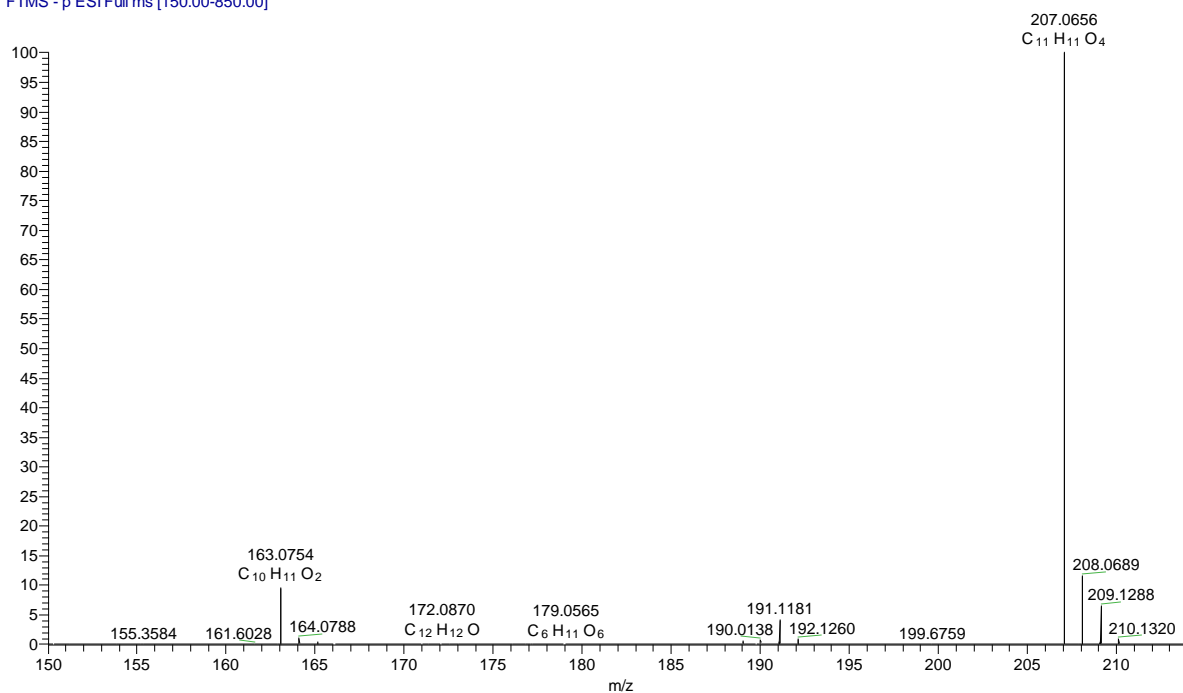
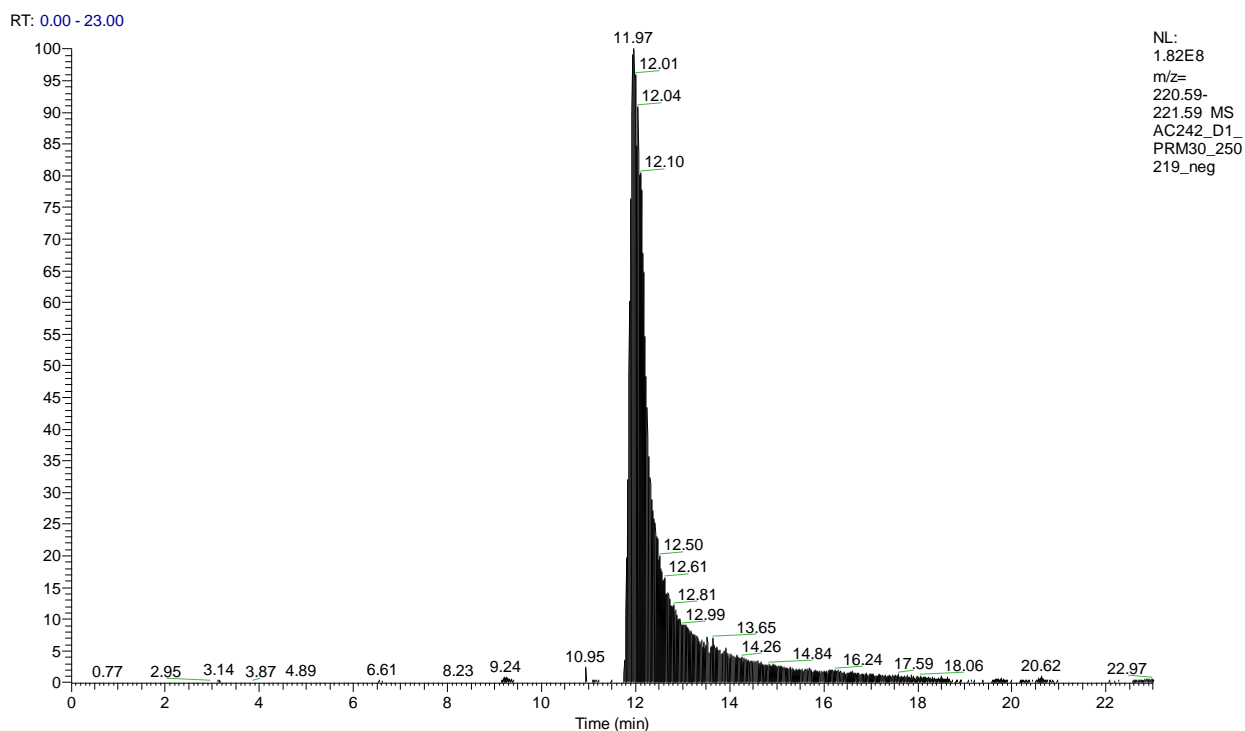


Figura 6 IS. Espectros de massas modo negativo dos fragmentos MS/MS de (4).



AC242_D1_PRM30_250219_neg #2643 RT: 11.78 AV: 1 NL: 4.58E9
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]

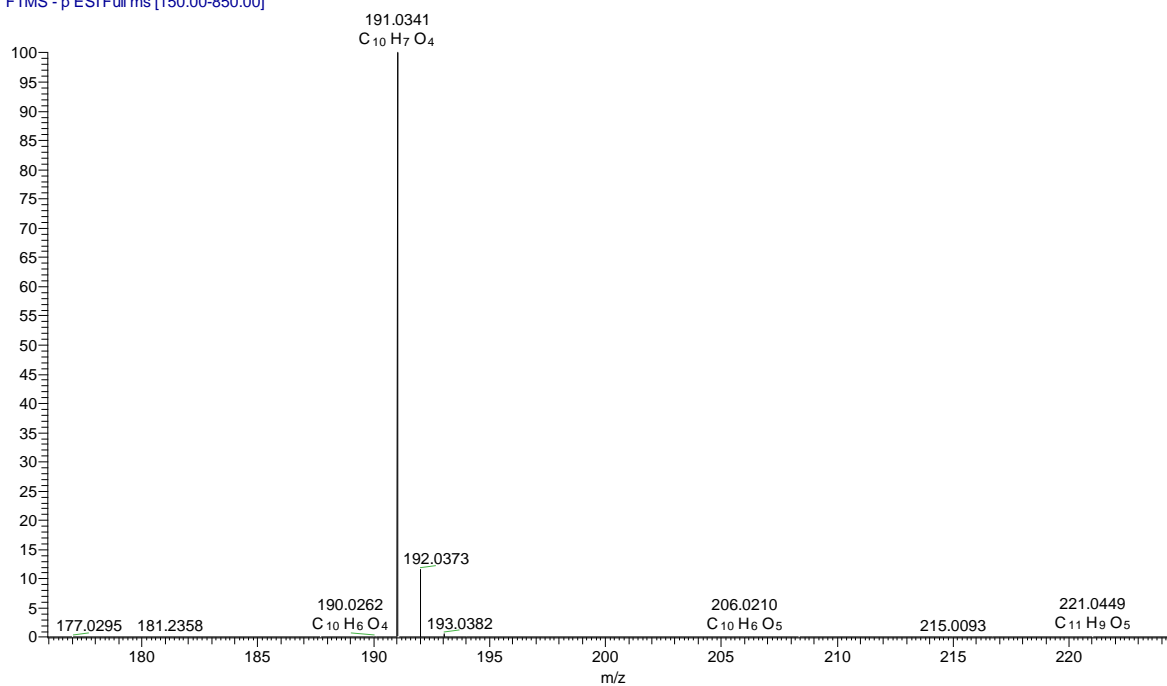
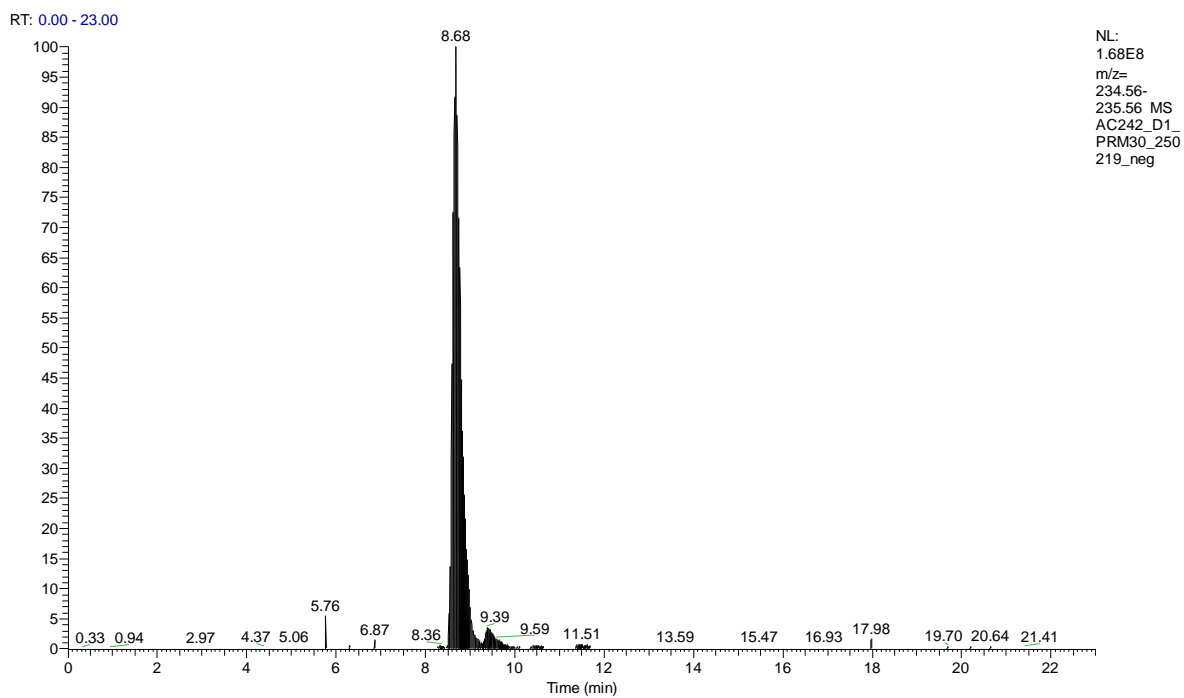


Figura 7 SI. Espectros de massas modo negativo dos fragmentos MS/MS de (5).



AC242_D1_PRM30_250219_neg #1927 RT: 8.59 AV: 1 NL: 6.34E7
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]

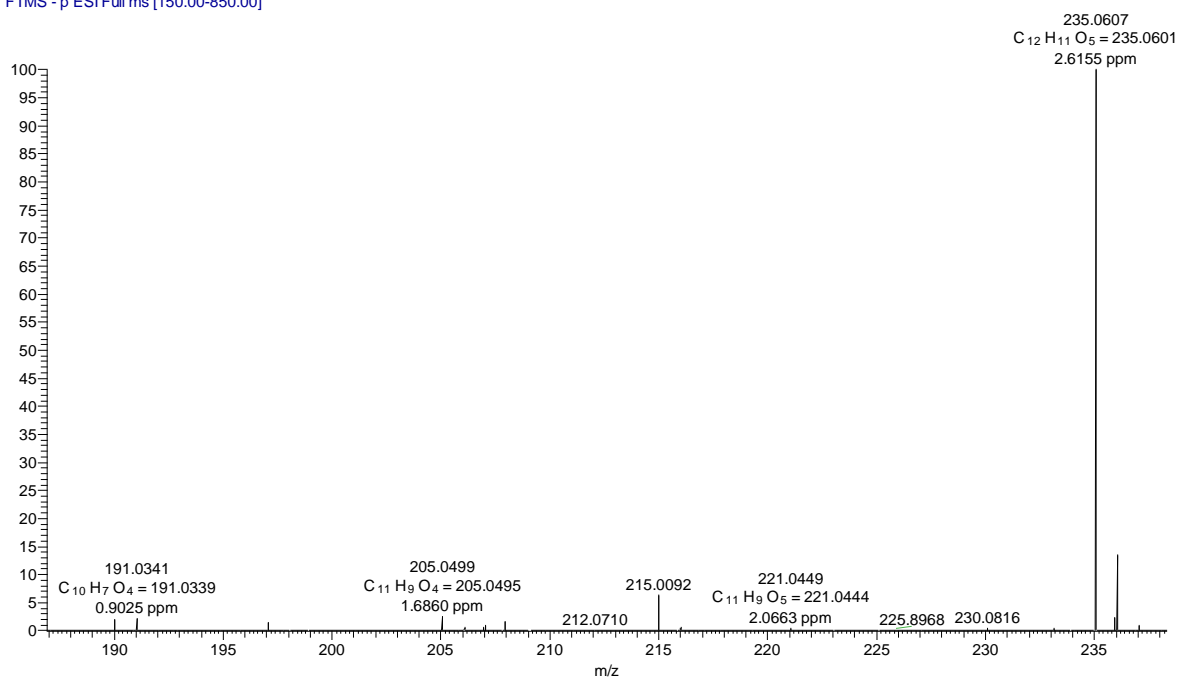
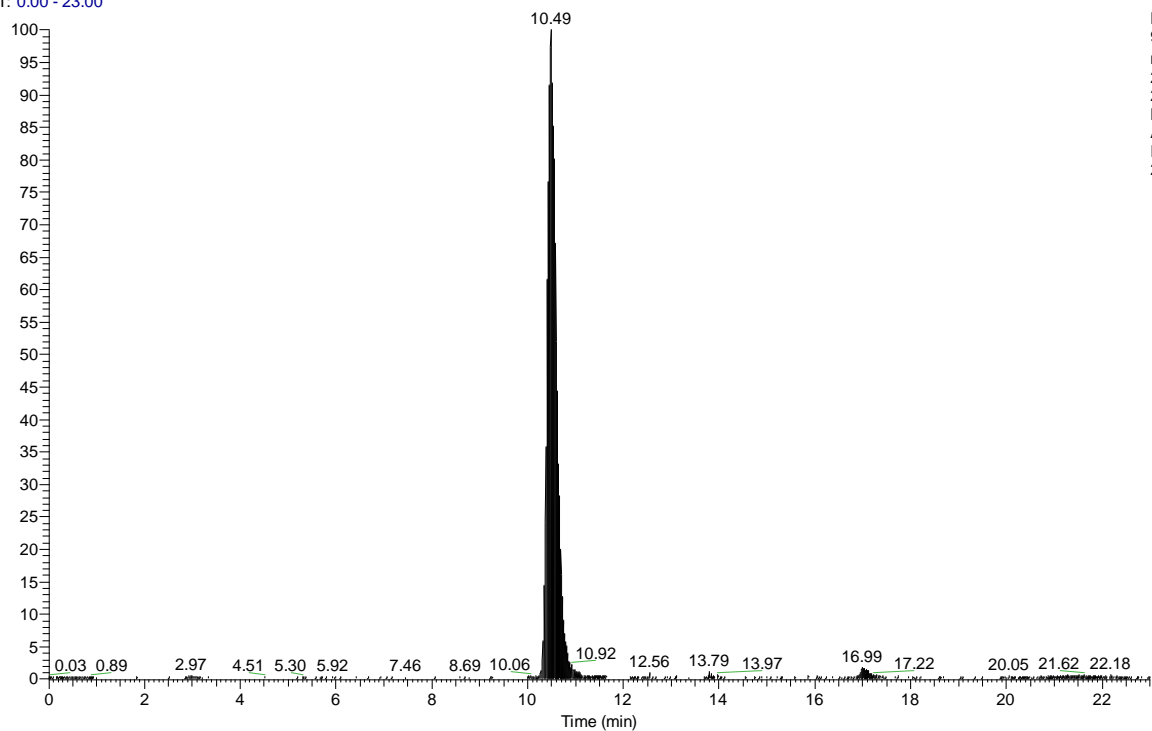


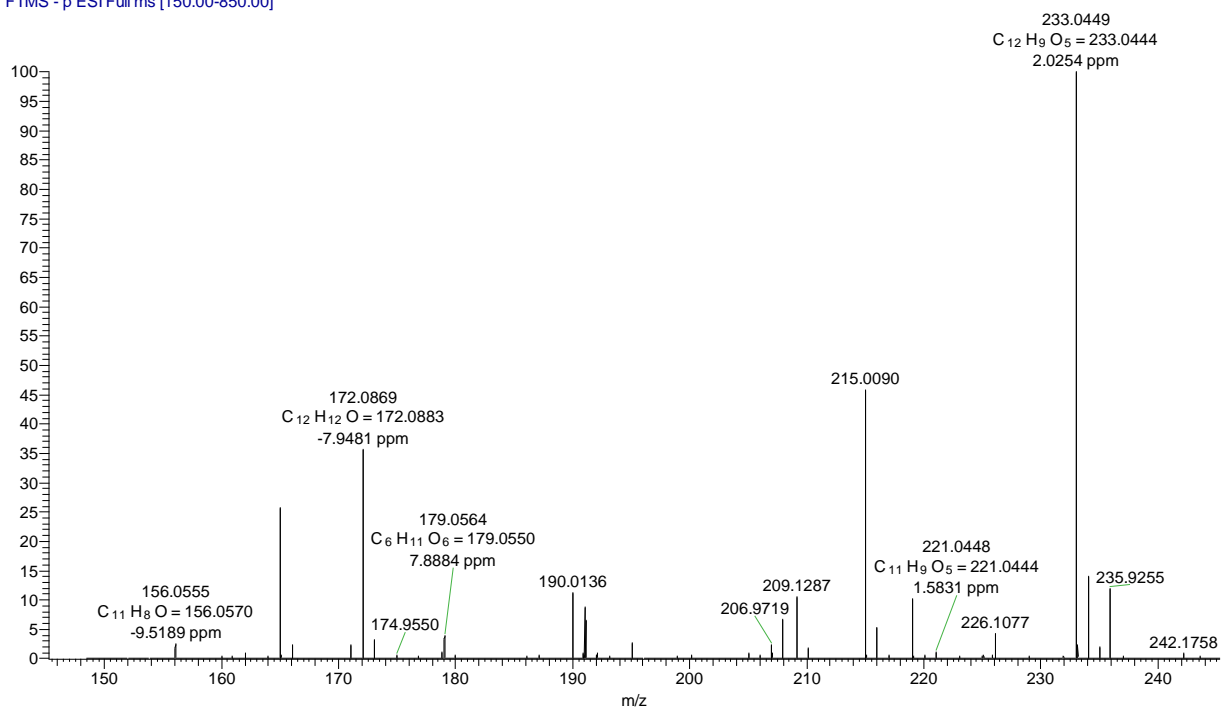
Figura 8 IS. Espectros de massas modo negativo dos fragmentos MS/MS de (6).

