

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOMICETOS CONTRA
***BOTRYTIS CINEREA*, PATÓGENO DA VIDEIRA (*VITIS SP*)**

Sibele Ribeiro de Oliveira

Recife – 2004

Sibele Ribeiro de Oliveira

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE ACTINOMICETOS CONTRA
BOTRYTIS CINEREA, PATÓGENO DA VIDEIRA (*VITIS SP*)**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de concentração: Microbiologia aplicada

Orientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Alda de Andrade Chiappeta

Prof^ª. Dr^ª. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Recife – 2004

Oliveira, Sibebe Ribeiro de
Atividade antagonística de actinomicetos contra
Botrytis cinerea, patógeno da videira (*Vitis* sp.) /
Sibebe Ribeiro de Oliveira. – Recife : O Autor, 2004.
vii, 60 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2004.

Inclui bibliografia e anexo.

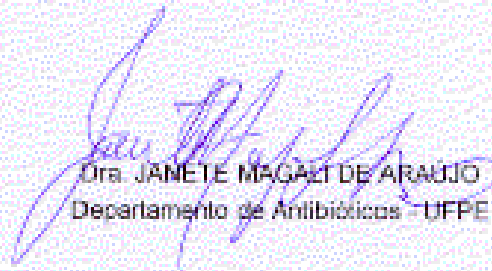
1. Atividade antifúngica – Actinomicetos –
Controle biológico. 2. Fungos (*Botrytis cinerea*) –
Atividade antagonística. 3. Mofo cinzento – Videira (*Vitis*
sp.). 4. Resíduos industriais – Produção de
antibiótico. I. Título.

579.6:582.288	CDU (2.ed.)	UFPE
660.63	CDD (21.ed.)	BC2004-210


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR SIBELE RIBEIRO DE OLIVEIRA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.


DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 06 DE FEVEREIRO DE 2004 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. JANETE MAGALHÃES DE ARAÚJO
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. ELZA ÁUREA DE LUNA ALVES LIMA
Departamento de Micologia - UFPE



Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA
Pesquisadora DCR/CNPq

***“Que os esforços superem as impossibilidades,
pois as grandes proezas dos homens surgiram
daquilo que parecia ser impossível”***

Charles Chaplin

*Aos meus pais, Terezinha e Valter, pelo
apoio, incentivo e amor oferecidos
durante toda a minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir mais esta conquista em minha vida.

À minha família, pelo amor e incentivos constantes.

À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Antibióticos e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, por disponibilizarem os equipamentos e instalações físicas para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Alda de Andrade Chiappeta, Do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela orientação, compreensão e amizade em todos os momentos.

À Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da UFPE, pela co-orientação e pela realização dos testes fitoquímicos.

À Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, pela orientação na caracterização taxonômica dos actinomicetos e pelo apoio constante a mim dispensado.

À Profa. Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena, por ter despertado em mim o interesse em seguir a carreira acadêmica.

À Profa. Dra. Eugênia Maria Maranhão Rios, pelas valiosas sugestões e pela disponibilização de alguns equipamentos.

A todos os Professores do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pelo exemplo de docência e pela atenção a mim dispensada.

À secretária do Curso de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Maria Suely Rodrigues Cavalcanti, pelo carinho e atenção.

Aos meus companheiros de mestrado pelos momentos que jamais serão esquecidos.

Aos técnicos de laboratório José Orlando Silva, Manoel Silvestre de Souza Lins e Salatiel Joaquim de Santana pela ajuda indispensável à realização deste trabalho.

À bióloga Tatiana Keyla Wanderley, pela valiosa contribuição na caracterização taxonômica dos actinomicetos.

À Ayla Maritchia Alves, amiga sempre presente, pela valiosa ajuda.

Aos companheiros do Departamento de Antibióticos, pelos momentos de descontração, estímulo e amizade.

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos, pela atenção e serviços prestados e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 PROBLEMAS NO CULTIVO DA VIDEIRA	6
3.2 DOENÇAS DA VIDEIRA	8
3.2.1 <i>Botrytis cinerea</i>	8
3.2.2 <i>Plasmopora viticola</i>	9
3.2.3 <i>Uncinula necator</i>	10
3.2.4 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	10
3.2.5. <i>Elsinoe ampelina/Sphaceloma ampelinum</i>	12
3.2.6. Outros	12
3.3 CONTROLE BIOLÓGICO	13
3.4 ACTINOMICETOS	14
3.5 ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO ...	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS	17
4.2 MEIOS DE CULTURA	17
4.2.1 Meios para reativação e manutenção dos actinomicetos	17
4.2.2 Meio para manutenção das linhagens do patógeno e realização do teste de antagonismo <i>in vitro</i>	17
4.2.3 Meios para produção do princípio ativo	17

4.2.3.1. Meios convencionais	17
4.2.3.2. Meios alternativos	18
4.2.4. Meios para caracterização taxonômica de actinomicetos	19
4.3 TESTES DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA	19
4.3.1 Reativação das linhagens de actinomicetos	19
4.3.2 Padronização do inóculo do patógeno	20
4.3.3 Testes de antagonismo	20
4.3.3.1. Teste do bloco de gelose	20
4.3.3.2. Teste de difusão em disco de papel	21
4.3.3.3. Prova de unidade de Waksman	23
4.4. CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA	25
4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	26
4.6 DETERMINAÇÃO DAS CLASSES DE COMPOSTOS	27
4.6.1. Teste para fenóis e taninos	27
4.6.2. Teste para antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis	28
4.6.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	29
4.6.4. Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	29
4.6.5. Teste para esteróides e triterpenóides	29
4.6.6. Teste para saponinas	30
4.6.7. Teste para alcalóides	30
4.6.8. Teste para Bases Quaternárias	30
4.6.9. Teste para quinonas	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 REATIVAÇÃO DAS CULTURAS DE ACTINOMICETOS	31
5.2 TESTE DO BLOCO DE GELOSE	31
5.3 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO DE PAPEL	33
5.3.1 Meios convencionais	33
5.3.2 Meios alternativos	39
5.4 PROVA DE UNIDADE DE WAKSMAN	40
5.5 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA	41
5.5.1. Análise micromorfológica	41
5.6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	43
5.7. DETERMINAÇÃO DAS CLASSES DE COMPOSTOS	43

6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
8. ANEXOS	53
8.1. MEIOS DE CULTURA	53
8.2. LAUDOS DE DOSAGEM DE NITROGÊNIO	55
8.3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1 – Uvas com boa aparência, próprias para consumo	2
FIGURA 1.2 – Uvas deterioradas por <i>Botrytis cinérea</i> , impróprias para consumo .	2
FIGURA 4.3 – Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose	21
FIGURA 4.4 – Esquema da metodologia usada no teste de difusão em disco	22
FIGURA 4.5 – Esquema da metodologia usada na prova de unidade de Waksman .	24
FIGURA 5.6 - Culturas de actinomicetos utilizadas nos testes de atividade antagônica, reativadas da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos (DAUFPE)	31
FIGURA 5.7 - Halos de inibição da linhagem FN-4 de <i>Botrytis cinerea</i> obtidos com os actinomicetos: 1) DAUFPE-14632; 2) DAUFPE-11470; 3) DAUFPE-11664; 4) DAUFPE-8631B; 5) DAUFPE-13127, pelo teste do bloco de gelose.. . . .	33
FIGURA 5.8 - Halos de inibição de <i>Botrytis cinerea</i> FN-4, pelo actinomiceto DAUFPE-8631-B, com 96 horas de fermentação nos meios MPE (a) e M-1 (b)	34
FIGURA 5.9 - Halos de inibição de <i>Botrytis cinerea</i> FN-4, pelo actinomiceto DAUFPE-11470, com 72 horas de fermentação nos meios MPE (a) e M-1 (b)	34

FIGURA 5.10 - Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-8631B, frente ao isolado FN-4 de <i>Botrytis cinerea</i> , no meio MPE, em diferentes tempos de fermentação	36
FIGURA 5.11 - Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-8631B, frente ao isolado FN-4 de <i>Botrytis cinerea</i> , no meio M-1, em diferentes tempos de fermentação	36
FIGURA 5.12 - Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-11470, frente ao isolado FN-4 de <i>Botrytis cinerea</i> , no meio MPE, em diferentes tempos de fermentação	37
FIGURA 5.13 - Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-11470, frente ao isolado FN-4 de <i>Botrytis cinerea</i> , no meio M-1, em diferentes tempos de fermentação	37
FIGURA 5.14 - Halos de inibição de <i>Botrytis cinerea</i> FN-4, pelos actinomicetos DAUFPE-8631-B (a) e DAUFPE-11470 (b), no meio de fermentação Mi-2	40
FIGURA 5.15 – Crescimento de <i>Botrytis cinerea</i> (FN-4) , em meio BDA contendo alíquotas de diferentes volumes do líquido metabólico do actinomiceto DAUFPE-8631B, com 96 horas de fermentação no meio MPE: a) 0,01 mL; b) 0,02 mL; c) 0,03 mL; d) 0,05 mL; e) 0,1 mL; f) 0,2 mL; g) 0,3 mL; h) 0,5 mL; i) 1,0 mL; T) Testemunho (sem adição do líquido metabólico)	40
FIGURA 5.16 – Micromorfologia do actinomiceto DAUFPE-8631-B, em meio ISP-2; as setas mostram espirais típicas do gênero <i>Streptomyces</i> . .	41
FIGURA 5.17 – Micromorfologia do actinomiceto DAUFPE-11470, em meio ISP-2; as setas mostram espirais típicas do gênero <i>Streptomyces</i>	42

FIGURA 5.18 – Cromatografia em camada delgada da parede celular do actinomiceto DAUFPE-8631-B: DAP) Ácido diaminopimérico; 1) *Streptomyces* sp; 2) *Nocardia* sp; 3) DAUFPE-8631B

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 4.1 – Determinação de diferentes classes de compostos, pela variação da coloração do extrato, em meio ácido ou alcalino	28
TABELA 4.2 – Variação da coloração do extrato bruto de actinomicetos, em meio ácido ou alcalino, indicativa da presença de diferentes classes de compostos	29
TABELA 5.3 – Atividade antifúngica de actinomicetos frente aos dois isolados de <i>Botrytis cinerea</i> (FN-A e FN-4) pelo teste do bloco de gelose . . .	32
TABELA 5.4 – Atividade antifúngica dos actinomicetos selecionados no teste de bloco de gelose, frente a <i>Botrytis cinerea</i> (FN-4), pelo método de difusão em disco de papel, em diferentes tempos de fermentação e meios de produção (diâmetro do halo de inibição em mm)	33
TABELA 5.5 – Produção de massa celular no mosto fermentado dos actinomicetos, em diferentes meios de produção e tempos de fermentação meios convencionais (g/mL)	35
TABELA 5.6 - Variação do pH no mosto fermentado de diferentes linhagens de actinomicetos, em diferentes tempos de fermentação, nos meios de produção convencionais	38
TABELA 5.7 – Atividade antifúngica dos <i>Streptomyces</i> DAUFPE-8631-B <i>Botrytis cinerea</i> (FN-4), pelo método de difusão em disco de papel, em diferentes meios de produção à base de resíduos industriais no tempo de 96 horas de fermentação (diâmetro do halo de inibição em mm)	39

TABELA 8 - Classes de compostos presentes no extrato etanólico do

<i>Streptomyces</i> DAUFPE-11470	44
--	----

RESUMO

O uso de produtos químicos no combate a doenças causadas por fungos fitopatogênicos, além de ter um alto custo, ocasiona problemas ao meio ambiente e ao homem, determinando graves danos à biota natural do solo, além de contribuir para o desenvolvimento da resistência microbiana. O controle biológico, utilizando actinomicetos produtores de antibióticos, é uma alternativa para estes problemas. Avaliou-se “*in vitro*” o potencial de antagonismo de actinomicetos, pertencentes a Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE, com reconhecida atividade antifúngica, contra dois isolados de *Botrytis cinerea*, patógeno da videira (*Vitis* sp). A atividade antifúngica foi determinada pelos métodos do bloco de gelose, difusão em disco de papel e unidade de Waksman. Das 63 linhagens testadas, 19 apresentaram atividade, pelo teste do bloco de gelose. Destas, cinco mostraram halos iguais ou superiores a 40 mm de diâmetro para pelo menos um dos isolados e foram selecionadas para o teste de difusão em disco, em meios convencionais de produção de antibióticos (MPE e M-1) e meios alternativos utilizando resíduos das indústrias do milho (milhocina) e da cerveja (cevada). Foram formulados cinco meios alternativos, contendo diferentes concentrações de nitrogênio. As linhagens DAUFPE-8631B e DAUFPE-11470, destacaram-se nos meios convencionais, apresentando os maiores halos de inibição nos tempos de 96 e 72 horas de fermentação, respectivamente e foram testadas com os meios alternativos. Taxonomicamente, as linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*. Os meios à base de milhocina mostraram melhores resultados, destacando-se o meio Mi-2, (concentração de nitrogênio igual a do meio M1). O estudo fitoquímico do extrato bruto da linhagem DAUFPE-11470 demonstrou a predominância de fenóis, flavononas, flavonóis, xantonas e bases quaternárias. Os resultados obtidos permitem concluir que as linhagens DAUFPE-8631-B e DAUFPE-11470 de *Streptomyces*, são potencialmente utilizáveis no controle biológico de *Botrytis cinerea*, e que a milhocina pode substituir a farinha de soja como fonte de nitrogênio nos meios de produção, constituindo uma alternativa viável, na eliminação dos problemas causados pelo óleo da soja, na extração do princípio ativo.

ABSTRACT

The use of chemical products in the combat to diseases caused by phytopathogenic fungi, besides having a high cost, it causes problems to the environment and the man, determining serious damages to the natural biota of the soil, besides contributing for the development of the microbial resistance. The biological control, using actinomycetes producing of antibiotics, it is an alternative for these problems. It was evaluated *in vitro* the potential antagonism of actinomycetes with having recognized antifungal activity, belonging the Collection of Cultures of the Department of Antibiotics of UFPE, against two isolated of *Botrytis cinerea*, pathogen of the grapevine (*Vitis* sp). The antifungal activity was determined by the methods of the gelose block, diffusion in paper disk and unit of Waksman. Of the 63 tested lineages, 19 presented activity, for the test of the gelose block. Five these, showed halos same or superior to 40 mm diameter for at least one of the isolated ones and they were selected for the diffusion test in disk, in conventional media of production of antibiotics (MPE and M-1) and alternative media using residues of the industries of the corn ("milhocina") and of the beer (barley). Five alternative media were formulated, containing different concentrations of nitrogen. The lineages DAUFPE-8631B and DAUFPE-11470, stood out in the conventional means, presenting the largest inhibition halos in the times of 96 and 72 hours of fermentation, respectively and they were tested with the alternative media. The taxonomic study of these two lineages demonstrated that both belong to the genus *Streptomyces*. The media with "milhocina" showed better results, standing out the Mi-2, (concentration of same nitrogen the one of half M1). The phytochemical study of the crude extract of the lineage DAUFPE-11470 demonstrated the predominance of phenols, flavonones, flavonoids, xantones and quaternary bases. The obtained results allow to concluded that the lineages DAUFPE-8631-B and DAUFPE-11470 of *Streptomyces*, are potentially usable in the biological control of *Botrytis cinerea*, and that the "milhocina" can substitute the soy flour as source of nitrogen in the production media, constituting a viable alternative, in the elimination of the problems caused by the oil of the soy, in the extraction of the active beginning.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de frutas frescas, incluindo as uvas de mesa, tem aumentado em importância, no âmbito nacional e internacional. Tem-se observado, nos últimos anos, o incremento no consumo devido aos benefícios que elas trazem à saúde humana: apresentam baixo teor calórico e são ricas em fibras alimentares, vitaminas e sais minerais. Além disso, não contêm colesterol, gordura, sal e outras substâncias prejudiciais à saúde.

A uva é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo cultivada há séculos em todos os continentes. A produção de uvas de mesa no Brasil, constitui um dos mercados hortifrutícolas que mais cresce no país. O consumo, *per capita*, desse produto vem se mantendo em torno de 2,5kg/habitante/ano, sendo a produção brasileira destinada ao mercado nacional, totalmente absorvida.

