



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE
BIONORTE**



**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DE ACTINOBACTÉRIAS
DA AMAZÔNIA ISOLADAS NO CAMPUS DA UFAM DA RIZOSFERA
DE *Inga edulis***

RAFAEL DE SOUZA RODRIGUES

MANAUS - AM

Junho/2024

RAFAEL DE SOUZA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DE ACTINOBACTÉRIAS
DA AMAZÔNIA ISOLADAS NO CAMPUS DA UFAM DA RIZOSFERA
DE *Inga edulis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade e Biotecnologia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Afonso Duarte Leão de Souza
– DQ/UFAM

Coorientadora: Profa. Dra. Antônia Queiroz de
Lima Souza – FCA/UFAM

Área de concentração: Biotecnologia. **Linha de
Pesquisa:** Bioprospecção e Desenvolvimento de
Bioprocessos e Bioprodutos

MANAUS - AM

Junho/2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696i Rodrigues, Rafael de Souza
Investigação biológica e química de actinobactérias da Amazônia
isoladas no campus da UFAM da rizosfera de *Inga edulis* / Rafael
de Souza Rodrigues . 2024
215 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientador: Antonia Queiroz Lima de Souza
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Potencial biotecnológico. 2. Actinobactérias. 3. Identificação
molecular. 4. Mineração genômica. 5. Atividades biológicas. I.
Souza, Afonso Duarte Leão de. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

RAFAEL DE SOUZA RODRIGUES

**INVESTIGAÇÃO BIOLÓGICA E QUÍMICA DE ACTINOBACTÉRIAS
DA AMAZÔNIA ISOLADAS NO CAMPUS DA UFAM DA RIZOSFERA
DE *Inga edulis***

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 24 /06/ 2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **AFONSO DUARTE LEAO DE SOUZA**
Data: 27/08/2024 18:24:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (Orientador)
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Documento assinado digitalmente
 **JACQUELINE APARECIDA TAKAHASHI**
Data: 29/08/2024 23:57:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi (Membro Externo)
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA SANTANA BARBOSA MARINHO**
Data: 30/08/2024 08:41:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Patrícia Santana Barbosa Marinho (Membro Externo)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Documento assinado digitalmente
 **Alberdan Silva Santos**
Data: 30/08/2024 13:25:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos (Membro Titular Interno)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Documento assinado digitalmente
 **GILVAN FERREIRA DA SILVA**
Data: 28/08/2024 12:06:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Gilvan Ferreira da Silva (Membro Titular Interno)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

DEDICATÓRIA

A Deus.

A minha família.

Aos meus professores.

Aos meus colegas.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus. Sem Ele não teria conseguido realizar este trabalho.

Ao Meu pai, João de Souza Rodrigues (*in memoriam*), que faleceu no início dessa jornada, mas que deixou seu legado como força para os desafios nos momentos difíceis. A minha mãe, Neide de Souza Rodrigues, pelo companheirismo e conselhos desde o início, na faculdade. Aos meus irmãos Rayca Kristin de Souza Rodrigues, Jonathas de Souza Rodrigues e Joneison de Souza Rodrigues;

A minha esposa, Monica Ribeiro Batista, pelo companheirismo diante dos desafios que enfrentamos juntos nesta reta final. Aos meus amados filhos, Alef Henrique Batista Rodrigues e Hadassah Rafaela Batista Rodrigues;

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza e Prof^a. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, grandes como pessoas, professores e pesquisadores. Estes, aos quais prezo e estimo muito, nos momentos mais difíceis pegaram na minha mão e me colocaram em seus ombros. Vocês estarão nas memórias dos meus filhos e netos, sempre;

Ao meu amigo João Júnior Franco Mesquita e aos seus pais Pr. João Alves Mesquita e Pra. Mary Silvia Franco Mesquita por toda ajuda e incentivos nesta jornada;

À minha cunhada Ariana Ribeiro Batista, (esposo) Ricardo Jarbas Ferreira de Oliveira e (filha) Ana Beatriz Batista de Oliveira por todas as ajudas e carinhos pelos meus filhos;

Aos meus amigos Anderson Nogueira Barbosa e Sabrina Moura Parente, ao Sr. Aldair Kleber Rodrigues Barbosa e a Sra. Alcilene de André Nogueira por toda ajuda e incentivos nesta jornada;

Aos meus queridos amigos Pr. Cleudomar Peixoto Maciel e Pra. Rosalina França Maciel por todas as ajudas e incentivos;

Aos meus queridos amigos Prof. Miguel Angelo Martins e Prof^a. Vania de Carvalho Barros Martins por todas as ajudas e incentivos;

Ao querido amigo Pr. Oseia Oliveira por todas as ajudas e incentivos;

Aos queridos colegas e amigos Dr. Paulo Alexandre Lima Santiago e Dra. Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago por toda ajuda e incentivos;

Ao Prof. Dr. Gilvan F. da Silva pelo suporte técnico e pelos conhecimentos transmitidos na Biologia Molecular;

Ao Dr. Felipe Moura A. da Silva pelas contribuições no desenvolvendo deste projeto de Tese na parte química;

Aos colegas,

Dra. Kamila R. Primo Fernandes, Dra. Maria de Fátima Oliveira Almeida, Dra. Marta Rodrigues de Oliveira, Me. Mauro Ricardo da Silva Pacheco, Leidiane Pereira da Silva, Philippe Defáferi Bieler, Thalita Caroline Lima Alves, Lourdes Mylla Rocha Perdigão, Brenno Augusto Nazario de Oliveira, Me. Douglas Couceiro, Me. Luiz Paulo Moraes de Oliveira, Dr. Elison de Souza Sevalho, Dr. Francinaldo Moura A. da Silva, Dr. Ricardo de M. Katak, Me. Rafael Pinto e Souza, Me. Fagner Ferreira da Costa, Me. Ana Tana Rosas Nascimento Ferreira, Jaqueline Ferreira Gomes, Jeferson C. da Cruz.

Aos coordenadores: Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia e Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen; ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, CNPq e Capes pelos auxílios concedidos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa de Doutorado concedida (POSGRAD UEA - 003/2019).

EPÍGRAFE

Eclesiastes Cap. 1

13 E apliquei o meu coração a esquadrihar e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; essa enfadonha ocupação deu Deus aos filhos dos homens, para nela os exercitar.

14 Atentei para todas as obras que se fazem debaixo do sol, e eis que tudo era vaidade e aflição de espírito.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Sir Isaac Newton

RODRIGUES, Rafael de Souza. **Investigação biológica e química de actinobactérias da Amazônia isoladas no campus da UFAM da rizosfera de *Inga edulis***. 2024. 215 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil, 2024.

RESUMO GERAL

As actinobactérias são reconhecidas como prolíficas produtoras de produtos naturais (PN) de interesse biotecnológico. Esses microrganismos cosmopolitas são as principais fontes de antimicrobianos e, nas primeiras décadas do século XXI, surgem como possíveis novas fontes de PN não antimicrobianos de interesses medicinais e agroindustriais. As prospecções destas nos mais diversos ecossistemas vêm apresentando novas espécies que se destacam em triagens com atividades, a saber: antimicrobiana, anticâncer, larvicida e antiparasitária entre outras. Neste contexto, o desenvolvimento desta Tese de doutorado teve como objetivo geral: isolar actinobactérias da rizosfera de *Inga edulis* Martius – (Mart.), uma leguminosa endêmica na região Amazônica e presente no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM); e avaliar seu potencial biotecnológico frente a um espectro de ensaios biológicos, tais como: antifúngico, anticâncer, antimalárico e larvicida. Como também, realizar mineração genômica de “Biosynthetic Gene Clusters” (BGCs) relacionados com a síntese de PN e identificar substâncias químicas relacionadas com as atividades biológicas. Esta Tese está dividida em três capítulos: No Capítulo 1 apresentamos uma revisão publicada no periódico “Antonie van Leeuwenhoek (Springer Nature)”. Nela descrevemos o potencial biotecnológico dos actinomicetos no século XXI, começando pelas atividades antimicrobianas e terminando com o potencial remediador de substâncias nocivas ao meio ambiente. No Capítulo 2 apresentamos um total de 64 isolados de actinobactérias da rizosfera de três pés de *I. edulis* e uma triagem, utilizando o método de culturas pareadas, com 20 linhagens selecionadas que são capazes de atenuar os crescimentos miceliais dos seguintes fitopatógenos: *Colletotrichum* sp. (ISO01), *C. guaranicola* (P01), *Pestalotiopsis* sp. (3002R2), *Conynespore cassiicola* (Iso079) e *Sclerotium coffeicola* (M01). As análises moleculares do gene *rRNA 16S* das 20 linhagens as classificam em dois gêneros: *Streptomyces* (90%) e *Kitasatospora* (10%). Dentre estas, foram selecionadas duas linhagens para produção de extratos, frações e ensaios bioguiados de antibiose fúngica: *Streptomyces* sp. (LaBMicrA B270) não apresentou antibiose para *S. coffeicola* (M01) e *Streptomyces* sp. (LaBMicrA B280) foi eficiente contra todos os fitopatógenos. Os melhores resultados foram obtidos com a fração do meio líquido AcOEt/2-propanol 9:1. LabMicrA B270

apresentou atividade fungicida com a fração AcOEt/2-propanol 9:1 com dosagem mínima de 250 µg/mL contra os quatro fitopatógenos. LabMicrA B280 apresentou atividade fungicida com a fração AcOEt/2-propanol 9:1 com dosagem mínima de 250 µg/mL para *S. coffeicola* e 125 µg/mL para os demais fitopatógenos. Estes resultados comprovam que as duas linhagens detêm potencial para serem usadas como agentes de biocontrole, bem como também fontes de substâncias com atividades fungicidas. No capítulo 3, apresentamos um estudo biológico e químico dos extratos produzidos pela linhagem LabMicrA B280. As análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura mostram que essa linhagem apresenta ornamentações pseudomiceliais semelhantes às espécies do gênero *Streptomyces*. Na análise filogenômica, seu valor de hibridização digital entre DNAs (dDDH) é < 70%, 63,6 % o que a define como uma nova espécie do gênero *Streptomyces* e a análise de seu perfil químico por APCI/MS evidencia íons sem equivalência nos bancos de dados de PN. O genoma de LabMicrA B280 apresenta 8.2 Mb, distribuídos em 96 contigs, com conteúdo de G+C de 72%, N50 de 229434 e as ocorrências de 314 subsistemas, com 24 categorias de genes. As análises de mineração genômica resultaram em sete anotações de BGCs que apresentam 100% de similaridade de um total de 39 BGCs. Dentre estes, destaca-se o BGC relacionado com a síntese da pentamicina, um antifúngico que também foi isolado da fração ME/AP/RF3 de LabMicrA B280. Os melhores resultados nos ensaios biológicos foram observados para esta fração com: 125 µg/mL de dosagem mínima contra *S. coffeicola* (M01) e 62 µg/mL contra os demais fitopatógenos; 50 µg/mL de dosagem mínima para 91,45 % $\pm$ 0,55 de citotoxicidade contra células cancerígenas do epitélio de laringe humano (HEp-2), sem efeito citotóxico contra as células saudáveis; atividades antiplasmódicas com dosagens mínimas de 50 µg/mL contra as linhagens W2 e 3D7 de *Plasmodium falciparum* com efeito de mortalidades de 91,3 % $\pm$ 0,03 e 61,0 % $\pm$ 0,18; e 250 µg/mL de dosagem larvicida para alcançar 100% de mortalidade contra o *Aedes aegypti*. Desta fração foi ainda isolada a substância pentamicina, potente fungicida usado no tratamento da candidíase vulvovaginal. O espectro biotecnológico da nova espécie LabMicrA B280 mostra que a Amazonia abriga actinobactérias com um grande potencial biotecnológico. Neste trabalho inédito que investigou as atividades biológicas de actinobactérias isoladas da rizosfera de *I. edules*, são apresentados resultados promissores para controle de fitopragas, controle biológicos do *A. aegypti* e *P. falciparum*, metabólitos secundários com importantes atividades medicinais (anticâncer e antifúngico).

Palavras chaves: Potencial biotecnológico; Actinobactérias; Identificação molecular; Mineração genômica; Atividades biológicas.

RODRIGUES, Rafael de Souza. **Biological and chemical investigation of Amazonian actinobacteria isolated on the UFAM campus from the rhizosphere of *Inga edulis***. 2024. 215 p. Thesis (Ph.D. in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, 2024.

ABSTRACT

Actinobacteria are recognized as prolific producers of natural products (NPs) of biotechnological interest. These cosmopolitan microorganisms are the main sources of antimicrobials and, in the first decades of the 21st century, they have emerged as possible new sources of non-antimicrobial NPs of medicinal and agroindustrial interest. Prospecting for these microorganisms in the most diverse ecosystems has revealed new species that stand out in screenings with activities, namely: antimicrobial, anticancer, larvicidal and antiparasitic, among others. In this context, the development of this doctoral thesis had the general objective of isolating actinobacteria from the rhizosphere of *Inga edulis* Martius – (Mart.), a legume endemic to the Amazon region and present on the campus of the Federal University of Amazonas (UFAM); and evaluating their biotechnological potential in a spectrum of biological assays, such as: antifungal, anticancer, antimalarial and larvicidal. We also aim to perform genome mining of “Biosynthetic Gene Clusters” (BGCs) related to PN synthesis and identify chemical substances related to biological activities. This thesis is divided into three chapters: In Chapter 1, we present a review published in the journal “Antonie van Leeuwenhoek (Springer Nature)”. In it, we describe the biotechnological potential of actinomycetes in the 21st century, starting with their antimicrobial activities and ending with their potential to remediate substances harmful to the environment. In Chapter 2, we present a total of 64 isolates of actinobacteria from the rhizosphere of three *I. edulis* Mat. plants and a screening, using the paired culture method, with 20 selected strains that are capable of attenuating the mycelial growth of the following phytopathogens: *Colletotrichum* sp. (ISO01), *C. guaranicola* (P01), *Pestalotiopsis* sp. (3002R2), *Conyospora cassiicola* (Iso079) and *Sclerotium coffeicola* (M01). Molecular analyses of the 16S rRNA gene of the 20 strains classified them into two genera: *Streptomyces* (90%) and *Kitasatospora* (10%). Among these, two strains were selected for the production of extracts, fractions and bioguided fungal antibiosis assays: *Streptomyces* sp. (LaBMicrA B270) did not show antibiosis for *S. coffeicola* (M01) and *Streptomyces* sp. (LaBMicrA B280) was efficient against all phytopathogens. The best results were obtained with the liquid medium fraction AcOEt/2-propanol 9:1. LabMicrA B270 showed fungicidal activity with the EtOAc/2-propanol 9:1 fraction at a minimum dosage of 250 µg/mL against the four

phytopathogens. LabMicrA B280 showed fungicidal activity with the EtOAc/2-propanol 9:1 fraction at a minimum dosage of 250 µg/mL for *S. coffeicola* and 125 µg/mL for the other phytopathogens. These results prove that both strains have potential to be used as biocontrol agents, as well as sources of substances with fungicidal activity. In chapter 3, we present a biological and chemical study of the extracts produced by the LabMicrA B280 strain. Morphological analyses by scanning electron microscopy show that this strain presents pseudomycelial ornamentations similar to species of the genus *Streptomyces*. In the phylogenomic analysis, its digital hybridization value between DNAs (dDDH) is <70%, 63.6%, which defines it as a new species of the genus *Streptomyces*, and the analysis of its chemical profile by APCI/MS shows ions without equivalence in the PN databases. The genome of LabMicrA B280 has 8.2 Mb, distributed in 96 contigs, with a G+C content of 72%, N50 of 229,434, and occurrences of 314 subsystems, with 24 gene categories. The genomic mining analyses resulted in seven BGC annotations that present 100% similarity out of a total of 39 BGCs. Among these, the BGC related to the synthesis of pentamycin, an antifungal that was also isolated from the ME/AP/RF3 fraction of LabMicrA B280, stands out. The best results in the biological assays were observed for this fraction with: 125 µg/mL minimum dosage against *S. coffeicola* (M01) and 62 µg/mL against the other phytopathogens; 50 µg/mL minimum dosage for 91.45% ± 0.55 cytotoxicity against human laryngeal epithelioma (HEp-2) cancer cells, with no cytotoxic effect against healthy cells; antiplasmodial activities with minimum dosages of 50 µg/mL against the W2 and 3D7 strains of *Plasmodium falciparum* with mortality effects of 91.3% ± 0.03 and 61.0% ± 0.18; and 250 µg/mL larvicidal dosage to achieve 100% mortality against *Aedes aegypti*. From this fraction, the substance pentamycin, a potent fungicide used in the treatment of vulvovaginal candidiasis, was also isolated. The biotechnological spectrum of the new species LabMicrA B280 shows that the Amazon is home to actinobacteria with great biotechnological potential. This unprecedented work investigated the biological activities of actinobacteria isolated from the rhizosphere of *I. edules*, and presented promising results for the control of phytopests, biological control of *A. aegypti* and *P. falciparum*, and secondary metabolites with important medicinal activities (anticancer and antifungal).

Keywords: Biotechnological potential; Actinobacteria; Molecular identification; Genomic mining; biological activities.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Fig. 1.** Espectro biotecnológico de actinomicetos. Mais conhecidos por seu espectro antimicrobiano, à esquerda, os actinomicetos ganharam notoriedade por sua potencial aplicação em diversos outros campos, mostrados nos exemplos à direita.....27
- Fig. 2.** Estratégias metodológicas para prospecção de PNMs. A- O microrganismo está isolado de qualquer ambiente natural; B- Suas sequências de DNA e metabólitos são obtidos em condições adequadas; C- Os metabólitos são prospectados por mineração genômica e confrontando os espectros de massa com bancos de dados (por exemplo, GNPS). Para mais detalhes veja o texto principal.....30

CAPÍTULO 2

- Fig. 1.** Árvore filogenética de sequências parciais do 16S rRNA usando a análise de máxima verossimilhança de actinobactérias das rizosferas de três indivíduos de *I. edulis* e espécies tipos.....69
- Fig. 2.** Mapa de calor mostrando os valores percentuais médios das zonas de inibição do crescimento de fitopatógenos por actinomicetos (GraphPad Prism versão 8.0.1) 70
- Fig. 3.** (A e C) Características macro e micromorfológicas de *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270 e B280 cultivadas por 10 dias em meio ISP2. Acima: frente e verso das placas de Petri; Abaixo: ornamentações miceliais - imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (B e D) Ensaio de cultura dupla das cepas LaBMicrA B270 e B280 (meio das placas) com os fitopatógenos *Pestalotiopsis* sp. (3002R2) e *Colletotrichum guaranicola* (P01) (extremidades das placas), após 10 dias de crescimento em meio ISP2. No meio: o controle contendo apenas os fitopatógenos após o décimo dia de cultura.....71
- Fig. 4.** Curvas de rendimento dos extratos metabólicos das cepas selecionadas para estudos biológicos.....72

CAPÍTULO 3

- Fig. 1.** Estrutura do genoma da linhagem LaBMicrA B280: o anel em azul mostra a ordem dos contigs montados; os anéis em verde e roxo mais internos apresentam as regiões de cadeia direta (CDS) e cadeia reversa (CDS); em vermelho genes de resistência a antimicrobianos (AMR); em laranja genes relacionados com fatores de virulência (FV); genes relacionados com transportes (cor azul); o conteúdo de G+C está representado nos anéis mais internos da figura.....90
- Fig. 2.** Análise filogenômica inferida a partir de distâncias GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny approach) realizada na plataforma TYGS. São apresentadas as relações filogenômicas entre *Streptomyces* sp. nov. LaBMicrA B280 e linhagens “Tipo”. Esta árvore é sustentada com suporte de 100 replicações de pseudo-bootstrap. Para visualização da árvore foi usada a plataforma iTOL (<https://itol.embl.de/>).....92
- Fig. 3.** Tipos e números de BGCs de LaBMicrA B280 e das linhagens^T que apresentaram similaridade > 50% na análise filogenômica com base na formula dDDH (d4, in%): *S. costaricanus* (*murinus*) DSM 41827 (63.6 %), *S. graminearus* JCM 6923 (62.7 %), *S. phaeogriseichromatogenes* DSM 40710 (61.6 %), *S. griseofuscus* NRRL B-5429 (61.4 %), *S. griseofuscus* DSM 40191(61.3 %) e *S. malaysiense* MUSC 136 (51.1%). A barra lateral indica abundância absoluta.....95
- Fig. 4.** Região 52.1: (A) sentença entre os genes de LaBMicrA B280 e os de *Streptomyces* sp. S816 (MIBiG-BGC0002032) relacionados com a síntese de Pentamicina. (B) Proposta química e estrutural do íon majoritário da fração FR3-B oriunda do caldo de cultivo de LabMicrA B280, que se assemelha a estrutura química da Pentamicina.....96
- Fig. 5 - A)** “Molecular Networking (GNPS)”. **B)** Análise espectrométrica da fração FR3 em ionização positiva (+). Bioautografia da atividade antifúngica da fração FR3-B. Placa de Petri à esquerda: controle; no centro: placas de CCD reveladas em UV (luz ultravioleta) e VN (vanilina); à direita: placa de Petri teste com duas placas de CCD da fração em teste, revelando atividade para um ou mais metabólitos ao centro contra o fitopatógeno (*C. cassicola* (Iso079).....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Exemplos de dados recentemente relatados sobre metabólitos de actinomicetos e suas atividades.....	38
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Identificação baseada na similaridade da região 16S do rRNA de actinomicetos provenientes das rizosferas de <i>Inga edulis</i> , localizadas no campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, utilizando o banco de dados EzBioCloud.....	67
Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos extratos de 10 dias das linhagens <i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B270 e B280.....	74

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Valores de dDDH, Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) e Identidade média de Aminoácidos (AAI) entre LaBMicrA 280 e a espécie “Tipo” mais relacionada <i>Streptomyces costaricanus</i> (<i>murinus</i>) DSM 41827 ^T	92
Tabela 2. BGCs de LabMicrA B280.....	93
Tabela 3. Atividades biológicas da fração FR3 de LabMicrA B280.....	97
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C e 2D de pentamicina e confronto com dados da literatura.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 APRESENTAÇÃO	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.3 Objetivos específicos	19
2. CAPITULO 1 - POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ACTINOMICETOS NO SÉCULO XXI: UMA BREVE REVISÃO	20
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 COSMOPOLITISMO E EXPRESSÕES AMBIENTAIS VS. EXPRESSÕES LABORATORIAIS DE PNMS DE ACTINOMICETOS.....	26
2.2.1 Exemplos do potencial de produção de produtos naturais por actinomicetos em diferentes relações ecológicas	27
2.2.2 Fatores limitantes para síntese de PNMs via cultivo em laboratório	29
2.2.3 Agentes eliciadores de PNMs e actinomicetos.....	30
2.2.4 Mineração genômica e metabólica para produção de PNMs	32
2.3 ESPECTRO ANTIMICROBIANO.....	38
2.3.1 Antibacterianos.....	39
2.3.2 Antifúngicos	40
2.3.3 Antivirais.....	41
2.3.4 Antiparasitários.....	43
2.4 ESPECTRO NÃO-ANTIMICROBIANO.....	44
2.4.1 Anticânceres.....	44
2.4.2 Antidiabetes	46
2.4.3 Anticolesterol	47
2.4.4 Tratamento de Alzheimer.....	47
2.4.5 Antiúlceras e anti-inflamatórios estomacais	48
2.4.6 Proteção, fertilização e melhoria da produção vegetal	48
2.4.7 Remediação, promoção da biodisponibilidade e solubilização de minerais.....	50
2.4.8 Outras aplicações biotecnológicas focadas não apenas na medicina e na agricultura .	51
2.5 CONCLUSÃO	52
3. CAPITULO 2 - BIODIVERSIDADE E ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS DE ACTINOMICETOS AMAZÔNICOS ISOLADOS DAS RIZOSFERAS DE PLANTAS <i>Inga edulis</i> Martius.....	54
3.1 INTRODUÇÃO	57
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.2.1 Coletas de amostras de solo	58

3.2.2 Obtenção de cepas de actinobactérias	59
3.2.3 Estudo microscópico	59
3.2.4 Seleção de linhagens e estudo morfológico.....	60
3.2.5 Caracterização molecular e análise filogenética.....	60
3.2.6 Fitopatógenos selecionados para avaliar o potencial antifúngico das cepas de actinobactérias.....	61
3.2.7 Triagem utilizando técnica de cultura pareadas	61
3.2.8 Monitoramento da produção de extratos.....	62
3.2.9 Monitorando das atividades antifúngicas	62
3.2.10 Produção dos extratos e ensaio de concentração inibitória mínima.....	63
3.3. RESULTADOS	64
3.3.1 Diversidade morfológica e genotípica.....	64
3.3.2 Atividades antifúngicas das 20 cepas contra fitopatógenos.....	67
3.3.3 Curvas de produção dos extratos das linhagens LaBMicrA B270 e B280 e suas atividades antifúngicas ao longo do tempo.....	69
3.3.4 Ensaios de concentração mínima inibitória	71
3.4 DISCUSSÃO.....	72
3.5 CONCLUSÃO	74
4. CAPITULO 3 – PROSPECÇÃO GENÔMICA E ESTUDOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DA LINHAGEM <i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B280 ISOLADA DA RIZOSFERA DE <i>Inga edulis</i> Martius – (Mart.) NA AMAZÔNIA.....	77
4.1 INTRODUÇÃO	80
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	82
4.2.1 Origem da linhagem LabMicrA B280	82
4.2.2 Sequenciamento genômico e montagem	82
4.2.3 Filogenômica.....	82
4.2.4 Predição de clusters associados a síntese de produtos naturais	83
4.2.5 Produção e fracionamento do extrato do meio cultivado	83
4.2.6 Ensaios biológicos.....	84
4.2.7 Bioautografia da atividade antifúngica da fração FR3-B.....	86
4.2.8 Análises por espectrometria de massas de FR3-B.....	86
4.3 RESULTADOS	88
4.3.1 Montagem do genoma e anotações de sistemas metabólicos	88
4.3.2 Identificação filogenômica e Identidade Média de Aminoácidos.....	89
4.3.3 Mineração genômica e sintenia entre BGCs	91
4.3.4 Atividades biológicas.....	95
4.3.5 Molecular Networking e bioautografia	96
4.3.6 Caracterização estrutural do macrolídeo pentamicina.....	98
4.4 DISCUSSÃO.....	100

4.5 CONCLUSÃO	104
5. DISCUSSÃO INTEGRADORA.....	106
6. CONCLUSÕES GERAIS	108
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICES	148
ANEXOS	168

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 APRESENTAÇÃO

Devido a atenuação das prospecções por novos produtos naturais de origem microbiana e do aumento da resistência a antimicrobianos nas três últimas décadas do século XX, várias prospecções se intensificaram no início do século XXI. Contudo, embora estejam presentes em todos os ecossistemas terrestres, a região amazônica ainda continua subexplorada no que se refere ao potencial biotecnológico dos fungos, eubactérias e actinobactérias.

As actinobactérias têm sido destacadas como um dos principais grupos de produtores de antimicrobianos e ultimamente também, como capazes de produzir substâncias com diversas outras atividades, sendo as principais: anticâncer, antiparasitária, larvicida e antiglicantes, dentre outras.

Diante deste cenário com expectativas promissoras, explorar o potencial biotecnológico das actinobactérias rizosféricas de *Inga edulis*, isoladas no campus da Universidade Federal do Amazonas, foi a principal motivação para este trabalho. As actinobactérias pertencem ao filo *Actinomycetota*, composto por mais de 200 gêneros e muito atrativo para pesquisadores de produtos naturais de origem microbiana. Destaca-se o gênero *Streptomyces*, o mais conhecido e maior produtor de produtos naturais, com mais de 7.000 metabólitos identificados.

O campus universitário da Universidade Federal do Amazonas é uma Área de Preservação Florestal dentro do espaço urbano da cidade de Manaus e, por ser uma área verde com 6,7 milhões de metros quadrados, em grande parte nativa, representa parcialmente a grandeza e a diversidade do ecossistema da floresta Amazônica. Esta estrutura florestal é ainda muito pouco explorada para estudos de bioprospecção de microrganismos. O trabalho aqui proposto justifica-se, portanto, pelo potencial biotecnológico dos actinomicetos, por proporcionar uma amostragem da biodiversidade desses microrganismos em fragmentos de florestas preservadas da Amazônia e por propor uma abordagem favorável ao aproveitamento das linhagens obtidas para produção sustentável de antifúngicos, antibacterianos, anticânceres, antioxidantes, inibidores da enzima acetilcolinesterase e antiparasitários. Destaque-se a necessidade de encontrar soluções para combater microrganismos resistentes aos fármacos e antimicrobianos atuais e contra doenças parasitárias como a malária, endêmica da região Amazônica.

Desta forma, este trabalho inicia-se com o levantamento bibliográfico (Cap. 1) o qual foi sendo atualizado para revelar trabalhos significativos do potencial biotecnológico

pesquisado e descoberto dos actinomicetos nos pouco mais de vinte anos do século XIX. Em paralelo foram feitas coletas de rizosferas de *Inga edulis* (Fabaceae) do Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas em Manaus para isolamento de actinomicetos, seguindo-se por suas identificações morfológicas e moleculares, triagens e ensaios biológicos, prospecções genômicas e metabolômicas de produtos naturais, além do estudo químico de substâncias de interesses biotecnológicos. Os resultados desta pesquisa experimental estão em sua maior parte inseridos nos dois capítulos finais desta tese e, assim como capítulo de revisão bibliográfica acima referido, constituem manuscritos científicos publicados ou em vias de publicação. Finalmente, consta em anexo, além dos manuscritos em língua inglesa referentes aos capítulos 2 e 3, um manuscrito do qual o autor desta tese foi coautor. Embora este manuscrito não conste no corpo principal da tese por ter sido inserido na tese do primeiro autor, é uma demonstração da importância de pesquisas em parcerias.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial biotecnológico de actinomicetos isolados da rizosfera de *Inga edulis* Martius (Fabaceae) no Campus Universitário de Manaus da Universidade Federal do Amazonas.

1.2.3 Objetivos específicos

- Investigar actinomicetos associados à rizosfera de plantas de *Inga edulis*;
- Identificar por características morfológicas, bioquímicas e de biologia molecular, linhagens selecionadas dos diferentes grupos morfológicos dos actinomicetos isolados;
- Ensaiar essas linhagens selecionadas contra fitopatógenos fúngicos de interesse agrícola;
- Avaliar o potencial antifúngico de extratos das duas linhagens de actinomicetos com os melhores resultados no ensaio de culturas pareadas;
- Avaliar o potencial antiparasitário, citotóxico e larvicida dos mesmos extratos;
- Realizar o sequenciamento genômico, identificação filogenômica e mineração genômica de metabólitos da linhagem mais promissora;
- Caracterizar metabólitos bioativos presentes nos extratos e frações dessa linhagem por métodos espectrométricos e espectroscópicos.

2. CAPITULO 1 - POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ACTINOMICETOS NO SÉCULO XXI: UMA BREVE REVISÃO

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ACTINOMYCETES IN THE 21st CENTURY: A BRIEF REVIEW

<https://doi.org/10.1007/s10482-024-01964-y>

Manuscrito publicado no periódico Antonie van Leeuwenhoek (Springer Nature)
(ISSN 1572-9699)

Rafael de Souza Rodrigues^{a,b}, Antonia Queiroz Lima de Souza^{a,b,c}, Maria Divina Oliveira Feitoza^d, Thalita Caroline Lima Alves^c, Anderson Nogueira Barbosa^b, Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago^b, Afonso Duarte Leão de Souza^{a,b,e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^bCentral Analítica, Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^cFaculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

^dInstituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Coari, Amazonas, Brazil

^eDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

Corresponding author

Rafael de Souza Rodrigues

Universidade Federal do Amazonas, Central Analítica, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 6200, Coroado I, Manaus, Amazonas, Brazil, CEP 69.077-000.

Autor correspondente: rafaelsr.bio@gmail.com

RESUMO

Esta breve revisão visa chamar a atenção para o potencial biotecnológico dos actinomicetos. As suas principais utilizações como fontes de antibióticos e na agricultura seriam suficientes para não as negligenciar; contudo, como veremos, a sua aplicação biotecnológica é muito mais ampla. Longe de pretender esgotar esta questão, apresentamos um breve levantamento das pesquisas envolvendo actinomicetos e suas aplicações publicadas nos últimos 23 anos. Destacamos uma perspectiva para a descoberta de novos princípios ativos ou novas aplicações para os metabólitos conhecidos desses microrganismos que, há aproximadamente 80 anos, desde a descoberta da estreptomicina, têm sido a principal fonte de antibióticos. Com base nos dados coletados, organizamos o texto para mostrar como o cosmopolitismo dos actinomicetos e as relações ecológicas evolutivas bióticas e abióticas dos actinomicetos se traduzem na expressão de metabólitos no ambiente e na riqueza de agrupamentos de genes biossintéticos, muitos dos quais permanecem silenciados em culturas laboratoriais tradicionais. Apresentamos também as principais estratégias utilizadas no século XXI para promover a expressão destes genes silenciados e obter novos metabólitos secundários a partir de cepas conhecidas ou novas. Muitos destes metabólitos têm atividades biológicas relevantes para a medicina, agricultura e indústrias de biotecnologia, incluindo candidatos a novos medicamentos ou modelos de medicamentos contra doenças infecciosas e não infecciosas. A seguir apresentamos exemplos significativos do espectro antimicrobiano dos actinomicetos, que é o mais comumente investigado e mais conhecido, bem como seu espectro não antimicrobiano, que está se tornando mais conhecido e cada vez mais explorado.

Palavras-chave: actinomicetos; perspectiva biotecnológica; metabólitos bioativos; novas aplicações.

2.1 INTRODUÇÃO

No último século, a produção de antibióticos proporcionou um crescimento humano e socioeconómico exponencial nunca antes visto [1]. No entanto, os efeitos secundários do uso indevido de antimicrobianos tornaram-se uma grande preocupação no século XXI sob a forma de doenças infecciosas difíceis de tratar em humanos e animais, bem como agentes patogénicos de plantas resistentes a biocidas [2,3]. A resistência, principal efeito colateral, tornou-se uma realidade que afeta significativamente a vida das pessoas no que diz respeito à saúde e à alimentação, e os patógenos resistentes têm causado a morte de milhões de pessoas em todo o mundo, além de prejudicar a produção de enormes quantidades de animais e fontes de alimentos vegetais todos os anos [4,5]. Diante disso, para mitigar a resistência antimicrobiana, muitos pesquisadores têm olhado para a síntese química e a semissíntese como alternativas para a biossíntese de novos antimicrobianos, inspirados na natureza ou não. No entanto, estas alternativas têm sido incapazes de satisfazer a crescente procura de novos antimicrobianos médicos e agroindustriais [6], que tem sido agravada pelo surgimento de microrganismos multirresistentes. Isto tem aumentado a busca por microrganismos que possam produzir novas substâncias bioativas [7,8]. Além disso, juntamente com a resistência dos microrganismos patogénicos, o crescimento da incidência de doenças como o cancro e a diabetes, entre outras, bem como a necessidade de promover alternativas tecnológicas mais sustentáveis [9], desafia-nos a explorar em maior medida o potencial biotecnológico dos actinomicetos que estão presentes nos mais variados ecossistemas e que possuem um amplo espectro biotecnológico (Fig. 1) [10-12].

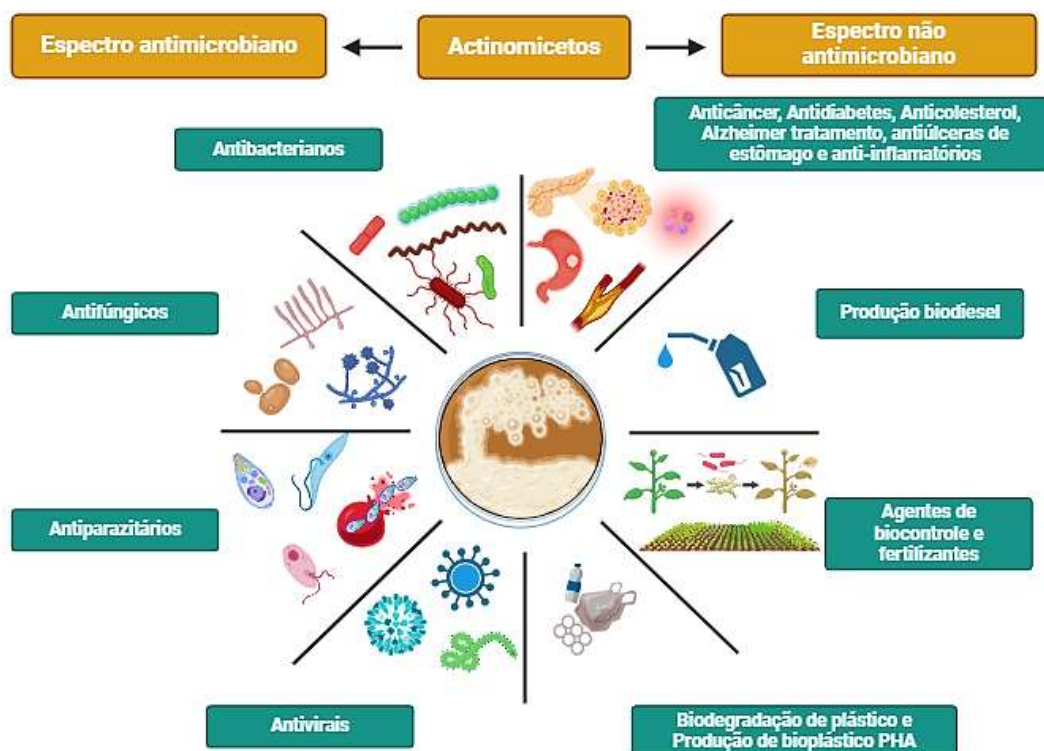


Fig. 1. Espectro biotecnológico de actinomicetos. Mais conhecidos por seu espectro antimicrobiano, à esquerda, os actinomicetos ganharam notoriedade por sua potencial aplicação em diversos outros campos, mostrados nos exemplos à direita.

Na verdade, o potencial biotecnológico dos actinomicetos está longe de ser totalmente conhecido; no entanto, como veremos nesta breve revisão, este potencial não se limita apenas aos antibióticos e à utilização na agricultura, podendo haver muitas outras aplicações biotecnológicas. Em contraste com o rico potencial indicado pelos dados desta revisão, existem muito poucas investigações e aplicações biotecnológicas relacionadas a estas bactérias, que pertencem ao filo *Actinobacteria*. Este filo possui aproximadamente 374 gêneros e milhares de espécies descritas [13]. O gênero *Streptomyces* pode ser destacado por possuir o maior número de espécies e relatos consideráveis de produtos naturais microbianos (PNMs). Além disso, a partir da década de 1940, esse gênero provocou o aumento das pesquisas envolvendo actinomicetos, que começou com uma entrada triunfante no grupo de recursos genéticos produtores de PNM. O responsável por esse feito foi o Dr. Selman Waksman, que, ao estudar microrganismos do solo, encontrou o *Streptomyces griseus*, do qual isolou a estreptomicina, que é um bactericida eficiente contra um dos maiores carrascos da humanidade: o *Mycobacterium tuberculosis*. Este feito rendeu ao seu grupo o Prêmio Nobel de Medicina em 1952 [14-16].

Desde a descoberta da estreptomicina até 2010, os actinomicetos foram responsáveis por 42% das mais de 23.000 descobertas de PNM, sendo a maioria delas de antimicrobianos,

igualando assim a proporção de PNMs produzidas por fungos [17], um grupo muito maior em termos de espécie. Recentemente, foram estimadas mais de 15.000 PNMs originárias de linhagens do filo *Actinobacteria*, muitas das quais apresentam atividades fora do espectro antimicrobiano (Tabela 1) [18-21]. Esta extraordinária capacidade dos actinomicetos para produzir PNMs é consistente com a sua natureza cosmopolita e com o fato de, ao longo da evolução, terem se adaptado aos mais diversos ambientes, dos mais amenos aos mais extremos. Isto tem origem, entre outras causas, nas relações ecológicas que os actinomicetos mantêm com outros organismos, nomeadamente as plantas, colonizando-os em praticamente todos os tecidos de forma harmoniosa ou patogénica, bem como nas relações competitivas nos solos e ambientes aquáticos, travando batalhas com outros microrganismos armados com os mais diversos metabólitos [22-26]

Na exploração desta riqueza de metabólitos, em geral, dentro do universo dos actinomicetos, novos isolados se destacam por apresentarem novas atividades em bioensaios *in vitro* e *in situ* [27, 28]. Paralelamente, vários estudos genômicos e metabolômicos revelaram uma riqueza de PNMs escondidas nos genomas de vários isolados bem conhecidos, bem como em isolados recentemente descobertos, levando assim ao surgimento, no século XXI, de uma nova geração de substâncias bioativas [29,30]. Entre os exemplos de abordagens metabolômicas bem-sucedidas, uma das mais utilizadas para visar supostamente esses novos metabólitos é a Rede Social Molecular Global de Produtos Naturais (GNPS), com as suas inúmeras ferramentas e bases de dados espectrométricos públicas [31-34].

Amplamente retratados como fontes de metabólitos bioativos para diversas aplicações médicas e agroindustriais, os actinomicetos ainda são muito pouco conhecidos quimicamente. A maioria dos trabalhos relacionados apenas relatam a atividade dos extratos actinobacterianos, mas não são conclusivos se seus compostos bioativos seriam conhecidos, semelhantes aos conhecidos ou novos. Além disso, no caso dos medicamentos, não basta identificar as substâncias. Vários estudos ainda são necessários para confirmar sua viabilidade terapêutica como novo medicamento, incluindo testes pré-clínicos e clínicos com animais e humanos. Entre os ensaios, é fundamental determinar os padrões de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade química (ADMET) de um potencial novo medicamento. Infelizmente, cerca de 50% dos metabólitos naturais bioativos não alcançam bons resultados na ADMET, o que os torna inviáveis como quimioterápicos e gera desgastes consideráveis [35-37].

Nesse contexto, nosso principal objetivo nesta breve revisão é fornecer ao leitor um levantamento das pesquisas publicadas nos últimos 23 anos envolvendo actinomicetos e suas aplicações, destacando uma perspectiva para a descoberta de novos princípios ativos ou novas

aplicações para os metabólitos conhecidos desses microrganismos. Como critérios para o levantamento bibliográfico, foram priorizadas publicações científicas dos últimos 23 anos relatando atividades biológicas e isolamento de substâncias de actinomicetos. As bases de dados consultadas foram Web of Science, Springer Nature, Elsevier, PubMed e Google Scholar. As palavras-chave selecionadas foram actinomicetos e antibióticos; antibacteriano; antifúngico; antiparasitário; antimalárico; anti-inflamatórios; diabetes; Alzheimer; antileishmaniose; antitripanossômico; antiviral; biocontrole; fertilizantes; antiacetilcolinesterase; biocombustível. Cada palavra-chave foi combinada individualmente com a palavra actinomicetos em todas as bases de dados acessadas. Com base nos dados coletados consideramos: o cosmopolitismo dos actinomicetos em relação à expressão de metabólitos no ambiente e as limitações e alternativas para a síntese de PNMs em laboratório; o espectro antimicrobiano mais comumente visado; e o espectro não antimicrobiano cada vez mais explorado. Na conclusão apontamos algumas questões práticas com o objetivo de chamar a atenção das pessoas e entidades interessadas para o grande potencial biotecnológico dos actinomicetos em diversos campos e para a necessidade de explorar e preservar os ambientes ainda pouco explorados.

2.2 COSMOPOLITISMO E EXPRESSÕES AMBIENTAIS VS. EXPRESSÕES LABORATORIAIS DE PNMS DE ACTINOMICETOS

Os actinomicetos são, em sua maioria, de vida livre e polinutricionais [26,38]. O seu cosmopolitismo mostra a sua capacidade de estabelecer relações ecológicas complexas em diferentes ambientes e com outros seres vivos, uma consequência presumível da sua evolução que lhes confere uma extraordinária capacidade de produzir metabólitos primários e secundários. Essa capacidade parece mais evidente quando se consideram os genomas desses microrganismos, uma vez que codificam aproximadamente 800 proteínas envolvidas em diversas funções ecológicas. A maioria são enzimas hidrolíticas, celulasas, quitinases e proteases, o que lhes confere um arsenal incomparável para explorar qualquer ecossistema [26,39]. A influência das relações ecológicas dos actinomicetos no seu metabolismo pode ser compreendida através de estudos químicos e genéticos, que nos permitem interpretar seus sinais interativos via expressões de metabólitos primários e secundários e descobrir os grupos de genes (ou clusters de genes biossintéticos – BGCs) envolvidos na síntese de PNMs (Fig. 2) [26,40,41]. Abaixo estão alguns exemplos da adaptabilidade dos actinomicetos a diferentes ambientes e suas complexas relações ecológicas que causam a expressão de PNMs que podem ser utilizados para diversos fins. Existem também exemplos de casos laboratoriais bem-

sucedidos de utilização de genes silenciados de actinomicetos para expressão de novos metabólitos.

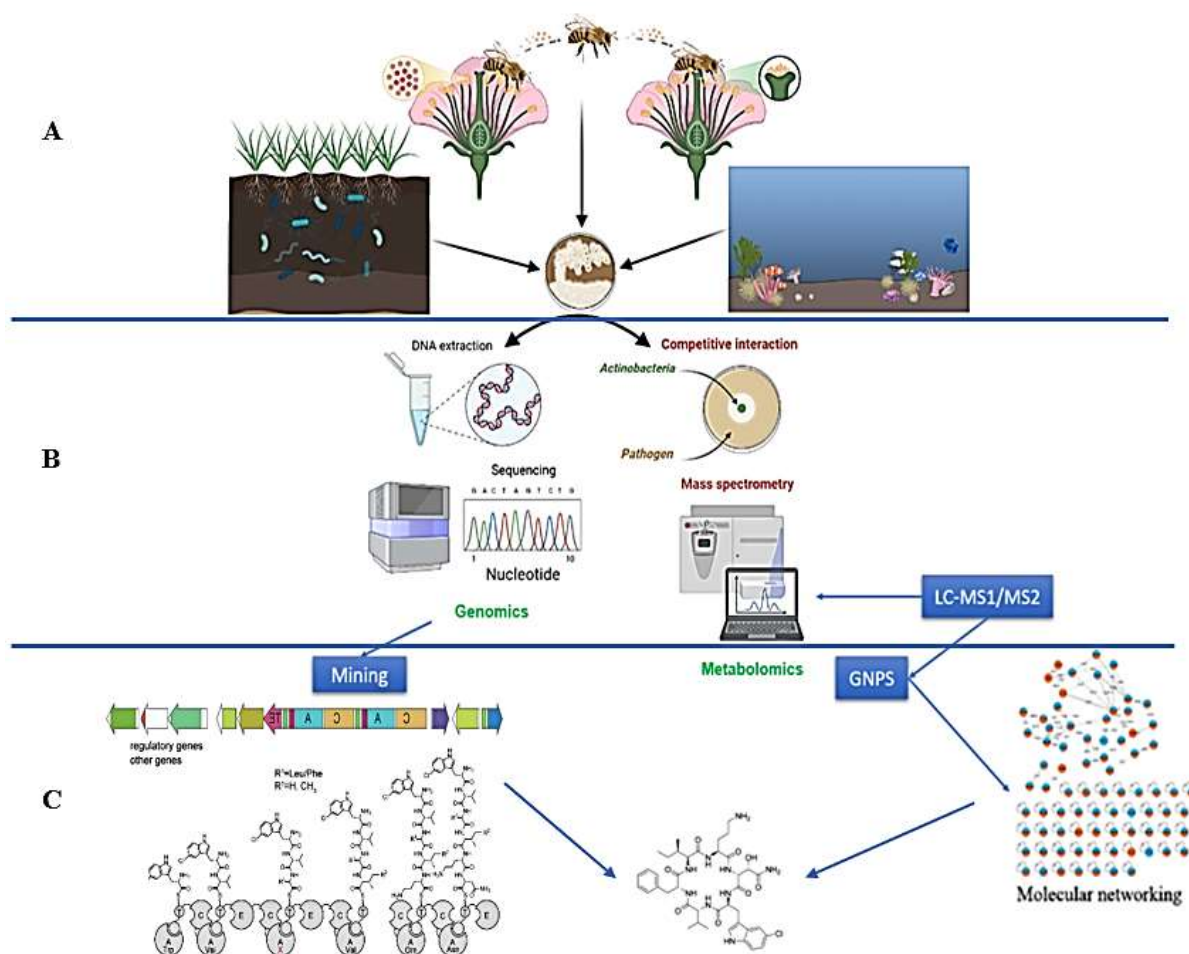


Fig. 2. Estratégias metodológicas para prospecção de PNMs. A- O microrganismo foi isolado de qualquer ambiente natural; B- Suas sequências de DNA e metabólitos são obtidos em condições adequadas; C- Os metabólitos são prospectados por mineração genômica e confrontando os espectros de massa com bancos de dados (por exemplo, GNPS). Para mais detalhes veja o texto principal.

2.2.1 Exemplos do potencial de produção de produtos naturais por actinomicetos em diferentes relações ecológicas

Tal como acontece com o nosso próprio organismo, ao longo da evolução, os microrganismos se adaptaram a diferentes condições ambientais e alimentares, utilizando o seu arsenal genético para produzir enzimas e PNMs apropriados. Presumivelmente, a coevolução com outros seres vivos sob as mais diversas e muitas vezes adversas condições melhorou este arsenal e a sua expressão metabólica. A conhecida especificidade desta expressão metabólica a diferentes estímulos ambientais sugere a necessidade de coletar actinomicetos de diferentes

habitats. Como veremos nos exemplos abaixo, isto potencializa a descoberta de diferentes cepas com diferentes produções de PNMs.

Rizosfera – Em uma determinada área do solo, a rizosfera é a região mais nutritiva e com maior biodiversidade, pois é repleta de exsudato nutritivo, que é disputado por actinomicetos, fungos, protozoários e eubactérias [42]. Neste ambiente de guerra química, quando alimentados pelo exsudato, os actinomicetos compensam os vegetais com proteção através da secreção de antimicrobianos, fixação de nitrogênio, produção de hormônios de crescimento e enzimas capazes de metabolizar carboidratos complexos [38,43]. A proteção contra fitopatógenos (biocontrole) e condições de rigor podem ter induzido a evolução a ponto de haver comunicação entre os actinomicetos e as plantas, o que ocorre por meio de sinalização inorgânica e orgânica [8, 38,41,43]. Assim, no exsudato rizosférico, muitos sinais químicos de sofrimento podem ser emitidos, como os hormônios de estresse das plantas, ácido jasmônico e ácido salicílico, que estimulam a secreção de antibióticos pelos actinomicetos [26,44].

Insetos – A classe Insecta Linnaeus, 1758, rica fonte de biodiversidade, pode abrigar uma riqueza ainda maior em actinomicetos e seus metabólitos. É o que se pode deduzir de estudos como o de Matarrita-Carranza *et al.* [45], que avaliaram a influência dessas bactérias dentro da ordem *Hymenoptera*, que possui mais de 150 mil espécies de insetos [46]. Das 29 espécies tropicais estudadas, incluindo as das famílias *Apidae* (abelhas), *Vespidae* (vespas) e *Formicidae* (formigas), foram isolados 197 actinomicetos cultiváveis, cujos bioensaios indicaram as potenciais atividades antimicrobianas de seus metabólitos. Existe uma aparente associação mutualística na qual as bactérias, ao serem alimentadas, estabelecem um mecanismo de defesa contra patógenos microbianos em favor dos insetos hospedeiros [47,48].

Esponjas marinhas – Igualmente estimulantes são os estudos em busca de conhecimento sobre os actinomicetos que interagem com organismos em ambientes marinhos. Esses estudos resultaram na descoberta de novos candidatos a produtores de PNMs de interesse biotecnológico. É o caso dos actinomicetos das esponjas, organismos que filtram e decompõem partículas e são de extrema relevância para o nosso planeta. Eles também são hospedeiros naturais de vários grupos de microrganismos recicladores [49]. Essa relação de alta complexidade e adversidade certamente deverá estimular a produção de uma gama variada de compostos bioativos. Um exemplo importante nesse sentido é dado por Cheng *et al.* [50], que estudaram a diversidade de 12 espécies de esponjas do Mar Mediterrâneo e isolaram 64 actinomicetos, oito dos quais apresentaram atividade antiprotozoária para *Trypanosoma brucei* (TC221). Em outros estudos, com actinomicetos isolados de esponjas marinhas, Nagarajan *et*

al. [51] e Santos et al. [52] detectaram atividades antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas para os metabólitos produzidos pelas linhagens estudadas.

Os exemplos anteriores revelam que actinomicetos de diferentes origens podem apresentar potencial biotecnológico variado - antibióticos para defesa de plantas, antipatógenos para proteção de insetos e metabólitos antibacterianos, antifúngicos e anticancerígenos associados a organismos marinhos. Em perspectiva, o ambiente mais diversificado do planeta pode abrigar os mais diferentes actinomicetos com riqueza inestimável em metabólitos bioativos. Porém, muitos metabólitos com potentes propriedades medicinais e agroindustriais não são produzidos em condições laboratoriais porque não fornecem os estímulos físicos e químicos dos ecossistemas originais acessados. Assim, como discutiremos brevemente nas seções seguintes, diversos estudos têm buscado compreender os sistemas moleculares envolvidos na ativação de vias de síntese e têm revelado os fatores limitantes para a descoberta de novas PNMs.

2.2.2 Fatores limitantes para síntese de PNMs via cultivo em laboratório

Revisões recentes destacam as limitações dos atuais meios de cultura e métodos de isolamento disponíveis para actinomicetos [13,53]. Nos laboratórios, os meios de cultura carecem de complexidade e são desprovidos dos estímulos ambientais biológicos, químicos e físicos necessários para ativar agrupamentos de genes biossintéticos (BGCs) e, assim, promover a síntese de produtos naturais microbianos (PNMs). Por exemplo, em laboratório, como reproduzir as condições ambientais da diversidade dos actinomicetos marinhos, sujeitos a grandes variações nutricionais, dos simbioses (animais e algas) e da temperatura e pressão, sem contar as suas diversas origens, como em o caso relatado de esporos de cepas de *Streptomyces* transportados dos solos através do escoamento dos rios para o fundo dos oceanos, onde estão sujeitos a uma pressão evolutiva distinta da pressão terrestre [54]. Igualmente difíceis de reproduzir são as condições a que estão sujeitas as estirpes microbianas de locais pobres em nutrientes, como fontes termais e solos oligotróficos antárticos e desérticos, bem como estirpes endofíticas que perdem a sua fito-comunicação original e interação com o microbioma da planta hospedeira. Todos esses fatores são agentes evolutivos que regulam o metabolismo secundário e a quimioidiversidade dos actinomicetos e, embora as condições laboratoriais sejam muito diferentes das ambientais, estratégias foram desenvolvidas para aumentar a quantidade de PNMs produzidas por estas bactérias. Estratégias como choques térmicos e elétricos, adaptações nutricionais de meios de cultura com adição de substâncias

ambientais que tenham efeito estimulante e a expressão heteróloga de BGCs de genomas de linhagens não cultiváveis, entre outras, têm favorecido descobertas de novas PNMs [13,53], principalmente em prospecções marinhas [55].

2.2.3 Agentes eliciadores de PNMs e actinomicetos

A proposta de agentes nutricionais, físicos, químicos e biológicos para estimulação tornou-se uma estratégia promissora para a síntese e descoberta de PNMs, especialmente quando combinada com o conhecimento da diversidade genômica dos clusters de genes biossintéticos (BGCs) de uma cepa, como será visto na próxima seção. Um excelente exemplo da influência da estimulação nutricional na síntese de PNMs ocorreu através da limitação de carbono e nitrogênio em culturas de *Saccharopolyspora erythraea* e *Sc. hygroscopicus* [56], que resultou no aumento da produção do macrolídeo Eritromicina e coincidiu com o acúmulo de tRNA e aminoácidos e a atenuação da síntese proteica. Estes resultados parecem revelar uma situação típica de competição por nutrientes, com a consequente necessidade de proteção do território que deve ocorrer em condições naturais.

Uma interessante estratégia de estimulação consiste em interromper o metabolismo de linhagens com concentrações subinibitórias (SICs) de antibióticos, o que leva à estimulação de concentrações mais elevadas de outros antibióticos e desperta BGCs crípticos envolvidos na síntese de PNMs. Por exemplo, a SIC (de 5 µg/mL) do cloranfenicol – inibidor da síntese proteica em procariontes – aumentou a síntese do antibiótico actinomicina (síntese dependente de cálcio) e da piperidamicina em *S. albus*, enquanto a SIC do sintético ARC2 (um análogo do triclosan) – que inibe parcialmente a síntese de ácidos graxos – também aumentou a síntese de antibióticos policetídeos em *S. albus* [57]. Em outro exemplo, a cepa marinha *Streptomyces* sp. HB202 (*Halichondria panicea*), sob efeito das SICs de tetraciclina ou bacitracina, produziu diversos compostos do grupo das fenazinas denominados estreptofenazinas A-H. As estreptofenazinas C e H mostraram atividades contra *Bacillus subtilis*, enquanto C também foi ativa contra *Staphylococcus lentus* [58].

Em outra abordagem utilizando exposição a compostos químicos naturais ou sintéticos, a cepa *Micromonospora kermanensis* DSM 45485 foi submetida ao pH alcalino e à influência individual do ácido valpróico, dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de lantânio, triclosan e do sobrenadante da cultura de *Pseudomonas aeruginosa* UTMC 1404, e apresentou atividade biológica contra patógenos Gram-negativos [59]. Considerando que nestes testes o meio de cultura (ISP2) foi o mesmo na presença e ausência de estimulantes e que, na ausência destes, não foi observada atividade biológica, este exemplo revela possível comportamento de defesa

espacial em resposta a ataques químicos, que no ambiente pode significar a presença de organismos hostis. Em outro caso, ao tentar estimular *S. hygroscopicus* a aumentar a produção do macrolídeo ascomicina (FK520), um potente antifúngico e imunossupressor, vários produtos químicos em baixas concentrações foram utilizados como estimulantes. Dentre eles, o composto químico DMSO, utilizado como fonte de carbono, destacou-se por duplicar a produção de ascomicina (FK520) [60].

Como os actinomicetos são onipresentes, eles carregam em seus genomas as marcas evolutivas de suas experiências em diversas comunidades e ambientes da Terra registradas em seu DNA, especialmente em aglomerados de genes biossintéticos (BGCs) ativos ou crípticos. Um bom mecanismo biológico para estimular BGCs crípticos é o co-cultivo de duas cepas do mesmo ambiente. Isto foi demonstrado em experimentos de co-culturas de *S. luteireticuli* NIIST-D31 com *S. luteovorticillatus* NIIST-D47 e resultou na síntese de novas variantes estereoquímicas de estreptofenazina (S1 e S2) e 1-*N*-metilalbonoursina, e com *S. tioluteus* NIIST-D63, resultando em novas estreptofenazinas e novamente em 1-*N*-metilalbonoursina [61]. Além disso, no co-cultivo de *S. venezuelae* e *Saccharomyces cerevisiae* com abundância de glicose, *S. venezuelae* produziu a trimetilamina volátil [62].