RT: 0.00 - 23.00

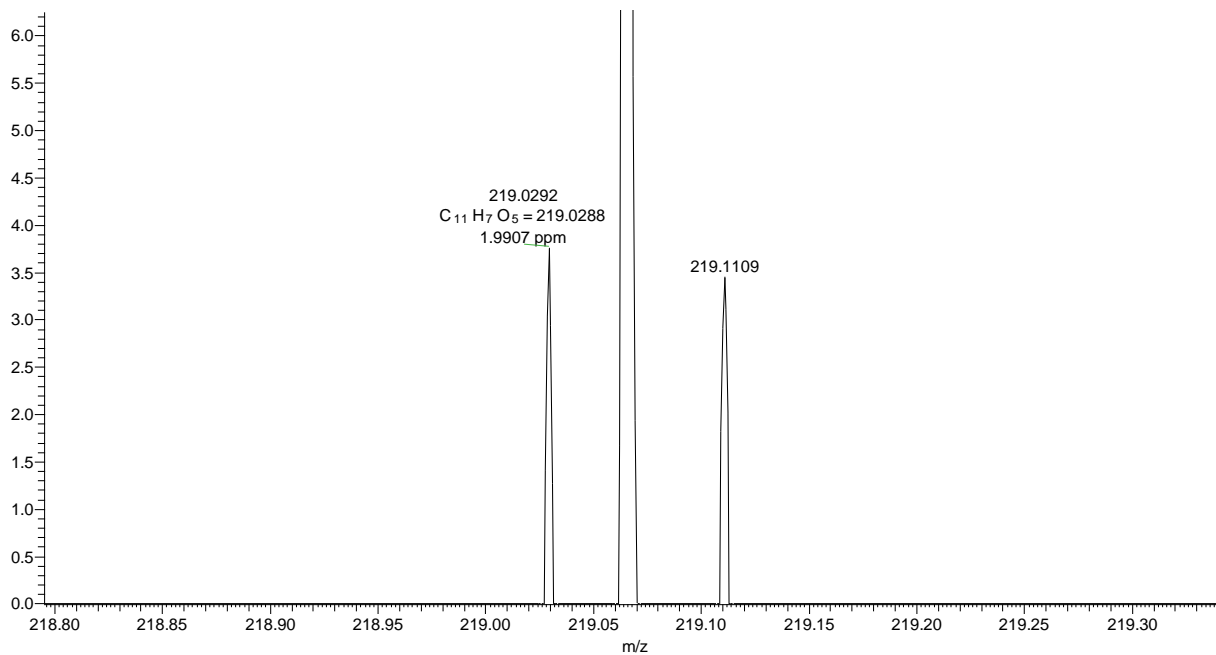


NL:
9.24E7
m/z=
232.5102-
233.5102
MS
AC242_D1_
PRM30_250
219_neg

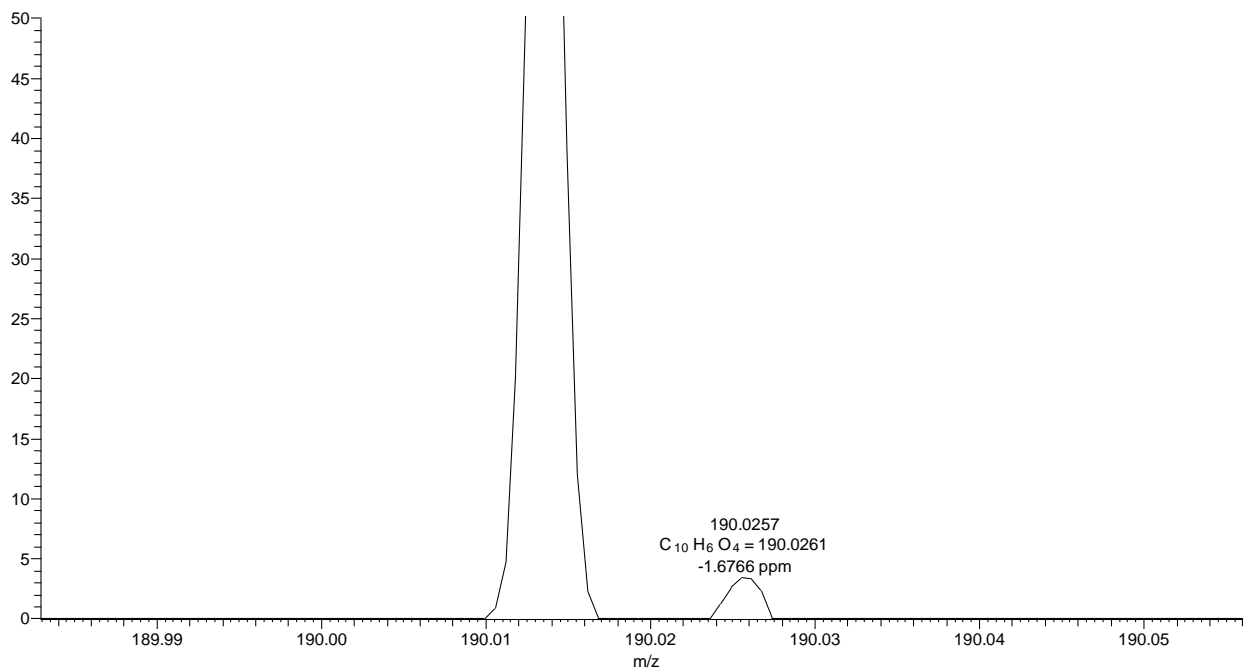
AC242_D1_PRM30_250219_neg #2409 RT: 10.74 AV: 1 NL: 9.08E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_250219_neg #2409 RT: 10.74 AV: 1 NL: 9.23E5
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_250219_neg #2409 RT: 10.74 AV: 1 NL: 1.03E6
T: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_250219_neg #2410 RT: 10.74 AV: 1 NL: 5.83E4
T: FTMS -p ESI Full ms2 207.07@hcd30.00 [50.00-440.00]

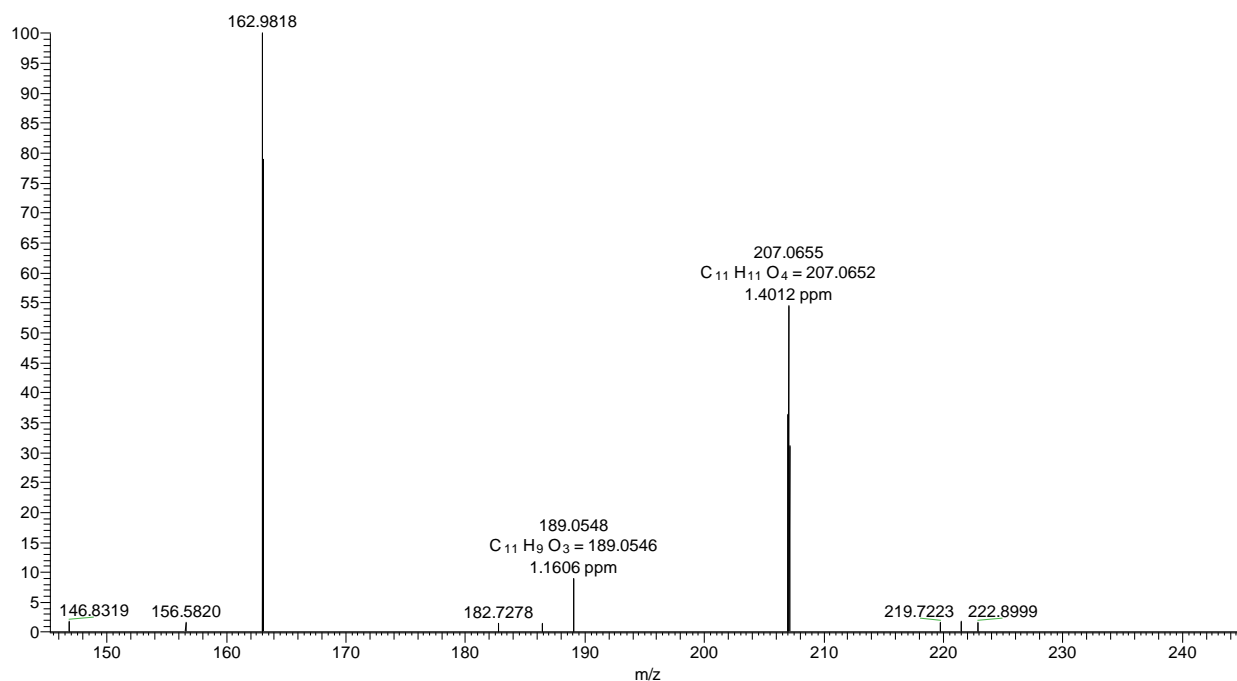
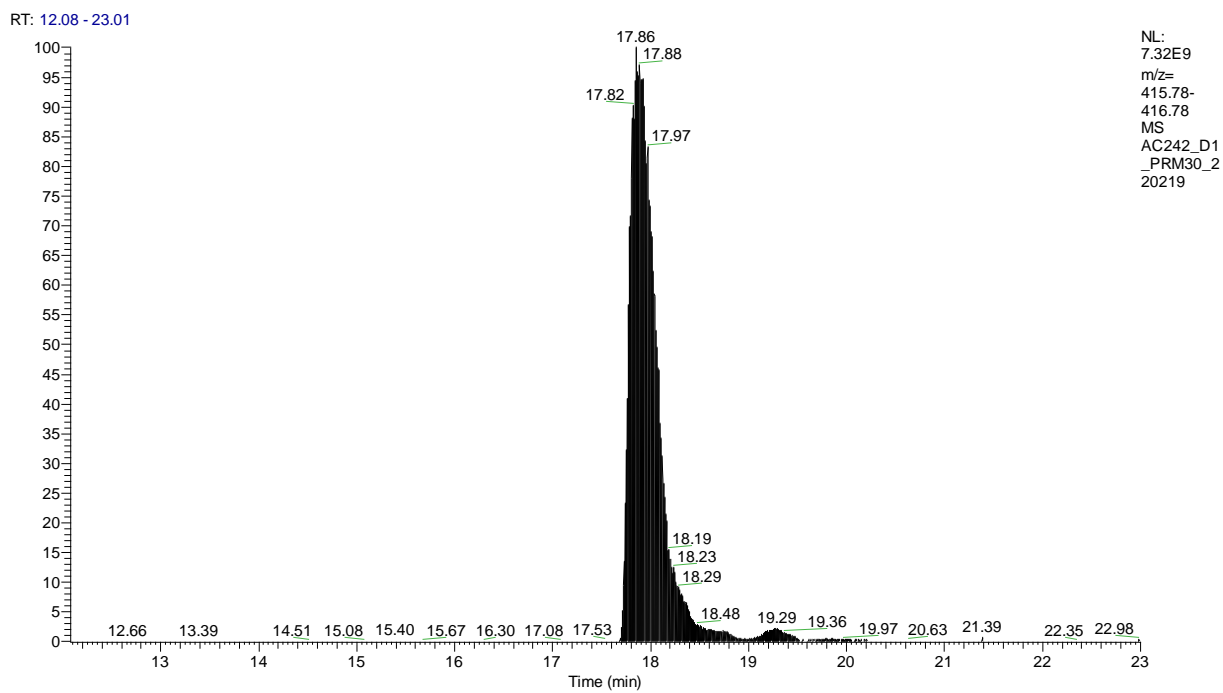
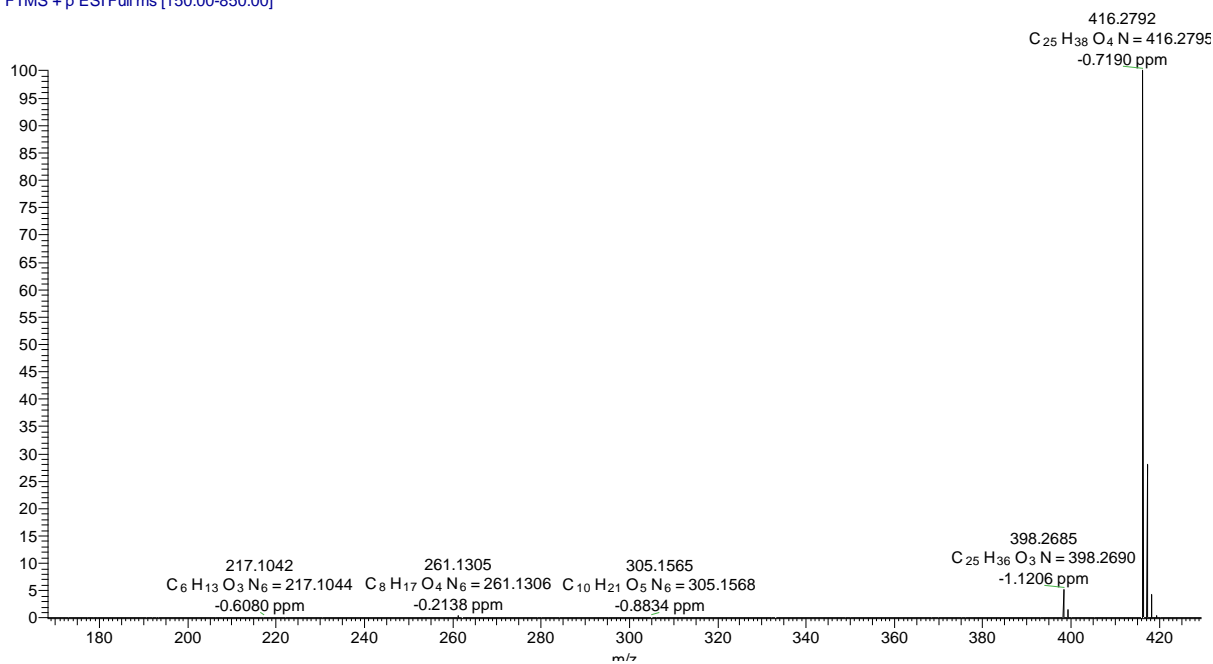


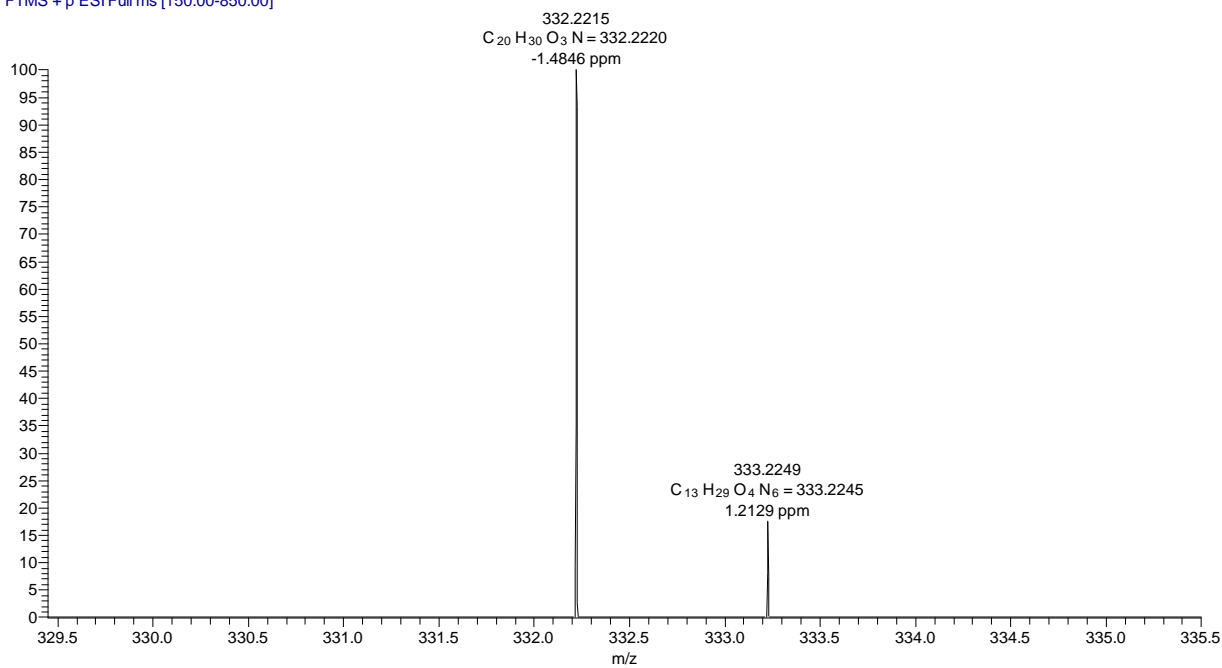
Figura 9 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (7).



AC242_D1_PRM30_220219 #4011 RT: 17.88 AV: 1 NL: 6.75E9
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4011 RT: 17.88 AV: 1 NL: 9.83E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4011 RT: 17.88 AV: 1 NL: 1.48E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]

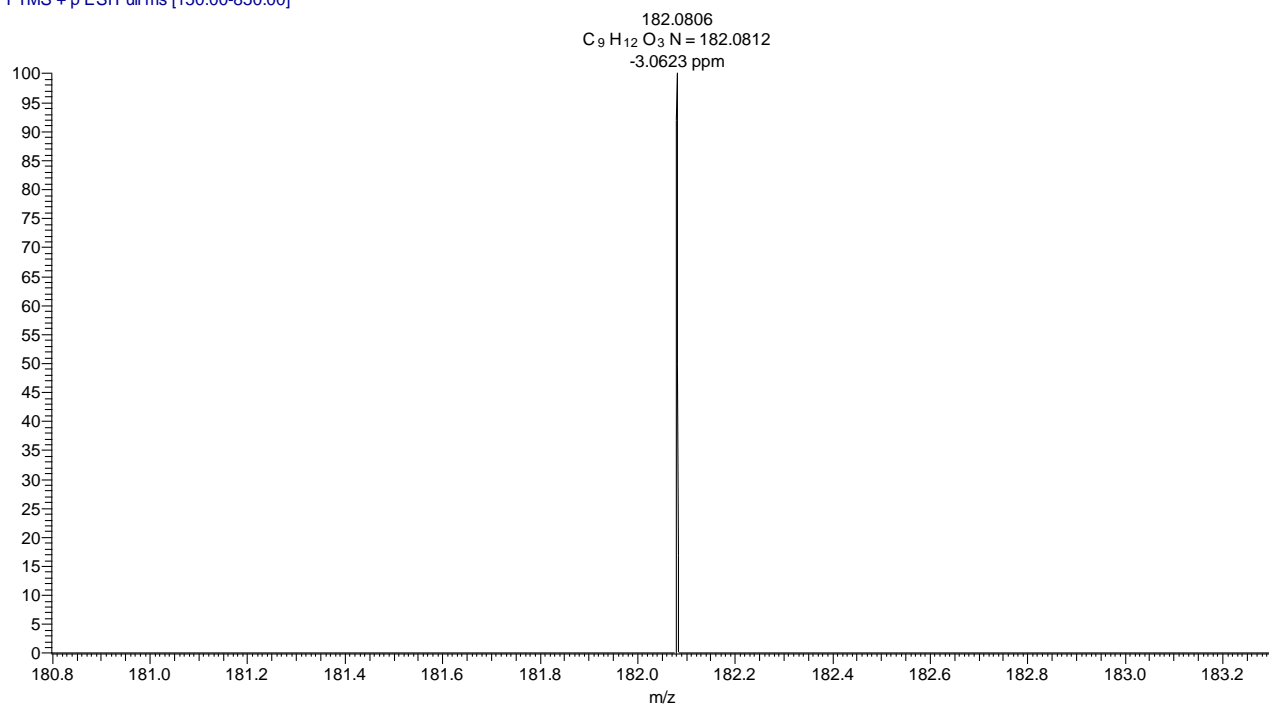
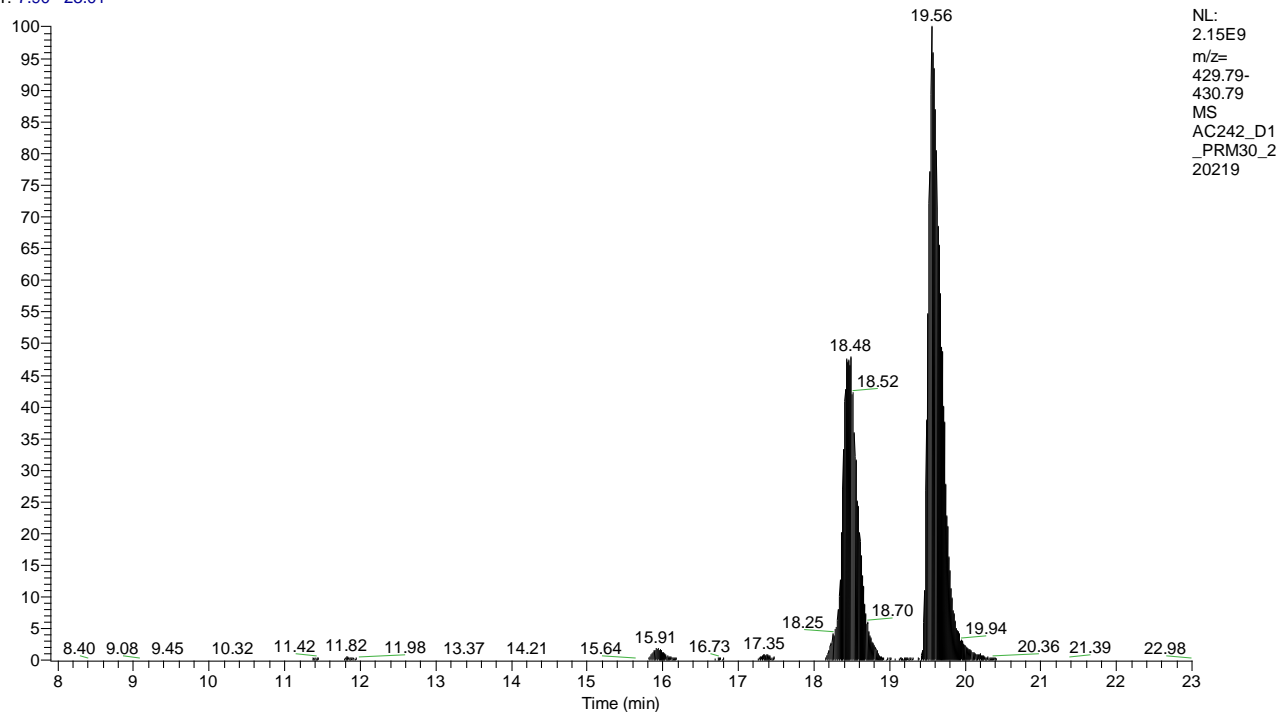


Figura 10 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (8).