A maior oferta de uva no mercado brasileiro vai de novembro a março; o período de menor oferta, nos principais centros consumidores do país, ocorre entre os meses de abril e junho. Nesse contexto, a situação do pólo de produção de uva da Região do Vale do São Francisco é privilegiada pois, graças às condições climáticas, pode-se obter colheitas em qualquer época do ano, condição que permite aproveitar as melhores oportunidades de preços, ocupando as janelas deixadas pelas regiões produtoras concorrentes. No mercado nacional, os atacadistas são os principais agentes de distribuição do produto, destacando-se entre estes, o atacadista nacional representado principalmente pelas Centrais de Abastecimento (Ceasas), que são as principais intermediadoras dos produtos hortifrutícolas do país (SILVA *et al*, 1989; MARIANO *et al*, 1993).

Os frutos da videira, de uma maneira geral, são considerados perecíveis por apresentarem alto teor de água em sua composição química, uma vez que mesmo após a colheita, todos os seus processos biológicos continuam ativos. Embora os índices estimados de perdas para esses produtos apresentem dados subjetivos e muitas vezes divergentes, são consensuais quanto à ocorrência de perdas significativas que podem ser evitadas, desde que medidas específicas sejam adotadas para identificá-las e reduzi-las (GOMES, 1996).

As podridões patológicas causam perdas substanciais em produtos agrícolas, principalmente por serem cultivados, na maioria das vezes, em locais distantes da área de consumo, implicando na existência de um intervalo de tempo indeterminado entre a colheita e o consumo. Em países em desenvolvimento, essas deteriorações são geralmente mais severas que as perdas de produção, podendo reduzir a qualidade mercadológica, chegando a causar perda total da comercialização do produto e, conseqüentemente, grandes prejuízos econômicos (Figs. 1.1 e 1.2).



Figura 1.1 – Uvas com boa aparência, próprias para consumo.



Figura 1.2 – Uvas deterioradas por *Botrytis cinerea*, impróprias para consumo.

Os fungicidas químicos, por serem aplicados, em muitos casos, no solo, têm atingido e contaminado águas superficiais e subterrâneas. Esses e outros motivos como, por exemplo, a pressão da sociedade por produtos livres de agroquímicos, têm exigido dos pesquisadores e da indústria, maior empenho em programas de controle biológico. Práticas de manejo que favoreçam o desenvolvimento de antagonistas nativos, bem como a introdução de microrganismos selecionados, são estratégias que podem ser utilizadas no controle biológico de fitopatógenos (CHOUDHURY, 2001).

As perspectivas de utilização de microrganismos para a solução de problemas da agricultura e do meio ambiente, constituem um campo que está em amplo desenvolvimento tecnológico. Nos últimos 30 anos, os metabólitos microbianos estão sendo investigados como produtos agroativos de grande importância econômica visando a redução do impacto ambiental causado pelo uso de substâncias químicas. O uso indiscriminado de defensivos agrícolas, acarreta graves problemas ao meio ambiente e ao homem, prejudicando a biota natural do solo, pela indução do rápido desenvolvimento de microrganismos resistentes, além de ser bastante oneroso na aplicação em grandes áreas (HURST, 1981; VANDAMME, 1984).

Entre os microrganismos com potencial de utilização no controle biológico de fitopatógenos, destacam-se as bactérias, e em especial, o grupo dos actinomicetos, responsáveis pela degradação e reciclagem de substratos naturais, além de serem reconhecidos como os principais produtores de inúmeros metabólitos secundários, principalmente, os antibióticos, devido ao seu amplo espectro de ação em relação à célula alvo, com atividade contra bactérias, fungos, protozoários, vírus e células tumorais. Esses actinomicetos estão amplamente distribuídos em diferentes ecossistemas e podem ser encontrados em diversos substratos (ARAÚJO, 1998).

As investigações sobre o uso de actinomicetos ou seus metabólitos como agentes de controle biológico são ainda limitadas, embora na China e no Japão, esses microrganismos venham sendo utilizados com sucesso, no controle de fungos fitopatogênicos do algodoeiro (*Gossypium* sp.) e de outras culturas de interesse econômico, já há alguns anos. A perspectiva de biocontrole do *Botrytis cinerea* por actinomicetos possibilita uma redução dos danos causados à saúde do homem e à biota natural, pelo uso indiscriminado de agrotóxicos. (MARIANO *et al*, 1993).

O aproveitamento de resíduos industriais como fonte de carbono e nitrogênio em meios de produção de antibióticos, constitui uma alternativa biotecnológica menos onerosa e mais viável, minimizando problemas encontrados na obtenção de extratos brutos dos fermentados de actinomicetos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar “*in vitro*”, a atividade antifúngica de actinomicetos frente ao *Botrytis cinerea*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar actinomicetos com atividade antifúngica, avaliando o seu potencial de antagonismo, em meios sólidos e líquidos frente a *Botrytis cinerea*;
- Caracterizar taxonomicamente os actinomicetos selecionados;
- Testar meios de fermentação mais econômicos e eficazes para produção do princípio ativo, utilizando resíduos industriais;
- Avaliar a atividade antifúngica e determinar as classes de compostos dos extratos brutos dos actinomicetos selecionados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na situação atual de alta competição, um dos principais fatores que determina o sucesso do agronegócio de uvas de mesa é a qualidade mercadológica, requisito essencial para que o Brasil possa competir no mercado internacional de frutas. O conceito de qualidade mercadológica engloba a qualidade de compra (aparência, tamanho, etc.), a qualidade nutricional e funcional (vitaminas, minerais, fibras, sais, substâncias que previnem ou curam doenças), a qualidade de segurança do alimento (ausência de resíduos químicos, microrganismos nocivos e materiais físicos), a qualidade ambiental (processo de produção que preserva o ambiente) e a qualidade de vida (respeito à qualidade de vida dos trabalhadores). Estes critérios variam de acordo com as cultivares, as condições climáticas dos locais de cultivo, os sistemas de cultivo, etc. As condições de colheita e manuseio pós-colheita, também influenciam grandemente esses fatores, com reflexos diretos na conservação e qualidade mercadológica das uvas de mesa. A presença de defeitos no produto deprecia o seu valor comercial e reduz a possibilidade de expansão do mercado (CHOUDHURY, 2001).

3.1. PROBLEMAS NO CULTIVO DA VIDEIRA

As plantações de uvas estão sujeitas ao ataque de um grande número de fitopatógenos, responsáveis por perdas na produção e qualidade dos frutos, variando de região para região. Condições ambientais, como excesso de calor e alta umidade, associadas a práticas inadequadas de manejo de pomares, favorecem a ocorrência de ataques severos. Medidas de controle constituem uma eficiente diagnose e são essenciais para a redução das perdas provocadas pelas doenças ([HTTP://WWW.UFPEL.TCHE.BR/FAEM/HERBARIO/FRUTEIRAS](http://www.ufpel.tche.br/faem/herbario/fruteiras)).

As estimativas de perdas reais ou potenciais de uvas brasileiras alcançam a marca dos 25% ou mais. Essas perdas pós-colheita têm grande importância econômica, pois, nessa fase, os custos de produção e de colheita já ocorreram. O período entre a colheita e o consumo das frutas é muito menor do que o período entre o plantio e a colheita. Enquanto uma planta pode levar até 2 anos para produzir uvas de mesa, a duração do manuseio pós-colheita pode ser de uma ou poucas semanas. Doenças fúngicas são

responsáveis por importantes mudanças na qualidade dos frutos na pós-colheita, contribuindo para a redução da quantidade e do valor de comercialização. Muitas vezes, o problema está associado com o uso de pesticidas que falham no controle dos patógenos resistentes (CHOUDHURY, 2001).

De acordo com a Associação dos Engenheiros Agrônomos de Santa Catarina (1998), as deteriorações patológicas da uva podem ocorrer tanto na pré-colheita, como durante e na pós colheita. As condições solo e clima da região produtora são as principais responsáveis pelos problemas de deterioração patológica na fase de pré-colheita; o tipo de variedade cultivada e o sistema de cultivo das uvas de mesa, assim como o tipo de fitopatógeno envolvido no processo de deterioração, também influenciam este processo ([HTTP://WWW. SCALET.EMBRAPA.BR](http://www.scalet.embrapa.br)).

Vários fatores interagem favorecendo o desenvolvimento de deteriorações pós-colheita de uvas de mesa. As doenças podem iniciar-se no campo, durante a ontogenia do fruto, ou serem produzidas depois da colheita, com a maturação fisiológica (CAPPELLINI & CEPONIS, 1984). Após a colheita, os frutos passam por uma série de transformações endógenas resultantes do metabolismo, que se refletem em várias mudanças nas suas características, tais como textura, cor, sabor e aroma, indicativas do processo de amadurecimento e posterior senescência. Durante esses processos, os frutos geralmente tornam-se mais suscetíveis à invasão de patógenos, devido, principalmente, ao aumento da predisposição às injúrias mecânicas, que transformam esses produtos em um substrato disponível para o rápido desenvolvimento de patógenos (ECKERT, 1980; COURSEY, 1983).

Fatores abióticos como temperatura, umidade relativa e luminosidade têm grande influência no desenvolvimento das deteriorações, podendo as infecções, ocorrerem durante a produção, a colheita, o manuseio, o transporte, o armazenamento e a comercialização. Os fitopatógenos causadores das deteriorações pós-colheita podem ser agrupados em quiescentes (latentes), quando a inibição do desenvolvimento dos microrganismos fitopatogênicos ocorre devido às condições fisiológicas impostas pela planta hospedeira até que a maturação fisiológica tenha sido atingida. As bagas imaturas possuem, uma resistência que inibe o desenvolvimento das deteriorações. Neste grupo

destacam-se os fungos *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia* e *Botrytis*; um outro grupo é o dos oportunistas, quando as bagas contaminadas por fungos, como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e outros, podem manifestar, em pouco tempo, os sintomas das doenças. Neste caso, as condições fisiológicas da planta hospedeira podem retardar, mas não inibir o desenvolvimento da infecção (CHOUDHURY, 2001).

O cultivo da videira é desafio vencido no Semi-Árido brasileiro. Contudo, o grande avanço da área plantada, estimada atualmente em 10.000 hectares, e as várias fases fenológicas da planta, encontradas de forma simultânea nos pomares e a importação de novos materiais genéticos, tem favorecido a ocorrência de doenças como Oídio, Míldio, Antracnose, e o surgimento de outras doenças como “morte descendente” causada por *Lasiodiplodia theobromae*, registrada por Tavares & Menezes (1991), e o “cancro da videira” causada por *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*, registrada por Malavolta *et. al* (1998) e o “mofo cinzento”, causado pelo *Botrytis cinerea*, registrado por Tavares (2000).

3.2. AGENTES CAUSADORES DE DOENÇAS DA VIDEIRA

3.2.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea, agente causador do mofo cinzento, provoca perdas de mais de 50% nas variedades suscetíveis, em condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento. Além da redução na colheita, são consideráveis os prejuízos indiretos acarretados pela doença, em razão do fungo desenvolver-se às custas do açúcar, tanino e nitrogênio solúveis da uva. Danos nos viveiros também são elevados. A podridão cinzenta afeta todos os órgãos da parreira de forma significativa em regiões com alta umidade relativa, deteriorando os frutos na pré e/ou pós-colheita, principalmente em variedades de uva viníferas brancas (SILVA-RIBEIRO *et al*, 1994).

Botrytis cinerea causa danos, quando no apodrecimento de cachos, acarretando prejuízos na pré-colheita pela perda na produção, que também reveste-se de prejuízo em potencial na pós-colheita, devido à rapidez na disseminação para todos os cachos adjacentes. A doença afeta todos os órgãos da planta, sendo que os danos mais severos ocorrem nos cachos. Nestes, observa-se uma descoloração na pele das bagas, que ficam

flácidas e adquirem uma cor cinza, apodrecendo em seguida. Quando a infecção é precoce, em frutos ainda verdes, a baga fica azeda, podendo cair do cacho. Nas folhas, a doença pode se manifestar formando manchas extensas, de cor cinza esverdeada, que tornam-se de cor castanha, secando completamente as mesmas. Em ambiente com umidade relativa em torno de 80%, aparece na superfície dos órgãos afetados, uma abundante inflorescência de cor cinza, constituída pelo micélio do fitopatógeno (TAVARES, 2000).

3.2.2 *Plasmopora viticola*

Plasmopora viticola, agente causador do Míldio, teve sua primeira ocorrência registrada nos Estados Unidos em 1834, disseminando-se depois na Europa, África, Ásia, Austrália e América do Sul. No Brasil, ocorre na maioria dos pomares vitícolas do país. No Vale do São Francisco, sua ocorrência é mais acentuada no primeiro semestre do ano, quando as condições climáticas são mais favoráveis ao desenvolvimento do fungo, devido à ocorrência de chuvas. Este patógeno é de difícil controle, principalmente quando ocorre na fase de floração da planta. Sua importância econômica é significativa pelos prejuízos e pela crescente severidade em todas as regiões com clima favorável. Os sintomas aparecem em todas as partes verdes da planta, sendo que nas folhas, inicialmente, podem ocorrer na face ventral, manchas pequenas arredondadas, de bordas indefinidas e de aspecto encharcado; na face dorsal as manchas correspondem à colônias de fungos, de cor esbranquiçada, que evoluem queimando o tecido vegetal, tornando-o de cor pardo-avermelhada, que por fim tornam-se necróticas e irregulares e podem coalescer, formando grandes áreas mortas, com conseqüente seca e queda das folhas. Todas as fases fenológicas da planta são sensíveis a esta doença, principalmente todo o período da fase inicial de crescimento vegetativo e início da fase reprodutiva. Nestas fases os tecidos são mais tenros, facilitando a penetração e colonização do fungo, que, ao externar, os sintomas já possui suas toxinas agindo no interior da planta, dificultando assim o controle. (TAVARES, 1995).

Os danos de necrose irreversíveis e desfolhamento acarretam prejuízos na produtividade, pela redução da área fotossintética e, conseqüentemente diminuição da produção de carboidratos, além dos danos diretos nos frutos afetados, que são perdidos

ainda na fase de pré-colheita, atingindo também a produção dos anos seguintes (EICHHORN & LORENZ, 1984).

3.2.3 *Uncinula necator*

Uncinula necator, agente causador do oídio, ocorre em todas as regiões vitícolas do país, sendo que sua importância econômica é mais expressiva nas regiões semi-áridas do nordeste brasileiro, principalmente no Vale do São Francisco, onde causa danos consideráveis devido à constância de condições climáticas favoráveis ao patógeno.

A infecção acontece em toda a parte aérea da planta, principalmente nos órgãos tenros e suculentos, sendo que os maiores danos são observados nos cachos e brotos, que são afetados no início do desenvolvimento, ocorrendo aborto das inflorescências e como resultado, uma baixa frutificação ou perda total da produção. Sua sobrevivência ou conservação de um ano para o outro, dá-se por meio do micélio, que fica nas gemas e escamas dos sarmentos, admitindo-se também que os conídios, possam permanecer nas diferentes estações do ano. Os danos causados por este fungo nos pomares de videira são expressados pela redução da área fotosintética das folhas devido às queimas que causam, ao elevado índice de abortamento de flores e de depreciação dos frutos que tornam-se manchados (KIMATI & GALLI, 1980).

3.2.4 *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae, agente etiológico da podridão seca, ocorre em uma grande variedade de plantas de elevado interesse econômico. Sua crescente incidência em áreas irrigadas da região Nordeste, desde 1990, tem sido motivo de grande preocupação, principalmente nas áreas de submédio São Francisco, onde vem afetando não só a uva, mas também manga, abacate, goiaba, citrus, coco, tâmara, banana e acerola (TAVARES E AMORIM, 1995). Em outras regiões brasileiras, já foi citado também em amendoim, cana-de açúcar, café, fumo, mamão, mamona, algodão e seringueira (PIZZINATTO *et al.*, 1983).