Por fim, há também exemplos de elementos químicos metálicos, incluindo terras raras e metais pesados, como estimulantes da síntese de PNMs pelos actinomicetos. Assim, as sínteses de dactinomicina, actinomicina e estreptomicina por *S. antibioticus*, *S. parvulus* e *S. griseus* foram aumentadas quando os meios de cultura foram suplementados com escândio (Sc^{3+}) [63]. Noutro caso, quando suplementado com níquel, uma estirpe marinha de *Streptomyces* produziu anguciclina [63]. Todos os exemplos acima parecem revelar que, na sua evolução, as estirpes de actinomicetos armazenaram um poderoso arsenal de armas químicas sob a forma de genes ou BGCs. Este arsenal tornou-os especialmente preparados para sobreviver a inúmeras adversidades ambientais, incluindo a competição por espaço e alimentos, ataques de outros organismos, exposição a substâncias ou elementos químicos tóxicos e alterações ambientais abióticas. Esse mesmo arsenal poderá ser a solução para inúmeros problemas que envolvem a saúde humana e a agricultura, entre outras possibilidades biotecnológicas. Nessa perspectiva, veremos a seguir que os usos de estimulantes vêm se aprimorando e técnicas mais robustas estão sendo utilizadas em abordagens que visam melhorar a descoberta de PNMs.

2.2.4 Mineração genômica e metabólica para produção de PNMs

Apesar de compreender alguns dos mecanismos de ativação dos BGCs, ainda é um desafio superar suas complexidades, uma vez que muitas vias compartilham diversas enzimas [64]. Como vimos, ao isolar um microrganismo de um determinado ecossistema, limitamo-lo às condições laboratoriais, e estas não fornecem os mesmos sinais extracelulares do seu antigo ambiente com todos os desafios abióticos e bióticos que teve de superar para sobreviver, possivelmente causando perdas a sua produção genuína de princípios ativos. Porém, através de estudos genômicos, é possível quantificar os BGCs presentes no DNA genômico de um microrganismo e estimar sua capacidade potencial de produzir PNMs conhecidos e desconhecidos. Vejamos três exemplos: no primeiro, em um estudo que analisou 1.110 genomas de *Streptomyces*, foram encontradas 34 classes principais de BGCs entre as cepas, que apresentaram uma variedade de 8 a 83 BGCs, com predomínio de NRPS (1.062 genomas), PKS1 (981 genomas), terpenos (697 genomas), lantipeptídeos (540 genomas), butirolactona (503 genomas), pks2 (499 genomas), bacteriocina (419 genomas) e Pks3 (366 genomas) [65]. Segundo os autores, avaliar se as quantidades de cópias importantes de BGCs (por exemplo, NRPS e PKS) e suas distribuições nos genomas estão associadas a variações nas sínteses e atividades biológicas dos PNMs é fundamental. No segundo exemplo, as distribuições de BGCs ligados às vias metabólicas PKS e NRPS foram investigadas nos genomas de 75 cepas de *Salinispora arenicola* (37), *Sal. tropica* (7) e *Sal. pacifica* (31), nas quais 1.924 domínios KS e 1.693 domínios C foram encontrados os quais representam enzimas relacionadas a essas vias (PKS e NRPS) neste gênero exclusivamente marinho [66]. Os autores estimaram que esta elevada diversidade foi adquirida através da transferência horizontal de genes e observaram que se concentra em estirpes no que chamaram de ilhas genômicas de BGCs que podem mudar de posição. Esta dinâmica de mudança de posição ainda é pouco compreendida, mas tem grande influência na síntese de PNMs. Finalmente, no terceiro exemplo, em linhagens de *Amycolatopsis* spp. de diferentes regiões geográficas, observa-se que estas carregam entre 14 e 45 BGCs, com predominância de PKS, NRPS, híbrido, RiPP e terpeno [67].

Todos os exemplos acima revelam apenas uma parte da operação de uma abordagem que visa combinar racionalmente a mineração genômica com a metabolômica. A Figura 2 mostra as principais etapas dessas duas frutíferas metodologias combinadas utilizadas nos últimos anos para prospectar PNMs. Após isolar o microrganismo da natureza (Fig. 2-A), são obtidas suas sequências de DNA e extratos metabólicos. A produção de metabólitos bioativos pode ser induzida, por exemplo, pela exposição a substâncias antimicrobianas ou por cultivo competitivo com patógenos alvo (Fig. 2-B). Por fim, as PNMs são prospectadas por mineração

genômica e comparação dos espectros de massa dos componentes dos extratos de microrganismos com bancos de dados (por exemplo, GNPS) (Fig. 2-C).

A mineração de genes é amplamente utilizada e fundamental para a engenharia genética, que possui inúmeras formas de codificar os produtos de vias silenciadas. Em um estudo recente, Cheng et al. [68] identificaram um cluster de genes (mich BGC) relativo aos alcaloides benzoxazol na cepa de *Micromonospora* sp. SCSIO 07395. A expressão heteróloga do mich BGC em *S. albus* Del14 resultou em cinco novos alcaloides, as microecmicinas A – E, entre as quais a microecmicina A demonstrou atividade antibacteriana moderada. Por outro lado, a análise dos dados obtidos via LC-MS1/MS2, utilizando a plataforma GNPS, também tem sido uma ferramenta poderosa para a desreplicação de extratos e a descoberta de novos metabólitos. [31-34]. Embora o estudo químico de um extrato por técnicas convencionais de identificação e purificação de metabólitos possa resultar em metabólitos bioativos, a quantificação genômica de BGCs, aliada à caracterização bioguiada e rápida de perfis metabólicos, permite avaliar e otimizar a aquisição de princípios ativos e outras substâncias promissoras provenientes de microrganismos [69,70], como pode ser visto nos exemplos a seguir.

Gohain et al. [69] estudaram a diversidade microbiana de seis plantas medicinais indianas e obtiveram 76 actinomicetos, com prevalência do gênero *Streptomyces*. Segundo os autores, 21 dos isolados apresentaram atividades em ensaios biológicos contra patógenos fúngicos e bacterianos. Além disso, foram detectadas 85% de bandas para a policetídeo sintase (PKS) tipo II e 14% para PKS-I das BGCs. A caracterização e quantificação de BGCs silenciados permite que estes sejam clonados e expressos em organismos modelos. Por exemplo, Qian et al. [71] sequenciou o genoma de *Streptomyces* sp. (Tü 6314) e encontrou um BGC PKS tipo II (skt) enigmático, depois clonou-o usando o vetor *Streptomyces* pSET152. Através da expressão heteróloga em *S. coelicolor*, conseguiram produzir seis policetídeos, dos quais quatro apresentaram atividade contra o vírus HIV1.

Com o mesmo propósito de aproveitar o potencial dos genes silenciados, dentre as demais metodologias utilizadas para ativar esses genes, tem sido utilizada a metodologia chamada HiTES (High Performance Eliciting Screens). Em resumo, combina a utilização de um gene repórter que está integrado na vizinhança das BGCs silenciadas e analisa o efeito de centenas de substâncias, que são candidatas a induzir os metabólitos associados a estes genes crípticos. Qualquer substância adicionada individualmente à cultura em poços de placas de 96 poços que tenha o efeito desejado, sinalizado pela resposta significativamente aumentada do gene repórter nos actinomicetos modificados, em relação ao controle (um poço sem qualquer substância de teste adicionada), é então usado como indutor em uma cultura em larga escala.

Idealmente, essa metodologia leva à produção de novos metabólitos a partir dos genes que foram silenciados e por ela despertados [72]. Utilizando esta metodologia, estes autores alcançaram a expressão de 14 novos produtos de *S. albus* (J1074), que incluíam um novo antifúngico e um inibidor da multiplicação de células cancerígenas.

O mesmo grupo liderado pelo Professor Mohammad R. Seyedsayamdost, utilizando a metodologia HiTES modificada que chamaram de “Bioactivity-HiTES” [70], detectou antibióticos crípticos em três linhagens de actinomicetos. A metodologia de bioatividade-HiTES foi descrita como semelhante à anterior, na medida em que os actinomicetos são cultivados em placas de 96 poços na presença de uma biblioteca de dezenas ou centenas de substâncias naturais. Posteriormente, os meios cultivados por cada bactéria na presença individual de cada substância elicitora candidata foram testados quanto à bioatividade. Neste caso, foram testados para inibição de bactérias Gram-negativas. Como resultado, os autores descobriram dois antibióticos enigmáticos contra *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, bem como um novo epóxi naftoquinona. A vantagem desta nova abordagem é que dispensa qualquer manipulação genética das linhagens de actinomicetos, economizando assim recursos e tempo.

Desde a primeira década do século XXI, as abordagens cada vez maiores de mineração do genoma parecem ter superado as previsões mais otimistas que poderiam ser feitas sobre os incalculáveis produtos naturais a serem descobertos a partir dos actinomicetos. Nessas abordagens, as análises de sequências genéticas frequentemente resultam na descoberta de muitas vias biossintéticas “órfãs” [29]. Além dos artigos citados, nos últimos anos, surgiram diversas revisões sobre inovações e estudos relativos à biossíntese de novas PNMs, entre os quais os de Craney *et al.* [64], De Simeis e Serra [73], Gomez-Escribano *et al.* [74], Gong *et al.* [75], Jiang *et al.* [76], Li *et al.* [77], Wu *et al.* [78] e Zhang *et al.* [79] se destacam. Em geral, todos os relatórios acima revelam as abordagens de mineração genética como as ferramentas mais promissoras e poderosas para enfrentar o desafio contínuo de encontrar novos metabólitos bioativos, especialmente antimicrobianos. A Tabela 1 retrata alguns dos estudos e descobertas mais recentes de novos grupos de produtos naturais bioativos. Muitas dessas descobertas foram feitas usando metabolômica por meio da plataforma GNPS, mineração genômica de BGCs ou ambas as abordagens juntas [80].

Tabela 1-Exemplos de dados recentemente relatados sobre metabólitos de actinomicetos e suas atividades.

Organismos (origens)	Metabólitos	Fórmula Molecular	Atividades	Ref.*
<i>Streptomyces</i> sp. OID44 (marine)	Epoxinamide	C ₆₂ H ₇₉ N ₁₁ O ₂₀	Anticancer	[81]*
<i>Streptomyces</i> sp. JB5 (bog)	Dentigerumycin E	C ₃₉ H ₆₃ N ₉ O ₁₆	Anticâncer	[82]*
<i>Streptomyces</i> sp. AMD43 (bog)	Taeamide A	C ₅₁ H ₈₅ N ₁₁ O ₁₆	Anti-tuberculosis	[83]*
<i>Streptomyces</i> sp. JMS132 (marine)	Cystargamides C and D	(C) C ₅₁ H ₆₃ N ₇ O ₁₃ , (D) C ₄₇ H ₅₅ N ₇ O ₁₃	Antioxidante	[84]*
<i>S. fungicidicus</i> SYH3 (soil)	6-(5-Hydroxy-6-methylheptyl)-5, 6-dihydro-2H-pyran-2-one	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	Antifúngica	[85]
<i>Streptomyces</i> sp. 211726 (mangrove rhizosphere of <i>Heritiera globosa</i>)	Azalomycin F analogues 1-7	C ₅₇ H ₉₈ N ₃ O ₁₇ , C ₅₉ H ₁₀₅ N ₄ O ₁₅ , C ₆₀ H ₁₀₆ N ₃ O ₁₅ , C ₆₁ H ₁₀₈ N ₃ O ₁₅ , C ₆₂ H ₁₁₀ N ₃ O ₁₅ , C ₆₄ H ₁₁₄ N ₃ O ₁₅ , C ₆₅ H ₁₁₆ N ₃ O ₁₅	Antifúngica e anticâncer	[86]
<i>Streptomyces</i> sp. KP6107 (soil)	Niphimycin	C ₅₉ H ₁₀₃ N ₃ O ₁₈	Antifúngica	[87]
<i>S. antibioticus</i> H12-15 (marine)	Neoantimycin A and B	(A) C ₂₇ H ₃₉ NO ₇ , (B) C ₂₆ H ₃₇ NO ₇	Antifúngica e anticâncer	[88]
<i>Streptomyces</i> sp. CT37 (rhizosphere of a <i>Caesalpinoideae</i>)	1H-indole-3-carboxaldehyde	C ₉ H ₇ NO	Antifúngica	[89]
<i>Streptomyces</i> sp. neau-D50 (root endophyte)	Borrelidin	C ₂₈ H ₄₃ NO ₆	Antifúngica	[90]
<i>Streptomyces</i> canus BYB02 (termite)	Resistomycin (1) and Tetracenomycin D (2)	(1) C ₂₂ H ₁₆ O ₆ , (2) C ₁₉ H ₁₂ O ₆	Antifúngica	[91]
<i>Streptomyces</i> strain YIM PH20095 (rhizosphere of <i>Panax notoginseng</i>)	Strepphenazine A1, B2, e C3	(A1) C ₁₄ H ₉ N ₂ O ₄ , (B2) C ₂₀ H ₁₇ N ₄ O ₂ , (C3) C ₁₉ H ₁₄ N ₃ O ₃	Antifúngica	[92]
<i>Streptomyces</i> sp. NBU3104 (sea sponge)	Antimycins I, J, K, M, e P	(I) C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₉ , (J) C ₃₀ H ₃₆ N ₂ O ₉ , (K) C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₉ , (M) C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₉ , (P) C ₃₁ H ₄₆ N ₂ O ₉	Antifúngica	[93]*
<i>Streptomyces</i> sp. SN194 (soil)	Chloroxaloterpin A and B	(A) C ₂₈ H ₃₇ ClN ₂ O ₃ , (B) C ₂₈ H ₃₆ ClNO ₃	Antifúngica	[94]
<i>S. yongxingensis</i> sp. nov. (<i>Menella woodin</i>)	Niphimycin C	C ₅₉ H ₁₀₃ N ₃ O ₁₈	Antifúngica	[95]*
<i>S. antibioticus</i> OUCT16-23 (marine)	Filipin analogues 1- 8, 11, and 12	(1) C ₂₈ H ₄₄ O ₉ , (2) C ₂₉ H ₄₆ O ₉ , (3) C ₂₉ H ₄₆ O ₁₀ , (5) C ₃₄ H ₅₆ O ₁₀ , (6) C ₃₃ H ₅₄ O ₁₀ , (7) C ₃₄ H ₅₆ O ₁₀ , (8) C ₃₅ H ₅₈ O ₁₀ , (11) C ₂₇ H ₄₂ O ₈ , (12) C ₃₇ H ₆₂ O ₁₁	Antifúngica	[96]*
<i>S. distallicus</i> (NRRL WC3846) (soil)	Aureothin (1), Allo-aureothin (2), Deoxyaureothin (3), 4',7-Dihydroxyisoflavone (4), 2-Methyl-5-(3-indolyl) oxazole (5), and 2-Ethyl-5-(3-indolyl) oxazole (6)	(1) C ₂₂ H ₂₃ NO ₆ , (2) C ₂₂ H ₂₃ NO ₆ , (3) C ₂₂ H ₂₅ NO ₅ , (4) C ₁₅ H ₁₀ O ₄ , (5) C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O, (6) C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	Larvicida	[97]*
<i>Streptomyces</i> sp. CNQ343 (marine sediments)	Bahamaolides A and B	(A) C ₃₉ H ₆₄ O ₁₁ , (B) C ₃₉ H ₆₄ O ₁₁	Antifúngica	[98]
<i>Streptomyces</i> strain N11-34 (marine)	Nyuzenamide A and B	(A) C ₆₆ H ₈₁ N ₁₁ O ₂₀ , (B) C ₆₇ H ₈₃ N ₁₁ O ₂₀	Antifúngica e anticâncer	[99]
<i>Streptomyces</i> sp. Lt 005 (marine)	Anhydroexfoliamycin	C ₂₂ H ₂₄ O ₈	Anti-inflamatória, regenerativa, e proteção de células nervosas	[100]
<i>Streptomyces</i> strain KRA17-580 (soil)	Cinnoline-4- carboxamide (1) and Cinnoline-4-carboxylic acid (2)	(1) C ₉ H ₇ N ₃ O ₂ , (2) C ₉ H ₆ N ₂ O ₂	Herbicida	[101]

<i>Streptomyces</i> sp. RB110-1 (termite)	Termidomycin A	C ₇₀ H ₁₁₉ NO ₂₀	Antifúngica	[102]
<i>S. avermitilis</i> TM24 (genetically modified)	macrolides 1 - 10	(1) C ₄₆ H ₇₀ O ₁₅ , (2) C ₄₆ H ₆₆ O ₁₂ , (3) C ₄₆ H ₇₂ O ₁₄ , (4) C ₄₆ H ₇₂ O ₁₄ , (5) C ₄₆ H ₆₆ O ₁₃ , (6) C ₄₆ H ₆₆ O ₁₂ , (7) C ₃₈ H ₅₂ O ₉ , (8) C ₃₉ H ₆₀ O ₁₀ , (9) C ₄₀ H ₆₂ O ₁₀ , (10) C ₃₉ H ₆₁ NO ₁₀	Antifúngica e anticâncer	[103]*
<i>S. solisilvae</i> HNM30702 (rhizosphere of <i>Cephalotaxus hainanensis</i>)	Soliseptide A	C ₃₁ H ₅₄ N ₈ O ₉	Antibacteriana e Antifúngica	[104]
<i>Streptomyces</i> sp. RM-4-15 (soil)	Ruthmycin	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	Antifúngica	[105]
<i>S. albolongus</i> (<i>Elephas maximus</i>)	19-Methoxybafilomycin C1 amide (1), 21-Deoxybafilomycin A1 (2) and A2 (3), (1β,4β,4α,8α)-4,8a-Dimethyloctahydronaphthalene-1,4a(2H)-diol (4), (1β,4β,4α,7α,8α)-4,8a-Dimethyloctahydronaphthalene-1,4a,7(2H)-triol (5)	(1) C ₄₀ H ₆₃ NO ₁₁ , (2) C ₃₅ H ₅₈ O ₈ , (3) C ₃₆ H ₆₀ O ₈ , (4) C ₁₂ H ₂₂ O ₂ , (5) C ₁₂ H ₂₂ O ₃	Antibacteriana, Antifúngica, e anticâncer	[106]
<i>Streptomyces</i> Species MBT28 (soil)	7-prenylisatin	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂	Antibacteriana	[107]
<i>S. caniferus</i> CA-271066 (marine)	Caniferolide A	C ₇₇ H ₁₂₂ O ₃₁ S	Atenuante da neuroinflamação, diminuição do estresse oxidativo e beta-amilóide e agente antipatologia de Tau	[108]
<i>Streptomyces</i> sp. AD-3-6 (soil)	Nybomycin B, C, and nybomycin D	(B) C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₅ , (C) C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄ , (D) C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₃	Antibacteriana, Antifúngica, e anticâncer	[109]
<i>Streptomyces</i> sp. KY11784 (líquen <i>Pseudocyphellaria dissimilis</i>)	Skyllamycin D and E	(D) C ₇₅ H ₉₆ N ₁₂ O ₂₁ , (E) C ₇₅ H ₉₆ N ₁₂ O ₂₀	Antibacteriana e Antifúngica	[110]
<i>S. lomondensis</i> S015 (soil)	1-carboxyl-6-formyl-4,7,9-trihydroxy-phenazin	C ₁₄ H ₉ N ₂ O ₆	Antifúngica	[111]
<i>S. eurocidicus</i> CGMCC 4.1086	Naphthocyclinone 1 - 6	(1) C ₃₄ H ₃₃ O ₁₃ , (2) C ₃₆ H ₃₅ O ₁₄ , (3) C ₃₃ H ₃₁ O ₁₃ , (4) C ₃₅ H ₃₃ O ₁₄ , (5) C ₃₅ H ₃₁ O ₁₄ , (6) C ₃₅ H ₃₃ O ₁₄	Antifúngica	[112]
<i>S. griseus</i> ATCC 12475	Grisgenomycin A and B	(A) C ₆₅ H ₉₃ N ₁₅ O ₁₈ , (B) C ₆₅ H ₉₀ N ₁₄ O ₁₈	Antiviral	[113]*
<i>Streptomyces</i> sp. PKU-EA00015 (<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	Strepimidazoles A - G	(A) C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O, (B) C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O, (C) C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O, (D) C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O, (E) C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O, (F) C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₂ , (G) C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₂	Antifúngica	[114]
<i>Streptomyces</i> sp. ZQ4BG (mangrove)	Polyene-polyol macrolides 1 - 9	(1) C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀ , (2) C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀ , (3) C ₃₆ H ₆₀ O ₁₂ , (4) C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁ , (5) C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁ , (6) C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁ , (7) C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁ , (8) C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁ , (9) C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	Antifúngica e anticâncer	[115]
<i>S. argenteolus</i>	Argenteolide A	C ₃₅ H ₅₅ NO ₁₄	Antifúngica e anticâncer	[116]*
<i>Streptomyces</i> sp. XMA39	Strepoxepinmycin C and D	(C) C ₂₅ H ₃₃ NO ₁₀ , (D) C ₂₅ H ₂₉ NO ₉	Antibacteriana, Antifúngica, e anticâncer	[76]
<i>S. atrovirens</i> LQ13 (soil)	Atrovimycin	C ₆₅ H ₉₀ O ₂₀ N ₁₀	Antibacteriana e Antifúngica	[117]*
<i>Streptomyces</i> sp. PU-MM59 (Himalayan)	Himalaquinones A - G	(1) C ₁₉ H ₁₄ O ₇ , (2) C ₂₀ H ₁₆ O ₇ , (3) C ₂₀ H ₁₆ O ₇ , (4) C ₂₀ H ₁₆ O ₆ , (5) C ₂₀ H ₁₆ O ₆ , (6) C ₂₁ H ₁₆ O ₉ , (7) C ₂₀ H ₁₆ O ₆	Antibacteriana, Antifúngica, e anticâncer	[118]

<i>Streptomyces</i> sp. HTL16 (feces of <i>Dama dama</i>)	Bafilomycin M	C ₃₅ H ₅₄ O ₇	Antiviral	[119]
<i>Streptomyces</i> sp. strain P8-A2 (soil)	Azodyrecin B	C ₁₉ H ₃₆ N ₂ O ₃	Anticâncer	[120]
<i>Streptomyces</i> sp. ICBG1318 (<i>Melipona scutellaris</i>)	Meliponamycins A and B	(A) C ₃₆ H ₆₁ N ₇ O ₁₂ , (B) C ₃₇ H ₆₃ N ₇ O ₁₂	Larvicida, antibacteriana, e antiparasitária	[121]
<i>Streptomyces</i> sp. DM28 (Riverine sediment)	Dumulmycin	C ₃₃ H ₄₈ O ₈	Antibacteriana	[122]*
<i>Streptomyces</i> sp. Q22 (mangrove)	Bagremycin C	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₆ S	Antifúngica e anticâncer	[123]
<i>Streptomyces</i> sp. GKU 257-1 (marine)	Sattahipmycin	C ₂₆ H ₁₉ NO ₈	Antibacteriana e antiparasitária	[124]
<i>S. canescus</i>	Candicidins A3, A2D, A1	(A3) C ₅₉ H ₈₆ O ₁₈ N ₂ , (A2D) C ₅₉ H ₈₄ O ₁₈ N ₂ , (A1) C ₅₉ H ₈₄ O ₁₇ N ₂	Antifúngica	[125]
<i>S. xiamenensis</i> 318 (mangrove)	Capsimycins 2, B, C, D, E, F, G	(2) C ₃₀ H ₄₀ N ₂ O ₆ , (B) C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₅ , (C) C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₆ , (D) C ₂₉ H ₃₉ N ₂ O ₅ Cl, (E) C ₃₁ H ₄₄ N ₂ O ₇ , (F) C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₆ , (G) C ₂₉ H ₃₈ N ₂ O ₆	Anticâncer	[126]
<i>Streptomyces</i> sp. CMAA 1527 and <i>Streptomyces</i> sp. CMAA 1653 (<i>Deschampsia antarctica</i>)	Cinerubin B, actinomycin V	(B) C ₄₂ H ₅₁ NO ₁₆ , (V) C ₆₂ H ₈₄ N ₁₂ O ₁₇	Anticâncer	[127]
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-4 (ARS culture collection)	Venturicidin E	C ₄₁ H ₆₉ NO ₁₁	Anticâncer	[128]
<i>Streptomyces</i> sp. ZZ741 (marine)	Streptoglutarimides A - J	(A) C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ , (B) C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ , (C) C ₁₅ H ₁₉ NO ₅ , (D) C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ , (E) C ₁₅ H ₂₁ NO ₆ , (F) C ₁₅ H ₂₁ NO ₆ , (G) C ₁₅ H ₂₁ NO ₅ , (H) C ₁₅ H ₂₃ NO ₅ , (I) C ₁₅ H ₂₃ NO ₅ , (J) C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Antibacteriana, Antifúngica, e anticâncer	[129]
<i>Micromonospora</i> sp. AKA109 (marine)	Akazaoxime	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	Antibacteriana	[130]*
<i>Micromonospora</i> sp. M71-A77 (marine)	Levantilide A and B	(A) C ₃₀ H ₅₂ O ₆ , (B) C ₃₀ H ₅₀ O ₆	Anticâncer	[131]
<i>Micromonospora</i> sp. SCSIO 07395 (marine)	Microechmycin A–E	(A) C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₄ , (B) C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₆ , (C) C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ , (D) C ₃₃ H ₂₈ N ₄ O ₉ , (E) C ₃₃ H ₂₈ N ₄ O ₉	Antibacteriana	[68]
<i>Micromonospora</i> sp. WH06 (soil)	N-acetyltryptamine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O	Antiparasitária	[230]
<i>M. matsumotoense</i> M-412 (marine)	Paulomycin G	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₁₁ S	Anticâncer	[132]
<i>Micromonospora</i> sp. G039 (marine)	Isopimare-2-one-3-ol-8,15-diene (1), Lagumycin B (2)	(1) C ₂₀ H ₃₀ O ₂ , (2) C ₁₈ H ₁₂ O ₅	Antibacteriana	[133]
<i>Micromonospora</i> sp. CNJ-878 (marine)	Juvenimicin C	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₀	Anticâncer	[134]
<i>Micromonospora</i> sp. RV115 (sea sponge)	Diazepinomicin	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₄	Anticancer, antiparasitic, and antioxidant	[135]
<i>Micromonospora</i> sp. GMKU326	Maklamicin	C ₃₂ H ₄₄ O ₆	Antibacteriana	[136]
<i>Micromonospora</i> sp. B006 (freshwater)	Diazepinomicin	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₄	Síndrome Phelan-McDermid e epilepsia	[137]
<i>Micromonospora</i> sp. AKA109 (marine)	Akazaoxime	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	Antibacteriana	[138]
<i>M. yangpuensis</i> DSM 45577	YPM F and G	(F) C ₂₆ H ₁₇ NO ₈ , (G) C ₂₆ H ₁₇ NO ₇	Anticâncer	[139]

<i>Nocardia</i> sp. Acta 3026 (mangrove)	Nocardichelin A and B	(A) C ₄₀ H ₆₅ N ₅ O ₈ , (B) C ₃₈ H ₆₁ N ₅ O ₈	Anticâncer	[140]
<i>Nocardia</i> sp. WMMB215 (<i>Trididemnum orbiculatum</i>)	Peptidolipin B and E	(B) C ₅₉ H ₁₀₇ N ₇ O ₁₁ , (E) C ₆₁ H ₁₀₉ N ₇ O ₁₁	Antibacteriana	[141]
<i>Kitasatospora</i> sp. CPCC 204717 (<i>Huperzia serrata</i>)	Zelkovamycin and Zelkovamycin E	C ₃₆ H ₄₅ O ₉ N ₉ S, (E) C ₃₅ H ₄₄ N ₉ O ₉ S	Antiviral	[142, 143]
<i>K. griseola</i> MF730-N6	Satosporin B and C	(B) C ₂₈ H ₄₆ O ₉ , (C) C ₂₂ H ₃₆ O ₄ ,	Anticâncer e antibacteriana	[144]
<i>Kitasatospora</i> sp. HKI 714 (soil)	Endophenazines 2, A1, G	(2) C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₄ , (A1) C ₁₈ H ₁₆ O ₃ N ₂ , (G) C ₁₈ H ₁₆ O ₃ N ₂	Antibacteriana	[145]
<i>K. cystarginea</i> NRRL-B16505 (soil)	Cystargolide A and B	(A) C ₁₈ H ₃₀ N ₂ O ₆ , (B) C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O ₆	Anticâncer	[146]
<i>Kitasatospora</i> sp. (Alaska soil)	Cyclodepsipeptide 1 and 2, and kitastatin 1 (3)	(1) C ₃₇ H ₅₃ N ₃ O ₁₃ , (2) C ₃₆ H ₅₁ N ₃ O ₁₃ , (3) C ₃₆ H ₅₃ N ₃ O ₁₂	Antibacteriana, antifúngica, e anticâncer	[147]
<i>Kitasatospora</i> sp. MBT66. (soil)	Endophenazines (A - E)	(1) C ₂₀ H ₂₁ N ₃ O ₆ , (2) C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₄ , (3) C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ , (4) C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ , (5) C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	Antibacteriana	[148]

Obs.: Esta tabela destaca dados entre 2012 e 2023. Ref* = Referências. *Estudos de mineração genômica e metabolômica.

2.3 ESPECTRO ANTIMICROBIANO

As linhagens de actinomicetos cultiváveis e não cultiváveis podem ser encontradas em solos ou outros ambientes que variam de oligotróficos a copiotróficos, de pH ácido a básico, de locais secos a inundados, e de altas a baixas temperaturas, entre outros fatores. Em seus genomas, essas cepas carregam BGCs e as marcas epigenéticas das pressões ecológicas que permeiam suas atividades metabólicas primárias e secundárias. Muitas destas pressões ecológicas advêm da coexistência forçada com outros microrganismos, muitas vezes em situações hostis. Isto não é sem razão, uma vez que, historicamente, a principal aplicação dos metabolitos de actinomicetos tem sido dentro do espectro antimicrobiano, onde ainda tem a sua maior importância biotecnológica. A seguir, veremos vários exemplos das últimas décadas que consolidam o potencial dos actinomicetos e os projetam como fontes fundamentais de metabolitos para a necessidade contínua de combate aos patógenos humanos e à agricultura, especialmente cepas resistentes a medicamentos ou multirresistentes.

2.3.1 Antibacterianos

A resistência microbiana aos antibióticos (MRA) ceifou a vida de milhares de pessoas nas últimas décadas [149,150]. De acordo com pesquisas anuais da Organização Mundial da Saúde iniciadas em 2015, esse problema de saúde pública é uma grande ameaça para a humanidade devido ao surgimento de cepas multirresistentes (MDR) [4,151,152]. Como exemplos, há relatos de cepas de *E. coli* multirresistentes, principais causas de mortes infantis por diarreia e septicemia [81]. Há também registros de cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* sp., que são as mais frequentemente responsáveis por infecções em pessoas internadas em unidades de terapia intensiva (UTI), podendo evoluir para septicemia [5]. Em resumo, a resistência aos antibacterianos pode ser representada pelos três mecanismos mais bem-sucedidos e compreendidos: (I) uso de bombas de efluxo, estruturas de membrana plasmática que os expõem para o ambiente extracelular; (II) pelas ações das enzimas citosólicas que os metabolizam; (III) e por meio de alterações de alvos, que é outra forma de contornar a ação dessas drogas [153].

O apelo é urgente, uma vez que o cenário global se assemelha a uma situação pandêmica devido à rápida propagação das estirpes MDR. Vários estudos têm buscado explorar o potencial biotecnológico dos actinomicetos e apresentar novos isolados candidatos a produtores de bioativos de PNMs por meio de triagem pelo método de coculturas com cepas MDR. Num destes estudos, isolados de solos egípcios (identificados como *S. griseus*, *S. flaveolus* e outros actinomicetos) mostraram ter potencial para serem eficazes contra agentes patogênicos bacterianos e fúngicos MDR [154]. Em outro estudo, entre 100 linhagens de actinomicetos endofíticos de algas marinhas (*Caulerpa racemosa*) que foram testadas, cinco mostraram atividades antagonistas contra bactérias Gram-negativas MDR, que são consideradas entre os patógenos as mais virulentas porque têm uma parede celular mais espessa [155]. Embora muitos exemplos como esses ainda precisem ser confirmados ou tenham os princípios ativos identificados, eles sinalizam substâncias capazes de contornar os mecanismos de resistência dos microrganismos MDR e revelam que novas classes de antibióticos com diferentes mecanismos de ação podem ser possíveis.

Como exemplo do potencial do ambiente marinho para ser fonte de novos antibióticos, um novo antibiótico, nomeadamente desertomicina G, foi produzido por *S. althoticus* MSM3 isolado da macroalga *Ulva* sp. [156]. Essa substância destaca-se por seu espectro que se estende além da atividade bactericida contra *M. tuberculosis*, apresenta atividade contra patógenos

Gram-positivos e negativos, além de atuar contra linhagens celulares cancerígenas do adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e do carcinoma de cólon (DLD- 1) l. Os princípios ativos que apresentam essas características são de grande relevância, uma vez que pessoas que realizam tratamentos contra o câncer são mais propensas a infecções e tais substâncias podem ajudar a prevenir infecções.

Os estudos acima são apenas alguns dos exemplos de triagens realizadas e publicadas em diversos artigos nos últimos anos e enfatizam o potencial antibacteriano e biotecnológico de actinomicetos isolados de esponjas marinhas [157], solos [155], vegetais [158] e manguezais [159]. Embora relatórios como estes revelem apenas uma pequena fração de um universo inteiro que ainda é pouco explorado, é motivante encontrar isolados tão promissores e capazes de enfrentar numerosos patógenos como cepas MDR e MRA, o que nos dá esperança de que será possível minimizar as numerosas mortes em ambientes hospitalares [160,161]. Por outro lado, a urgência e a necessidade contínua de novos medicamentos para enfrentar microrganismos resistentes aos medicamentos parecem exigir mais e melhores pesquisas sobre o promissor filo dos actinomicetos, entre outras soluções potenciais.

2.3.2 Antifúngicos

Tal como acontece com as bactérias patogénicas, nas últimas décadas, a resistência fúngica e o surgimento de estirpes MDR têm aumentado de forma alarmante em todo o mundo [162]. Os fungos patogênicos são oportunistas e inimigos mortais das pessoas imunossuprimidas; todos os anos, desde 2012, foram registadas pelo menos 1,4 milhões de mortes de pessoas vítimas de infecções fúngicas [162,163]. Sem dúvida, *Candida albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* são as principais culpadas por essas infecções, fato agravado pelo surgimento de cepas que resistem a pelo menos dois ou mais antifúngicos das classes azólica e polieno, e um das equinocandinas [162,164,165]. Não é sem razão que um dos principais órgãos de controle de doenças, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), enfatiza a necessidade urgente de novos antifúngicos no seu recente alerta à comunidade científica sobre o aumento da letalidade das infecções fúngicas devido o rápido surgimento de cepas MDR [79].

Este cenário global tem impulsionado a prospecção de novos recursos genéticos que produzam PNMs que possam aumentar o arsenal de antifúngicos disponíveis [165]. Numa das primeiras prospecções no início do século XXI, num rastreio de 320 actinomicetos de solos marroquinos para atividades antifúngicas, 23 mostraram fortes atividades contra *C. tropicalis*

R2 e *Pythium irregulare* (este último resistente à anfotericina B e nistatina) sem interferência na síntese de ergosterol, ou seja, com mecanismos de ação não poliênico e azoe [166]. A resistência aos polienos e azoes ocorre quando os medicamentos dessas classes não inibem a síntese do ergosterol ou não apresentam afinidades por ele na membrana celular após a modificação [166]. Além disso, o ergosterol é muito semelhante ao colesterol das células humanas e este é um fator limitante para estas classes [167]. Como alternativa aos inibidores da síntese do ergosterol, têm sido utilizadas substâncias sintéticas, como as equinocandinas, classe de antifúngicos que inibem a síntese da parede celular do fungo, estrutura que não é observada nas células humanas. Outra classe menos conhecida que não inibe a síntese de ergosterol é a das flucitosinas, entre elas a 5-flucitosina (5FC), que atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos em fungos [166,167]. Apesar da relativa eficácia das equinocandinas e das flucitosinas, existem vários outros estudos que têm procurado antifúngicos naturais, de preferência não inibidores da síntese de ergosterol, como no rastreio de actinomicetos pelos investigadores marroquinos mencionados no parágrafo anterior. Outra descoberta importante foi a descoberta da turbinmicina, produzida pela cepa de actinomicetos *Micromonospora* sp. (WMMC-415), que foi isolado da esponja marinha *Ecteinascidia turbinata* e é um bioativo promissor que suprime um dos patógenos fúngicos mais resistentes, nomeadamente *C. auris*, bem como *Aspergillus fumigatus* [168]. Num mecanismo de ação diferenciado, a turbinmicina tem como alvo uma proteína citosólica, a Sec14, indispensável aos fungos e envolvida no transporte intracelular de substâncias produzidas no retículo endoplasmático.

Em comparação com a triagem que busca novos antibacterianos, a quantidade de prospecção realizada para novos antifúngicos é muito menor; no entanto, vários estudos e revisões especularam sobre muitos candidatos actinomicetos como potenciais produtores de novos fungicidas contra as cepas MDR de *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, por exemplo [169,170]. A gravidade das doenças fúngicas, o aparecimento contínuo de estirpes resistentes aos medicamentos, a dificuldade decorrente do fato de as células fúngicas serem eucarióticas, como as nossas, e o potencial antifúngico dos actinomicetos, torna-os alvos naturais na procura de novos modelos antifúngicos, idealmente capazes de atacar apenas células fúngicas e não humanas.

2.3.3 Antivirais

Recentemente, durante cerca de três anos, o mundo viveu uma nova pandemia desencadeada pela síndrome respiratória aguda grave - Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que, até

2022, ceifou mais de 6 milhões de vidas [171]. É uma exceção, mas as síndromes respiratórias e a gripe são graves problemas de saúde pública e são causadas pelos vírus mais prevalentes [172]. Uma destas doenças virais, a síndrome do vírus sincicial, afetou cerca de 33,8 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade, com aproximadamente 3,4 milhões de casos graves e 199.000 mortes em 2005 [173]. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), milhões de pessoas convivem com hepatites virais (tipos: A, B e C), que causam milhões de mortes todos os anos. Prevê-se o desenvolvimento da reincidência de vírus patogênicos e o aumento de vírus emergentes devido à falta de saneamento básico, desnutrição e alterações climáticas [172].

O desenvolvimento de antivirais é muito mais lento em comparação com o de antibacterianos e antifúngicos porque a imunização ou vacinação é o método preferido para prevenir ou conter este tipo de patologias. No entanto, a pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 mostrou-nos a necessidade de medicamentos de emergência, e os métodos computacionais foram muito importantes nestas circunstâncias, uma vez que permitiram ensaios *in silico* utilizando substâncias conhecidas. Em um caso utilizando esse método, 50 compostos bioativos isolados de actinomicetos de mangue foram testados contra a NSP10-metiltransferase do agente etiológico da SARS-CoV-2 [174]. Dentre essas substâncias, a sespenina, a xiamicina-C, a xiamicina-D, a xiamicina-E, a xiamicina-éster metílico e a xiamicina-A apresentaram as maiores capacidades de neutralização desta enzima principal componente do ciclo de replicação deste vírus. Na verdade, a necessidade de antivirais para doenças generalizadas é anterior à COVID-19. Num exemplo recente, em 2013, o continente americano sofreu a epidemia do vírus Zika (ZIKV) que afetou milhões de pessoas, algumas das quais desenvolveram síndrome de Guillain-Barré e microcefalia [175]. Nesta ocasião, numerosos isolados bioativos de actinomicetos foram testados *in silico* e alguns, como a daptomicina e a nanchangmicina, mostraram fortes atividades contra o agente causador, embora anteriormente estes não tivessem sido descritos para o tratamento desta virose [176,177].

Neste contexto desafiador para o desenvolvimento de novos antivirais, há descobertas que trouxeram esperança às pessoas afetadas pelo vírus *HIV-1*. Estudos do isolado *S. albosporus* resultaram no isolamento de *N,N,N*-(trimetilado)-Tyr-L-Leu-L-Val-L-Leu-(desidratado)-His, que é capaz de inibir a protease- *HIV-1* que é essencial para o ciclo deste patógeno [178]. Da mesma forma, ahmpatinina-iBu de *Streptomyces* sp. (CPCC202950) foi considerado um potente inibidor da mesma protease do *HIV-1* [179]. Por outro lado, a 3-acetil-5-metil-2'-desoxiuridina, derivada de *S. microflavus*, foi ativa em bioensaios contra o vírus da hepatite B, herpes simples tipo 1 e 2 (*HSV-1* e *HSV-2*) e varicela vírus zoster (VZV) [180].

Nos estudos citados acima, vemos exemplos do potencial ainda pouco explorado dos actinomicetos para produção de antivirais, e ensaios *in silico* para triagem de substâncias com esse potencial. Porém, os ensaios *in silico* permitem observar apenas preliminarmente a afinidade de uma substância por um alvo e isso não é suficiente para usos emergenciais – uma vez que outros experimentos, inclusive aqueles envolvendo a farmacocinética e a farmacodinâmica de um princípio ativo, são necessários para estabelecer sua real eficácia bem como a dosagem correta, entre outros fatores. Por exemplo, embora tenham sido indicadas por ensaios *in silico* para SARS-CoV-2, a hidroxicloroquina e a azitromicina não foram eficazes contra a doença COVID-19 [181]. As doenças virais já mataram um número incalculável de pessoas e a arma mais eficiente são as vacinas; entretanto, buscar novos medicamentos que auxiliem no tratamento de vírus é essencial para reduzir a mortalidade, e os actinomicetos já demonstraram sua capacidade de fornecer PNMs que podem auxiliar no tratamento de inúmeros vírus.

2.3.4 Antiparasitários

Das doenças parasitárias, a malária é uma das mais devastadoras e mortais. O continente Africano é o mais afetado por esta doença e aproximadamente 96% ou 627.000 mortes pela doença ocorreram em 2020 [182]. Em todo o mundo, os vetores da malária são os mosquitos do género *Anopheles*, incluindo *A. gambiae*, *A. coluzzii* e *A. arabiensis*, que transmitem os protozoários *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* [183].

P. falciparum é o que mais preocupa, pois é o mais incidente e responsável pela forma mais agressiva dessa parasitose, além de apresentar cepas resistentes aos antiplasmódicos atuais [172,184]. Além da malária, que é uma parasitose endêmica em regiões tropicais e subtropicais, outras doenças transmitidas por protozoários, como a leishmaniose e a tripanossomíase (doença de Chagas), são problemas de saúde pública na maioria dessas regiões devido à resistência aos antimoniais. Quando não tratados corretamente, podem evoluir para quadros mais graves e levar à morte [185]. Da mesma forma, e também muito graves, as infecções por *Entamoeba histolytica* afetaram aproximadamente 50 milhões de pessoas só em 2012, das quais 100.000 morreram. Numa revisão recente, a amebíase já é considerada a terceira parasitose mais mortal em todo o mundo, especialmente em países subdesenvolvidos da América Central/Sul, África e Ásia devido ao saneamento básico deficiente. Com uma média de 70 mil mortes nos últimos anos, essa parasitose pode afetar diversos órgãos do nosso corpo, o que pode levar a um quadro mais grave [186].

Os testes do extrato bruto de *S. canus* (N25) mostraram as melhores atividades antiprotozoárias para *P. falciparum*, além de inibir também o protozoário *Toxoplasma gondii*, agente causador da toxoplasmose. O ácido fenazina-1-carboxílico, que é capaz de inibir esses patógenos, foi identificado nas frações [187]. A estaurosporina (STS) e a 7-oxostaurosporina (7OSTS), isoladas de *S. sanyensis*, apresentaram excelentes atividades antiparasitárias contra *Leishmania amazonensis*, *L. donovani*, bem como *T. cruzi* e *T. brucei* [188], que são os agentes causadores da doença de Chagas e da doença do sono. Em outro estudo, esses protozoários foram neutralizados *in vitro* pelo actinoalólido-A de *Actinoallomurus fulvus* (MK10-036) [189]. Em relação às infecções causadas por *E. histolytica*, observando a resistência e os efeitos tóxicos dos medicamentos, um estudo com extratos de actinomicetos marinhos rendeu equinomicina-A e tirandamicina-A, que apresentaram forte atividade antiamebíase e reduziram o crescimento de *E. histolytica* (HM1:IMSS) e *E. histolytica* (Col) em 84,2% e 64,8%, respectivamente [190]. Até o momento, vários estudos destacaram inúmeras PNMs com capacidade de suprimir numerosos protozoários e suas resistências, entre as quais vários isolados de actinomicetos, como mostra a revisão de Estrella-Parra *et al.* [191]. Desde o início do século 21, muitos estudos foram publicados relatando triagem com isolados de actinomicetos, que, entre outras atividades, mostraram atividades antimicrobianas. Embora os actinomicetos sejam alvos naturais na busca de novos modelos antimicrobianos, há uma necessidade urgente de identificação das moléculas responsáveis pelas atividades biológicas de cepas promissoras recentemente isoladas, uma vez que a maioria dos estudos termina em estágios preliminares sem que as substâncias responsáveis pelas atividades sejam conhecidas.

2.4 ESPECTRO NÃO-ANTIMICROBIANO

2.4.1 Anticânceres

A área da medicina enfrenta dificuldades no tratamento de diversos tipos de câncer. Esta doenças já ceifaram milhões de vidas em todo o mundo e é caracterizada pelo surgimento e proliferação de células anormais, agressivas e invasivas [192,193]. Dados do início do século XXI mostram que o fardo global do câncer em 2000 atingiu 10 milhões de novos casos e 6 milhões de mortes, com 22 milhões de pessoas a viver com câncer neste período [194]. Várias projeções da época previam que esses números aumentariam ou até duplicariam, havendo necessidade de mais estudos em busca de novos produtores de medicamentos anticânceres [193,195]. Recentemente, estas projeções foram confirmadas; por exemplo, num levantamento

de dados de 2018, foi observado um aumento significativo na incidência anual, com estimativas gerais de 18,1 milhões de novos casos e a ocorrência de 9,6 milhões de mortes naquele ano [196]. Em 2020, esses números atingiram 19,3 milhões de novos casos, com o câncer de mama feminino (11,7%) superando o câncer de pulmão (11,4%), seguido pelo câncer colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e câncer de estômago (5,6%) [172,193].

Muitos isolados de actinomicetos são promissores na produção de substâncias ativas com capacidades antimicrobianas e anticancerígenas. Por exemplo, entre 41 isolados endofíticos de *Streptomyces* spp., 31,7% apresentaram atividades citotóxicas contra as células cancerígenas A549 (pulmão), 29,3% para HL-60 (sangue), 85,4% para BEL-7404 (fígado) e 90,2% para P388D1 (sangue), destacando-se sete linhagens como as mais promissoras [197]. Deve-se notar que os cânceres de pulmão e fígado estão entre os mais comuns e mais mortais [193]. Num estudo mais recente, três isolados de *Streptomyces* spp. provenientes de solos e sedimentos marinhos apresentaram atividades antimicrobianas e anticancerígenas em seus extratos brutos [198]. Em seu extrato, o isolado mais notável, *Streptomyces* sp. D-EGY, apresentou IC₅₀ de 0,85 µg/mL para a linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Os autores relataram quarenta compostos isolados e identificados deste extrato, cujas correlações com atividades anticancerígenas devem ser investigadas.

Em outros dois estudos realizados nos últimos anos, as expectativas parecem mais favoráveis. Em primeiro lugar, conforme relatado acima, a desertomicina G bactericida contra *M. tuberculosis* também é ativa contra células cancerígenas das linhagens de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e carcinoma de cólon (DLD-1) [156]. Em seguida, a caerulomicina A isolada de *Actinoalloteichus cyanogriseus* (DSM 43889) mostrou atividades citotóxicas de amplo espectro contra linhagens celulares de câncer A375 (melanoma), A549 (pulmão), H1299 (pulmão), HepG2 (fígado), HT29 (cólon humano), HL-60 (sangue) e M624 (músculo) [199]. O estudo do seu mecanismo de ação indicou sua capacidade de interferir na formação dos microtubos e na replicação do DNA, atuando especificamente nas enzimas responsáveis pela polimerização dos microtubos e na Topoisomerase I, responsável pelo relaxamento da molécula de DNA durante sua replicação. Segundo os autores, este é o segundo princípio ativo isolado de microrganismos com atividade anticancerígena que atua em dois alvos, ao contrário do Taxol® (isolado de plantas), que atua apenas na síntese de microtubos.

Em comparação com os medicamentos antineoplásicos disponíveis no mercado, a maioria derivados de plantas, estes aspirantes podem ser considerados superiores e têm menor custo de obtenção, revelando assim que o rastreio de metabólitos de actinomicetos pode ser muito atrativo. No entanto, embora inúmeras revisões e estudos tenham consolidado o amplo

espectro de ação dos compostos bioativos destas bactérias [200-205], há muito mais a descobrir sobre o potencial anticancerígeno dos metabólitos actinobacterianos. Alguns dos metabólitos anticancerígenos são possivelmente os mesmos que os actinomicetos utilizam contra fungos na natureza, uma vez que os fungos são seres eucarióticos como nós, substâncias que podem combater fungos também podem combater cânceres que são constituídos por nossas próprias células modificadas. Embora esta hipótese também sinalize um risco de toxicidade para células humanas saudáveis, pode ser uma boa ideia procurar tanto substâncias anticancerígenas entre os compostos antifúngicos como antifúngicos entre os metabólitos anticancerígenos.

2.4.2 Antidiabetes

No século XXI, entre as doenças crônicas destaca-se a diabetes, sobretudo a diabetes tipo 2 (em média 95% dos casos), que é a mais mortal. Esta é uma disfunção metabólica que resulta da baixa disponibilidade de insulina ou recepção inadequada de células-alvo à insulina [206-208]. De acordo com um dos últimos relatórios da OMS, esta doença foi um dos principais fatores que predispõe as pessoas afetadas a um estado mais grave de SARS-CoV-2 [173]. Só nos Estados Unidos, uma das populações mais obesas do mundo, estima-se que 10% da população tenha um dos tipos de diabetes [209].

O isolado endofítico *S. longisporoflavus* destaca-se por produzir um extrato com atividade inibitória para a enzima alfa-amilase [27]; esta enzima dificulta a absorção de glicose em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. De fato, para tratar a diabetes tipo 2, alguns isolados bioativos de actinomicetos, como a voglibose [210] e a acarbose [211], obtidos de *S. hygroscopicus-limoneus* e *S. calvus*, respectivamente, já são usados. A voglibose atua inibindo a alfa-glicosidase, reduzindo assim os níveis de glicose no sangue em pessoas com diabetes mellitus [211], e a acarbose é um inibidor da alfa-glicosidase e da alfa-amilase no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 [212]. Além disso, mais recentemente, no estudo de Kawahara *et al.* [213], um novo candidato para o tratamento do diabetes mellitus 2, o alcaloide amamina (1), isolado de *Kitasatospora* sp. O HGTA304 foi capaz de inibir a α -glicosidase com um valor IC₅₀ (56 μ M) aproximadamente dez vezes menor que a acarbose (549 μ M). Resultados como estes dão-nos esperança de que possamos encontrar isolados de actinomicetos mais promissores que possam ser usados para tratar doenças crônicas como a diabetes.

2.4.3 Anticolesterol

O colesterol é um componente essencial das células humanas, mas seu excesso na corrente sanguínea pode causar danos à saúde humana, principalmente problemas cardíacos [214]. Na investigação de um BGC de *S. lunaelactis* MM109, que sintetiza PNMs distintos, observou-se que a disponibilidade de ferro na forma mineral é essencial para a síntese do *p*-vinilfenil-3-nitroso-4-hidroxibenzoato, que é um precursor de ferroverdinas triméricas que possuem atividade anticolesterol [28]. A descoberta de novas ferroverdinas pode auxiliar no tratamento da sarcoidose cardíaca, que é uma inflamação cardíaca relacionada a níveis elevados de colesterol no sangue.

2.4.4 Tratamento de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que causa demência e afeta milhares de pessoas todos os anos [215]. Seus mecanismos fisiológicos ainda estão sendo investigados; entretanto, os acúmulos de β -amilóide e acetilcolinesterase no neocórtex são fatores determinantes. Na verdade, os inibidores da acetilcolinesterase ajudam a melhorar a disponibilidade de acetilcolina, um neurotransmissor indispensável para as atividades cognitivas e a memória. Esta atividade ajuda a diminuir os efeitos negativos do acúmulo de β -amilóide no neocórtex [216]. Estima-se que até 2050, a cada 33 segundos, uma pessoa será afetada por esta doença [215,217-219]. Ainda não existem medicamentos feitos a partir de actinomicetos que possam ser utilizados no tratamento desta doença neurodegenerativa, mas alguns estudos já relatam a possibilidade dos actinomicetos serem fontes de princípios ativos capazes de auxiliar no seu tratamento. Podemos citar, como exemplo, um estudo da comunidade endofítica de *Gynura cusimbua*, planta medicinal chinesa que, segundo o conhecimento tradicional desta região, é utilizada na prevenção da hipertensão, doenças coronárias, Alzheimer e aterosclerose. Este estudo mostrou que essa planta possui uma rica diversidade de actinomicetos. O estudo também levanta a hipótese de que alguns dos metabólitos encontrados na planta relacionados às atividades biológicas podem ser originários de actinomicetos [220]. Outro estudo reforça esta hipótese, pois, entre os mais de 200 actinomicetos isolados de esponjas do Mar Cáspio e do Golfo Pérsico, 50% apresentaram extratos com atividade anti-acetilcolinesterase [215]. Os autores enfatizam que os diversos compostos isolados e caracterizados com atividades podem auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas que afetam a cognição e a memória.

2.4.5 Antiúlcera e anti-inflamatórios estomacais

Em estudos da microbiota de uma esponja endêmica do Mar Vermelho (*Spheciospongia mastoidea*), foi identificado um actinomiceto (RA2) que é capaz de produzir dois compostos, butilcicloheptilprodigiosina e undecilprodigiosina. Essas substâncias apresentaram atividades antiúlcera e anti-inflamatória em experimentos com ratos que sofreram lesões estomacais induzidas por ácido clorídrico/etanol. Quando estes compostos isolados de RA2 foram administrados oralmente, foram observadas taxas diminuídas de lesões em áreas de ulceração, anomalias histopatológicas e infiltração de neutrófilos. Estes resultados são semelhantes aos do omeprazol, o medicamento antiúlcera padrão [221]. Por outro lado, *S. gramineus*, associado ao líquen *Leptogium trichophorum*, juntamente com três actinofuranonas conhecidas, produziu seis novas actinofuranonas promissoras (D a I) [222]. Dentre estas, duas conhecidas e duas novas actinofuranonas se destacaram como potenciais candidatas a anti-inflamatórios devido aos resultados em testes de atenuação da produção de óxido nítrico (NO) e evasões de citocinas pró-inflamatórias (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α).

2.4.6 Proteção, fertilização e melhoria da produção vegetal

Os elevados rendimentos alimentares na produção agrícola dependem de fertilizantes, pesticidas e agentes de controle biológico. Sobre esta questão, ainda há muito a ser explorado dentro do fascinante grupo dos actinomicetos, como pode ser inferido de muitos estudos. Por exemplo, foi observado um aumento significativo na fertilidade da tamareira (*Phoenix dactylifera* L.) quando actinomicetos foram inoculados na sua rizosfera, melhorando assim o ciclo de vida deste vegetal de importância econômica para o Egito. Melhorias notadas na aparência dos frutos, que apresentavam maiores teores de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, ácidos fenólicos, flavonoides, vitaminas e minerais. Além disso, foram observadas melhorias nas atividades antitumoral, antioxidante, antiprotozoária e antimicrobiana (fungos e bactérias) de frutos de tamareiras tratados com actinomicetos [223]. Em outro caso, 11 isolados dos gêneros *Norcadia*, *Streptomyces* e *Janibacter* de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale*) apresentaram atividades contra os fitopatógenos *Alternaria pimpriana* e *Colletotrichum coccodes* [224].

A proteção das plantas e a melhoria da qualidade dos seus frutos exemplificadas acima parecem intimamente associadas e essa melhoria é uma possível consequência da eliminação de fitopatógenos, e não uma vantagem direta para a planta. Isto também é observado nos dois exemplos seguintes, nos quais, juntamente com o biocontrole de fitopatógenos, foram relatadas

melhorias significativas na qualidade dos frutos. No primeiro caso, destacou-se uma comunidade endofítica de actinomicetos de pepinos saudáveis devido ao biocontrole do fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, que é a causa do murchamento. A cepa *Streptomyces* sp. NBRC 100767 apresentou a atividade mais forte e a azalomicina B foi a responsável [225]. No outro estudo, a cepa *Streptomyces* sp. JKTJ-3 apresentou amplo espectro de biocontrole e foi capaz de inibir 12 fitopatógenos, incluindo *Pythium aphanidermatum*, responsável pelo murchamento de mudas de melancia [226].

Além de isolados de solos ou endófitos, cepas de actinomicetos de outros ecossistemas podem apresentar atividade contra fitopatógenos. Recentemente, um consórcio de actinomicetos isolados de intestinos de insetos foi relatado como sendo promissor para o biocontrole de *Bipolaris maydis*, que causa ferrugem nas folhas do trigo [227]. *Streptomyces* sp. O SN5431 foi o que obteve maior sucesso nos testes biológicos com extratos, e a substância tiuslactona B, proveniente de seu caldo fermentado, foi responsável pela atividade fungicida.

O combate aos nematoides que afetam os vegetais também pode ser auxiliado pelos actinomicetos. A cepa *Micromonospora* sp. WH06 é relatado como um potencial agente de biocontrole do nematoide *Meloidogyne incognita*, que causa lesões nas raízes de pés de tomate. O ácido benzenopropanóico, isolado do caldo fermentado de *Micromonospora* sp. WH06, causa mortalidade de 99% com dose de 200 µg/mL após 72h e inibição da eclosão dos ovos em *M. incognita* [228].

Compostos voláteis (COVs) de actinomicetos também demonstraram atividades antimicrobianas. Os voláteis 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, piridina e álcool feniletílico da linhagem *Streptomyces* sp SPS-33 apresentaram fortes atividades *in vivo* e *in vitro* contra o fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata*, causador da podridão do carvão vegetal em plantas de batata-doce [229]. Também foram observadas diminuição da perda de água e aumento da atividade antioxidante.

A aplicabilidade de linhagens promissoras de actinomicetos na agricultura está se tornando uma estratégia mais sustentável e economicamente viável. Na relação harmoniosa com as plantas, os se actinomicetos beneficiam de um fitoexsudado nutritivo e atrativo e produzem vários metabólitos secundários com atividades fitopropagadoras e fitoprotetoras [8,162,163]. Os hormônios secretados pelos actinomicetos, ou induzidos por eles nas plantas, estimulam diversas atividades importantes nestas. Por exemplo, a secreção do fitohormônio auxina (ácido indol-acético) promove o alongamento das raízes – o que permite que alcancem mais nutrientes – e também a ativação da imunidade das plantas contra fitopatógenos fúngicos. A citocinina ajuda a retardar a deterioração e o envelhecimento das plantas; a giberelina ajuda

no alargamento das raízes, na resistência ao estresse salino e nas interações endossimbióticas; o etileno estimula a colonização das raízes e as respostas imunológicas contra patógenos microbianos; e, por fim, as poliaminas estão envolvidas na senescência, maturação dos frutos, floração, organogênese, morfogênese e embriogênese. Esses hormônios, secretados pelos actinomicetos, atuam em todos os processos fisiológicos das plantas, desde a germinação das sementes até a resiliência aos estresses abióticos e bióticos e são sintetizados principalmente por cepas do gênero *Streptomyces* e outros gêneros raros (*Nocardiosis*, *Micromonospora* e *Amycolatopsis*, entre outros) [232,233]. Entre as enzimas, as nitrogenases são bastante conhecidas. Eles têm a capacidade de converter N_2 (não utilizável pelas plantas) em NH_3 (utilizável pelas plantas) para a síntese de proteínas, metabólitos secundários, DNA e RNA [234-236].