RT: 7.90 - 23.01



AC242_D1_PRM30_220219 #4388 RT: 19.56 AV: 1 NL: 1.46E8
T: FTMS + p ESI Full ms2 430.30@hcd30.00 [50.00-895.00]

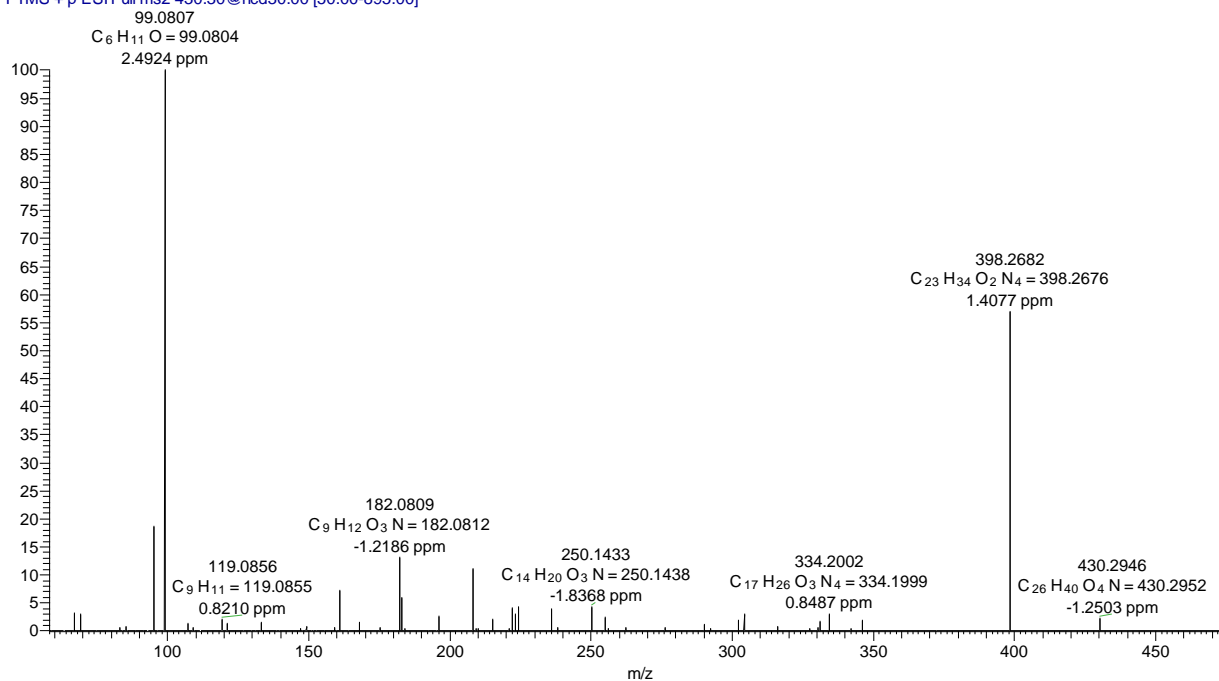
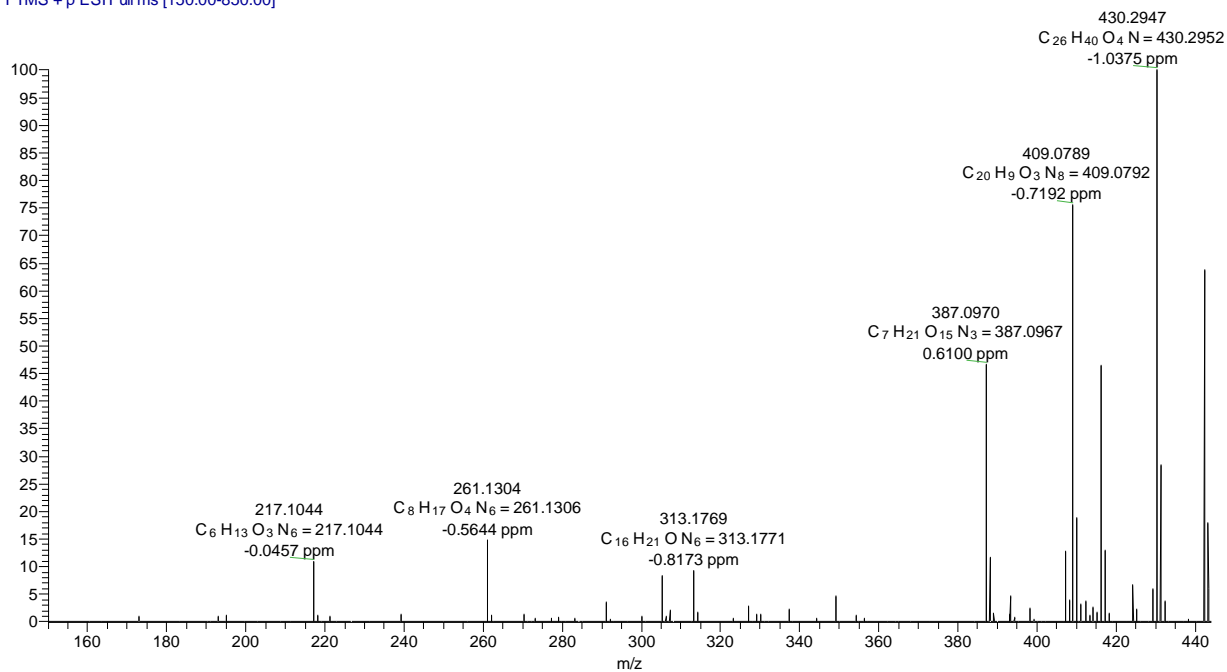
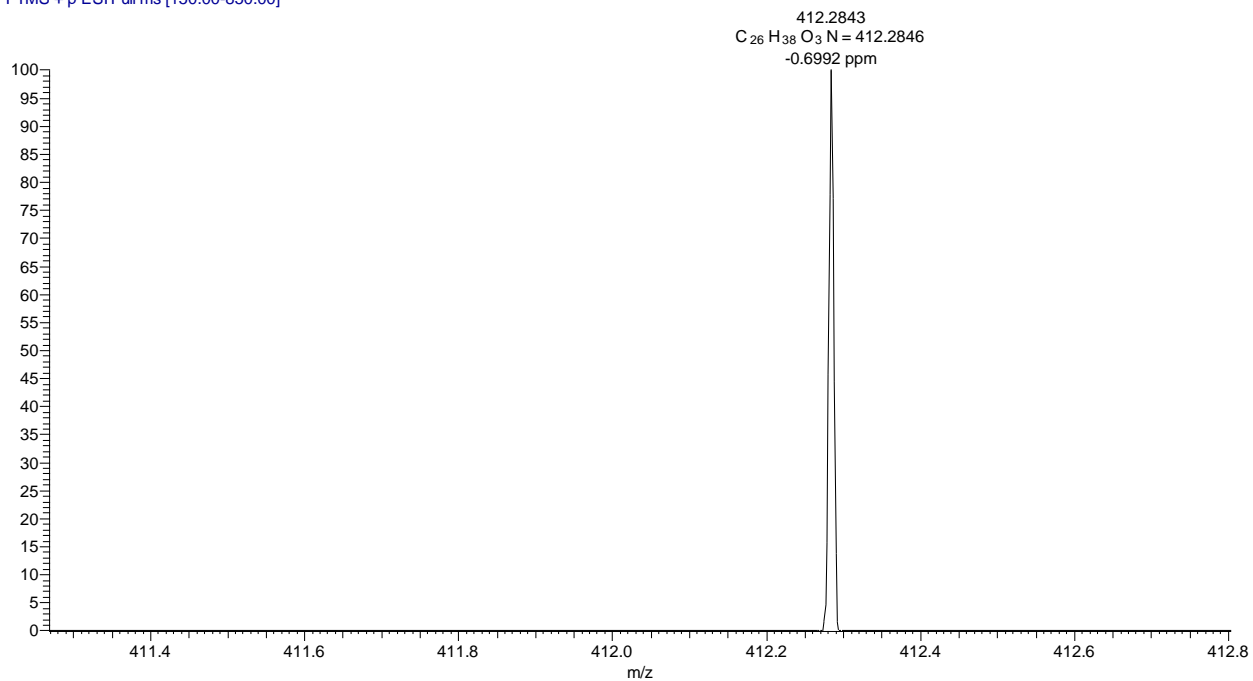


Figura 11 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (9).

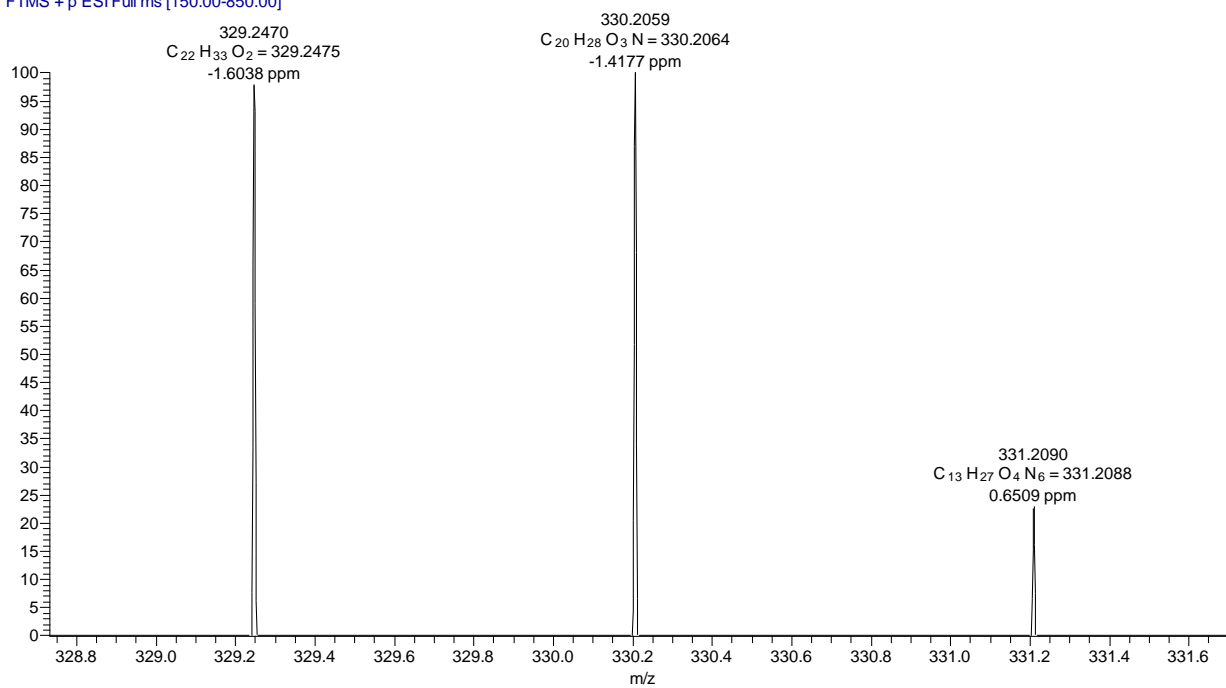
AC242_D1_PRM30_220219 #4183 RT: 18.64 AV: 1 NL: 2.78E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4183 RT: 18.64 AV: 1 NL: 1.06E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4183 RT: 18.64 AV: 1 NL: 3.73E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4182 RT: 18.64 AV: 1 NL: 7.09E3
T: FTMS + p ESIFull.ms2 402.26@hcd30.00 [50.00-840.00]

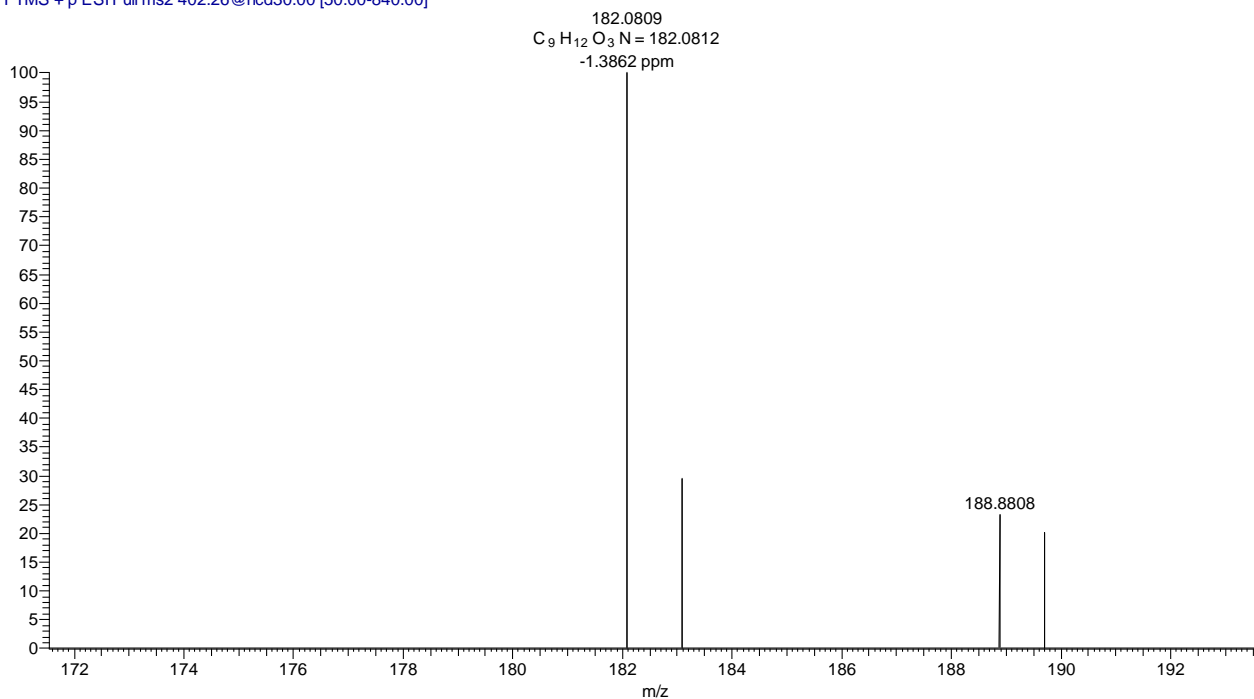
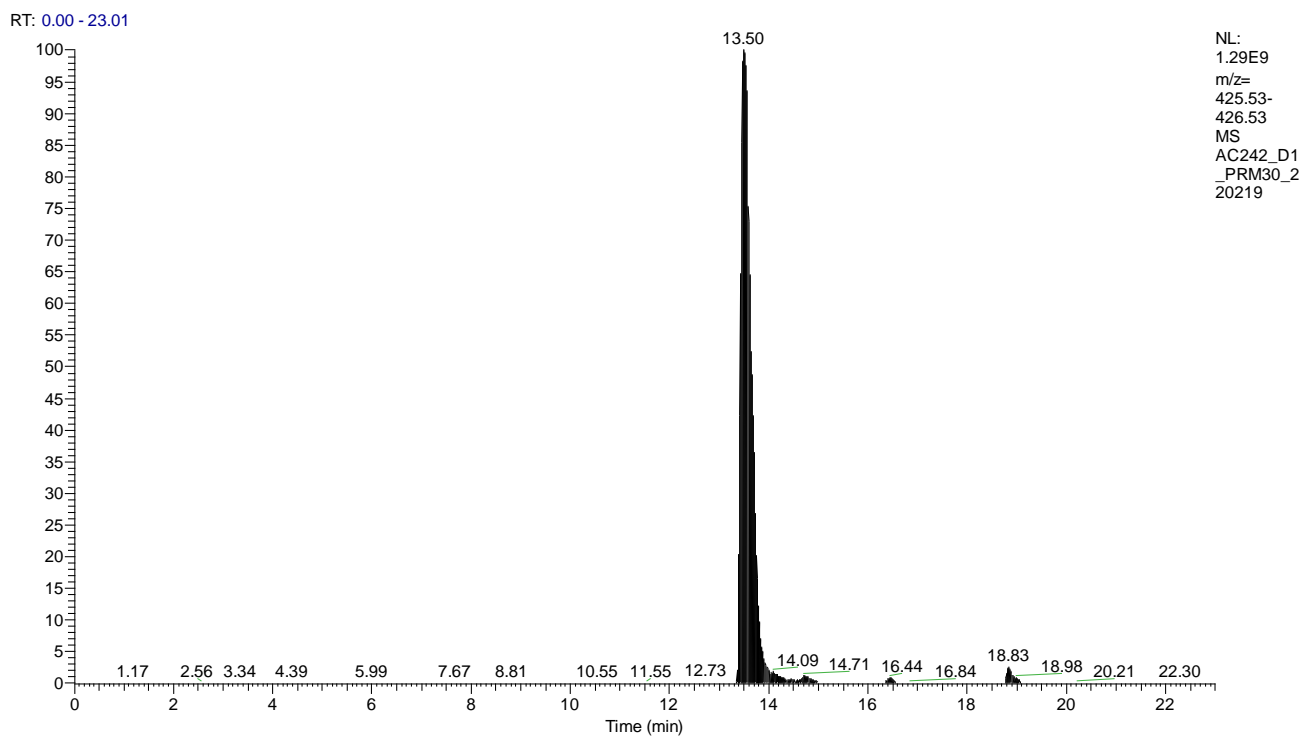
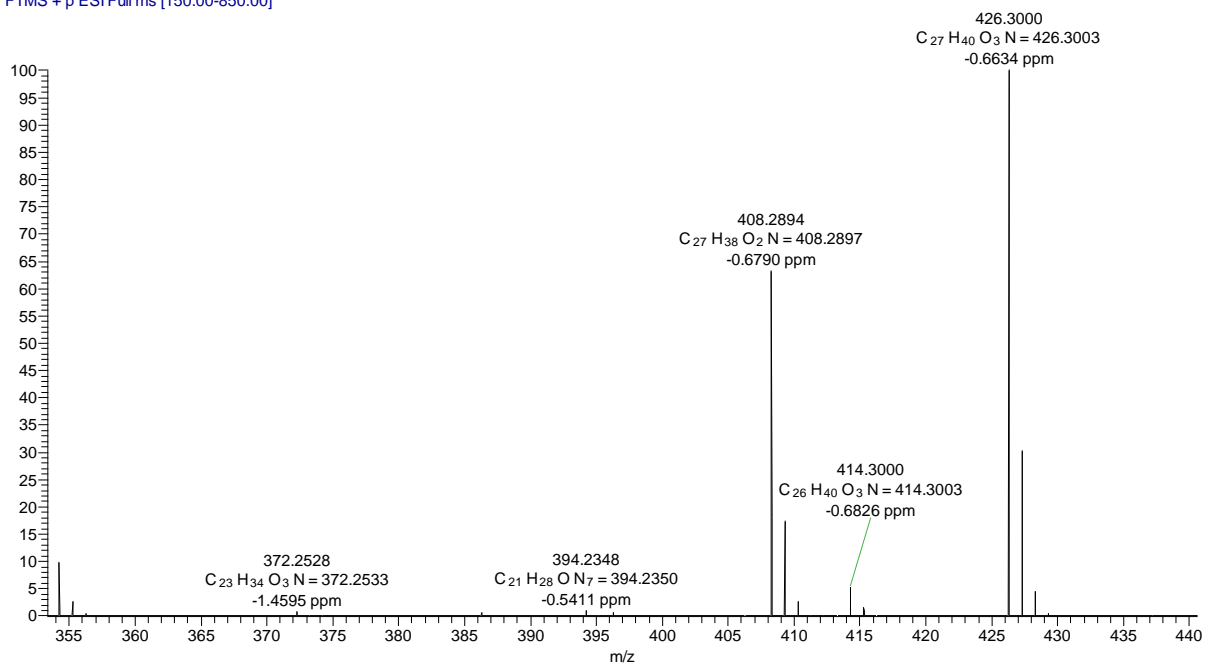


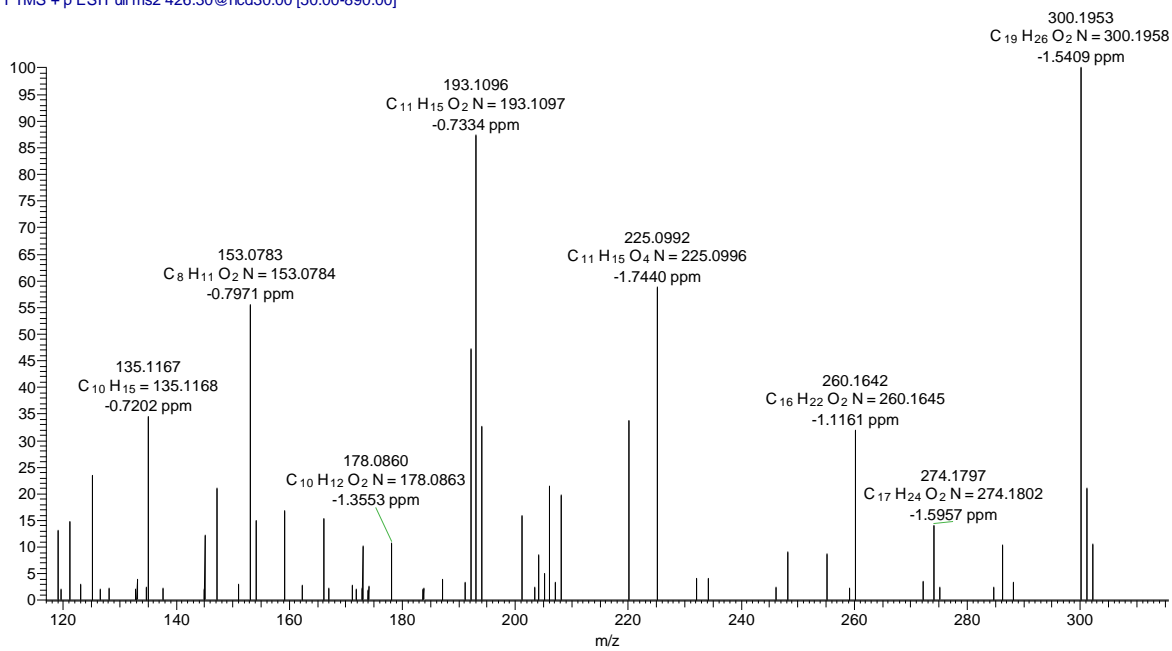
Figura 12 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (10).