Externamente, a planta de videira infectada pode apresentar várias formas de sintomas associados ou independentes, como por exemplo, queima ou seca de ponteiros e folhas; necrose de cor escura; manchas escuras geralmente longitudinais e salteadas, em toda a extensão dos ramos produtivos; diminuição do vigor floema, caracterizando morte de células, e que se desenvolve em todas as direções, ou seja, para cima, para baixo até a raiz e na lateral, até causar o anelamento e, conseqüente morte da planta, podendo ser observado em qualquer parte do tronco. A penetração do fungo em sua maioria, ocorre através dos ferimentos causados à planta, como por exemplo, poda de formação e poda verde; nas rachaduras quando na torção dos ramos para indução da brotação; nos danos mecânicos no tronco; nas fendas da enxertia e pelo corte das raízes. Sua penetração também pode ocorrer através das aberturas naturais do tecido vegetal, quando a incidência do fungo no pomar é alta. Como este fungo não é sistêmico, ou seja, não é disseminado pela seiva no interior da planta, a infecção é localizada e progressiva, destruindo célula por célula, até penetrar no interior do lenho, apresentando um comportamento dinâmico e agressivo. Sobrevive, principalmente, em restos de culturas deixados no pomar ou na sua proximidade e em demais plantas hospedeiras (mangueira, goiabeira, abacateiro, coqueiro, bananeira, limoeiro etc), bem como em tecidos vegetais infectados que permanecem na planta afetada e que muitas vezes passam despercebidos. Seu principal agente de disseminação é o vento, que transporta as estruturas de infecção do fungo, para todo o pomar e/ou para pomares vizinhos. Altas temperaturas, baixa umidade relativa do ar, falta de proteção química das partes podadas da planta, ferimentos, nutrição desbalanceada e estresse hídrico (disponibilidade de água abaixo de 20% da capacidade de campo ou saturação de umidade) são situações que favorecem o desenvolvimento de fungo. Embora a predisposição da planta seja mais prevalente, o patógeno infesta a planta ao longo do ano, durante todo o seu ciclo de vida, independentemente da idade do pomar e de algumas variações de temperatura e umidade relativa do ar anteriormente citadas, num processo contínuo, não apresentando período de latência (TAVARES, 2000).

Os danos causados, por esse fungo, nos pomares de videira na região do Vale do São Francisco, são diversos. Dentre eles destacam-se a destruição dos ramos produtivos que comprometem a formação da planta e os ciclos seguintes, devido a necessidade de nova poda, por ocasião da limpeza dos ramos infectados; redução da produtividade e aumento dos custos de produção (LIMA *et al*, 1997).

3.2.5 *Elsinoe ampelina*

Elsinoe ampelina é agente fúngico de uma das mais importantes doenças que afetam a cultura da videira em regiões com alta umidade, chuvas abundantes, ventos frios e temperaturas entre 15 e 18⁰C. Ocorre no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo. *Elsinoe ampelina* é a fase perfeita sendo raramente encontrada na natureza; apresenta estruturas chamadas ascos com ascósporos hialinos, tri-septados, com lóculos desprovidos de ostíolo e com ascósporos liberados pela desintegração do estroma. Na fase imperfeita *Sphaceloma ampelinum* forma conídios unicelulares, hialinos, com acérvulos. Em condições favoráveis ao seu desenvolvimento pode ser responsável por menor produtividade da planta e por perdas diretas no fruto. No Nordeste brasileiro, o microclima resultante da irrigação das áreas produtoras de uva, oferece condições ótimas, principalmente na primeira metade do ano, quando as temperaturas são mais baixas.

A doença pode ser observada em todas as partes aéreas da planta, ocasionando necroses escuras. Os danos nas folhas limitam a fotossíntese e a produção de carboidratos, causando danos na produtividade, bem como necroses irreversíveis diretas nos frutos afetados que são responsáveis pelo seu descarte imediato. Seu valor econômico é significativo pelos crescentes prejuízos, haja visto as constantes fontes de inóculos e as condições de microclima favorável resultantes também da irrigação, o que evidencia a importância de manejar a cultura de forma mais racional já que este é um problema fitossanitário em potencial nas áreas produtoras do Vale do São Francisco (GRIGOLETTI JÚNIOR & SÔNEGO, 1993).

3.2.6 Outros

Choudhury *et al* (2001) citam ainda outros agentes de doenças da videira, como *Colletotrichum* sp e *Alternaria* sp, os quais são classificados como patógenos quiescentes, isto é, que dependem das condições fisiológicas da planta hospedeira, para instalação da infecção.

3.3. CONTROLE BIOLÓGICO

De acordo com a definição de Cook & Baker (1983), controle biológico é “a redução da soma de inóculos ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem”. Este conceito inclui qualquer controle obtido através de organismos vivos, que não o homem. Na prática, o controle biológico é utilizado principalmente com o intuito de eliminar ou reduzir os danos causados por um patógeno, através da ação de um antagonista. Ambos os conceitos envolvem a redução da densidade populacional do patógeno.

Qualquer agente biológico capaz de interferir nos processos vitais de fitopatógenos, pode ser classificado como um antagonista, sendo que sua importância depende da relação com o patógeno alvo e o mecanismo através do qual é exercida a ação antagônica (COOK & BAKER, 1983).

Diversas espécies de fungos, bactérias e actinomicetos têm sido referidas como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos, sendo que algumas destas espécies têm já um uso comprovado, enquanto outras são referidas como potencialmente antagônicas (MELO, 1998).

Um dos mecanismos pelos quais os agentes de biocontrole podem exercer sua ação antagônica é parasitando os fitopatógenos, sendo que alguns fungos demonstram uma certa especificidade para parasitar determinados grupos de patógenos (Ayers & Adams 1998, *apud* MELO, 1998).

Extratos brutos de *Bacillus subtilis* e outras bactérias Gram-positivas, isoladas de solo e de grãos, vem apresentando resultados promissores no controle biológico de diversos fitopatógenos, entre os quais, *Fusarium moniliforme* (MOTOMURA & HIROOKA, 1996).

Um grande número de metabólitos antifúngicos vem sendo isolado de microrganismos. O potencial de utilização destes metabólitos como agentes de controle

biológico de fungos que atacam diversas culturas de interesse econômico, vem despertando cada vez mais a atenção dos pesquisadores, tanto do ponto de vista econômico, quanto pela possibilidade de redução do impacto ambiental (MATSUURA, 1998).

3.4 ACTINOMICETOS

Pertencentes a ordem Actinomycetales, os actinomicetos constituem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente se enquadram entre as bactérias gram-positivas. Apresentam características específicas, como: células procariontes, sensibilidade aos agentes antibacterianos e lisozimas; formação de grumos em meio de cultura líquido, filamentos finos semelhante a hifas fúngicas com diâmetros entre 0,2 a 0,5 μm , tipicamente ramificados, denominado micélio. Em meio de cultura sólido, as colônias apresentam filamentos ramificados firmemente aderidos ao ágar. Estas colônias são constituídas pelo micélio vegetativo (submerso em meio de cultura) e pelo micélio aéreo, cuja extremidade contém conídios (esporos assexuados). Os conídios dão às colônias a aparência aveludada. Além disso, as colônias produzem pigmentos aderidos ao micélio aéreo ou excretados ao meio (PEREIRA, 2001).

Os actinomicetos destacam-se das outras bactérias, por crescerem lentamente, e por serem os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial e medicinal, bem como por seu importante papel na reciclagem de nutrientes do solo (ARAÚJO, 1998).

Aproximadamente 6.000 antibióticos de origem microbiana, são produzidos por actinomicetos (OKAMI & HOTTA, 1988; LANCINI & LORENZETTI, 1993).

Cerca de 65% a 70% dos compostos bioativos, produzidos por actinomicetos, são metabolizados por espécies do gênero *Streptomyces*, incluindo os antibióticos de uso clínico, veterinário e agroquímico, além de outros metabólitos secundários como enzimas, imunomoduladores e inibidores de enzimas (ARAÚJO, 1998; KURYLOWICZ, 1981; KURYLOWICZ, *et al*, 1979).

Características quimiotaxonômicas e nicromorfológicas, permitem distinguir diferentes gêneros de actinomicetos; o gênero *Streptomyces* apresenta o isômero LL do ácido diaminopimélico (DAP) no hidrolisado da parede (QUEENER & DAY, 1986).

3.5 ACTINOMICETOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Na área de controle biológico com actinomicetos, as investigações ainda são limitadas, embora na China e no Japão, o uso destes microrganismos como agentes de biocontrole venha sendo realizado com sucesso, já há alguns anos. O biocontrole por actinomicetos tem sido proposto para fungos patógenos do algodoeiro e de outras culturas de importância econômica (SILVA *et al*, 1989; MARIANO *et al*, 1993).

A ação antagônica de alguns destes microrganismos, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos, indica-os como uma alternativa a ser pesquisada para a obtenção de produtos agrícolas isentos de doenças. Entre as substâncias produzidas por *Streptomyces* com ação inibidora contra fungos, destacam-se: cicloheximida, produzida por *Streptomyces griseus*; fungicidina por *S. noursei*; aureomicina por *S. aureofaciens* e blasticidina, por *S. griseochromogenes* (SILVA *et al*, 1984).

O primeiro relato da atividade antifúngica de actinomicetos foi feito por Tims (1932), ao verificar a inibição de *Phytium* sp. isolado de cana de açúcar. Os ambientalistas defendem o uso de alguns actinomicetos e seus metabólitos na agricultura, por apresentarem atividade herbicida, com a vantagem de serem biodegradáveis (SOUZA, 1993)

Isono *et al* (1965) e Isono *et al* (1967), descobriram no Japão, um novo grupo de substâncias antibióticas, as polioxinas, produzidas pelo *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*. Esse composto apresentou uma excelente atividade antagonista, devido à capacidade seletiva de inibir a síntese de quitina na parede celular de fungos (CAMPOS & DIETRICH, 1982).

O griseocarnin, antibiótico poliênico isolado de *Streptovercillium griseocarneum* apresenta excelente atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos (CAMPOS *et al*, 1974).

Estreptomicina, cicloheximida e griseofulvina, estão entre os antibióticos produzidos por actinomicetos, mais usados na agricultura, para o controle de pragas e doenças. Desses, a cicloheximida apresenta um alto poder fungicida, porém com muita toxidez para as plantas, sendo por isto de uso restrito. A griseofulvina tem baixo poder fungicida e é menos fitotóxico, porém apresenta alto custo, devido ao baixo rendimento (SILVA *et al*, 1984).

Diversos pesquisadores vêm realizando estudos na tentativa de desenvolver variedades de *Streptomyces* como agentes controladores de doenças causadas por fungos em raízes, visando obter linhagens mais eficientes (YUAN & CRAWFORD, 1995).

Das 190 culturas de actinomicetos isoladas da rizosfera, rizoplano e endofíticos da raiz do tomateiro, 18 mostraram 100% de atividade antagônica contra *Ralstonia solanacearum* (MOURA *et al*, 1998).

A utilização de metabólitos de actinomicetos na agricultura tem despertado o interesse de ambientalistas, de todo mundo por serem, ao contrário de agrotóxicos, produtos biodegradáveis que apresentam atividade herbicida (SOUZA, 1993).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS CULTURAS

Os isolados do fitopatógeno *Botrytis cinerea* (FN-A e FN-4) foram fornecidos pela Profa. Dra. Maria Menezes, do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Os actinomicetos testados foram provenientes da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE). Foram selecionadas culturas com reconhecida atividade antifúngica .

4.2 MEIOS DE CULTURA (ANEXO 8.1)

4.2.1 Meios para reativação e manutenção dos actinomicetos

- Meio ISP-1: Triptona-extrato de levedura (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948).
- Meio ISP-2: Extrato de malte-extrato de levedura-ágar (PRIDHAM *et al*, 1957).

4.2.2 Meio para manutenção das linhagens do patógeno e realização do teste de antagonismo *in vitro*

- BDA- Batata-dextrose ágar (MÉLLO *et al*, 1988).

4.2.3 Meios para produção do princípio ativo

4.2.3.1 Meios convencionais

- Meio MPE para a produção de eurimicina (KAWAMURA *et al*, 1976)
- Meio M-1 (50% da concentração do meio MPE)

Os meios para fermentação foram testados na sua composição original e com substituição das fontes de nitrogênio por resíduos industriais, cevada (produto residual da indústria da cerveja) e milhocina, proveniente da indústria do milho.

4.2.3.2. Meios alternativos

Foram idealizados cinco meios alternativos, à base de cevada e milhocina, em substituição à farinha de soja utilizada nos meios convencionais (MPE e M-1), como fonte de carbono e nitrogênio:

- Meio C-1: cevada sem alteração da concentração de nitrogênio do decocto.
- Meio C-2: cevada com concentração de nitrogênio equivalente a do meio MPE
- Meio C-3: cevada com concentração de nitrogênio equivalente a do meio M-1
- Meio Mi-1: milhocina com concentração de nitrogênio equivalente a do meio MPE
- Meio Mi-2: milhocina com concentração de nitrogênio equivalente a do meio M-1

A cevada foi obtida de indústria de cerveja situada no município do Cabo (PE) e foi utilizada na forma de um decocto obtido a partir de 500mg/l de água destilada, em vapor fluente, durante 20 minutos.

A milhocina (um “xarope” concentrado de milho), resíduo da indústria do milho, foi proveniente de uma fábrica também localizada no Polo Industrial do Cabo (PE).

As concentrações de nitrogênio total dos meios MPE e M-1, e dos resíduos industriais, foram determinadas pelo Laboratório de Microbiologia e Físico-Química de Alimentos (LMFQA) do Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco (ITEP) (Anexo 2), e serviram de base para a preparação dos meios alternativos.

4.2.4 Meios para caracterização taxonômica de actinomicetos

- Meio CAA: Caseína-amido ágar (KUSTER & WLLIAMS, 1964)
- Meio ISP –1: Triptona-extrato de levedura (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948).
- Meio ISP –2: Extrato de malte-extrato de levedura-ágar (PRIDHAM *et al*, 1957).
- Meio ISP –3: Farinha de aveia ágar (KUSTER, 1959)
- Meio ISP –4: Sais inorgânicos–amido ágar (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

4.3. TESTES DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA

4.3.1. Reativação das linhagens de actinomicetos

Os actinomicetos testados foram reativados a partir de culturas preservadas em óleo mineral.

Inicialmente as culturas foram transferidas para o meio ISP-1 (Triptona-extrato de levedura) em tubos de ensaio esterilizados. Os tubos foram incubados sob agitação, em mesa agitadora a 200rpm durante 5 dias, a temperatura de 28 ± 2 °C. Após o período de incubação, realizou-se o semeio em placas de Petri esterilizadas contendo meio ISP-2, pela técnica “pour-plate” e posterior incubação em BOD (30 ± 1 °C) durante 5-7 dias. As colônias isoladas foram transplantadas para tubos de ensaio contendo meio ISP-2 e os tubos foram incubados em BOD (30 ± 1 °C) durante 5-7 dias.

As culturas obtidas foram estocadas sob refrigeração, para realização dos testes de antagonismo.

4.3.2 Padronização do inóculo do patógeno

A suspensão fúngica foi preparada a partir de culturas puras dos isolados de *Botrytis cinerea* (FN-A e FN-4); com o auxílio de um furador apropriado, de 5mm de diâmetro, foram retirados blocos da cultura, a aproximadamente 1,5 cm do centro da colônia, região de maior ocorrência de picnídios, o que permitiu obter blocos com um maior número de conídios e uniformidade do número de conídios por blocos (SILVA, 2002).

O inóculo foi padronizado colocando-se 5 bloquinhos de micélio-ágar em um tubo esterilizado, macerados com auxílio de um bastão de vidro, em 2 mL de Tween 80 a 0,01%, e homogeneizados em Vórtex. Da suspensão obtida, retirou-se 0,1 mL, para semeio em placa de Petri contendo meio BDA, com alça de Drigalsky.

4.3.3 Testes de antagonismo

A atividade antagônica dos actinomicetos frente aos dois isolados do fitopatógeno foi avaliada qualitativamente pelos métodos de bloco de gelose (ICHIKAWA *et al*, 1971) e de difusão em discos de papel (BAUER *et al*, 1966, modificado), em meio de cultura BDA.