Tal como nestes poucos exemplos, devido à sua capacidade de fixar nitrogênio na rizosfera e ao seu potencial para inibir fitopatógenos, os actinomicetos são fortes candidatos que podem ser explorados para melhorias na produção de muitas plantas. As atividades ecológicas dos actinomicetos em favor das plantas são um modelo para uma agricultura mais sustentável, com destaque para o gênero *Streptomyces* e algumas linhagens de gêneros raros de actinomicetos que vêm ganhando reconhecimento [233,237].

2.4.7 Remediação, promoção da biodisponibilidade e solubilização de minerais

As vantagens da utilização de actinomicetos como biorremediadores consiste no fato de não apresentarem riscos à saúde de animais, humanos, plantas, nem ao solo e ambientes aquáticos. Suas atividades biológicas são estimuladas quando são disponibilizadas as condições nutricionais e ecológicas de seus nichos. As enzimas (quitinase, celulase, glucanase, protease, lipases e fosfolipase, entre outras) secretadas pelos actinomicetos exercem importantes atividades biológicas para o meio ambiente e para as plantas. Por exemplo, quitinase, glucanase, lipases e fosfolipase degradam as paredes celulares e as membranas plasmáticas de fitopatógenos microbianos, que são micróbios concorrentes e neutros [238]. De fato, existem vários exemplos de actinomicetos como purificadores ambientais, entre os quais podemos destacar o gênero *Rhodococcus*, que se apresenta como um remediador diversificado. Assim, cepas desse gênero são capazes de produzir 3-clorobenzoato 1,2-dioxigenase (3CBDO), enzima capaz de degradar o herbicida 3-clorobenzoato (3CBA) [239]. Outras cepas, isoladas de solos árticos, são capazes de oxidar hidrocarbonetos [240], e outras são capazes de degradar produtos farmacêuticos anti-inflamatórios não esteroides, como ibuprofeno, meloxicam e naproxeno

[241]. Este gênero também é promissor na promoção da biodisponibilidade mineral, como é o caso de uma cepa de *Rhodococcus* sp. que, por meio de enzimas peptídicas sintetases não ribossômicas, sintetiza diversos sideróforos (rodoquelina, requiquelina, requibactina, rodobactina e heterobactina A), o que demonstra que a linhagem pode ser utilizada como auxiliar agrícola para biodisponibilidade de ferro [242]. Há também relatos de linhagens de *Streptomyces* e *Promicromonospora* isoladas de solos marroquinos que são capazes de solubilizar fosfato [243]. Na verdade, os actinomicetos abrigam em seus genomas um consórcio de enzimas pouco exploradas, capazes de atuar na decomposição de matéria orgânica vegetal e animal e na solubilização de substâncias inorgânicas (manganês - Mn, cobalto - Co, lítio - Li, cobre - Cu, zinco - Zn, cádmio - Cd, níquel - Ni, alumínio - Al e magnésio - Mg) em estados mais simples para usos biológicos [244,245].

2.4.8 Outras aplicações biotecnológicas focadas não apenas na medicina e na agricultura

Certamente ainda há muito a ser revelado sobre o potencial de aplicação biotecnológica dos actinomicetos, tanto no direcionamento de produtos quanto de processos, não apenas na medicina e na agricultura. Duas destas aplicações estão relacionadas com a procura de alternativas mais sustentáveis para a produção de combustíveis e plásticos biodegradáveis. Recentemente, um método inovador para produção de biodiesel foi criado utilizando o actinomiceto *Piscicoccus intestinalis* (WA3) e a microalga *Tetrademus obliquus* (AARLG022) em cocultivo para enriquecimento de biomassa utilizando o método de efluente digerido de biogás (BDE) [246]. Os autores observaram o aumento de lipídios de cadeia longa, ácido indol-3-acético e sideróforos por *T. obliquus* em cocultivo com *P. intestinalis*-WA3 (agente fertilizante) quando compararam os resultados com os da monocultura de *T. obliquus*. É um resultado animador que abre um horizonte promissor a ser explorado, neste caso, para melhorar a produção de biodiesel a partir de algas. Em outro estudo relevante, cepas de três gêneros de actinomicetos: *S. gougerotti*, *M. matsumotoense* e *N. prasina* demonstraram a capacidade de degradar polietileno de baixa densidade (LDPE), poliestireno (PS) e ácido polilático (PLA) sob condições variadas [9]. Além disso, principalmente as cepas de *S. gougerotti* e *M. matsumotoense* foram capazes de utilizar esses plásticos como fontes de carbono para produzir bioplásticos de polihidroxialcanoato (PHA). Neste contexto sustentável, os actinomicetos ganham mais uma importante aplicabilidade dentro do seu fascinante espectro biotecnológico.

2.5 CONCLUSÃO

Os estudos apresentados nesta revisão são uma pequena amostra do enorme potencial biotecnológico dos actinomicetos, sobre os quais o nosso conhecimento e exploração estão em rápida expansão. Assim, considerando os dados aqui descritos e a literatura, os metabólitos dos actinomicetos podem atender a inúmeras demandas médicas, agrícolas e industriais, muito além do que é atualmente conhecido e utilizado. A utilização de tecnologias de mineração genética aumenta ainda mais a descoberta da imensa riqueza metabólica escondida nos genomas de espécies conhecidas e de novos isolados, conforme destacado por vários estudos. Assim, com a ajuda da genômica e da metabolômica, revela-se uma nova geração de antibióticos e substâncias de interesse biotecnológico. Considerando os avanços do século passado, desde a descoberta da estreptomicina em 1944, os primeiros 23 anos do século XXI representam um salto considerável na investigação do potencial dos actinomicetos. Portanto, para as próximas décadas, pode-se imaginar o desenvolvimento de produtos inovadores utilizando actinomicetos como fonte de metabólitos que sejam capazes de tratar inúmeras patologias e auxiliar em diversas terapias, entre outras aplicações biotecnológicas. No entanto, é necessário melhorar muitas abordagens de pesquisa para ir além dos resultados preliminares. É necessário enfrentar esta questão nas suas causas profundas, entre as quais destacamos o isolamento de muitas equipes de investigação, o baixo nível de financiamento e a falta de planejamento estratégico e eficaz. O esforço de todos é essencial: governos, organismos financiadores, instituições de investigação e os próprios investigadores. Devemos destacar também a necessidade de investigar os diversos ambientes pouco conhecidos e com alto potencial para exploração da riqueza metabólica de actinomicetos e outros microrganismos, dentre os quais destacamos os ambientes aquáticos de água doce ou salgada e os ambientes florestais tropicais, especialmente a Amazônia. Infelizmente, muitos destes ambientes sofrem degradação constante e grande parte da sua microbiota está sendo extinta sem que possamos descobrir e aproveitar o seu potencial biotecnológico.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Amazonia pelo suporte. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) através da chamada 007/2021 - Programa Biodiversa e projeto POSGRAD 2021/2022, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance code 001). Os autores também agradecem à FAPEAM pela bolsa de doutorado concedida a Rafael de Souza Rodrigues e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de pesquisa concedida a ADLS.

Contribuições do autor:

Rafael de Souza Rodrigues: Conceituação, Metodologia, Resenhas e Revisão de Literatura; **Maria Divina Oliveira Feitoza:** Resenhas e Revisão de Literatura; **Thalita Caroline Lima Alves:** Resenhas e Revisão de Literatura; **Anderson Nogueira Barbosa:** Revisão e Edição; **Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago:** Revisões; **Antonia Queiroz Lima de Souza e Afonso Duarte Leão de Souza:** Revisão, Edição, Curadoria e Supervisão. Este estudo faz parte da tese de doutorado de Rafael de Souza Rodrigues.

Disponibilidade de dados

Todos os dados analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo publicado

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse quanto à publicação deste trabalho.

**3. CAPITULO 2 - BIODIVERSIDADE E ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS
DE ACTINOMICETOS AMAZÔNICOS ISOLADOS DAS RIZOSFERAS
DE PLANTAS *Inga edulis* Martius**

**BIODIVERSITY AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF AMAZONIAN
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM RHIZOSPHERES OF *Inga edulis* PLANTS**

Artigo aceito pelo periódico Frontiers in Bioscience-Elite (IMR Press)
(ISSN1945-0508)

O MATERIAL SUPLEMENTAR DESTE CAPITULO ENCONTRA-SE NO
ANEXO 1

Rafael de S. Rodrigues^{1,2,*}, Antonia Q. Lima de Souza^{1,2,3,*}, Anderson N. Barbosa⁴, Sarah Raquel S. da Silva Santiago^{1,2}, Aldenora dos S. Vasconcelos^{5,6}, Roneres D. Barbosa³, Thalita C. Lima Alves³, Jeferson C. da Cruz⁷, Gilvan F. da Silva⁷, Jania L. da Silva Bentes³, Afonso D. Leão de Souza^{1,2,8,*}

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

²Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴Laboratório de Virologia e Imunologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

⁵Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁶Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos, Universidade do Estado do Amazonas (CMABio-UEA), Manaus, Amazonas 69079-030, Brasil

⁷Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil

⁸Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

*Correspondência:

rafaelsr.bio@gmail.com (Rafael de S. Rodrigues);

antoniaqueiroz@ufam.edu.br (Antonia Q. Lima de Souza);

souzadq@ufam.edu.br (Afonso D. Leão de Souza)

Esses autores contribuíram igualmente

RESUMO

Introdução: As actinobactérias são grandes produtoras de metabólitos antibacterianos e antifúngicos e vêm crescendo a busca por substâncias de interesse biotecnológico, principalmente para uso na agricultura, entre outras aplicações. A Amazônia é potencialmente rica em actinobactérias. No entanto, quase não existem estudos sobre eles. Assim, apresentamos um estudo da ocorrência e do potencial antifúngico de actinobactérias da rizosfera de *Inga edulis*, planta nativa da América do Sul e de utilidade econômica em toda a Amazônia. **Métodos:** Dentre as 64 cepas de actinobactérias isoladas da rizosfera de três plantas de *I. edulis*, 20 cepas foram selecionadas e submetidas a ensaios de dupla cultura contra cinco importantes fungos fitopatogênicos, bem como análises morfológicas e do gene 16S rRNA. Duas cepas, LaBMicrA B270 e B280, também foram estudadas quanto às curvas de produção de extratos metabólicos e atividades antifúngicas, incluindo sua concentração inibitória mínima (CIM) contra fungos fitopatogênicos. **Resultados:** Entre as 20 cepas, 90% foram identificadas como *Streptomyces* e 10% como *Kitasatospora*. Todas as cepas apresentaram antagonismos contra dois ou mais dos cinco fitopatógenos: *Corynespora cassiicola*, *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Sclerotium coffeicola*. *Streptomyces* spp. as cepas LaBMicrA B270 e B280 foram ativas contra fitopatógenos do guaraná (*Paullinia cupana*). Além disso, o extrato AcOEt/2-propanol 9:1 do meio de cultura de 10 dias da cepa LaBMicrA B280 apresentou atividade contra todos os fitopatógenos testados, com CIM de 125 µg/mL. **Conclusões:** Os resultados revelaram uma grande variedade de actinomicetos em três rizosferas de *I. edulis* na Amazônia e o alto potencial dos extratos metabólicos de algumas dessas cepas bacterianas contra fungos fitopatogênicos que assolam inúmeras culturas.

Palavras-chave: Rizobactérias, actinobactérias, biodiversidade, desenvolvimento agrícola, biocontrole de fitopatógenos.

3.1 INTRODUÇÃO

Na última década, prospecções de novos isolados de actinomicetos têm sido realizadas em diversos ecossistemas do planeta. Muitos desses actinomicetos foram revelados como fontes de produtos naturais (NPs) promissores com diversas atividades biológicas ou outras aplicações biotecnológicas [1-4]. Essas buscas por novos actinomicetos e seus metabólitos, entre outras razões, são resultado da escassez de recursos agrícolas para conter a disseminação de fitopatógenos multirresistentes e outras pragas que devastam plantações em todas as partes do planeta. Esses fitopatógenos e pragas resistentes prejudicam a produção agrícola e se tornaram mais difundidos devido ao uso descontrolado e indiscriminado em larga escala de biocidas que têm sido empregados para atender à crescente demanda por alimentos nos séculos XX e XXI. [5-10].

Amplamente distribuídos, os actinomicetos possuem atividades ecológicas essenciais para o planeta e para os seres vivos. Por exemplo, eles podem ajudar as plantas através da fixação biológica de nitrogênio, reciclagem de matéria orgânica, secreções de fitohormônios, antibióticos e enzimas líticas, e como agentes de biocontrole de fitopestes [11,12]. Em sistemas simbióticos, os actinomicetos beneficiam as plantas por meio de atividades como as acima e, por sua vez, as plantas liberam nutrientes que alimentam os actinomicetos. As atividades dos actinomicetos em favor das plantas os tornam úteis como agentes de controle biológico e fertilizantes naturais [6,9].

O potencial dos actinomicetos contra fungos fitopatogênicos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores em busca de novos antifúngicos e alternativas mais sustentáveis para a agricultura, o que deve ser destacado [7]. Na prática, entre os microrganismos, os actinomicetos se destacam pela produção de 70% dos antimicrobianos disponíveis para medicina e agricultura [13,14]. Notavelmente, o gênero *Streptomyces* é o maior produtor dos milhares de PNs atribuídos aos actinomicetos [15-17]. No entanto, outros gêneros, incluindo *Micromonospora* e *Kitasatospora*, vêm ganhando cada vez mais atenção na busca por novos PNs [18,19]), especialmente compostos antifúngicos, como os macrolídeos, a classe antimicrobiana mais conhecida [20,21,22].

Em relação à biodiversidade, o filo *Actinomycetota* possui mais de 200 gêneros, entre os quais estão *Streptomyces*, o maior deles com aproximadamente 700 espécies [23], e seu intimamente relacionado *Kitasatospora*, o segundo, com 33 espécies, da família *Streptomycetaceae* [18,24,25]. Em geral, fenotipicamente, as bactérias pertencentes a esses gêneros são Gram-positivas, possuem micélios aéreos, segmentos com formato cilíndrico, esférico ou ovóide e cadeias de esporos espirais (ou parcialmente) ou lineares (15,18,26). Seus

genomas são ricos em guanina-citosina, com tamanhos variando entre 6 e 10 milhões de pares de bases (pb) de nucleotídeos, e possuem quantidades diversificadas de clusters de genes biossintéticos (BGCs) relacionados à síntese de NPs: 8 a 83 CGBs para *Streptomyces* e 22 a 50 para *Kitasatospora* [15,18,25,27,28].

No contexto resumido acima, destacamos a busca por novas cepas de actinomicetos dos mais variados ambientes bem como por metabólitos bioativos de cepas deste Filo bacteriano, visando atender, entre outras demandas, à necessidade de novos antifúngicos eficientes contra fitopatógenos de interesse agrícola. Embora as investigações sobre actinomicetos ocorram em todo o mundo, quase não há estudos sobre os amazônicos. Assim, relatamos aqui parte de um estudo de uma amostra de actinomicetos isolados da rizosfera de três indivíduos de *I. edulis* (família Fabaceae), planta de importância agroecológica para a Amazônia [29-31]. As plantas de *I. edulis* estão no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), o maior fragmento florestal urbano da Amazônia e, com 670 hectares, um dos maiores do mundo. Este fragmento florestal está bem preservado e é potencialmente um ambiente representativo de parte da incontável e quase inexplorada diversidade microbiana amazônica. Neste estudo avaliamos a diversidade e o potencial antifúngico de uma amostra de vinte actinomicetos contra fitopatógenos fúngicos de interesse regional e global. Dentre esses fungos, destacamos os fitopatógenos do guaraná (*Paullinia cupana*), uma das melhores fontes de cafeína, e o *Sclerotium coffeicola*, fitopatógeno reconhecido mundialmente por afetar centenas de plantas de importância agrícola. Portanto, considerando a potencial diversidade dos actinomicetos amazônicos, este estudo é um primeiro, porém importante passo para conhecer uma pequena amostra destes em rizosferas de plantas de *I. edulis*, bem como o potencial desta amostra contra fungos fitopatogênicos de interesse agrícola.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coletas de amostras de solo

As coletas de amostras das rizosferas de *I. edulis* foram realizadas em três locais diferentes no campus da UFAM (Local S1 - 3°05'19.4" S 59°58'00.5" W, Local S2 - 3°05'20.8" S 59°57'57.5" W e Local S3 - 3° 5'19.06" S 59°57'56.26" W) (Material Suplementar - SM1(ANEXO 2)). Nos locais, os indivíduos de *I. edulis* não estavam no período de produção de sementes. Em cada local, foram coletadas três amostras de rizosfera a 40 cm do colar da raiz da planta e a 20 cm abaixo do solo na região pilífera das raízes. Para garantir que apenas

amostras de rizosfera fossem coletadas, pedaços das raízes das plantas foram cortados, o solo em excesso foi removido, e apenas o solo superficial aderido à camada superficial da raiz foi amostrado, tomando cuidado para não remover pedaços da raiz superficial em si ou pedaços de suas estruturas pilíferas. Materiais esterilizados foram utilizados em todas as coletas de amostras: tubos Falcon™ de 50 mL, espátulas metálicas e sacos plásticos para transportar as amostras. As amostras foram levadas para o Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LaBMicrA) - UFAM, onde foram armazenadas a -4 °C.

3.2.2 Obtenção de cepas de actinobactérias

Vinte e quatro horas após as coletas, 1 g de solo de cada local foi dissolvido em 5 mL de água destilada esterilizada contendo 0,02% de Tween-20. Cada suspensão foi submetida a diluição serial com solução salina a 0,8%. Das diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , foram semeados em triplicata 50 µL em placas de Petri de 90 × 15 mm contendo meio de cultura ISP2-aveia (para 1 L: 10 g de aveia, 14 g de ágar, 10 g de malte, 4 g de extrato de levedura e 4 g de glicose) e meio de cultura ISP2-amido (para 1 L: 10 g de amido, 14 g de ágar, 10 g de malte, 4 g de extrato de levedura e 4 g de glicose), aos quais foram adicionados 100 µg/mL do antifúngico nistatina e do antibacteriano tetraciclina. Estes meios ISP são modificações do ISP2 adicionando respectivamente farinha de aveia e amido. O ISP2 é amplamente utilizado, principalmente para culturas de actinomicetos, e pertence ao conhecido Projeto Internacional *Streptomyces* [32]. As placas de cultivo foram incubadas a 28 ± 2 °C e, durante 30 dias, as cepas de actinomicetos que germinaram foram coletadas diariamente e purificadas. Linhagens de actinobactérias foram cultivadas por dez dias no mesmo meio sólido, dos quais cinco pedaços de 0,6 x 0,6 cm² contendo cada linhagem foram preservados em três microtubos criogênicos de 1,5 mL contendo 20% de glicerol. Os microtubos foram conservados em freezer a -80 °C.

3.2.3 Estudo microscópico

As actinobactérias isoladas e purificadas foram cultivadas em lamínulas inclinadas em torno de 45° por dez dias ou mais de acordo com o desenvolvimento morfológico de cada linhagem e coradas pelo método de coloração de Gram (LB Laborclin®). Todas as lamínulas coradas foram observadas em microscópio óptico com objetiva de 100× (microscópio óptico Carl Zeiss, acoplado ao Zen AxioCamER - Zen lite 2012 photo documenter). Para microscopia eletrônica, *Streptomyces* spp. as linhagens LaBMicrA B270 e B280 foram cultivadas em placas

de Petri contendo meio de cultura ISP2 por dez dias a 28 °C. Posteriormente, discos de 0,5 cm de diâmetro do meio contendo as cepas cultivadas foram analisados usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JSM IT500HR, JEOL Ltd. Japão) (para detalhes, ver MS2 (ANEXO 2)) [33]. As imagens foram obtidas em tensões de 10 e 15 kV.

3.2.4 Seleção de linhagens e estudo morfológico

Os isolados foram cultivados em meio ISP2 e agrupados de acordo com suas características macromorfológicas e a pigmentação do meio de crescimento nas placas de Petri (frente e verso). Após agrupamento, uma cepa de cada grupo com poucas cepas e duas de grupos maiores foram selecionadas para dar continuidade aos estudos. Após cultivo em meio de cultura ISP2, as cepas selecionadas foram descritas morfolologicamente de acordo com os manuais de Shirling e Gottlieb [26]. As cepas foram registradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AC1746C.

3.2.5 Caracterização molecular e análise filogenética

Para a extração de DNA, as cepas selecionadas de actinobactérias foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de batata, dextrose e extrato de levedura (BDL) [34], a 28 ± 2 °C e 120 rpm, por 72 h. As extrações seguiram o protocolo do kit de MicroPrep™ de DNA Fúngico/Bacteriano da Zymo Research. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando 20 ng de DNA, o kit de PCR Illustrat™ PuReTaq Ready-to-Go™ PCR beads (GE Healthcare) e os iniciadores 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' e 1492R 3'CGGTTACCTTGTTACGACTT5' [35], com um volume final de 25 µL, em um termociclador de 96 poços (Applied Biosystems) [35]. As amostras foram sequenciadas usando o método de Sanger e o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems).

A identificação foi inicialmente realizada de acordo com a similaridade baseada no alinhamento de pares do algoritmo da região 16S rRNA com espécies-tipo depositadas no banco de dados EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>; acessado em 23.08.2023) [36]. Além da identificação baseada na similaridade, também foi realizada análise de máxima verossimilhança a partir do alinhamento das sequências na plataforma IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) usando 1.000 replicatas e o modelo evolutivo TN+F+I+G4. *Streptacidiphilus albus* NBRC100918 foi usado como um grupo externo. A topologia da árvore e os valores de suporte

no bootstrap foram visualizados usando a plataforma iTOL (<https://itol.embl.de/>) e editados manualmente usando o software CorelDraw versão 2020. Os números de acesso das espécies-tipo e cepas usadas neste estudo estão disponíveis na Tabela 1.

3.2.6 Fitopatógenos selecionados para avaliar o potencial antifúngico das cepas de actinobactérias

Para avaliar o potencial antifúngico das cepas de actinobactérias selecionadas, foram escolhidos cinco fitopatógenos, que foram gentilmente fornecidos pelo Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia do Departamento de Ciências Agrárias da UFAM: *Colletotrichum* sp. (pimenta tipo habanero-ISO01) isolado de lesões de tecido foliar de plantas de pimenta tipo habanero (*Capsicum chinense*); *C. guaranicola* (planta de guaraná-P01) e *Pestalotiopsis* sp. (guaraná-3002R2) isolados de lesões de tecido foliar de diferentes plantas de guaraná (*Paullinia cupana*); *Corynespora cassicola* (planta de tomate-ISO079) isolado de lesões de tecido foliar de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*); e *Sclerotium coffeicola* (Árvore de manga-M01) isolado de lesões de tecido foliar de árvores de manga (*Mangifera indica*). Essas plantas são economicamente valiosas para a região amazônica, especialmente o guaraná, pois é uma rica fonte de cafeína.

3.2.7 Triagem utilizando técnica de cultura pareadas

Após serem reativadas em ISP2, cada cepa de actinomiceto foi inoculada em uma linha que atravessava o centro das placas de Petri contendo ISP2 e incubada a 28 ± 2 °C. No terceiro dia, discos de ágar com 5 mm de diâmetro contendo cada cepa de fitopatógeno previamente cultivada por cinco dias em BDA foram inoculados em dois pontos nas mesmas placas de teste, a um centímetro das bordas e perpendicularmente à linha da cepa de actinomiceto. A um centímetro de um dos inóculos de patógeno e paralelamente à linha de actinomiceto, uma faixa de 10 mm de largura do meio de cultura foi removida de uma borda à outra para evitar a difusão metabólica pelo meio e verificar a possível produção de substâncias antifúngicas voláteis (Fig. 3). Placas de controle de patógenos foram feitas da mesma forma; no entanto, sem os inóculos de actinomicetos. As placas de cultura dupla e controle foram incubadas por dez dias. Em seguida, o crescimento dos patógenos nas placas de controle e de cultura dupla foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as médias das zonas de inibição do fitopatógeno fúngico foram calculadas (MS3 (ANEXO 2)). A fórmula de Edington foi aplicada

a essa média ($I = [(FGC-FGT)/FGC] \times 100$, onde: I = porcentagem de inibição; FGC = crescimento fúngico no controle; FGT = crescimento fúngico no tratamento) [37], e o programa GraphPad Prism (versão 8.0.1) foi usado para construir um mapa de calor com a porcentagem de inibição micelial.

3.2.8 Monitoramento da produção de extratos

As linhagens *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270 e B280, selecionadas dos ensaios de cultura dupla, foram cultivadas por 96 h em meio ISP2 - 1,5% de ágar em placas de Petri, a partir das quais dois pedaços de 5 × 5 mm de ágar foram inoculados em um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 120 mL de ISP2, empregando um total de 36 frascos. As cepas foram cultivadas a 120 rpm e 28 ± 2 °C. Cada linhagem cultivada foi amostrada as 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 120 h, 168 h, 216 h, 264 h, 312 h, 360 h e 408 h, removendo três frascos de Erlenmeyer de cada vez. Em cada amostragem, o consumo de glicose e o pH foram medidos com tiras indicadoras (análise de urina) e pesadas as massas secas dos extratos celulares e do meio de cultura. Os extratos do meio de cultura também foram submetidos a ensaios antifúngicos.

Para obter os extratos em cada intervalo, as células e o meio de cultura de cada frasco foram separados por centrifugação (centrífuga Eppendorf®) a 4.000 rpm por 15 min, e então as células foram lavadas três vezes com 10 mL de água destilada. As células foram então agitadas e maceradas por 24 h com 5 mL de AcOEt/MeOH 1:1. O meio de cultura foi particionado três vezes com 40, 30 e 30 mL de AcOEt/2-propanol 9:1, que foram então combinados. Após a evaporação dos solventes, os extratos foram pesados, secos em um dessecador com sílica ativada e pesados novamente, até atingirem um peso constante, a fim de estabelecer os valores médios da triplicata de cada ponto. Após isso, os três extratos de cada ponto de tempo foram coletados, concentrados e pesados. Em seguida, os extratos do meio de cultura foram armazenados a 4 °C até o dia dos ensaios biológicos.

3.2.9 Monitorando das atividades antifúngicas

Os extratos do meio de cultura de *Streptomyces* spp. linhagens LaBMicrA B270 e B280 de cada doze amostragens descritas acima foram testadas contra os cinco fitopatógenos alvo. Os extratos foram dissolvidos em 200 µL de DMSO e misturados com 800 µL de água destilada autoclavada. A partir dessas soluções, novas soluções foram confeccionadas diluindo alíquotas correspondentes a 20 mg de cada extrato seco em água destilada esterilizada, atingindo volume

final de 1 mL. Como controle positivo, 20 mg de nistatina foram suspensos em 1 mL de água. Os ensaios dos extratos e controles foram realizados em triplicata em placas de cultura celular com 12 poços, cada poço contendo: testes: 0,950 mL de BDAL (batata, dextrose, ágar e extrato de levedura), 50 µL de extrato + fitopatógeno; controles negativos: 1 mL BDAL + fitopatógeno; DMSO: 1 mL de BDAL + 50 µL de DMSO aquoso a 20%; controles positivos: 0,950 mL BDAL, 50 µL de solução de nistatina + fitopatógeno. As misturas dos extratos ou da nistatina com o meio de cultura, na concentração final de 1 mg/mL, foram homogeneizadas a aproximadamente 40 °C. Cada fitopatógeno foi inoculado nos poços utilizando discos de 5 mm de diâmetro provenientes de seu cultivo anterior em placas de Petri contendo meio de cultura BDAL [34], a 28 ± 2 °C por 96 h. Após dez dias de incubação a 28 ± 2 °C, a atividade de cada teste foi considerada negativa para qualquer crescimento ou positiva para nenhum crescimento.

3.2.10 Produção dos extratos e ensaio de concentração inibitória mínima

Após os resultados das curvas de crescimento e dos bioensaios, as linhagens LaBMicrA B270 e B280 foram cultivadas por dez dias, e novos extratos foram preparados conforme descrito na Seção 2.8. Desta vez, no entanto, a fração aquosa do meio de cultura, após a partição com AcOEt/2-propanol 9:1, não foi descartada, mas liofilizada. Os extratos orgânicos concentrados e as frações aquosas liofilizadas foram armazenados a -18 °C até o momento do teste de concentração inibitória mínima (MIC) contra os fitopatógenos-alvo para o teste MIC, os extratos orgânicos e a fração aquosa de cada linhagem de actinomiceto foram misturados a aproximadamente 40 °C em triplicata com BDAL em poços de placas de cultura de células de 12 poços até concentrações finais de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 e 7,81 µg/mL. Posteriormente, cada fitopatógeno foi inoculado e testado nos poços como no item anterior. Novamente, a atividade para cada teste foi considerada negativa para qualquer crescimento ou positiva para ausência de crescimento.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Diversidade morfológica e genotípica

Neste estudo, foram obtidas 64 cepas de actinomicetos das rizosferas de três indivíduos de *I. edulis* nos três locais amostrados. O Local S2 destacou-se por produzir 30 isolados (46,9%), seguido por S1 com 19 isolados (29,7%), e S3 com 15 isolados (23,4%). Seguindo o procedimento descrito na Seção 2.4, o agrupamento das 64 cepas resultou em 16 morfogrupos, e 20 cepas foram selecionadas para o presente estudo. Todas as 20 cepas mostraram características morfológicas típicas para actinomicetos de acordo com os manuais de Shirling e Gottlieb [26] (MS4 (ANEXO 2)). A identificação molecular baseada no gene 16S rRNA revelou que 18 cepas pertenciam ao gênero *Streptomyces* (90%), enquanto duas cepas pertenciam ao gênero *Kitasatospora* (10%) (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação baseada na similaridade da região 16S do rRNA de actinomicetos provenientes das rizosferas de *Inga edulis*, localizadas no campus da Universidade Federal do Amazonas, utilizando o banco de dados EzBioCloud.

Strains and LaBMicrA code	GenBank Accession code	EzBioCloud Taxon Name	Accession number	Similarity (%)
<i>Kitasatospora</i> sp. B282	OR725990	<i>K. acidiphila</i> MMS16-CNU292 ^T	MG189374	100
<i>Kitasatospora</i> sp. B313	OR726028	<i>K. arboriphila</i> HKI 0189 ^T	AY442267	98.70
<i>Streptomyces</i> sp. B267	OR724644	<i>S. silvae</i> For3 ^T	MW479423	99.34
<i>Streptomyces</i> sp. B270	OR724732	<i>S. murinus</i> NBRC 12799 ^T	AB184155 AB184845 FJ857947 AB184667	98.36
		<i>S. lanatus</i> NBRC 12787 ^T		
		<i>S. fractus</i> MV32 ^T		
		<i>S. graminearus</i> NBRC 15420 ^T		
<i>Streptomyces</i> sp. B271	OR724661	<i>S. murinus</i> NBRC 12799 ^T	AB184155 AB184667	96.66
		<i>S. graminearus</i> NBRC 15420 ^T		
<i>Streptomyces</i> sp. B272	OR725986	<i>S. acidicola</i> K1PN6 ^T	MN319555	100
<i>Streptomyces</i> sp. B278	OR724700	<i>S. misionensis</i> DSM 40306 ^T	FNTD01000004	94.51
		<i>S. cupreus</i> PSKA01 ^T	SJACMSF010000162	
<i>Streptomyces</i> sp. B280	OR724701	<i>S. graminearus</i> NBRC 15420 ^T	AB184667 AB184155	98.83
		<i>S. murinus</i> NBRC 12799 ^T		
<i>Streptomyces</i> sp. B301	OR724719	<i>S. durocortorensis</i> RHZ10 ^T	MW582863	96.93
<i>Streptomyces</i> sp. B304	OR725980	<i>S. pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	AJ781377	98.70
<i>Streptomyces</i> sp. B310	OR726013	<i>S. pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	AJ781377	100
		<i>S. olivaceus</i> NRRL B-3009 ^T		
	OR726569	<i>S. olivaceus</i> NRRL B-3009 ^T	JOFH01000101	99.74

<i>Streptomyces</i> sp. B314		<i>S. pactum</i> NBRC 13433 ^T	AB184398	
<i>Streptomyces</i> sp. B317	OR733339	<i>S. jiujiangensis</i> JXJ 0074 ^T	KF938657	100
<i>Streptomyces</i> sp. B318	OR730983	<i>S. similanensis</i> KC-106 ^T	AB773850	95.45
<i>Streptomyces</i> sp. B319	OR730984	<i>S. anandii</i> NRRL B-3590 ^T	AY999803	97.92
		<i>S. pimmonensis</i> ^T RM75549 ^T	MW479154	
		<i>S. fumanus</i> NBRC 13042 ^T	AB184273	
<i>Streptomyces</i> sp. B322	OR730985	<i>S. rochei</i> NRRL B-2410 ^T	MUMD01000370	100
<i>Streptomyces</i> sp. B325	OR730986	<i>S. katrae</i> NRRL ISP 5550 ^T	JZWV01000648	97.66
		<i>S. racemochromogenes</i> NRRL B-5430 ^T	DQ026656	
		<i>S. polychromogenes</i> NBRC 13072 ^T	AB184292	
<i>Streptomyces</i> sp. B289	OR733333	<i>S. griseoflavus</i> LMG 19344 ^T	AJ781322	99.59
<i>Streptomyces</i> sp. B290	OR733337	<i>S. murinus</i> NBRC 12799 ^T	AB184155	100
		<i>S. graminearus</i> NBRC 15420 ^T	AB184667	
<i>Streptomyces</i> sp. B299	OR734917	<i>S. griseoflavus</i> LMG 19344 ^T	AJ781322	99.59

Nota: T* refere-se à espécie tipo. Similaridade baseada no algoritmo de alinhamento de sequência em pares (Myers & Miller, 1988).

A menor similaridade foi observada para a cepa *Streptomyces* sp. LaBMicrA B278 que apresentou 94,51% de similaridade com *S. misionensis* DSM 40306 e *S. cupreus* PSKA01, sendo que a maior similaridade foi de 100% entre *Streptomyces* sp. LaBMicrA B372 e *S. acidicola* K1PN6; *Streptomyces* sp. LaBMicrA B310 e *S. pulveraceus* LMG 20322; *Streptomyces* sp. LaBMicrA B317 e *S. jiujiangensis* JXJ 0074; *Streptomyces* sp. LaBMicrA B322 e *S. rochei* NRRL B-2410; *Streptomyces* sp. LaBMicrA B290 e *S. murinus* NBRC 12799 e *S. graminearus* NBRC 15420. No entanto, a identificação baseada na similaridade da região 16S não permitiu discriminar oito das 20 cepas avaliadas neste estudo, como *Streptomyces* sp. LaBMicrA B270, que mostrou a mesma similaridade de 98,36% com quatro espécies diferentes (*S. murinus* NBRC 12799, *S. lanatus* NBRC 12787, *S. fractus* MV32 e *S. graminearus* NBRC 15420) (Tabela 1).

Para uma melhor resolução na identificação, a análise filogenética utilizando as 20 linhagens obtidas neste estudo e as espécies intimamente relacionadas identificadas pela análise de similaridade no EzBioCloud foi utilizada para confirmar a posição filogenética dos isolados com base nas sequências do gene 16S. Os isolados pertencentes a *Streptomyces* e *Kitasatospora* formaram dois clados monofiléticos distintos, confirmando o status de gênero para os isolados utilizados neste estudo (Figura 1). Onze cepas (LaBMicrA B267, LaBMicrA B272, LaBMicrA B278, LaBMicrA B282, LaBMicrA B313, LaBMicrA B314, LaBMicrA B317, LaBMicrA B318, LaBMicrA B2319, LaBMicrA B322 e LaBMicrA B325) foram agrupadas de acordo com

o tipo espécies que apresentaram maior similaridade na análise no EzBioCloud (Tabela 1). Como esperado, as cepas LaBMicrA B270, LaBMicrA B271, LaBMicrA B280 e LaBMicrA B290 que apresentam semelhança com *S. murinus* e *S. graminearus* (Tabela 1) formam um clado intimamente relacionado a elas. Resultado semelhante pode ser observado para as linhagens LaBMicrA B304 e LaBMicrA B310, que apresentam similaridade com *S. pulveraceus* LMG 20322 e formam um clado com este. Diferentemente, as cepas B289 e B299 do LaBMicrA não se agruparam estreitamente com *S. griseoflavus*, com o qual mostraram alta similaridade no EzBioCloud.

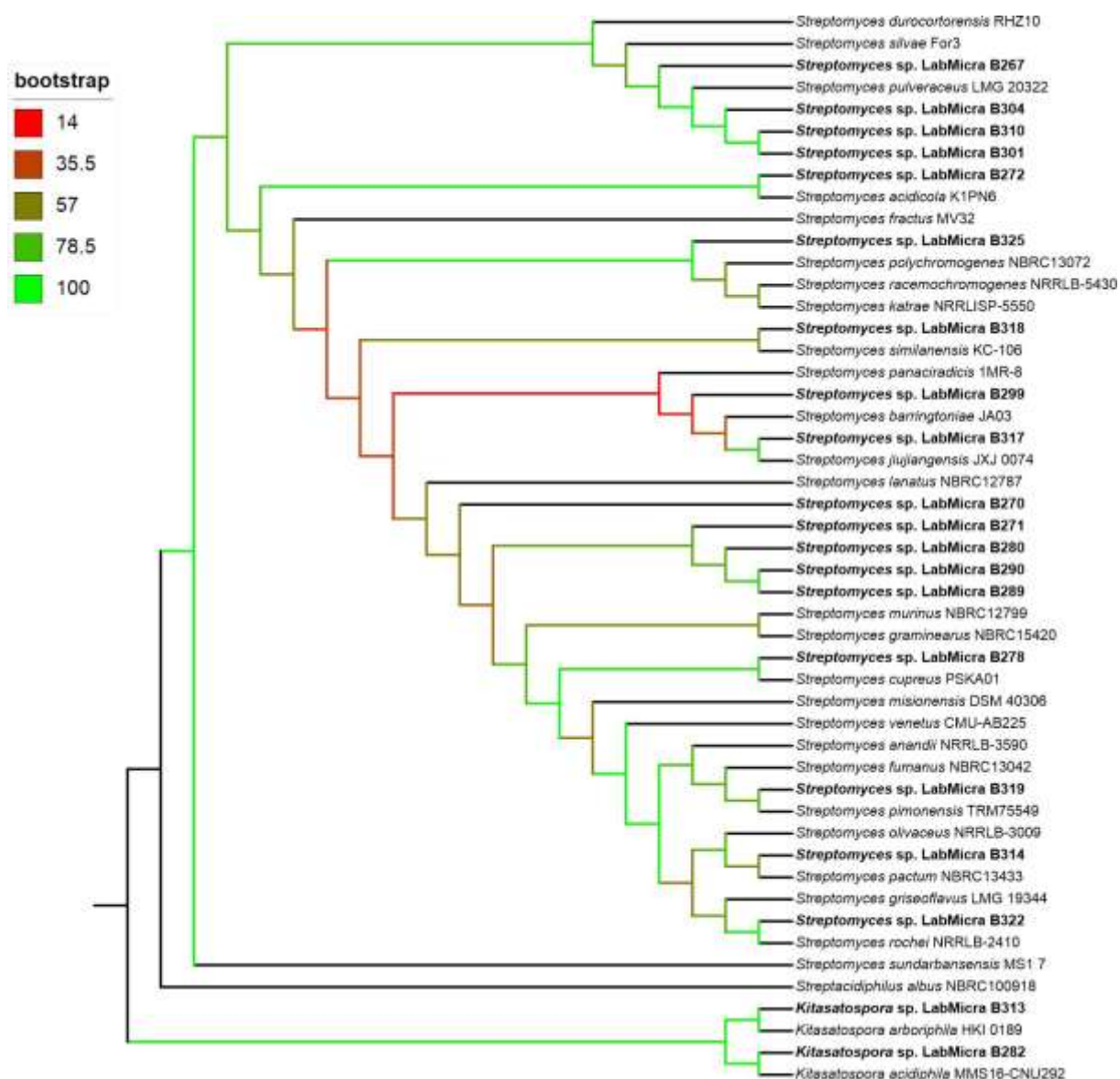


Fig. 1 - Árvore filogenética de sequências parciais da região 16S rRNA utilizando a análise de máxima verossimilhança de actinomicetos das rizosferas de três indivíduos de *I. edulis* do campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) com espécies-tipo na base de dados EzBioCloud.

3.3.2 Atividades antifúngicas das 20 cepas contra fitopatógenos

Na triagem usando o método de ensaio de cultura dupla, todas as 20 cepas mostraram antagonismo contra os fitopatógenos *Corynespora cassiicola* (ISO079) e *Colletotrichum* sp. (ISO01) (Seção 2.6; Fig. 2). Treze foram ativas contra *Pestalotiopsis* sp. (3002R2), o mesmo número foi antagonista contra *Colletotrichum guaranicola* (P01). As cepas *Streptomyces* sp. LaBMicrA B267, B280 e B301 foram as únicas ativas contra *S. coffeicola* (M01) e todos os cinco fitopatógenos. As cepas *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270 e B280 (Fig. 3-A e C) se destacaram por seu forte antagonismo contra, respectivamente, *Pestalotiopsis* sp. (3002R2) e *Colletotrichum guaranicola* (P01), ambos fitopatógenos da planta guaraná (*P. cupana*) (Fig. 3-B e D). Não foi observada atividade consistente contra os fitopatógenos dos metabólitos voláteis dos actinomicetos.

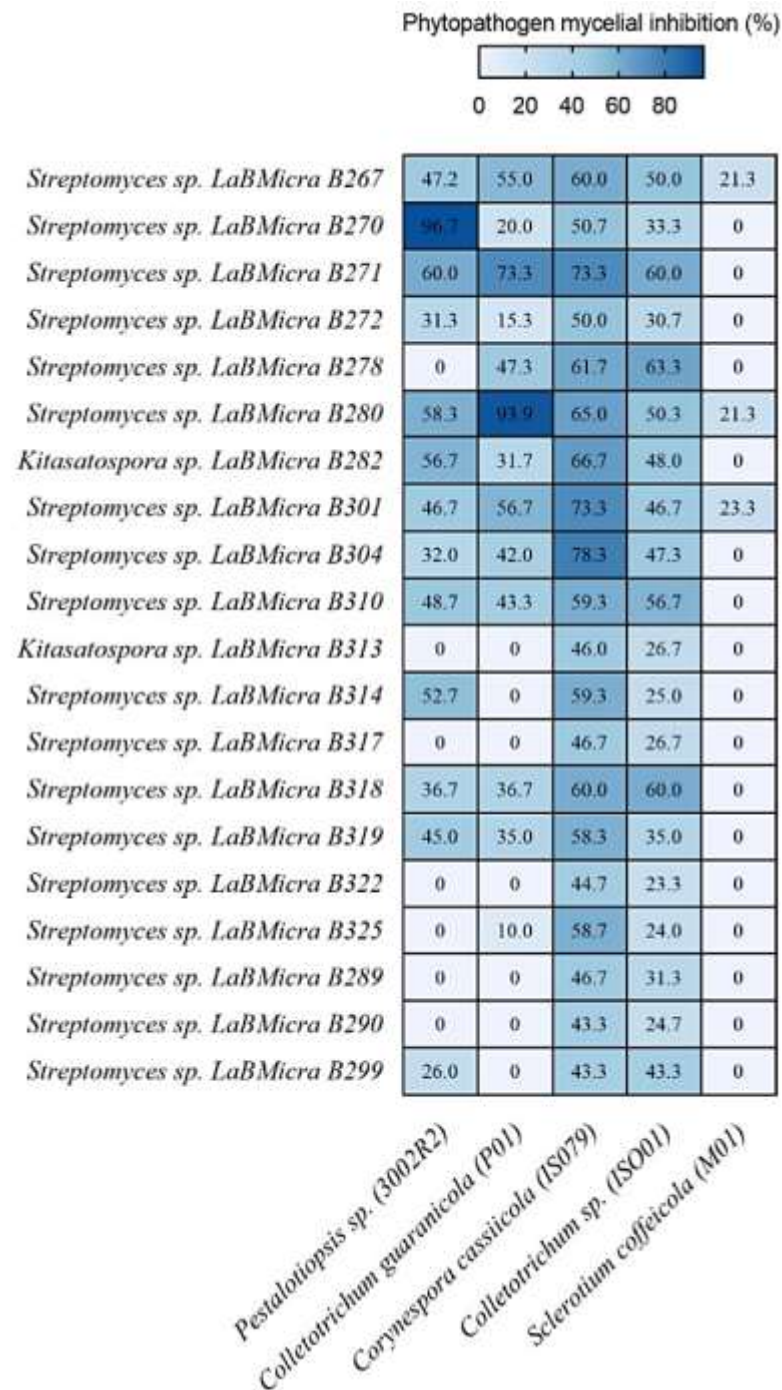


Fig. 2 - Mapa de calor mostrando os valores percentuais médios das zonas de inibição do crescimento micelial de fitopatógenos por actinomicetos (GraphPad Prism versão 8.0.1).

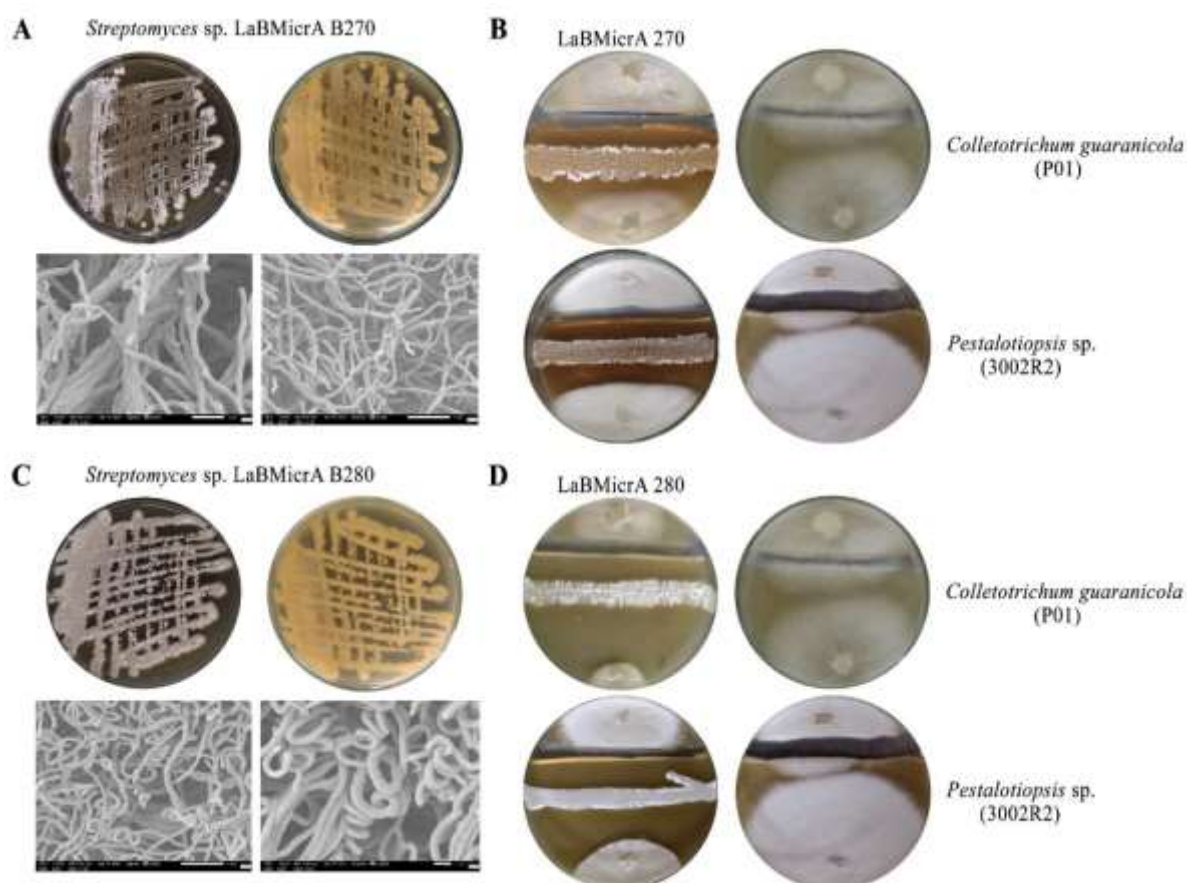


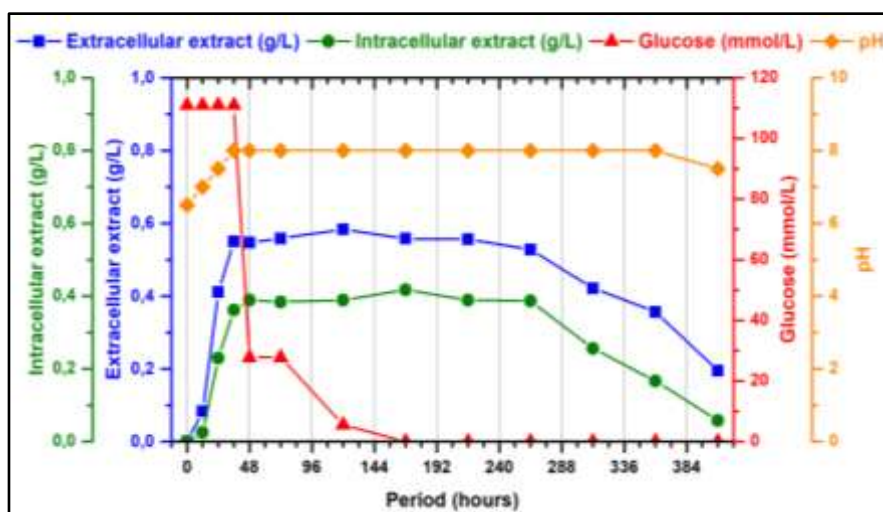
Fig. 3 - (A e C) Características macro e micromorfológicas de *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270 e B280 cultivadas por 10 dias em meio ISP2. Acima: frente e verso das placas de Petri; Abaixo: ornamentações miceliais - imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (B e D) Ensaio de cultura dupla das cepas LaBMicrA B270 e B280 (meio) com os fitopatógenos *Pestalotiopsis* sp. (3002R2) e *Colletotrichum guaranicola* (P01) (extremidades), após 10 dias de crescimento em meio ISP2. No meio: o controle contendo apenas os fitopatógenos após o décimo dia de cultura.

3.3.3 Curvas de produção dos extratos das linhagens LaBMicrA B270 e B280 e suas atividades antifúngicas ao longo do tempo

Devido aos resultados promissores nos testes anteriores de cultura dupla, as linhagens LaBMicrA B270 e B280 foram selecionadas para o estudo das curvas de produção dos extratos de células e meios de cultura e das atividades dos mesmos extratos contra os fitopatógenos de teste ao longo de todo o tempo de crescimento. Como pode ser observado, as curvas dos extratos de células e meio de cultura foram semelhantes às curvas clássicas de crescimento bacteriano (Fig. 4). Da mesma forma, a concentração de glicose atingiu um nível próximo de zero quando o período de produção máxima dos extratos começou sinalizando o final da fase exponencial e o início da fase estacionária. Curiosamente, o comportamento do pH foi bastante distinto para as duas cepas; o primeiro atingiu um máximo de 8,0 no período de produção máxima de extrato

e só diminuiu no período de declínio, enquanto o segundo manteve um pH de 6,5 durante todas as fases. A diminuição das massas dos extratos, típica das fases de declínio, começou após 272 horas de cultura (11º dia) em ambas as curvas. Um dia antes, no 10º dia, os rendimentos dos extratos cultivados em meio ISP2 foram, respectivamente, 542 e 720 mg/L para *Streptomyces* spp. LaBMicA B270 (OR724732) e B280 (OR724701).

Streptomyces sp. LaBMicA B270



Streptomyces sp. LaBMicA B280

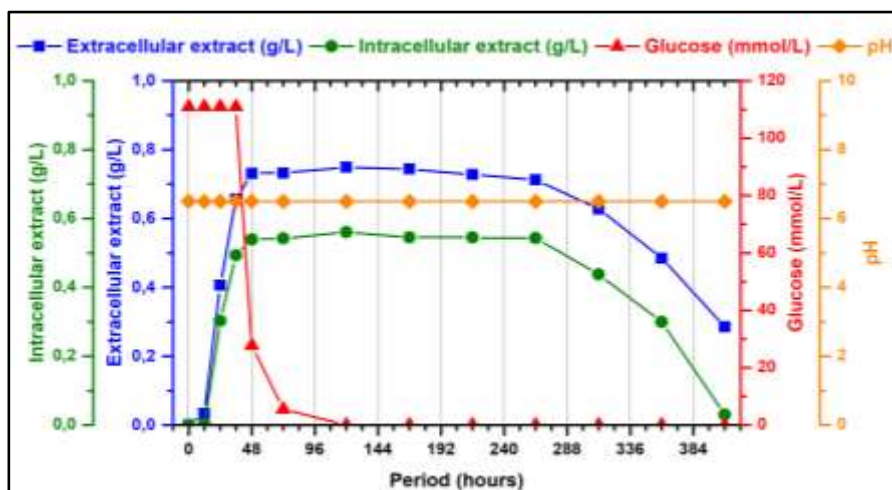


Fig. 4 – Curvas de rendimento de extratos metabólicos das cepas selecionadas para estudos biológicos.

Para confirmar os ensaios de cultura dupla e verificar o tempo necessário de crescimento para as atividades antifúngicas observadas nos ensaios, os extratos de AcOEt/2-propanol 9:1 dos meios de cultura das cepas LaBMicA B270 e B280, de cada ponto de tempo, foram testados contra os mesmos fitopatógenos. Como nos ensaios de cultura dupla, os extratos de todos os pontos de tempo, entre 36 horas de crescimento (ponto de tempo 3) até o início das

fases de declínio, mostraram atividades antifúngicas contra todos os fitopatógenos. Como também esperado dos ensaios de cultura dupla, os extratos de LaBMicrA B270 novamente não mostraram atividade contra *S. coffeicola* (M01).

3.3.4 Ensaios de concentração mínima inibitória

Após observar os resultados dos ensaios periódicos descritos acima, os extratos das cepas LaBMicrA B270 e B280 com dez dias de crescimento foram escolhidos para os ensaios de concentração mínima inibitória. Desta vez, os extratos intracelulares também foram testados para descobrir se as células também tinham as mesmas atividades antifúngicas. Os melhores resultados foram obtidos com as frações de AcOEt/2-propanol 9:1 da partição dos meios de cultura (Tabela 2). Confirmado os ensaios anteriores, a cepa LaBMicrA B280 mostrou atividade contra todos os fitopatógenos e a cepa LaBMicrA B270 não mostrou atividade apenas para *S. coffeicola* (M01). Com exceção deste caso, os extratos de AcOEt/2-propanol 9:1 não mostraram crescimento nas dosagens mínimas de 250 ou 125 µg/mL e, apenas abaixo dessas, muito pouco crescimento ou crescimento normal foram observados. No entanto, os extratos das biomassas bacterianas em AcOEt/MeOH 1:1 mostraram atividade antifúngica muito mais fraca e para apenas duas ou três cepas. Por fim, nenhuma atividade foi observada nas frações aquosas do meio de cultura após a partição com AcOEt/2-propanol 9:1.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos extratos de 10 dias das linhagens *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270 e B280.

Cepas testadas	Concentrações e atividades					Fitopatógenos
	1.000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	0,62 µg/mL	
	AcOEt/2-propanol 9:1 extrato (meio de cultura)					
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B270	+	+	+	+	±	<i>Colletotrichum</i> sp. (ISO01)
	+	+	+	±	–	<i>C. guaranicola</i> (P01)
	+	+	+	±	–	<i>Corysnepora</i> <i>cassiicola</i> (ISO079)
	+	+	+	+	±	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (3002R2)
	–	–	–	–	–	<i>Sclerotium coffeicola</i> (M01)
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B280	+	+	+	+	±	<i>Colletotrichum</i> sp. (ISO01)
	+	+	+	+	±	<i>C. guaranicola</i> (P01)
	+	+	+	+	±	<i>Corysnepora</i> <i>cassiicola</i> (ISO079)
	+	+	+	+	±	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (3002R2)
	+	+	+	±	–	<i>Sclerotium coffeicola</i> (M01)
AcOEt/MeOH 1:1 extrato (biomassa celular)						
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B270	–	–	–	–	–	<i>Colletotrichum</i> sp. (ISO01)
	–	–	–	–	–	<i>C. guaranicola</i> (P01)
	+	+	±	–	–	<i>Corysnepora</i> <i>cassiicola</i> (ISO079)
	+	±	–	–	–	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (3002R2)
	–	–	–	–	–	<i>Sclerotium coffeicola</i> (M01)
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B280	+	+	±	–	–	<i>Colletotrichum</i> sp. (ISO01)
	+	±	–	–	–	<i>C. guaranicola</i> (P01)
	+	±	–	–	–	<i>Corysnepora</i> <i>cassiicola</i> (ISO079)
	–	–	–	–	–	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (3002R2)
	–	–	–	–	–	<i>Sclerotium coffeicola</i> (M01)

Nota: + = sem crescimento; ± = crescimento muito pequeno; – = crescimento

3.4 DISCUSSÃO

Muitos exemplos mostram que, em qualquer ecossistema, a interação de uma planta com microrganismos pode ser benéfica, neutra ou prejudicial, determinando, entre outros fatores, a adaptabilidade da planta (em maior ou menor grau) ao ambiente em que cresce [3,28]. *I. edulis*, uma planta com efeito indutivo positivo para a produção agrícola de vegetais de interesse econômico, como *Coffea canephora* var. *robusta* (café robusta), *Theobroma cacao* e

Terminalia amazonia, também tem boa receptividade a microrganismos benéficos [29-31,38-40]. Neste estudo, foram isoladas 64 cepas de actinomicetos das rizosferas de três indivíduos de *I. edulis* presentes no campus da UFAM, o maior fragmento de floresta urbana da Amazônia. As cepas isoladas foram agrupadas em 16 grupos morfológicamente diferentes e 20 cepas foram selecionadas e avaliadas quanto à biodiversidade e seu potencial antifúngico. A análise filogenética usando sequências 16S agrupou a maioria das vinte cepas por similaridade com cepas tipo do banco de dados EzBioCloud. Isso sugere que a similaridade genética obtida pelo alinhamento em pares pode ser um bom indicador para a classificação inicial dessas cepas com as espécies tipo de maior similaridade. No entanto, essa análise de forma alguma indica delimitação no nível de espécies. Na verdade, atualmente, a delimitação de espécies de *Streptomyces*, bem como de outras espécies bacterianas, tem sido realizada por análises de dDDH (hibridização de DNA-DNA digital) e ANI (identidade média de nucleotídeos) usando o genoma completo [41,42].