AC242_D1_PRM30_220219 #3043 RT: 13.56 AV: 1 NL: 1.10E9
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3042 RT: 13.56 AV: 1 NL: 1.47E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 426.30@hcd30.00 [50.00-890.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3042 RT: 13.56 AV: 1 NL: 3.45E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 426.30@hcd30.00 [50.00-890.00]

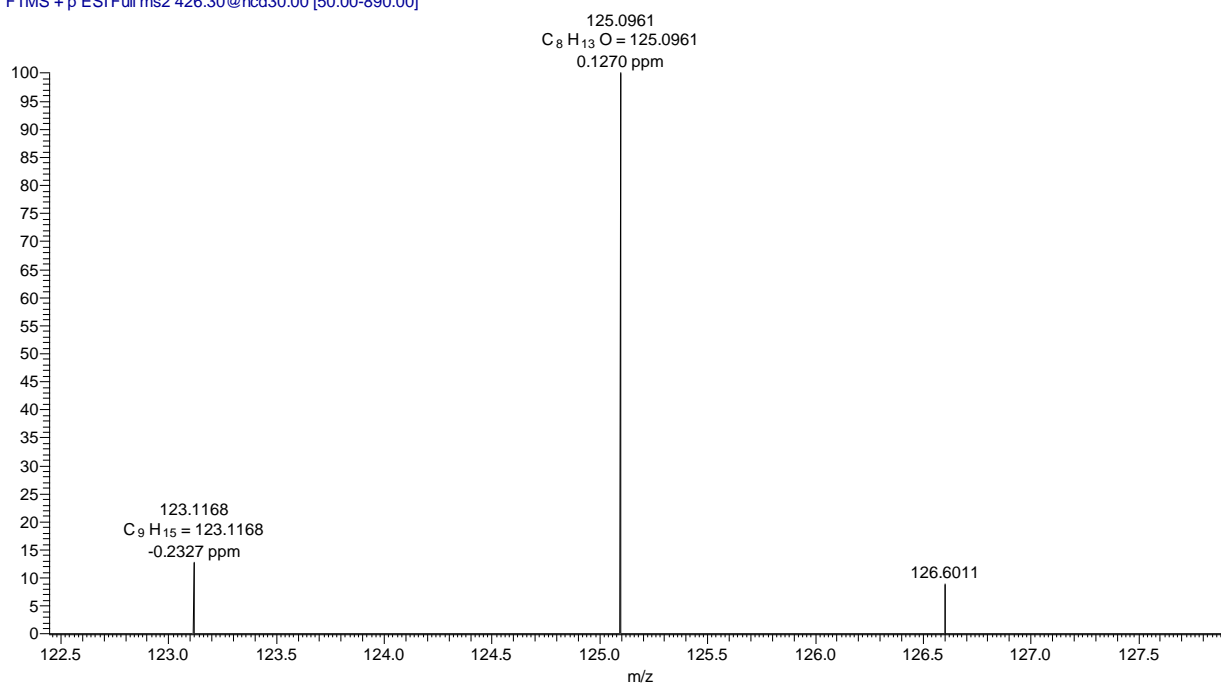
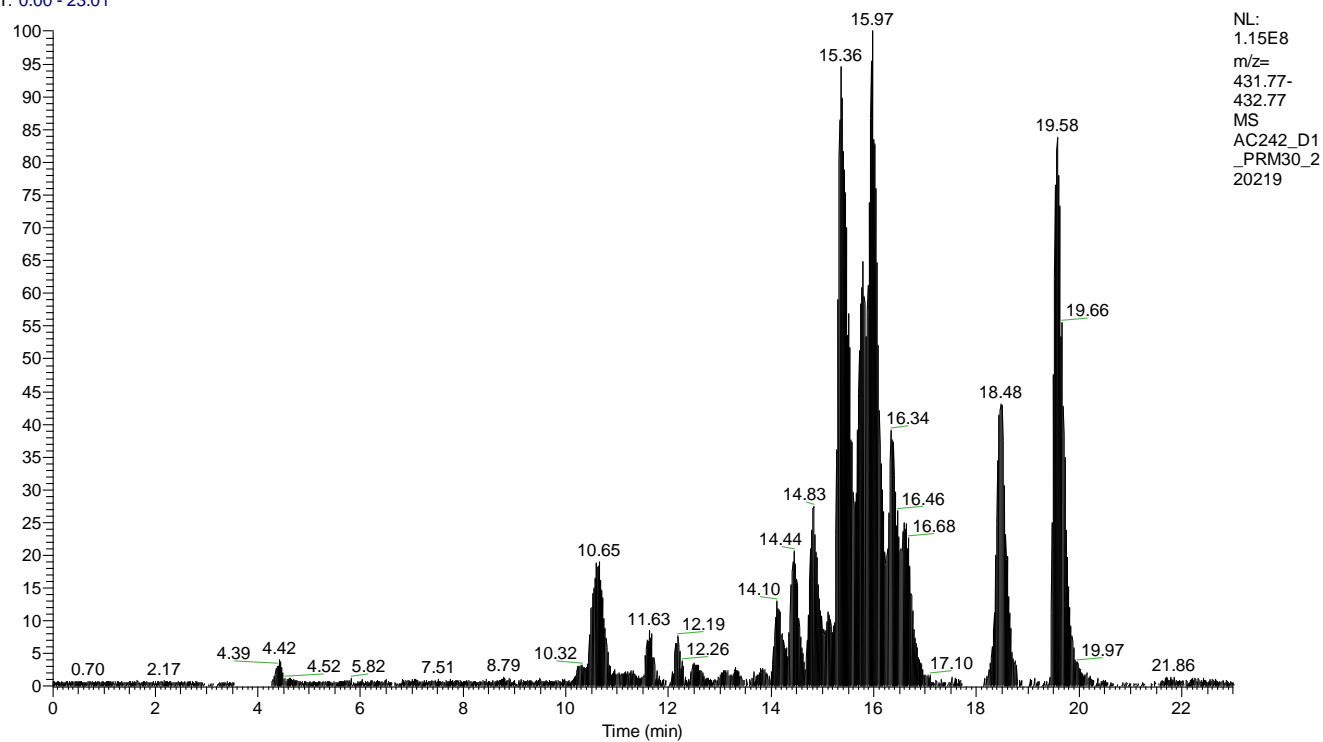
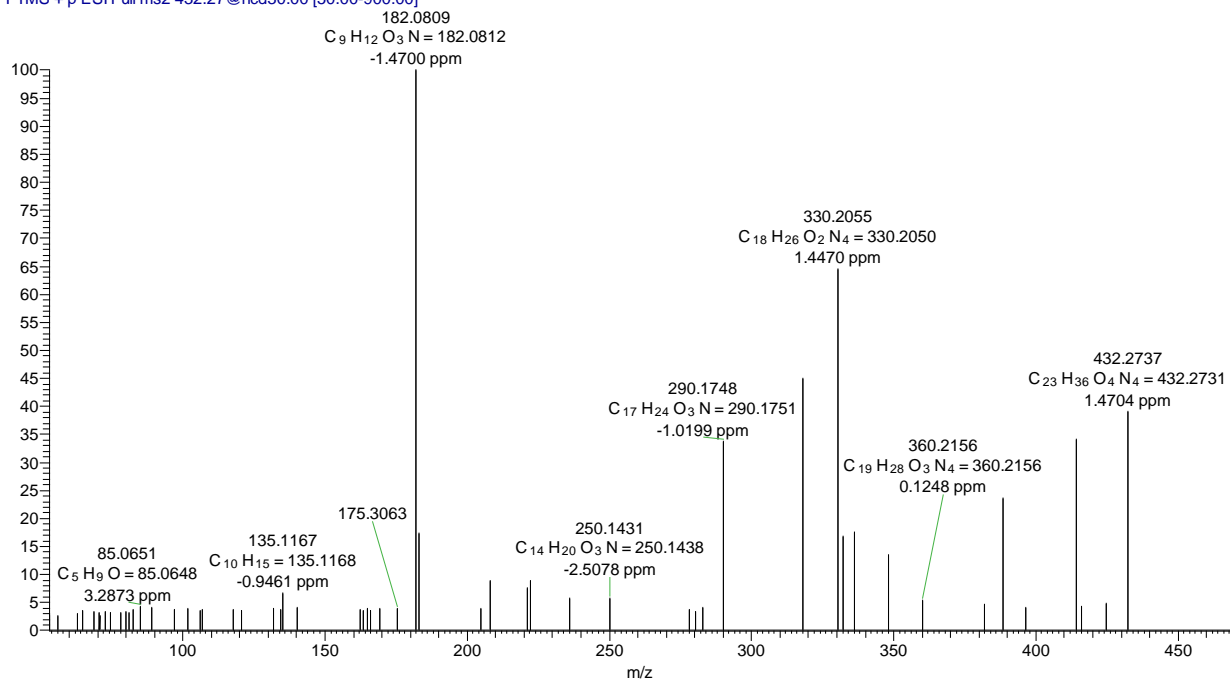


Figura 13 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (11).

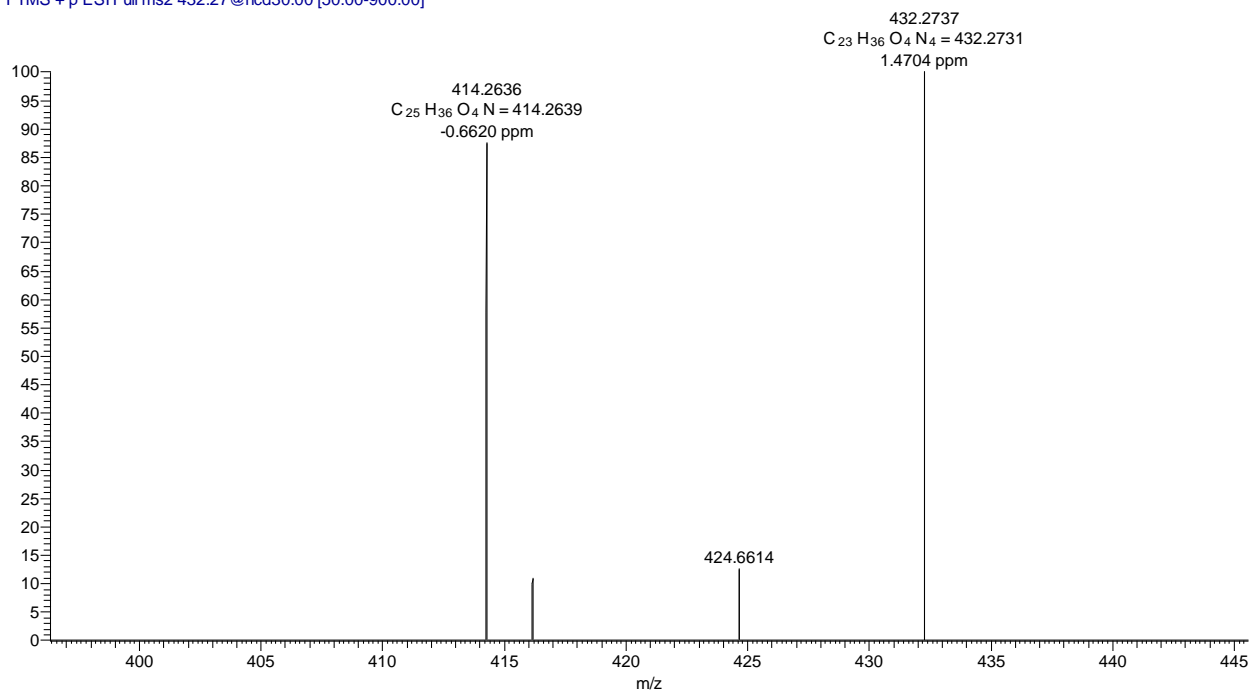
RT: 0.00 - 23.01



AC242_D1_PRM30_220219 #3622 RT: 16.14 AV: 1 NL: 2.57E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 432.27@hcd30.00 [50.00-900.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3622 RT: 16.14 AV: 1 NL: 1.00E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 432.27@hcd30.00 [50.00-900.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3623 RT: 16.15 AV: 1 NL: 9.93E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]

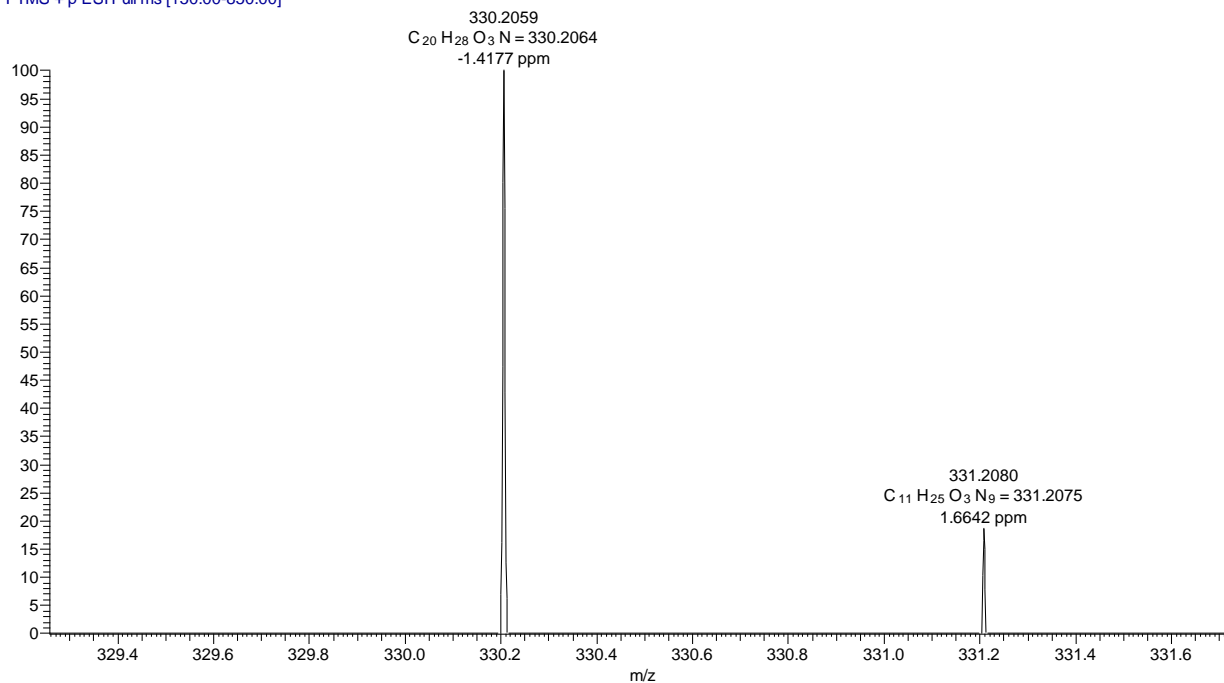
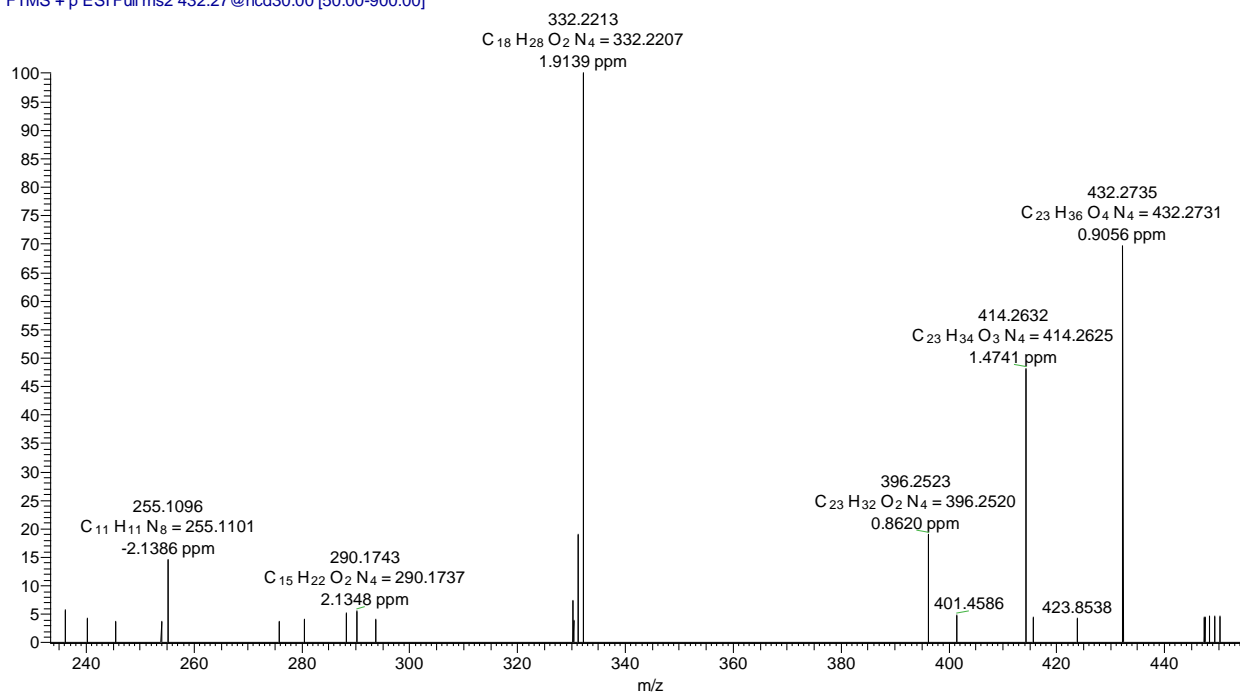
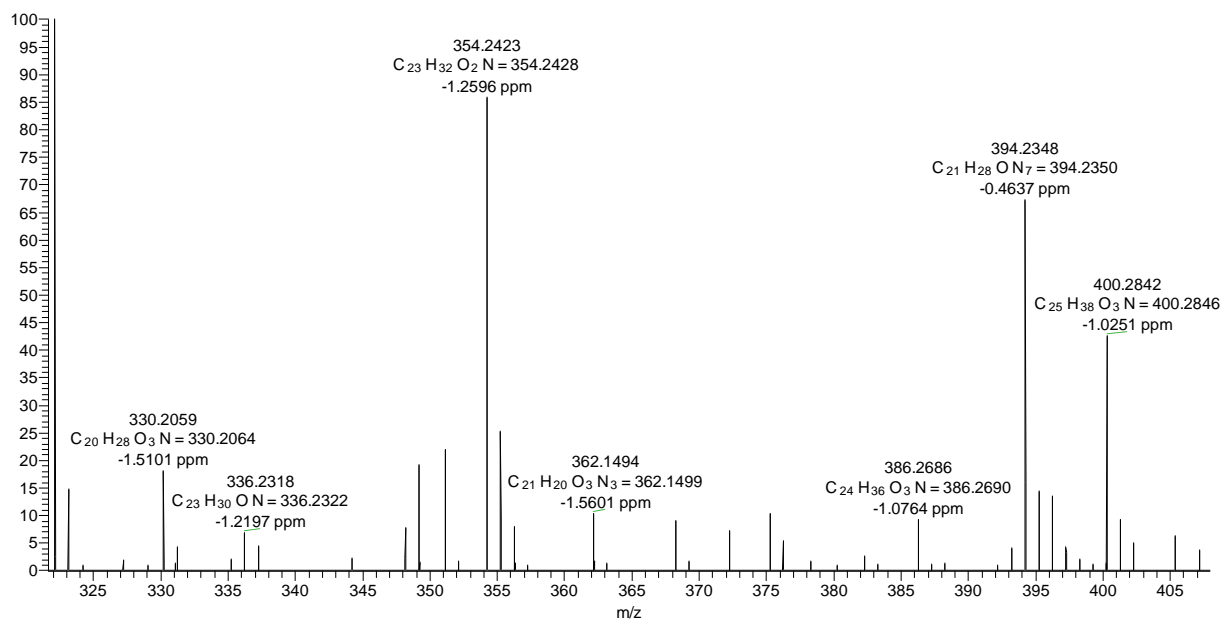


Figura 14 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (12).