4.3.3.1. Teste de bloco de gelose

O teste do bloco de gelose é um método de avaliação qualitativa que permite selecionar os actinomicetos mais ativos, para realização dos testes de difusão em disco. Para preparação dos blocos, os actinomicetos foram cultivados em placas de Petri com meio ISP-2, durante 6 dias a 30 ± 1 °C, para obtenção de um crescimento em tapete; obtido o crescimento, retiraram-se os blocos de gelose, com um furador apropriado de 8mm de diâmetro, esterilizado.

O semeio do patógeno foi realizado com auxílio de alça de Drigalsky, colocando-se 0,1 mL da suspensão fúngica sobre a superfície do meio BDA, em placa de Petri, sobre o qual foram colocados os blocos de actinomicetos, com o auxílio de alça de

platina (Figura 4.3). As placas foram incubadas por 4 dias à temperatura de 30 ± 1 °C e os resultados foram obtidos pela medida, em milímetro, dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do patógeno, considerando-se positivos, halos iguais ou superiores a 40mm. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos nas três repetições.

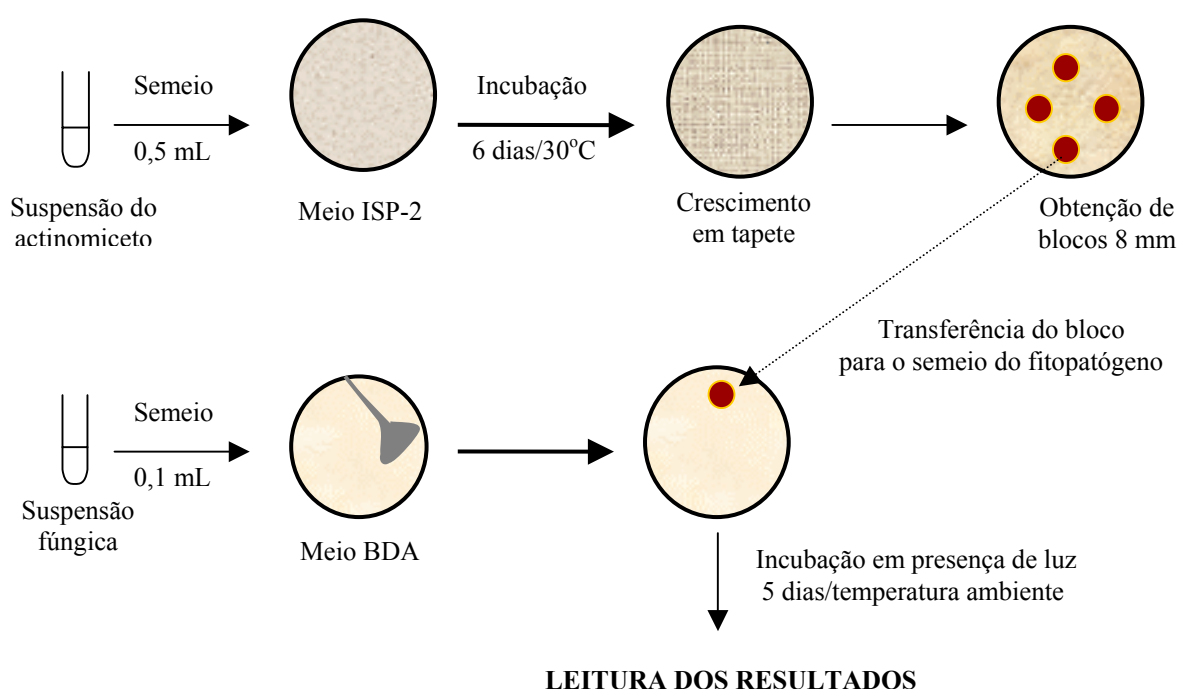


Figura 4.3 - Esquema da metodologia usada no teste do bloco de gelose

4.3.3.2. Teste de difusão em disco de papel

Os actinomicetos que apresentaram os melhores resultados no teste do bloco de gelose foram selecionados para realização do teste de disco. Este teste permitiu selecionar o melhor tempo de fermentação e o melhor meio de produção do princípio ativo. As culturas selecionadas foram inoculadas nos meios MPE e M-1 em frascos de Erlenmeyer e cultivadas sob agitação a 200 rpm, a 28 ± 2 °C, durante 144 horas, para realização do teste de disco.

Alíquotas da fermentação foram retiradas a cada 24 horas, a partir do início da fermentação e testadas, até o declínio da atividade. A suspensão padronizada do fitopatógeno (0,1 mL) foi semeada em placas de Petri contendo o meio BDA. Sobre a superfície do meio semeado foram colocados discos de papel (Whatman nº 02) de 6mm de diâmetro, embebidos com 20µL da fermentação do actinomiceto. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (28 ± 2 °C), em presença de luz, durante 5 dias (Figura 4.4). Após o período de incubação, realizou-se a medição (em mm) dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento fúngico, formado ao redor dos discos. Foram considerados positivos halos iguais ou superiores a 40mm. Os resultados foram expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos das três repetições.

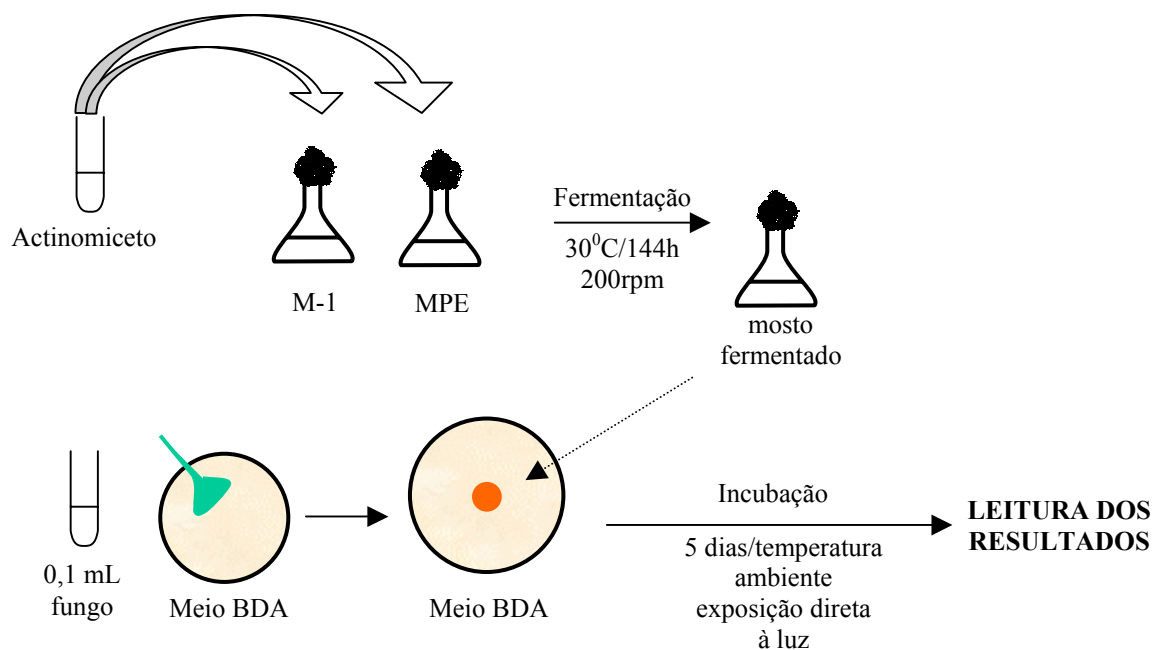


Figura 4.4 - Esquema da metodologia usada no teste de difusão em teste de disco

A partir deste teste foram selecionados dois actinomicetos, que apresentaram os melhores resultados, para realização de testes de atividade com os meios alternativos. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição, em milímetro.

4.3.3.3. Prova de unidade de Waksman

Este teste indica quantitativamente a atividade antimicrobiana do líquido fermentado em unidade arbitrária por Waksman & Reilly (1945), considerando-a igual a uma unidade por mililitro (1 U/mL) quando 1mL do líquido fermentado inibir o crescimento do microorganismo. O teste foi realizado a partir dos resultados obtidos no teste de disco, com os meios de produção do princípio ativo, conhecendo-se o melhor tempo de fermentação e o melhor meio de produção do princípio ativo.

A intensidade da atividade do líquido fermentado (unidades/mL), foi avaliada quantitativamente homogeneizando-se alíquotas de volumes conhecidos do líquido (1,0, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,03, 0,02 e 0,01mL), filtrado em condições estéreis, ao meio BDA, sobre o qual foi semeada, em estrias, a suspensão padronizada do fitopatógeno. Após o período de incubação de 4 dias à temperatura ambiente, em presença de luz, foram feitas leituras (Figura 4.5), considerando-se o intervalo entre a última placa em que ocorreu o crescimento fúngico e a primeira onde houve inibição, fazendo-se comparação com a placa testemunho (sem adição do líquido metabólico). Para cálculo dos resultados, usou-se a fórmula abaixo:

$$IA = \frac{V_t}{A_l}$$

Onde:

IA = Intensidade da atividade

Vt = Volume total da placa (meio de cultura + alíquota)

Al = Alíquota do líquido fermentado

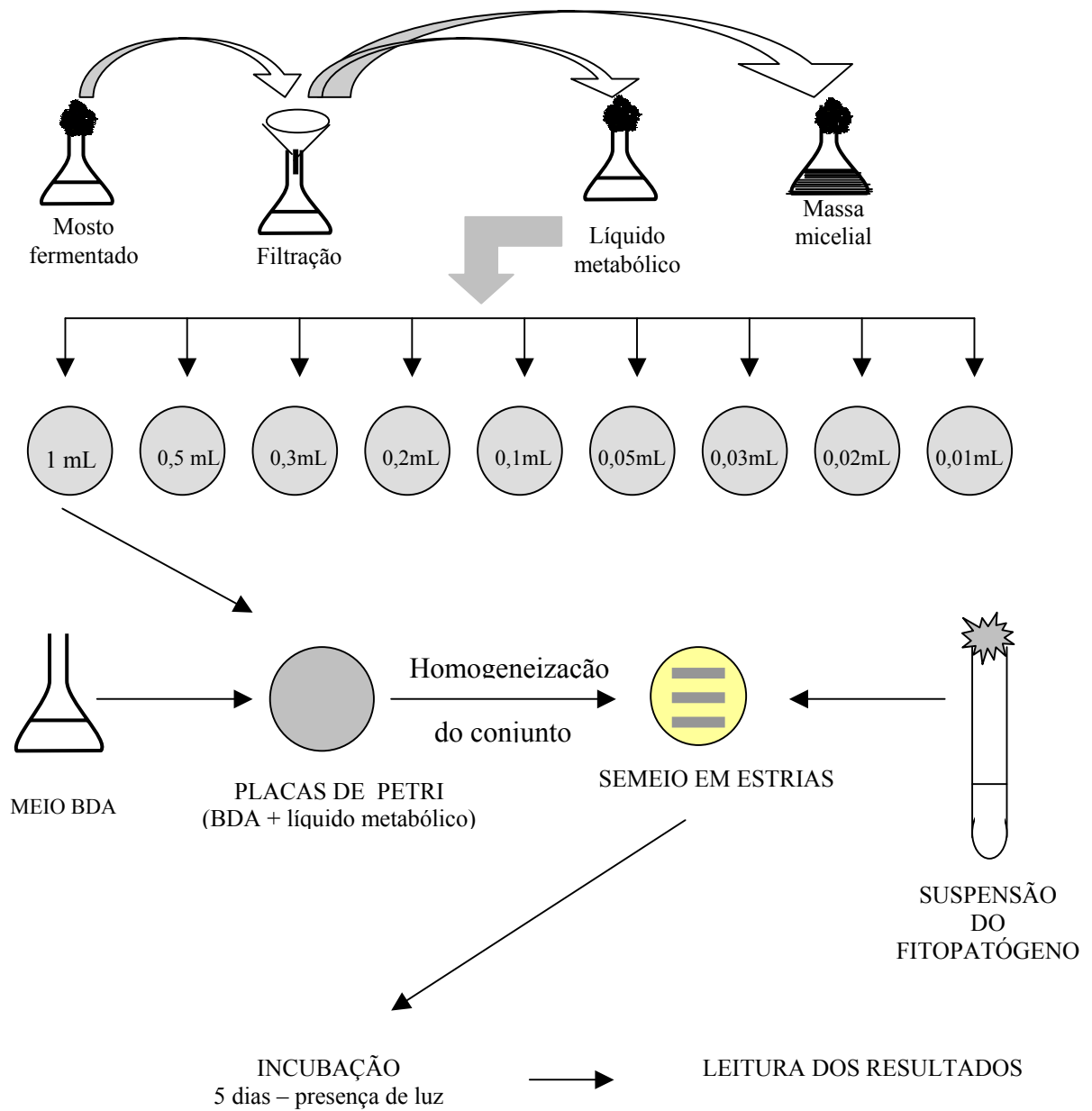


Figura 4.5 - Esquema da metodologia usada na prova de unidade de Waksman

4.4 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA

Os actinomicetos que apresentaram os melhores resultados no teste de difusão em disco foram selecionados para caracterização taxonômica, a nível de gênero, de acordo com a metodologia descrita por Furtado (2001), obedecendo as seguintes etapas:

- A) Análise micromorfológica
- B) Cultivo em meio líquido
- C) Hidrólise da parede celular
- D) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A) Análise Micromorfológica

A caracterização micromorfológica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Shirling & Gottlieb (1968). A linhagem foi cultivada nos meios sólidos caseína amido ágar (CAA), extrato de malte-extrato de levedura ágar (ISP-2), farinha de aveia ágar (ISP-3) e sais inorgânicos-amido ágar (ISP-4), incubada a 30⁰C por 15 dias para observação das características morfológicas do actinomiceto: presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos ou presença de esporângio. O cultivo foi realizado em placas de Petri com lamínula inserida parcialmente no meio de cultura, em posição inclinada, para obtenção do crescimento de hifas sobre a superfície da mesma. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas e observadas ao microscópio óptico.

B) Cultivo em meio líquido

A massa celular do actinomiceto, para realização da hidólise da parede celular foi obtida a partir de um cultivo em meio ISP-1 a 30⁰C por 72 horas.

C) Hidrólise da parede celular

A partir do cultivo em meio líquido do actinomiceto, realizou-se uma filtração, a vácuo, e a massa celular foi secada em estufa a 50 °C por 2 horas. Em seguida, transferiu-se 10mg da massa seca para um tubo de ensaio com tampa rosqueável (10 X 90mm), adicionou-se 1mL de solução de HCL 6N e colocou-se na estufa a 100°C por 16h para hidrólise da parede celular; após resfriamento, o material foi lavado com 1mL de água destilada, por centrifugação (1200rpm). O sobrenadante foi coletado em um tubo Eppendorf e levado ao rotoevaporador para a retirada de todo o ácido remanescente. Esta etapa foi repetida até eliminação total do ácido. O material livre de ácido, foi retomado em 0,1 mL de água destilada por mg de material, e levado para a corrida em cromatografia por camada delgada (CCD).

D) Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada do hidrolisado da parede celular foi realizada para identificação do isômero do ácido diaminopimérico (LL-DAP ou Meso-DAP) presente na parede do actinomiceto. A fase móvel estava constituída por metanol-água-ácido clorídrico 6N-piridina (80:23:4:10, v/v) e a fase fixa por placas de celulose (Merck nº 5716, 20X20). Na fase fixa foram aplicadas, lado a lado, 10µL do ácido diaminopimérico padrão (DAP) a 0,19% m/v, 10µL das amostras-padrão de *Streptomyces* (DAUFPE-8744) e *Nocardia* (DAUFPE-3504), que apresentam os isômeros LL-DAP e Meso-DAP, respectivamente. A cuba foi previamente saturada por 2h e a corrida se deu por aproximadamente 5 h. A placa foi colocada para secar na capela, borrifada com uma solução de ninhidrina a 0,2%, e aquecida a 100°C por 5 minutos para visualização dos isômeros de DAP (LL-DAP e meso-DAP). A comparação dos valores dos R_{fs} obtidos permitiu a diferenciação entre os dois gêneros (LECHEVALIER, 1979).