Diferentes exemplos na literatura, nos quais cepas com similaridade acima de 98% na região 16S pertencem a espécies diferentes, ratificam que mesmo alta similaridade nesta região bacteriana não garante a identidade da espécie. É o que se encontra na descrição recente da cepa *Streptomyces* herbicida NEAU-HV9, que apresentou similaridade de sequência com *S. panaciradicis* 1MR-8 (98,90%), *S. sasae* JR-39 (98,89%) e *S. barringtoniae* JA03T (98,69%) [43]. Um resultado semelhante foi observado para as cepas LaBMicrA B270 e B280, que, embora tenham apresentado similaridade de 98,36% e 98,86% na região 16S com *S. murinus* NBRC 12799 e *S. graminearus* NBRC 15420, pertencem a uma nova espécie de *Streptomyces* de acordo com dados do genoma completo (dados não mostrados). Exemplos como estes podem indicar que muitas cepas obtidas neste estudo podem não estar completamente representadas nas espécies conhecidas até o momento, revelando a necessidade de estudos mais aprofundados usando análises filogenéticas multilocus ou filogenômicas do genoma completo para caracterização precisa dessas cepas.

Em relação ao seu potencial antifúngico, as 20 cepas também foram interessantes nos testes contra os fitopatógenos de importância agrícola *Colletotrichum* sp. ISO01, *C. guaranicola* P01, *Pestalotiopsis* sp. 3002R2, *Corynespora cassiicola* ISO079 e *Sclerotium coffeicola* M01. Esses fitopatógenos causam problemas que geram milhões de dólares em perdas para a agricultura. *Corynespora cassiicola* é amplamente citada como um agente causador de doenças em mais de 530 espécies de plantas de 380 gêneros [44] diferentes e é um agente infeccioso de micose em humanos que trabalham com culturas hortícolas [45]. O gênero *Colletotrichum* é responsável por doenças em mais de 3.200 espécies de plantas [46]. O gênero

Pestalotiopsis abriga várias espécies de interesse biotecnológico [47,48], mas algumas espécies são relatadas como fitopatógenos [49-51]. *S. coffeicola* tem um alto impacto na produção agrícola e é responsável por lesões nas folhas da murta indiana (*Morinda citrifolia* L.) [52] e em árvores de manga (*Mangifera* sp.), plantas importantes para a medicina tradicional e nas indústrias alimentícia e cosmética [53,54].

Os resultados dos ensaios in vitro confirmam a ampla capacidade das espécies de *Streptomyces* de combater outros microrganismos, especialmente fungos, e indicam que todas as 20 cepas podem ser fontes de substâncias antifúngicas. As atividades antifúngicas dos extratos periodicamente amostrados de *Streptomyces* spp. linhagens LaBMicrA B270 e B280, bem como os testes de concentração inibitória mínima, ratificaram seu potencial e sugerem substâncias antifúngicas altamente eficazes, considerando sua provável baixa concentração nesses extratos. Ambas as cepas são fortes candidatas para combater os fitopatogênicos *Colletotrichum guaranicola* (P01) e *Pestalotiopsis* sp. (3002R2), que ameaçam a planta de guaraná (*P. cupana*), uma cultura muito importante na economia das comunidades amazônicas. As sementes de guaraná figuram entre as melhores fontes de cafeína do mundo e são usadas na produção de refrigerantes, como suplemento alimentar e na medicina tradicional [55]. Além disso, LaBMicrA B280 também foi ativa contra *S. coffeicola* M01, um fitopatógeno que afeta centenas de plantas de importância agrícola em todo o mundo.

O desenvolvimento de métodos agrícolas menos prejudiciais, mais ecologicamente corretos e sustentáveis depende da disponibilidade de microrganismos que promovam o biocontrole e a fertilização. Muitos exemplos destacam que *Streptomyces* e outros actinomicetos são úteis para esse fim, combatendo fitopatógenos [56-59], melhorando a produção de frutas e promovendo sua fertilização [4,7,10,11,60]. Nesse contexto, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, os actinomicetos da rizosfera de *I. edulis* podem representar uma alternativa viável para uma agricultura sustentável. É possível que sejam transportados através de sementes ou mudas de um solo para outro, bem como através da serapilheira das plantas *I. edulis*, comumente geradas em abundância [61-64]. Essas possibilidades, no entanto, precisam ser investigadas.

3.5 CONCLUSÃO

Neste estudo inédito, foi revelado que as rizosferas de *I. edulis* podem abrigar uma ampla variedade de actinomicetos, cuja diversidade de espécies ainda precisa ser investigada. Isso foi inferido ao comparar os genes 16S rRNA das vinte cepas de actinomicetos das

rizosferas de três indivíduos dessa planta com o banco de dados EzBioCloud, cujo resultado indica que essas 20 cepas estão distribuídas em mais de dez grupos distintos dentro dos gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora*. Também revelamos o grande potencial dessas 20 cepas contra as linhagens fúngicas fitopatogênicas de *Colletotrichum* sp., *C. guaranicola*, *Pestalotiopsis* sp., *Corynespora cassiicola* e *S. coffeicola*, que frequentemente devastam plantações de numerosas culturas de importância econômica global e regional. Duas *Streptomyces* spp. linhagens LaBMicrA B270 e B280 também merecem destaque, pois, após 10 dias de crescimento, seus extratos AcOEt/2-propanol 9:1 do meio de cultura inibiram completamente o crescimento de quatro, exceto *S. coffeicola* (B270), ou de todos os cinco fungos (B280), respectivamente, nas dosagens mínimas de 250 ou 125 µg/mL, revelando que possuem metabólitos com potente atividade antifúngica. Coerentemente, o estudo periódico revelou que os extratos do meio de cultura de ambos os actinomicetos tinham atividades antifúngicas entre o final da fase de crescimento (3º dia) e o início da fase de declínio.

Naturalmente, o presente estudo precisa ser expandido e aprofundado para uma melhor compreensão e uso do potencial biotecnológico dessas cepas. No entanto, ele reforça a hipótese de que os microrganismos amazônicos, particularmente os actinomicetos, embora menos investigados e percebidos do que as plantas, não são menos importantes como fontes de inestimável potencial para resolver muitos problemas modernos, especialmente os agrícolas. Estudos adicionais serão realizados para obter um maior conhecimento do potencial dessas cepas para uso na agricultura, bem como na medicina. Os ingredientes ativos dos extratos e a ativação de BGCs não expressos relacionados à síntese de NPs serão objetos de pesquisa, com o objetivo de descobrir novos metabólitos bioativos. Além disso, a possibilidade de novas espécies também será investigada por meio do sequenciamento completo do genoma de alguns dos actinomicetos. Esperamos que estudos como este estimulem outros grupos regionais a explorar os actinomicetos, entre outros microrganismos, da vasta biodiversidade microbiana na Amazônia e reforcem a necessidade de preservá-la.

Disponibilidade de Dados e Materiais

Os dados estão contidos no artigo ou no Material Suplementar (SM).

Contribuições dos Autores

RSR: desenvolvimento do projeto e preparação do manuscrito; ANB: análise de dados; SRSSS e ASV: assistência na identificação morfológica; RDB e JLSB: isolamentos e identificações de fitopatógenos; TCLA: ensaios biológicos; JCC: identificação molecular; GFS: identificação molecular e suporte técnico; AQLS e ADLS: suporte técnico, metodologia, supervisão e preparação do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Aprovação Ética e Consentimento para Participar

Não aplicável.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao Centro Multiusuário de Análise de Fenômenos Biomédicos (UEA - CMABio) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Amazônia (PPG-Bionorte) pelo apoio. Os autores também agradecem à FAPEAM pela bolsa de doutorado concedida a Rafael de Souza Rodrigues e à bolsa de produtividade concedida a GFS, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de pesquisa concedida a ADLS.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) via chamada 007/2021 - Programa Biodiversa, chamada 010/2021- Áreas Prioritárias, e projetos POSGRAD 2021/2022 e 2022/2023, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Códigos de Financiamento 001 e 88881.200469/2018-01 - Procad AmazonMicro).

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

**4. CAPITULO 3 – PROSPECÇÃO GENÔMICA E ESTUDOS
BIOLÓGICOS E QUÍMICOS DA LINHAGEM *Streptomyces* sp. nov.
LaBMicrA B280 ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Inga edulis* Martius –
(Mart.) NA AMAZÔNIA**

A versão final deste manuscrito será publicada.

O MATERIAL SUPLEMENTAR DESTE CAPITULO ENCONTRA-SE NO
ANEXO 2

Rafael de S. Rodrigues^{1*}, Antonia Q. Lima de Souza^{1,2,3*}, Kamila R. Primo Fernandes³, Felipe Moura A. da Silva³, Rafael Pinto e Souza⁴, Anderson N. Barbosa^{1,4}, Fábio César S. Nogueira⁵, Gabriel R. Alves Carneiro⁵, Ricardo de M. Katak⁶, Ivanildes dos S. Bastos⁷, Patrícia Puccinelli Orlandi⁷, Gilvan F. da Silva⁸, Afonso D. Leão de Souza^{1,3,9*}

¹Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

²Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

³Centro de Apoio Multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁴Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁵Laboratório de Proteômica/Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Laboratório de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus, Brasil

⁷Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz-AM), Manaus, Brasil

⁸Laboratório de Biologia Molecular, Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, Brazil

⁹Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

*Correspondências:

rafaelsr.bio@gmail.com (Rafael de S. Rodrigues);

antoniaqueiroz@ufam.edu.br (Antonia Q. Lima de Souza);

souzadq@ufam.edu.br (Afonso D. Leão de Souza)

RESUMO

Neste estudo, investigamos a identidade taxonômica e o potencial biotecnológico da actinobactéria LaBMicrA B280, isolada da rizosfera de *Inga edulis* (Mart.) no campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus. Sua identidade taxonômica foi determinada por meio de análises genômicas e identidade média de aminoácidos. Foram realizadas ainda: anotações de subsistemas metabólicos e Biosynthetic Gene Clusters (BGCs); bem como ensaios biológicos: antifúngico, antimalárico, citotóxico e larvicida; um clássico "Molecular Networking"; e a caracterização do íon majoritário da fração FR3 que apresentou os melhores resultados de bioatividade. Os cálculos de hibridização digital entre DNAs (dDDH) e média da identidade nucleotídica (ANI) atribuem à LaBMicrA B280 valores abaixo dos pontos de corte para novas espécies ($> 70\%$ e $> 96\%$). A mineração genômica resultou em 39 BGCs preditos, incluindo o responsável pela síntese de pentamicina. Foram anotados ainda 314 subsistemas metabólicos deste genoma e 24 categorias de genes. No Molecular Networking não foram anotadas substâncias – manualmente a pentamicina. Observou-se que as concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ de FR3 são efetivas em $91,3\% \pm 0,03$ e $61,0\% \pm 0,18$ contra *Plasmodium falciparum* (Cepas W2 e 3D7 respectivamente), e $91,45\% \pm 0,55$ de citotóxicidade contra a linhagem cancerígena HEP-2. Na atividade larvicida foi verificada a eficiência de 100% contra o *Aedes aegypti* (FO) na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ em 48 h. Desta fração, que apresentou os melhores resultados, foi isolado o fungicida pentamicina. Os resultados mostram que a linhagem LaBMicrA B280 é uma nova espécie com um espectro biotecnológico diversificado, bem como uma fonte de importantes metabólitos secundários a serem investigados.

Palavras-chave: Taxonomia, Anotações de BGCs, Atividades biológicas, Molecular Networking, Pentamicina.

4.1 INTRODUÇÃO

Em recente revisão, relatamos muitos trabalhos publicados no presente século que demonstram o potencial das actinobactérias, conhecidas e novas, para a produção de antibióticos, uso na agricultura e diversas outras aplicações biotecnológicas [1]. Prospecções em ecossistemas ainda pouco explorados (oceanos, mares, desertos, manguezais e insetos, entre outros) têm resultado não apenas na descoberta de novos produtos naturais (PN), como também de novas espécies [2,3]. Várias triagens têm demonstrado que as actinobactérias, principalmente as do gênero *Streptomyces*, continuam a ser as principais fontes de PN com atividades antimicrobianas, porém tem aumentado o relato da produção por esses microrganismos de PN com atividades anticancerígena, antiparasitária, larvicida e biocida, entre outras [1,2,4]. De fato, as actinobactérias são conhecidas por serem prolíferas produtoras de PN e por produzirem os antimicrobianos mais importantes desde a descoberta da estreptomicina – há aproximadamente 80 anos [1,2]. Até o final da primeira década do século XXI foram atribuídos a elas 9.660 metabólitos com bioatividades – 42% dos PN microbianos [5], e mais recentemente há estimativas que superam 15.000 PN [6-8]. As bactérias do gênero *Streptomyces*, o de maior número de relatos de PN e o maior do filo *Actinobacteria*, possuem genomas que variam em tamanho de 6 a 10 milhões de pares de bases (pb), ricos em G+C, e podem abrigar entre 8 e 80 Clusters de Genes Biossintéticos (BGCs) [9,10]. Esses genomas ricos em BGCs podem ser responsáveis em determinada espécie pela síntese de centenas de metabólitos secundários, muitos dos quais envolvidos em diversas atividades ecológicas, tais como, controle biológico, fitopropagação e biorremediação [2,4]. Os BGCs ocupam em média 13% dos genomas dessas bactérias filamentosas, a maioria silenciados e retentores de uma riqueza potencialmente desconhecidas de metabólitos secundários a serem transcritos. Os dados de muitos desses BGCs e de PN a eles relacionados podem ser acessados em bancos de dados públicos e empregados em estudos de prospecção ou mineração genômica de PN e desreplicação de amostras de extratos [1,2,10], uma abordagem muito útil para solucionar problemas em diversas áreas que dependem da descobertas de novo PN bioativos [1].

Muitos problemas relacionados à saúde humana e à agricultura em destaque nas últimas décadas podem ter nos metabólitos das actinobactérias uma solução alternativa. Destacam-se entre eles, a resistência e a multirresistência aos atuais antimicrobianos, fonte de grande preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS) e que tem causado a morte de milhões de pessoas, como revelam dados de 2019, em que foram registradas 4,95 milhões de mortes [11]. Um exemplo típico é a resistência do *Plasmodium falciparum* ao antimalárico

artemisinina [12]. Este protozoário é um dos principais agentes da malária, uma parasitose muito agressiva transmitida por vetores do gênero *Anopheles*, causa de grande flagelo da região Amazônica e responsável por milhares de mortes em 2020, somente no continente Africano [13]. Além do combate ao protozoário da malária, o uso de actinomicetos vem se mostrando uma alternativa econômica e ecológica viável para conter mosquitos dos gêneros *Anopheles* e *Aedes*, reconhecidos vetores de doenças tropicais como parasitoses (malária) e viroses (dengue, chikungunha e outras) que causam aproximadamente centenas de milhares de mortes por ano [14]. A agricultura tem enfrentado um grande desafio para conter fitopatógenos que destroem plantações em todo o mundo, causando perdas de milhares de dólares todos os anos [15,16]. Os fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Corynespora* e *Sclerotium* estão entre os maiores responsáveis por estes prejuízos, causando pragas em dezenas de espécies de plantas e até infecções em seres humanos, como é o caso do *Corynespora cassicola* [17-21]. Outro problema para os quais os metabólitos dos actinomicetos podem representar uma solução alternativa é o câncer. Há muito revelada como um grande problema de saúde mundial, sendo a segunda causa de morte no mundo e atingiu recentemente 19,3 milhões de casos em todo o mundo, com prevalência do câncer de mama feminino (11,7%), de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%) [22,23,24].

Recentemente relatamos um trabalho inédito sobre a diversidade e atividade antifúngicas de actinobactérias da rizosfera de *Inga edulis* Martius no campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), uma área de aproximadamente 670 mil hectares de mata amazônica, em sua maioria nativa, e um dos maiores fragmentos florestais naturais urbanos do mundo [25]. Entre 64 actinobactérias isoladas das rizosferas de *I. edulis*, 20 foram preliminarmente caracterizadas pelo gene 16S do rRNA e tiveram seus metabólitos ensaiados contra linhagens de importantes fitopatógenos. Dentre estas 20 linhagens, destacou-se por suas atividades antifúngicas aos fitopatógenos testes a linhagem *Streptomyces* sp. nov. LaBMicrA B280 (OR724701), objeto dos estudos mais abrangentes que relatamos neste trabalho. Nesses estudos foram verificadas sua identidade taxonômica; subsistemas metabólicos; os tipos de BGCs associados a síntese de PN em seu genoma; e novas atividades biológicas dos seus extratos: antifúngica contra fitopatógenos; citotóxica contra a linhagem cancerígena do epiteloma de laringe humano (HEp-2); larvicida contra *A. egypti* (FO); e antiparasitária contra linhagens de *P. falciparum* (W2 e 3D7). O extrato do meio cultivado desta linhagem também foi estudado quimicamente em busca dos princípios ativos relacionados a essas atividades e a composição da fração que apresentou os melhores resultados foi investigada pelo clássico Molecular Networking GNPS.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Origem da linhagem LabMicrA B280

A linhagem *Streptomyces* sp. nov. LabMicrA B280 (OR724701) foi isolada da rizosfera de *I. edulis* (Mart.), no Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus/Amazonas e está preservada no Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia (LaBMicrA), localizado na Central Analítica (CA) – UFAM [25].

4.2.2 Sequenciamento genômico e montagem

A linhagem LaBMicrA B280 foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultura BDL [26], a 28 ± 2 °C e 120 rpm, por 72 h. A biomassa bacteriana foi separada do caldo de cultivo por centrifugação e o DNA genômico (gDNA) extraído utilizando o kit Zymo Research Fungal/Bacterial DNA MicroPrep™ (Zymo Research, USA). Em seguida, o gDNA foi quantificado no NanoDrop™ (ThermoFisher Nanodrop spectrophotometer), analisado em gel de agarose 0,8% (p/v) e, novamente, quantificado no Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technologies). O sequenciamento do gDNA foi realizado utilizando a plataforma Illumina – HiSeqX – PE 150 cycle, com comprimento de leitura de 2 x 150 (Paired End), com cobertura estimada em 100x. A montagem do genoma foi realizada utilizando a combinação de dados de sequenciamento de Illumina – HiSeqX e fluxo de trabalho SPAdes [27], com auxílio de curadoria manual por meio do mapeamento das leituras Illumina nos contigs originados. A estrutura e qualidade do genoma, previsões e anotações de subsistemas foram realizadas utilizando as plataformas BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center) (<https://www.bv-brc.org/>) e Rast Annotation using Subsystem Technology (RAST) (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) [28] (acessadas em 20/02/2024).

4.2.3 Filogenômica

A identificação filogenômica foi realizada submetendo o rascunho do genoma da linhagem LaBMicrA B280 nos servidores Type Strain Genome Server (TYGS) (TYGS v.391; <https://tygs.dsmz.de/>) e Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) 3.0 (GGDC v3.0; <https://ggdc.dsmz.de>) utilizando os parâmetros padrões e valor < 70% de similaridade para delimitação de uma nova espécie (acessados em 20/02/2024) [29]. A topologia da árvore filogenômica e os valores de suporte bootstrap foram visualizados usando a plataforma iTOL

(<https://itol.embl.de/>). Análises complementares por meio do Overall genome relatedness index (OGRI) foram realizadas utilizando-se métricas internacionalmente validadas: AAI (average aminoacid identity; <http://enve-omics.ce.gatech.edu/aai/>), OrthoANI (orthologous average nucleotide identity; <https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani>), ANI (average nucleotide identity; <https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>), BLAST ANI (ANIb) e MUMmer ANI (ANIm) (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) (acessos em 25/02/2024) com delimitação de similaridade < 95~96% para uma nova espécie [30-32].

4.2.4 Predição de clusters associados a síntese de produtos naturais

Para a predição de Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) foi utilizada a ferramenta Secondary Metabolites Analysis Shell Bacterial (antiSMASH), versão 7.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) (acesso em 10/03/2024). Foram utilizados os parâmetros padrões e seguido o pipeline da plataforma [33]. Para complementar as análises de BGCs, foi realizada uma análise de sintenia utilizando a ferramenta Clinker (<https://cagecat.bioinformatics.nl>) [34] (acesso em 10/03/2024). Para identificação dos tipos de proteínas associadas aos BGCs foram usadas as plataformas Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (acessos em 16/03/2024). Um gráfico de heatmap foi construído com base nos resultados da identificação filogenômica usando o pacote 'pheatmap' no software de ambiente R (versão 4.0.2). Apenas as linhagens “Tipo” com similaridade > 50% tiveram seus BGCs comparados com os de LaBMicrA B280. Todos os genomas das linhagens^T foram baixados do banco de genomas “Genome” – NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=1883>; acesso em 01/07/2024) e seus BGCs previstos na plataforma antiSMASH. Os clusters do tipo “Híbrido” foram desmembrados e reunidos; por exemplos “T1PKS, NRPS” em T1PKS e NRPS contados individualmente.

4.2.5 Produção e fracionamento do extrato do meio cultivado

A produção de extratos foi realizada como descrito em Souza Rodrigues et al. [25]. Brevemente, após o cultivo em meio ISP2 a 120 rpm e 28 ± 2 °C por 10 dias, os extratos da linhagem LaBMicrA B280 foram obtidos após a separação das células por centrifugação; estas foram maceradas com AcOEt/MeOH 1:1 e o meio cultivado foi particionado com AcOEt/2-propanol 9:1. Após análises preliminares em CCD de fase reversa (C₁₈) (3 x 6 cm), o extrato

AcOEt/2-Propanol 9:1 foi fracionado em uma coluna cromatográfica com fase C8 (3 cm x 150 mm), após ser misturado com sílica de 63-200 μm para formar uma pastilha. A coluna foi ativada com 50 mL de MeOH-HPLC (3x) e condicionada com H₂O/MeOH-HPLC – 8:2 v/v (3x); em seguida a pastilha foi adicionada no topo da coluna e procedeu-se a eluição com 50 mL de H₂O/MeOH-HPLC – 8:2 v/v - FR1; 50 mL de H₂O/ MeOH-HPLC – 1:1 v/v - FR2; 50 mL de H₂O/ MeOH-HPLC – 2:8 v/v - FR3; e 50 mL de MeOH-HPLC – 100% - FR4. Após novas análises cromatográficas e ensaios biológicos, a fração FR3 foi fracionada novamente e de forma semelhante em coluna C-8, porém, eluindo-se com H₂O/MeOH-HPLC/Acetona 8:1:1 v/v - FR3-A; H₂O/MeOH-HPLC/Acetona 4:4:2 v/v - FR3-B; e MeOH-HPLC 100% - FR3-C. Finalmente, após análises preliminares por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna analítica C18, a fração FR3-B (5,4 mg) foi fracionada em coluna semi-preparativa (Sunfire, C18, 5 μm , 10 $\times$ 250 mm) Shimadzu, modelo UFLC (Shimadzu, Columbia, MD, EUA), usando água (A) e metanol (B) como fases móveis. O gradiente de eluição foi de: 65 - 100% B (v / v) durante 12 min, com um fluxo de 3.5 mL min⁻¹ e monitoramento com UV a 315 nm. O composto majoritário (2,3 mg) foi obtido com tempo de retenção (t_R) de 7.7 min e submetido a identificação por Ressonância Magnética Nuclear. Os espectros de RMN unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos em um espectrômetro de NMR AVANCE III HD 500 (Bruker, Billerica, MA, EUA), operando a 11,75 T, operando a 500,13 para ¹H e a 125,76 MHz para ¹³C. DMSO-d₆ foi o solvente e TMS o padrão de referência interna.

4.2.6 Ensaios biológicos

Além dos ensaios antifúngicos [25], o extrato de metabólitos extracelulares AcOEt/2-Propanol 9:1 e frações foram submetidos aos ensaios a seguir.

4.2.6.1 Ensaio de Citotoxicidade

Todos os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%. A linhagem cancerígena do epiteloma da laringe humana (HEp-2) foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e antibiótico gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios foram realizados em triplica utilizando o método Alamar Blue de acordo com Ahmed et al. [35]. As células foram plaqueadas na concentração de 1,0 $\times$ 10⁴ células/poço em placa de 96 poços e incubadas por 24

h em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C; adicionaram-se individualmente os extratos AcOEt/MeOH 1:1 (biomassa celular), AcOEt/2-propanol 9:1 (meio cultivado) e as frações FR1, FR2, FR3 e FR4 nas concentrações 50, 25, 12,5 e 6,3 µg/mL e, após 72 h de incubação nas mesmas condições citadas anteriormente, adicionou-se 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço e esperou-se o tempo de metabolização de 2 h do Alamar blue® (Sigma-Aldrich, Brasil). O volume final em cada poço foi de 200 µL. A fluorescência foi monitorada em leitor de microplaca (GloMax® Explorer) comprimento de onda de emissão 580-640 nm e excitação 520nm. O crescimento celular foi utilizado como controle positivo e DMSO 0,1% foi utilizado como controle negativo. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula: %Viabilidade= $F_t \times 100 / F_b$, onde F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e F_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.6.2 Ensaio antiplasmódico

Para a avaliação da atividade antiplasmódica dos extratos e frações, o cultivo das cepas (W2 e 3D7) de *P. falciparum* foi realizado de acordo com Trager & Jenson [36], com parasitemia final a 2% e hematócrito a 2%. Os extratos AcOEt/MeOH 1:1 (biomassa celular), AcOEt/2-propanol 9:1 (meio cultivado) e as frações FR1, FR2, FR3 e FR4 em DMSO a 0,5%, nas concentrações que variam de 50 a 0,39 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata em placas de 96 poços de fundo chato. O crescimento parasitário foi utilizado como controle positivo (presença do parasita), e o crescimento de eritrócitos não parasitados como controle negativo (ausência do parasita). Após 72 h de incubação, foram realizadas lavagens com o tampão PBS 1X e brometo de etílico, o que removeu os resíduos de extratos. Ao final, as células das cepas W2 e 3D7 foram ressuspensas em 200 µL de PBS 1X para a análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA), no canal FL-1 com software Getting Started with BD FACSDiva™ e FlowJo™ versão 10.

4.2.6.3 Ensaio larvicida

O preparo das larvas de *A. aegypti* (FO) foi realizado como descrito em Oliveira et al. [37]. Os bioensaios seletivos seguiram os critérios estabelecidos por Dulmage et al. [38] e a OMS [39] com pequenas modificações e foram conduzidos em condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Os bioensaios seletivos foram realizados em triplicata

usando copos plásticos de 50 ml contendo 10 ml de água destilada, dez larvas de 3º ínstar, ração em pó para ratos (Teklad Global 18%) e as amostras dos extratos AcOEt/MeOH 1:1 (biomassa celular), AcOEt/2-propanol 9:1 (meio de cultura), e das frações FR1, FR2, FR3 e FR4 solubilizadas em DMSO nas concentrações de 500 µg/ml e 250 µg/ml [39]. As leituras de mortalidade foram registradas em 24, 48 e 72 h após a exposição aos extratos e frações [40].

4.2.7 Bioautografia da atividade antifúngica da fração FR3-B

Para o ensaio de bioautografia, foi preparada uma solução-mãe com 5 mg da fração FR3-B e 0,5 mL de MeOH-HPLC. Placas de CCD de fase reversa (C₁₈) com 4,5 x 6 cm foram divididas em três partes de 1,5 x 6 cm; cada parte recebeu aproximadamente 5 µL da solução-mãe 5x. O experimento foi realizado em triplicata. As placas de CCD foram eluídas com a mistura de H₂O/MeOH-HPLC/Acetona: 4:4:2 em cubas para análises cromatográficas. Após a eluição, de cada placa de CCD uma parte com um ponto de eluição foi cortada. A parte cortada foi revelada com UV de 254 NM e 365 NM e vanilina, e as outras duas foram submetidas ao ensaio de bioautografia. Para isso, as duas réplicas ou dois pontos restantes em CCD foram mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos e levemente aquecidas para evaporação do solvente. Após isto, as placas foram posicionadas no meio das placas de Petri de 1,5 x 90 mm e encobertas com meio ISP2. Discos de 5x5 mm das culturas dos patógenos foram inoculados lateralmente às placas, à meia altura, alinhados com as bandas reveladas nas CCDs. Seguiu-se o cultivo a 28 °C e durante 20 dias o crescimento de cada patógeno foi observado.

4.2.8 Análises por espectrometria de massas de FR3-B

A fração FR3-B foi analisada em um espectrômetro de massa tipo ion-trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e operando no modo positivo. A amostra foi dissolvida em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹ e analisada por inserção direta de alíquotas de 5 µL. Para a aquisição do espectro de íons totais por ESI-MS foram utilizados os seguintes parâmetros: tensão de pulverização, 5 kV; gás de bainha, 10 unidades arbitrárias (arb); gás auxiliar, 5 arb; gás de varredura, 0 arb; temperatura capilar, 200° C; tensão capilar, 40 V; lente tubular, 115 V; faixa de massa, m/z 100 a 1000.

4.2.8.1 Determinação da massa exata e fragmentação da pentamicina

A fração FR3 foi preparada na concentração de 1 mg mL⁻¹ em MeOH grau HPLC, centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para vidros de 1,5 mL e analisado em um espectrômetro de massa tipo QExactive Plus – Thermo Scientific, acoplado a um sistema UPLC Ultimate 3000 System – Thermo Scientific. Os parâmetros de análise foram: modos positivo e negativo; aquisição tipo Full MS- ddMS2; resolução 70,000 em MS1 e 17,500 para aquisição de MS2; energia de colisão de 10, 20 e 40 para os íons com abundância relativa acima de 20%. Parâmetros de ionização: Sheet Gas: 55; Auxiliar Gas: 20; Sweep Gas: 0; Spray voltage: 3.5 kV; Temperatura do capilar: 380 °C; Temperatura de gás: 380 °C; faixa de massa: m/z 100 a 1000. Parâmetros cromatográficos: volume de injeção = 10 µL; tempo de corrida = 45 min; fluxo = 300 µL/min; temperatura do forno = 40 °C. Fase móvel modo positivo: A = Água com 0,1% de ácido fórmico; B = Metanol com 0,1% de ácido fórmico; modo negativo: A = Água a 5 mM de formiato de amônio; B = Metanol; coluna = Agilent Zorbax C18 (2.1x50 mm, 1,8 µm).

4.2.8.2 Molecular Networking (GNPS)

Uma aquisição com dados de MS1 e MS2 da fração FR3 foi submetida na plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>) e usada a ferramenta Molecular network” seguindo o fluxo de trabalho: “Uma rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho on-line (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). A tolerância de massa do íon precursor foi definida como 0,02 Da e uma tolerância de íon fragmento MS/MS de 0,02 Da. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as arestas de menor pontuação foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca precisavam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondentes.” A conversão dos dados para a análise foi realizada utilizando o software MSConverter (ProteoWizard®, Palo Alto, EUA).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Montagem do genoma e anotações de sistemas metabólicos

Para verificar a qualidade e estrutura do rascunho do genoma de LaBMicrA B280 foi utilizada a plataforma BV-BRC. O genoma da linhagem apresentou: 8.257.865 de Mb; 72,0 % de conteúdo de G+C; 96 contigs; N50 229434 e L50 13; 7701 Sequências Codificantes (CDSs) de proteínas; 66 tRNA e 06 rRNA. O mapa circular do genoma de LaBMicrA B280 (fig. 1) apresenta a montagem completa do seu cromossomo: o anel mais externo em azul apresenta a posição e a ordem dos contigs, os anéis mais internos apresentam as cadeias direta (verde-CDS) e reversa (roxa-CDS), entre outras funcionalidades estruturais.

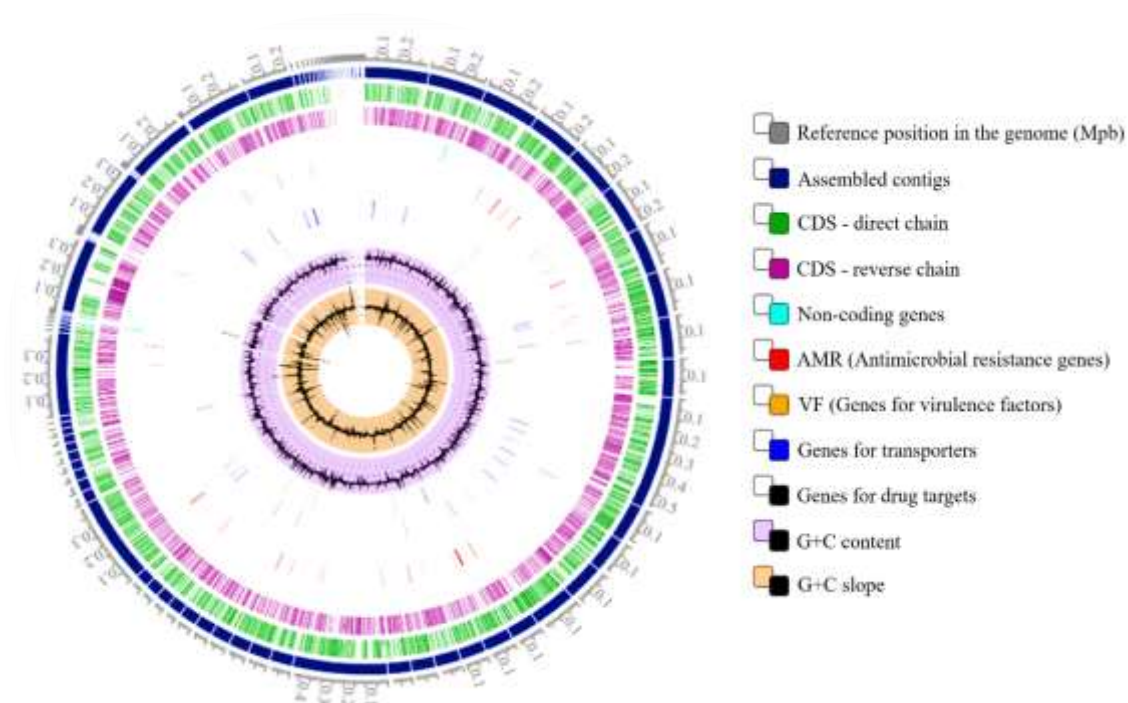


Fig. 1. Estrutura do genoma da linhagem LaBMicrA B280: o anel em azul mostra a ordem dos contigs montados; os anéis em verde e roxo mais internos apresentam as regiões de cadeia direta (CDS) e cadeia reversa (CDS); em vermelho genes de resistência a antimicrobianos (AMR); em laranja genes relacionados com fatores de virulência (FV); genes relacionados com transportes (cor azul); o conteúdo de G+C está representado nos anéis mais internos da figura.

Para anotações de subsistemas metabólicos foi utilizado o servidor RAST. O genoma de LaBMicrA B280 apresenta as ocorrências de 314 categorias de subsistemas e 7701 CDSs. Aproximadamente, 18% das CDSs (1351) ou 27 recursos de subsistema foram classificadas como subsistemas funcionais, por exemplo, “Amino Acids and Derivatives (451)”, “Carbohydrates (318)”, “Protein Metabolism (231)”, “Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments (182)”, Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids (170)”, “Phosphorus Metabolism (26)”,

entre outros (Material suplementar-MS1). Na categoria “Secondary Metabolism (9)” não foi observado subsistema funcional relacionado com a síntese de fitohormônios, entretanto há as ocorrências de categorias relacionadas com a síntese de antibiótico (Thiazole-oxazole-modified microcin (TOMM) synthesis (6)), sideróforos (“Iron acquisition and metabolism (49)”) e fixação de nitrogênio (“Nitrogen Metabolism (21)”) (MS1).

4.3.2 Identificação filogenômica e Identidade Média de Aminoácidos

A identificação filogenômica da linhagem LaBMicrA B280 foi realizada por meio de valores de hibridização digital DNA–DNA (dDDH). Duas árvores: filogenética (16 rRNA: com suporte médio de 62,5% (MS2)) e filogenômica (gDNA: com suporte médio de 86,9%) (fig. 2) foram construídas com base na fórmula GBDP d_5 utilizando a plataforma TYGS. Os valores de dDDH das fórmulas d4 e GGDC (Cálculo de distância genoma a genoma) (d2) apresentados neste trabalho suportam a linhagem LaBMicrA B280 como uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, com similaridade < 70 % com sua correlata filogeneticamente mais próxima *S. costaricanus* (*murinus*) DSM 41827^T (tabela 1). Os valores de identidade média de nucleotídeos (ANI) e identidades médias de aminoácidos (AAI) mantiveram-se abaixo do limite de corte < 95~96 para a determinação de novas espécies, complementando os valores de dDDH e GGDC (tabela 1).

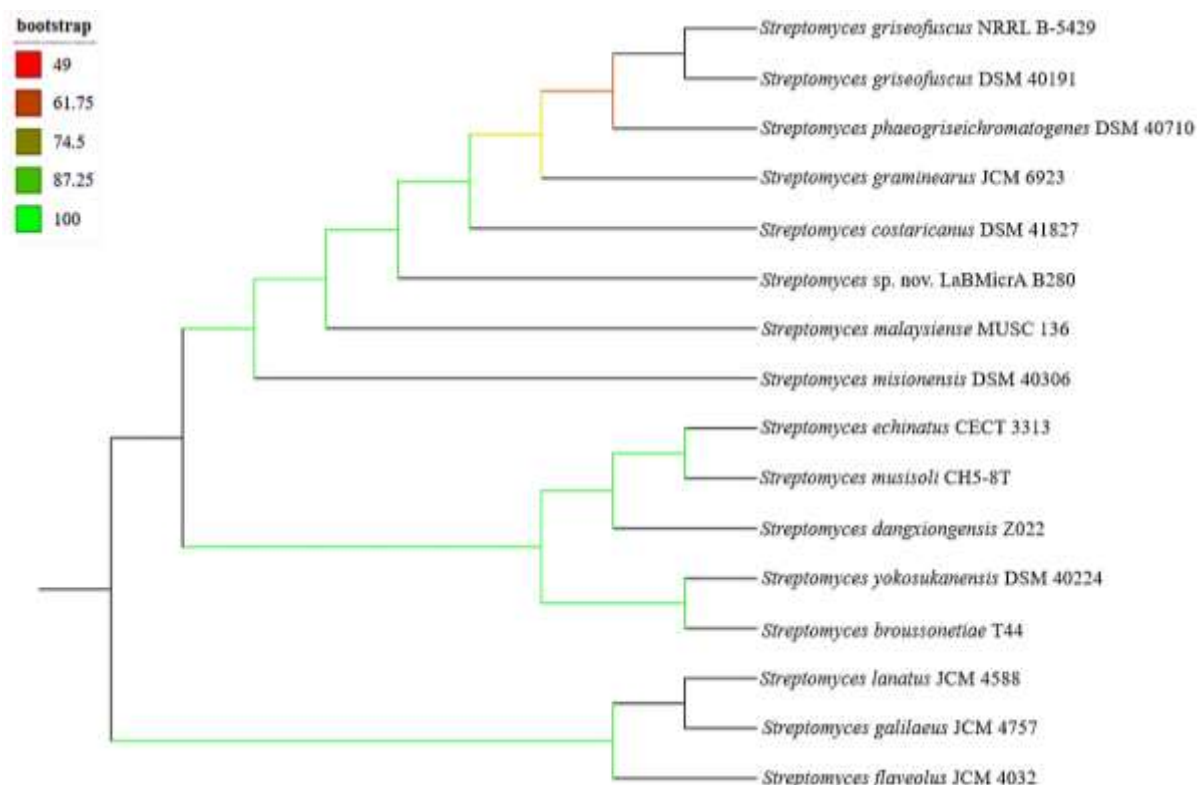


Fig. 2. Análise filogenômica inferida a partir de distâncias GBDP (Genome BLAST Distance Phylogeny approach) realizada na plataforma TYGS. São apresentadas as relações filogenômicas entre *Streptomyces* sp. nov. LaBMicrA B280 e linhagens “Tipo”. Esta árvore é sustentada com suporte de 100 replicações de pseudo-bootstrap. Para visualização da árvore foi usada a plataforma iTOL (<https://itol.embl.de/>).

Tabela 1 – Valores de dDDH, Identidade Média de Nucleotídeos (ANI) e Identidade média de Aminoácidos (AAI) entre LaBMicrA 280 e a espécie “Tipo” mais relacionada *Streptomyces costaricanus* (*murinus*) DSM 41827^T.

Isolado	Tygs e GGDC				G+C content Difference (%)
	dDDH (d0, in %)	*dDDH (d2, in %)	dDDH** (d4, in %)	dDDH (d6, in %)	
LabMicrA B280	74,2	63,7	63,6	74,6	0,24
	Overall genome relatedness index (OGRI)				
	ANI (%)	OrthoANI (%)	AAI (%)	ANiB (%)	ANIm (%)
	95,43	95,87	94,92	95, 16	95,72

Obs.: *Fórmula d2: cálculo realizado na plataforma Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0; **Fórmula d4: cálculo realizado na plataforma TYGS. OGRI: ANI, OrthoANI, Blast+ (ANiB) e MUMmer (ANIm). Como ponto de corte para pertencer à mesma espécie valores > 95~96 %; Identidade Média de Aminoácidos (AAI) > 95%.

4.3.3 Mineração genômica e sintenia entre BGCs

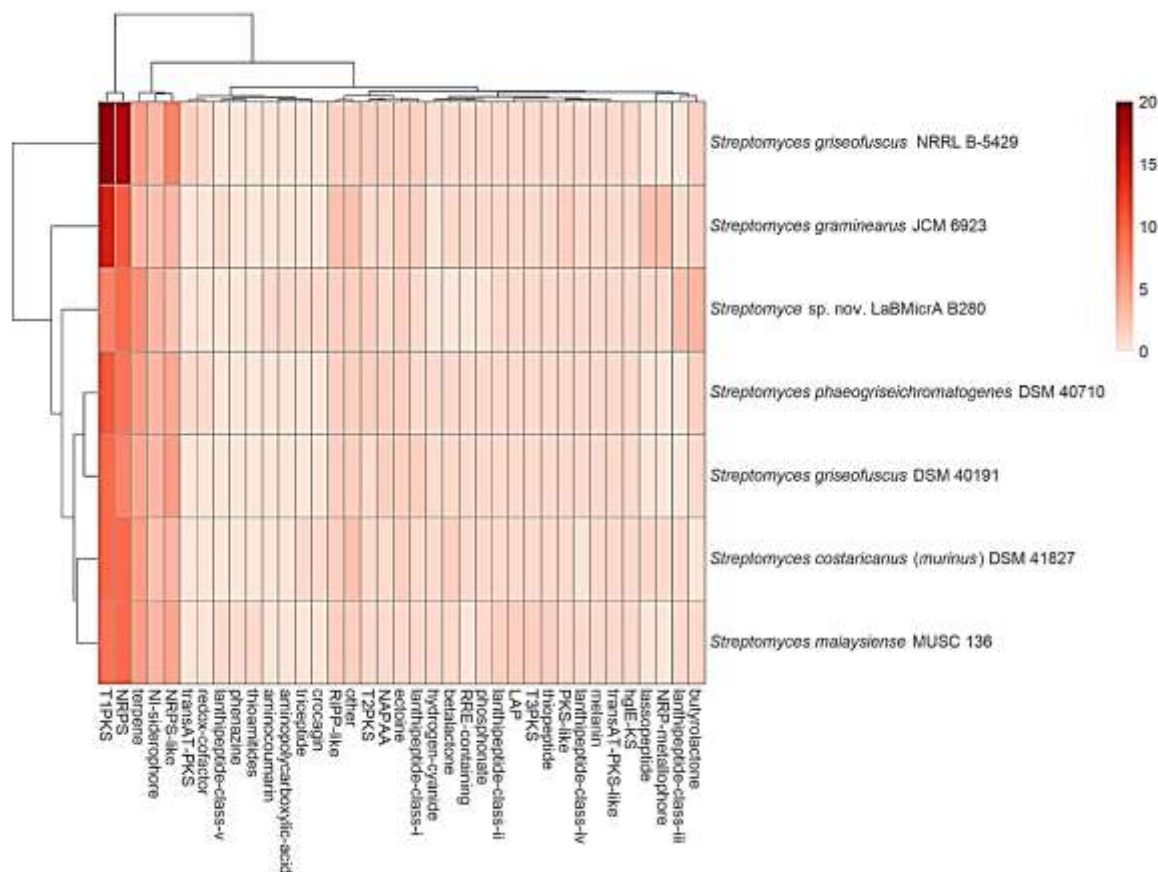
O rascunho do genoma da linhagem LaBMicrA B280 foi submetido na plataforma antiSMASH para predições de BGCs relacionados com a síntese de PN. Trinta e nove BGCs foram anotados, sete predições apresentaram 100% de similaridade com BGCs relacionados com as sínteses de: Geosmina; Albusnodina; Ectoína; Flaviolina/1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno; Leupeptina Pr/leupeptina Ac; Pentamicina; e Desferrioxamina B/Desferrioxamina E (tabela 2). Entre as demais predições, 5 apresentaram similaridade acima de 50%, 22 abaixo de 50% e 5 não apresentam anotações. As predições para LaBMicrA B280 em sua maioria são de BGCs híbridos (41,02 %). Vinte e sete predições (69,23%) apresentam níveis de similaridade < 50%. Predominam BGCs tipo “non-ribosomal peptide synthetases” (NRPS) e “polyketide synthase” (PKS (I, II e III)).

Tabela 2 - BGCs de LabMicrA B280.

Região	Tipo de BGC	Início	Predições de sínteses	Similaridade
Região 1.1	RiPP-like	91,764	-	
Região 1.2	Terpeno	113,048	Geosmina	100%
Região 1.3	NI-siderophore	265,687	Enduracididina	23%
Região 2.1	transAT-PKS-like, NRPS-like, T1PKS	91,915	Cinnabaramida A	18%
Região 4.1	lassopeptide	136,663	Albusnodina	100%
Região 5.1	lanthipeptide-class-iii	123,978	-	
Região 6.1	ectoine	133,552	Ectoína	100%
Região 9.1	hglE-KS, T1PKS	41,107	Hexacosalactona A	13%
Região 9.2	T3PKS	136,937	Flaviolina/1,3,6,8-tetrahidroxinaftaleno	100%
Região 10.1	NRPS	1	Omnipeptina	15%
Região 11.1	T1PKS, NRPS, butyrolactone	1	Salinomicina	26%
Região 11.2	T2PKS, aminocoumarin	354,987	Pigmento de esporo	83%
Região 14.1	T1PKS	1	Tetronasina	3%
Região 14.2	NRP-metallophore, NRPS	97,871	Mirubactina	78%
Região 15.1	tripeptide	91,256	-	
Região 21.1	Terpene	66,259	Kitacinamicina A/Kitacinamicina B/Kitacinamicina C/Kitacinamicina D/Kitacinamicina E/Kitacinamicina F	4%
Região 22.1	NRPS, terpene	102,693	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100%

Região 22.2	terpene, thiopeptide, LAP, NI-siderophore, aminopolycarboxylic-acid	242,232	Hopene	92%
Região 26.1	NRPS, lanthipeptide-class-i, lanthipeptide-class-ii	17,16	Bleomicina	12%
Região 28.1	NRPS, NRPS-like	13,025	Napiradiomicina A80915C/napiradiomicina 2/napiradiomicina 3/napiradiomicina 4	9%
Região 33.1	butyrolactone	275,82	gaburedin A/gaburedin B/gaburedin C/gaburedin D/gaburedin E/gaburedin F	20%
Região 34.1	lanthipeptide-class-iii, butyrolactone	16,223	Hidroxistreptomicina	18%
Região 36.1	NRPS	1	WS 79089B/benaftamicina/WS 79089D/WS 79089A/WS 79089C	5%
Região 37.1	NRPS, NAPAA	3,699	Estenotricina	13%
Região 38.1	RiPP-like	6,973	Informatipeptina	28%
Região 42.1	lanthipeptide-class-iii	4,276	-	
Região 44.1	crocagin	311,613	Foxicina A/Foxicina B/Foxicina C/Foxicina	12%
Região 52.1	T1PKS, NRPS	83,281	Pentamicina	100%
Região 52.2	NRPS	270,797	Antibiótico diisonitrila SF2768	50%
Região 52.3	NRPS-like, T1PKS	317,948	Borrelidina	11%
Região 53.1	T1PKS, terpene, other, lanthipeptide-class-iv	1	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	7%
Região 53.2	terpene	105,551	Ebelactona	5%
Região 54.1	NI-siderophore	78,783	Desferrioxamina B/deferoxamina E	100%
Região 54.2	melanin	173,648	Melanina	60%
Região 55.1	NI-siderophore	63,343	Quinamicina	16%
Região 55.2	T2PKS, ectoine	163,683	Kosinostatina	47%
Região 55.3	other, T1PKS, PKS-like	257,469	Tambjamina BE-18591	21%
Região 56.1	terpene	70,53	Julicromo Q3-3/julicromo Q3-5	25%
Região 59.1	butyrolactone	1,963	-	

Foi realizada uma análise complementar de tipos e números de BGCs entre os genomas de LaBMicrA B280 e das linhagens^T que apresentaram valores de similaridade > 50% na análise filogenômica (MS3) (fig. 3). No mapa de calor, o genoma de LaBMicrA B280 apresenta menor intensidade (entre 10-15) para BGCs tipo NRPS e PKS do que *S. griseofuscus* NRRL B-5429 e *S. graminearus* JCM 6923 (entre 15-20). Entretanto, seu genoma apresenta maior



Na análise de sintenia da região 52.1 (ver material suplementar MS5 para mais resultados) (fig. 3-A), 15 genes de LaBMicra B280 e *Streptomyces* sp. S816 apresentam alta similaridade e estão relacionados com a síntese do policetídeo Pentamicina (fig. 3-B). Na análise entre os genes dos BGCs a tonalidade mais escura indica maior nível de similaridade. Na região central da sintenia, onde estão localizados os produtos gênicos PKS I, menor é a similaridade com uma escala próxima de 50%. Os 15 genes (descrição da esquerda para a

direita) estão relacionados com funções de: hidrólise de ligações tioéster (GrsT); oxidação do colesterol (Cholesterol_Oxidase); ativação transcricional (PAS/CitB); ativação transcricional (AfsR-Dnrl- RedD_regulator); transferência de elétrons (Fer_SF (3Fe4S_ferredoxin)); oxidação (CypX (Cytochrome P450)); carboxilação e redução (Crotonyl-CoA_carboxylase/reductase); síntese de policetídeos (Polyketide_synth (PksD)); e no final da sentença os produtos gênicos (circulado de vermelho) relacionados com a síntese da Pentamicina (CypX (Cytochrome P450 e Fer_SF (3Fe-S_cluster_ET)) [56]. Ainda no BGC de LaBMicrA B280 existem outros produtos gênicos, como por exemplo, sintetase peptídica não ribossômica (NRPS), entre outros, são preditos e completam sua estrutura.

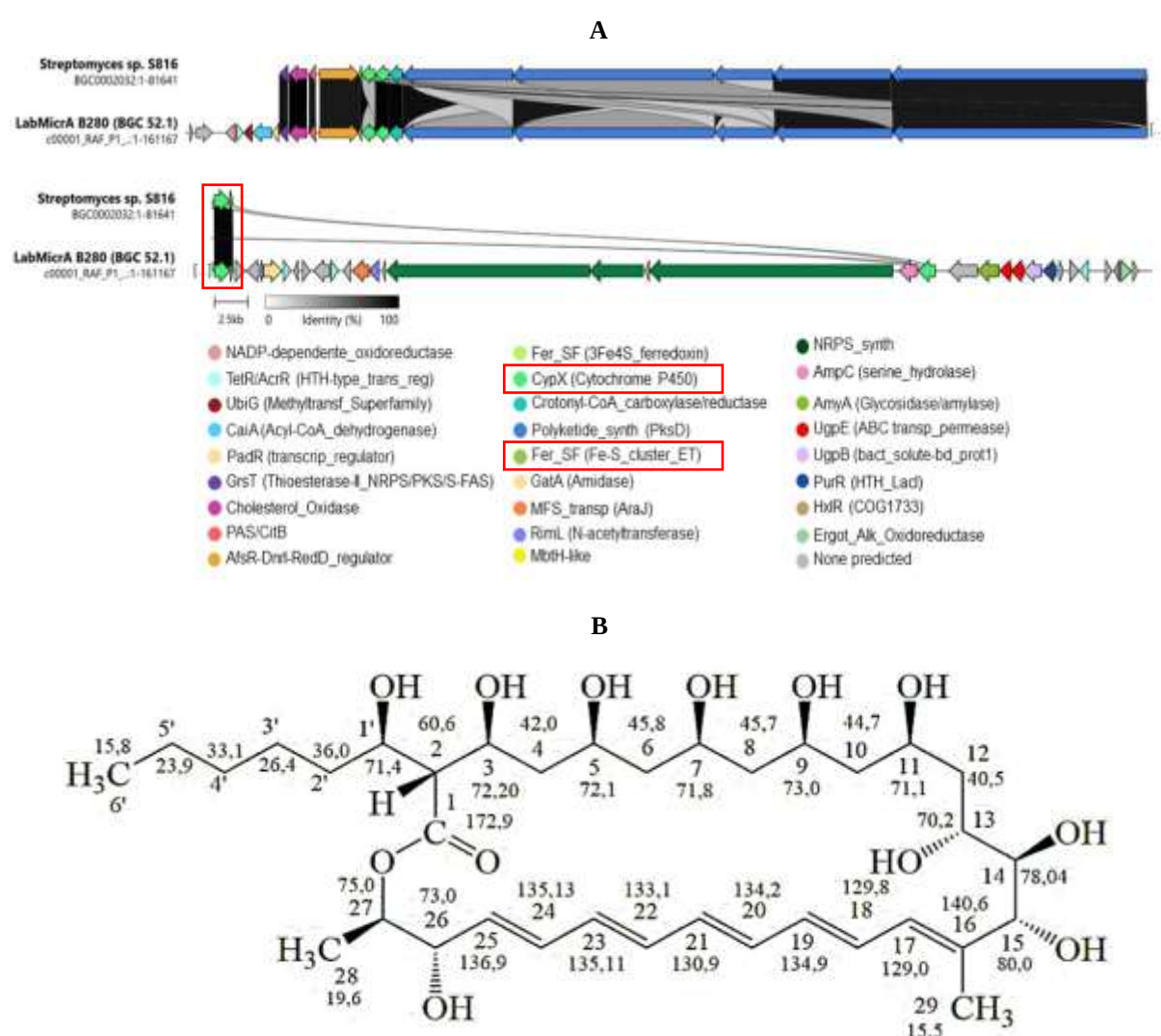


Fig. 4. Região 52.1: (A) sentença entre os genes de LaBMicrA B280 e os de *Streptomyces* sp. S816 (MIBiG-BGC0002032) relacionados com a síntese de Pentamicina. (B) Proposta química e estrutural do íon majoritário da fração FR3-B oriunda do caldo de cultivo de LabMicrA B280, que se assemelha a estrutura química da Pentamicina.

4.3.4 Atividades biológicas

Na triagem com os extratos brutos AcOEt/MeOH 1:1 (metabólitos secundários intracelulares), AcOEt/2-propanol 9:1 (metabólitos secundários extracelulares) e sobrenadante do meio de cultivo liofilizados, o extrato AcOEt/2-propanol 9:1 havia apresentado fortes atividades antifúngicas contra *Corynespora cassiicola* (ISO079), *Colletotrichum* sp. (ISO01), *C. guaranicola* (P01), *Pestalotiopsis* sp. (3002R2) e *Sclerotium coffeicola* (M01) [25]. Estas atividades concentraram-se na fração FR3 deste extrato que apresentou atividade fungicida contra todos os patógenos na concentração de 1.000 µg/mL, e uma CIM menor que a do extrato (Tabela 4). Na avaliação das atividades: citotóxica, larvicida e antiplasmodial dos extratos AcOEt/MeOH 1:1, AcOEt/2-propanol 9:1 e do meio liofilizados, novamente foram observadas efetividades no extrato AcOEt/2-propanol 9:1 e na sua fração FR3, a qual apresentou, entre as quatro frações, os melhores resultados citotóxico, larvicida e antiplasmodial (tabela 3).

Tabela 3 - Atividades biológicas da fração FR3 de LabMicrA B280.

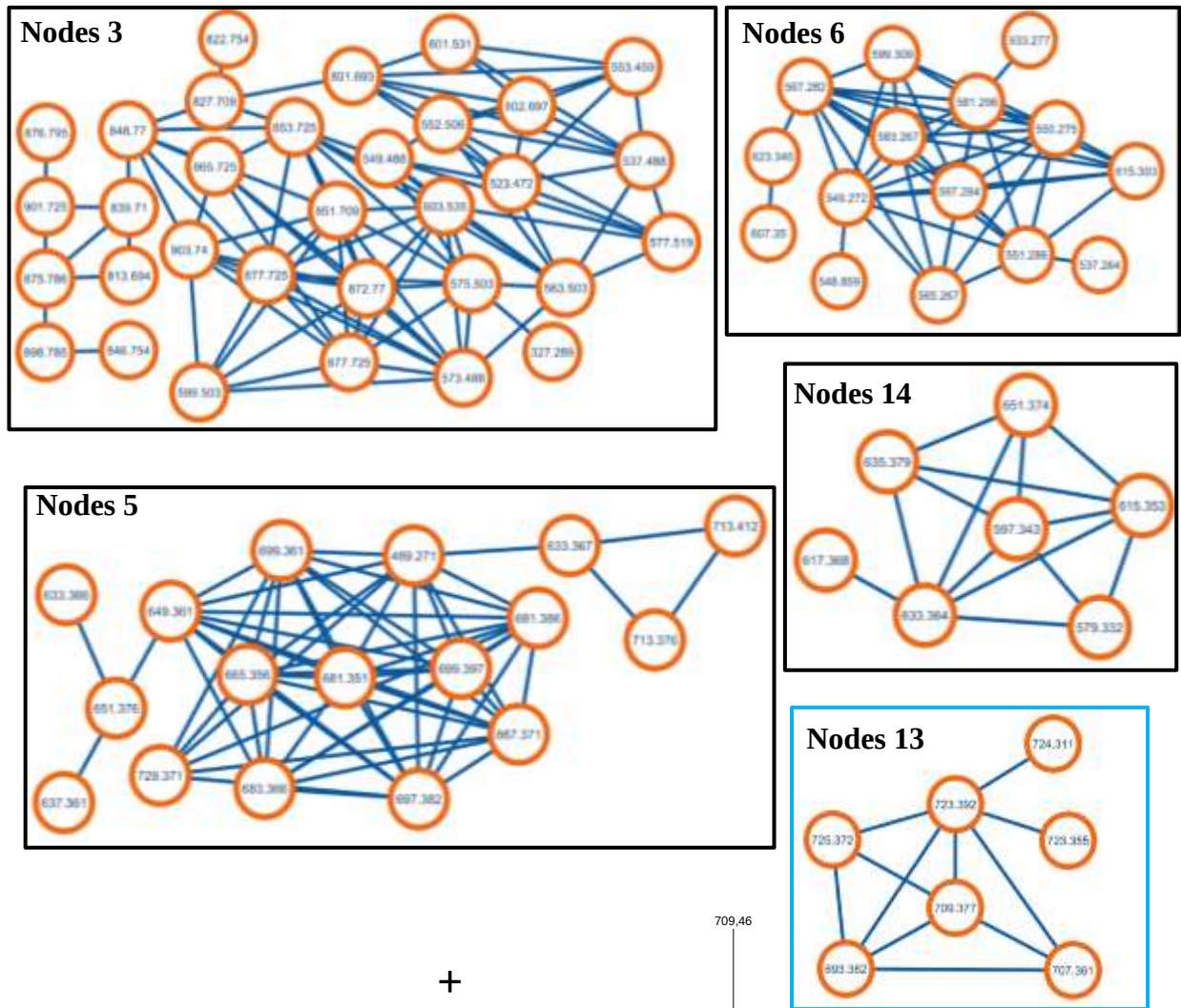
Atividades biológicas e concentrações efetivas de FR3					
Atividades antifúngicas (CIM)*					
62 µg/mL	62 µg/mL	62 µg/mL	62 µg/mL	125 µg/mL	
<i>Colletotrichum</i> sp. (ISO01)	<i>Colletotrichum guaranicola</i> (P01)	<i>Corynespora cassiicola</i> (ISO079)	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (3002R2)	<i>Sclerotium coffeicola</i> (M01)	
Atividade citotóxica contra a linhagem cancerígena do epiteloma de laringe humano (HEp-2)					
50 µg/mL	25 µg/mL		12,5 µg/mL	6,3 µg/mL	
91,45 ± 0,55	76,13 ± 0,53		37,80 ± 0,88	24,28 ± 0,88	
Atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> (FO)					
24h	48h	72h	24h	48h	72h
500 µg/mL	500 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
100 % de M**	100 %	100 %	83,3 %	100 %	100 %
Atividade antiparasitária contra <i>P. falciparum</i> (W2 e 3D7)					
50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL	6,3 µg/mL	3,12 µg/mL	1,56 µg/mL
<i>P. falciparum</i> (Cepa W2)					
91,3 % ± 0,03	37,5 % ± 0,09	23,5 % ± 0,08	11,25 % ± 0,53	3,27 % ± 0,03	2,30 % ± 0,24
<i>P. falciparum</i> (Cepa 3D7)					
61,0 % ± 0,18	11,8 % ± 0,01	5,8 % ± 0,04	3,5 % ± 0,14	0,0 %	0,00 %

Obs.: *CIM = Concentração inibitória mínima. M** = Mortalidade.