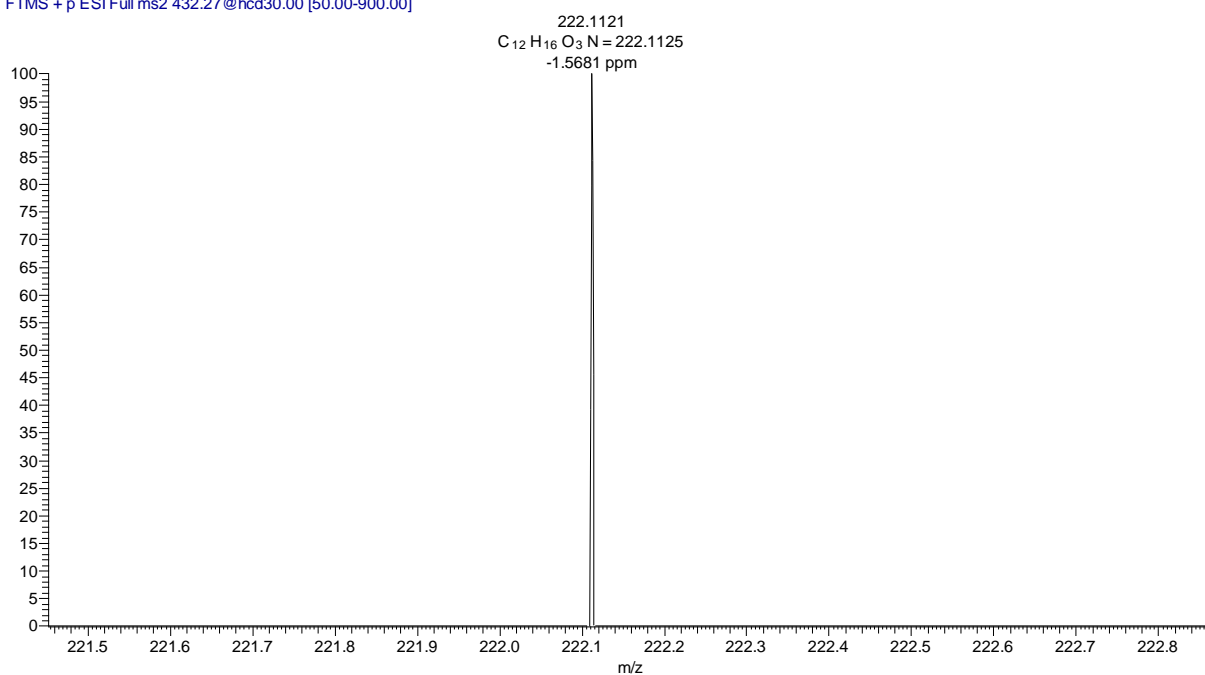
AC242_D1_PRM30_220219 #3238 RT: 14.43 AV: 1 NL: 1.24E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 432.27@hcd30.00 [50.00-900.00]



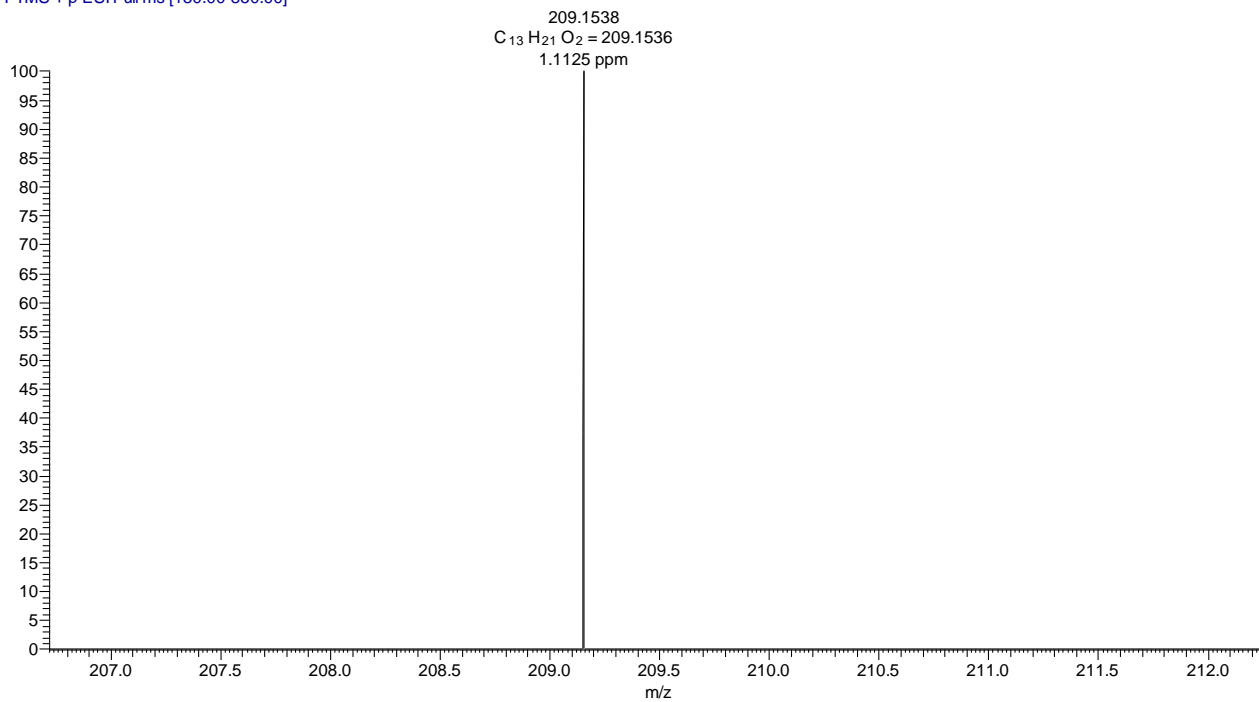
AC242_D1_PRM30_220219 #3239 RT: 14.43 AV: 1 NL: 2.36E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3238 RT: 14.43 AV: 1 NL: 5.62E3
T: FTMS + p ESI Full ms2 432.27@hcd30.00 [50.00-900.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3237 RT: 14.43 AV: 1 NL: 2.80E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3238 RT: 14.43 AV: 1 NL: 8.53E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 432.27@hcd30.00 [50.00-900.00]

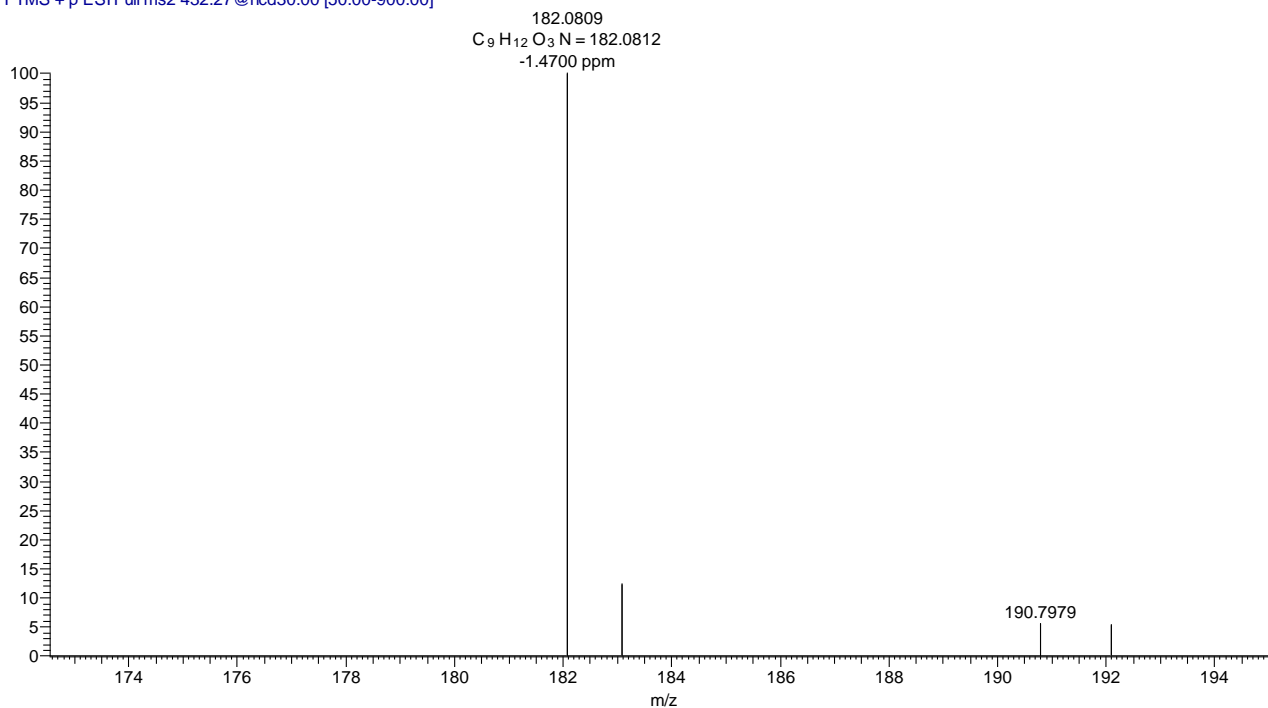
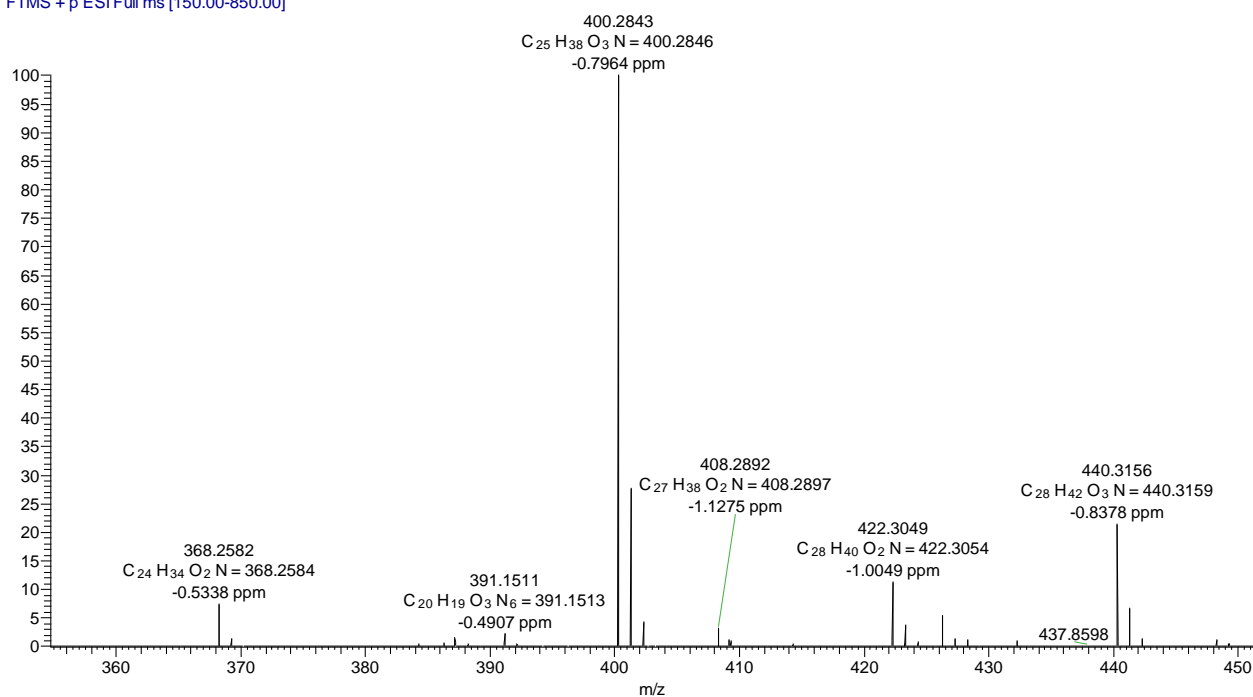


Figura 15 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (13).

AC242_D1_PRM30_220219 #3149 RT: 14.03 AV: 1 NL: 3.76E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3148 RT: 14.03 AV: 1 NL: 5.81E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 440.32@hcd30.00 [50.00-915.00]

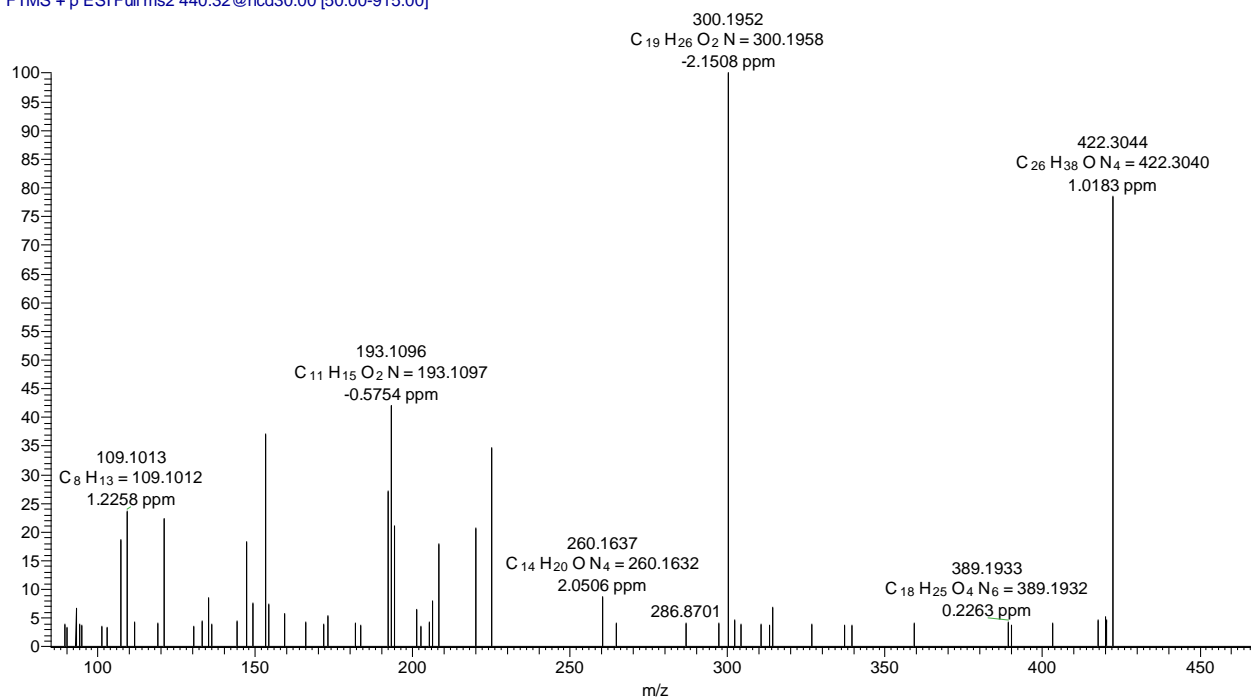
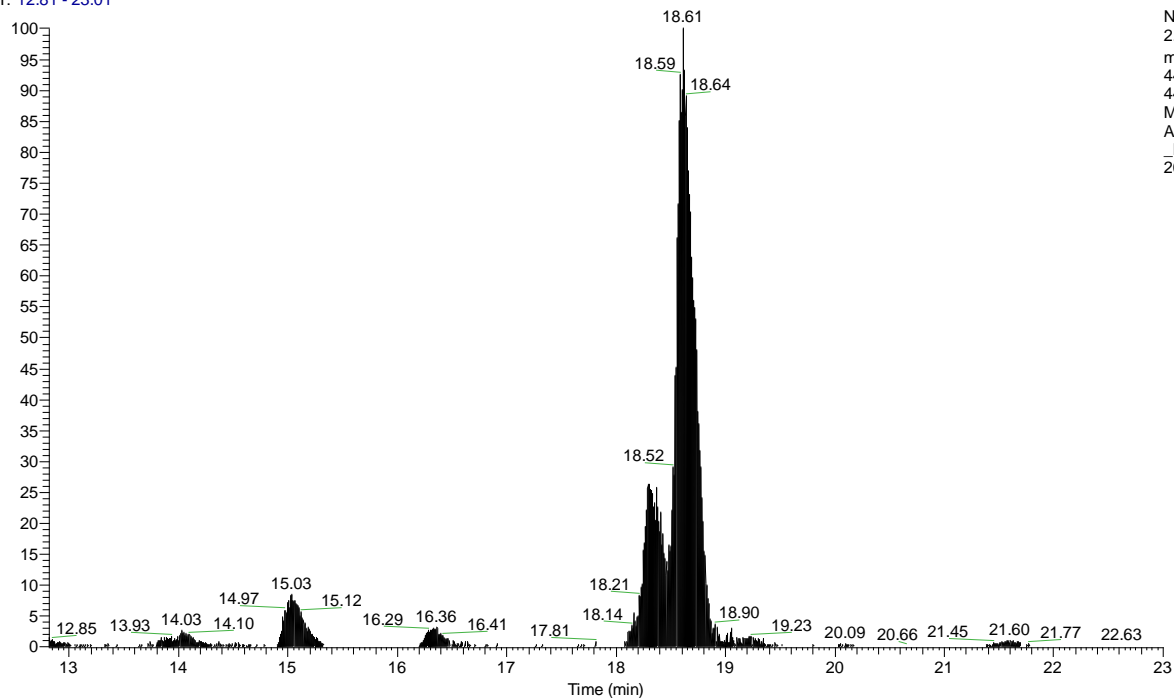


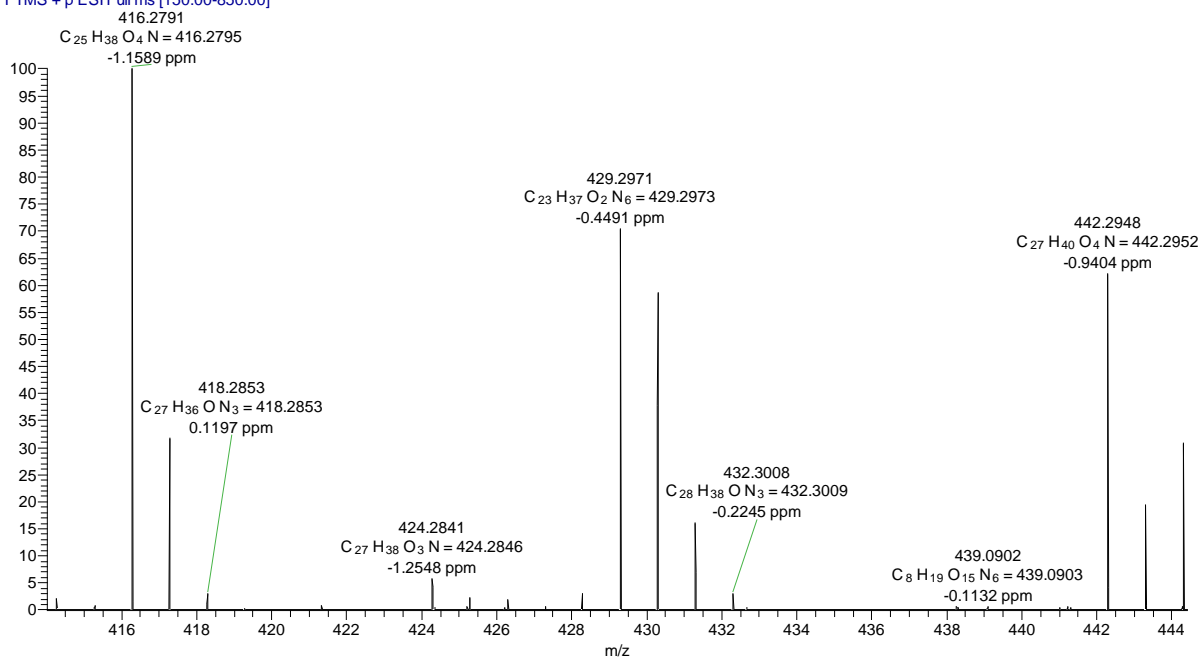
Figura 16 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (14).