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A partir da fermentação do actinomiceto, no meio de produção e tempo de fermentação selecionados, foi realizada uma tentativa de extração do princípio ativo da

massa e do líquido metabólico. O líquido metabólico foi separado da massa celular por filtração á vácuo, em filtro bacteriológico.

A extração da massa micelial foi realizada com solventes miscíveis em água (etanol, metanol e acetona) a pH 2,0, 7,0 e 9,0, sob agitação durante 2 horas em agitador mecânico e filtrados para separação do extrato.

Para obtenção do extrato do líquido metabólico foram utilizados solventes não miscíveis em água (acetato de etila, clorofórmio e éter etílico), também em diferentes valores de pH (2,0, 7,0 e 9,0), sob agitação. Os extratos foram obtidos por separação em funil de decantação.

Tanto os extratos da massa micelial quanto do líquido metabólico foram neutralizados a pH 7,0 e testados pelo método de difusão em disco de papel, para verificação da presença do princípio ativo.

O extrato que apresentou melhor atividade, foi selecionado para determinação das classes de compostos.

4.6. DETERMINAÇÃO DAS CLASSES DE COMPOSTOS

A determinação das classes de compostos foi realizada segundo o procedimento indicado por Matos (1997), com o extrato bruto seco que apresentou melhor atividade no teste de disco.

4.6.1. Teste para fenóis e taninos

Uma pequena quantidade do extrato bruto, foi dissolvida em 2 mL de H₂O destilada e adicionada com 3 gotas de cloreto férrico (FeCl₃). Após agitação vigorosa, observou-se a variação da coloração para azul ou vermelho, indicativa da presença de fenóis. A formação de precipitado abundante, de coloração azul escuro, indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de coloração verde, presença de taninos flobafênicos (taninos condensados).

4.6.2. Teste para antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis

Foram utilizados três tubos de ensaio contendo a mesma quantidade de solução aquosa do extrato seco. O primeiro tubo foi acidulado até pH 3; os outros dois foram alcalinizados a pH 8,5 e pH 11. A mudança de coloração nos diferentes valores de pH é indicativa da presença de vários constituintes (Tabela 1).

Tabela 4.1 – Determinação de diferentes classes de compostos, pela variação da coloração do extrato, em meio ácido ou alcalino.

Constituintes	Cor da solução		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho púrpura
Flavanonóis	-	-	Vermelho laranja

4.6.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Foram usados dois tubos de ensaio com igual quantidade de solução aquosa do extrato bruto; o primeiro foi acidulado até pH 1-3, com ácido clorídrico e o segundo foi alcalinizado até pH 11, utilizando hidróxido de sódio. Os tubos foram aquecidos, cuidadosamente, durante 2 a 3 minutos. O aparecimento ou intensificação de cor, indica a presença de constituintes especificados na tabela 2.

Tabela 4.2 –Variação da coloração do extrato bruto de actinomicetos, em meio ácido ou alcalino, indicativa da presença de diferentes classes de compostos

Constituintes	Cor da solução	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavanonas	-	Vermelho-laranja

4.6.4. Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Pequenas quantidades do extrato bruto foram dissolvidas em 2 mL de H₂O destilada, em tubos de ensaio, e adicionados alguns centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Após o final da efervescência, observou-se, por comparação com o branco, aparecimento ou intensificação de cor vermelha, sendo este indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.6.5. Teste para esteróides e triterpenóides

Uma pequena quantidade do extrato seco foi extraída com 1 a 2 mL de clorofórmio, tendo-se o cuidado de dissolver bem o resíduo; a solução clorofórmica foi filtrada lentamente, em funil com uma bolinha de algodão coberta com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro. Ao filtrado foi adicionado 1 mL de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de Liebermann-Bouchard): a coloração azul evanescente, passando para verde permanente, indica a presença de esteróides livres e a coloração parda até vermelha, indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.6.6. Teste para saponinas

O resíduo insolúvel em clorofórmio, proveniente da filtração do teste de esteróides e triterpenóides, foi colocado em um tubo de ensaio ao qual foi adicionado 5 mL de água destilada. O tubo foi agitado fortemente durante três minutos; a formação de espuma persistente e abundante é indicativa da presença de heterosídeos saponínicos.

4.6.7. Teste para alcalóides

Uma solução aquosa do extrato foi alcalinizada com hidróxido de amônia até pH 11; esta solução foi extraída sucessivamente com porções de uma solução éter-clorofórmica (3:1), para extração das bases orgânicas. As fases aquosa e éter-clorofórmica foram separadas, a fração orgânica foi re-extraída com HCl 0,1N; a fração aquosa resultante foi dividida em três tubos de ensaio aos quais foram adicionados respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides (“Hager”, “Mayer” e “Dragendorff”). A formação de precipitado em pelo menos dois tubos, indica a presença de alcalóides.

4.6.8. Teste para Bases Quaternárias

A solução aquosa privada de alcalóides, proveniente do teste anterior, foi acidulada, filtrada e dividida em três partes, às quais foram adicionados respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides (“Hager”, “Mayer” e “Dragendorff”). A formação de precipitado floculoso é indicativa de bases quaternárias.

4.6.9. Teste para quinonas

Com uma pequena quantidade do extrato, preparou-se uma solução com 5 mL de éter, em um tubo de ensaio; a esta, foram adicionados 2 mL de solução 6N de hidróxido de amônia. Agitou-se bem a mistura para obtenção de duas fases. O aparecimento da coloração vermelha na fase aquosa indica a presença de quinona.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REATIVAÇÃO DAS CULTURAS DE ACTINOMICETOS

Foram reativadas da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos (DAUFPE), 62 culturas de actinomicetos, com reconhecida atividade antifúngica, para realização dos testes de atividade *in vitro* contra as duas linhagens de *Botrytis cinerea* (Figura 5.6).



Figura 5.6 - Culturas de actinomicetos utilizadas nos testes de atividade antagônica, reativadas da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos (DAUFPE).

5.2 TESTE DO BLOCO DE GELOSE

Dos 62 isolados de actinomicetos reativados, 19 (30,7%) apresentaram atividade contra o fitopatógeno analisado, pelo teste de bloco de gelose. Destes, cinco (26,3%) mostraram halos iguais ou superiores a 40mm, para pelo menos um dos isolados testados (Tabela 3).

De um modo geral, o isolado de *Botrytis cinerea* FN-4, mostrou-se mais resistente que o FN-A, sendo que, para este último, apenas três dos actinomicetos ativos

apresentaram halos de inibição menores que os de FN-4. O isolado mais resistente (FN-4) foi escolhido para realização dos testes seguintes.

Tabela 5.3 – Atividade antifúngica de actinomicetos frente aos dois isolados de *Botrytis cinerea* (FN-A e FN-4) pelo teste do bloco de gelose.

ACTINOMICETO	<i>Botrytis cinerea</i>	
	FN-A (Ø halo em mm)	FN-4 (Ø halo em mm)
DAUFPE-7634	26	24
DAUFPE-7696	19	18
DAUFPE-7697	31	28
DAUFPE-8631 B	60	55
DAUFPE-9024	20	19
DAUFPE-9586	24	21
DAUFPE-9624	40	35
DAUFPE-11470	44	42
DAUFPE-11647	30	33
DAUFPE-11664	40	42
DAUFPE-11674	25	24
DAUFPE-11711	27	21
DAUFPE-12315	36	34
DAUFPE-12868	29	31
DAUFPE-12879	34	30
DAUFPE-13056	39	38
DAUFPE-13127	41	37
DAUFPE-14632	53	48
DAUFPE-14979	36	32

As cinco linhagens que apresentaram halos superiores a 40mm de diâmetro para o isolado FN-4 (DAUFPE-8631-B, DAUFPE-11470, DAUFPE-11664, DAUFPE-13127 e DAUFPE14632) foram selecionadas para realização dos testes de difusão em disco de papel (Figura 5.7).

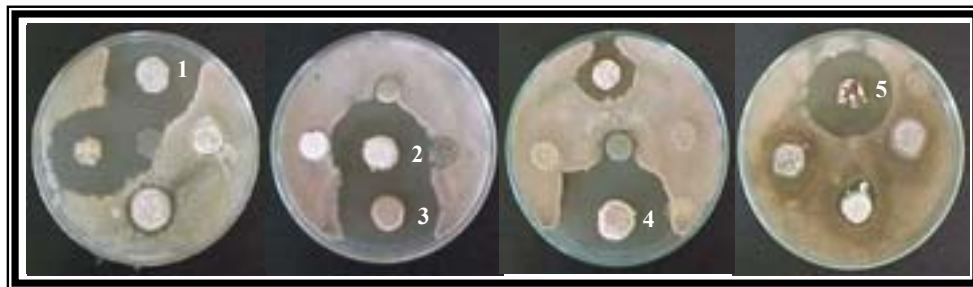


Figura 5.7 - Halos de inibição da linhagem FN-4 de *Botrytis cinerea* obtidos com os actinomicetos: 1) DAUFPE-14632; 2) DAUFPE-11470; 3) DAUFPE-11664; 4) DAUFPE-8631B; 5) DAUFPE-13127, pelo teste do bloco de gelose.

5.3 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO DE PAPEL

5.3.1. Meios convencionais

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos com as cinco linhagens de actinomicetos que apresentaram os melhores resultados no teste do bloco de gelose.

Tabela 5.4 – Atividade antifúngica dos actinomicetos frente a *Botrytis cinerea* (FN-4), pelo método de difusão em disco de papel, em diferentes tempos de fermentação e meios de produção em diâmetro do halo de inibição em (mm).

ACTINOMICETOS	MEIOS DE FERMENTAÇÃO	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (horas)					
		24	48	72	96	120	144
DAUFPE-8631B	MPE	50	57	50	60	48	44
	M1	44	54	49	59	53	47
DAUFPE-11470	MPE	41	44	47	45	43	42
	M1	38	48	49	49	42	35
DAUFPE-11664	MPE	26	43	9	44	43	28
	M1	35	40	45	43	34	26
DAUFPE-13127	MPE	31	47	17	20	20	16
	M1	26	31	17	26	23	16
DAUFPE-14632	MPE	39	47	47	50	46	42
	M1	44	36	54	45	48	44

As linhagens DAUFPE-8631B e DAUFPE-11470, destacaram-se nos meios de produção convencionais (MPE e M-1), apresentando os maiores halos nos tempos de 96 e 72 horas de fermentação, respectivamente, e foram selecionadas para os testes com os meios alternativos, à base de resíduos industriais, como fontes de carbono e nitrogênio (Figuras 5.8 e 5.9).

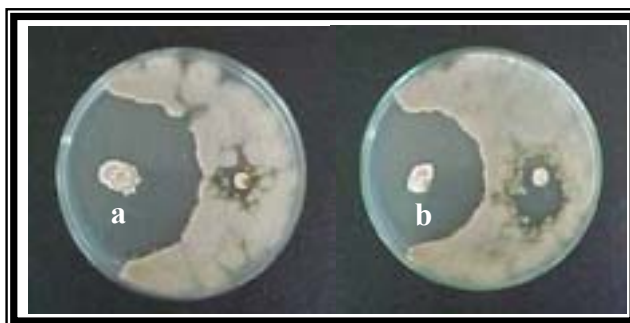


Figura 5.8 – Halos de inibição de *Botrytis cinerea* FN-4, pelo actinomiceto DAUFPE-8631-B, com 96 horas de fermentação nos meios MPE (a) e M-1 (b).

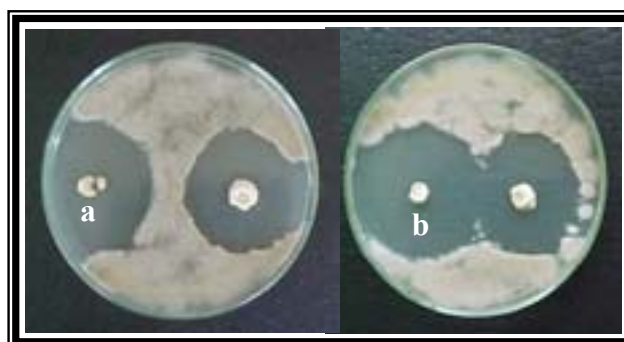


Figura 5.9 – Halos de inibição de *Botrytis cinerea* FN-4, pelo actinomiceto DAUFPE-11470, com 72 horas de fermentação nos meios MPE (a) e M-1 (b).

A cinética do crescimento das cinco linhagens selecionadas, foi acompanhada pela determinação do peso seco da massa celular Na Tabela 5 são mostrados os resultados da produção de massa celular, ao longo das 144 horas de fermentação, nos meios de fermentação MPE e M-1.

Tabela 5.5 – Produção de massa celular no mosto fermentado dos actinomicetos, em diferentes meios de produção e tempos de fermentação nos meios convencionais em g/mL.

ACTINOMICETOS	MEIO DE FERMENTAÇÃO	TEMPO DE FERMENTAÇÃO					
		(horas)					
		24	48	72	96	120	144
DAUFPE-8631-B	MPE	0,0142	0,0248	0,0695	0,1059	0,1011	0,0084
	M-1	0,0088	0,0118	0,0142	0,0367	0,0338	0,0333
DAUFPE-11470	MPE	0,0125	0,0169	0,0180	0,0102	0,0110	0,0150
	M-1	0,0060	0,0048	0,0093	0,0015	0,0042	0,0050
DAUFPE-11664	MPE	0,0245	0,0148	0,0134	0,0373	0,0731	0,0111
	M-1	0,0044	0,0067	0,0090	0,0876	0,0060	0,0041
DAUFPE-13127	MPE	0,0147	0,0087	0,0142	0,0082	0,0113	0,0125
	M-1	0,0020	0,0032	0,0040	0,0033	0,0063	0,0062
DAUFPE-14632	MPE	0,0169	0,0371	0,1239	0,0980	0,0486	0,0411
	M-1	0,0385	0,0121	0,0837	0,0640	0,0057	0,0116

A linhagem DAUFPE-11470 apresentou maior produção de massa com 72 horas de fermentação.

Para melhor visualização dos resultados, realizou-se uma comparação entre a atividade antifúngica e a produção de massa celular das linhagens DAUFPE-8631B (Figuras 5.10 e 5.11) e DAUFPE-11470 (Figuras 5.12 e 5.13), nos dois meios de fermentação convencionais.

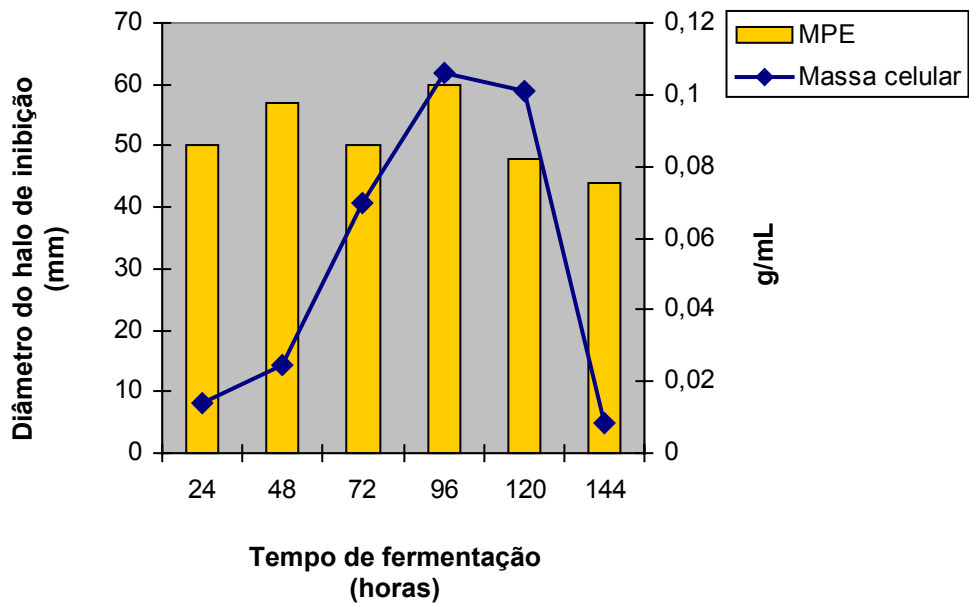


Figura 5.10 – Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-8631B, frente ao isolado FN-4 de *Botrytis cinerea*, no meio MPE, em diferentes tempos de fermentação.