4.3.5 Molecular Networking e bioautografia

A análise no GNPS, utilizando a ferramenta “Molecular Networking”, apresentou 30 agrupamentos ou “Network Nodes”. Dentre estes, apenas 13 “Network Nodes” apresentaram anotações dentro da linha de corte estabelecida de cosseno (0,7 a 1,0). Dentre os “Network Nodes” de interesse 3, 5, 6 13 e 14, das substâncias ionizadas no modo positivo, apenas o 13 apresentou anotação manual dentro da margem de cosseno estabelecida (Fig. 5-A). Com base nos perfis de MS2 os “Network Nodes” 3, 5, 6 13 e 14 destacam-se como 5 grupos de substâncias que podem pertencer a diferentes classes de substancias. O íon em m/z 693,382 ($[M+Na]^+$), confirmado pelo íon em m/z 709,377 ($[M+K]^+$) foi identificado como Pentamicina (“Network Nodes” 13) (fig. 5-A), (“Molecular Networking” disponível em: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=65a5a15056416dbdb1eb7e7e7da227>). As análises seguiram o pipeline da plataforma para dados com aquisição em alta resolução. Na análise por bioautografia pode ser observado que a atividade da fração FR3-B, que apresenta as melhores atividades biológicas, pode ser devida à pentamicina que absorve luz UV em 365 nm (fig. 5-B).

A



B

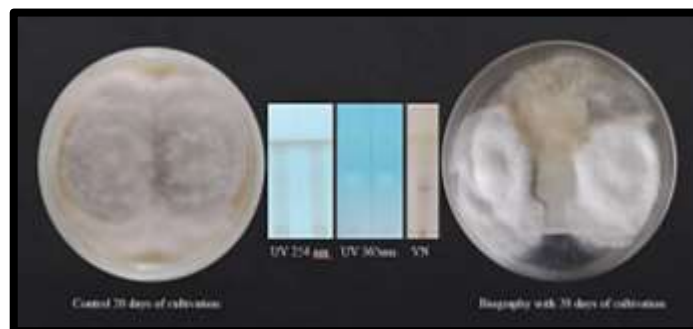
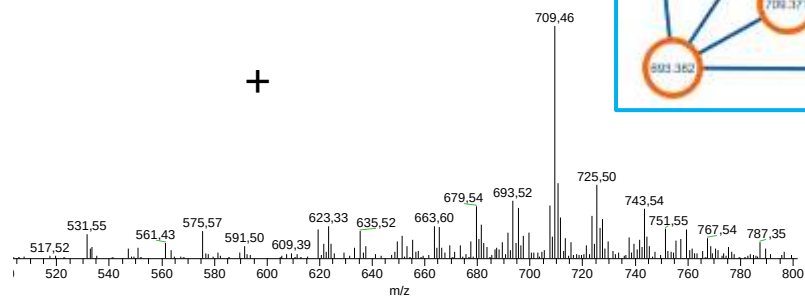


Fig. 5 - A) “Molecular Networking (GNPS)”. **B)** Análise espectrométrica da fração FR3 em ionização positiva (+). Bioautografia da atividade antifúngica da fração FR3-B. Placa de Petri à esquerda: controle; no centro: placas de CCD reveladas em UV (luz ultravioleta) e VN (vanilina); à direita: placa de Petri teste com duas placas de CCD da fração em teste, revelando atividade para um ou mais metabólitos ao centro contra o fitopatógeno (*C. cassicola* (Iso079)).

4.3.6 Caracterização estrutural do macrolídeo pentamicina

O fracionamento da fração RF3 por HPLC resultou na purificação da pentamicina (fig. 4) como um sólido amorfo de cor amarela (2,3 mg), correspondente ao pico majoritário (t_R = 7.7 min a 315 nm) (MS6). A análise desta substância por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) permitiu confirmar a sua massa e fórmula molecular, respectivamente 670,393 (calculada) u e $C_{35}H_{58}O_{12}$, através do íon em m/z 671,573 ($[M+H]^+$) (observado) 671,471 (calculado) no espectro de massas de alta resolução e 693,5 ($[M+Na]^+$) e 709,5 ($[M+K]^+$) no de baixa resolução. A identificação estrutural da amostra com a pentamicina foi constatada através dos dados de RMN 1D e 2D (MS7) e da comparação com os dados da literatura (Tabela 4) [41]. No espectro de RMN de ^1H foram observados vários sinais compatíveis com esta molécula na região de hidrogênios carbinólicos, em δ 3,1-4,0, e na região de olefinas, em δ 5,9-6,5, além de sinais de CH , CH_2 e CH_3 em δ 0,8-2,5. Também foram observados alguns sinais em δ 4,8-5,3 que apresentaram menores intensidades quando o experimento foi feito com supressão do sinal da água e também variavam ligeiramente de posição entre diferentes repetições do espectro de RMN de ^1H . No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os 35 sinais esperados para a Pentamicina, entre os quais dois sobrepostos em δ 73,0. Com o auxílio do DEPT-135 (MS7) e dos espectros de RMN 2D foi possível determinar as multiplicidades e as correlações coerentes para a estrutura desta substância. Destacamos algumas correlações, fundamentais para o posicionamento da cadeia lateral, o fechamento do anel na função éster e a interseção do seguimento de duplas ligações com o restante da estrutura. O hidrogênio H-2 em δ 2,49 (dd 8,4, 7,4) correlaciona no COSY (SM7) com os hidrogênios H-3 e H-1' e no HMBC (MS7) com os carbonos C-1, C-3, C-4, C-1' e C-2', revelando sua posição central em relação à função éster, a cadeia lateral e a parte polihidroxilada da molécula. O H-27 correlaciona pelo COSY com H-26 e H-28 e pelo HMBC com o C-1, C-25, C-26 e C28, confirmando o fechamento através do oxigênio do éster e sua proximidade ao início da sequência olefínica. No outro extremo desta sequência, os hidrogênios metílicos H-29 correlacionam pelo COSY fracamente com o H-17 e pelo HMBC com C-15, C16 e C17. Essas correlações e as do H-14 no HMBC com C-12, C-13, C-15 e C-16 e no COSY com os vizinhos H-13 e H-14, confirmam o encontro da sequência metilênica com a dos três carbonos carbinólicos vizinhos e o início da sequência de metilenos alternados com carbonos carbinólicos. Ainda foram importantes as correlações dos hidrogênios hidroxílicos desta sequência, as quais permitiram determinar a posição de cada um de seus carbonos. Por exemplo, o sinal em 4,9 do hidrogênio 1'-OH apresentou correlação com o H-1' no COSY e com os C-2,

C-1' e C-2' no HMBC. A proximidade desse hidrogênio ao 3-OH foi confirmada pela correlação espacial no NOESY, no qual foram confirmadas também as proximidades dos vizinhos sequência destes até o 11-OH. Os dados de multiplicidades e deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são semelhantes aos descritos anteriormente para a pentamicina (também conhecida como fungicromina). As diferenças dos dados da amostra em discussão com os da referência podem ser atribuídas principalmente ao efeito dos diferentes solventes utilizados (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e 2D de pentamicina e confronto com dados da literatura.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	$^1\text{H}^a$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^b$	$^{13}\text{C}^{**}$	HMBC ^c	COSY ^c	NOESY ^c
1			172,9 s	172,98			
2	2,49 dd 8,4, 7,4 1H	2,55 dd 9, 7	60,6 d	60,35	1, 3, 4, 1', 2'	3, 1'	3, 2'
3	4,02 m 1H	4,05 m	72,2 d	73,41	1, 5, 2f, 1'f	2, 4, 3-OH	2, 25, 27, 28
4	1,399 m	1,52	42,0 t	41,38	2f, 5	3, 5	
5	3,91 m 1H	4,02 m	72,1 d	74,08	nd	4, 6, 5-OH	
6	1,30 m 1,39 m	1,38 m 1,47 m	45,8 t	45,17		5	
7	3,90 m 1H	4,14 ~m ~6	71,8 d	73,92		7-OH	
8	1,33 m 1,41 m	1,33 m 1,49 m	45,7 t	45,33			
9	3,89 m 1H	4,02 ~dd ~6, ~6	73,0 d	74,20		10a/b, 9-OH	
10	1,29 1,41	1,51 m	44,7 t	44,34	9, 11, 12f 9, 11	10b 10a, 11	21
11	3,80 m 1H	3,95 m	71,1 d	71,45		12b, 10b, 11-OH	
12	1,39 1,60 ddd 14,3, 10,8, 3,9 1H	1,39 m 1,52 m	40,5 t	39,58	10, 11 10, 11	12b 11, 12a, 13	
13	3,14 d 10,5	3,30 d 11	70,2 d	70,34		12b, 13-OH, 14	12a
14	3,50 d 9,2	3,55 dd 9, 1,5	78,4 d	78,31	12, 13, 15, 16f	13, 15	
15	3,71 d 8,9 1H	3,86 d 9	80,0 d	80,43	14, 16, 17, 29	14, 15-OH, 17f	17
16			140,6 s	138,55			
17	5,96 dd 11,2, 1,0 1H	6,08 dd 11,2, 2,0	129,0 d	129,91	15, 18, 19, 29	18, 15f, 29	15, 19
18	6,48 dd 14,4, 11,4 1H	6,55 dd 14,1, 11,2	129,8 d	129,06	16, 17, 20	17, 19	29
19	6,28 m 1H	6,38 ddm 14,4, 11,4	134,9 d	135,36	17, 21	18, 20	17
20	6,35 m 1H	6,43 dd 12, 12	134,2 d	134,13	18	19	
21	6,37 m 1H	6,42 dd 12, 12	130,9 d	134,81	19	22	25
22	6,26 m 1H	6,32 m	133,1 d	133,66	20, 24	21, 23	
23	6,40 dd 14,0, 10,7 1H	6,44 dd 12, 12	135,11 d	134,21	22, 25	22, 24	
24	6,36 m 1H	6,48 dm 14,3	135,13 d	131,97	22, 26	23, 25	
25	6,06 dd 14,4, 4,2 1H	6,12 dd 14,3, 5,0	136,9 d	134,28	23, 26	24, 26	3, 21
26	4,01 m 1H	4,07 dd 6, 6	73,0 d	73,25	25, 27	25, 26-OH, 27	
27	4,65 dq 7,3, 6,4 1H	4,79 q 7, d 7	75,0 d	75,25	1, 25, 26, 28f	26, 28	3, 28
28	1,22 d 6,3 3H	1,16 d 6	19,6 q	17,96	26, 27	27	27

29	1,71 sl 3H	1,78 s	13,5 q	11,74	15, 16, 17, 19f	17
1'	3,69 m 1H	3,70 m	71,4 d	72,59		2, 1'-OH, 2'a
2'	1,28 1,38	1,35 m 1,52 m	36,0 t	36,22	4' 4'f	1'
3'	1,26 1,43 m	1,40 m 1,53 m	26,4 t	26,01		
4'	1,258	1,30 m	33,1 t	32,88	3', 5'	
5'	1,27	1,33 m	23,9 t	23,65	4', 6'	6'
6'	0,88 t 7,0 3H	0,88 t 7	15,8 q	14,38	5', 4'	5'
1'-OH	4,90 s				2, 1', 2'	1' 3-OH
3-OH	5,19 d 2,6				2, 3	3 2, 3, 4, 5-OH, 1'-OH
5-OH	5,07 s				4, 5, 6	5 4, 3-OH, 6, 7, 7-OH
7-OH	4,97 s				6, 7, 8	7 5-OH, 8, 9, 9-OH
9-OH	5,22 s				8, 9, 10	9 7-OH, 8, 9, 11-OH
11-OH	4,91 s				10f, 11, 12f	11 9-OH, 12a
13-OH	4,42 d 5,0				13f	13
14-OH	4,57 s					no
15-OH	4,85 s					15
26-OH	5,33 d 4,8				25, 26, 27	26 3

Espectros de pentamicina oriunda da linhagem *Streptomyces* sp. LabMicrA 280: ^aRMN de ¹H a 500,13, ^bRMN de ¹³C a 125,76 MHz e ^cRMN 2D em DMSO-d₆, com TMS como referência; e da linhagem *S. cellulosa* (ATCC 12625): ^{*}RMN de ¹H a 400 ou 500 MHz em 25 mol % de DMSO-d₆/ MeOH-d₄; ^{**}RMN de ¹³C a 100,6 MHz em MeOH-d₄, com o solvente em δ 49,00 como referência [41].

4.4 DISCUSSÃO

A linhagem *Streptomyces* sp. nov. LabMicrA B280 foi isolada da rizosfera de *I. edulis*, planta endêmica na Amazônia, utilizada como vetor agroecológico nos cultivos de outros vegetais de importância econômica para a região amazônica [42,43]. Em um trabalho anterior, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi observado que as estruturas micromorfológicas de LabMicrA B280 com hifas filamentosas em espirais e septadas eram típicas do gênero *Streptomyces* spp. [44,45]. Também foi observado que o gene rRNA 16S desta linhagem tinha mais de 98% de similaridade com as linhagens “Tipo” *S. graminearus* NBRC 15420 e *S. murinus* NBRC 12799 [25]. Não havendo dúvidas quanto ao gênero, restava identificar a espécie um dos motivos para o sequenciamento do genoma total no presente trabalho. A qualidade e estrutura do rascunho do genoma de LabMicrA B280 foram visualizadas na plataformas BV-BRC (3.35.5). N50 e L50 são métricas que descrevem a qualidade de um genoma e os valores apresentados para o rascunho do genoma de LabMicrA B280 indicam boa qualidade. Quando o valor de N50 for maior que o valor de L50, melhor é a

qualidade da montagem; o observável para o rascunho do genoma de LabMicrA B280 – o que permite melhor compreensão da estrutura e composição genômica de uma amostra de gDNA. Assim, com base nos valores de dDDH (d4, em %) e GGDC a linhagem LabMicrA B280 foi identificada como uma nova espécie do gênero *Streptomyces* (tabela 1) apresentando 63,6% (< 70%) de similaridade com *S. costaricanus* DSM 41827^T, atualmente reclassificada como *S. murinus* DSM 41827^T [29,46,47]. As demais métricas ANI, OrthoANI, AAI, ANIb e ANIm corroboram com este resultado, de acordo com a validação internacionalmente aceita [30-32,48,49].

Nas anotações realizada na plataforma RAST (SEED Viewer version 2.0), foram observadas 27 categorias de genes no genoma de LabMicrA B280 relacionadas com atividades importantes para o solo e vegetais (MS1). Por exemplo, a categoria “Phosphorus Metabolism” mostra que LabMicrA B280 pode ser capaz de atuar como um regulador ambiental da biodisponibilidade de Fósforo, nutriente importante para os vegetais, por ajudar no desenvolvimento das raízes e na absorção de água [1,4,50]; na categoria “Secondary Metabolism” a capacidade de sintetizar o aminoácido não proteinogênico “Lanthionine” usado na síntese de antibióticos peptídicos e antibióticos peptídicos da classe das microcins, o que confere a LabMicrA B280 capacidade de atuar como agente de biocontrole [1,4,50]; na categoria “Nitrogen Metabolism” a capacidade de metabolizar compostos nitrogenados, atividade relacionada com a biodisponibilidade de nitrogênio, indispensável para a síntese de aminoácidos [1,4,50]; e na categoria “Iron acquisition and metabolism ” a capacidade de sintetizar “Siderophores”, por exemplo “Siderophore assembly kit (26)” e “Siderophore Desferrioxamine E (6)” (ver MS1) que atuam na captação de ferro, solubilizando-o e transportando-o. Nutriente importante para os vegetais, por exemplo, porque atua na síntese de clorofila e fotossíntese, no metabolismo do nitrogênio e na respiração celular [1,4,50]. Os sideróforos ainda podem formar complexos estáveis com metais pesados (U, Np, Al, Cu, Cd, Ga, Zn e Pb) e aumentar suas concentrações solúveis [51]. Essas possíveis atividades metabólicas e outras de LabMicrA B280 são essenciais para os solos e vegetais, e a destacam como um possível agente remediador, fertilizador e de biocontrole [1,4,50].

Corroborando com os resultados descritos acima, o elevado número de grupos de genes órfãos presentes no genoma de LabMicrA B280 (69,23%) não apenas a ratificam como uma espécie nova, como revelam uma riqueza de PN desconhecida, que pode ser aproveitada por meio de metodologias atualmente disponíveis [1]. Em relação as predições com 100 % de similaridades podemos citar: a geosmina, metabolito secundário volátil responsável pelo cheiro terroso [52] e comunicação química ambiental [53]; a ectoína, um metabólito secundário que

apresenta importantes atividades biológicas, por exemplo, anticâncer [54] e é candidata a fármaco contra o mal de Alzheimer e a rinoconjuntivite [55]; a pentamicina, um antifúngico usado no tratamento de candidíase vaginal [56] e tricomoniase [57]; e as desferrioxaminas B e E, sideróforos não peptídico que atuam na quelação de ferro comumente sintetizado por espécies dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora*, atividade importante para os microrganismos e vegetais [58]. A desferrioxamina B é comercializada como Desferal e utilizada no tratamento de sobrecarga de ferro em humanos [59,60]. Mais de 50% das predições para LabMicrA B280 estão relacionadas com a capacidade de sintetizar antimicrobianos e anticânceres. Os BGCs com baixos níveis de similaridade (< 50 %) podem estar relacionados com as sínteses de antibióticos, anticânceres e sideróforos desconhecidos, entre outros PN. Entre os BGCs com baixas similaridades, dois, um com moderado nível de similaridade predito pela Region 14.2 (78%) e outro com baixo nível predito pela Region 44.1 (12%), estão relacionados com as sínteses de sideróforos tipo mirubactin e foxicin (tabela 4) – capacidade de sintetizar sideróforos predita, também, pela análise de subsistemas metabólicos no servidor RAST [61,62]. Já os BGCs preditos com similaridade < 50 % estão relacionados com as sínteses de importantes antibióticos e antitumorais. Por exemplo, de antibióticos: a Region 1.3 (23%) prediz a síntese de “enduracididine”, ativo contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)[63]; a Region 9.1 (13%) a síntese de “hexacosalactone A”, que apresenta moderada atividade contra *Proteus vulgaris* CPCC 160013 e *S. aureus* ATCC 25923, e antifúngica contra o fitopatógeno *Valsa ambiens* [64]; a Region 37.1 (13%) a síntese do antibiótico “stenothricin”, ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas que causam pneumonias e infecções no sistema urinário [65]; a Region 52.3 (11%) a síntese do macrolídeo e antifúngico “borrelidin”, que exibe forte atividade contra o fitopatógeno *Phytophthora sojae* [66] e antimalárica [67]; a Region 56.1 (25%) a síntese de antibacterianos do grupo “julichromes”, ativos contra *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*, e MRSA [68]; a Region 28.1 (9%) a síntese de “napyradiomycin”, ativo contra MRSA e *Enterococcus faecium* [69]. Os BGCs relatados a seguir estão relacionados com a síntese de antimicrobianos e anticânceres, por exemplo: a Region 2.1 (18%) [70]; Region 11.1 (26%) [71]; Region 21.1 (4 %) [72]; a Region 26.1 (12%) [73]; Region 55.1 (16%) [74]; Region 55.2 (47%) [75]; Region 55.3 (21%) [76]; Region 36.1 (5%) [77]. Os baixos níveis de similaridade para 69,23% (27) dos BGCs de LabMicrA B280 nos permite inferir que esta candidata a nova espécie pode ser fonte de PN desconhecidos; principalmente, sintetizados por BGCs dos tipos PKS e NRPS que são amplamente distribuídos entre espécies de *Streptomyces* spp. [10].

A atividade do extrato AcOEt/2-propanol 9:1 da linhagem LabMicrA B280 contra os fitopatógenos: *Colletotrichum* sp. (ISO01), *C. guaranicola* (P01), *Pestalotiopsis* sp. (3002R2), *C. cassicola* (CD: Iso079) e *S. coffeicola* (M01) [25], mostrou-se coerente com a presença da pentamicina na fração FR3 que, mais concentrada que o extrato, apresentou atividades mais fortes (CIM 62 µg/mL). Observa-se que o mesmo extrato orgânico (AcOEt/2-propanol 9:1) e a fração FR3 que contém a pentamicina apresentaram outras atividades biológicas observadas neste trabalho, inclusive a larvicida contra o *Aedes aegypti* (FO), principal vetor da dengue, febre amarela, Zika e Chikungunya, revelando o potencial desse extrato e da FR3 como mais um instrumento no controle biológico deste mosquito incidente em zonas urbanas e considerado um problema de saúde pública [78-80]. Também foi observada forte atividade antiplasmodial contra duas cepas de *P. falciparum* (W2 e 3D7), sendo a maior efetividade contra a cepa W2 (91,3 % ± 0,03) e menor contra 3D7 (61,0 % ± 0,18 %). Estes resultados quando comparados com os da literatura mostram melhores efetividades e a possibilidade, indicando que a pentamicina e possivelmente outras substâncias presentes nessas amostras, têm potencial farmacológico antimalárico [81-86]. Da mesma forma, a citotoxicidade contra a linhagem cancerígena HEP-2 nas concentrações de 50 µg/mL (91,45 ± 0,55) e 25 µg/mL (76,13 ± 0,53) revelam o potencial da pentamicina ou de outro metabólito presente na fração FR3 para o combater esta doença – melhores resultados quando comparados com os de outros estudos com espécies do gênero *Streptomyces* spp. [87,88].

Embora o macrolídeo pentamicina seja a substância majoritária da fração FR3 e o íon central no “Network Nodes” 13, a análise metabolômica direcionada apresenta outros “Nodes” (3, 5, 6, 14) com íons sem análogos na plataforma GNPS, revelando a possibilidade de substâncias desconhecidas na fração FR3 [89] relacionadas com as atividades biológicas relatadas neste estudo – o que corrobora com os resultados da mineração genômica. Os macrolídeos são uma importante classe de PN de interesses medicinal e agroindustrial que apresentam diversas atividades biológicas (antimicrobianas, anticancer, entre outras) e são sintetizados por linhagens de actinobactérias isoladas de diversos ecossistemas [90-93]. Um dos principais fatores negativos para essa classe é alta instabilidade química para algumas substâncias, as inviabilizando para usos clínicos, como por exemplos a pentamicina. Entretanto, a caracterização de BGCs de interesses biotecnológicos têm aberto caminhos para a síntese de análogos de macrolídeos, que apresentam alta instabilidade química, por meio da engenharia biossintética. Por exemplo, Payero et al. [94] em seu trabalho relata que a exclusão de genes que codificam CYPs, responsáveis pela hidroxilação de C-26 (FilC) e C-1' (FilD) na biossíntese de filipina III, leva à produção de análogos com atividade antifúngica mais fortes. O que poderia

ser usado para avaliar se análogos da pentamicina desenvolveriam melhores atividades e estabilidade química visando o uso clínico [56]. A pentamicina é um antifúngico de interesse agrícola porque apresenta atividades contra importantes fitopatógenos, por exemplo, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* e *Pseudoperonospora cubensis* [95]. E em nosso estudo há a possibilidade deste espectro ser aumentando com os resultados apresentados para outros gêneros de fitopatógenos. Em seu estudo Wan et al. [96] destaca seus esforços para aumentarem a síntese do macrolídeo fungichromin (pentamicina) por *Streptomyces* sp. WP-1. Ao ativarem a superexpressão dos reguladores *ptnF* (PAS-CitB) e *ptnR* (AfsR-Dnrl-RedD_regulador), e de *ptnB* (crotonyl-CoA reductase/carboxylase) o rendimento de fungichromin aumentou significativamente para 8,5 g/L. A síntese do macrolídeo pentamicina depende do gene *ptnJ* (CypX (Cytochrome P450), que codifica um CYP P450 capaz de converter filipina III em pentamicina adicionado um grupo hidroxila em C-14 [56]. A análise por bioautografia da fração FR3 configura com as atividades antifúngicas relatada na literatura para a pentamicina. Pelo menos duas manchas podem ser observadas na região da CCD que inibiu o crescimento do patógeno. Contudo, a pentamicina (ou fungicromina) [41,97], dados os relatos como potente antifúngico [56] e antiparasitário [57], é o principal candidato a justificar as atividades observadas para a fração FR3. Naturalmente, será necessário investigar, em novos estudos, se esta substância está relacionada de fato com tais atividades ou outras presentes na fração FR3. Essa riqueza, a princípio, desconhecida apresentada no genoma e no metabolismo secundário de LabMicrA B280, corrobora com a grandiosidade da floresta Amazônica, região superestimada em relação ao potencial biotecnológico dos seus recursos genéticos microbianos.

4.5 CONCLUSÃO

Neste estudo relatamos a linhagem *Streptomyces* sp. nov. LabMicrA B280, obtida da rizosfera de *I. edulis*, como uma nova espécie. As análises do seu genoma mostram vários BGCs relacionados com a síntese de metabólitos, com princípios ativos conhecidos ou não, além da possibilidade de inúmeros metabólitos a serem determinados se são inéditos ou não. As análises de subsistemas metabólicos mostram o potencial da linhagem *Streptomyces* sp. nov. LabMicrA B280 desempenhar importantes atividades ambientais de interesse agrícola. Os ensaios biológicos dos extratos e frações também revelam a linhagem LabMicrA B280 como uma promissora produtora de princípios ativos com fortes atividades antimalárica, larvicida, citotóxica e antifúngica. A pentamicina, íon majoritário da fração que apresentou os melhores resultados, ainda deve ser comprovada se é a substância responsável pelas atividades relatadas

ou se essas atividades devem ser atribuídas a outras substâncias presentes nas amostras bioativas analisadas.

Disponibilidade de dados e materiais

Os dados constam do artigo ou Supplementary Material (SM).

Contribuições do autor

RSR: desenvolvimento do projeto e preparação do manuscrito; KRPF: produção de extratos; FMAS: análises de RMN; RPS: análises de mineração genômica e sintenia; FCSN e GRAC: análises cromatográfica e espectrométrica; RMK: ensaio larvicida; ISB e PPO: ensaios antiparasitários e citotóxico; GFS: metodologia, identificação molecular, análises genômicas e suporte técnico; AQLS e ADLS: suporte técnico, metodologia, supervisão e preparação do manuscrito.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Amazônia (PPG-Bionorte) pelo apoio e a Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas & Maria Deane – Manaus/AM. Os autores também agradecem à FAPEAM pela bolsa de doutorado concedida a Rafael de Souza Rodrigues e à bolsa de produtividade concedida ao GFS, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de pesquisa concedida à ADLS.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) através da chamada 007/2021 - Programa Biodiversa, chamada 010/2021- Áreas Prioritárias, e projetos POSGRAD 2021/2022 e 2022/2023, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Códigos Financeiros 001 e 88881.200469/2018-01 - Procad AmazonMicro).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

5. DISCUSSÃO INTEGRADORA

Neste trabalho, foram apresentados três capítulos relacionados à diversidade e ao potencial biotecnológico de actinomicetos associados à rizosfera de três indivíduos de *Inga edulis* presentes no campus universitário da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Para a melhor compreensão do trabalho desenvolvido no contexto mundial mais recente, no primeiro capítulo é apresentado um breve levantamento bibliográfico que utilizou 246 referências e resultou na elaboração de um artigo de revisão, apresentando importantes e diversificados estudos sobre os actinomicetos no contexto de seu espectro biotecnológico no século XXI. De forma resumida, apresenta-se um panorama da importância deste grupo de microrganismos como o principal responsável pela síntese dos antibióticos mais importantes para a medicina desde o início da antibioterapia. Também fica evidente a versatilidade biotecnológica deste grupo de bactérias filamentosas para a produção de outros importantes metabólitos, tais como: anticânceres, anti-inflamatórios e antiglicantes, entres outros. A partir do conhecimento de suas funções ecológicas, por exemplo: agentes de biocontrole de fitopragas, fertilizadores e biorremediadores, métodos ecológicos e sustentáveis vêm sendo desenvolvidos para serem aplicados pelas indústrias agrícolas. Estes atributos biotecnológicos descritos em vários estudos têm sido os principais estimuladores para as realizações de prospecções em vários ecossistemas ainda pouco explorados. No presente estudo, o fragmento supracitado é parte da floresta amazônica, um bioma cuja diversidade e potencial biotecnológico de actinomicetos são praticamente desconhecidos.

Referente ao desenvolvimento experimental, os principais resultados foram objetos de dois manuscritos, um submetido e outro a submeter em breve. O primeiro manuscrito consta no capítulo 2, onde relatamos a realização de prospecções nos solos rizosféricos de três indivíduos de *I. edulis*, leguminosa endêmica na floresta amazônica, presentes no Campus da UFAM. Obtivemos um total de 64 linhagens isoladas, dentre as quais vinte foram selecionadas para estudos e se destacaram como fontes de possíveis substâncias antifúngicas. Esta pequena amostra da biodiversidade microbiana do Campus da UFAM nos apresenta um potencial biotecnológico interessante, a julgar pelas atividades biológicas observadas, havendo ainda muito a ser conhecido e compreendido. Neste primeiro momento, as atividades contra importantes fungos fitopatógenos nos leva a inferir que estas linhagens são importantes candidatas a agentes de biocontrole em modelos agrícolas ecologicamente mais sustentáveis. Como a identificação das linhagens selecionadas foi feita preliminarmente apenas por aspectos não determinantes de espécies, inclusive pelo estudo da região 16S do rRNA, não tendo sido

realizada pelo padrão ouro ou Hibridização DNA-DNA, nesta primeira abordagem não foi possível determinar para neste grupo de actinomicetos a diversidade de espécies e a ocorrência de espécies novas. Nesta perspectiva, uma destas foi selecionada para estudos mais avançados de identificação por DNA, novas atividades biológicas e identificação de seus metabólitos, resultando no capítulo três. Esta linhagem, LabMicrA B280, já havia se destacado em relação às demais por apresentar atividade antifúngica contra todos os fitopatógenos ensaiados. No novo estudo, ela se destaca como uma fonte promissora de produtos naturais devido seu espectro biotecnológico de atividades antifúngicas, citotóxica, antiparasitária e larvicida. Os estudos do DNA da linhagem LabMicrA B280 a revelou como uma espécie nova e a presença de grupos gênicos de várias substâncias conhecidas e de um número maior de substâncias a serem determinadas podendo ser inéditas ou não. Uma das substâncias conhecidas cujos agrupamentos gênicos foram determinados nessa linhagem, a pentamicina, foi isolada. A pentamicina é um raro antifúngico da classe dos macrolídeos, comercializado como creme vaginal por sua forte ação anticândida. Os resultados apresentados neste trabalho revelam, portanto, um potencial biotecnológico a ser explorado para os actinomicetos da rizosfera de *I. edulis* e se alinham com as perspectivas sobre a riqueza que Amazônia detém. A considerar apenas as vinte linhagens estudadas na presente tese, todas têm potencial biotecnológico pelo menos como produtoras de substâncias antifúngicas para dois fitopatógenos, o que deve ser constatado através de estudos que visem a descoberta de novos produtos naturais.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Neste inédito estudo, apresentamos uma pequena amostra do potencial biotecnológico de actinobactérias isoladas de solos rizosféricos na UFAM. No primeiro capítulo, apresentamos uma revisão que destaca o potencial biotecnológico destas bactérias no século XXI. Nesta revisão, destacamos o diversificado espectro biotecnológico desses prolíferos produtores de produtos naturais que vai desde a síntese de potentes antimicrobianos a antiglicantes, como também importantes recursos ecológicos e agroecológicos. Ela teve por objetivo chamar a atenção para os importantes resultados de vários estudos que apresentam inúmeras substâncias candidatas a recursos medicinais e agrícolas, entre outros. No capítulo dois apresentamos vinte linhagens selecionadas dentre 64 isoladas que se destacam como fontes de substâncias antifúngicas e algumas como possíveis espécies novas. Este achado sugere que as rizosferas de *I. edulis*, leguminosa endêmica no Campus da UFAM, podem conter uma diversidade microbiana, com predominância do gênero *Streptomyces* e linhagens de gêneros raros (por exemplos *Kitasatospora*), bactérias cujo potencial biotecnológico também se projeta promissor. Assim, todas as vinte linhagens estudadas preliminarmente apresentaram atividades antifúngicas contra pelo menos dois dos cinco fitopatógenos ensaiados e esse pretendo potencial biotecnológico foi ratificado na linhagem LabMicrA B280, a qual se revelou como uma nova espécie, fonte de substâncias com atividades antifúngica, antiparasitária, citotóxica e larvicida. As análises do genoma desta linhagem revelaram ainda uma riqueza de produtos naturais desconhecida a ser exploradas. O BGC responsável pela síntese do antifúngico pentamicina foi confirmado pelo isolamento deste metabólito do extrato do meio cultivado da linhagem LabMicrA B280. A presença da pentamicina nas amostras que apresentaram as atividades ensaiadas indica que esta substância tem um espectro ampliado de ação para além das conhecidas atividades antifúngicas, fato a ser investigado.

REFERÊNCIAS

Capítulo 1

- [1] OKEKE, I.N.; LAMIKANRA, A.; EDELMAN, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 18, 1999. <https://doi.org/10.3201/eid0501.990103>
- [2] MURRAY, C.J.; IKUTA, K.S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; AGUILAR, G.R.; GRAY, A.; *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- [3] RAYMAEKERS, K.; PONET, L.; HOLTAPPELS, D.; BERCKMANS, B.; CAMMUE, B.P. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- [4] WORLD HEALTH ORGANIZATION STATISTICS 2016: monitoring health for the SDGs sustainable development goals. ([https://www.who.int/data/gho/data/themes/antimicrobial-resistance-\(amr\)](https://www.who.int/data/gho/data/themes/antimicrobial-resistance-(amr)) accessed 15 May 2022).
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2022. Global values are median of country figures and are not population weighted averages. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). Geneva. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf> accessed 28 May 2022).
- [6] WRIGHT, P.M.; SEIPLE, I.B.; MYERS, A.G. The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 34, p. 8840-8869, 2014. <https://doi.org/10.1002/anie.201310843>
- [7] HOQUE, M.N.; JAHAN, M.I.; HOSSAIN, M.A.; SULTANA, M. Genomic diversity and molecular epidemiology of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* DMC30b isolated from a hospitalized burn patient in Bangladesh. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 31, p. 110-118, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.08.023>
- [8] VAN DER MEIJ, A.; WORSLEY, S.F.; HUTCHINGS, M.I.; VAN WEZEL, G.P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 392-416, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fox005>
- [9] OLIVEIRA, J.; ALMEIDA, P.L.; SOBRAL, R.G.; LOURENÇO, N.D.; GAUDÊNCIO, S.P. Marine-Derived Actinomycetes: Biodegradation of Plastics and Formation of PHA Bioplastics—A Circular Bioeconomy Approach. **Marine Drugs**, v. 20, n. 12, p. 760, 2022. <https://doi.org/10.3390/md20120760>
- [10] AZMAN, A.S.; OTHMAN, I.; VELU, S.S.; CHAN, K. G.; LEE, L.H. Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 856, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00856>

- [11] MAHAJAN, G.B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 4, n. 1, p. 240-253, 2012.
- [12] PEREIRA, F.; ALMEIDA, J.R.; PAULINO, M.; GRILO, I.R.; MACEDO, H.; CUNHA, I.; *et al.* Antifouling napyradiomycins from marine-derived actinomycetes *Streptomyces aculeolatus*. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 63, 2020. <https://doi.org/10.3390/md18010063>
- [13] DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R.A.; TAUF, T. *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>
- [14] SCHATZ, A.; BUGLE, E.; WAKSMAN, A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 55, n. 1, p. 66-69, 1944. <https://doi.org/10.3181/00379727-55-14461>
- [15] WAKSMAN, A.; WOODRUFF, H.B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 581-600, 1940.
- [16] WOODRUFF, H.B. Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 1, p. 2-8, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.01143-13>
- [17] KEKUDA, T.R.P.; SHOBHA, K.S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p. 250-256, 2010.
- [18] LACEY, H.J.; RUTLEDGE, P.J. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 887, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>
- [19] QUINN, G.A.; BANAT, A.M.; ABDELHAMEED, A.M.; BANAT, I.M. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of medical microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040-1048, 2020. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- [20] WANG, K.; KE, S.; FANG, W.; WU, Z.; ZHANG, Y. Novel agroactive secondary metabolites from actinomycetes in the past two decades with focus on screening strategies and discovery. **Natural Products from Actinomycetes: Diversity, Ecology and Drug Discovery**, p. 199-221, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_9
- [21] YAN, S.; ZENG, M.; WANG, H.; ZHANG, H. *Micromonospora*: A prolific source of bioactive secondary metabolites with therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 13, p. 8735-8771, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00626>
- [22] AL-ANSARI, M.; KALAIYARASI, M.; ALMALKI, M.A.; VIJAYARAGHAVAN, P. Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 3, p. 1993-1998, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.005>

- [23] JANARDHAN, A.; KUMAR, A. P.; VISWANATH, B.; SAIGOPAL, D. V. R.; NARASIMHA, G. Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties. **Biotechnology research international**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/217030>
- [24] KOKKINI, M.; GONZÁLEZ HEREDIA, C.; OVES-COSTALES, D.; DE LA CRUZ, M.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍN, J.; *et al.* Exploring micromonospora as phocoenamicins producers. **Marine Drugs**, v. 20, n. 12, p. 769, 2022. <https://doi.org/10.3390/md20120769>
- [25] NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S. Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants. **Letters in applied microbiology**, v. 64, n. 4, p. 261-270, 2017. <https://doi.org/10.1111/lam.12718>
- [26] VAN BERGEIJK, D.A.; TERLOUW, B.R.; MEDEMA, M.H.; VAN WEZEL, G.P. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 546-558, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- [27] AKSHATHA, V.J.; NALINI, M.S.; D'SOUZA, C.; PRAKASH, H.S. *Streptomyces endophytes* from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. **Letters in applied microbiology**, v. 58, n. 5, p. 433-439, 2014. <https://doi.org/10.1111/lam.12209>
- [28] MARTINET, L.; NAÔMÉ, A.; DEFLANDRE, B.; MACIEJEWSKA, M.; TELLATIN, D.; TENCONI, E.; *et al.* A single biosynthetic gene cluster is responsible for the production of bagremycin antibiotics and ferroverdin iron chelators. **MBio**, v. 10, n. 4, p. 10.1128/mbio.01230-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/mbio.01230-19>
- [29] CHALLIS, G.L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1555-1569, 2008. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018523-0>
- [30] CHALLIS, G.L. Exploitation of the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) genome sequence for discovery of new natural products and biosynthetic pathways. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 219-232, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1383-2>
- [31] ATANASOV, A.G.; ZOTCHEV, S.B.; DIRSCH, V.M.; SUPURAN, C.T. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
- [32] BASKIYAR, S.; REN, C.; HECK, K.L.; HALL, A.M.; GULFAM, M.; PACKER, S.; *et al.* Bioactive natural products identification using automation of molecular networking software. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 24, p. 6378-6385, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00307>
- [33] XU, S.; WANG, J.J.; WEI, Y.; DENG, W.W.; WAN, X.; BAO, G.H.; *et al.* Metabolomics based on UHPLC-Orbitrap-MS and global natural product social molecular networking reveals effects of time scale and environment of storage on the metabolites and taste quality of raw Pu-erh tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 43, p. 12084-12093, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05314>

- [34] WANG, M.; CARVER, J.J.; PHELAN, V.V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- [35] CAI, C.; LIN, H.; WANG, H.; XU, Y.; OUYANG, Q.; LAI, L.; PEI, J. miDruglikeness: subdivisional drug-likeness prediction models using active ensemble learning strategies. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, p. 29, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom13010029>
- [36] GUAN L.; YANG H.; CAI Y.; SUN L.; DI P.; LI W.; TANG Y. ADMET-score—a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm**, v. 10, n. 1, p. 148-157, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8MD00472B>
- [37] OUYANG Y.; HUANG J.J.; WANG Y.L.; ZHONG H.; SONG B.A.; HAO G.F. *In silico* resources of drug-likeness as a mirror: what are we lacking in pesticide-likeness?. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 37, p. 10761-10773, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01460>
- [38] DJEBAILI, R.; PELLEGRINI, M.; ERCOLE, C.; FARDA, B.; KITOUNI, M.; DEL GALLO, M. Biocontrol of soil-borne pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by plant growth-promoting actinomycetes: In vitro and in planta antagonistic activity. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1305, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101305>
- [39] BENTLEY, S.D.; CHATER, K.F.; CERDEÑO-TÁRRAGA, A.M.; CHALLIS, G.L.; THOMSON, N.R.; JAMES, K. D.; *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 141-147, 2002. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- [40] RUTLEDGE, P.J.; CHALLIS, G.L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 8, p. 509-523, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>
- [41] JAVED, Z.; TRIPATHI, G.D.; MISHRA, M.; DASHORA, K. Actinomycetes—the microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101893, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101893>
- [42] LUGTENBERG, B. Principles of plant-microbe interactions. **Springer International Pu**, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_3
- [43] UJVÁRY, I. Pest control agents from natural products. In: Hayes' handbook of pesticide toxicology. **Academic Press**, p. 119-229, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3>
- [44] VAN DER MEIJ, A.; WILLEMSE, J.; SCHNEIJDERBERG, M.A.; GEURTS, R.; RAAIJMAKERS, J.M.; VAN WEZEL, G.P. Inter-and intracellular colonization of Arabidopsis roots by endophytic actinobacteria and the impact of plant hormones on their antimicrobial activity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 679-690, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1014-z>

- [45] MATARRITA-CARRANZA, B.; MOREIRA-SOTO, R.D.; MURILLO-CRUZ, C.; MORA, M.; CURRIE, C.R.; PINTO-TOMAS, A.A. Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 292779, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02016>
- [46] ADAMS, A.S.; ADAMS, S.M.; CURRIE, C.R.; GILLETTE, N.E.; RAFFA, K.F. Geographic variation in bacterial communities associated with the red turpentine beetle (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental entomology**, v. 39, n. 2, p. 406-414, 2010. <https://doi.org/10.1603/EN09221>
- [47] HANSHEW, A.S.; MCDONALD, B.R.; DÍAZ DÍAZ, C.; DJIÉTO-LORDON, C.; BLATRIX, R.; CURRIE, C. R. Characterization of actinobacteria associated with three ant-plant mutualisms. **Microbial ecology**, v. 69, p. 192-203, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0469-3>
- [48] HUANG, H.; REN, L.; LI, H.; SCHMIDT, A.; GERSHENZON, J.; LU, Y.; CHENG, D. The nesting preference of an invasive ant is associated with the cues produced by actinobacteria in soil. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 9, p. e1008800, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008800>
- [49] BALSUS, E.P. Sponge symbionts play defense. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 8, p. 611-612, 2014. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1588>
- [50] CHENG, C.; MACINTYRE, L.; ABDELMOHSEN, U. R.; HORN, H.; POLYMENAKOU, P. N.; EDRADA-EBEL, R.; HENTSCHEL, U. Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0138528, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138528>
- [51] NAGARAJAN, M.; RAJESH, K.R.; MEENAKSHI, S.K.; SUNDARARAMAN, M. Marine biotechnology: Potentials of marine microbes and algae with reference to pharmacological and commercial values. **Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology**, p. 685-723, 2015. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_35
- [52] SANTOS, O.C.S.; SOARES, A.R.; MACHADO, F.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DE MARVAL, M.; *et al.* Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. **Letters in applied microbiology**, v. 60, n. 2, p. 140-147, 2015. <https://doi.org/10.1111/lam.12347>
- [53] HEMMERLING, F.; PIEL, J. Strategies to access biosynthetic novelty in bacterial genomes for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 21, n. 5, p. 359-378, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00414-6>
- [54] MORAN, M.A.; RUTHERFORD, L.T.; HODSON, R.E. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3695-3700, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3695-3700.1995>

- [55] TENEBRO, C. P.; TRONO, D. J. V. L.; VICERA, C. V. B.; SABIDO, E. M.; YSULAT JR, J. A.; MACASPAC, A. J. M.; DALISAY, D. S. Multiple strain analysis of *Streptomyces* species from Philippine marine sediments reveals intraspecies heterogeneity in antibiotic activities. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 17544, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96886-4>
- [56] WILSON, G.C.; BUSHELL, M.E. The induction of antibiotic synthesis in *Saccharopolyspora erythraea* and *Streptomyces hygroscopicus* by growth rate decrease is accompanied by a down-regulation of protein synthesis rate. **FEMS microbiology letters**, v. 129, n. 1, p. 89-96, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07562.x>
- [57] TANAKA, Y.; IZAWA, M.; HIRAGA, Y.; MISAKI, Y.; WATANABE, T.; OCHI, K. Metabolic perturbation to enhance polyketide and nonribosomal peptide antibiotic production using triclosan and ribosome-targeting drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 4417-4431, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8216-6>
- [58] MITOVA, M.I. LANG, G.; WIESE, J.; IMHOFF, J.F. Subinhibitory concentrations of antibiotics induce phenazine production in a marine *Streptomyces* sp. **Journal of natural products**, v. 71, n. 5, p. 824-827, 2008. <https://doi.org/10.1021/np800032a>
- [59] MOHAMMADIPANAH, F.; KERMANI, F.; SALIMI, F. Awakening the secondary metabolite pathways of *Promicromonospora kermanensis* using physicochemical and biological elicitors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 1224-1237, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03361-3>
- [60] WANG, C.; WANG, J.; YUAN, J.; JIANG, L.; JIANG, X.; YANG, B.; HUANG, D. Generation of *Streptomyces hygroscopicus* cell factories with enhanced ascomycin production by combined elicitation and pathway-engineering strategies. **Biotechnology and bioengineering**, v. 116, n. 12, p. 3382-3395, 2019. <https://doi.org/10.1002/bit.27158>
- [61] INDUJA, D.K.; JESMINA, A.R.S.; JOSEPH, M.M.; SHAMJITH, S.; INGALADAL, N.; MAITI, K.K.; *et al.* Isolation of two new stereochemical variants of streptophenazine by cocultivation of *Streptomyces* NIIST-D31, *Streptomyces* NIIST-D47, and *Streptomyces* NIIST-D63 strains in 3 C 2 combinations. **The Journal of Antibiotics**, v. 76, n. 10, p. 567-578, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00638-7>
- [62] JONES, S.E.; HO, L.; REES, C.A.; HILL, J.E.; NODWELL, J.R.; ELLIOT, M.A. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. **Elife**, v. 6, p. e21738, 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.21738>
- [63] ZONG, G.; FU, J.; ZHANG, P.; ZHANG, W.; XU, Y.; CAO, G; *et al.* Use of elicitors to enhance or activate the antibiotic production in *Streptomyces*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1260-1283, 2022. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1987856>
- [64] CRANEY, A.; AHMED, S.; NODWELL, J. Towards a new science of secondary metabolism. **The Journal of antibiotics**, v. 66, n. 7, p. 387-400, 2013. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.25>

- [65] BELKNAP, K.C.; PARK, C.J.; BARTH, B.M.; ANDAM, C.P. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2003, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58904-9>
- [66] ZIEMERT, N.; LECHNER, A.; WIETZ, M.; MILLÁN-AGUIÑAGA, N.; CHAVARRIA, K.L.; JENSEN, P.R. Diversity and evolution of secondary metabolism in the marine actinomycete genus *Salinispora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 12, p. E1130-E1139, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.132416111>
- [67] ADAMEK, M.; ALANJARY, M.; SALES-ORTELLS, H.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T.; WINKLER, A.; ZIEMERT, N. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. **BMC genomics**, v. 19, p. 1-15, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4809-4>
- [68] CHENG, Z.; ZHANG, Q.; PENG, J.; ZHAO, X.; MA, L.; ZHANG, C.; *et al.* Genomics-driven discovery of benzoxazole alkaloids from the marine-derived *Micromonospora* sp. SCSIO 07395. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 821, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28020821>
- [69] GOHAIN, A.; GOGOI, A.; DEBNATH, R.; YADAV, A.; SINGH, B.P.; GUPTA, V.K.; *et al.* Antimicrobial biosynthetic potential and genetic diversity of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 19, p. fnv158, 2015. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv158>
- [70] MOON, K.; XU, F.; ZHANG, C.; SEYEDSAYAMDOST, M.R. Bioactivity-HiTES unveils cryptic antibiotics encoded in actinomycete bacteria. **ACS chemical biology**, v. 14, n. 4, p. 767-774, 2019. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00049>
- [71] QIAN, Z.; BRUHN, T.; D'AGOSTINO, P.M.; HERRMANN, A.; HASLBECK, M.; ANTAL, N.; *et al.* Discovery of the streptoketides by direct cloning and rapid heterologous expression of a cryptic PKS II gene cluster from *Streptomyces* sp. Tu 6314. **The Journal of organic chemistry**, v. 85, n. 2, p. 664-673, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b02741>
- [72] XU, F.; NAZARI, B.; MOON, K.; BUSHIN, L.B.; SEYEDSAYAMDOST, M.R. Discovery of a cryptic antifungal compound from *Streptomyces albus* J1074 using high-throughput elicitor screens. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 27, p. 9203-9212, 2017. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02716>
- [73] DE SIMEIS, D.; SERRA, S. Actinomycetes: A never-ending source of bioactive compounds—An overview on antibiotics production. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 483, 2021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050483>
- [74] GOMEZ-ESCRIBANO, J.P.; HOLMES, N.A.; SCHLIMPERT, S.; BIBB, M.J.; CHANDRA, G.; WILKINSON, B.; BIBB, M.J. *Streptomyces venezuelae* NRRL B-65442: genome sequence of a model strain used to study morphological differentiation in filamentous actinobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 9-10, p. kuab035, 2021. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab035>
- [75] GONG, R.; YU, L.; QIN, Y.; PRICE, N.P.; HE, X.; DENG, Z.; *et al.* Harnessing synthetic biology-based strategies for engineered biosynthesis of nucleoside natural products in actinobacteria. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107673, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107673>

- [76] JIANG, Y.J.; ZHANG, D.S.; ZHANG, H.J.; LI, J.Q.; DING, W.J.; XU, C.D.; *et al.* Medermycin-type naphthoquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. XMA39. **Journal of natural products**, v. 81, n. 9, p. 2120-2124, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00544>
- [77] LI, L.; MACLINTYRE, L.W.; BRADY, S.F. Refactoring biosynthetic gene clusters for heterologous production of microbial natural products. **Current opinion in biotechnology**, v. 69, p. 145-152, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.011>
- [78] WU, P.; CHEN, K.; LI, B.; ZHANG, Y.; WU, H.; CHEN, Y.; *et al.* Polyketide starter and extender units serve as regulatory ligands to coordinate the biosynthesis of antibiotics in actinomycetes. **Mbio**, v. 12, n. 5, p. 10.1128/mbio.02298-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/mBio.02298-21>
- [79] ZHANG, M.; KONG, L.; GONG, R.; IORIO, M.; DONADIO, S.; DENG, Z.; *et al.* Biosynthesis of C-nucleoside antibiotics in actinobacteria: recent advances and future developments. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 2, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01722-z>
- [80] LE LOARER, A.; MARCELLIN-GROS, R.; DUFOSSÉ, L.; BIGNON, J.; FRÉDÉRICH, M.; LEDOUX, A.; *et al.* Prioritization of microorganisms isolated from the Indian ocean sponge *Scopalina hapalia* based on metabolomic diversity and biological activity for the discovery of natural products. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 697, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030697>
- [81] KANG, S.; HAN, J.; JANG, S.C.; AN, J.S.; KANG, I.; KWON, Y.; *et al.* Epoxinnamide: An Epoxy Cinnamoyl-Containing Nonribosomal Peptide from an Intertidal Mudflat-Derived *Streptomyces* sp. **Marine Drugs**, v. 20, n. 7, p. 455, 2022. <https://doi.org/10.3390/md20070455>
- [82] SHIN, D.; BYUN, W.S.; MOON, K.; KWON, Y.; BAE, M.; UM, S.; *et al.* Coculture of marine *Streptomyces* sp. with *Bacillus* sp. produces a new piperazic acid-bearing cyclic peptide. **Frontiers in chemistry**, v. 6, p. 498, 2018. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00498>
- [83] CUI, J.; KIM, E.; MOON, D.H.; KIM, T.H.; KANG, I.; LIM, Y.; *et al.* Taeanamides A and B, Nonribosomal Lipo-Decapeptides Isolated from an Intertidal-Mudflat-Derived *Streptomyces* sp. **Marine Drugs**, v. 20, n. 6, p. 400, 2022. <https://doi.org/10.3390/md20060400>
- [84] SEO, J.; SHIN, Y.H.; JO, S.J.; DU, Y.E.; UM, S.; KIM, Y.R.; *et al.* Cystargamides C and D, new cyclic lipopeptides from a tidal mudflat-derived streptomyces sp. JMS132. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 904954, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.904954>
- [85] LIU, H.; AN, M.; SI, H.; SHAN, Y.; XU, C.; HU, G.; *et al.* Identification of Cyclic Dipeptides and a New Compound (6-(5-Hydroxy-6-methylheptyl)-5, 6-dihydro-2 H-pyran-2-one) Produced by *Streptomyces fungicidicus* against *Alternaria solani*. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5649, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27175649>
- [86] YUAN, G.; HONG, K.; LIN, H.; SHE, Z.; LI, J. New azalomycin F analogs from mangrove *Streptomyces* sp. 211726 with activity against microbes and cancer cells. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 817-829, 2013. <https://doi.org/10.3390/md11030817>

- [87] KIM, H.Y.; KIM, J.D.; HONG, J.S.; HAM, J.H.; KIM, B.S. Identification of antifungal niphimycin from *Streptomyces* sp. KP 6107 by screening based on adenylate kinase assay. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 581-589, 2013. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200045>
- [88] HU, C.; ZHOU, S.W.; CHEN, F.; ZHENG, X.H.; SHEN, H.F.; LIN, B.R.; *et al.* Neoantimycins A and B, two unusual benzamido nine-membered dilactones from marine-derived *Streptomyces* antibioticus H12-15. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 557, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22040557>
- [89] FANG, Q.; MAGLANGIT, F.; MUGAT, M.; URWALD, C.; KYEREMEH, K.; DENG, H. Targeted isolation of indole alkaloids from *Streptomyces* sp. CT37. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1108, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25051108>
- [90] LIU, C.X.; ZHANG, J.; WANG, X.J.; QIAN, P.T.; WANG, J.D.; GAO, Y.M.; *et al.* Antifungal activity of borrelidin produced by a *Streptomyces* strain isolated from soybean. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1251-1257, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf2044982>
- [91] ZHANG, Y.L.; LI, S.; JIANG, D.H.; KONG, L.C.; ZHANG, P.H.; XU, J.D. Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces* canus BYB02. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 7, p. 1521-1524, 2013. <https://dx.doi.org/10.1021/jf2044982>
- [92] CHEN, X.; HU, L.F.; HUANG, X.S.; ZHAO, L.X.; MIAO, C.P.; CHEN, Y.W.; *et al.* Isolation and characterization of new phenazine metabolites with antifungal activity against root-rot pathogens of *Panax notoginseng* from *Streptomyces*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 41, p. 11403-11407, 2019. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b0419>
- [93] LI, W.; DING, L.; LI, J.; WEN, H.; LIU, Y.; TAN, S.; *et al.* Novel antimycin analogues with agricultural antifungal activities from the sponge-associated actinomycete *Streptomyces* sp. NBU3104. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 27, p. 8309-8316, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02626>
- [94] BI, Y.; YU, Z. Diterpenoids from *Streptomyces* sp. SN194 and their antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 45, p. 8525-8529, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03645>
- [95] CHEN, Y.; WEI, Y.; CAI, B.; ZHOU, D.; QI, D.; ZHANG, M.; *et al.* Discovery of niphimycin C from *Streptomyces yongxingensis* sp. nov. as a promising agrochemical fungicide for controlling banana *Fusarium* wilt by destroying the mitochondrial structure and function. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 40, p. 12784-12795, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02810>
- [96] BAO, Y.; LI, H.; DONG, Y.; DUAN, H.; LI, H.; LI, W. Genome-guided discovery of antifungal filipins from a deep-sea-derived *Streptomyces* antibioticus. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 2, p. 365-374, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00952>
- [97] KIM, S.J.; CANTRELL, C.L.; AVULA, B.; CHEN, J.; SCHRADER, K.K.; SANTO, S.N.; *et al.* *Streptomyces distallicus*, a potential microbial biolarvicide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 36, p. 11274-11280, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03537>