RT: 12.81 - 23.01

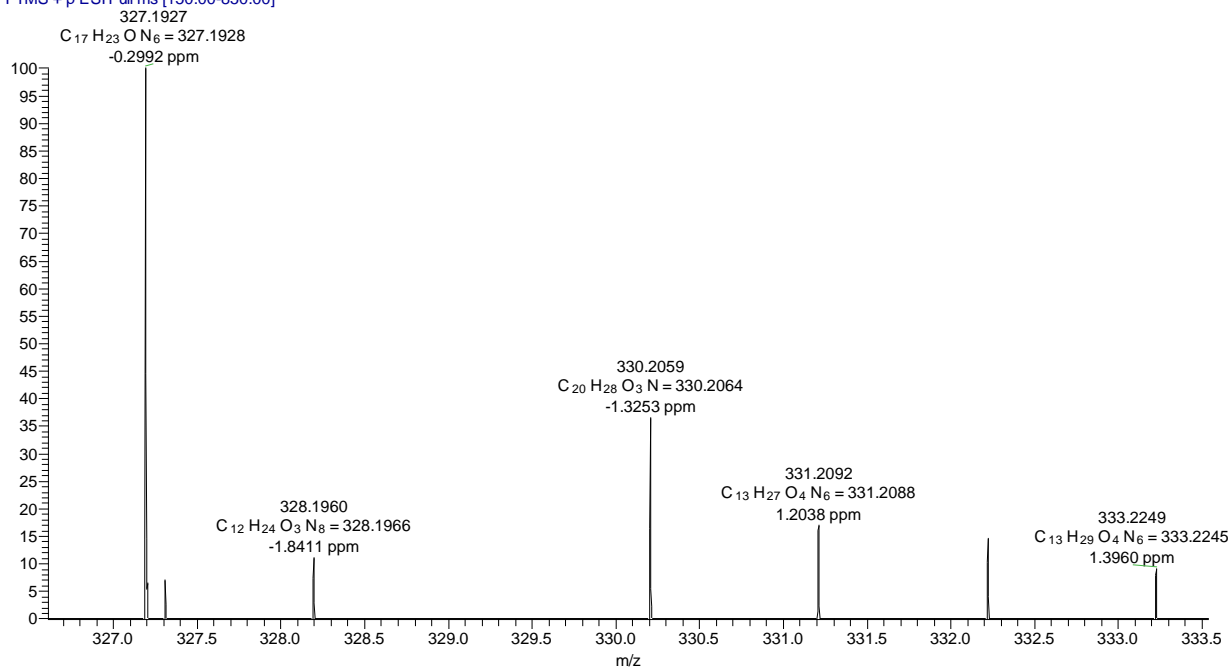


NL:
2.05E8
m/z=
441.77-
442.77
MS
AC242_D1
_PRM30_2
20219

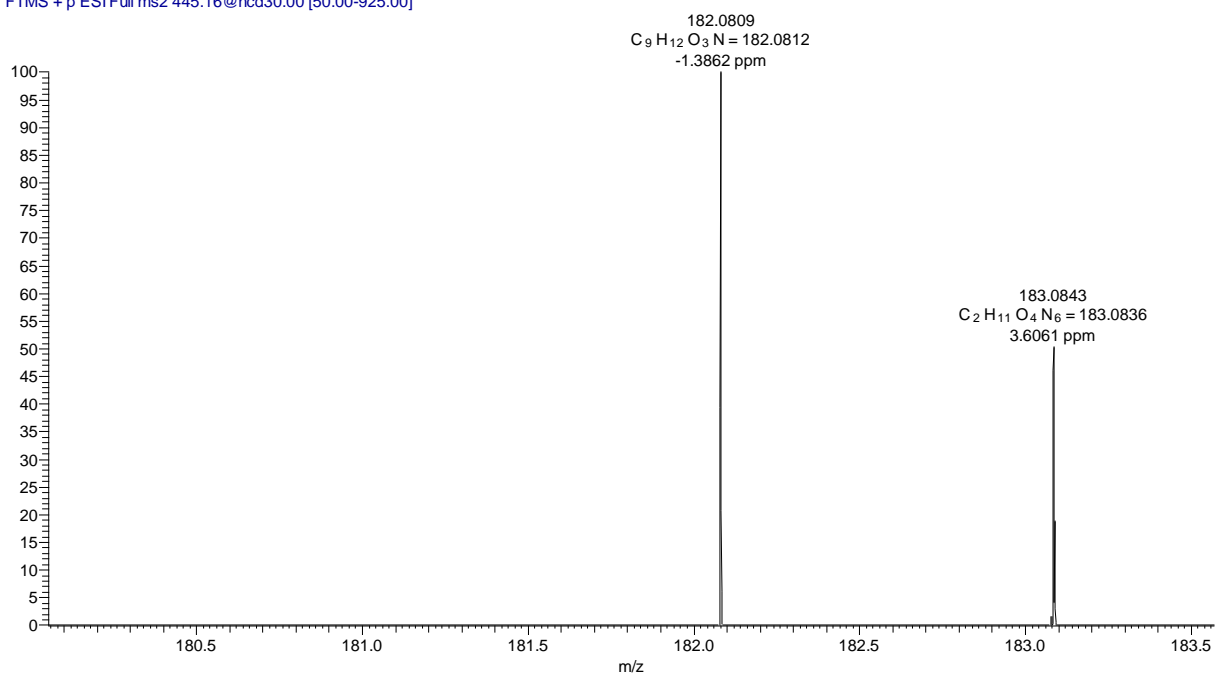
AC242_D1_PRM30_220219 #4207 RT: 18.75 AV: 1 NL: 1.22E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4207 RT: 18.75 AV: 1 NL: 6.78E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4208 RT: 18.75 AV: 1 NL: 2.12E5
T: FTMS + p ESI Full ms2 445.16@hcd30.00 [50.00-925.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4208 RT: 18.75 AV: 1 NL: 3.63E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 445.16@hcd30.00 [50.00-925.00]

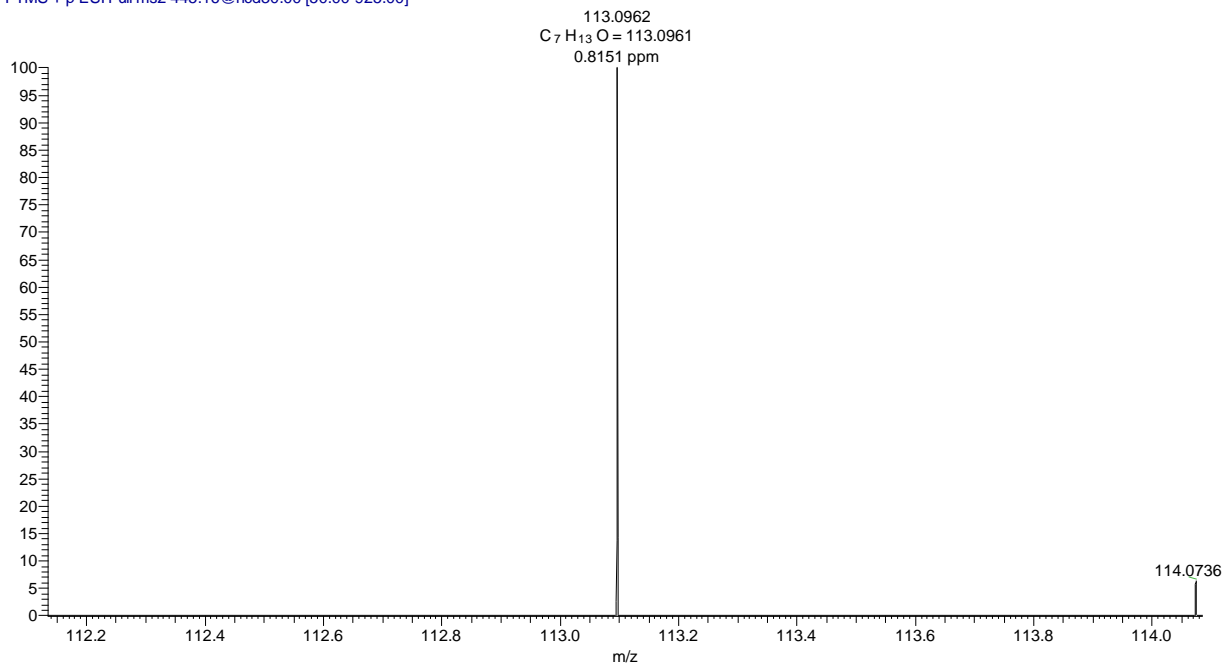
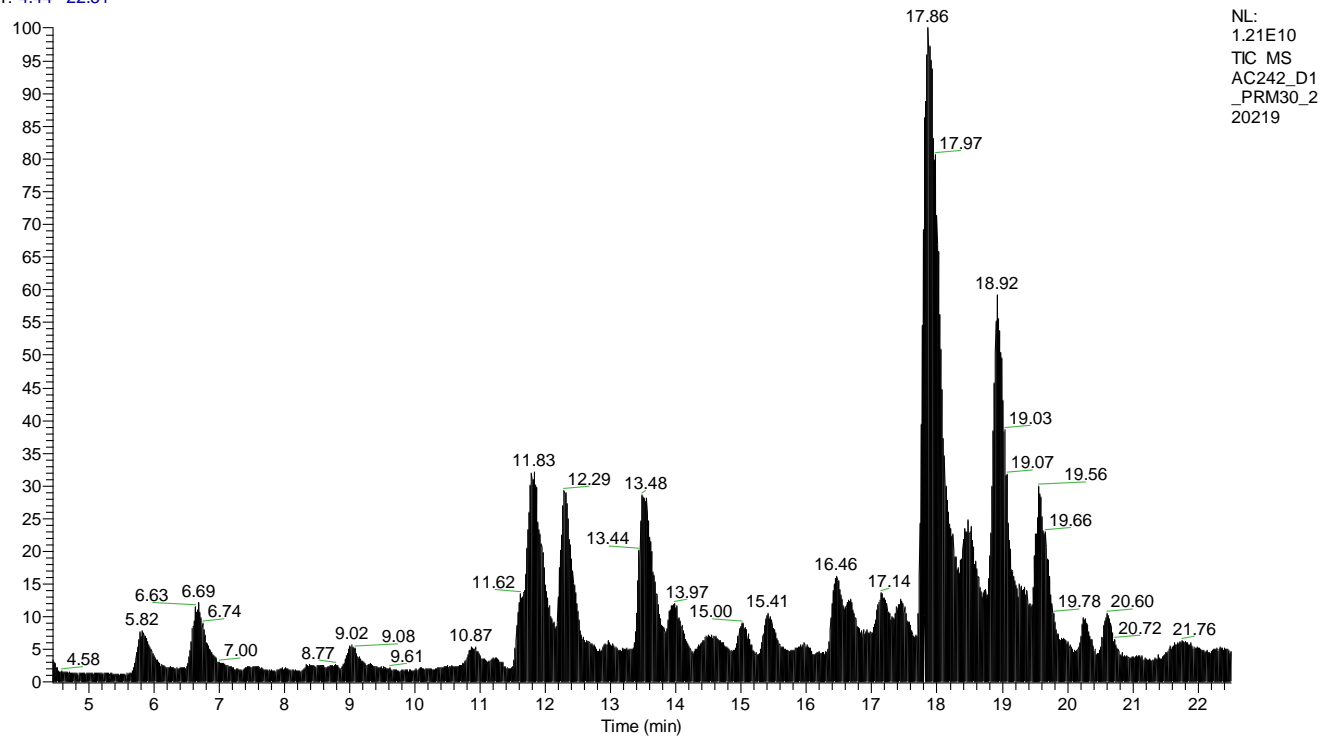
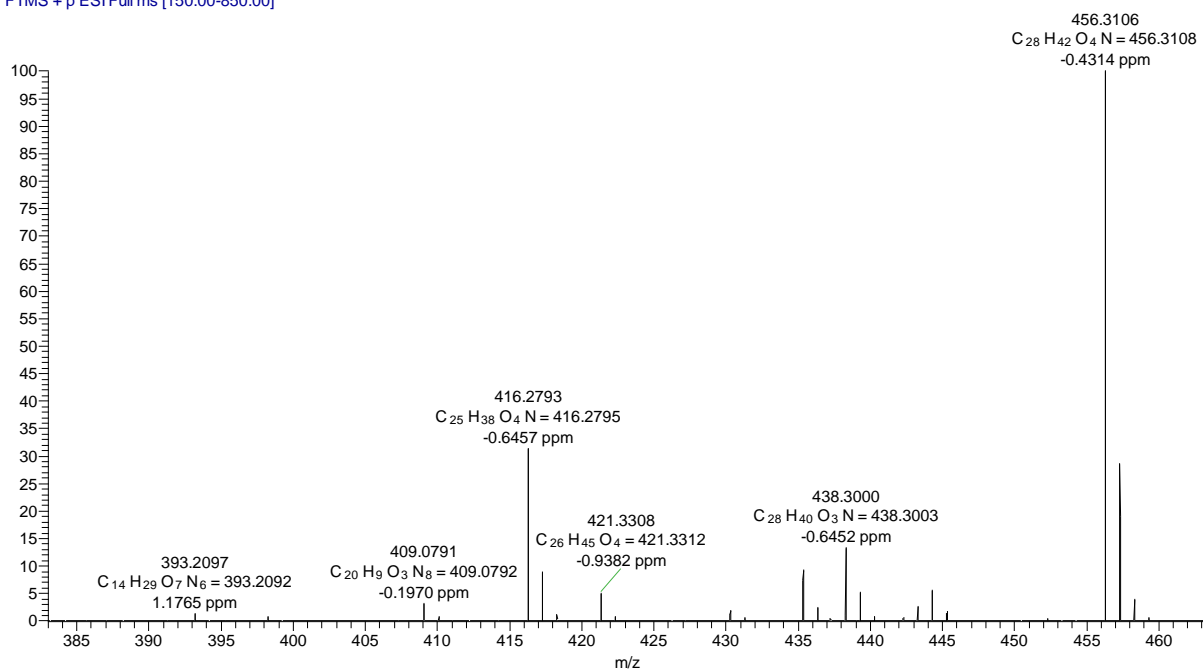


Figura 17 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (15).

RT: 4.44 - 22.51



AC242_D1_PRM30_220219 #4309 RT: 19.20 AV: 1 NL: 3.79E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #4308 RT: 19.20 AV: 1 NL: 2.22E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 456.31@hcd30.00 [50.00-950.00]

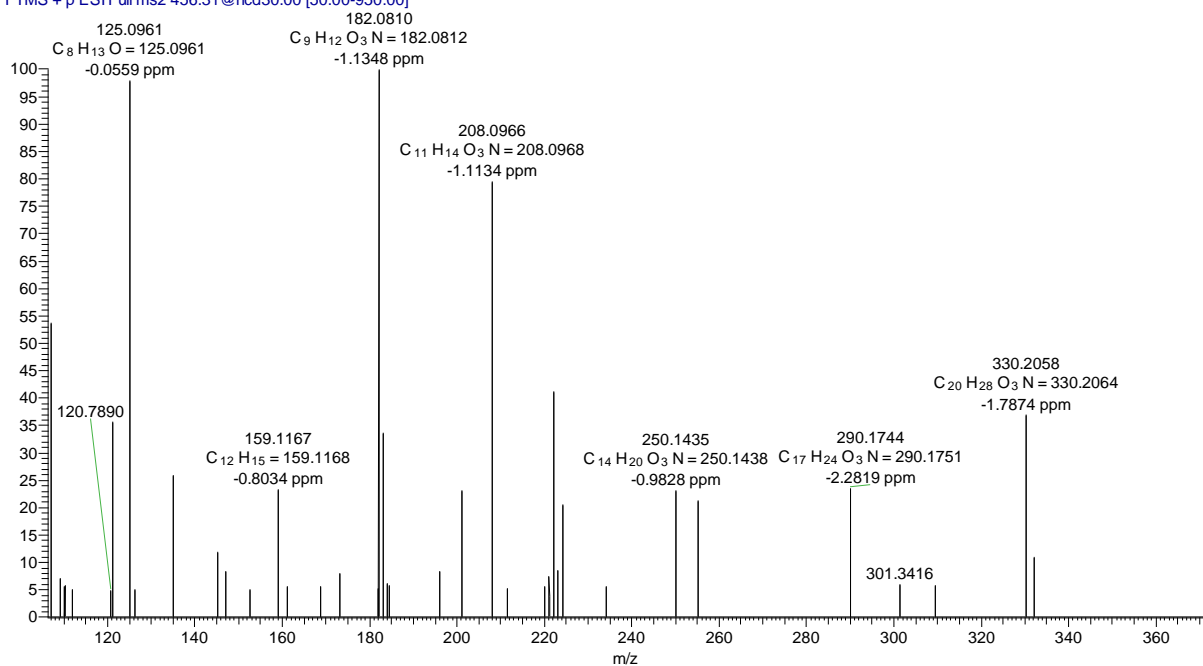
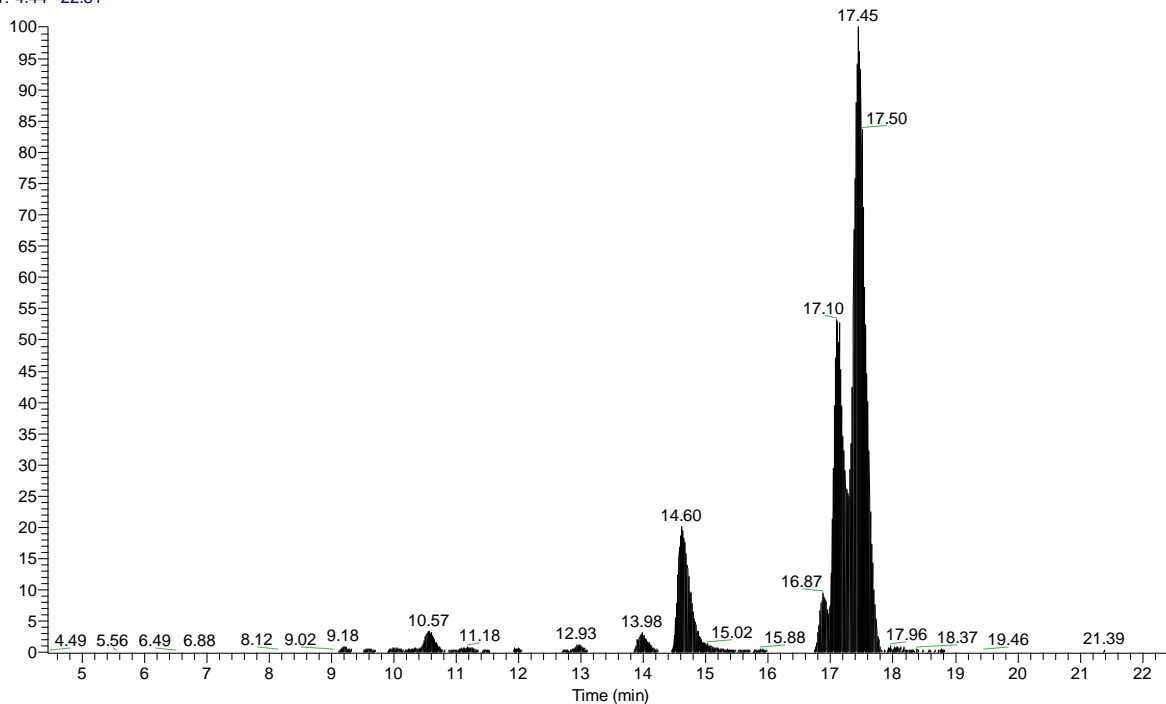


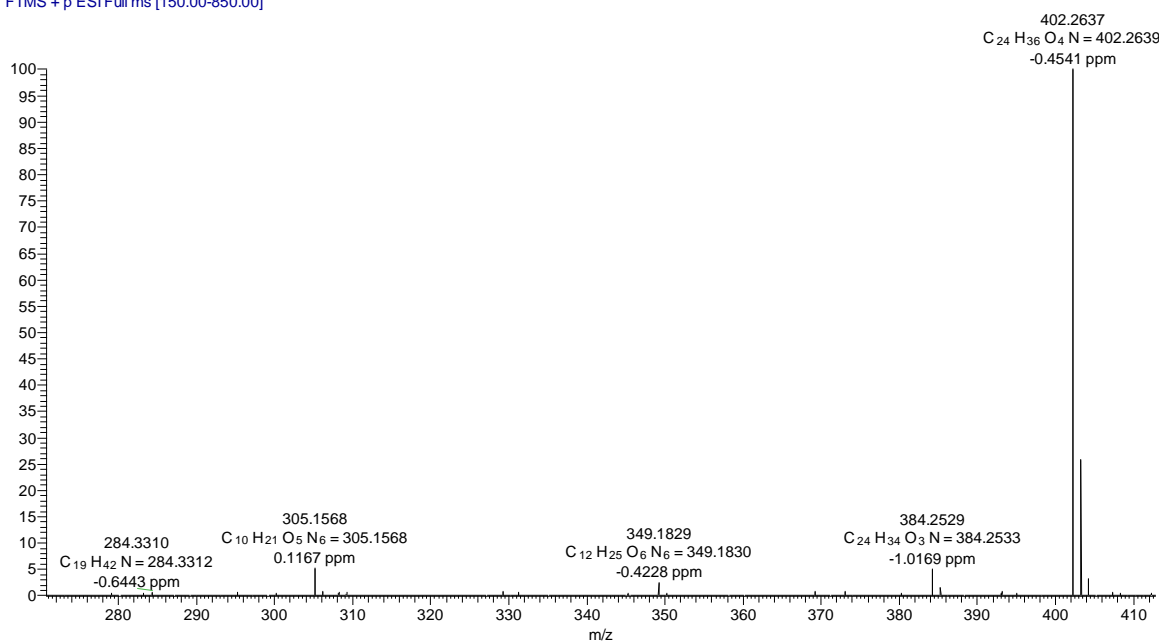
Figura 18 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (16).