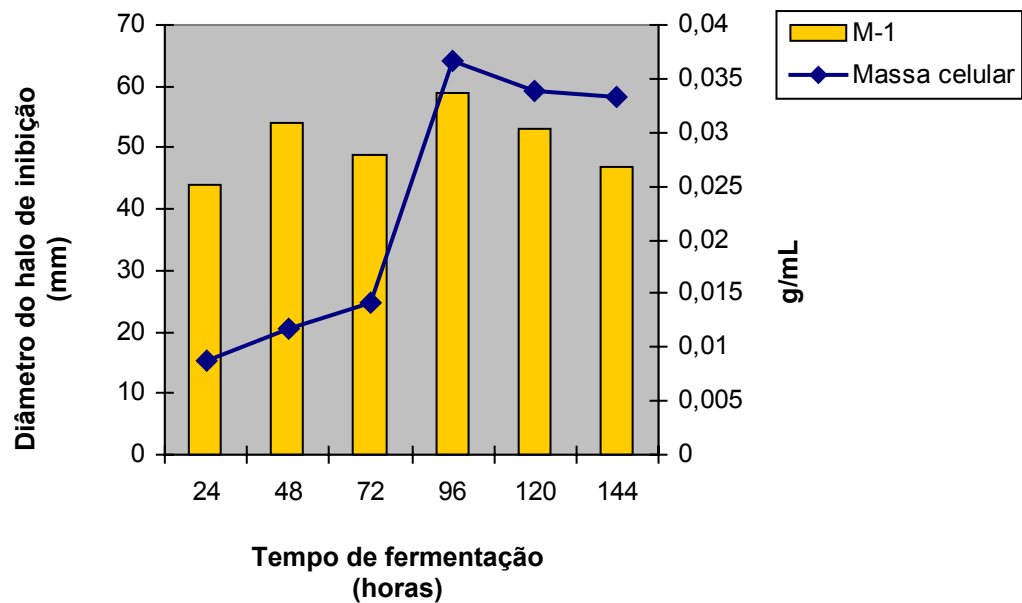


Figura 5.11 – Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-8631B, frente ao isolado FN-4 de *Botrytis cinerea*, no meio M-1, em diferentes tempos de fermentação.

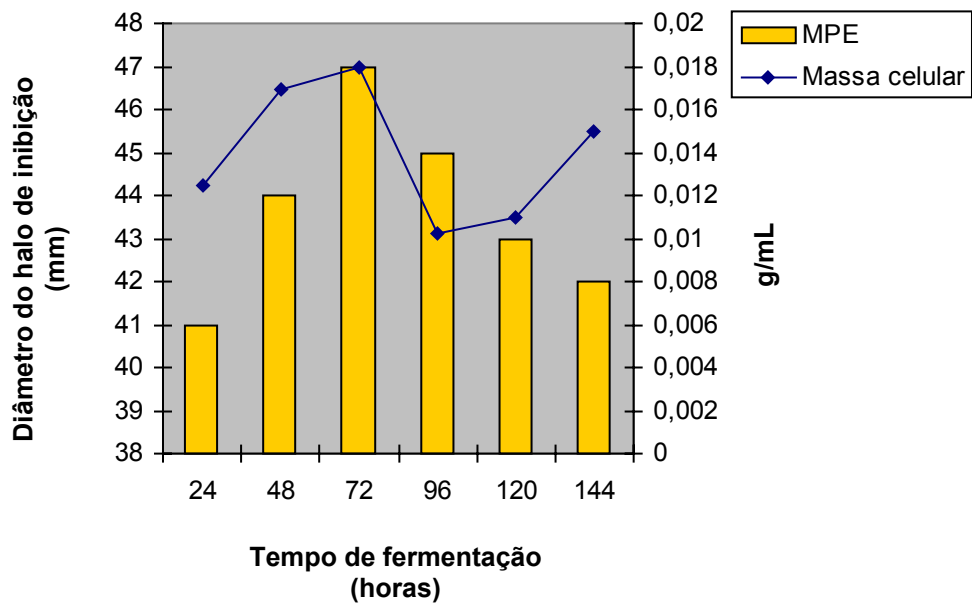


Figura 5.12 – Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-11470, frente ao isolado FN-4 de *Botrytis cinerea*, no meio MPE, em diferentes tempos de fermentação.

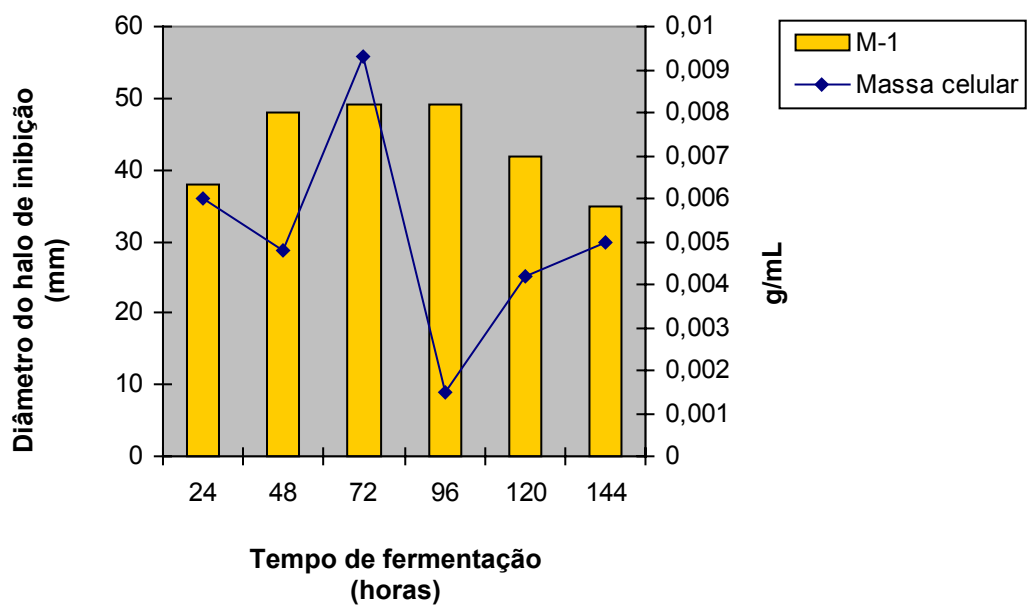


Figura 5.13 – Relação entre a atividade antifúngica e a massa celular da actinomiceto DAUFPE-11470, frente ao isolado FN-4 de *Botrytis cinerea*, no meio M-1, em diferentes tempos de fermentação.

Analisando-se os gráficos acima, observa-se que, tanto para a linhagem DAUFPE-8631B quanto para DAUFPE-11470, os picos de atividade coincidem com aqueles de produção de biomassa, comprovando a presença do princípio ativo na massa celular.

A Tabela 5.6 mostra a variação do pH do mosto fermentado das cinco linhagens de actinomiceto, de acordo com o tempo de fermentação e com o meio de produção utilizado.

Tabela 5.6 - Variação do pH no mosto fermentado de diferentes linhagens de actinomicetos, em diferentes tempos de fermentação, nos meios de produção convencionais.

ACTINOMICETOS	MEIOS DE FERMENTAÇÃO	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (HORAS)						
		0	24	48	72	96	120	144
DAUFPE-8631-B	MPE M-1	7,0	4,4	4,8	4,6	5,3	6,7	7,9
		7,0	5,2	5,4	5,8	6,4	7,4	7,3
DAUFPE-11470	MPE M-1	7,0	6,8	5,9	4,6	4,4	4,7	5,2
		7,0	6,9	6,5	7,5	7,7	8,3	8,2
DAUFPE-11664	MPE M-1	7,0	6,0	6,0	5,8	6,5	7,1	8,4
		7,0	6,7	5,5	6,2	5,5	7,4	7,3
DAUFPE-13127	MPE M-1	7,0	7,2	6,8	6,1	6,9	7,2	7,1
		7,0	7,3	7,4	7,2	7,1	7,3	7,1
DAUFPE-14632	MPE M-1	7,0	4,6	5,2	4,5	6,7	7,0	7,2
		7,0	5,2	6,0	6,7	7,2	7,2	6,6

A maioria das linhagens apresentou um aumento do pH com o decorrer da fermentação, porém a melhor atividade ocorreu no intervalo de 72 a 96 horas, não encontrando-se uma relação entre a maior produção do princípio ativo e a variação do pH.

5.3.2. Meios alternativos

Das cinco linhagens testadas, DAUFPE-8631B e DAUFPE-11470 apresentaram os maiores halos de inibição, nos meios MPE e M-1, respectivamente, e foram selecionadas para a realização dos testes com meios de produção alternativos (Tabela 5.7) e caracterização taxonômica a nível de gênero.

Tabela 5.7 – Atividade antifúngica dos *Streptomyces* DAUFPE-8631-B e DAUFPE-11470 frente a *Botrytis cinerea* (FN-4), pelo método de difusão em disco de papel, em diferentes meios de produção à base de resíduos industriais no tempo de 96 e 72 horas de fermentação, respectivamente, em diâmetro do halo de inibição (mm).

MEIOS ALTERNATIVOS	CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO	HALOS DE INIBIÇÃO	
		DAUFPE-8631-B	DAUFPE-11470
C 1	0,014%p/v	32	39
C 2	0,085%p/v	32	33
C 3	0,041%p/v	36	32
Mi 1	0,085%p/v	31	27
Mi 2	0,041%p/v	42	55

Dentre os meios alternativos formulados, destacou-se o Mi 2, cuja concentração de nitrogênio é equivalente ao meio convencional M-1, tanto para o *Streptomyces* DAUFPE-8631-B (96 horas de fermentação) como para o DAUFPE-11470 (72 horas de fermentação). Embora os halos de inibição tenham sido ligeiramente menores nos meios alternativos (Figura 5.14), em comparação aos meios convencionais MPE e M-1 (Figura 5.9), pode-se afirmar que os resíduos industriais testados, especialmente a milhocina, podem substituir a farinha de soja como fonte de nitrogênio em meios de produção de antibióticos por *Streptomyces* sp. Tais resultados oferecem uma alternativa para minimizar os problemas encontrados na extração do princípio ativo, causados pelo óleo presente nos meios à base de soja.

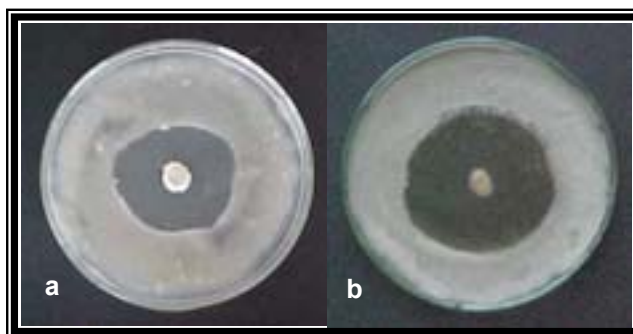


Figura 5.14 – Halos de inibição de *Botrytis cinerea* FN-4, pelos actinomicetos DAUFPE-8631-B (a) e DAUFPE-11470 (b), no meio de fermentação Mi-2.

5.4. Prova de Unidade de Waksman

O teste da Unidade de Waksman mostrou que não houve inibição do crescimento do fitopatógeno em nenhuma das placas semeadas onde foram colocadas alíquotas de diferentes volumes do líquido metabólico dos actinomicetos, evidenciando que o princípio ativo não está presente no líquido metabólico e sim na massa micelial (Figura 5.15).

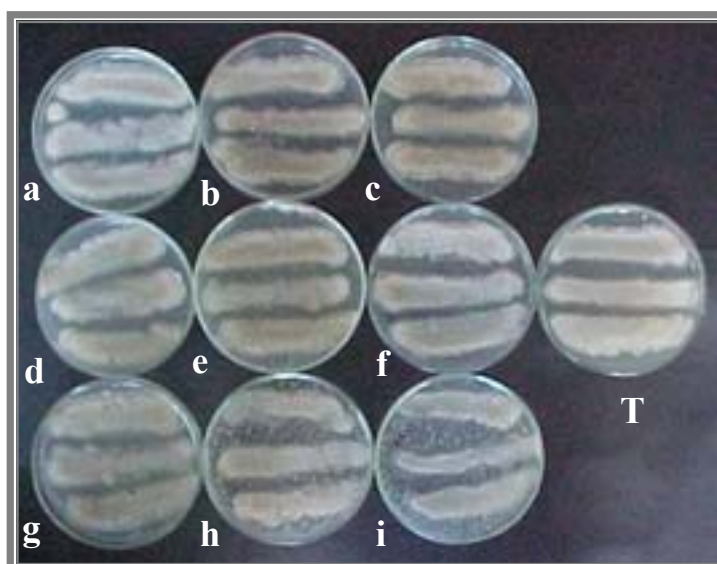


Figura 5.15 – Crescimento de *Botrytis cinerea* (FN-4) , em meio BDA contendo alíquotas de diferentes volumes do líquido metabólico do actinomiceto DAUFPE-8631B, com 96 horas de fermentação no meio MPE: a) 0,01 mL; b) 0,02 mL; c) 0,03 mL; d) 0,05 mL; e) 0,1 mL; f) 0,2 mL; g) 0,3 mL; h) 0,5 mL; i) 1,0 mL; T) Testemunho (sem adição do líquido metabólico).

5.5 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA

5.5.1. Análise micromorfológica

A observação da presença de cadeias de conídios em espirais no micélio aéreo, crescido sobre a superfície da lamínula, indica que os actinomicetos DAUFPE-8631-B e DAUFPE-11470 pertencem, provavelmente, ao gênero *Streptomyces* (Figuras 5.16 e 5.17). A identificação foi confirmada pela identificação do isômero LL-DAP, pela cromatografia em camada delgada.

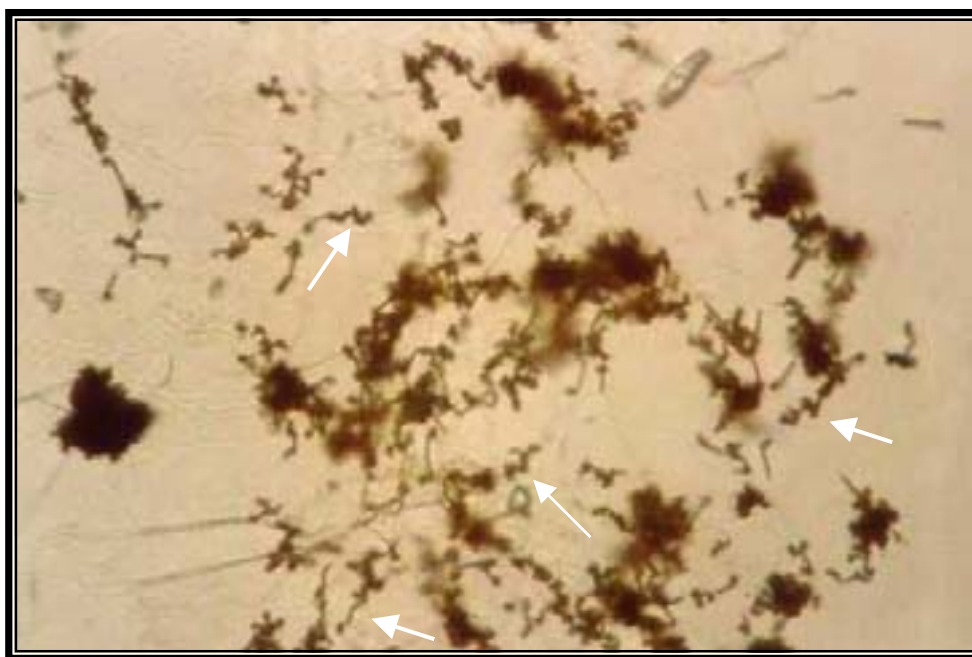


Figura 5.16 – Micromorfologia do actinomiceto DAUFPE-8631-B, em meio ISP-2; as setas mostram espirais típicas do gênero *Streptomyces*.