- [98] KIM, D.G.; MOON, K.; KIM, S.H.; PARK, S.H.; PARK, S.; LEE, S.K.; *et al.* Bahamaolides A and B, antifungal polyene polyol macrolides from the marine actinomycete *Streptomyces* sp. **Journal of natural products**, v. 75, n. 5, p. 959-967, 2012. <https://doi.org/10.1021/np3001915>
- [99] KARIM, M.R.U.; IN, Y.; ZHOU, T.; HARUNARI, E.; OKU, N.; IGARASHI, Y. Nyuzenamides A and B: Bicyclic peptides with antifungal and cytotoxic activity from a marine-derived *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 23, n. 6, p. 2109-2113, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00210>
- [100] LEIROS, M.; ALONSO, E.; SANCHEZ, J.A.; RATEB, M.E.; EBEL, R.; HOUSSEN, W.E.; *et al.* Mitigation of ROS insults by *Streptomyces* secondary metabolites in primary cortical neurons. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 71-80, 2014. <https://doi.org/10.1021/cn4001878>
- [101] KIM, H.J.; BO, A.B.; KIM, J.D.; KIM, Y.S.; KHAITOV, B.; KO, Y.K.; *et al.* S. Herbicidal characteristics and structural identification of the potential active compounds from *Streptomyces* sp. KRA17-580. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 52, p. 15373-15380, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01974>
- [102] UM, S.; GUO, H.; THIENGMAG, S.; BENNDORF, R.; MURPHY, R.; RISCHER, M.; *ET AL.* Comparative genomic and metabolic analysis of *Streptomyces* sp. RB110 morphotypes illuminates genomic rearrangements and formation of a new 46-membered antimicrobial macrolide. **ACS Chemical Biology**, v. 16, n. 8, p. 1482-1492, 2021. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00357>
- [103] FENG, Y.; YU, Z.; ZHANG, S.; XUE, Z.; HUANG, J.; ZHANG, H.; *et al.* Isolation and characterization of new 16-membered macrolides from the aveA3 gene replacement mutant strain *Streptomyces avermitilis* TM24 with acaricidal and nematocidal activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4782-4792, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00079>
- [104] WANG, J.; CONG, Z.; HUANG, X.; HOU, C.; CHEN, W.; TU, Z.; *et al.* Soliseptide A, a cyclic hexapeptide possessing piperazic acid groups from *Streptomyces solisilvae* HNM30702. **Organic letters**, v. 20, n. 5, p. 1371-1374, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b00142>
- [105] WANG, X.; ELSHAHAWI, S.I.; SHAABAN, K.A.; FANG, L.; PONOMAREVA, L.V.; ZHANG, Y.; *et al.* Ruthmycin, a new tetracyclic polyketide from *Streptomyces* sp. RM-4-15. **Organic letters**, v. 16, n. 2, p. 456-459, 2014. <https://doi.org/10.1021/ol4033418>
- [106] DING, N.; JIANG, Y.; HAN, L.; CHEN, X.; MA, J.; QU, X.; *et al.* Bafilomycins and odoriferous sesquiterpenoids from *Streptomyces albolongus* isolated from *Elephas maximus* feces. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 799-805, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00827>
- [107] WU, C.; DU, C.; GUBBENS, J.; CHOI, Y.H.; VAN WEZEL, G.P. Metabolomics-driven discovery of a prenylated isatin antibiotic produced by *Streptomyces* species MBT28. **Journal of natural products**, v. 78, n. 10, p. 2355-2363, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00276>

- [108] ALVARIÑO, R.; ALONSO, E.; LACRET, R.; OVES-COSTALES, D.; GENILLOUD, O.; REYES, F.; *et al.* Caniferolide A, a macrolide from *Streptomyces caniferus*, attenuates neuroinflammation, oxidative stress, amyloid-beta, and tau pathology in vitro. **Molecular pharmaceutics**, v. 16, n. 4, p. 1456-1466, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01090>
- [109] WANG, X.; ELSHAHAWI, S.I.; PONOMAREVA, L.V.; YE, Q.; LIU, Y.; COPLEY, G.C.; *et al.* Structure determination, functional characterization, and biosynthetic implications of nybomycin metabolites from a mining reclamation site-associated *Streptomyces*. **Journal of natural products**, v. 82, n. 12, p. 3469-3476, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01015>
- [110] BRACEGIRDLE, J.; HOU, P.; NOWAK, V.V.; ACKERLEY, D.F.; KEYZERS, R.A. Owen, J.G. Skyllamycins D and E, non-ribosomal cyclic depsipeptides from lichen-sourced *Streptomyces anulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 9, p. 2536-2543, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00547>
- [111] DENG, R.X.; ZHANG, Z.; LI, H.L.; WANG, W.; HU, H.B.; ZHANG, X.H. Identification of a novel bioactive phenazine derivative and regulation of phoP on its production in *Streptomyces lomondensis* S015. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 3, p. 974-981, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06498>
- [112] LI, Y.; XU, Z.; CHEN, P.; ZUO, C.; CHEN, L.; YAN, W.; *et al.* Genome mining and heterologous expression guided the discovery of antimicrobial naphthocyclinones from *Streptomyces eurocidicus* CGMCC 4.1086. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 2914-2923, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06928>
- [113] LI, Y.; DING, X.; DU, Y.; LI, Y.; REN, W.; LU, Y.; *et al.* Genome-Directed Discovery of Bicyclic Cinnamoyl-Containing Nonribosomal Peptides with Anticoronaviral Activity from *Streptomyces griseus*. **Organic Letters**, v. 25, n. 26, p. 4874-4879, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c01683>
- [114] SUN, X.; WANG, G.; XIAO, H.; JIANG, J.; XIAO, D.; XING, B.; *et al.* Strepimidazoles A–G from the plant endophytic *Streptomyces* sp. PKU-EA00015 with inhibitory activities against a plant pathogenic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 7, p. 2246-2254, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00362>
- [115] WANG, W.; SONG, T.; CHAI, W.; CHEN, L.; CHEN, L.; LIAN, X.Y.; *et al.* Rare polyene-polyol macrolides from mangrove-derived *Streptomyces* sp. ZQ4BG. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1703, 2017. <https://DOI:10.1038/s41598-017-01912-z>
- [116] LIU, Z.; YASHIRODA, Y.; SUN, P.; MA, H.; WANG, Y.; LI, L.; *et al.* Argenteolides A and B, Glycosylated Polyketide–Peptide Hybrid Macrolides from an Actinomycete *Streptomyces argenteolus*. **Organic Letters**, v. 25, n. 4, p. 571-575, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c03290>
- [117] LIU, Q.; LIU, Z.; SUN, C.; SHAO, M.; MA, J.; WEI, X.; *et al.* Discovery and biosynthesis of atrovimycin, an antitubercular and antifungal cyclodepsipeptide featuring vicinal-dihydroxylated cinnamic acyl chain. **Organic letters**, v. 21, n. 8, p. 2634-2638, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00618>

- [118] ZHANG, Y.; CHEEMA, M.T.; PONOMAREVA, L.V.; YE, Q.; LIU, T.; SAJID, I.; *et al.* Himalaquinones A–G, Angucyclinone-Derived Metabolites Produced by the Himalayan Isolate *Streptomyces* sp. PU-MM59. **Journal of natural products**, v. 84, n. 7, p. 1930-1940, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00192>
- [119] XIE, X.; LU, S.; PAN, X.; ZOU, M.; LI, F.; LIN, H.; *et al.* Antiviral bafilomycins from a feces-inhabiting *Streptomyces* sp. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 2, p. 537-543, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01243>
- [120] WIBOWO, M.; GOTFREDSSEN, C.H.; SASSETTI, E.; MELCHIORSEN, J.; CLAUSEN, M.H.; GRAM, L.; *et al.* Azodyrecins A–C: Azoxides from a Soil-Derived *Streptomyces* Species. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 12, p. 3519-3525, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00339>
- [121] MENEGATTI, C.; LOURENZON, V.B.; RODRIGUEZ-HERNANDEZ, D.; DA PAIXAO MELO, W.G.; FERREIRA, L.L.G.; ANDRICOPULO, A.D.; *et al.* Meliponamycins: antimicrobials from stingless bee-associated *Streptomyces* sp. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01011>
- [122] AN, J.S.; SHIN, B.; KIM, T.H.; HWANG, S.; SHIN, Y.H.; CUI, J.; *et al.* Dumulmycin, an antitubercular bicyclic macrolide from a riverine sediment-derived *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 23, n. 9, p. 3359-3363, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00847>
- [123] CHEN, L.; CHAI, W.; WANG, W.; SONG, T.; LIAN, X.Y.; ZHANG, Z. Cytotoxic bagremycins from mangrove-derived *Streptomyces* sp. Q22. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 5, p. 1450-1456, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01136>
- [124] LEETANASAKSAKUL, K.; KOOMSIRI, W.; SUGA, T.; MATSUO, H.; HOKARI, R.; WATTANA-AMORN, P.; *et al.* Sattahipmycin, a hexacyclic xanthone produced by a marine-derived *Streptomyces*. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 5, p. 1211-1217, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00870>
- [125] SZCZEBLEWSKI, P.; LASKOWSKI, T.; KUBACKI, B.; DZIERGOWSKA, M.; LICZMAŃSKA, M.; GRYNDA, J.; *et al.* Analytical studies on ascosin, candicidin and levorin multicomponent antifungal antibiotic complexes. The stereostructure of ascosin A2. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40158, 2017. <https://DOI: 10.1038/srep40158>
- [126] YU, H.L.; JIANG, S.H.; BU, X.L.; WANG, J.H.; WENG, J.Y.; YANG, X.M.; *et al.* Structural diversity of anti-pancreatic cancer capsimycins identified in mangrove-derived *Streptomyces xiamenensis* 318 and post-modification via a novel cytochrome P450 monooxygenase. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 40689, 2017. <https://DOI: 10.1038/srep40689>
- [127] SILVA, L.J.; CREVELIN, E.J.; SOUZA, D.T.; LACERDA-JÚNIOR, G.V.; DE OLIVEIRA, V.M.; RUIZ, A.L.T.G.; *et al.* Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer discovery. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 13870, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69786-2>

- [128] LI, H.; ZHANG, M.; LI, H.; YU, H.; CHEN, S.; WU, W.; *et al.* Discovery of venturicidin congeners and identification of the biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. NRRL S-4. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 1, p. 110-119, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01177>
- [129] ZHANG, D.; YI, W.; GE, H.; ZHANG, Z.; WU, B. Bioactive streptoglutarimides A–J from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZZ741. **Journal of natural products**, v. 82, n. 10, p. 2800-2808, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00481>
- [130] KOMAKI, H.; TAMURA, T.; IGARASHI, Y. Taxonomic positions and secondary metabolite-biosynthetic gene clusters of akazaoxime- and levantilide-producers. **Life**, v. 13, n. 2, p. 542, 2023. <https://doi.org/10.3390/life13020542>
- [131] GÄRTNER, A.; OHLENDORF, B.; SCHULZ, D.; ZINECKER, H.; WIESE, J.; IMHOFF, J.F. Levantilides A and B, 20-membered macrolides from a *Micromonospora* strain isolated from the mediterranean deep sea sediment. **Marine drugs**, v. 9, n. 1, p. 98-108, 2011. <https://doi.org/10.3390/md9010098>
- [132] SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; BRAÑA, A. F.; PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J.; DE PEDRO, N.; CRUZ, M.D.L.; *et al.* Paulomycin G, a new natural product with cytotoxic activity against tumor cell lines produced by deep-sea sediment derived *Micromonospora matsumotoense* M-412 from the Avilés Canyon in the Cantabrian Sea. **Marine Drugs**, v. 15, n. 9, p. 271, 2017. <https://doi.org/10.3390/md15090271>
- [133] MULLOWNEY, M.W.; Ó HAINMHIRE, E.; TANOUYE, U.; BURDETTE, J.E.; PHAM, V.C.; MURPHY, B.T. A pimarane diterpene and cytotoxic angucyclines from a marine-derived *Micromonospora* sp. in Vietnam's east sea. **Marine Drugs**, v. 13, n. 9, p. 5815-5827, 2015. <https://doi.org/10.3390/md13095815>
- [134] CARLSON, S.; MARLER, L.; NAM, S.J.; SANTARSIERO, B.D.; PEZZUTO, J.M.; MURPHY, B.T. Potential chemopreventive activity of a new macrolide antibiotic from a marine-derived *Micromonospora* sp. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1152-1161, 2013. <https://doi.org/10.3390/md11041152>
- [135] ABDELMOHSEN, U.R.; SZESNY, M.; OTHMAN, E.M.; SCHIRMEISTER, T.; GROND, S.; STOPPER, H.; *et al.* Antioxidant and anti-protease activities of diazepinomicin from the sponge-associated *Micromonospora* strain RV115. **Marine drugs**, v. 10, n. 10, p. 2208-2221, 2012. <https://doi.org/10.3390/md10102208>
- [136] IGARASHI, Y.; OGURA, H.; FURIHATA, K.; OKU, N.; INDANANDA, C.; THAMCHAIPENET, A. Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. **Journal of natural products**, v. 74, n. 4, p. 670-674, 2011. <https://doi.org/10.1021/np100727h>
- [137] BRAESEL, J.; CRNKOVIC, CM.; KUNSTMAN, K.J.; GREEN, S.J.; MAIENSCHNEICLINE, M.; ORJALA, J.; *et al.* Complete genome of *Micromonospora* sp. strain B006 reveals biosynthetic potential of a Lake Michigan actinomycete. **Journal of natural products**, v. 81, n. 9, p. 2057-2068, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00394>

- [138] IGARASHI, Y.; MATSUYUKI, Y.; YAMADA, M.; FUJIHARA, N.; HARUNARI, E.; OKU, N.; *et al.* Structure determination, biosynthetic origin, and total synthesis of akazaoxime, an enteromycin-class metabolite from a marine-derived actinomycete of the genus *Micromonospora*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 86, n. 9, p. 6528-6537, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00358>
- [139] WANG, Z.; WEN, Z.; LIU, L.; ZHU, X.; SHEN, B.; YAN, X.; *et al.* Yangpumicins F and G, enediyne congeners from *Micromonospora yangpuensis* DSM 45577. **Journal of natural products**, v. 82, n. 9, p. 2483-2488, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00229>
- [140] SCHNEIDER, K.; ROSE, I.; VIKINESWARY, S.; JONES, A.L.; GOODFELLOW, M.; NICHOLSON, G.; *et al.* Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia* strain acta 3026. **Journal of natural products**, v. 70, n. 6, p. 932-935, 2007. <https://doi.org/10.1021/np060612i>
- [141] WYCHE, T.P.; HOU, Y.; VAZQUEZ-RIVERA, E.; BRAUN, D.; BUGNI, T.S. Peptidolipins B–F, antibacterial lipopeptides from an ascidian-derived *Nocardia* sp. **Journal of natural products**, v. 75, n. 4, p. 735-740, 2012. <https://doi.org/10.1021/np300016r>
- [142] HAO, X.; YU, J.; WANG, Y.; CONNOLLY, J.A.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; *et al.* Zelkovamycins B–E, Cyclic Octapeptides Containing Rare Amino Acid Residues from an Endophytic *Kitasatospora* sp. **Organic Letters**, v. 22, n. 23, p. 9346-9350, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c03565>
- [143] HAO, X.; LI, S.; WANG, G.; LI, J.; PENG, Z.; ZHANG, Y.; *et al.* Zelkovamycins F and G, Cyclopeptides with C α -Methyl-threonine Residues, from an Endophytic *Kitasatospora* sp. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 7, p. 1715-1722, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00174>
- [144] ARENS, J.C.; BERRUÉ, F.; PEARSON, J.K.; KERR, R.G. Isolation and structure elucidation of satosporin A and B: new polyketides from *Kitasatospora griseola*. **Organic letters**, v. 15, n. 15, p. 3864-3867, 2013. <https://doi.org/10.1021/ol401598f>
- [145] HEINE, DANIEL; MARTIN, KARIN; HERTWECK, CHRISTIAN. Genomics-guided discovery of endophenazines from *Kitasatospora* sp. HKI 714. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 1083-1087, 2014. <https://doi.org/10.1021/np400915p>
- [146] GILL, K.A.; BERRUÉ, F.; ARENS, J.C.; CARR, G.; KERR, R.G. Cystargolides, 20S proteasome inhibitors isolated from *Kitasatospora cystarginea*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 4, p. 822-826, 2015. <https://doi.org/10.1021/np501060k>
- [147] PETTIT, G. R.; TAN, R.; PETTIT, R. K.; SMITH, T.H.; FENG, S.; DOUBEK, D.L.; *et al.* Antineoplastic agents. 560. Isolation and structure of kitastatin 1 from an Alaskan *Kitasatospora* sp. **Journal of natural products**, v. 70, n. 7, p. 1069-1072, 2007. <https://doi.org/10.1021/np068072c>
- [148] WU, C.; VAN WEZEL, G.P.; HAE CHOI, Y. Identification of novel endophenaside antibiotics produced by *Kitasatospora* sp. MBT66. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 7, p. 445-452, 2015. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.14>

- [149] STEPHENS, C.M.; ADAMS-SAPPER, S.; SEKHON, M.; JOHNSON, J.R.; RILEY, L.W. Genomic analysis of factors associated with low prevalence of antibiotic resistance in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* sequence type 95 strains. **Msphere**, v. 2, n. 2, p. 10.1128/msphere. 00390-16, 2017. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00390-16>
- [150] ALVAREZ-URIA, G.; GANDRA, S.; MANDAL, S.; LAXMINARAYAN, R. Global forecast of antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **International journal of infectious diseases**, v. 68, p. 50-53, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.01.011>
- [151] EXNER, M.; BHATTACHARYA, S.; CHRISTIANSEN, B.; GEBEL, J.; GORONCY-BERMES, P.; HARTEMANN, P.; TRAUTMANN, M. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? **GMS hygiene and infection control**, v. 12, 2017. <https://doi.org/10.3205/dgkh000290>
- [152] World Health Organization: Antimicrobial resistance fact sheet. Geneva, 2021 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, accessed 30 May 2022).
- [153] FISHER, M.C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERMAN, J.; BICANIC, T.; BIGNELL, E.M.; BOWYER, P.; VERWEIJ, P.E. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022. <https://doi.org/10.1038/41579-022-00720-1>
- [154] ELBENDARY, A.A.; HESSAIN, A.M.; EL-HARIRI, M.D.; SEIDA, A.A.; MOUSSA, I.M.; MUBARAK, A.S.; EL JAKEE, J.K. Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 1, p. 44-46, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003>
- [155] RAJIVGANDHI, G.; MUNESWARAN, T.; MARUTHUPANDY, M.; RAMAKRITINAN, C.M.; SARAVANAN, K.; RAVIKUMAR, V.; *et al.* Antibacterial and anticancer potential of marine endophytic actinomycetes *Streptomyces coeruleorubidus* GRG 4 (KY457708) compound against colistin resistant uropathogens and A549 lung cancer cells. **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 325-335, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.025>
- [156] BRAÑA, A.F.; SARMIENTO-VIZCAÍNO, A.; PÉREZ-VICTORIA, I.; MARTÍN, J.; OTERO, L.; PALACIOS-GUTIÉRREZ, J.J.; DESERTOMYCIN G.; *et al.* A new antibiotic with activity against Mycobacterium tuberculosis and human breast tumor cell lines produced by *Streptomyces althoticus* MSM3, isolated from the Cantabrian Sea Intertidal macroalgae *Ulva* sp. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 114, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17020114>
- [157] ALMAARY, K.S.; ALHARBI, N.S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J.M.; RAJIVGANDHI, G.; RAMACHANDRAN, G.; *et al.* Anti-bacterial effect of marine sea grasses mediated endophytic actinomycetes against *K. pneumoniae*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 33, n. 6, p. 101528, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101528>
- [158] TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S.; KULIK, A.; GROND, S. Rare actinomycetes *Nocardia caishijiensis* and *Pseudonocardia carboxydvorans* as endophytes, their bioactivity and metabolites evaluation. **Microbiological research**, v. 185, p. 22-35, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.01.003>

- [159] DASGUPTA, N.; NANDY, P.; SENGUPTA, C.; DAS, S. RAPD and ISSR marker mediated genetic polymorphism of two mangroves *Bruguiera gymnorrhiza* and *Heritiera fomes* from Indian Sundarbans in relation to their sustainability. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 21, p. 375-384, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0308-0>
- [160] AHMAD, M.S.; EL-GENDY, A.O.; AHMED, R.R.; HASSAN, H.M.; EL-KABBANY, H.M.; MERDASH, A.G. Exploring the antimicrobial and antitumor potentials of *Streptomyces* sp. AGM12-1 isolated from Egyptian soil. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 438, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00438>
- [161] ELSAYED, T.R.; GALIL, D.F.; SEDIK, M.Z.; HASSAN, H.M.; SADIK, M.W. Antimicrobial and anticancer activities of actinomycetes isolated from Egyptian soils. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 9, n. 9, p. 1689-1700, 2020. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.909.209>
- [162] BENEDICT, K.; WHITHAM, H.K.; JACKSON, B.R. Economic burden of fungal diseases in the United States. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2022. p. ofac097. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac097>
- [163] BROWN, G.D.; DENNING, D.W.; LEVITZ, S.M. Tackling human fungal infections. **Science**, v. 336, n. 6082, p. 647-647, 2012. <https://doi.org/10.1126/science.1222236>
- [164] CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J.F. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290>
- [165] PRISTOV, K.E.; GHANNOUM, M.A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- [166] OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, n. 2, p. 69-74, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01069-X](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01069-X)
- [167] BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B.C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
- [168] ZHANG, F.; ZHAO, M.; BRAUN, D.R.; ERICKSEN, S.S.; PIOTROWSKI, J.S.; NELSON, J.; *et al.* S. A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. **Science**, v. 370, n. 6519, p. 974-978, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd6919>
- [169] ALKHALIFAH, D.H.M. *Sponge-associated* sp. RM66 metabolome induction with N-acetylglucosamine: Antibacterial, antifungal and anti-trypansomal activities. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4691-4698, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.082>

- [170] LIU, C.; ZHUANG, X.; YU, Z.; WANG, Z.; WANG, Y.; GUO, X.; *et al.* Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria of healthy and diseased soybean. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 243, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080243>
- [171] BHARATI, S.; PODDER, P.; MONDAL, M.R.H.; PODDER, P.; KOSE, U. A review on epidemiology, genomic characteristics, spread, and treatments of COVID-19. **Data Science for COVID-19**, p. 487-505, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90769-9.00011-6>
- [172] WORLD HEALTH STATISTICS 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>. Accessed 20 May 2022)
- [173] NAIR, H.; NOKES, D.J.; GESSNER, B.D.; DHERANI, M.; MADHI, S.A.; SINGLETON, R.J.; *et al.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 375, n. 9725, p. 1545-1555, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60206-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60206-1)
- [174] MUHAMMAD, S.; QAISAR, M.; IQBAL, J.; KHERA, R.A.; AL-SEHEMI, A.G.; ALARFAJI, S.S.; *et al.* Exploring the inhibitory potential of novel bioactive compounds from mangrove actinomycetes against nsp10 the major activator of SARS-CoV-2 replication. **Chemical Papers**, v. 76, n. 5, p. 3051-3064, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01997-X>
- [175] SAIZ, J-C.; MARTÍN-ACEBES, M.A. The race to find antivirals for *Zika virus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 10.1128/aac. 00411-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/AAC.00411-17>
- [176] BARROWS, N.J.; CAMPOS, R.K.; POWELL, S.T.; PRASANTH, K.R.; SCHOTTLER, G.; SOTO-ACOSTA, R.; *et al.* A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of *Zika virus* infection. **Cell host & microbe**, v. 20, n. 2, p. 259-270, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.004>
- [177] RAUSCH, K.; HACKETT, B.A.; WEINBREN, N.L.; REEDER, S.M.; SADOVSKY, Y.; HUNTER, C. A.; *et al.* Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against *Zika virus*. **Cell reports**, v. 18, n. 3, p. 804-815, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.068>
- [178] LIU, X.; GAN, M.; DONG, B.; ZHANG, T.; LI, Y.; ZHANG, Y.; *et al.* 4862F, a new inhibitor of HIV-1 protease, from the culture of *Streptomyces* I03A-04862. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 236-243, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules18010236>
- [179] CHEN, M.H.; CHANG, S.S.; DONG, B.; YU, L.Y.; WU, Y.X.; WANG, R.Z.; *et al.* Ahmpatinin i Bu, a new HIV-1 protease inhibitor, from *Streptomyces* sp. CPCC 202950. **RSC advances**, v. 8, n. 10, p. 5138-5144, 2018. <https://doi.org/10.1039/C7RA13241G>
- [180] LI, K.; LI, Q.L.; JI, N.Y.; LIU, B.; ZHANG, W.; CAO, X.P. Deoxyuridines from the marine sponge associated actinomycete *Streptomyces microflavus*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 5, p. 690-695, 2011. <https://doi.org/10.3390/md9050690>

- [181] BRAZ, H.L.B.; DE MORAES SILVEIRA, J.A.; MARINHO, A.D.; DE MORAES, M.E.A.; de Moraes Filho, M.O.; Monteiro, H.S.A.; *et al.* In silico study of azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine and their potential mechanisms of action against SARS-CoV-2 infection. **International journal of antimicrobial agents**, v. 56, n. 3, p. 106119, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106119>
- [182] CHAN, K.; TUSTING, L.S.; BOTTOMLEY, C.; SAITO, K.; DJOUAKA, R.; LINES, J. Malaria transmission and prevalence in rice-growing versus non-rice-growing villages in Africa: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 3, p. e257-e269, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00349-1)
- [183] BARNEY, R.; VELASCO, M.; COOPER, C.A.; RASHID, A.; KYLE, D.E.; MOON, R.W.; *et al.* Diagnostic characteristics of lactate dehydrogenase on a multiplex assay for malaria detection including the zoonotic parasite *Plasmodium knowlesi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 106, n. 1, p. 275, 2022. <https://doi.org/doi:10.4269/ajtmh.21-0532>
- [184] SISSOKO, M.S.; HEALY, S. A.; KATILE, A.; OMASWA, F.; ZAIDI, I.; GABRIEL, E.E.; *et al.* Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 498-509, 2017. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30104-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30104-4)
- [185] DAVIES-BOLORUNDURO, O.F.; OSUOLALE, O.; SAIBU, S.; ADELEYE, I.A.; AMINAH, N.S. Bioprospecting marine actinomycetes for antileishmanial drugs: current perspectives and future prospects. **Heliyon**, v. 7, n. 8, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07710>
- [186] JASNI, N.; SAIDIN, S.; ARIFIN, N.; AZMAN, D.K.; SHIN, L.N.; OTHMAN, N. A review: natural and synthetic compounds targeting *Entamoeba histolytica* and its biological membrane. **Membranes**, v. 12, n. 4, p. 396, 2022. <https://doi.org/10.3390/membranes12040396>
- [187] PAGMADULAM, B.; TSERENDULAM, D.; RENTSENKHAND, T.; IGARASHI, M.; SAWA, R.; NIHEI, C.I.; *et al.* Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. **Parasitology international**, v. 74, p. 101961, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101961>
- [188] CARTUCHE, L.; SIFAoui, I.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; BETHENCOURT-ESTRELLA, C. J.; SAN NICOLÁS-HERNÁNDEZ, D.; LORENZO-MORALES, J.; FERNÁNDEZ, J.J. Antikinetoplastid activity of indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis*. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 657, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10040657>
- [189] INAHASHI, Y.; IWATSUKI, M.; ISHIYAMA, A.; MATSUMOTO, A.; HIROSE, T.; OSHITA, J.; *et al.* Actinoallolides A–E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. **Organic letters**, v. 17, n. 4, p. 864-867, 2015. <https://doi.org/10.1021/ol5037216>
- [190] ESPINOSA, A.; SOCHA, A.M.; RYKE, E.; ROWLEY, D.C. Antiamoebic properties of the actinomycete metabolites echinomycin A and tirandamycin A. **Parasitology research**, v. 111, p. 2473-2477, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3019-2>

- [191] ESTRELLA-PARRA, E.A.; ARREOLA, R.; ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, M.E.; TORRES-ROMERO, J.C.; ROJAS-ESPINOSA, O.; DE LA CRUZ-SANTIAGO, J.A.; *et al.* Natural marine products as antiprotozoal agents against amitochondrial parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 19, p. 40-46, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.05.003>
- [192] PIMENTEL, M.R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/576286>
- [193] SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [194] PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. **The lancet oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7)
- [195] RAHIB, L.; SMITH, B.D.; AIZENBERG, R.; ROSENZWEIG, A.B.; FLESHMAN, J.M.; MATRISIAN, L. M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. **Cancer research**, v. 74, n. 11, p. 2913-2921, 2014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- [196] FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M.; PIÑEROS, M.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- [197] LI, J.; ZHAO, G.Z.; CHEN, H.H.; WANG, H.B.; QIN, S.; ZHU, W.Y.; *et al.* Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 6, p. 574-580, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02470.x>
- [198] ABDEL-AZIZ, M.S.; HATHOUT, A.S.; EL-NELEETY, A.A.; HAMED, A.A.; SABRY, B.A.; ALY, S.E.; *et al.* Molecular identification of actinomycetes with antimicrobial, antioxidant and anticancer properties. **Comunicata Scientiae**, v. 10, n. 2, p. 218-231, 2019. <https://doi.org/10.14295/cs.v10i2.2269>
- [199] TONG, L.; SUN, W.; WU, S.; HAN, Y. Characterization of Caerulomycin A as a dual-targeting anticancer agent. **European journal of pharmacology**, v. 922, p. 174914, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174914>
- [200] AAMIR, M.; RAI, K.K.; ZEHRRA, A.; DUBEY, M.K.; SAMAL, S.; YADAV, M.; *et al.* Endophytic actinomycetes in bioactive compounds production and plant defense system. In: **Microbial endophytes**. Woodhead Publishing, 2020. p. 189-229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818734-0.00009-7>

- [201] EK-RAMOS, M.J.; GOMEZ-FLORES, R.; OROZCO-FLORES, A.A.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GONZÁLEZ-OCHOA, G.; TAMEZ-GUERRA, P. Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 463, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00463>
- [202] LAW, J.W.F.; LAW, L.N.S.; LETCHUMANAN, V.; TAN, L.T.H.; WONG, S.H.; CHAN, K.G.; *et al.* Anticancer drug discovery from microbial sources: The unique mangrove *streptomycetes*. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5365, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25225365>
- [203] SALAM, N.; KHIEU, T.N.; LIU, M.J.; VU, T.T.; CHU-KY, S.; QUACH, N. T.; *et al.* Endophytic actinobacteria associated with *Dracaena cochinchinensis* Lour.: isolation, diversity, and their cytotoxic activities. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1308563>
- [204] TANVIR, R.; SHEIKH, A.A.; JAVEED, A. Endophytic actinomycetes in the biosynthesis of bioactive metabolites: chemical diversity and the role of medicinal plants. **Studies in natural products chemistry**, v. 60, p. 399-424, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00011-5>
- [205] TAECHOWISAN, T.; CHAISAENG, S.; PHUTDHAWONG, W.S. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. **Food and agricultural immunology**, v. 28, n. 6, p. 1330-1346, 2017. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1339669>
- [206] ALHARBI, N.S. Novel bioactive molecules from marine actinomycetes. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 13, n. 4, p. 1905-1927, 2016. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2346>
- [207] COUSIN, E.; DUNCAN, B.B.; STEIN, C.; ONG, K. L.; VOS, T.; ABBAFATI, C.; *et al.* Diabetes mortality and trends before 25 years of age: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet diabetes & endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 177-192, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00349-1)
- [208] ROPER, N.A.; BILOUS, R.W.; KELLY, W.F.; UNWIN, N.C.; CONNOLLY, V.M. Cause-specific mortality in a population with diabetes: South Tees Diabetes Mortality Study. **Diabetes care**, v. 25, n. 1, p. 43-48, 2002. <https://doi.org/10.2337/diacare.25.1.43>
- [209] HULETT, N.A.; SCALZO, R.L.; REUSCH, J.E.B. Glucose uptake by skeletal muscle within the contexts of type 2 diabetes and exercise: An integrated approach. **Nutrients**, v. 14, n. 3, p. 647, 2022. <https://doi.org/10.3390/nu14030647>
- [210] MAHMUD, T. The C 7 N aminocyclitol family of natural products. **Natural product reports**, v. 20, n. 1, p. 137-166, 2003.
- [211] DE MELO, E. B.; DA SILVEIRA GOMES, A.; CARVALHO, I. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. **Tetrahedron**, v. 62, n. 44, p. 10277-10302, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.055>
- [212] XU, H.; YANG, J.; BAI, L.; DENG, Z.; MAHMUD, T. Genetically engineered production of 1, 1'-bis-valienamine and validienamycin in *Streptomyces hygroscopicus* and

their conversion to valienamine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, p. 895-902, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1711-z>

[213] KAWAHARA, T.; UEDA, M.; KISHIMOTO, N.; YASUTAKE, T.; MISUMI, S.; DEVKOTA, H. P.; *et al.* Amamine, an isoquinoline alkaloid from the *Kitasatospora* sp. HGTA304. **The Journal of Antibiotics**, v. 76, n. 10, p. 623-625, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00641-y>

[214] SEENAK, P.; KUMPHUNE, S.; MALAKUL, W.; CHOTIMA, R.; NERNPERMPISOOTH, N. Pineapple consumption reduced cardiac oxidative stress and inflammation in high cholesterol diet-fed rats **Nutrition & metabolism**, v. 18, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00566-z>

[215] ALMASI, F.; MOHAMMADIPANAH, F.; ADHAMI, H.R.; HAMED, J. Introduction of marine-derived *Streptomyces* sp. UTMC 1334 as a source of pyrrole derivatives with anti-acetylcholinesterase activity. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1370-1382, 2018. <https://doi.org/10.1111/jam.14043>

[216] BARAGE, S.H.; SONAWANE, K.D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. **Neuropeptides**, v. 52, p. 1-18, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>

[217] ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 4, p. 325-373, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>

[218] BUSH, A.I. The metallobiology of Alzheimer's disease. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 4, p. 207-214, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00067-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00067-5)

[219] CALDERON-GARCIDUEÑAS, A.L.; DUYCKAERTS, C. Alzheimer disease. **Handbook of clinical neurology**, v. 145, p. 325-337, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7>

[220] ZHANG, X.; GAO, Z.; ZHANG, M.; JING, F.; DU, J.; ZHANG, L. Analysis of endophytic actinobacteria species diversity in the stem of *Gynura cusimbua* by 16S rRNA gene clone library. **Microbiology**, v. 85, p. 379-385, 2016. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030176>

[221] ABDELFAH, M.S.; ELMALLAH, M.I.; EBRAHIM, H.Y.; ALMEER, R.S.; ELTANANY, R.M.; ABDEL MONEIM, A.E. Prodigiosins from a marine sponge-associated actinomycete attenuate HCl/ethanol-induced gastric lesion via antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **PLoS One**, v. 14, n. 6, p. e0216737, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216737>

[222] MA, J.; CAO, B.; LIU, C.; GUAN, P.; MU, Y.; JIANG, Y.; HUANG, X. Actinofuranones DI from a lichen-associated actinomycetes, *Streptomyces gramineus*, and their anti-inflammatory effects. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2393, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23092393>

- [223] ABDELGAWAD, H.; SALEH, A.M.; AL JAOUNI, S.; SELIM, S.; HASSAN, M.O.; WADAAN, M.A.; *et al.* Utilization of actinobacteria to enhance the production and quality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits in a semi-arid environment. **Science of the total environment**, v. 665, p. 690-697, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.140>
- [224] OSARO-MATTHEW, R.C.; IRE, F.S.; FRANK-PETERSIDE, N. Screening of actinomycetes from turmeric (*Curcuma longa* L.) and ginger (*Zingiber officinale*) rhizosphere for antifungal activity. **J Adv Microbiol**, v. 20, p. 18-28, 2020. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2020/v20i230214>
- [225] CAO, P.; LI, C.; WANG, H.; YU, Z.; XU, X.; WANG, X.; *et al.* Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria in healthy and diseased cucumber plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a promising biocontrol agent. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 236, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020236>
- [226] GE, M.; CAI, X.; WANG, D.; LIANG, H.; ZHU, J.; LI, G.; *et al.* (2023). Efficacy of *Streptomyces murinus* JKTJ-3 in Suppression of *Pythium Damping-Off* of Watermelon. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1360, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061360>
- [227] WANG, Y.; YANG, D.; YU, Z. New Lactones Produced by *Streptomyces* sp. SN5431 and Their Antifungal Activity against *Bipolaris maydis*. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 616, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030616>
- [228] RAN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X.; LI, G. Nematicidal Metabolites from the Actinomycete *Micromonospora* sp. WH06. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2274, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112274>
- [229] LI, X.; LI, B.; CAI, S.; ZHANG, Y.; XU, M.; ZHANG, C.; *et al.* Identification of rhizospheric actinomycete *Streptomyces lavendulae* SPS-33 and the inhibitory effect of its volatile organic compounds against *Ceratocystis Fimbriata* in postharvest sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.). **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 319, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030319>
- [230] OLANREWAJU, O.S.; BABALOLA, O.O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 1179-1188, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y>
- [231] TRIVEDI, P.; LEACH, J.E.; TRINGE, S.G.; SA, T.; SINGH, B.K. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature reviews microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607-621, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- [232] EBRAHIMI-ZARANDI, M.; ETESAMI, H.; GLICK, B.R. Fostering plant resilience to drought with Actinobacteria: Unveiling perennial allies in drought stress tolerance. **Plant Stress**, p. 100242, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100242>
- [233] OYEDOH, O.P.; YANG, W.; DHANASEKARAN, D.; SANTOYO, G.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Rare rhizo-Actinomycetes: A new source of agroactive metabolites. **Biotechnology Advances**, p. 108205, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108205>

- [234] ABDELGAWAD, H.; ABUELSOUD, W.; MADANY, M.M.; SELIM, S.; ZINTA, G.; MOUSA, A.S.; *et al.* Actinomycetes enrich soil rhizosphere and improve seed quality as well as productivity of legumes by boosting nitrogen availability and metabolism. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1675, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10121675>
- [235] AL-RASHDI, A.; AL-HINAI, F.S.; AL-HARRASI, M.M.A.; AL-SABAHI, J.N.; AL-BADI, R.S.; AL-MAHMOOLI, I. H.; VELAZHAHAN, R. The potential of endophytic bacteria from *Prosopis cineraria* for the control of *Pythium aphanidermatum* induced damping-off in cucumber under saline water irrigation. **Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 1, p. 39-56, 2023. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01237-5>
- [236] ROSENBLUETH, M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M.A.; REYES-HERNÁNDEZ, B.J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.C.; *ET AL.* Nitrogen fixation in cereals. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1794, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>
- [237] OYEDOH, O.P.; YANG, W.; DHANASEKARAN, D.; SANTOYO, G.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Sustainable agriculture: Rare-actinomycetes to the rescue. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 666, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030666>
- [238] SELIM, M.S.M.; ABDELHAMID, S.A.; MOHAMED, S.S. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. **Journal of Genetic Engineering and biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 72, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00156-9>
- [239] EMELYANOVA, E.V.; RAMANAIAH, S.V.; PRISYAZHNAYA, N.V.; SHUMKOVA, E.S.; PLOTNIKOVA, E.G.; WU, Y.; *et al.* The Contribution of Actinobacteria to the Degradation of Chlorinated Compounds: Variations in the Activity of Key Degradation Enzymes. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 141, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010141>
- [240] SEMENOVA, E.M.; BABICH, T.L.; SOKOLOVA, D.S.; ERSHOV, A.P.; RAIEVSKA, Y.I.; BIDZHIEVA, S.K.; *et al.* Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic Região and their potential for bioremediation from hydrocarbon pollutants. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1490, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081490>
- [241] IVSHINA, I.; BAZHUTIN, G.; TYAN, S.; POLYGALOV, M.; SUBBOTINA, M.; TYUMINA, E. Cellular modifications of rhodococci exposed to separate and combined effects of pharmaceutical pollutants. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1101, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061101>
- [242] SARKAR, G.; SUTHINDHIRAN, K. Diversity and biotechnological potential of marine actinomycetes from India. **Indian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 475-493, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12088-022-01024-x>
- [243] BOUSSELHAM, M.; LEMRISS, S.; DHIBA, D.; AALLAM, Y.; SOUIRI, A.; ABBAS, Y.; *et al.* *Streptomyetaceae* and *Promicromonosporaceae*: Two Actinomycetes Families from Moroccan Oat Soils Enhancing Solubilization of Natural Phosphate. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1116, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061116>

- [244] IMADE, E.E.; BABALOLA, O.O. Biotechnological utilization: the role of *Zea mays* rhizospheric bacteria in ecosystem sustainability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 11, p. 4487-4500, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11351-6>
- [245] SCHWABE, R.; ANKE, M.K.; SZYMAŃSKA, K.; WICHE, O.; TISCHLER, D. Analysis of desferrioxamine-like siderophores and their capability to selectively bind metals and metalloids: development of a robust analytical RP-HPLC method. **Research in microbiology**, v. 169, n. 10, p. 598-607, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.08.002>
- [246] KUMSIRI, B.; PEKKOH, J.; PATHOM-AREE, W.; LUMYONG, S.; PHINYO, K.; PUMAS, C.; *et al.* Enhanced production of microalgal biomass and lipid as an environmentally friendly biodiesel feedstock through actinomycete co-culture in biogas digestate effluent. **Bioresource Technology**, v. 337, p. 125446, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125446>

Capítulo 2

- [1] DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R.A.; TAUFU, T. *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>
- [2] CHEVRETTE, M. G.; CARLSON, C.M.; ORTEGA, H.E.; THOMAS, C.; ANANIEV, G.E.; BARNS, K.J.; *et al.* The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 516, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08438-0>
- [3] ELSHAFIE, H.S.; CAMELE, I. Rhizospheric actinomycetes revealed antifungal and plant-growth-promoting activities under controlled environment. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1872, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11141872>
- [4] LIU, C.; ZHUANG, X.; YU, Z.; WANG, Z.; WANG, Y.; GUO, X.; *et al.* Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria of healthy and diseased soybean. **Microorganisms**, v. 7, n. 8, p. 243, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080243>
- [5] BUTLER, M.S.; HENDERSON, I.R.; CAPON, R.J.; BLASKOVICH, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline as of December 2022. **The Journal of Antibiotics**, v. 76, n. 8, p. 431-473, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00629-8>
- [6] DJEBAILI, R.; PELLEGRINI, M.; ERCOLE, C.; FARDA, B.; KITOUNI, M.; DEL GALLO, M. Biocontrol of soil-borne pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by plant growth-promoting actinomycetes: In vitro and in planta antagonistic activity. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1305, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101305>
- [7] OYEDOH, O.P.; YANG, W.; DHANASEKARAN, D.; SANTOYO, G.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Rare rhizo-Actinomycetes: A new source of agroactive metabolites. **Biotechnology Advances**, p. 108205, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108205>

- [8] PRIYASHANTHA, A.K.H.; KARUNARATHNA, S.C.; LU, L.; TIBPROMMA, S. Fungal Endophytes: An Alternative Biocontrol Agent against Phytopathogenic Fungi. **Encyclopedia**, v. 3, n. 2, p. 759-780, 2023. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia3020055>
- [9] SAEED, Q.; XIUKANG, W.; HAIDER, F.U.; KUČERIK, J.; MUMTAZ, M.Z.; HOLATKO, J.; *et al.* Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: a comprehensive review of effects and mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10529, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
- [10] STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004. <https://doi.org/10.1021/np030397v>
- [11] LIU, D.; YAN, R.; FU, Y.; WANG, X.; ZHANG, J.; XIANG, W. Antifungal, plant growth-promoting, and genomic properties of an endophytic actinobacterium *Streptomyces* sp. NEAU-S7GS2. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 471636, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02077>
- [12] LIU, Y.; PONPANDIAN, L.N.; KIM, H.; JEON, J.; HWANG, B.S.; LEE, S.K.; *et al.* Distribution and diversity of bacterial endophytes from four *Pinus* species and their efficacy as biocontrol agents for devastating pine wood nematodes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12461, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48739-4>
- [13] BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **The Journal of antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.
- [14] SHARMA, P.; THAKUR, D. Antimicrobial biosynthetic potential and diversity of culturable soil actinobacteria from forest ecosystems of Northeast India. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 4104, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60968-6>
- [15] BARKA, E.A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.P.; *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. <https://doi.org/10.1128/mmb.00019-15>
- [16] BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- [17] LAW, J.W.F.; CHAN, K.G.; HE, Y.W.; KHAN, T.M.; AB MUTALIB, N.S.; GOH, B.H.; *et al.* Diversity of *Streptomyces* spp. from mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 15262, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51622-x>
- [18] TAKAHASHI, Y. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 506-513, 2017. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.8>
- [19] YAN, S.; ZENG, M.; WANG, H.; ZHANG, H. *Micromonospora*: A prolific source of bioactive secondary metabolites with therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 13, p. 8735-8771, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00626>

- [20] KIM, D.G.; MOON, K.; KIM, S.H.; PARK, S.H.; PARK, S.; LEE, S.K.; *et al.* Bahamaolides A and B, antifungal polyene polyol macrolides from the marine actinomycete *Streptomyces* sp. **Journal of natural products**, v. 75, n. 5, p. 959-967, 2012. <https://doi.org/10.1021/np3001915>
- [21] NARA, A.; HASHIMOTO, T.; KOMATSU, M.; NISHIYAMA, M.; KUZUYAMA, T.; IKEDA, H. Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in Actinomycetales microorganisms. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 616-624, 2017. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.33>
- [22] WANG, W.; SONG, T.; CHAI, W.; CHEN, L.; CHEN, L.; LIAN, X.Y.; *et al.* Rare polyene-polyol macrolides from mangrove-derived *Streptomyces* sp. ZQ4BG. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1703, 2017. <https://DOI:10.1038/s41598-017-01912-z>
- [23] KOMAKI, H. Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 831, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>
- [24] NOUIOUI, I.; CARRO, L.; GARCÍA-LÓPEZ, M.; MEIER-KOLTHOFF, J.P.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; GÖKER, M. Genome-based taxonomic classification of the phylum Actinobacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 355158, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007>
- [25] LI, Y.; WANG, M.; SUN, Z.Z.; XIE, B.B. Comparative genomic insights into the taxonomic classification, diversity, and secondary metabolic potentials of *Kitasatospora*, a genus closely related to *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 683814, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.683814>
- [26] SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*: V. Additional descriptions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 265-394, 1972. <https://doi.org/10.1099/00207713-22-4-265>
- [27] BELKNAP, K.C.; PARK, C.J.; BARTH, B.M; ANDAM, C.P. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 2003, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58904-9v>
- [28] VAN BERGEIJK, D.A.; TERLOUW, B.R.; MEDEMA, M.H.; VAN WEZEL, G.P. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 546-558, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- [29] ROLLO, A.; RIBEIRO, M.M.; COSTA, R.L.; SANTOS, C.; CLAVO P.Z.M.; MANDÁK, B.; *et al.* Genetic structure and pod morphology of *Inga edulis* cultivated vs. wild populations from the Peruvian Amazon. **Forests**, v. 11, n. 6, p. 655, 2020. <https://doi.org/10.3390/f11060655>
- [30] PIATO, K.; SUBÍA, C.; PICO, J.; CALDERÓN, D.; NORRGROVE, L.; LEFORT, F. Organic farming practices and shade trees reduce pest infestations in *Robusta coffee* systems in Amazonia. **Life**, v. 11, n. 5, p. 413, 2021. <https://doi.org/10.3390/life11050413>

- [31] PIATO, K.; SUBÍA, C.; LEFORT, F.; PICO, J.; CALDERÓN, D.; NORRGROVE, L. No reduction in yield of young *Robusta coffee* when grown under shade trees in Ecuadorian Amazonia. **Life**, v. 12, n. 6, p. 807, 2022. <https://doi.org/10.3390/life12060807>
- [32] SHIRLING, E.T.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.
- [33] SOUZA, W.DE. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro**, 2007.
- [34] SOUZA, A.Q.L.D.; SOUZA, A.D.L.D.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.D.M.; PEREIRA, J. O. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>
- [35] HAYGOOD, M.G.; DAVIDSON, S.K. Small-subunit rRNA genes and in situ hybridization with oligonucleotides specific for the bacterial symbionts in the larvae of the bryozoan *Bugula neritina* and proposal of "*Candidatus Endobugula sertula*". **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4612-4616, 1997. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4612-4616.1997>
- [36] YOON, S.H.; HA, S.M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- [37] SOUSA, T.F.; REÇA, B.N.P.V.; CASTRO, G.S.; DA SILVA, I.J.S., CANIATO, F.F.; DE ARAÚJO JÚNIOR, M. B; DA SILVA, G.F. *Trichoderma agriamazonicum* sp. nov. (Hypocreaceae), a new ally in the control of phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 275, p. 127469, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127469>
- [38] NICHOLS, J.D.; CARPENTER, F.L. Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia amazonia*. **Forest Ecology and Management**, v. 233, n. 2-3, p. 344-351, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.031>
- [39] SOBANSKI, N.; MARQUES, M.C.M. Effects of soil characteristics and exotic grass cover on the forest restoration of the Atlantic Forest. **Journal for Nature Conservation**, v. 22, n. 3, p. 217-222, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2014.01.001>
- [40] IGLESIAS, L.; SALAS, E.; LEBLANC, H.A.; NYGREN, P. Response of *Theobroma cacao* and *Inga edulis* seedlings to cross-inoculated populations of arbuscular mycorrhizal fungi. **Agroforestry systems**, v. 83, p. 63-73, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9400-9>
- [41] NIKOLAIDIS, M.; HESKETH, A.; FRANGOU, N.; MOSSIALOS, D.; VAN DE PEER, Y.; OLIVER, S.G.; *et al.* A panoramic view of the genomic landscape of the genus *Streptomyces*. **Microbial Genomics**, v. 9, n. 6, p. 001028, 2023. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001028>

- [42] KOMAKI, H. Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 831, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>
- [43] LUO, Y.; LING, L.; ZHANG, K.; SONG, Z.; ZHANG, L.; LI, J.; ZHAO, J. *Streptomyces herbicida* sp. nov., a novel actinomycete with antibacterial and herbicidal activity isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 006263, 2024. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006263>
- [44] MA, D.; ZHU, J.; JIANG, J.; ZHAO, Y.; LI, B.; MU, W.; LIU, F. Evaluation of bioactivity and control efficacy of tetramycin against *Corynespora cassicola*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 152, p. 106-113, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.09.0093>.
- [45] HUANG, H.K.; LIU, C.E.; LIOU, J.H.; HSIUE, H.C.; HSIAO, C.H.; HSUEH, P.R. Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassicola*, a plant pathogen. **Journal of Infection**, v. 60, n. 2, p. 188-190, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.002>
- [46] O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S.G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M.F.; *et al.* Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-1065, 2012. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- [47] MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.; GUO, L.D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal diversity**, v. 50, p. 167-187, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- [48] SUN, J.F.; LIN, X.; ZHOU, X.F.; WAN, J.; ZHANG, T.; YANG, B.; *et al.* Pestalols A–E, new alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 6, p. 451-457, 2014. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.24>
- [49] DENG, J.X.; SANG, H.K.; HWANG, Y.S.; LIM, B.S.; YU, S.H. Postharvest fruit rot caused by *Pestalotiopsis* sp. on grape in Korea. **Australasian Plant Disease Notes**, v. 8, p. 111-114, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13314-013-0109-7>
- [50] LIOTTI, R.G.; SILVA FIGUEIREDO, M.I.; DA SILVA, G.F.; DE MENDONÇA, E.A.F.; SOARES, M.A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological research**, v. 207, p. 8-18, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.011>
- [51] MARIMUTHU, S.; KARTHIC, C.; MOSTAFA, A.A.; AL-ENAZI, N.M.; ABDEL-RAOUF, N.; SHOLKAMY, E.N. Antifungal activity of *Streptomyces* sp. SLR03 against tea fungal plant pathogen *Pestalotiopsis theae*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 8, p. 3258-3264, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.08.027>
- [52] GASPAROTTO, L.; CATARINO, A.D.M.; DA SILVA, G.F.; MORAES CATARINO, A.; DA SILVA, G.F. Mancha concêntrica: nova doença do noni, causada por *Sclerotium coffeicola*. **Embrapa, Comunicado Técnico**, v. 143, 2019.

- [53] GUPTA, A.K.; GURJAR, P.S.; BEER, K.; PONGENER, A.; RAVI, S.C.; SINGH, S.; VERMA, D.K. A review on valorization of different byproducts of mango (*Mangifera indica* L.) for functional food and human health. **Food Bioscience**, v. 48, p. 101783, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101783>
- [54] RIBEIRO, S.M.R.; SCHIEBER, A. Bioactive compounds in mango (*Mangifera indica* L.). In: **Bioactive foods in promoting health**. Academic Press, 2010. p. 507-523. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374628-3.00034-7>
- [55] MARQUES, L.L.M.; FERREIRA, E.D.F.; PAULA, M.N.; KLEIN, T.; DE MELLO, J.C.P. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant—a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 77-110, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.08.007>
- [56] CAO, P.; LI, C.; WANG, H.; YU, Z.; XU, X.; WANG, X.; XIANG, W. Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria in healthy and diseased cucumber plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a promising biocontrol agent. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 236, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020236>
- [57] GE, M.; CAI, X.; WANG, D.; LIANG, H.; ZHU, J.; LI, G.; *et al.* (2023). Efficacy of *Streptomyces murinus* JKTJ-3 in Suppression of *Pythium Damping-Off* of Watermelon. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1360, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061360>
- [58] WANG, Y.; YANG, D.; YU, Z. New Lactones Produced by *Streptomyces* sp. SN5431 and Their Antifungal Activity against *Bipolaris maydis*. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 616, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030616>
- [59] MATTEI, V.; MOTTA, A.; SARACCHI, M.; KUNOVA, A.; CORTESI, P.; PIZZATTI, C.; *et al.* Wheat seed coating with *Streptomyces* sp. strain DEF39 spores protects against *Fusarium* Head Blight. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1536, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081536>
- [60] LIOTTI, R.G.; DA SILVA FIGUEIREDO, Maria Isabela; SOARES, Marcos Antonio. *Streptomyces griseocarneus* R132 controls phytopathogens and promotes growth of pepper (*Capsicum annum*). **Biological Control**, v. 138, p. 104065, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104065>
- [61] ABDELGAWAD, H.; ABUELSOUD, W.; MADANY, M.M.; SELIM, S.; ZINTA, G.; MOUSA, A.S.; *et al.* Actinomycetes enrich soil rhizosphere and improve seed quality as well as productivity of legumes by boosting nitrogen availability and metabolism. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1675, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10121675>
- [62] HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00050-14>
- [63] JAYASINGHE, B.D.; PARKINSON, D. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. **Applied soil ecology**, v. 38, n. 2, p. 109-118, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.09.005>

[64] SHAHZAD, R.; KHAN, A.L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I.J. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 319267, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024>

Capítulo 3

[1] SOUZA RODRIGUES, R.; SOUZA, A.Q.L.; FEITOZA, M.D.O.; ALVES, T.C.L.; BARBOSA, A.N.; SILVA SANTIAGO, S.R.S.; SOUZA, A.D.L. Biotechnological potential of actinomycetes in the 21st century: a brief review. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 117, n. 1, p. 82, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10482-024-01964-y>

[2] DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R.A.; TAUF, T. *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>

[3] KOMAKI, H. Recent progress of reclassification of the genus *Streptomyces*. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 831, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040831>

[4] OYEDOH, O.P.; YANG, W.; DHANASEKARAN, D.; SANTOYO, G.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Rare rhizo-Actinomycetes: A new source of agroactive metabolites. **Biotechnology Advances**, p. 108205, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108205>

[5] KEKUDA, T.R.P.; SHOBHA, K.S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p. 250-256, 2010.