RT: 4.44 - 22.51



NL:
7.30E8
m/z=
401.62-
402.62
MS
AC242_D1
_PRM30_2
20219

AC242_D1_PRM30_220219 #3893 RT: 17.35 AV: 1 NL: 3.09E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3894 RT: 17.35 AV: 1 NL: 6.14E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 402.26@hcd30.00 [50.00-840.00]

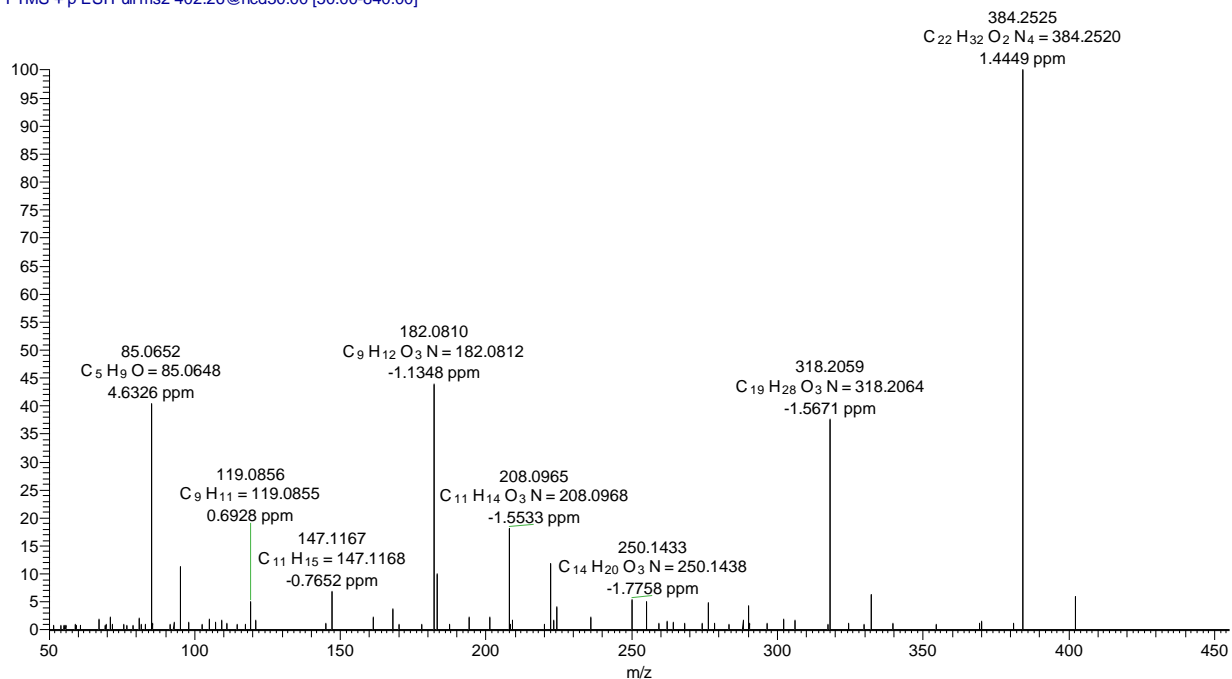
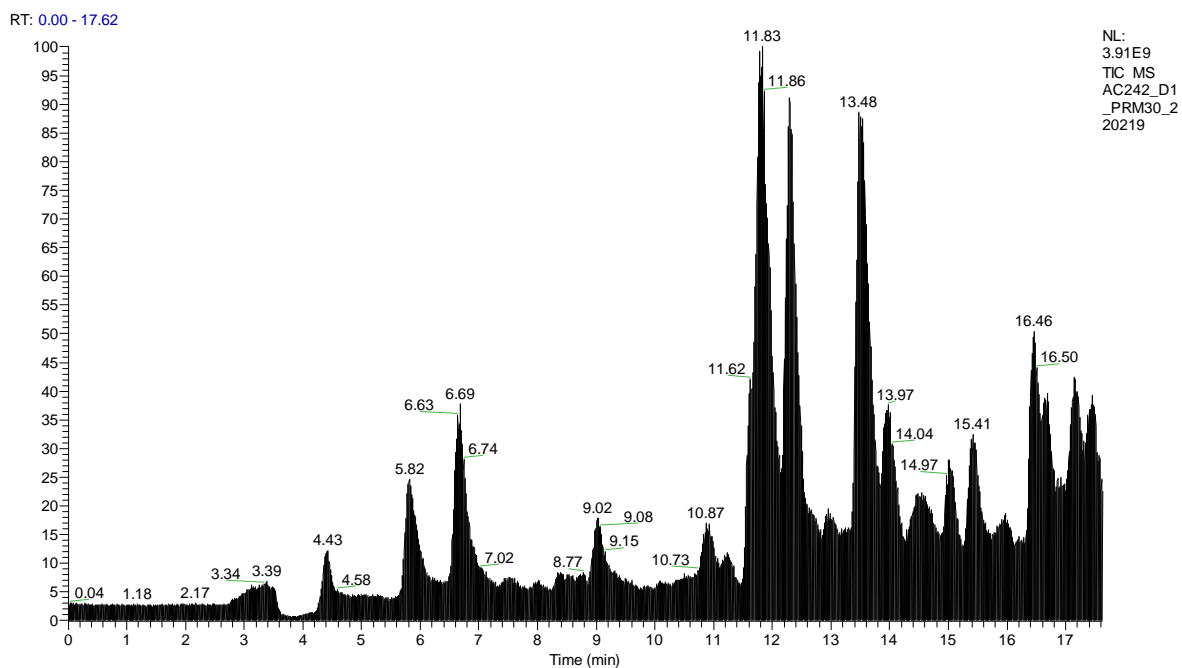
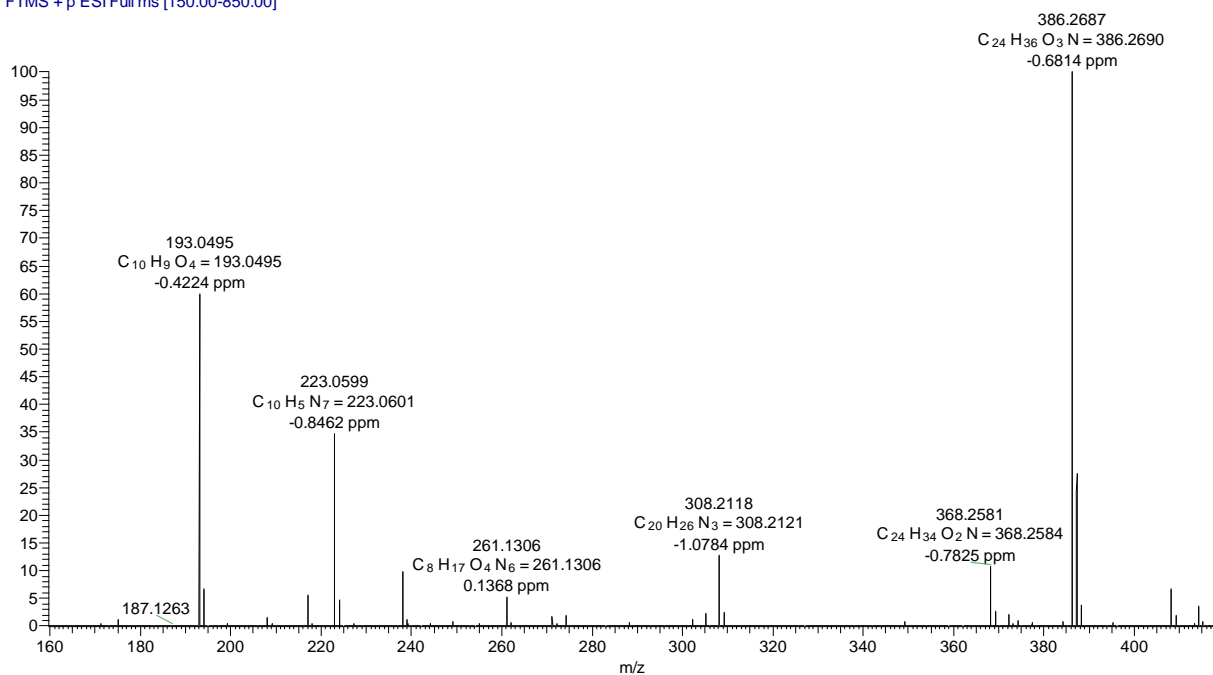


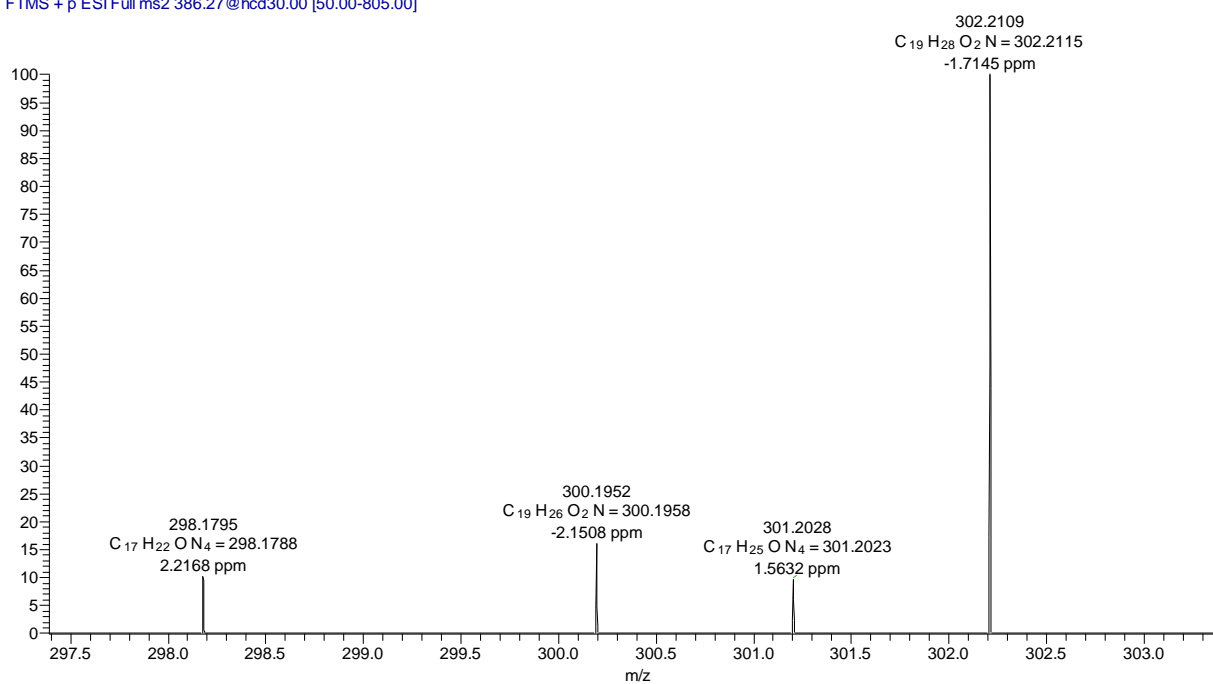
Figura 19 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (17).



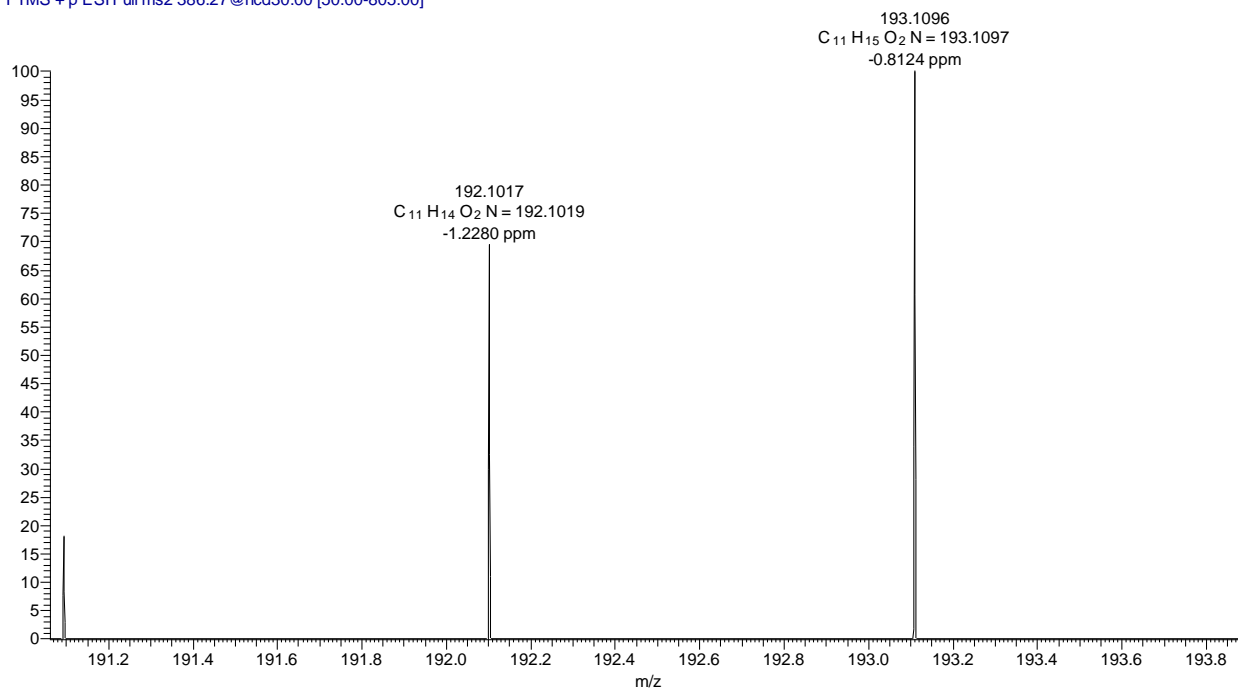
AC242_D1_PRM30_220219 #2735 RT: 12.19 AV: 1 NL: 3.53E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-850.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #2736 RT: 12.19 AV: 1 NL: 2.18E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 386.27@hcd30.00 [50.00-805.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #2736 RT: 12.19 AV: 1 NL: 1.33E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 386.27@hcd30.00 [50.00-805.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #2736 RT: 12.19 AV: 1 NL: 4.03E6
T: FTMS + p ESI Full ms2 386.27@hcd30.00 [50.00-805.00]

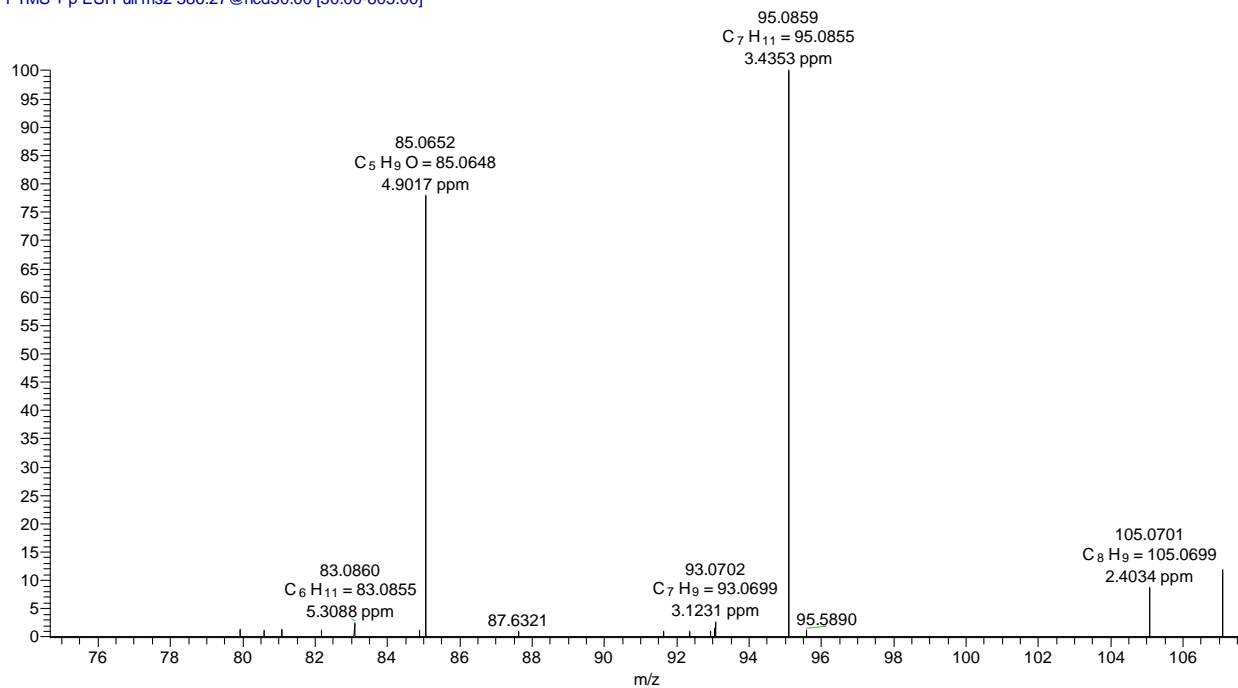
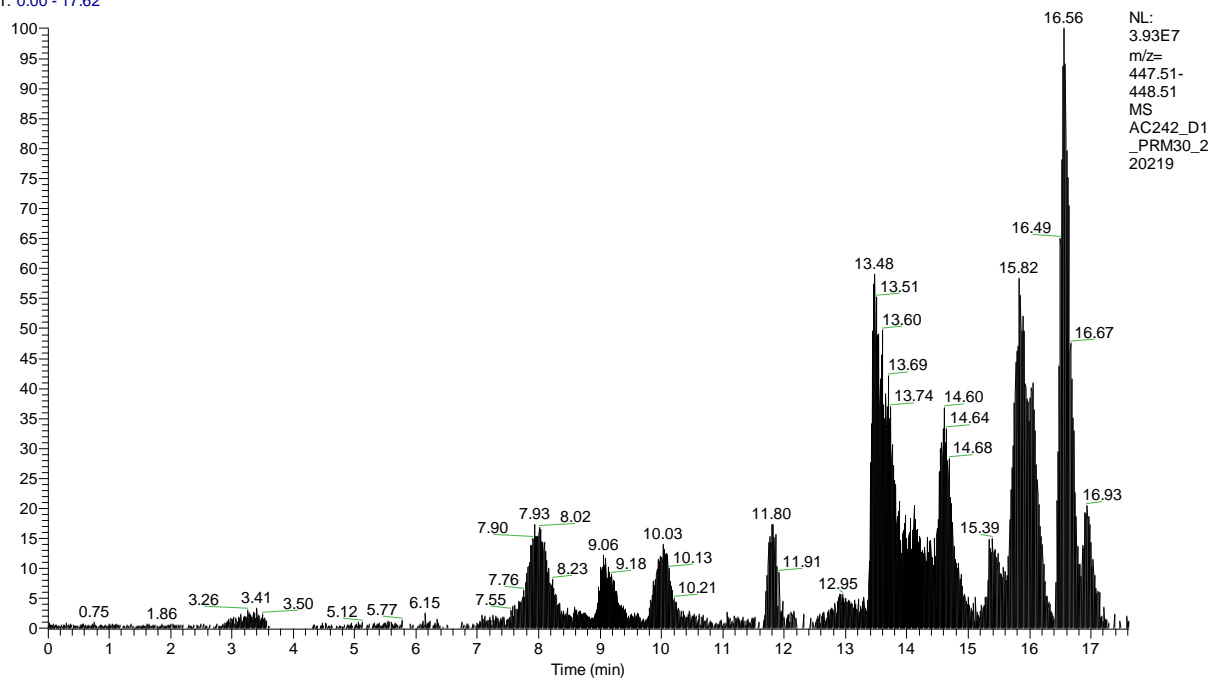


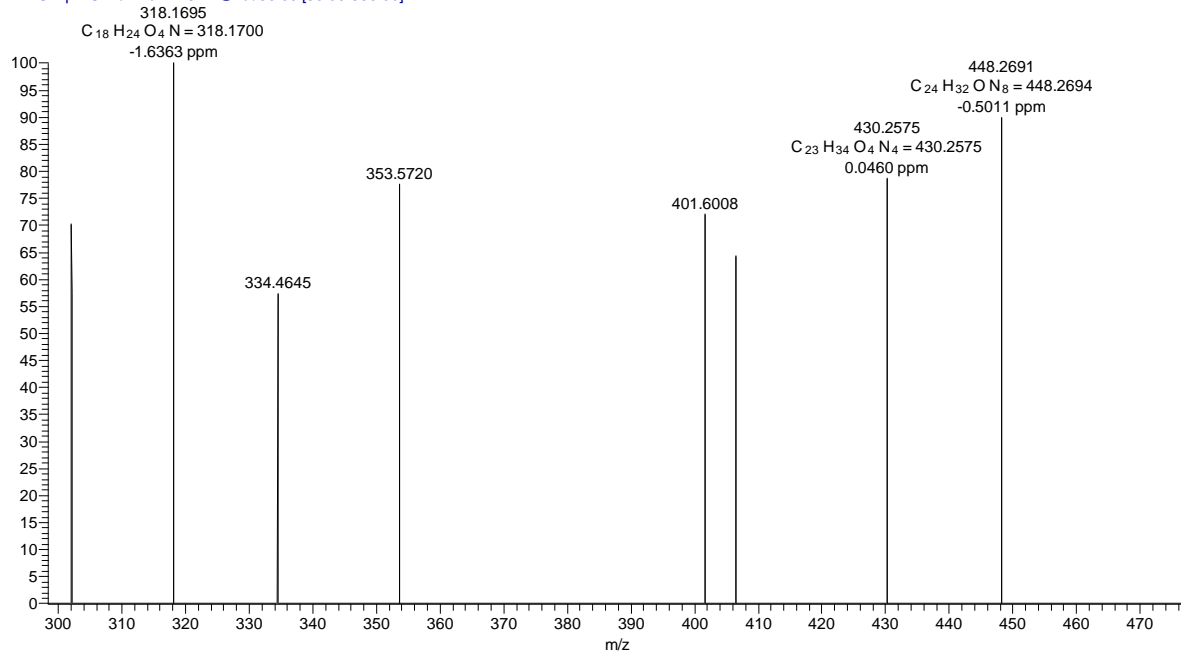
Figura 20 IS. Espectros de massas modo positivo dos fragmentos MS/MS de (18).