Na Figura 5.18 pode-se observar o R_f do ácido diaminopimélico (DAP) presente na parede celular do actinomiceto DAUFPE-8631B, comparado aos R_f s do DAP de *Streptomyces* (forma LL-DAP) e *Nocardia* (forma meso-DAP).

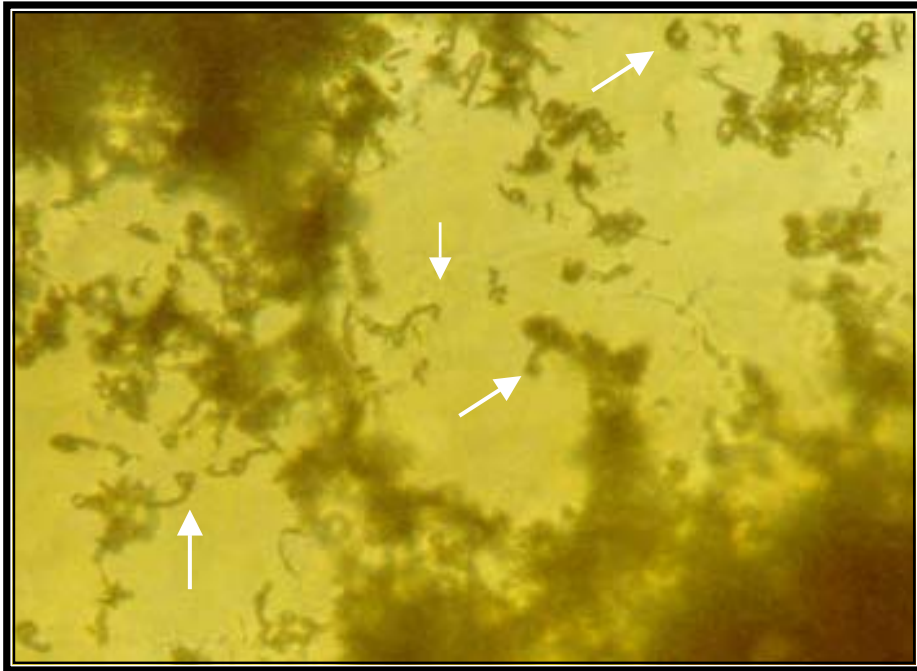


Figura 5.17 – Micromorfologia do actinomiceto DAUFPE-11470, em meio ISP-2; as setas mostram espirais típicas do gênero *Streptomyces*.

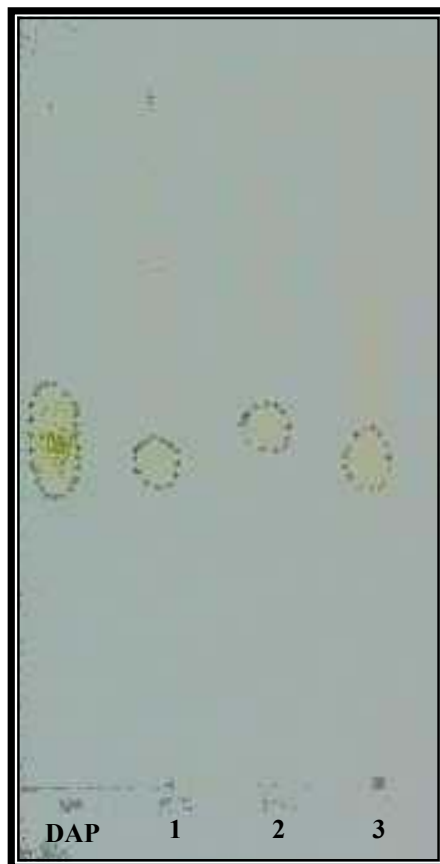


Figura 5.18 – Cromatografia em camada delgada da parede celular do actinomiceto DAUFPE-8631-B: DAP) Ácido diaminopimérico; 1) *Streptomyces* sp; 2) *Nocardia* sp; 3) DAUFPE-8631B.

5.6. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos brutos da massa micelial da linhagem de *Streptomyces* DAUFPE-8631B não apresentaram atividade contra o isolado FN-4 de *Botrytis cinerea*, o que permite pensar que o princípio ativo não foi extraído por qualquer dos solventes utilizados. Tal fato pode ser explicado, provavelmente, pelo tamanho da molécula da substância ativa, e requer estudos aprofundados, envolvendo permeabilização da membrana celular.

Entre os extratos da massa micelial do *Streptomyces* DAUFPE-11470, o extrato etanólico em pH 7, foi o que apresentou melhor atividade frente ao *B. cinerea*, e foi produzido em maior escala, para determinação das classes de compostos. Outro parâmetro utilizado para a escolha desta linhagem, foi a maior produção de massa micelial com 72 horas de fermentação. Silva (2002), obteve resultados semelhantes, ao testar esta linhagem frente a *Lasioidiplodia theobromae*.

5.7. Determinação das classes de compostos

O extrato etanólico da massa micelial em pH 7 do *Streptomyces* DAUFPE-11470 foi submetido a uma triagem para determinação das classes de compostos presentes no mesmo.

Os testes para determinação das diferentes classes de compostos, permitiram identificar a presença de fenóis, flavononas, flavonóis e xantonas e bases quaternárias (Tabela 5.8). A atividade antifúngica encontrada, provavelmente está relacionada com a presença de fenóis e/ou flavonóis. Cardoso Filho (2003) cita uma possível atividade antiviral e antifúngica de alguns compostos fenólicos, entre eles os flavonóides, e sua possível utilização no controle de fitopatógenos.

Tabela 5.8 – Classes de compostos presentes no extrato etanólico do *Streptomyces* DAUFPE-11470.

CLASSES DE COMPOSTOS	EXTRATO ETANÓLICO
Fenóis	+ (pardo claro)
Taninos pirogálicos	-
Taninos flobafênicos	-
Antocianinas e Antocianidinas	ácido (-) / básica (-)
Flavononas, flavonóis e xantonas	+
Chalconas e auronas	ácido (-) / básica (-)
Flavanonóis	-
Leucoantocianidinas	ácido (-)
Catequinas	-
Flavanonas	-
Alcalóides	-
Bases quaternárias	+
Quinonas	-
Triterpenóides	-
Esteróides	-
Saponinas	-

+ = presente

- = ausente

6. CONCLUSÕES

- Dos 62 actinomicetos testados, 19 foram ativos contra os isolados FN-A e FN-4 de *Botrytis cinerea* pelo teste do bloco de gelose. As linhagens DAUFPE-8631-B, DAUFPE-11470, DAUFPE-11664, DAUFPE-13127 e DAUFPE-14632 apresentando halos iguais ou superiores a 40mm, sendo estas selecionadas para o teste de difusão em disco.
- O isolado FN-4 de *Botrytis cinerea* mostrou-se mais resistente para a maioria dos actinomicetos ativos.
- Os actinomicetos DAUFPE-8631B e DAUFPE-11470 destacaram-se nos meios de produção convencionais (MPE e M-1), apresentando os maiores halos nos tempos de 96 e 72 horas de fermentação, respectivamente, sendo selecionados para os testes com os meios alternativos à base de resíduos industriais;
- Nos ensaios com os meios alternativos, o meio que apresentou os melhores resultados foi o MILHOCINA-2 (Mi-2), para as duas linhagens de actinomiceto;
- As linhagens DAUFPE-8631-B e DAUFPE-11470 pertencem ao gênero *Streptomyces*;
- O aproveitamento de resíduos da indústria de milho é uma alternativa viável como fonte de nitrogênio em meios para produção de princípios ativos antifúngicos por *Streptomyces* sp.
- A atividade antifúngica do *Streptomyces* sp. DAUFPE-11470 está relacionada, provavelmente, com fenóis e flavonóis presentes no extrato bruto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. **In:** MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L, ed. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 351-367, 1998.

BAUER, A. M.; KIRBY, M. N.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. D. Antibiotics susceptibility teste by a atandardized single disk method. **American Jounal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

CAMPOS TAKAKI, G.; RIOS, E. M. M.; ALBUQUERQUE, M. Griseocarnin um antibiótico isolado do *Streptoverticillium griseocarneum* (IAA-7527) **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 14, p. 91-100, 1974.

CAMPOS-TAKAKI, G. & DIETRICH, S. M. C. Uso do antibiótico polioxina D no estudo da composição da parede celular de *Achlva radios*a (Oomycetes) **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife, v. 21, p. 81, 1982.

CAPPELLINI, R. A.; CEPONIS, M. J. Postharvest losses in fresh fruits and vegetables: Postharvest losses in perishable crops. **In:** MOLINE, H. E. (Ed). **Postharvest pathology of fruits and vegetables: Postharvest losses in perishable crops**. Berkeley: University of California Agricultural Experiment Station, p. 24-30, 1984.

CARDOSO FILHO, J. A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (teleomosfo: *Guignardia citricarpa*). **Tese de Doutorado em Agronomia da Escola Superior de Agronomia da Universidade de São Paulo**, Piracicaba –SP, 145p., 2003.

CHOUDHURY, M. M. Uva de mesa – Pós-colheita. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 55p., 2001.

COOK, R. J. & BAKER, K. F. Nature and practice of biological control of plant pathogens. **St. Paul. APS Press.** 85 p., 1983.

COURSEY, D G. Post-Harvest losses in perishable foods of the developing world: **In:** MORRIS, L. (Ed). **Post-harvest physiology and crop preservation.** New York: Plenum, p. 485-513, 1983.

ECKERT, J. W. Postharvest disease os fresh fruits and vegetables – Etiology and control. **In:** HAARD, N. F. & SALUNKHE, D.K. (Eds.). **Postharvest biology and handling of fruits and vegetables.** Westport: The Avi, p. 81-117, 1980.

EICHHORN, W. & LORENZ, M. Actinomycetes enzymes. **In.:** Goodfellow, M.; Williams, S. T. Mordarski, M. (eds). **Actinomycetes in biotechnology.** Academic Press,London, p. 219-283, 1984.

FURTADO, V. C. Estudos Preliminares da Produção de Antibiótico e Caracterização Parcial do Actinomiceto Isolado da Zona da Mata de Pernambuco. **Dissertação de Mestrado do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.** Recife-PE, 2001.

GOMES, M. S. O. Conservação Pós-colheita: Frutas e Hortaliças. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – SPI,** Brasília, Brasil, 1996.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A. & SÔNEGO, O. R. Principais doenças fúngicas da videira no Brasil, **Circular técnica n^o. 17,** Embrapa – CNPUV, 52 p., Out. 1993.

[HTTP://WWW. SCALET.EMBRAPA.BR.](http://www.scalet.embrapa.br) Acessado em 02/10/2003.

[HTTP://WWW.UFPEL.TCHE.BR/FAEM/HERBARIO/FRUTEIRAS.](http://www.ufpel.tcche.br/faem/herbario/fruteiras) Acessado em 26/09/2003 .

HURST, A. Nisin. **Advances Applied Microbiology** New York, v. 27, p. 85-123. 1981.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strains by the agar piece method and the prothotroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224. 1971.

ISONO, K., MAGATSU, J. KAWASHIMA, Y.; SUZUKI, S. – Studies on Polyoxins, antifungal antibiotics. I. Isolation and characterization of Polyoxins, A and B. **Agronomic Biological Chemistry**, 29: 848-854, 1965.

ISONO, K., MAGATSU, J. KAWASHIMA, Y.; SUZUKI, S. – Studies on Polyoxins, antifungal antibiotics. I. Isolation and characterization of Polyoxins C, D, E, F, G, H, and I. **Agronomic Biological Chemistry**, 31: 190-199, 1967.

KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPPEU, T.; ARIMA,. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, Tokio, v. 29, n. 3, p. 242-247, 1976.

KIMATI, H. & GALLI, F. Doenças da Videira. In: **Manual de Fitopatologia; Doenças das plantas cultivadas**. 2. ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, 1980.

KURYLOWICZ, W.; Antibióticos-Uma Revisão Crítica. Recife: Editora da Universidade Federal de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, p. 341, 1981.

KURYLOWICZ, W.; KURZATKOWSKI, W.; WOZNICKA, W.; PASZKIEWICZ, a; POLOWNIAK-PRACKA, H.; Ultrastructure of actinomycetes and fungi during biosynthesis of antibiotics. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, vol.19 n. (1/2), 1979.

KÜSTER, E. Outline of a comparative study criteria used in characterization of the Actinomycetes. **International Bulletin of Bacteriology**, v. 9, p. 98-104, 1959.

KÜSTER, E. & WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, London, v. 202, p. 928-929, 1964.

LANCINI, G. & LORENZETTI, R. (e.d.s.) Biotecnology of antibiotic and other bioactive microbial metabolic. **Plenum Press**. New York, p. 29-33, 1993.

LANCINI, G.; PARENT, F.; GALLO, G. (e. d. s.) Resistance of microorganismis to antibiotics. A multidiciplinary Approach. **Plenum Press**, p. 85-106, 1995.

LECHEVALIER,H.A.;LECHEVALIER,M.P. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, V. 20, p. 435-443, 1979.

MALAVOLTA, C.; SEGURA, D.; SANCHEZ, S. Sintesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundários produzidos por microorganismos. **Revista Latino Americana**, v. 36, p. 39-158, 1998.

MARIANO, R. L. R.; SILVA, E. C.; SENA, K. X. F. R. Controle biológico de bactérias fitopatogênicas pelo uso de actinomicetos. **Cadernos Omega**, Série Agrônômica, Recife, v. 4, p. 19-27, 1993.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica experimental**, 2^a ed. Ceará: Universidade Federal do Ceará, 1997. 141p.

MATSUURA, T. **Ocorrência de Actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*)**. Tese. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, 1998.

MELLO, B. R. **Catálogo da Coleção de Microrganismos**, v. 2, ed. Recife: Universitária, 1988, 140 p.

MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos** (1998). IN: Melo, I. S. & Azevedo. Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. v.1. 1998, 65p.

MOTOMURA, M. & HIROOKA, E. Y. Antifungal substance producing microorganisms with perspective of application in *Fusarium moniliforme* control. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 2, p. 471-479. 1996.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. D. S.; NEVES, M. C. P. Bioassay for massal assessing of antagonistic actinomycetes against *Ralstonia solanacearum* on yomato crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 2065-2072. 1998.

OKAMI, Y. & HOTTA, K. Search and discovery of New Antibiotics. **In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDANSKI, M. Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic Press Inc., p. 89-120, 1988.

PEREIRA, J. C. **Populações de actinomicetos como compostos da comunidade bacteriana nos solos**. Colhido na internet, site www.cnpad.gov.br 2001.

PIZZINATO, M. A.; SOAVE, J.; CIA, E. Patogenicidade de *Botryodiplodia theobromae* Pat. a plantas de diferentes idades e maçãs de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Fitologia Brasileira**, Brasília v. 8, p. 223-228, jun., Suplemento, 1983.

PRIDHAM, T. G. & GOTTLIEB, D. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetes as na aid for epecies determination. **Journal of Bacteriology**. Baltimore, v. 56. p. 107-114, 1948.

PRIDHAM, T. G. & LYONS, A. J. Jr. *Streptomyces albus* (Rossi Doria) Waksman & Henrici: Taxonomic study of strains labeled *Streptomyces albus*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, p. 431-441, 1961.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENECICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, New York, p. 947-953. 1957.

QUEENER, S. W.; DAY, L. E. Antibiotic-producing *Streptomyces*. **In: GUNSALUS, I. C. ed. The Bacteria**. Orlando: Academic Press Inc. Vol. IX, p. 3-4. 1986.

RIBEIRO, I. J. A.; PARADELA FILHO, O.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Uma nova doença da videira. **Summa phytopatologica**, Piracicaba, v. 18, p. 30, jan./mar, 1992.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 16(3): 313-340, 1966.

SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultivars of *Streptomyces* II. Species description from first study. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, 18: 69-189. 1968.