[6] LACEY, H.J.; RUTLEDGE, P.J. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 887, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>

[7] WANG, K.; KE, S.; FANG, W.; WU, Z.; ZHANG, Y. Novel agroactive secondary metabolites from actinomycetes in the past two decades with focus on screening strategies and discovery. **Natural Products from Actinomycetes: Diversity, Ecology and Drug Discovery**, p. 199-221, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-6132-7_9

[8] YAN, S.; ZENG, M.; WANG, H.; ZHANG, H. *Micromonospora*: A prolific source of bioactive secondary metabolites with therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 13, p. 8735-8771, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00626>

[9] BARKA, E.A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.P.; *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016. <https://doi.org/10.1128/mmmbr.00019-15>

- [10] BELKNAP, K.C.; PARK, C.J.; BARTH, B.M.; ANDAM, C.P. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 2003, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58904-9>
- [11] MURRAY, C.J.; IKUTA, K.S.; SHARARA, F.; SWETSCHINSKI, L.; AGUILAR, G.R.; GRAY, A.; *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- [12] WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. (acessado em 13 de maio de 2022: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>).
- [13] CHAN, K.; TUSTING, L.S.; BOTTOMLEY, C.; SAITO, K.; DJOUAKA, R.; LINES, J. Malaria transmission and prevalence in rice-growing versus non-rice-growing villages in Africa: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 3, p. e257-e269, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00349-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00349-1)
- [14] KATAK, R.D.M.; CINTRA, A.M.; BURINI, B.C.; MARINOTTI, O.; SOUZA-NETO, J.A.; ROCHA, E. M. Biotechnological Potential of Microorganisms for Mosquito Population Control and Reduction in Vector Competence. **Insects**, v. 14, n. 9, p. 718, 2023. <https://doi.org/10.3390/insects14090718>
- [15] RAYMAEKERS, K.; PONET, L.; HOLTAPPELS, D.; BERCKMANS, B.; CAMMUE, B.P. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- [16] WORLD HEALTH ORGANIZATION STATISTICS 2016: monitoring health for the SDGs sustainable development goals. ([https://www.who.int/data/gho/data/themes/antimicrobial-resistance-\(amr\)](https://www.who.int/data/gho/data/themes/antimicrobial-resistance-(amr)) accessed 15 May 2022).
- [17] MA, D.; ZHU, J.; JIANG, J.; ZHAO, Y.; LI, B.; MU, W.; LIU, F. Evaluation of bioactivity and control efficacy of tetramycin against *Corynespora cassiicola*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 152, p. 106-113, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.09.0093>.
- [18] HUANG, H.K.; LIU, C.E.; LIOU, J.H.; HSIUE, H.C.; HSIAO, C.H.; HSUEH, P.R. Subcutaneous infection caused by *Corynespora cassiicola*, a plant pathogen. **Journal of Infection**, v. 60, n. 2, p. 188-190, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.11.002>
- [19] O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S.G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M.F.; *et al.* Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1060-1065, 2012. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- [20] LIOTTI, R.G.; SILVA FIGUEIREDO, M.I.; DA SILVA, G.F.; DE MENDONÇA, E.A.F.; SOARES, M.A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological research**, v. 207, p. 8-18, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.011>

- [21] GASPAROTTO, L.; CATARINO, A.D.M.; DA SILVA, G.F.; MORAES CATARINO, A.; DA SILVA, G.F. Mancha concêntrica: nova doença do noni, causada por *Sclerotium coffeicola*. **Embrapa, Comunicado Técnico**, v. 143, 2019.
- [22] PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. **The lancet oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7)
- [23] WORLD HEALTH STATISTICS 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>. Accessed 20 May 2022)
- [24] SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [25] RAFAEL S.R.; ANTONIA Q. L.S.; ANDERSON N.B.; SARAH R.S.S.S.; ALDENORA S.V.; RONERES D.B.; *et al.* Biodiversity and antifungal activities of Amazonian actinomycetes isolated from rhizospheres of *Inga edulis* plants. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. XX, n. XX, p. XX-XXX, 2024.
- [26] SOUZA, A.Q.L.D.; SOUZA, A.D.L.D.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.D.M.; PEREIRA, J. O. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens benthani*. **Acta amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>
- [27] PRJIBELSKI, A.; ANTIPOV, D.; MELESHKO, D.; LAPIDUS, A.; KOROBAYNIKOV, A. Using SPAdes de novo assembler. **Current protocols in bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. e102, 2020. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- [28] AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC genomics**, v. 9, p. 1-15, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- [29] MEIER-KOLTHOFF, J.P.; GÖKER, M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 2182, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10210-3>
- [30] RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126-19131, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106>
- [31] RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; OLIVER GLÖCKNER, F.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, v. 32, n. 6, p. 929-931, 2016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- [32] YOON, S.H.; HA, S.M.; LIM, J.; KWON, S.; CHUN, J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 1281-1286, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>

- [33] BLIN, K.; SHAW, S.; MEDEMA, M.H.; WEBER, T. The antiSMASH database version 4: additional genomes and BGCs, new sequence-based searches and more. **Nucleic acids research**, v. 52, n. D1, p. D586-D589, 2024. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad984>
- [34] GILCHRIST, C.L.M.; CHOOI, Y. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. **Bioinformatics**, v. 37, n. 16, p. 2473-2475, 2021. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>
- [35] AHMED, S.A.; GOGAL JR, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90396-4)
- [36] TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976. <https://doi.org/10.1126/science.781>
- [37] OLIVEIRA, M.R.; KATAK, R.D.M.; SILVA, G.F.; MARINOTTI, O.; TERENIUS, O.; TADEI, W.P.; SOUZA, A.Q.L. Extracts of Amazonian fungi with larvicidal activities against *Aedes aegypti*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 743246, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743246>
- [38] DULMAGE, H.T.; YOUSTEN, A.A.; SINGER, S.L.L.A.; LACEY, L.A. Guidelines for production of *Bacillus thuringiensis* H-14 and *Bacillus sphaericus*. **World Health Organization**, 1990.
- [39] WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. Available, 2005. (accessed dezembro 12, 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69101>).
- [40] DANGA, Y.S.P.; NUKENINE, E.N.; YOUNOUSSA, L.; ESIMONE, C.O. Phytochemicals and larvicidal activity of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) leaf extracts against *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **J. Pure Appl. Zool**, v. 2, n. 2, p. 160-171, 2014.
- [41] NOGUCHI, H.; HARRISON, P.H.; ARAI, K.; NAKASHIMA, T.T.; TRIMBLE, L.A.; VEDERAS, J.C. Biosynthesis and full NMR assignment of fungichromin, a polyene antibiotic from *Streptomyces cellulose*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 9, p. 2938-2945, 1988. <https://doi.org/10.1021/ja00217a041>
- [42] NICHOLS, J.D.; CARPENTER, F.L. Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia amazonia*. **Forest Ecology and Management**, v. 233, n. 2-3, p. 344-351, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.031> <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.05.031>
- [43] IGLESIAS, L.; SALAS, E.; LEBLANC, H.A.; NYGREN, P. Response of *Theobroma cacao* and *Inga edulis* seedlings to cross-inoculated populations of arbuscular mycorrhizal fungi. **Agroforestry systems**, v. 83, p. 63-73, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10457-011-9400-9>
- [44] MACIEJEWSKA, M.; PESSI, I.S.; ARGUELLES-ARIAS, A.; NOIRFALISE, P.; LUIS, G.; ONGENA, M.; *et al.* *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, p. 519-531, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0348-4>

- [45] SHIRLING, E.T.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.
- [46] MEIER-KOLTHOFF, J.P.; CARBASSE, J.S.; PEINADO-OLARTE, R.L.; GÖKER, M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D801-D807, 2022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- [47] KOMAKI, H. Reclassification of *Streptomyces costaricanus* and *Streptomyces phaeoigriseichromatogenes* as later heterotypic synonyms of *Streptomyces murinus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 004638, 2021. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004638>
- [48] LEE, I.; OUK KIM, Y.; PARK, S.C.; CHUN, J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 2, p. 1100-1103, 2016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760>
- [49] PRASAD, A.; LORENZEN, E.D.; WESTBURY, M.V. Evaluating the role of reference-genome phylogenetic distance on evolutionary inference. **Molecular ecology resources**, v. 22, n. 1, p. 45-55, 2022. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13457>
- [50] OYEDOH, O.P.; YANG, W.; DHANASEKARAN, D.; SANTOYO, G.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Sustainable agriculture: Rare-actinomycetes to the rescue. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 666, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030666>
- [51] SCHÜTZE, Eileen et al. Siderophore production by streptomycetes—stability and alteration of ferrihydroxamates in heavy metal-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 19376-19383, 2015.
- [52] JIANG, J.; HE, X.; CANE, D.E. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 11, p. 711-715, 2007. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.29>
- [53] GARBEVA, P.; AVALOS, M.; ULANOVA, D.; VAN WEZEL, G.P.; DICKSCHAT, J.S. Volatile sensation: The chemical ecology of the earthy odorant geosmin. **Environmental Microbiology**, v. 25, n. 9, p. 1565-1574, 2023. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16381>
- [54] SHEIKHPOUR, M.; SADEGHI, A.; YAZDIAN, F.; MOVAFAGH, A.; MANSOORI, A. Anticancer and apoptotic effects of ectoine and hydroxyectoine on non-small cell lung cancer cells: An in-vitro investigation. **stress**, v. 16, p. 20-23, 2019. <https://10.30699/acadpub.mci.3.2.14>
- [55] LIU, M.; LIU, H.; SHI, M.; JIANG, M.; LI, L.; ZHENG, Y. Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>

- [56] ZHOU, S.; SONG, L.; MASSCHELEIN, J.; SUMANG, F.A.; PAPA, I.A.; ZULAYBAR, T.O.; CHALLIS, G. L. Pentamycin biosynthesis in Philippine *Streptomyces* sp. S816: cytochrome P450-catalyzed installation of the C-14 hydroxyl group. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 1305-1309, 2019. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00270>
- [57] KRANZLER, M.; SYROWATKA, M.; LEITSCH, D.; WINNIPS, C.; WALOCHNIK, J. Pentamycin shows high efficacy against *Trichomonas vaginalis*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 4, p. 434-437, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.024>
- [58] ARULPRAKASAM, K.R.; DHARUMADURAI, D. Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105252, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105252>
- [59] BARONA-GÓMEZ, F.; WONG, U.; GIANNAKOPOULOS, A.E.; DERRICK, P.J.; CHALLIS, G.L. Identification of a Cluster of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces c oelicolor* M145. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 50, p. 16282-16283, 2004. <https://doi.org/10.1021/ja045774k>
- [60] CHIANI, M.; AKBARZADEH, A.; FARHANGI, A.; MEHRABI, M.R. Production of desferrioxamine B (Desferal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 13, n. 23, p. 1151-1155, 2010. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2010.1151.1155>
- [61] ARMIN, R.; ZÜHLKE, S.; MAHNKOPP-DIRKS, F.; WINKELMANN, T.; KUSARI, S. Evaluation of apple root-associated endophytic *Streptomyces pulveraceus* strain ES16 by an OSMAC-assisted metabolomics approach. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 643225, 2021. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.643225>
- [62] GREULE, A.; MAROLT, M.; DEUBEL, D.; PEINTNER, I.; ZHANG, S.; JESSEN-TREFZER, C.; *et al.* Wide distribution of foxicin biosynthetic gene clusters in *Streptomyces* strains—An unusual secondary metabolite with various properties. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 221, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00221>
- [63] HAN, L.; SCHWABACHER, A.W.; MORAN, G.R.; SILVAGGI, N.R. *Streptomyces wadayamensis* MppP is a pyridoxal 5'-phosphate-dependent l-arginine α -deaminase, γ -hydroxylase in the enduracididine biosynthetic pathway. **Biochemistry**, v. 54, n. 47, p. 7029-7040, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01016>
- [64] DUAN, H.; WANG, F.; ZHANG, C.; DONG, Y.; LI, H.; XIAO, F.; *et al.* Elucidation of the Late Steps during Hexacosalactone A Biosynthesis in *Streptomyces samsunensis* OUCT16-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 3, p. e01958-22, 2023. <https://doi.org/10.1128/aem.01958-22>
- [65] LIU, W.T.; LAMSA, A.; WONG, W.R.; BOUDREAU, P.D.; KERSTEN, R.; PENG, Y.; *et al.* MS/MS-based networking and peptidogenomics guided genome mining revealed the stenothricin gene cluster in *Streptomyces roseosporus*. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 99-104, 2014. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.99>

- [66] OLANO, C.; WILKINSON, B.; SÁNCHEZ, C.; MOSS, S.J.; SHERIDAN, R.; MATH, V.; *et al.* Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tü4055: cluster analysis and assignment of functions. **Chemistry & Biology**, v. 11, n. 1, p. 87-97, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.12.018>
- [67] SCHULZE, C.J.; BRAY, W.M.; LOGANZO, F.; LAM, M.H.; SZAL, T.; VILLALOBOS, A.; *et al.* Borrelidin B: isolation, biological activity, and implications for nitrile biosynthesis. **Journal of natural products**, v. 77, n. 11, p. 2570-2574, 2014. <https://doi.org/10.1021/np500727g>
- [68] Dong, Y.; Ding, W.; Sun, C.; Ji, X.; Ling, C.; Zhou, Z.; *et al.* Julichrome Monomers from Marine Gastropod Mollusk-Associated *Streptomyces* and Stereochemical Revision of Julichromes Q3· 5 and Q3· 3. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 4, p. e2000057, 2020. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000057>
- [69] SNYDER, A.; TANG, Z.; GUPTA, R. Enantioselective total synthesis of (–)-napyramycin A1 via asymmetric chlorination of an isolated olefin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 16, p. 5744-5745, 2009. <https://doi.org/10.1021/ja9014716>
- [70] STADLER, M.; BITZER, J.; MAYER-BARTSCHMID, A.; MÜLLER, H.; BENET-BUCHHOLZ, J.; GANTNER, F.; *et al.* Cinnabaramides A– G: analogues of lactacystin and salinosporamide from a terrestrial streptomycete. **Journal of natural products**, v. 70, n. 2, p. 246-252, 2007. <https://doi.org/10.1021/np060162u>
- [71] HUCZYNSKI, A. Salinomycin—a new cancer drug candidate. **Chemical biology & drug design**, v. 79, n. 3, p. 235-238, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01287.x>
- [72] Shi, J.; Liu, C.L.; Zhang, B.; Guo, W.J.; Zhu, J.; Chang, C.Y.; *et al.* Genome mining and biosynthesis of kitacinnamycins as a STING activator. **Chemical Science**, v. 10, n. 18, p. 4839-4846, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9SC00815B>
- [73] HECHT, S.M. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. **Journal of natural products**, v. 63, n. 1, p. 158-168, 2000. <https://doi.org/10.1021/np990549f>
- [74] Wang, K.K.A.; Ng, T.L.; Wang, P.; Huang, Z.; Balskus, E. P.; van der Donk, W.A. Glutamic acid is a carrier for hydrazine during the biosyntheses of fosfazinomycin and kinamycin. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3687, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06083-7>
- [75] RAMBABU, V.; SUBA, S.; VIJAYAKUMAR, S. Antimicrobial and antiproliferative prospective of kosinostatin—a secondary metabolite isolated from *Streptomyces* sp. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 6, p. 378-382, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.11.002>
- [76] CARBONE, M.; IRACE, C.; COSTAGLIOLA, F.; CASTELLUCCIO, F.; VILLANI, G.; CALADO, G.; *et al.* A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 8, p. 2668-2670, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.02.020>

- [77] XU, F.; LIANG, Y.; REN, J.; WANG, S.; ZHAN, J. Discovery of a novel analogue of FR901533 and the corresponding biosynthetic gene cluster from *Streptosporangium roseum* no. 79089. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 7131-7142, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10765-y>
- [78] REEGAN, A.D.; KUMAR, P.S.; ASHARAJA, A.C.; DEVI, C.; JAMEELA, S.; BALAKRISHNA, K.; *et al.* Larvicidal and ovicidal activities of phenyl acetic acid isolated from *Streptomyces collinus* against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Experimental Parasitology**, v. 226, p. 108120, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108120>
- [79] KUMAR, A.; PRASAD, A. Semi-field evaluation of bacterial bio-pesticide *Streptomyces indiaensis* (LMG19961) susceptibility against Dengue Vector: *Aedes aegypti* (L.). **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2024. <https://doi.org/10.1007/s42690-023-01131-2>
- [80] TAN, K.S.; AZMAN, A.S.; HASSANDARVISH, P.; AMELIA-YAP, Z.H.; TAN, T.K.; LOW, V.L. Protein Profiling of *Aedes aegypti* Treated with *Streptomyces* sp. KSF103 Ethyl Acetate Extract Reveals Potential Insecticidal Targets and Metabolic Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12398, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms241512398>
- [81] FITRI, L.E.; ALKARIMAH, A.; CAHYONO, A.W.; LADY, W.N.; ENDHARTI, A.T.; NUGRAHA, R.Y.B. Effect of Metabolite Extract of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* on *Plasmodium falciparum* 3D7 in Vitro. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 14, n. 3, p. 444, 2019.
- [82] ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; KRAMYU, J.; TANTICHARON, M.; THEBTARANONTH, Y. Potent in vitro antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1112-1113, 2002. <https://doi.org/10.1128/aac.46.4.1112-1113.2002>
- [83] FANG, Q.; MAGLANGIT, F.; WU, L.; EBEL, R.; KYEREMEH, K.; ANDERSEN, J.H.; *ET AL.* Signalling and bioactive metabolites from *Streptomyces* sp. RK44. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 460, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25030460>
- [84] UMEDA, T.; TANAKA, N.; KUSAKABE, Y.; NAKANISHI, M.; KITADE, Y.; NAKAMURA, K.T. Molecular basis of fosmidomycin's action on the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Scientific Reports**, v. 1, n. 1, p. 9, 2011. <https://doi.org/10.1038/srep00009>
- [85] NA, M.; MEUJO, D.A.; KEVIN, D.; HAMANN, M.T.; ANDERSON, M.; HILL, R.T. A new antimalarial polyether from a marine *Streptomyces* sp. H668. **Tetrahedron letters**, v. 49, n. 44, p. 6282-6285, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.08.052>
- [86] LOTFY, M.M.; HASSAN, H.M.; MOHAMMED, R.; HETTA, M.; EL-GENDY, A.O.; RATEB, M.E.; *et al.* Chemical profiling and biological screening of some river Nile derived-microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 435978, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00787>

- [87] DE AZEVEDO, V.L.S.; ROSA, F.C.; DIAS, L.R.L.; BATISTA, L.A.; MELO, M.C.; SALES, L.A.T.; *et al.* An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3). **Microorganisms**, v. 12, n. 3, p. 476, 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030476>
- [88] SUDHA, S.; MASILAMANI, S.M. Characterization of cytotoxic compound from marine sediment derived actinomycete *Streptomyces avidinii* strain SU4. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 10, p. 770-773, 2012
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60227-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60227-5)
- [89] WANG, M.; CARVER, J.J.; PHELAN, V.V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- [90] AL-FADHLI, A.A.; THREADGILL, M.D.; MOHAMMED, F.; SIBLEY, P.; AL-ARIQI, W.; PARVEEN, I. Macrolides from rare actinomycetes: Structures and bioactivities. **International journal of antimicrobial agents**, v. 59, n. 2, p. 106523, 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106523>
- [91] LI, J.; SANG, M.; JIANG, Y.; WEI, J.; SHEN, Y.; HUANG, Q.; NI, J. Polyene-producing *Streptomyces* spp. from the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* exhibit high inhibitory activity against the antagonistic fungus *Xylaria*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 649962, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649962>
- [92] WANG, W.; SONG, T.; CHAI, W.; CHEN, L.; CHEN, L.; LIAN, X.Y.; ZHANG, Z. Rare polyene-polyol macrolides from mangrove-derived *Streptomyces* sp. ZQ4BG. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1703, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01912-z>
- [93] ZHANG, C.W.; ZHONG, X.J.; ZHAO, Y.S.; RAJOKA, M.S.R.; HASHMI, M.H.; ZHAI, P.; SONG, X. Antifungal natural products and their derivatives: A review of their activity and mechanism of actions. **Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine**, v. 7, p. 100262, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100262>
- [94] PAYERO, T.D.; VICENTE, C.M.; RUMBERO, Á.; BARREALES, E.G.; SANTOS-ABERTURAS, J.; DE PEDRO, A.; *et al.* Functional analysis of filipin tailoring genes from *Streptomyces filipinensis* reveals alternative routes in filipin III biosynthesis and yields bioactive derivatives. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1-14, 2015.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0307-4>
- [95] SHIH, H.D.; LIU, Y.C.; HSU, F.L.; MULABAGAL, V.; DODDA, R.; HUANG, J.W. Fungichromin: a substance from *Streptomyces padanus* with inhibitory effects on *Rhizoctonia solani*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 1, p. 95-99, 2003.
<https://doi.org/10.1021/jf025879b>
- [96] WAN, M.; GAN, L.; LI, Z.; WANG, M.; CHEN, J.; CHEN, S.; *et al.* Enhancement of fungichromin production of *Streptomyces* sp. WP-1 by genetic engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 17, p. 5415-5425, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12672-4>

[97] BABCZYK, A.; MENCHE, D. Total Synthesis of Pentamycin by a Conformationally Biased Double Stille Ring Closure with a Trienyl-bis-stannane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 145, n. 20, p. 10974-10979, 2023. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c03011>

APÊNDICES

COAUTORIA EM ARTIGO PUBLICADO DERIVADO DA TESE

PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY
<https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2315476>



Biotransformation of monoterpenes using *Streptomyces* strains from the rhizosphere of *Inga edulis* Martius from in an Amazonian urban forest fragment

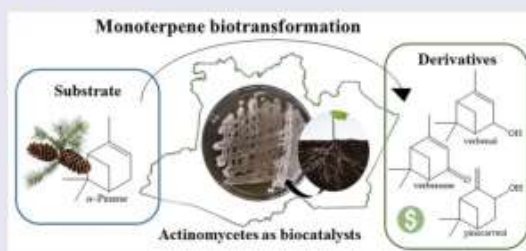
Elison de Souza Sevalho^{a,b} , Rafael de Souza Rodrigues^{a,b} , Antonia Queiroz Lima de Souza^{a,b,c} and Afonso Duarte Leão de Souza^{a,b,d}

^aGraduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the BIONORTE Network (PPG-BIONORTE), Amazonas State University (UEA), Manaus, Amazonas, Brazil; ^bAnalytical Center - Center of Multidisciplinary Support, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil; ^cFaculty of Agricultural Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil; ^dDepartment of Chemistry, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas, Brazil

ABSTRACT

To investigate the biocatalytic potential of Amazonian actinomycetes for monoterpenes biotransformation. To carry out the present study, eleven actinomycetes of the genus *Streptomyces* isolated from inga-cipó (*Inga edulis* Mart.) rhizospheres were tested for their ability to bioconvert the substrates *R*-(+)-limonene, *S*-(-)-limonene, 1*S*-(-)- α -pinene, and (-)- β -pinene as sole carbon and energy source. According to gas chromatography-mass spectrometry analysis, three strains, LabMicra B270, LabMicra B310, and LabMicra B314, were able to biotransform 1*S*-(-)- α -pinene after 96 h of growth. However, *Streptomyces* LabMicra B270 was the most promising since it converted after only 72 h all the 1*S*-(-)- α -pinene mainly into *cis*-verbenol (74.9 $\pm$ 1.24%) and verbenone (18.2 $\pm$ 1.20%), compounds that have important biological activities and great industrial interest as additives in foods and cosmetics. These findings can stimulate the development of natural aromas using naturally abundant monoterpenes, ratify the potential of microorganisms from almost unexplored niches such as the Amazonian rhizosphere, and reinforce the importance of preserving those niches.

GRAPHICAL ABSTRACT



KEYWORDS

Amazonian actinomycetes;
 bioconversion; *cis*-verbenol;
 monoterpene hydrocarbons;
 rhizosphere microbiome

Introduction

Biotransformation has emerged as an attractive alternative for the derivatization of terpenes since, when compared to laboratory synthesis, it utilizes mild conditions, has an elevated regio- and enantioselectivity, does not generate toxic wastes, and generates products that can be labeled as "natural compounds." However, the most significant advantage of biotransformation processes is their ability to produce compounds that are not easily obtained by chemical methods.^(1,2) Performed *in vitro* or in tanks, biotransformation with

microbial cells (bacteria, yeasts, and filamentous fungi) or enzymes can be repeated indefinitely, without further damage to the environment, which gives it another advantage.^(3,4)

In the last years, the biotechnological production of natural compounds has increased and has become promising for enabling the formation of aroma compounds. One reason for this rise in interest in biotechnological processes for producing aromas is the possibility of using agro-industrial by-products that are rich in monoterpene compounds, e.g., limonene and pinene, that can be used as substrates for

CONTACT Elison de Souza Sevalho elisonsevalho@hotmail.com Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the BIONORTE Network (PPG-BIONORTE), Amazonas State University (UEA), Manaus, Amazonas 690065-130, Brazil.

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2315476>.

© 2024 Taylor & Francis Group, LLC

biotransformation.^[5,6] The biotechnological importance of using monoterpenes as substrates for producing aroma compounds has been described and reviewed to a greater degree in the last few years.^[2,7]

R-(+)-limonene (PubChem CID: 440917) and *S*-(-)-limonene (PubChem CID: 439250) are the most studied monoterpenes and the former is one of the most abundant in nature and a major constituent of several essential oils of mainly citrus species.^[6] It is present in high concentrations in orange peel oil (approximately 90%) and can be obtained in large amounts as a by-product in the production of citrus juices and pulps.^[9] The two limonene isomers are inexpensive precursors for the production of more expensive oxygenated derivatives such as carveol, carvone isomers, perillyl alcohol, menthol, *p*-cymene, limonene-1,2-diol and α -terpineol, among others. They also have a broad range of applications due to their odorant and bioactive properties.^[8]

Other important monoterpenes are pinenes, which are bicyclic monoterpenes found in two isomeric forms, α -pinene (PubChem CID: 6654) and β -pinene (PubChem CID: 14896). α - and β -pinenes represent 75% to 90% of the essential oil from conifers and can be found in concentrations ranging from 50% to 70% and from 15% to 30%, respectively, in turpentine oil (crude resin from conifer trees, especially pine trees), an abundant by-product of the paper and cellulose industry.^[10] As such, α -pinene and β -pinene have been employed as substrates in biotransformation processes for the formation of important aroma compounds, including verbenol, verbenone, myrtenol, and α -terpineol.^[11]

Despite the various advantages of biotransformation using microorganisms, including more economical and eco-friendly procedures (green chemistry principles), it naturally has certain challenges,^[4] such as achieving an efficient and feasible strain and the possible toxicity of the substrate to some of the microorganisms being screened. Therefore, many studies have focused on selecting new biocatalysts for the biotransformation of many substrates, including terpenes.^[5] Fortunately, the worldwide diversity of microorganisms is enormous, which makes them an almost inexhaustible group of biocatalysts.

Brazil retains 15–20% of the world's biodiversity, especially in the Amazon, and therefore has an incalculable number of unexplored microorganisms for biotechnological applications,^[12] including actinomycetes, which are highly diverse and can be found in varied habitats and can grow in a large variety of substrates.^[13,14] Besides their importance to the sustainability of the Amazon Forest and as sources of antibiotics, the actinomycetes can also be explored for diverse biotechnological purposes, including the biotransformation of terpenes, which is a subject that is poorly targeted worldwide. Therefore, the objective of this study was to investigate the capacity of actinomycetes of the genus *Streptomyces*, isolated from the rhizosphere of *Inga-cipó* (*Inga edulis* Mart.) in the Brazilian Amazon, for the biotransformation of the monoterpenes limonene and pinene, which are abundant and

cheap precursors of many aromas that have high added value.

Materials and methods

Chemicals

All the chemicals for the culture media for the growth and maintenance of the fungal cultures were purchased from Kasvi Brasil (São José dos Pinhais, Brazil) and Biotec Reagentes Analíticos (Paraná, Brazil). All the reagents used in the preparation of the mineral medium were of analytical grade and were obtained from Nuclear-CAQ Casa da Química Ltda. (Diadema, Brazil). Ultrapure water (resistivity ≥ 18.2 M Ω /cm) was purified using a Milli-Q gradient system (Millipore, Milford, USA). The standards *R*-(+)-limonene ($\geq 93\%$), *S*-(-)-limonene ($\geq 95\%$), 1*S*-(-)- α -pinene ($\geq 97\%$), and (-)- β -pinene ($\geq 97\%$) used as substrates were acquired from Sigma-Aldrich Brazil (São Paulo, Brazil). The ethyl acetate (HPLC/Spectrophotometric) used for sample preparation was purchased from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil).

Microorganisms

The *Streptomyces* actinomycete strains used in this study belong to the bacterial collection of the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon (LaBMicA) at the Analytical Center of the Multidisciplinary Support Center of the Federal University of Amazonas (CA/CAM/UFAM). All the strains were isolated from the rhizosphere of *Inga-cipó* plants (*Inga edulis* Mart.) collected out in three different points on the campus of the Federal University of Amazonas (UFAM) in Manaus, Amazonas state (Point 1–3°05'19.4" S 59°58'00.5" W, Point 2–3°05'20.8" S 59°57'57.5" W, and Point 3–3° 5'19.06"S 59°57'56.26"W). The actinomycete strains were identified in the *Streptomyces* genus using the genes banks NCBI and EzBioCloud (Table 1). In accordance with Brazilian legislation, all fungi were registered in the Brazilian National System of Genetic Heritage Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen) under number AC1746C. The information of all *Streptomyces* strains identified in this study is listed in Table 1.

Inoculum preparation

The strains of actinomycetes were cultivated in Petri dishes containing the International *Streptomyces* Project-2 semi-solid culture medium (ISP2) (10 g/L starch, 4 g/L yeast extract, 10 g/L malt, 4 g/L dextrose, and 20 g/L agar) at 28 °C for eight days to confirm the viability and purity of the preserved samples. Macro- and micromorphological confirmation of each strain was conducted by microculture on a slide. Then, two 1 cm² fragments of each strain on agar were inoculated in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 50 mL of ISP2 liquid culture medium. The conical flask was incubated at 28 °C in a rotary shaker at 120 rpm for 72 hr.^[15]

Table 1. Similarities in two GenBanks for the *Streptomyces* strains screened for monoterpenes biotransformation in this work.

Strains ^a	Correspondent at GenBank/NCBI	Similarity (%)	Correspondent at EzBioCloud	Similarity (%)
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B267	<i>S. pulveraceus</i> NBRC 3855	99.51%	<i>S. silvae</i> For3	99.34%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B270	<i>S. bulii</i> strain C2	96.41%	<i>S. murinus</i> NBRC 12799	98.36%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B271	<i>S. gramineus</i> NBRC 15420	97.53%	<i>S. gramineus</i> NBRC 15420	96.66%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B272	<i>S. acidicola</i> K1PN6	88.60%	<i>S. sundarbansensis</i> MS1/7	78.35%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B278	<i>S. misionensis</i> JCM 4497	93.78%	<i>S. misionensis</i> DSM 40306	94.51%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B301	<i>S. pulveraceus</i> NBRC 3855	96.65%	<i>S. durocortensis</i> RHZ10	96.93 %
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B310	<i>S. pulveraceus</i> sNBRC 3855	98.96%	<i>S. durocortensis</i> RHZ10	99.07 %
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B314	<i>S. olivaceus</i> NBRC 12805	99.61%	<i>S. olivaceus</i> NRRL B-3009	99.74%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B318	<i>S. similanensis</i> KC-106	95.10%	<i>S. similanensis</i> KC-106	95.45%
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B303 ^b	—	—	—	—
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B209 ^b	—	—	—	—

^aThe suggestions from the gene banks were on basis of the 16S rRNA sequencing.^bNot sequenced. Identified as *Streptomyces* by microscopic analysis.

After incubation, the humid biomass was recovered by centrifuging at 4400 rpm and 28 °C for 10 min (Eppendorf Centrifuge 5702, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) under sterile conditions.

Screening for biotransformation assays

Screening experiments were performed in accordance with Molina et al.^[16] and Bier et al.^[17] in an aqueous system to obtain a high recovery rate of both transformed products. The biomass recovered as described above (2 g wet weight) was resuspended (under aseptic conditions) in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 50 mL of mineral medium (ultrapure water containing 0.5 g/L MgSO₄, 3 g/L NaNO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L KCl, and 0.01 g/L Fe₂SO₄; pH was not adjusted). After added 0.5% (v/v) of one of the substrates to be tested (*R*-(+)-limonene, *S*-(+)-limonene, 1*S*-(+)- α -pinene, and (-)- β -pinene), the flasks were incubated at 28 °C for 96 hr in a rotary shaker operating at 120 rpm. Controls of the biotransformation experiments were each substrate and the mineral medium, without any inoculum, and with only each inoculum in the medium, without any substrate. Periodically, 500 μ L samples from each treatment (biotransformation and control experiments) were taken every 24 hr in order to monitor the consumption of substrate and product formation. Each sample was extracted with the same volume of ethyl acetate. After phase separation in a vortex chamber, the organic layer was separated and stored at -80 °C until analysis.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis

The qualitative analysis was performed in accordance with Sevalho et al.^[18] using a gas chromatograph (Trace Ultra) coupled to a mass spectrometer (ISQ Single Quadrupole,

Thermo Scientific) equipped with a TR-5 capillary column (Trace) of 30 m length $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m of film thickness. The injection was done in split mode (split ratio of 1:30) using a 1 μ L sample. Helium was used as the carrier gas (flow rate 1.0 mL/min). The column temperature program was 40 °C (as the initial temperature) for 10 min, increased by 3 °C/min to 100 °C, followed by a constant ramp rate of 20 °C/min until reaching the temperature of 200 °C, which was maintained for 5 min. Other conditions: both injector and detector at 250 °C, ionization energy of 70 eV, scan without delay, and mass range of *m/z* 35–400.

Data analysis

The compounds were identified using the National Institute of Standards and Technology (NIST) library (similarities <90% were not considered). The ratio between the consumption of the substrate and its derived products was determined on the basis of the chromatographic peak areas using the Xcalibur software (version 2.2) of the GCMS system used. Three independent assays were performed for each experiment. Values are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) of the peak area of the chromatograms of the substrate and derived products. Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism (version 9.5.1) for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Results and discussion

Among the eleven *Streptomyces* actinomycete strains screened for the biotransformation of *R*-(+)-limonene, *S*-(+)-limonene, 1*S*-(+)- α -pinene, and (-)- β -pinene, three (27%) were able to biotransform at least or only one substrate, 1*S*-(+)- α -pinene, as the single carbon source. Eight actinomycete strains were

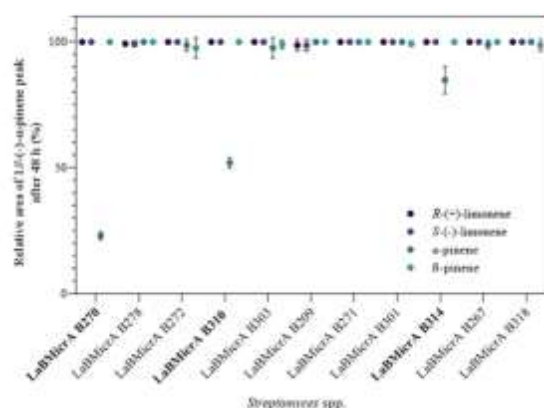


Figure 1. Diverse substrates after 48 hr of exposition for biotransformation using *Streptomyces* strains.

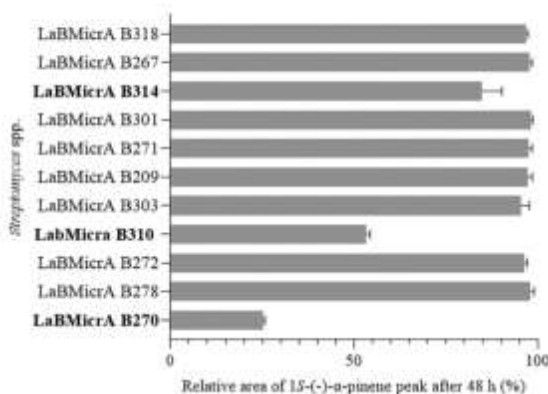


Figure 2. Relative peak areas in the GC-MS analysis showing the 1S-(-)-α-pinene substrate remaining after biotransformation using *Streptomyces* strains after 48 hr.

capable of using the hydrocarbons *R*-(+)-limonene, *S*-(+)-limonene, and (-)-β-pinene, respectively, the as the sole carbon source for growth, but not showed accumulation of metabolites (Figure 1), suggesting the complete degradation of these monoterpenes into carbon dioxide (CO₂). This problem may be related to the toxicity of monoterpene substrates that in many cases can inhibit the microorganisms and limit the maximum concentration of substrate used in the bioprocesses.^[7,19] Considering the eleven strains, any decrease in the absolute area of the substrate peak combined with the absence of any detectable peak of derivatives in the gas chromatography-mass spectrometry analysis was considered as being a loss for evaporation or consumption without any biotransformation.

The hydrocarbon structure of monoterpenes provides them with high hydrophobicity and, similarly to other membrane-active organic compounds like alkanes. The toxicity derived from hydrophobic organic compounds is correlated with the logarithm of its octanol/water partition coefficient (LogP or Log K_{ow}), in which LogP values ranging from 1 to 5 usually translate into compound toxicity for

whole cells. As an adaptive response, cells may change the membrane fatty acid profile to preserve membrane characteristics. Nevertheless, the mechanisms reported seem to be dependent on the genomic background of the cell and cell physiology (e.g., the growth phase), but also on the chemical properties (e.g., acyclic vs. cyclic, chain length, branching degree, and the degree and position of the oxyfunctionalization) and concentration of the stressor.^[6,7,20]

For Rottava et al.^[21] to reduce this effect of toxicity of these monoterpene compounds to microorganisms, the method of cell induction by the substrate has been employed, allowing the microorganism adaptation with lower amounts of substrate. In this context, slow continuous feeding (fed-batch fermentation), cell protection via immobilization or in situ flavor extraction membranes, and co-solvents are alternative approaches to overcome the problems related to substrates. Alternatively, procedures for strain adaptation or genetic engineering tools may be used to increase the substrate tolerance of fungal strains. The development of processes using engineered strains overexpressing genes related to key enzymes involved in biotransformation processes can be considered one of the most promising approaches for aroma production.^[5,22,23]

The three strains that were able to biotransform 1S-(-)-α-pinene, *Streptomyces* spp. LaBMicrA B270, LaBMicrA B310, and LaBMicrA B314 consumed this substrate completely and accumulated interesting compounds after 96 hr of reaction. However, *Streptomyces* sp. LaBMicrA B270 was the most promising one regarding its capacity to use the substrate as the single carbon and energy source in a mineral medium and accumulate products earlier, in only 48 hr (Figure 2).

There are many reports on the biotransformation of monoterpenes using microorganisms, most fungi, but there are not many that use actinomycetes, and almost none that use Amazonian microorganisms. Generally, in screening assays, the first experiments aim to identify the most adequate and robust strain for each process, since both substrate and product may cause inhibitory effects on cell growth. Therefore, all strains to be selected are incubated with the substrate to be used in order to find which strains can use the substrate as sole the carbon source, indicating the existence of a metabolic pathway for substrate degradation and possible accumulation of interesting secondary metabolite. In this context, many researchers have been focusing on identify new microorganisms that can be used in biotechnological process, through isolation, screening and selection of the best strains capable of producing aroma compounds from different substrates. This is a promising methodology since is a natural way to obtain new products at low costs.^[17]

It is interesting to notice that in this first step, the incubation conditions are usually similar in various screening works. This fact may be due to the necessity to maintain the optimum temperature, pH, and agitation for strain growth in order to have a better comparison of the results. The resistance to process conditions and ability of substrate degradation are important biocatalysts characteristics; however, it does not guarantee high concentration or specificity of products.^[4,24]

This investigation was focused more on the qualitative study of the products obtained than on your absolute earnings, to

select biocatalysts with potential for application in future, more detailed and larger-scale works. Substrate consumption and formation of biotransformation products were monitored by gas chromatography–mass spectroscopy (GC–MS) analysis.

The periodic GC–MS chromatographic profiles of the biotransformation samples of 1S-(α)-pinene using *Streptomyces* sp. LaBMicrA B270 showed the complete consumption of this substrate in 72 hr (Figure S1). According to GC–MS analyses and comparisons with the NIST library, the three main products were *cis*-verbenol, verbenone, and pinocarveol, all from oxidation changes and with the same bicyclic structure of the substrate. The high rates of *cis*-verbenol and verbenone stood out among them, with chromatographic areas of $74.9 \pm 1.24\%$ and $18.2 \pm 1.20\%$ of the total peak areas, respectively (Figures 2 and 3 and Table 2).

Despite taking an additional 24 hr, in other words, 96 hr of exposure, the biotransformation of 1S-(α)-pinene by the *Streptomyces* spp. LaBMicrA B310 and LaBMicrA B314 also presented *cis*-verbenol and verbenone as the major compounds together with other minor derivatives (Figures S2 and S3, respectively). From the Table 2 present the three *Streptomyces* strains promising able to bioconvert

1S-(α)-pinene into volatile compounds accumulated in the ethyl acetate fraction (%). Furthermore, no peak related to any hypothetical derivative from the substrates was detected in the experiment controls (Figure S4). For the above analyses, only peaks of the derivatives with similarities of $>90\%$ to the NIST proposals (Reverse Search Index) were considered.

So far, there are only a few reports on α -pinene oxidation via bacterial biotransformation. In a recent study, Saidani et al.^[25] showed the biotransformation of α -pinene by cell cultures of *Paenibacillus popilliae* 1C and *Streptomyces rochei* AB1, which resulted in the formation of main compounds such as *trans*-verbenol (59.47% and 40.40%, respectively).

Oxidative biotransformations of α -pinene led to chemical products commercially important as natural derivatives that are useful as flavors and fragrances with significant potential for industrial applications. These can take the following two competitive routes:^[1] epoxidation of the double bond of the cycle leading to pinene epoxide and diverse monoterpenoid derivatives and,^[2] as in the present work, allylic oxidation of α -pinene catalyzed by α -pinene monooxygenase with subsequent opening of the cyclobutene ring to form acyclic

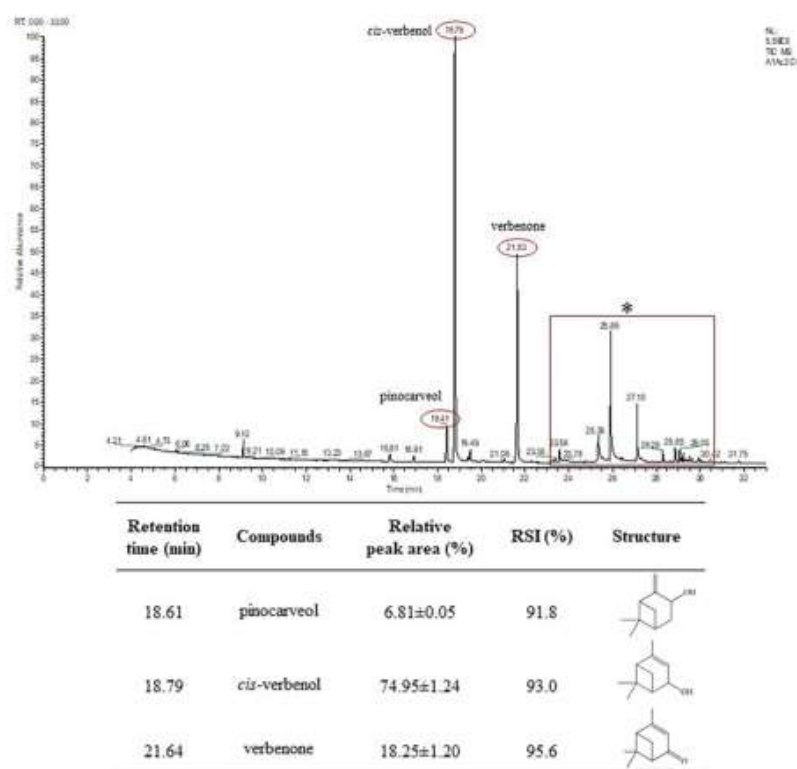


Figure 3. GC–MS chromatogram showing the biotransformation derivatives of 1S-(α)-pinene using *Streptomyces* sp. LaBMicrA B270 after 72 hr. RSI: Reverse Search Index. *Chromatographic column bleed.

Table 2. Derivatives obtained via biotransformation of 1S-(+)- α -pinene using *Streptomyces* spp.

RT	Compounds (%) ^a	LaBMicA B270	LaBMicA B310	LaBMicA B314
18.61	Pinocarveol	6.81 $\pm$ 0.05	4.82 $\pm$ 0.08	7.76 $\pm$ 0.48
18.79	Cis-verbenol	74.95 $\pm$ 1.24	57.39 $\pm$ 2.10	69.22 $\pm$ 1.17
21.19	Myrtenol	ND	ND	5.54 $\pm$ 0.63
21.64	Verbenone	18.25 $\pm$ 1.20	37.80 $\pm$ 2.10	17.49 $\pm$ 0.06

Note: RT; retention time; ND; not detected.

^aPercentage of peak area in the CG-MS analysis.

aldehydes in the production of verbenol-verbenone and myrtenol-myrtenal mixtures.^[26]

Among the value-added aromatic compounds, *cis*-verbenol (PubChem CID: 164888), our main finding, is a valuable food-flavoring compound and has a fresh pine odor. It is an ingredient for soft drinks, soups, meats, sausages, and ice cream. It also has biological activity such as antimicrobial and anti-fungicide properties.^[11] In addition, this aroma is a natural precursor of verbenone, and possesses anti-ischemic, antioxidant, and anti-inflammatory properties that prevent neuronal cell death caused by oxygen-glucose deprivation and reduce cerebral ischemic injury.^[24,27]

Verbenone (PubChem CID: 29025) is a colorless liquid with an odor typical of mint and camphor. It has been reported as having good pesticidal properties and acts as an anti-aggregation pheromone and a repellent for the pine bark beetle. It also has pharmacological properties like broncho-dilating, anti-inflammatory, and hemolytic activities.^[28,29] This product is mainly used in the food industry for the formulation of bakery products and sweets, but it can also be used as a starting material in the synthesis of various organic compounds, such as bicyclic lactones. These applications and the value of this compound make the biotechnological production of verbenone of great interest.^[11,30]

Economically, the advantages of the biotransformation of α -pinene are clear when comparing the reference prices of the substrate and products. For example, using the database of Merck KGaA (<https://www.sigmaaldrich.com/US/en>), the values of *cis*-verbenol (95%) are around US\$ 126.00 for 5 g and US\$ 403.00 for 25 g. The reference price of verbenone (94%) is around US\$ 82.60 for 10 g and US\$ 173.00 for 50 g, whereas the reference price of 1S-(+)- α -pinene (97%) is about US\$ 76.50/kg or around US\$ 0.08/g, at least 45 x more inexpensive than verbenone and 212 than *cis*-verbenol. Therefore, it seems worth making efforts and allocating resources to better understand and explore the biotransformation of pinene.

Because of the wide range of products of commercial interest that can be produced from monoterpenes, studies on the biotransformation of these compounds have been stimulated for decades. From a technological point of view, the biotransformation of monoterpenes has already shown great advances in recent years, although there are still challenges to be overcome by the aroma and fragrance industries.^[11]

Conclusion

In this work, eleven *Streptomyces* strains isolated from the rhizosphere of *Inga edulis* Mart. in an urban forest fragment of the Amazon were screened for ability to biotransform *R*- and *S*-limonene, 1S-(+)- α -pinene, and (-)- β -pinene. While no

derivative from the limonenes and (-)- β -pinene were achieved, three strains biotransformed 1S-(+)- α -pinene mainly into *cis*-verbenol and verbenone, which are compounds that have important biological activities and great industrial interest as additives in foods and cosmetics. Further efforts are needed to improve the concentration of these derivatives and obtain higher yields. However, work like this confirms the potential of microorganisms from yet unexplored niches such as the Amazonian rhizosphere and also the need to preserve them.

Acknowledgments

We would like to thank the Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the BIONORTE for the doctorate opportunities, and also the LaBMicA and LabCG laboratories at the CA/CAM/UFAM for the space and equipment provided, which were necessary for the development of the research.

Ethics statement

This article does not contain any studies with human or animal participants performed by any of the authors

Author contributions

Elison de Souza Sevalho: Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Writing—original draft, and Writing—review & editing; Rafael de Souza Rodrigues: Methodology and Data curation; Antonia Queiroz Lima de Souza: Funding acquisition, Methodology, Supervision and Writing—original draft; Afonso Duarte Leão de Souza: Funding acquisition, Methodology, Supervision, and Writing—review & editing. This study is part of the doctoral theses of Elison de Souza Sevalho and Rafael de Souza Rodrigues (PPG-BIONORTE/UFAM).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This research was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) via the Universal Amazonas call FAPEAM-002/2018, POSGRAD 2022/2023 call, and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The authors acknowledge FAPEAM for the PhD scholarships via the POSGRAD UEA – 003/2019 awarded to Elison de Souza Sevalho and Rafael de Souza Rodrigues. To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq for the research grant awarded to Afonso Duarte Leão de Souza.

ORCID

Elison de Souza Sevalho  <http://orcid.org/0000-0003-4754-3777>
 Rafael de Souza Rodrigues  <http://orcid.org/0000-0002-3890-6970>
 Antonia Queiroz Lima de Souza  <http://orcid.org/0000-0001-5602-8617>
 Afonso Duarte Leão de Souza  <http://orcid.org/0000-0001-7007-3991>

References

- [1] Molina, G.; Pêsoa, M. G.; Pimentel, M. R.; Pelissari, F. M.; Bicas, J. L.; Pastore, G. M. Production of natural flavor compounds us-

- ing monoterpenes as substrates. In *New Developments in Terpene Research*; Hu, J., Ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, 2014; pp cap. 1.
- [2] de Oliveira Felipe, L.; de Oliveira, A. M.; Bicas, J. L. Bioaromas—perspectives for sustainable development. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, 62, 153. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.005.
 - [3] Sales, A.; Paulino, B. N.; Pastore, G. M.; Bicas, J. L. Bioregeneration of Aroma Compounds. *Curr. Opin. Food Sci.* 2018, 19, 77–84. DOI: 10.1016/j.cofs.2018.03.005.
 - [4] Pessôa, M. G.; Vespermann, K. A.; Paulino, B. N.; Barcelos, M. C.; Pastore, G. M.; Molina, G. Newly Isolated Microorganisms with Potential Application in Biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 319–339. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.007.
 - [5] Sharma, A.; Sharma, P.; Singh, J.; Singh, S.; Nain, L. Prospecting the Potential of Agroresidues as Substrate for Microbial Flavor Production. *Front. Sustain. Food Syst.* 2020, 4, 18. DOI: 10.3389/fsufs.2020.00018.
 - [6] Soares-Castro, P.; Soares, F.; Santos, P. M. Current Advances in the Bacterial Toolbox for the Biotechnological Production of Monoterpene-Based Aroma Compounds. *Molecules* 2020, 26, 91. DOI: 10.3390/molecules26010091.
 - [7] de Souza Sevalho, E.; Paulino, B. N.; de Souza, A. Q. L.; de Souza, A. D. L. Fungal Biotransformation of Limonene and Pinene for Aroma Production. *Braz. J. Chem. Eng.* 2023, 40, [1–21]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.005.
 - [8] Ren, Y.; Liu, S.; Jin, G.; Yang, X.; Zhou, Y. J. Microbial Production of Limonene and Its Derivatives: Achievements and Perspectives. *Biotechnol. Adv.* 2020, 44, 107628. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107628.
 - [9] Vieira, A. J.; Beserra, F. P.; Souza, M. C.; Totti, B. M.; Rozza, A. L. Limonene: Aroma of Innovation in Health and Disease. *Chem. Biol. Interact.* 2018, 283, 97–106. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.02.007.
 - [10] Kutyla, M.; Fiedurek, J.; Gromada, A.; Jędrzejewski, K.; Trytek, M. Mutagenesis and Adaptation of the Psychotrophic Fungus *Chrysosporium pannorum* A-1 as a Method for Improving β -Pinene Bioregeneration. *Molecules* 2020, 25, 2589. DOI: 10.3390/molecules25112589.
 - [11] Vespermann, K. A.; Paulino, B. N.; Barcelos, M. C.; Pessôa, M. G.; Pastore, G. M.; Molina, G. Biotransformation of α - and β -Pinene into Flavor Compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 1805–1817. DOI: 10.1007/s00253-016-8066-7.
 - [12] Borelli, T.; Hunter, D.; Padulosi, S.; Amaya, N.; Meldrum, G.; de Oliveira Beltrame, D. M.; Samarasinghe, G.; Wasike, V. W.; Güner, B.; Tan, A.; et al. Local Solutions for Sustainable Food Systems: The Contribution of Orphan Crops and Wild Edible Species. *Agronomy* 2020, 10, 231. DOI: 10.3390/agronomy10020231.
 - [13] Farda, B.; Djebaili, R.; Vaccarelli, L.; Del Gallo, M.; Pellegrini, M. Actinomycetes from Caves: An Overview of Their Diversity, Biotechnological Properties, and Insights for Their Use in Soil Environments. *Microorganisms* 2022, 10, 453. DOI: 10.3390/microorganisms10020453.
 - [14] Nazari, M. T.; Machado, B. S.; Marchezi, G.; Crestani, L.; Ferrari, V.; Colla, L. M.; Piccin, J. S. Use of Soil Actinomycetes for Pharmaceutical, Food, Agricultural, and Environmental Purposes. *3 Biotech* 2022, 12, 232. DOI: 10.1007/s13205-022-03307-y.
 - [15] de Souza, A. Q. L.; de Souza, A. D. L.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M. L. B.; Sarquis, M. I. D. M.; Pereira, J. O. Atividade Antimicrobiana De Fungos Endofíticos Isolados De Plantas Tóxicas Da Amazônia: *Palaquium longiflorum* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Benth. *Acta Amaz.* 2004, 34, 185–195. DOI: 10.1590/S0044-59672004000200006.
 - [16] Molina, G.; Burton, M. L.; Bicas, J. L.; Dolder, M. A. H.; Pastore, G. M. Comparative Study of the Bioconversion Process Using R-(+)- and S-(-)-Limonene as Substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. *Food Chem.* 2015, 174, 606–613. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.059.
 - [17] Bier, M. C. J.; Medeiros, A. B. P.; Soccol, C. R. Biotransformation of Limonene by an Endophytic Fungus Using Synthetic and Orange Residue-Based Media. *Fungal Biol.* 2017, 121, 137–144. DOI: 10.1016/j.funbio.2016.11.003.
 - [18] Sevalho, E. d S.; dos Banhos, E. F.; de Souza, A. Q. L.; de Souza, A. D. L. Evaluation of the Biotransformation of R-(+)-Limonene to Aroma Compounds by *Pestalotiopsis versicolor* LabMicrA-478 Isolated of *Euterpe oleracea* Martius. *Rev. DELOS* 2023, 16, 75–85. DOI: 10.55905/rdelosv16.n42-007.
 - [19] Birrelli, W. G.; Ferreira, I. M.; Alvarenga, N.; Santos, D. D. A.; de Matos, I. L.; Comassetto, J. V.; Porto, A. L. Biocatalysis and Biotransformation in Brazil: An Overview. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 481–510. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.001.
 - [20] Zelińska-Blajet, M.; Feder-Kubis, J. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7078. DOI: 10.3390/ijms21197078.
 - [21] Rottava, I.; Cortina, P. F.; Grando, C. E.; Colla, A. R.; Martello, E.; Cansian, R. L.; Toniazzi, G.; Treichel, H.; Antunes, O. A. C.; Oestreich, E. G.; de Oliveira, D. Isolation and Screening of Microorganisms for R-(+)-Limonene and (-)- β -Pinene Biotransformation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, 162, 719–732. DOI: 10.1007/s12010-009-8872-9.
 - [22] Lukin, I.; Merz, J.; Schembecker, G. Techniques for the Recovery of Volatile Aroma Compounds from Biochemical Broth: A Review. *Flavour Fragrance J.* 2018, 33, 203–216. DOI: 10.1002/ffj.3447.
 - [23] Hadj Saadoun, J.; Bertani, G.; Levante, A.; Vezzosi, F.; Ricci, A.; Bernini, V.; Lazzi, C. Fermentation of Agri-Food Waste: A Promising Route for the Production of Aroma Compounds. *Foods* 2021, 10, 707. DOI: 10.3390/foods10040707.
 - [24] Pessôa, M. G.; Paulino, B. N.; Molina, G.; Pastore, G. M. Prospective Research and Current Technologies for Bioflavor Production. In *Bioprocessing for Biomolecules Production*; Molina, G.; Gupta, V.; Singh, B.; Gathergood, N., Eds.; John Wiley & Sons Ltd: Hoboken, NJ, 2019; pp cap 5. DOI: 10.1002/9781119434436.ch5.
 - [25] Saidani, F.; Riad, N.; Beichi, M.; Ferradji, F. Z.; Zahi, M. R.; Edouaouda, K.; Mesbah, F. Z.; Bouzidi, N.; Badis, A.; El Hattab, M. Screening of biotransformation metabolites of α -pinene by two bacterial strains *Paenibacillus popilliae* 1C, and *Streptomyces rochei* AB1. *J. Appl. Biotechnol. Rep.* 2022, 9, 763. DOI: 10.30491/JABR.2021.288335.1396.
 - [26] Gheorghita, G. R.; Sora, C.; Ion, S.; Parvulescu, V. I.; Tudorache, M. Cascade Biocatalysis Designed for the Allylic Oxidation of α -Pinene. *Catalysts* 2021, 11, 134. DOI: 10.3390/catal11010134.
 - [27] Choi, I. Y.; Lim, J. H.; Hwang, S.; Lee, J. C.; Cho, G. S.; Kim, W. K. Anti-ischemic and Anti-inflammatory Activity of (S)-Cis-Verbenol. *Free Radic. Res.* 2010, 44, 541–551. DOI: 10.3109/10715761003667562.
 - [28] González-Velasco, H. E.; Pérez-Gutiérrez, M. S.; Alonso-Castro, A. J.; Zapata-Morales, J. R.; Niño-Moreno, P. D. C.; Campos-Xolalpa, N.; González-Chávez, M. M. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of the Essential Oil of *Tagetes parryi* A. Gray (Asteraceae) and Verbenone. *Molecules* 2022, 27, 2612. DOI: 10.3390/molecules27092612.
 - [29] Fanaro, G. B.; Fontanille, P.; Maróstica Jr, M. R.; Bicas, J. L. Biotechnological aroma compounds. In *Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food Industry*; Bicas, J. L.; Maróstica Jr, M. R.; Pastore, G. M., Eds.; Bentham Science Publishers: Bussum, Netherlands, 2022; pp cap. 6.
 - [30] Dionísio, A. P.; Molina, G.; de Carvalho, D. S.; dos Santos, R.; Bicas, J. L.; Pastore, G. M. Natural flavourings from biotechnology for foods and beverages. In *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*; Baines, D.; Seal, R., Eds.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2012; pp cap. 11. DOI: 10.1533/9780857095725.1.231.

COAUTORIA EM OUTROS TRABALHOS

Research, Society and Development, v. 11, n. 2, e13211225325, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25325>

Evaluation of enzymatic production of hydrolases and oxyredutases by *Fusarium pseudocircinatum* and *Corynespora torulosa* isolated from caesarweed (*Urena lobata* L., 1753)

Avaliação da produção enzimática de hidrolases e oxirredutases por *Fusarium pseudocircinatum* e *Corynespora torulosa* isolados de malva (*Urena lobata* L., 1753)

Evaluación de la producción enzimática de hidrolasas y oxiredutadas por *Fusarium pseudocircinatum* y *Corynespora torulosa* aisladas de malva (*Urena lobata* L., 1753)

Received: 01/03/2022 | Reviewed: 01/08/2022 | Accept: 01/18/2022 | Published: 01/21/2022

Sarah Raquel Silveira da Silva Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6943-8436>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: srhaquel@gmail.com

Paulo Alexandre Lima Santiago

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1940-7447>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: psantiago@ufam.edu.br

Marta Rodrigues de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6065-7480>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: mro.dbb@ufam.edu.br

Rafael de Souza Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3890-8970>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: rafaelr.bio@gmail.com

Anderson Nogueira Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6112-6190>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brazil
E-mail: anderson.nb6@gmail.com

Gilvan Ferreira da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2828-8299>
EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brazil
E-mail: gilvan.silva@embrapa.br

Jeferson Chagas da Cruz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7718-2127>
EMBRAPA Amazônia Ocidental, Brazil
E-mail: jeferson.cruz@embrapa.br

Afonso Duarte Leão de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7007-3991>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: souzaadq@ufam.edu.br

Antonia Queiroz Lima de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5602-8617>
Universidade Federal do Amazonas, Brazil
E-mail: antoniaqueiroz@ufam.edu.br

FUNGI ASSOCIATED WITH THE BASIDIOMES OF Hymenochaetaceae (Agaricomycetes, Basidiomycota) IN THE AMAZON

FUNGOS ASSOCIADOS AOS BASIDIOMAS DE Hymenochaetaceae (Agaricomycetes, Basidiomycota) NA AMAZÔNIA

ABSTRACT

The Hymenochaetaceae are basidiomycete, wood-decomposing fungi that are found in different habitats, including the Amazon region, and can be parasitized or live in association with some plant organisms. This study investigated the cultivable fungi associated with the basidiomes of Hymenochaetaceae collected in different areas of the Brazilian Amazon. In all, 107 specimens of Hymenochaetaceae were collected and 203 strains of associated fungi were obtained, which were grouped into 16 morphogroups, with *Trichoderma* and *Aspergillus* being the most representative. A total of 19 strains were identified using the molecular method, which made it easier to find their possible biotechnological applications cited in the literature. This investigation has enabled new discoveries that may be inspire further studies that explore microbial resources through co-culture and the relationship between macrofungi and their associated fungi.

Keywords: Amazon, Funga, Macrofungi, Microfungi.

RESUMO

Os Hymenochaetaceae são fungos basidiomicetos, decompositores de madeira encontrados em diferentes habitats, inclui-se a região Amazônica, que podem ser parasitados ou viver associados com alguns organismos vegetais. Este estudo investigou os fungos cultiváveis associados ao basidioma de Hymenochaetaceae coletados em diferentes áreas da região Amazônia brasileira. Foram coletados 107 espécimes de Hymenochaetaceae onde foram obtidas 203 linhagens de fungos associados, agrupadas em 16 morfogrupos, sendo *Trichoderma* e *Aspergillus* os mais representativos. Um total de 19 linhagens foram identificadas pelo método molecular, o que facilitou a localização de suas possíveis aplicações biotecnológicas citadas na literatura. Essa investigação possibilitou novas descobertas que podem ser inspiradoras para estudos mais aprofundados para explorar recursos microbianos através da cocultura e a relação macrofungos e os seus fungos associados.

Palavras-chaves: Amazônia, Funga, Macrofungos, Microfungos.

Diversity and chemotaxonomy of Amazonian *Trichoderma* spp.

Abstract

Trichoderma is a genus of interest to researchers from various areas, due to its species diversity, biotechnological importance, and its applications. The present study aimed at the grouping and characterization of 37 *Trichoderma* spp. through morphological, molecular, and chemotaxonomic analysis of the fungus obtained in different tropical habitats. The lineages were evaluated with concatenated phylogenetic analysis through the sequences of internal transcribed spacer (*ITS*) regions, and portions of the translation elongation factor 1- α gene (*TEF1- α*). From the 37 strains of *Trichoderma*, nine species groups were obtained, namely: *T. asperellum* (2), *T. harzianum* (9), *T. lentiforme* (12), *T. spirale* (1), *T. koningiopsis* (2), *T. atroviride* (3), *T. asperelloides* (2), *T. afroharzianum* (4), *T. reesei* (2). A *Clonostachys rosea* strain was used as out group. *T. lentiforme* and *T. harzianum* stood out with more 50% of all strains studied and identified. The work done indicates the high diversity of *Trichoderma* spp. from the Amazon. The chemometric data showed the chemical correlations and intraspecific similarities among the species of *Trichoderma* through its intracellular and extracellular metabolites, as the main ions and in common and chemical proximity between species of the same clade.