RT: 0.00 - 17.62

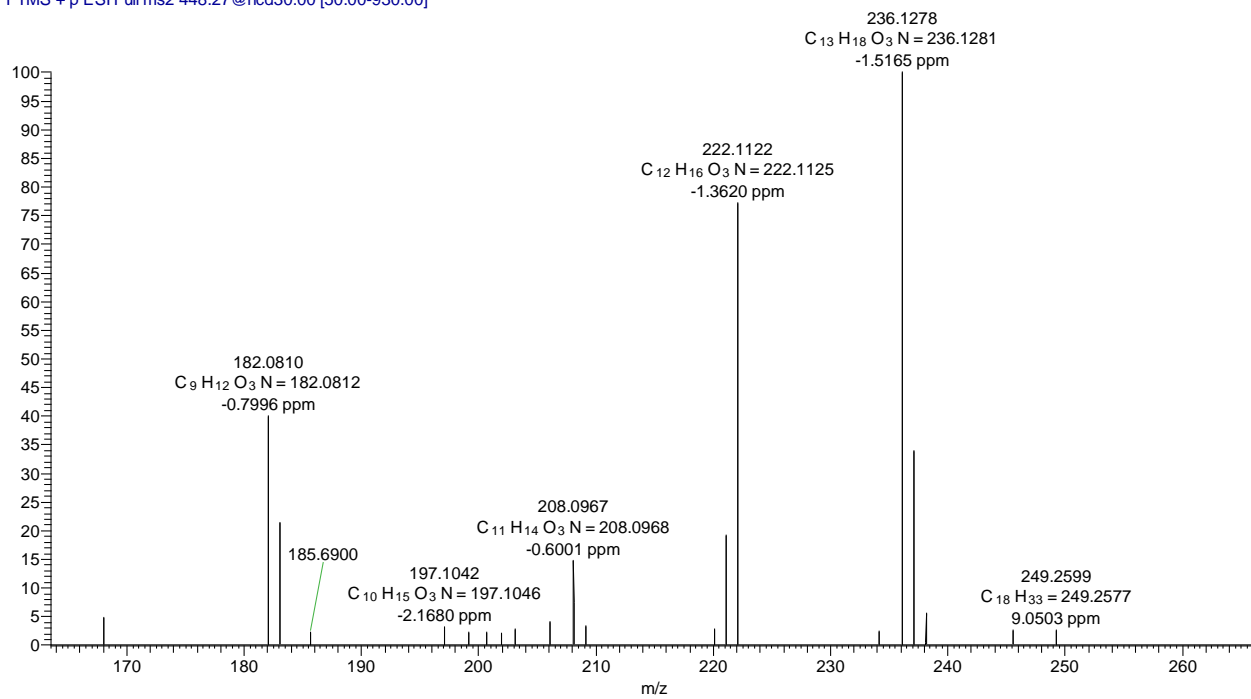


NL:
3.93E7
m/z=
447.51-
448.51
MS
AC242_D1
_PRM30_2
20219

AC242_D1_PRM30_220219 #3730 RT: 16.62 AV: 1 NL: 1.32E4
T: FTMS + p ESI Full ms2 448.27@hcd30.00 [50.00-930.00]



AC242_D1_PRM30_220219 #3730 RT: 16.62 AV: 1 NL: 3.33E5
T: FTMS + p ESI Full.ms2 448.27@hcd30.00 [50.00-930.00]



REFÊRENCIAS

- 1 Kim, Y.J.; Kim, J-H.; Rho, Jae-Y. Antifungal activities of *Streptomyces blastmyceticus* strain 12-6 against plant pathogenic fungi. **Microbiology**. p.1–6, 2019.
- 2 Mathurot, C.; Somporn C.; Saisamorn L. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **Journal of microbiology and biotechnology**. v.25(11), p. 1919–1928, 2009.
- 3 Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. (). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360(6390), p. 739–742, 2018.
- 4 Smaoui, S.; Ennouri, K.; Chakchouk-Mtibaa, A.; Sellem, I.; Bouchaala, K.; Karray-Rebai, I.; Mellouli, L. Statistical versus artificial intelligence -based modeling for the optimization of antifungal activity against *Fusarium oxysporum* using *Streptomyces sp.* strain TN71. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 28(3), p. 551– 560, 2018.
- 5 Kulkarni, M.; Gorthi, S.; Banerjee, G.; Chattopadhyay, Pritam. Production, characterization and optimization of actinomycin D from *Streptomyces hydrogenans* IB310, an antagonistic bacterium against phytopathogens. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 10, p. 69–74, 2017.
- 6 Liotti, R. G.; Silva Figueiredo, M. I.; Soares, M. A. *Streptomyces griseocarneus* R132 controls phytopathogens and promotes growth of pepper (*Capsicum annum*). **Biological Control**. 104065, 2019.
- 7 Yulong, L.; Fei H.; Qiao G.; Zhao Y. F.; Mian Z.; Chenglong J.; Quanhong X.; Hangxian L. Compositional and functional comparison on the rhizosphere microbial community between healthy and *Sclerotium rolfsii*-infected monkshood (*Aconitum carmichaelii*) revealed the biocontrol potential of healthy monkshood rhizosphere microorganisms, **Biological Control**. 104790, 2021.
- 8 Li, J. G.; Ren, G. D.; Jia, Z. J.; Dong, Y. H. Composition and activity of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased greenhouse tomatoes. **Plant and Soil**. v. 380, p. 337-347, 2014.
- 9 Kennedy, A. C.; Luna, L. Z. Rhizosphere. **Encyclopedia of Soils in the Environment**. p. 399–406, 2005.
- 10 Li, Y.L.; Guo, Q.; He, F.; Li, Y.Z.; Xue, Q.H.; Lai, H.X. Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by Actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota. **Microbial Ecology**. v. 79, p. 1-14, 2020.
- 11 Madigan M. T.; Martinko J. M. Biologie des microorganismes. **Pearson Education France**. p. 331-423, 2007.
- 12 Betancur, Lu. A.; Forero, A. M.; Vinchira-Villarraga, D. M.; Cárdenas, J. D.; Romero-Otero, A.; Chagas, F. O.; Pupo, M. T.; Castellanos, L.; Ramos, F. A. NMR-based metabolic profiling to follow the production of anti-phytopathogenic compounds in the culture of the marine strain *Streptomyces sp.* PNM-9. **Microbiological Research**. v. 239, 2020.

- 13 Kaaniche, F.; Hamed, A.; Elleuch, L.; Chakchouk-Mtibaa, A.; Smaoui, S.; Karray-Rebai, I.; Koubaa, I.; Arcile, G.; Allouche, N.; Mellouli, L. Purification and characterization of seven bioactive compounds from the newly isolated *Streptomyces cavourensis* tn638 strain via solid-state fermentation. **Microbial Pathogenesis**. v. 142, 2020.
- 14 Qi, D.F.; Zou, L.; Zhou, D.; Chen, Y.; Gao, Z.; Feng, R.; Zhang, M.; Li, K.; Xie, J.; Wang W. Taxonomy and broad spectrum antifungal activity of a rare actinomycete sca3-4 isolated from cactus rhizosphere. **Front. Microbiol.** v. 10, 2019.
- 15 We,i Y.; Zhao, Y.; Zhou, D. Q. D.; Li, K. T. W.; Chen, Y.; Jing, T.; Zang, X.; Xie, J.; Wang, W. A newly isolated *Streptomyces* sp. yys-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **Front. Microbiol.** v.11, 2020.
- 16 Sharma, V. Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture molecular aspects of biocontrol species of streptomyces in agricultural crops. p. 89–109, 2020.
- 17 Kwon, J. H.; Kim, J., Kim, W. I.; First report of *Rhizopus oryzae* as a postharvest pathogen of apple in Korea. **Mycobiology**. v.39, p. 140–142, 2011.
- 18 Yang, P. W.; Li, M. G.; Zhao, J. Y.; Zhu, M. Z.; Shang, H.; Li, J. R.; Cui, X. L.; Huang, R.; Wen, M. L. Oligomycins A and C, major secondary metabolites isolated from the newly isolated strain *Streptomyces diastaticus*. **Folia Microbiologica**, v. 55, p. 10–16, 2010.
- 19 Wubshe, G. Y.; Johansen, K. T.; Nyberg, N. T.; Jaroszewski, J.W.; Direct ¹³C NMR detection in HPLC hyphenation mode: Analysis of *Ganoderma lucidum* terpenoids, **J. Nat. Prod**, v. 75, p. 876-882, 2012.
- 20 Landreau, A.; S. Bertrand, C.; Simoes-Pires, L.; Marcourt, D. B.; Tai, M.; Litaudon, D.; Guilet, P.; Richomme, P. A.; Carrupt, P-J.; Wolfender J-L. Normal phase HPLC-based activity profiling of non polar crude plant extracts—acetylcholinesterase inhibiting guttiferones from *Montrouziera cauliflora* as a case study. **Nat. Prod. Res.** v. 30, p. 2754-2759, 2016.
- 21 Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking, **Nat. Biotechnol.** v. 34, p. 828-837, 2016.
- 22 Prapagdee, B.; Kuekulvong, C.; Mongkolsuk, S. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 5, p. 330–337, 2008.
- 23 Chagas, F. O.; Dias, L. G.; Pupo, M. T. A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides. **Journal Chemistry Ecology**. v.39, p. 1335–1342, 2013.
- 24 Costa, J. H.; Wassano, C. I.; Angolini, C. F. F.; Scherlach, K.; Hertweck, C.; Pacheco Fill, T. Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. **Scientific Reports**. v. 9, 2019.
- 25 Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v. 33, p. 1870-1874, 2016.

- 26 Hall T, 2012. BioEdit v7.2.5: Biological sequence alignment editor for Win95/98/2K/XP/7. Available at <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Accessed 13 September 2018.
- 27 Acharya, S.; Patra D. K.; Pradhan C.; Kumar M. P. Anti-bacterial, anti-fungal and anti-oxidative properties of different extracts of *Bruguiera gymnorrhiza* L. (Mangrove), **European Journal of Integrative Medicine**. v. 36, 2020.
- 28 Simionato A. S.; Navarro M. O. P.; Jesus, M. L. A.; Barazetti A. R.; Silva, C. S.; Simões G. C.; Balbi-Peña M. I.; Mello J. C. P.; Panagio, L. A.; Almeida R. S. C.; Andrade, G.; Oliveira A. G. The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. **Front. Microbiol.** v. 8, 2017.
- 29 Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Luzzatto-Knaan, T. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**. V. 34, p. 828–837, 2016.
- 30 Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K.; & Wolfender, J. L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**. V. 32, p. 1180–1204, 2014.
- 31 Shabir, G.; Saeed, A.; El-Seedi, H. R. Natural isocoumarins: Structural styles and biological activities, the revelations carry on **Phytochemistry**. v.181, 112568, 2021.
- 32 Noor, A. O.; Almasri, D. M.; Bagalagel, A. A.; Abdallah, H. M.; Mohamed, S. G. A.; Mohamed, G. A.; & Ibrahim, S. R. M. Naturally Occurring Isocoumarins Derivatives from Endophytic Fungi: Sources, Isolation, Structural Characterization, Biosynthesis, and Biological Activities. **Molecules**. v. 25(2), 2020.
- 33 Wu, Z.; Chen, J.; Zhang, X.; Chen, Z.; Li, T.; She, Z.; Li, C. Four New Isocoumarins and a New Natural Tryptamine with Antifungal Activities from a Mangrove Endophytic Fungus *Botryosphaeria ramosa* L29. **Marine Drugs**. v. 17(2), 88, 2019.
- 34 Wu, C.; Zhu, H.; van Wezel, G. P.; & Choi, Y. H. Metabolomics-guided analysis of isocoumarin production by *Streptomyces* species MBT76 and biotransformation of flavonoids and phenylpropanoids. **Metabolomics**. v. 12(5), 2016.
- 35 Ruanpanun, P.; Laatsch, H.; Tangchitsomkid, N.; Lumyong, S. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 27, p.1373–1380, 2010.
- 36 Lai, D.; Li, J.; Zhao, S.; Gu, G.; Gong, X.; Proksch, P.; Zhou, L. Chromone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Xylomelasma* sp. Samif07, and their antibacterial and antioxidant activities. **Natural Product Research**, p. 1–5, 2019.
- 37 Wu, Z.; Chen, J.; Zhang, X.; Chen, Z.; Li, T.; She, Z.; Li, C. Four New Isocoumarins and a New Natural Tryptamine with Antifungal Activities from a Mangrove Endophytic Fungus *Botryosphaeria ramosa* L29. **Marine Drugs**. v. 17(2), 2019.
- 38 Zhou, X.; Fenical, W. The unique chemistry and biology of the piericidins. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, p. 582–593, 2016.

- 39 Li, Y.; Kong, L.; Shen, J.; Wang, Q.; Liu, Q.; Yang, W.; You, D. (2019). Characterization of the positive SARP family regulator PieR for improving piericidin A1 production in *Streptomyces piomogeues* var. *Hangzhouwanensis*. **Synthetic and Systems Biotechnology**. v. 4, p. 16–24, 2019.
- 40 Takahashi, N.; Suzuki, A.; Miyamoto, S.; Tamura, S.; Mori, R. Chemical structure of piericidin A. 1. Functional groups. **Agr. Biol. Chem.** v. 27, p. 583–589, 1963.
- 41 Takahashi, N.; Suzuki, A.; Tamura, S. Structure of piericidin A. **J. Am. Chem. Soc.** V. 87, p. 2066–2068, 1965.
- 42 Urakawa, A.; Sasaki, T.; Yoshida, K.I.; Otani, T.; Lei, Y.; & Yun, W. IT-143-A and B, novel piericidin group antibiotics produced by *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.** v. 49, p. 1052–1055, 1996.
- 43 Hayakawa, Y.; Shirasaki, S.; Shiba, S.; Kawasaki, T.; Matsuo, Y.; Adachi, K.; & Shizuri, Y. Piericidins C7 and C8, new cytotoxic antibiotics produced by a marine *Streptomyces* sp. **J. Antibiot.** V.60, p. 196–200, 2007.
- 44 Takahashi, N.; Suzuki, A.; Kimura, Y.; Miyamoto, S.; Tamura, S. Structure of piericidin B and stereochemistry of piericidins. **Tetrahedron Lett.** v. 8, p. 1961–1964, 1967.
- 45 Yoshida, S.; Yoneyama, K.; Shiraishi, S.; Watanabe, A.; Takahashi, N. Chemical Structures of New Piericidins Produced by *Streptomyces pactum*. **Agricultural and Biological Chemistry**. V. 41, p. 855–862, 1977.
- 46 Kroiss, J.; Kaltenpoth, M.; Schneider, B.; Schwinger, M.G.; Hertweck, C.; Maddula, R. K.; Svatoš, A. Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. **Nature Chemical Biology**. v. 6(4), p. 261–263, 2010.
- 47 Kubota, N. K.; Ohta, E.; Ohta, S.; Koizumi, F.; Suzuki, M.; Ichimura, M.; Ikegami, S. Piericidins C5 and C6: new 4-pyridinol compounds produced by *Streptomyces* sp. and *Nocardioides* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 4569–4575, 2003.
- 48 Kominato, K.; Watanabe, Y.; HIRANO, S.I.; Kioka, T.; Terasawa, T.; Yoshioka, T.; Tone, H. Mer-A2026A and B, Novel Piericidins with Vasodilating Effect. II. Physico-Chemical Properties and Chemical Structures. **The Journal of Antibiotics**. v. 48, p. 103–105, 1995.

APÊNDICE A -LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Culturas de cepas de <i>Streptomyces</i> sp.	14
Figura 1- Growth inhibition (%) of <i>C. musae</i> by volatile organic compounds (VOCs) produced by the twenty actinobacteria strains assayed.	33
Figura 2- Phylogenetic tree inferred by maximum parsimony (MP) of data from the 16S genomic region of the rDNA for sequences of the genera <i>Amycolatopsis</i> and <i>Streptomyces</i> . Bootstrap values (> 70%) with 1000 repetitions are shown in the respective branch. <i>Bifidobacterium mongoliense</i> was used as an external group. The sequences in this study are highlighted in bold.	34
Figura 3- Results from the antifungal activity of <i>Streptomyces</i> sp. (ACTB-77) and <i>Amycolatopsis</i> sp. (ACTB-290) against <i>C. musae</i>	35
Figura 4- SEM imaging (20 μ M) of <i>C. musae</i> hyphae in the fifth day of experiment: (A) under axenic culture (control); (B) in co-culture with <i>Streptomyces</i> sp.; (C) in co-culture with <i>Amycolatopsis</i> sp.	36
Figura 5- Results from the antifungal activity of <i>Amycolatopsis</i> sp. (ACTB-290) against: (A) <i>Lasioidiplodia viticola</i> ; (B) <i>L. brasiliensis</i> -2253; (C) <i>L. brasiliensis</i> -2248; (D) <i>L. theobromae</i> ; (E) <i>Colletotrichum brevisporum</i> . Fungus strain under axenic culture is the control experiment.	38
Figura 6- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples of ACTB-77 (red), <i>C. musae</i> (dark blue) and the co-culture (light blue).	45
Figura 7- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples of ACTB-290 (dark blue), <i>C. musae</i> (dark red) and the co-culture (light orange, dark orange and green).	47
Figura 8- Scores (a) and loadings (b) graphs obtained by PC1 and PC2 for the samples ACTB-77 (dark red), ACTB-290 (dark blue), <i>C. musae</i> (cyan) and co-cultures ACTB-77/ <i>C. musae</i> (green) and ACTB-290/ <i>C. musae</i> (light blue). Scores (c) and loadings (d) graphs obtained by PC1 and PC3 for the same samples.	48
Figura 1- Representação da metodologia de triagem de actinobactérias produtoras de metabólitos secundários com potencial antifúngico.	87
Figura 2- Distância de inibição entre micro-organismos antagonicos pelo método de culturas pareadas (cultivo direto).	93
Figura 3- Atividade antifúngica de extratos de <i>Streptomyces</i> sp. (ACTB-242) a concentração de 0,5mg/mL.	95
Figura 4- Árvore filogenética inferida por máxima parcimônia (MP) de dados da região genômica 16S do rDNA para sequências do gênero <i>Streptomyces</i> . Os valores de bootstrap com 1000 repetições são mostrados no respectivo ramo. <i>Amycolatopsis roodepoortensis</i> foi usado como grupo externo. A sequência deste estudo está destacada em negrito.	95
Figura 5- Gráficos da relação crescimento do fungo (<i>C. Musae</i>) \times tempo de incubação com diferentes concentrações do extrato de <i>Streptomyces</i> sp (ACTB-242) a diferentes condições de	

extração (A) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-SR, (B) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-XAD16N e (C) Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato ACTB-242-HP20.....	98
Figura 6- Cromatogramas dos extratos AcOEt obtidos do cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. ACTB-242 sem resinas (A) e com XAD16N (B) e HP20 (C).....	98
Figura 7- Redes moleculares de dados de MS/MS obtidos a partir dos extratos de <i>Streptomyces</i> sp, modo negativo e positivo usando um corte de similaridade de cosseno de 0,7.....	99
Figura 8- Representação estrutural da isocumarina (1).	100
Figura 9- Rede molecular dos compostos (Cluster A) para o modo negativo ionização com anotações do GNPS dos íons de massa precursora m/z 191,03397 e m/z 221.0449.	101
Figura 10- Comparação dos espectros de fragmentos de m/z 221,0449 anotado como Reticulol com cosseno de 0,88 com espectro referência da biblioteca do GNPS. O espectro superior (amostra) e o espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).....	103
Figura 11- Estrutura dos Compostos da classe das isocumarinas identificados no modo negativo de ionização.	104
Figura 12- Rede molecular dos compostos (Cluster B) para o modo positivo de ionização com anotação pelo GNPS da piericidina A, íon de massa precursora m/z 416,2792.....	105
Figura 13- Comparação dos espectros de fragmentos de m/z 416,2792 anotado como piericidina A com cosseno de 0.75, com espectro referência da biblioteca do GNPS. O espectro superior (amostra) e o espectro inferior (referência da biblioteca do GNPS).	106
Figura 14- Estrutura dos compostos da classe das piericidinas identificados no modo positivo de ionização.	111

APÊNDICE B -LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Exemplos de compostos com atividade antifúngica isolados do gênero <i>Streptomyces</i> ..	15
Tabela 2- Exemplos de compostos biativos isolados de espécies do gênero <i>Amycolatopsis</i>	17
Table 1- Actinobacteria strains isolated from Caatinga plants and their respective geographic locations.....	27
Table 2- Volatile organic compounds (VOCs) produced by the rhizosphere actinobacteria <i>Streptomyces sp.</i> (ACTB-77) and <i>Amycolatopsis sp.</i> (ACTB-290) strains, and the phytopathogen fungus <i>Colletotrichum musae</i> (CM) under axenic and co-culture conditions. RI: retentindex; Compounds listed and numbered (column Nr.) by crescent order of their RI.....	40
Tabela 1- Fracionamento cromatográfico do extrato ACTB-242-HP-20-2.....	90
Tabela 2- Dados espectrais de RMN 1H e 13C (CD3OD, 300 e 75 MHz) de (1).....	100
Tabela 3- Compostos identificados por UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking no modo negativo de ionização.....	104
Tabela 4- Compostos identificados por UHPLC-MS/MS associado a redes moleculares networking no modo positivo de ionização.	109