SILVA, E. C.; SENA, K. X. DA F. R.; ANDRADE, M. S. A. S.; OLIVEIRA, T. J. G.; FILHO, A. A. S. Primeiras observações sobre o antagonismo *in vitro* do *Streptomyces* sp. IA-10493 dirigido a fungos fitopatogênicos. **Revista do Instituto de Antibióticos**. p. 121-125, Recife, 1984.

SILVA, E. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; ALBUQUERQUE, M. C. R. Ação do antibiótico Griseocarnin em fungos fitopatogênicos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 21, p. 113-125. 1989.

SILVA, R. M. Avaliação da patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* a frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) e atividade antagônica de actinomicetos no controle da Lasiodiplodiose. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife-PE, 61 p., 2002.

SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. & HENRIQUES, R. M. V. Aplicação de um isolado antagônico de *Trichoderma* sp. no controle biológico e integrado da podridão cinzenta em videira. Resumo, 4^o **SICONBIOL** p. 55 1994.

SOUZA, F. J. N. **Obtenção por tratamento com N-metil C. N. *Streptomyces capoaemus* DAUFPE-M3123 produtor do complexo ciclâmico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, 1993.

STANECK, J. L. & ROBERTS, G. D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin layer chromatography. **Applied Microbiology**, 28: 226-231, 2000.

TAKAKI, G. M. C. *et al.* Comparison of Antibacterial and Antifungal Activities of Lapachol and β - Lapachone **Planta Medica** v.60, p. 373-374, 1994.

TAVARES, S. C. C. H.; MENEZES, M. Infecção *Botryodiplodia theobromae* em Mangueira através ou não de ferimentos no semi-árido do nordeste brasileiro. **Revista de Fruticultura brasileira**, Cruz das Almas, v. 13, n. 4, p., out. 1991.

TAVARES, S. C. C. H.; AMORIM, L. R. Levantamento de *Botryodiplodia theobromae* em Áreas Irrigadas do Trópico Semi-Árido Brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**. v. 20, p. 326, 1995.

TAVARES, S. C. C. H.; MELO, G. C.; PEREZ, J. O.; SILVA, W. A. & KARASAWA, M. Fontes de resistência de videira no oídio no Nordeste brasileiro. **Revista de Fruticultura**, Curitiba, p. 399, 1996.

TAVARES, S. C. C. H.; Doenças fungicidas, bacterianas e por nematóide na videira no Vale de São Francisco e alternativas de controle. **Seminário sobre cultivo de uva sem semente no Vale de São Francisco para pequenos produtores irrigantes**, EMBRAPA, Semi-Árido, Petrolina, 67 p., 2000.

TIMS, E. C. – An actinomycete antagonist to a *Phytophthora* root parasite of sugar cane (cane). **Phytopathology**, p. 22-27, 1932.

VANDAMME, E. J. Antibiotic search and production: An Overview. **In: VANDAMME, E. J.; DEKKER, M. Biotechnology of Industrial**, New York: inc., p. 3-31, 1984.

YUAN, W.; CRAWFORD, L. D. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108, as a potential biocontrol agent fungal root and seed. **Review Applied**, v. 61, n. 8, p. 3119-3128. 1995.

WAKSMAN, S. A.; REILLY, H. C. Microbial antagonisms and antibiotic substances.
Editions Comman on Wealt Fundation, Inengthem Canalyt. Ed., New York: inc., p.
556, 1945.

8. ANEXOS

8.1. MEIOS DE CULTURA

BDA (batata-dextrose-Agar) – Mello et al., 1988).

Infuso de batata.....	4,0g
Dextrose.....	20,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,2

ISP-2: Extrato de malte – Extrato de levedura ágar (Pridham *et al*; 1957).

Extrato de levedura.....	4,0g
Extrato de malte.....	10,0g
Dextrose.....	4,0g
Agar.....	15,0g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,2

MPE (Meio para produção de eurimicina) (Kawamura, 1976)

Farinha de soja.....	20,0g
Glicose.....	20,0g
CaCO ₃	2,0g
NaCl.....	5,0g
Água destilada.....	1000 ml

pH 6,7 – 7,0

M-1 (Kawamura, 1976)

Farinha de soja.....	10,0g
Glicose.....	10,0g
CaCO ₃	5,0g
NaCl.....	1,0g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,0

ISP-1 (Tryptona - Extrato de levedura) Pridham e Gottlieb, 1948.

Tryptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,0 – 7,2

ISP-3 (Ágar – Farinha de Aveia) Kuster & Williams, 1964

Farinha de Aveia.....	20,0 g
Solução de traços de sais.....	1,0 g
Ágar.....	18,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,2

CAA (Ágar Caseína Amido) Kuster & Williams, 1964

Amido.....	10,0 g
Caseína.....	0,3 g
Nitrato de potássio.....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	2,0 g
Fosfato hidrogenado dipotássico.....	2,0 g
Sulfato de Magnésio.....	0,05 g
Carbonato de Cálcio.....	0,02 g
Sulfato ferroso.....	0,01 g
Ágar.....	25 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,0 – 7,4

ISP-4 (Sais inorgânicos – amido - ágar)

Amido solúvel.....	20,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2,0 g
NaCl.....	2,0 g
(NH ₄). 2 SO ₄	4,0 g
CaCO ₃	4,0 g
Água destilada.....	1000 ml
Solução de traços de sais.....	2,0 ml
Ágar.....	15,0 g

PH 7,0 – 7,4

Meios de cultura alternativos

MILHOCINA- 1

Milhocina (0,085%de nitrogênio).....	22,0 ml
Glicose.....	20,0 g
NaCl.....	10,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Água Destilada.....	1000 ml

pH=7,0

MILHOCINA- 2 (50% da concentração do milhocina-1)

Milhocina(0,085% de nitrogênio).....	11,0 ml
Glicose.....	10,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCO ₃	1,0 g
Água Destilada.....	1000 ml

pH=7,0

CEVADA- 1

Cevada (0,0056% de nitrogênio).....	1000 ml
Glicose.....	20,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCO ₃	2,0g

pH=7,0

CEVADA- 2 (concentrada)

Cevada Concentrada.(0,085% de nitrogênio).....	22,0 ml
Glicose.....	20,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Água Destilada.....	1000 ml

pH=7,0

CEVADA-3 (50% do cevada-2)

Cevada concentrada (0,085% de nitrogênio).....	11,0 ml
Glicose.....	10,0 g
NaCl.....	5,0 g
CaCO ₃	1,0 g
Água Destilada.....	1000 ml

pH=7,0

8.2. LAUDOS DE DOSAGENS DE NITROGÊNIO



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 185.316

Recife, 03 de abril de 2003

NATUREZA DO TRABALHO: Diversas de nitrogênio total.

MATERIAL : Quatro (04) amostras ref.: "MPE ; M1; Cevada; Milhocina", coletadas e remetidas pelo cliente aos 02/03/2003.

CLIENTE : FADE - FUNDAÇÃO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DA UFPE.

R E S U L T A D O S

DETERMINAÇÃO	Amostras(s)			
	MPE	M1	Milhocina	Cevada
Nitrogênio total (em N)	0,085 % p/v	0,041 % p/v	3,87 % p/v	0,006 % p/v

Obs.: O sódio e potássio foram determinados por Fotometria de Chama.

Os demais metais determinados por Spectrometria de Emissão Atômica em Plasma indutivamente acoplado.

Métodos de Análise:

- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz : métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Vol. 1. 3. ed. São Paulo, 1985.
- Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Derivados. Vol. II - métodos físicos e químicos. LANARA - Ministério da Agricultura. Brasília - DF, 1981.

Ana Maria L. M. Arnaud
Engenheira Química
CRQ. 01.301.517 - PE

DOB-LMFQA - 50 a 53

O.S. nº 0590/2003

NOTA IMPORTANTE

Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam (ão somente a(s) amostra(s) coletada(s) pelo cliente.

lops/.

F.L 1/1

INSTITUTO TECNOLÓGICO DO ESTADO DE PERNAMBUCO - ITEP

Av. Prof. Luiz Freire, 700 - Cidade Universitária - Recife - PE - CEP: 50.740-540
FAX: (0**81) 3272.4399 FAX: (0**81) 3272.4272 www.itep.br e-mail: itep@itep.br



RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 186.043

Recife, 20 de maio de 2003

NATUREZA DO TRABALHO: Determinação de nitrogênio total

MATERIAL: Uma (01) amostra Ref: "Cevada -3", coletada e remetida pelo cliente em 09/05/2003.

CLIENTE: FUNDAÇÃO DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DA UFPE -FADE

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO	AMOSTRA
	Cevada - 3
Nitrogênio total (em N)	0,014 % p/v

Métodos de Análise:

- Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. Vol. 1, 3. ed. São Paulo, 1985.
- Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Derivados. Vol. II - métodos físicos e químicos. LANARA - Ministério da Agricultura. Brasília - DF, 1981.

Sônia Valéria Pereira
Química Industrial
CRQ 01.201.917 - PE

DOB-LMFQA - 118

O.S nº 0991/2003

NOTA IMPORTANTE

Os resultados deste ensaio/análise têm significação restrita e se aplicam tão somente a(s) amostra(s) coletada(s) pelo cliente.

pmom/

FL 1/1

INSTITUTO TECNOLÓGICO DO ESTADO DE PERNAMBUCO - ITEP

Av. Prof. Lutz Freire, 700 - Cidade Universitária - Recife - PE - CEP. 50.740-540
PABX. (0**81) 3272.4399. FAX: (0**81) 3272.4272. www.itep.br e-mail: itep@itep.br

8.3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Utilization of industrial residues for the production of antifungal antibiotics for actinomycetes

Sibele R. de Oliveira; Alda A. Chiappeta*; Janete Magali de Araújo; Késia X. R. F. de Sena
Department of Antibiotics, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil.

*Author for correspondence (Fax: 002181 32718346; E-mail: alda@ufpe.br)

Abstract

The utilization of industrial residues of the industries of beer and corn was evaluated as substitutes of carbon and nitrogen sources utilized in the fermentation of *Streptomyces* sp (DAUFPE-8631-B and DAUFPE-11470). This evaluation was performed in order to obtain more efficient and economic production media for the bioactive substance against *Botrytis cinerea*, the fungal cause of gray mold in grapevines. The tested residues can substitute soy flour in media for antibiotics production by *Streptomyces* sp.

Key words: actinomycetes, antifungal activity, biological control, *Botrytis cinerea*, industrial residues.

INTRODUCTION

Actinomycetes are differentiated from other bacteria as the principal producers of bioactive compounds of high commercial and medicinal value (Araújo, 1998). Of the antibiotics produced by microorganisms, approximately 6,000 are originate from actinomycetes and 75% of these are produced from the genus *Streptomyces* (Okami & Hotta, 1998; Lancini & Lorenzetti, 1993). Research has been developed aimed the viable utilization of these microorganisms as a biotechnological alternative for the control of phytopathogenic fungus in order to obtain agricultural products without diseases.

The fermentation of actinomycetes for the production of bioactive substances is performed routinely in media containing soy flour as the carbon and nitrogen source. However, the high level of soy oil makes the extraction of the bioactive substance difficult, demanding additional phases that make the process more expensive.

This research evaluates the utilization potential of industrial residues from beer (barley flour) and corn (“milhocina”) in substitution for the soy flour in media production of the bioactive substance by *Streptomyces* spp against the fungus *Botrytis cinerea*. The objective is to offer a more economic production alternative and more rational utilization of industrial sub-products.

Botrytis cinerea, a phytopathogen that causes gray mold, an important grapevine disease, which in favorable climactic conditions for its development, incite the loss of over 50% of susceptible varieties. The damages are characterized by rotting clusters in the pre-harvest which also constitute potential loss in post harvest due to the rapid dissemination to adjacent clusters (Silva-Ribeiro *et al.* 1994).

MATERIAL AND METHODS

Two lineages of *Streptomyces* spp were tested (DAUFPE – 8631-B and DAUFPE – 11470), belonging to the Collection of Microorganisms of the Department of Antibiotics of the Federal University of Pernambuco, Brazil (DAUFPE), against an isolate of *Botrytis cinerea* (FN-4) provided by Micoteca of the Department of Phytosanitation of the Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

The industrial residues tested were barley flour, derived from the industries of beer and “milhocina”, a sub-product of the corn starch industry

Tests of antagonistic activity *in vitro*

The antagonistic activity of actinomycetes against *Botrytis cinerea* was evaluated, *in vitro*, by method of diffusion using paper discs (Bauer *et al.* 1966) in culture medium BDA (potato dextrose agar).

Recent cultures of *Streptomyces* were inoculated on fermentation media and cultivated shaken at 200 rpm, at 28-30 °C. Aliquots of the fermentation were taken and tested every 24 hours until the decline of activity (144 hours). A standardized suspension of the phytopathogen was sown on Petri dishes containing BDA with the Drigalsky loop. Discs of syrup paper (6mm in diameter) were soaked with 20 µL of the fermentation of the two *Streptomyces*, separately, and were placed upon the sown medium. The Petri dishes were incubated at room temperature for 5 days, exposed directly to light, ideal growth conditions for this fungus. Activity was evaluated by the diameter of the halos of inhibition (in millimeters) of pathogen growth formed around every disc.

Optimizing alternative media

Alternative sources of nutrients were tested utilizing industrial residues from beer (barley flour) and corn (“milhocina”) in different concentrations. The verification of yield was evaluated by tests of diffusion disc for comparison with results obtained with conventional media, contained soy flour with carbon and nitrogen source (MPE and M-1). The following media were idealized: C-1 (barley with no alteration of nitrogen concentration), C-2 (barley with nitrogen concentration equivalent to MPE), C-3 (barley with nitrogen concentration equivalent to M-1), Mi-1 (“milhocina” with nitrogen concentration equivalent to MPE) and Mi-2 (“milhocina”) with nitrogen concentration equivalent to M-1).

RESULTS AND DISCUSSION

The best production times of the bioactive substance for the two lineages of *Streptomyces* (DAUFPE-8631-B and DAUFPE-11470), were 96 and 72 hours, respectively. This data was used for experiments with the alternative media. When compared with the results of conventional media, the results of the disc test with the alternative media demonstrated that the *Streptomyces* spp utilized presented the larger halos of inhibition with medium Mi-2 (Table 1).

Table 1. Antifungal activity of *Streptomyces* spp against *Botrytis cinerea* in fermentation media, with different sources and concentrations of nitrogen by diffusion disc method (inhibition halos in mm).

The results indicate that industrial residues of beer and corn can be utilized as alternative sources of carbon and nitrogen in production media of antifungal bioactive substances for *Streptomyces* as an alternative to conventional media. Medium Mi-2

(milhocina) showed significant results, with a nitrogen concentration equivalent to medium M-1. The possibility of using industrial residues allows a reduction in large scale production costs of antibiotics with a microbial origin.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. ARAÚJO, J. M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L, ed. **Ecologia Microbiana** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 351-367.
2. BAUER, A. M. *et al.* Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496. 1966.
3. OKAMI, Y.; HOTTA, K. Search and discovery of new antibiotics. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDANSKI, M. **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic , 1988.
4. PRIDHAM *et al.* **Antibiotic Ann.**, p. 947-953. 1956/57.
5. SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. & HENRIQUES, R. M. V. Aplicação de um isolado antagônico de *Trichoderma* sp. no controle biológico e integrado da podridão cinzenta em videira. **4^o SICONBIOL** p. 55 1994.

Table 1. Antifungal activity of Streptomyces spp against Botrytis cinerea in fermentation media, with different sources and concentrations of nitrogen by diffusion disc method (inhibition halos in mm).

Fermentation media	Nitrogen source	Nitrogen concentration	Inhibition halos	
			DAUFPE-8631-B	DAUFPE-11470
MPE	Soy flour	0,085%p/v	60	47
M-1	Soy flour	0,041%p/v	53	49
C 1	Barley	0,014%p/v	32	39
C 2	Barley	0,085%p/v	32	33
C 3	Barley	0,041%p/v	36	32
Mi 1	“Milhocina”	0,085%p/v	31	27
Mi 2	“Milhocina”	0,041%p/v	42	55