Keywords: Endophytic fungi, *Trichoderma*, Phylogenetic analysis, Chemical profile.

Diversidade e quimiotaxonomia de *Trichoderma* spp. da Amazônia.

Resumo

Trichoderma é um gênero de interesse de pesquisadores de diversas áreas, devido à sua diversidade de espécies, importância biotecnológica e suas aplicações. O presente estudo objetivou agrupar e caracterizar 37 *Trichoderma* spp. através de análises morfológicas, moleculares e quimiotaxonômicas do fungo obtido em diferentes habitats tropicais. As linhagens foram avaliadas com análise filogenética concatenada através das sequências de regiões espaçadoras transcritas internas (*ITS*) e porções do gene do fator de alongamento de tradução 1- α (*TEF1- α*). Das 37 cepas de *Trichoderma* foram obtidos nove grupos de espécies, a saber: *T. asperellum* (2), *T. harzianum* (9), *T. lentiforme* (12), *T. Spirale* (1), *T. koningiopsis* (2), *T. atroviride* (3), *T. asperelloides* (2), *T. afroharzianum* (4), *T. reesei* (2). Uma cepa de *Clonostachys rosea* foi usada como grupo externo. *T. lentiforme* e *T. harzianum* se destacaram com mais de 50% de todas as cepas estudadas e identificadas. O trabalho realizado indica a alta diversidade de *Trichoderma* spp. da Amazônia. Os dados quimiométricos mostraram as correlações químicas e semelhanças intraespecíficas entre as espécies de *Trichoderma* através de seus metabólitos intracelulares e extracelulares, como os principais íons e em comum e proximidade química entre espécies do mesmo clado.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, *Trichoderma*, Análise filogenética, Perfil químico.



Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição

A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável

12 a 14 de novembro

Campinas/SP

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo intitulado:

"PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) CONSUMIDAS NO AMAZONAS E EFEITOS POSITIVOS NO COMBATE À DOENÇA DE ALZHEIMER"

de autoria de

"Diana Coêlho Monteiro, Leidiane Pereira da Silva, André Correa De Oliveira, Rita de Cassia Saraiva Nunomura, Joice Camila Martins da Costa, Rafael de Souza Rodrigues, Rayssa Oliveira Cantisani Pinto, Vanderson Gabriel Souza Torres, Vitória Beatriz Cavalcante Mourão, Amanda Gabriela Soares Lins, Giovana Araújo Alcantara, Afonso Duarte de Souza, Antonia Queiroz Lima de Souza"

foi apresentado na categoria Pôster no 15º SLACAN - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição: "A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável", realizado de 12 a 14 de novembro de 2023, Campinas - São Paulo - Brasil.

Juliano Lemos Bicas
Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico

Cintha Baú Betim Cazarin
Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
Coordenadora do Comitê Científico

Mario Roberto Maróstica Junior
Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior
Coordenador do Comitê de Programação

Gláucia Maria Pastore
Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do evento

Certification by Galoá



Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos e Nutrição

A Revolução da Ciência de Alimentos e Nutrição: Alimentando o Mundo de Forma Sustentável

12 a 14 de novembro

Campinas/SP

Acceptance letter

CONGRATULATIONS!!!

We are pleased to inform you that your abstract entitled:

"Evaluation of the potential of phenolic content and antioxidant activities of the extracts acquired from two Amazon actinomycetes of the genus Streptomyces"

By:

Rafael de Souza Rodrigues, Anselmo Ferreira dos Santos, Elison de Souza Sevalho, Antonia Souza, Afonso Souza

submitted to 15th Latin American Symposium of Food Science and Nutrition (SLACAN): "The Food and Nutrition Science Revolution: Feeding the World Sustainably" was **ACCEPTED**.

We are looking forward to seeing you soon.

Sincerely,

Cintha Baú Betim Cazarin
Profa. Dra. Cinthia Baú Betim Cazarin
Coordinator of the Scientific Committee

Juliano Lemos Bicas
Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordinator of the Scientific Committee

Certification by Galoá





XXXII CONIC 22/23

Congresso de Iniciação Científica

Reacendendo a Chama da Ciência
De 5 a 7 de dezembro de 2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO AMAZONAS**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Capital e Interior Unidos pela Ciência

PROSPECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR ACTINOMICETOS ISOLADOS DO CAMPUS DA UFAM EM MANAUS FRENTE A PATÓGENOS CLÍNICOS

Vitória Beatriz Cavalcante Mourão

Universidade Federal do Amazonas

Vitoriabcmourao@gmail.com / vitoria.mourao@ufam.edu.br

Rafael de Souza Rodrigues

Universidade do Estado do Amazonas- BIONORTE

rafaelsr.bio@gmail.co

Antônia Queiroz Lima de Souza

Universidade Federal do Amazonas

antoniaqueiroz@ufam.edu.br

RESUMO

Hodiernamente, estão sendo apresentados cada vez mais casos de infecções por microrganismos no Brasil e no mundo, e os antibióticos atuais estão gradativamente perdendo a eficácia frente a patógenos resistentes. Tendo em mente que a biodiversidade do Campus da Universidade Federal do Amazonas em Manaus apresenta demasiado potencial para produção biotecnológica de produtos naturais, e pouca exploração de estudos em antibióticos, esse projeto apresenta um estudo biológico e químico acerca da antibiose desses microrganismos, visando investigar a produção de antibióticos por meio de bactérias pseudofilamentosas, ou seja actinomicetos, por meio da produção de metabólitos secundários avaliados frente a patógenos de interesse clínico para estudo químico bioguiado, sendo estes *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outros. Pelo método de culturas pareadas foi selecionada uma linhagem P2-11, da qual feita uma curva de produção dos extratos e estes foram testados e feito o perfil químico, deste a melhor atividade encontrada foi para *E. coli*, *E. faecalis* e *B. cereus*. Após, também foram realizados o cultivo de mais 19 linhagens, em tempos de crescimento de 5 e 10 dias, dos quais os extratos do meio fermentado e da biomassa celular foram avaliados apenas contra quatro *Candidas* spp e obtiveram resultados de inibição para *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

Palavras-Chave: Actinomicetos; antibióticos; metabólitos; patógenos humanos.



XXXII CONIC 22/23
Congresso de Iniciação Científica

Reacendendo a Chama da Ciência
De 5 a 7 de dezembro de 2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DO AMAZONAS**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Capital e Interior Unidos pela Ciência

1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica é conhecida como uma das maiores florestas do mundo, sendo uma das principais fontes da biodiversidade do Brasil, conhecida por deter 20% da variedade dos seres vivos presentes no mundo. Apesar de apresentar uma relevante biodiversidade em sua fauna e flora, a compreensão a respeito das interações dos microrganismos com o meio ambiente, mostra-se não totalmente explorada apresentando potencial para novos estudos (SOUZA et al., 2004). Esta destaca-se por apresentar um clima predominantemente equatorial e úmido que favorece o crescimento microbiano.

Portanto destaca-se a presença dos Actinomicetos, bactérias pseudofilamentosas, Gram-positivas e formadoras de esporos. Onde de acordo com o estudo realizado por SILVA et al (2012), a comunidade de actinomicetos constitui cerca de 10 a 50% da população presente no solo, interagindo com substâncias como: celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus, que de modo geral não são consumidas por outros microrganismos.

Dessa forma, (DE OLIVEIRA (2018), destaca o potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos em que reitera a importância da produção de metabólitos secundários bioativos provenientes de actinomicetos foram relatados na última década. Portanto, evidencia-se que os Actinomicetos se destacam como uma fonte biológica de substâncias antibióticas, antitumorais, anti-inflamatórios, antivirais, antiparasitários, imunossuppressores, produção de vitaminas e enzimas (YARBROUGH et al., 1993; JESUS, 2013; MINOTTO, 2014; DE SOUSA et al., 2019).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de antibióticos de Actinomicetos isolados do Campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus-Amazonas, frente a patógenos de interesse clínico para estudo químico bioguiado.

3. METODOLOGIA

As linhagens foram obtidas por meio do selecionamento de 20 actinomicetos da coleção de trabalho de microrganismos do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas (LABMICRA/CA/UFAM). A reativação das linhagens foi realizada em placas de petri contendo meio de cultura ISP2 ágar (Ágar 1,5%, extrato de levedura 0,4% e extrato de malte 1%) e cultivados a 28 °C durante 8 dias.

Das linhagens a serem selecionadas para os ensaios de antibiose, foi realizada a curva de crescimento da P2-11 para análise de consumo da glicose, acompanhamento do pH, perfil químico e ensaio de antibiose. Foi realizado o microcultivo em ISP2, em laminulas inclinadas para visualização em microscópio Feldmann com captura de imagem e Software de medidas nas objetiva de 100x. Para a curva de crescimento, foram inoculados em erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultura ISP2, em incubadora Shaker a 120 rpm e retirado de acordo com os pontos de coleta para a construção da curva de crescimento. Ao retirar cada ponto de coleta do experimento de acordo com os pontos, foram medidos em cabine de segurança biológica o pH, glicose, densidade, nitritos e proteínas por meio de fitas de urinálise.

Os extratos foram levados a centrifugação em tubo falcon de 50 mL, para a separação do meio fermentado do meio celular. O meio celular foi submetido à maceração com acetato de etila e metanol em concentração 1:1 e colocado em dessecador contendo sílica. O meio fermentado foi particionado em funil de separação com Acetato de Etila e Isopropanol com proporção 9:1 em 3 particionamento com 40 mL, 30 mL e 30 mL e logo em seguida concentrado por rotaevaporação. Os extratos foram testados em Screening em placa de 96 poços frente a linhagens clínicas de *C. glabrata*, *E. coli*, *S. coccus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *E. Faecalis*. Ainda, ocorreu as análises espectrométricas dos extratos em ESI/LC/MS referentes a cada tempo de coleta.

Em seguida foram realizados extratos de metabólitos das 19 linhagens restantes em tempo



2

XXXII CONIC 22/23

Congresso de Iniciação Científica

Reacendendo a Chama da Ciência
De 5 a 7 de dezembro de 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Capital e Interior Unidos pela Ciência

de crescimento de 5 e 10 dias, liofilizados e testados frente a *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Ainda foram realizadas análises por meio de ESI/LC/MS e estudo acerca de seus íons de interesse.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os extratos da linhagem alvo, por meio da figura abaixo é possível notar que o estes apresentaram inibição parcial frente às bactérias e pouca inibição frente a levedura.

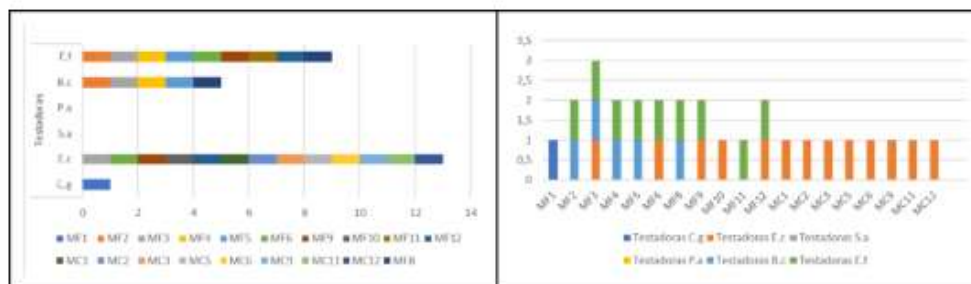


Figura 1: Testadoras frente a linhagem alvo.

Por meio da figura abaixo, em crescimento de 5 e 10 dias, é possível notar que em 5 dias de cultivos 18 linhagens, já haviam produzido algum metabólito secundário bioativo, apenas as linhagens 10 e 17 ainda não haviam produzido. Vale ressaltar o extrato MF-7A com atividade para *C. glabrata* e *C. haemulonii*. Outro fato interessante desta triagem são os resultados para *C. krusei* com sete extratos positivos (1, 2, 3, 4, 16, 18 e 19). Dos sete extratos ativos contra *C. albicans* seis também tem atividade contra *C. haemulonii*. Destes 40 extratos produzidos com 5 dias de cultivo, 12 foram extracelular e apenas um intracelular (15 – biomassa celular) apresentaram antibiose. Porém é importante destacar que o metabolismo de algumas linhagens são claramente mais lentas que outras e o seus melhores metabólitos secundários bioativos foram produzidos com 10 dias

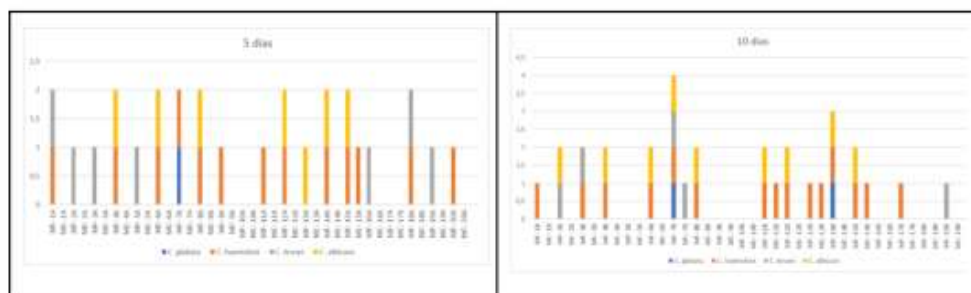


Figura 2: Testadoras frente aos extratos de linhagens de actinomicetos.

5. CONCLUSÕES

A produção de antibióticos por Actinomicetos isolados do Campus da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus-Amazonas, avaliada frente a patógenos de interesse clínico mostrou das 20 linhagens avaliadas, duas promissoras contra *Candida* spp. e atividades contra outros patógenos humanos com *E. coli*, *B. cereus* e *E. faecalis* com a linhagem P2-11.



XXXII CONIC 22/23

Congresso de Iniciação Científica

Reacendendo a Chama da Ciência
De 5 a 7 de dezembro de 2023**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Capital e Interior Unidos pela Ciência

Os extratos do meio fermentado e da biomassa celular foram avaliados apenas contra *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- DA CONCEIÇÃO, Beatriz Souza. GESTÃO DE ÁREAS PROTEGIDAS NA AMAZÔNIA-MPGAP.
- DE SOUSA, Sara Freitas et al. *Streptomyces* sp. isolados da Amazônia como agentes de biocontrole de fungos aflatoxigênicos. *Diversidade Microbiana da Amazônia*, p. 46, 2019.
- DE OLIVEIRA, RAIMUNDO CARMO; BRANCO-AC, R. I. O. POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ACTINOMICETOS DE SOLOS AMAZÔNICOS. 2018.
- JESUS, J. A. Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. 2013. Campos dos Goytacazes-RJ. (M. Sc Dissertação. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro). 88f, 2013.
- LOBATO, Ana Katherine de Carvalho Lima. Análise de fluxos metabólicos para otimização da Síntese do antibiótico cosmomicina por *Streptomyces olindensis* ICB20. 2010.
- MINOTTO, Elisandra. Caracterização de compostos produzidos por actinomicetos para o Biocontrole de *Bipolaris sorokiniana*. 2014.
- SILVA, Ingrid Reis da et al. Compostos antimicrobianos produzidos por *Streptomyces* Spp. 2012.
- SOUZA, Antonia Queiroz Lima de et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- YARBROUGH, GEORGE G. et al. Triagem de metabólitos microbianos para novas drogas – questões teóricas e práticas. *O Jornal de antibióticos*, v. 46, n. 4, pág. 535- 544, 1993.
- WANG, Mingxun et al. Mass spectrometry searches using MASST. *Nature biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 23-26, 20

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Universidade Federal do Amazonas pelo apoio durante a realização do projeto e ainda por meio do Programa de Iniciação Científica pela bolsa e apoio financeiro. Agradeço também aos órgãos de fomento pelo amparo à pesquisa na Universidade, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, a Central Analítica Multidisciplinar-CAM, ao laboratório de bioensaios e microrganismos da Amazônia (LABMICRA), LABCEM, LAEQ e LAQUA.

A minha orientadora Antonia Queiroz Lima de Souza e ao meu coorientador Afonso Duarte Leão de Souza, agradeço a todos os ensinamentos e orientações. Aos meus colegas de laboratório, em destaque ao Rafael de Souza Rodrigues, pelo auxílio e ensinamento.

E principalmente a minha família e amigos pelo apoio durante o projeto.





Evaluation of the potential of phenolic content and antioxidant activities of the extracts acquired from two Amazon actinomycetes of the genus *Streptomyces*

¹RODRIGUES, R. S.; ²SANTOS, A. F.; ³SEVALHO, E. S.; ⁴SOUZA, A. Q. L.; ⁵SOUZA, A. D. L.

¹Graduate Program in Biodiversity and Biotechnology of the BIONORTE Network, Federal University of Amazonas – Amazonas, rafaelr.bio@gmail.com

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas - Campus Maués - Amazonas, Ciência e Tecnologia do Amazonas - Campus Maués, anselmo.santos@ifam.edu.br

³Research Group on Chemistry Applied to Technology (QAT), School of Technology, Amazonas State University - Amazonas, elisonsevalho@hotmail.com

⁴Faculty of Agricultural Sciences, Federal University of Amazonas – Amazonas, antoniaqlsouza@gmail.com

⁵Department of Chemistry, Federal University of Amazonas, souzadq@gmail.com

Keywords: Rhizosphere; Actinomycetes extracts; Antioxidant substances.

Abstract: Actinomycetes are well-known as the source of bioactive metabolites. Natural extracts are the source of many antioxidant substances. They have proven useful not only as supplements to prevent diseases caused by oxidative stress but also as food additives that prevent oxidation. The study aimed to evaluate the phenolic content and antioxidant activities of extracts of two Amazon actinomycetes. The two strains of actinomycetes (LabMicra-B270 and LabMicra-B270) belong to the working collection of the Laboratory of Bioassays and Microorganisms of the Amazon (LabMicra) at the Federal University of Amazonas (SISGEN: AC1746C). The present *in vitro* study investigated the potential use of the actinomycetes extracts using the total phenolic content (TPC-Folin-Ciocalteu spectrophotometric using gallic acid as the standard) and antioxidant (diphenyl 2-picryl hydrazil (DPPH-) scavenging assay). The total phenolic content of the extracts was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per gram of sample in dry weight. The TPC value of the LabMicra-B270 extract was 46.45 ± 5.25 mg GAE/g, and that for the LabMicra-B280 extract was 24.60 ± 2.80 mg GAE/g. DPPH-scavenging capacity (%CS) was measured at 515 nm. Especially the extracellular fraction of the LabMicra-B270 extract showed the strongest antioxidant activity with a DPPH- CS₅₀ of 93% at a concentration of 273 ± 0.02 µg/mL, which was comparable to that of ascorbic acid, used as a positive control. This is the first report that endorses the bioactivity of the LabMicra-B270 extract obtained from an actinomycete of the genus *Streptomyces* isolated from the rhizosphere of inga-cipó (*Inga*

<https://proceedings.science/p/177441?lang=pt-br>

edulis Martius) with potential antioxidant activity that may be attributed to the phenolic compounds present. Furthermore, this study contributes to the increase in knowledge regarding the biodiversity of the Amazon. Further studies aiming at the structural elucidation of the molecules present in bioactive extracts should therefore be carried out.

Funding: We would like to thank the institutions FAPEAM, CNPq, and CAPES.



ANEXOS

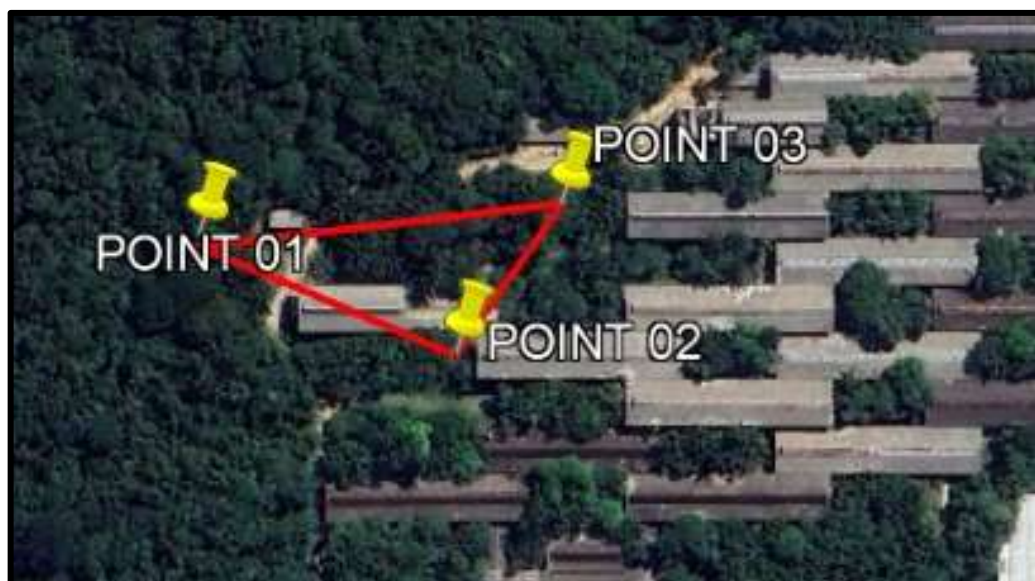
ANEXO 1: MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2

POTENCIAL BIODIVERSIDADE E ATIVIDADES ANTIFÚNGICAS DE ACTINOMICETOS AMAZÔNICOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DE PLANTAS

Inga edulis

Material suplementar - MS1.

Pontos de coletas



Material suplementar – MS2.

Procedimento operacional padrão (POP) para imageamento de amostras no microscópio eletrônico de varredura (MEV)

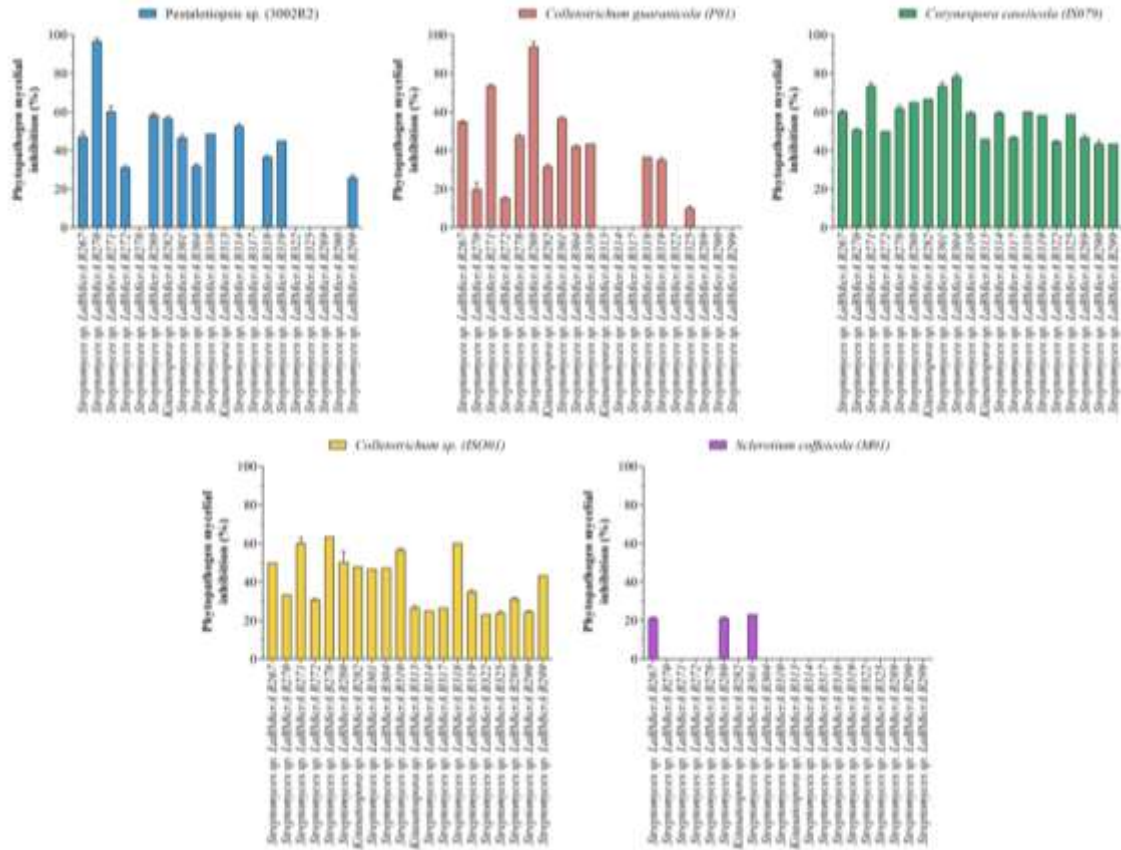
1. Processamento pré-microscopia eletrônica de varredura:

- 1.1. **Amostras:** discos de meio de cultura de aproximadamente 0,5 cm contendo as amostras foram seccionados e transferidos para uma placa de 24 poços;
- 1.2. **Fixação:** fixação por meio da submersão das amostras em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7.2) por 24 horas, em temperatura ambiente;
- 1.3. **Lavagem:** 4 lavagens sucessivas em tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7.2;
- 1.4. **Pós-fixação:** submersão das amostras por 2 horas em solução de tetróxido de ósmio 2% e ferrocianeto de potássio 1.6% (proporção 1:1) em tampão cacodilato de sódio 0.2 M. A pós-fixação foi no escuro, cobrindo a amostra com papel alumínio;
- 1.5. **Lavagem pós-fixação:** o excesso de ósmio foi lavado duas vezes com o tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7.2;
- 1.6. **Desidratação:** após lavagem em tampão, as amostras foram desidratadas com soluções de etanol a 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, mantendo-se as amostras submersas por em cada uma das soluções por 20 minutos (este processo foi repetido três vezes na etapa do etanol 100%).
- 1.7. **Secagem em ponto crítico:** após desidratação, as amostras submersas em etanol absoluto foram submetidas a secagem em ponto crítico Leica EM CPD300 por 2h com 14 ciclos;
- 1.8. **Metalização:** terminado os processos citados anteriormente, as amostras serão fixadas em fitas de carbono à stubs e submetidas a 4 minutos de metalização com ouro, no metalizador JEOL Smart Coater.

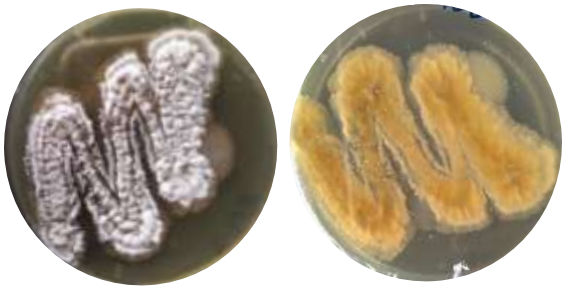
2. Análises utilizando o microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-IT500HR

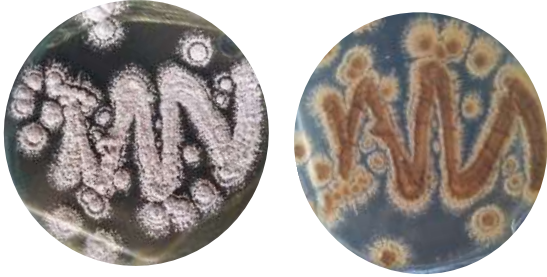
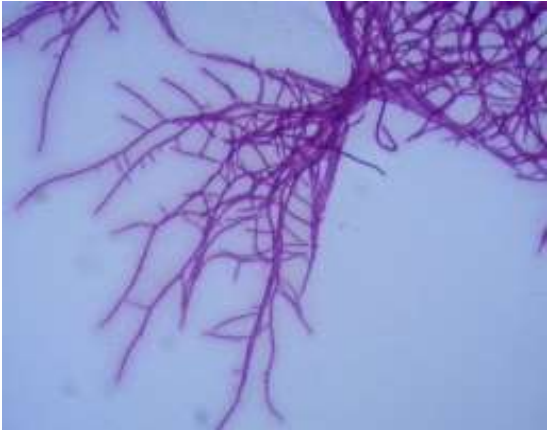
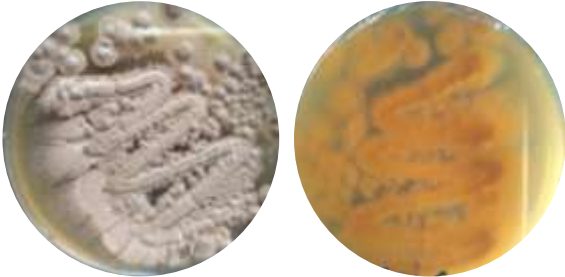
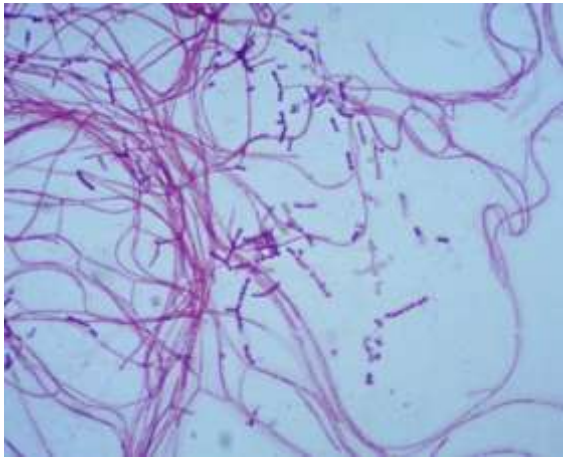
Material suplementar – MS3.

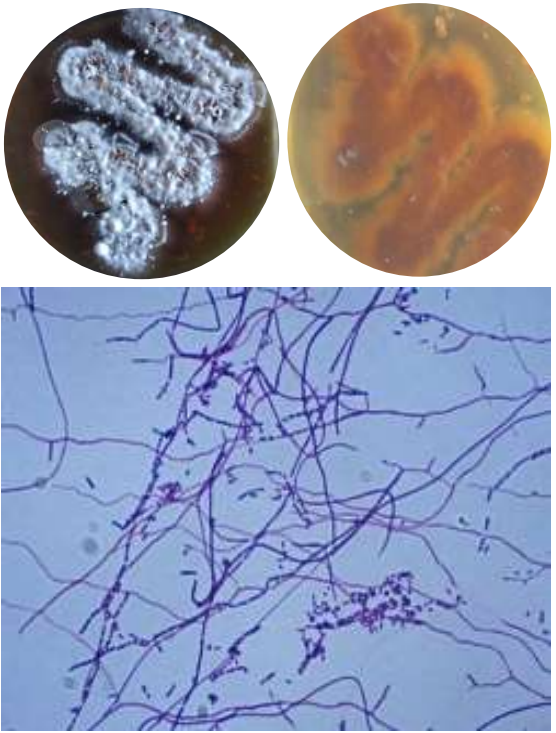
Gráficos de barras com valores de desvio padrão para cada desvio padrão do teste.

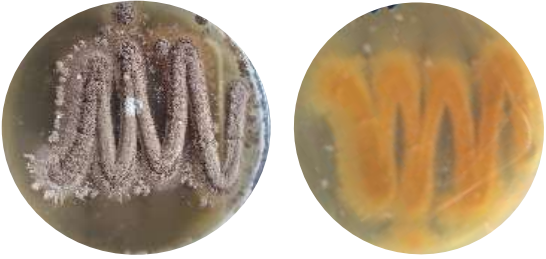
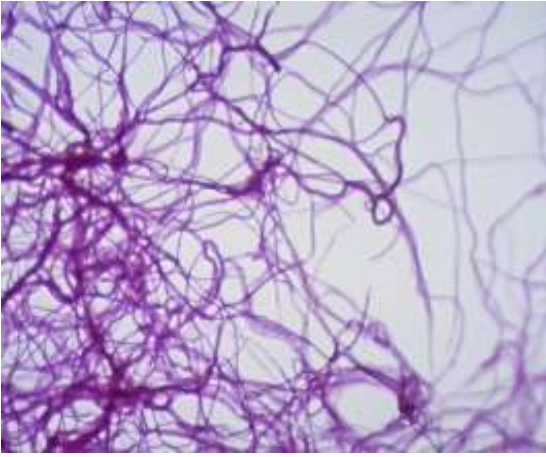
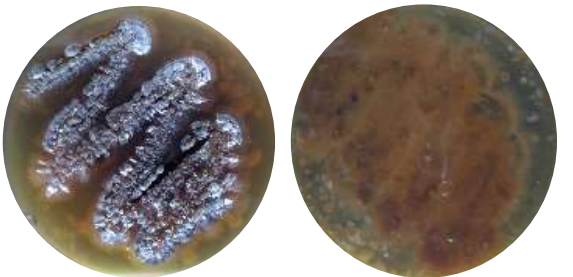
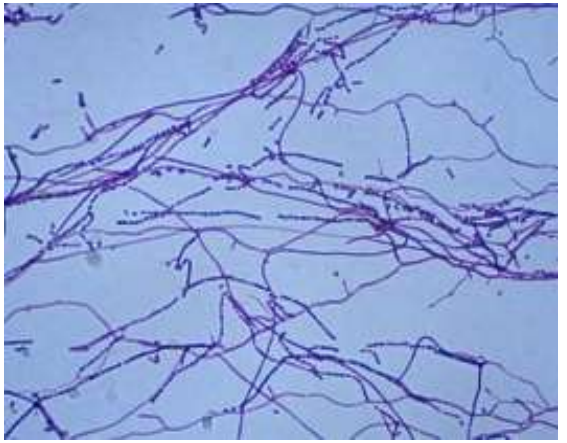


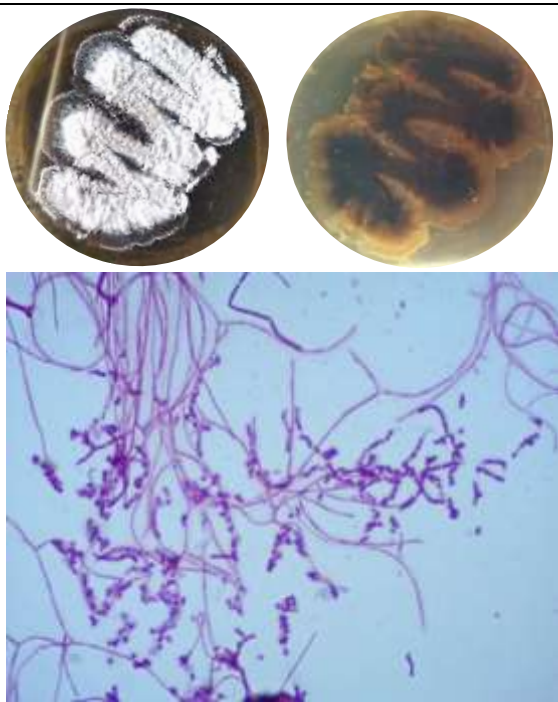
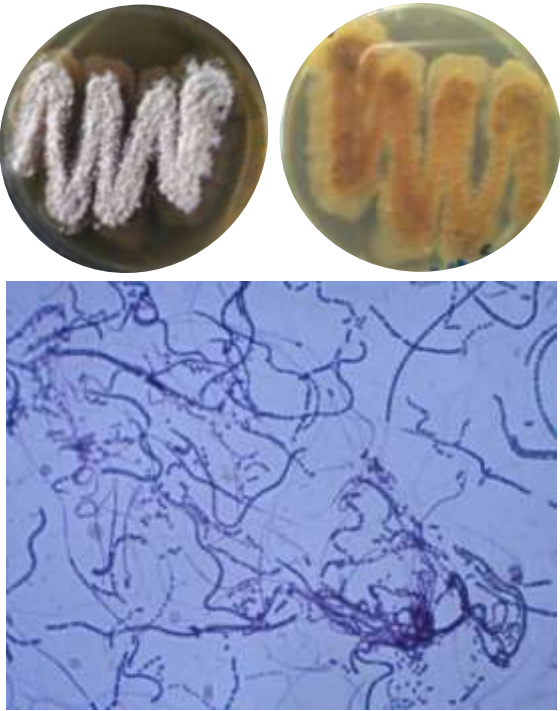
Material suplementar – MS4. Códigos de acesso GenBank/NCBI e macromorfologias e micromorfologias das cepas selecionadas. Características macro e micromorfológicas de cepas com excelente atividade antifúngica. Microculturas visualizadas em microscópio óptico (Carl Zeiss) acoplado ao programa Zen Photo/Image (AxioCamER-Zen lite 2012), utilizando objetiva de 100x e escala de 0,5 μm .

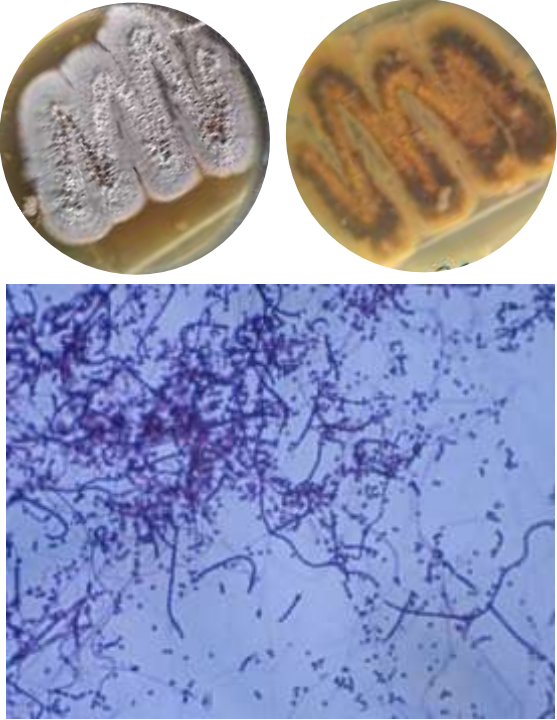
Isolated strains	Code GenBank/NCBI	Morphology
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B267	OR724644	 

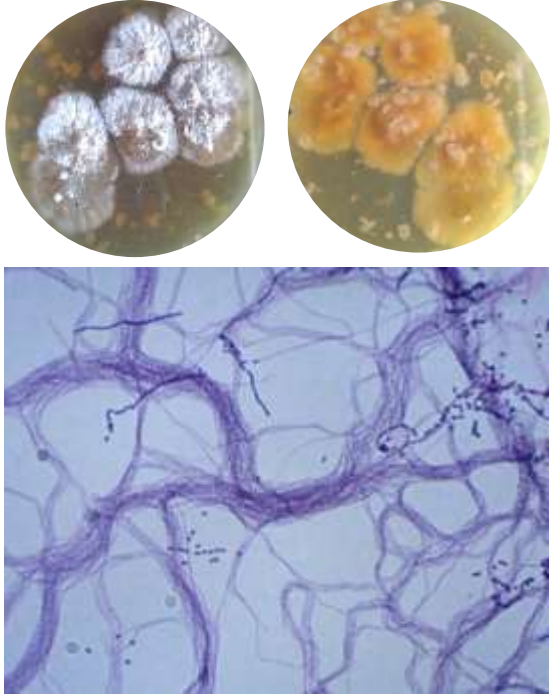
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B270	 
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B271 OR724661	 

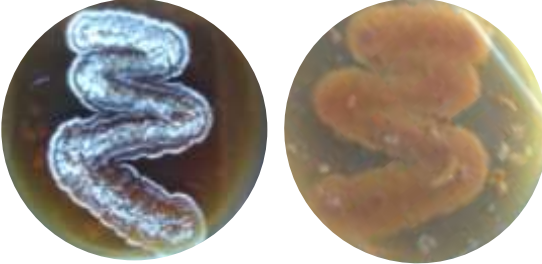
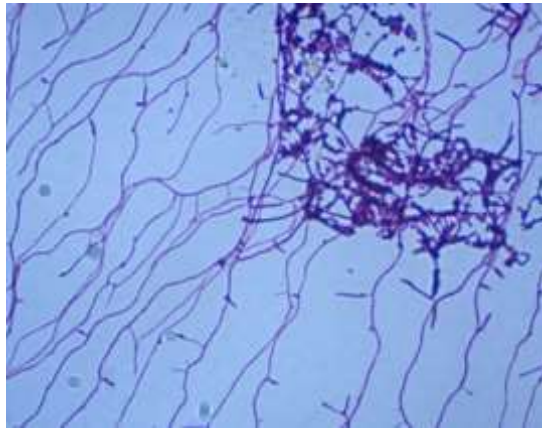
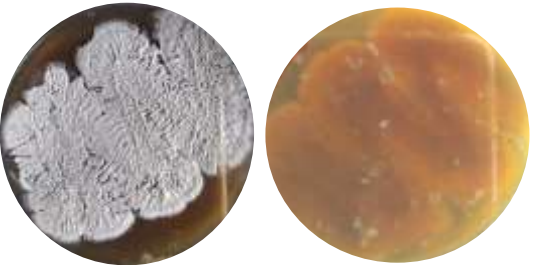
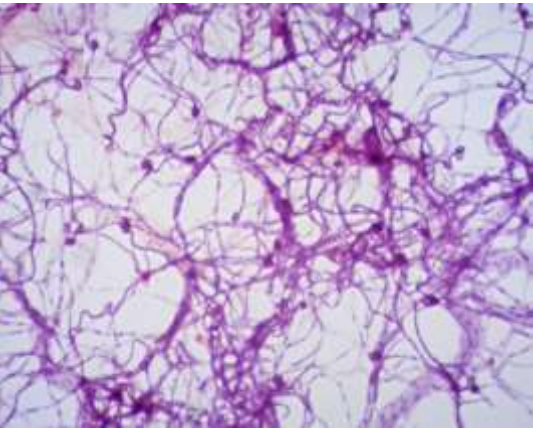
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B272	OR725986 
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B278	OR724700 

<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B280	 
<i>Kitasatospora</i> sp. LaBMicrA B282 OR725990	 

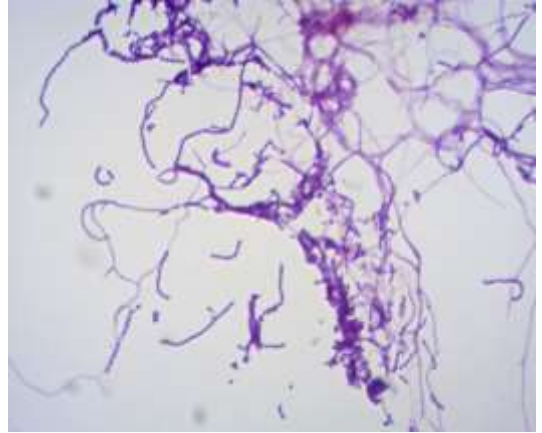
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B301 OR724719	
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B304 OR725980	

<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B310	OR726013 
<i>Kitasatospora</i> sp. LaBMicrA B313	OR726028 

<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B314	OR726569 
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B317	OR733339 

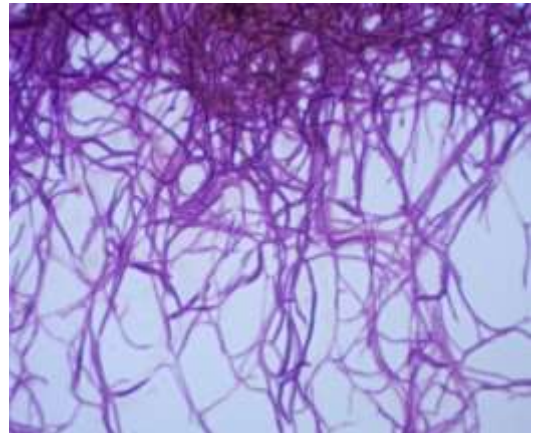
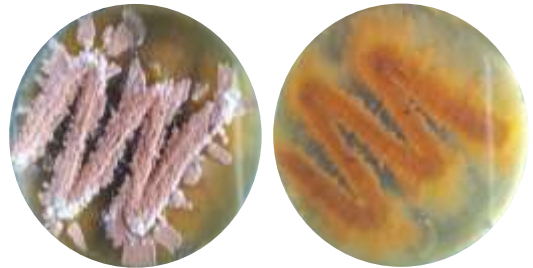
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B318 OR730983	 
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B319 OR730984	 
<i>Streptomyces</i> sp. OR730985	

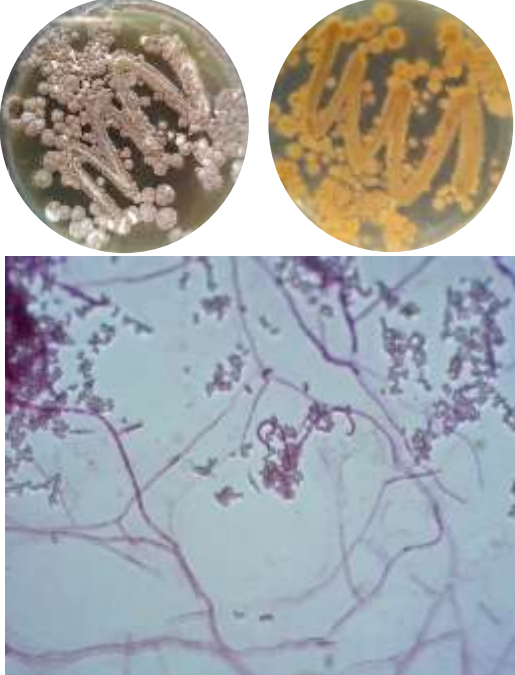
LaBMicrA
B322

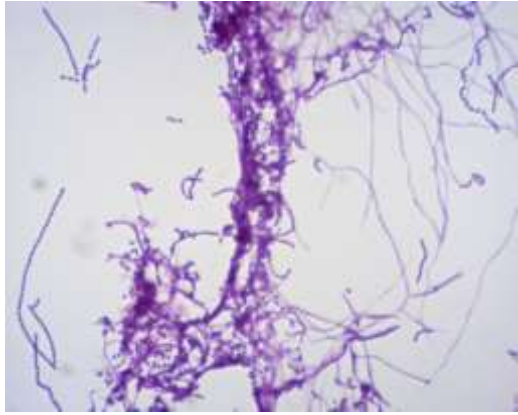


Streptomyces
sp.
LaBMicrA
B325

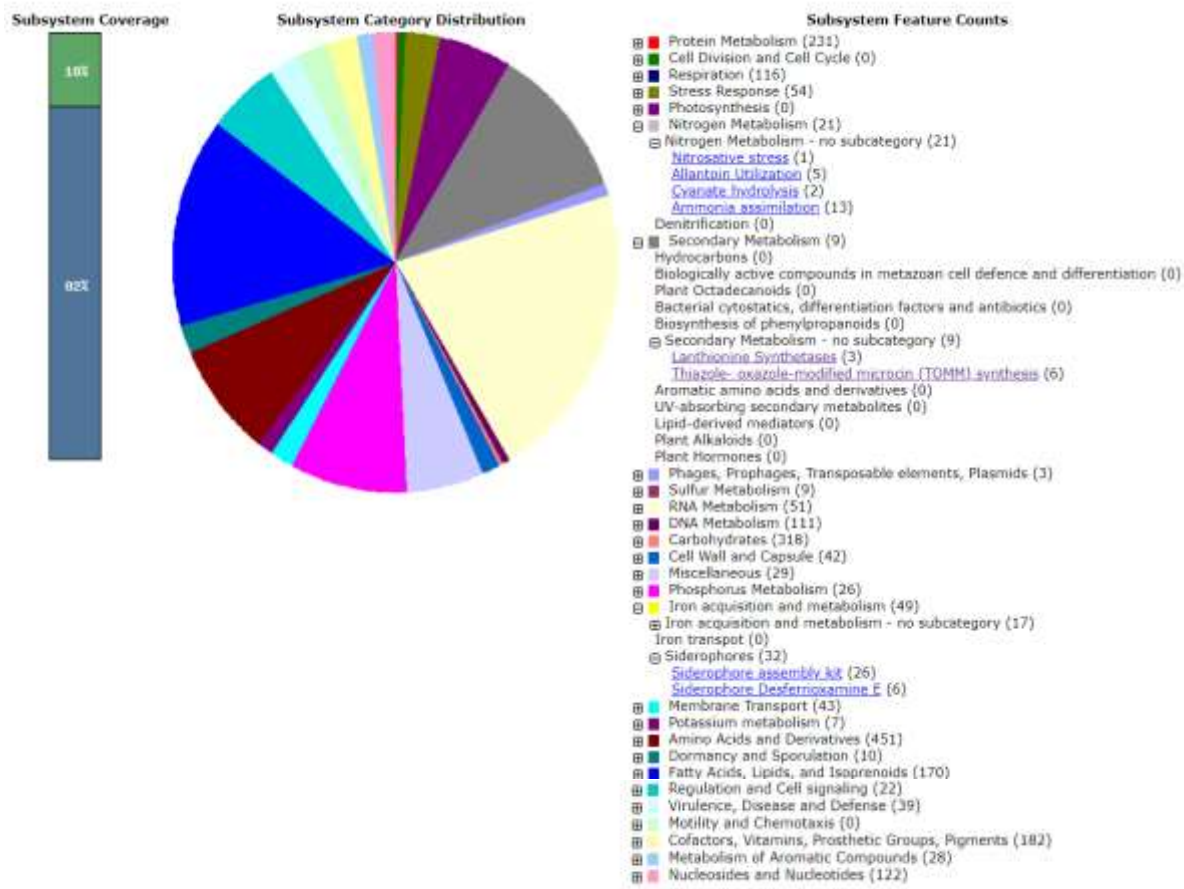
OR730986



<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B289 OR733333	
<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B290 OR733337	

<i>Streptomyces</i> sp. LaBMicrA B299 OR734917	  
--	--

MS1. Propostas da plataforma RAST de subsistemas metabólicos e sequências Codificantes (CDSs) de acordo com suas funcionalidades.



MS1. Siderophore assembly kit (26)

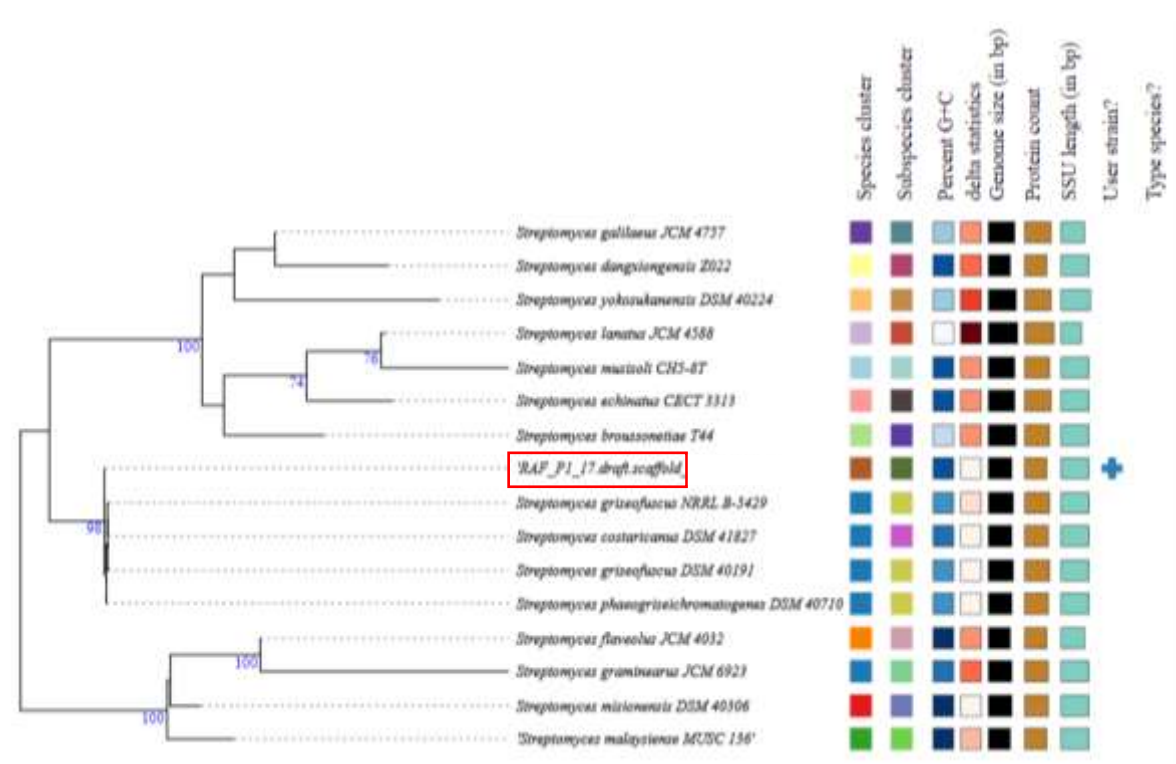
Functional Role	Reactions
Sdab	Siderophore biosynthesis diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase (EC 2.6.1.76)
Sdad	Siderophore biosynthesis L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase
SSIAc	Siderophore synthetase large component, acetyltransferase
SSsAc	Siderophore synthetase small component, acetyltransferase
SSLc	Siderophore synthetase component, ligase
SbsM	Siderophore biosynthesis protein, monooxygenase
LCFAL	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase of siderophore biosynthesis
STra	Siderophore transport protein
STonBrec	TonB-dependent siderophore receptor
FeSRTon	Ferric siderophore receptor, TonB dependent
Sperm	Siderophore related permease
FhuA	Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA
FhuB	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), permease component FhuB
FhuC	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), ATP-binding protein FhuC
FhuD	Ferric hydroxamate ABC transporter (TC 3.A.1.14.3), periplasmic substrate binding protein FhuD
FeSB	Iron-siderophore transport system, substrate-binding component
FeTM	Iron-siderophore transport system, transmembran component
FeP	Iron-siderophore transport system, permease component
FeATP	Iron-siderophore transport system, ATP-binding component
PchR	Transcriptional regulator PchR
PchA	Isochorismate synthase (EC 5.4.4.2) of siderophore biosynthesis
PchB	Isochorismate pyruvate-lyase (EC 4.-.-.-) of siderophore biosynthesis
PchC	Thioesterase in siderophore biosynthesis gene cluster
PchD	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EC 2.7.7.58) of siderophore biosynthesis
DHBAMPL1	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EC 2.7.7.58)
PchEPchF	Siderophore biosynthesis non-ribosomal peptide synthetase modules
PchG	ThiazolinyI imide reductase in siderophore biosynthesis gene cluster
PchHPchI	Putative ABC iron siderophore transporter, fused permease and ATPase domains
CycPep	ABC-type siderophore export system, fused ATPase and permease components
FptA	Outer membrane receptor for ferric siderophore
FtpB	Hypothetical protein FtpB in siderophore gene cluster
FtpC	Putative iron-regulated membrane protein in siderophore cluster
FptX	Inner-membrane permease for ferric siderophore
ICM	Isochorismatase (EC 3.3.2.1) of siderophore biosynthesis
BDH	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (EC 1.3.1.28) of siderophore biosynthesis
FeR	Ferric reductase (1.6.99.14)

PchK	Putative reductoisomerase in siderophore biosynthesis gene cluster
ABCp	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, permease component
ABCatp	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, ATPase component
ABCsb	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, periplasmic iron-binding component
ABCp2	ABC-type Fe ³⁺ -siderophore transport system, permease 2 component
Tonhem	TonB-dependent hemin receptor
hmuU	Hemin ABC transporter, permease protein
hmuV	ABC-type hemin transport system, ATPase component
hmuT	Periplasmic hemin-binding protein
hmuS	Hemin transport protein HmuS
hmuR	TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor
estlip	Esterase/lipase in siderophore cluster

MS1. Siderophore Desferrioxamine E (6)

Functional Role	Reactions
Tr	Putative Desferrioxamine E transporter
Hyp1	Hypothetical protein associated with desferrioxamine E biosynthesis
DesA	Desferrioxamine E biosynthesis protein DesA
DesB	Desferrioxamine E biosynthesis protein DesB
DesC	Desferrioxamine E biosynthesis protein DesC
DesD	Desferrioxamine E biosynthesis protein DesD

MS2-FILOGÊNIA COM BASE NAS SEQUÊNCIAS DE 16S rRNA



MS2. Árvore construída conforme descrito: “Second, an additional set of ten closely related type strains was determined via the 16S rDNA gene sequences. These were extracted from the user genomes using RNAMmer [4] and each sequence was subsequently BLASTed [5] against the 16S rDNA gene sequence of each of the currently 21282 type strains available in the TYGS database. This was used as a proxy to find the best 50 matching type strains (according to the bitscore) for each user genome and to subsequently calculate precise distances using the Genome BLAST Distance Phylogeny approach (GBDP) under the algorithm 'coverage' and distance formula d_5 ”.

MS3 - TABELA COM OS RESULTADOS DA ANÁLISE FILOGENÔMICA NA PLATAFORMA TYGS.

Query strain	Subject strain	dDDH (d0, in %)	C.I. (d0, in %)	dDDH (d4, in %)	C.I. (d4, in %)	dDDH (d6, in %)	C.I. (d6, in %)	G+C content difference (in %)
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B280	<i>Streptomyces costaricanus</i> DSM 41827	73,9	[69.9 - 77.5]	63,6	[60.6 - 66.4]	74,3	[70.9 - 77.5]	0,24
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B281	<i>Streptomyces gramineus</i> JCM 6923	75,5	[71.5 - 79.0]	62,7	[59.8 - 65.5]	75,5	[72.0 - 78.7]	0,16
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B282	<i>Streptomyces phaeogriseichromatogenes</i> DSM 40710	68,7	[64.8 - 72.3]	61,6	[58.7 - 64.4]	69,4	[65.9 - 72.6]	0,27
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B283	<i>Streptomyces griseofuscus</i> NRRL B-5429	64,8	[61.0 - 68.4]	61,4	[58.5 - 64.2]	65,9	[62.5 - 69.1]	0,27
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B284	<i>Streptomyces griseofuscus</i> DSM 40191	64,2	[60.4 - 67.8]	61,3	[58.5 - 64.1]	65,4	[62.0 - 68.6]	0,34
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B285	<i>Streptomyces malaysiense</i> MUSC 136	58,4	[54.8 - 61.9]	51,1	[48.5 - 53.7]	57,8	[54.6 - 61.0]	0,25
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B286	<i>Streptomyces missionensis</i> DSM 40306	49,3	[45.8 - 52.7]	36,7	[34.2 - 39.2]	46,1	[43.1 - 49.1]	0,41
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B287	<i>Streptomyces echinatus</i> CECT 3313	32,4	[29.0 - 36.0]	29,9	[27.5 - 32.4]	30,7	[27.8 - 33.8]	0,07
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B288	<i>Streptomyces musisoli</i> CH5-8T	32	[28.7 - 35.6]	29,9	[27.5 - 32.4]	30,4	[27.5 - 33.5]	0,11
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B289	<i>Streptomyces brousonetiae</i> T44	32,2	[28.8 - 35.8]	29,2	[26.9 - 31.7]	30,4	[27.5 - 33.5]	1,09
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B290	<i>Streptomyces yokosukanensis</i> DSM 40224	32,2	[28.8 - 35.7]	29,2	[26.9 - 31.7]	30,4	[27.5 - 33.5]	0,73
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B291	<i>Streptomyces dangxiangensis</i> Z022	33,4	[30.0 - 37.0]	29,1	[26.8 - 31.6]	31,4	[28.4 - 34.5]	0,15
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B292	<i>Streptomyces flaveolus</i> JCM 4032	26,8	[23.5 - 30.5]	26	[23.6 - 28.4]	25,5	[22.6 - 28.6]	0,27
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B293	<i>Streptomyces lanatus</i> JCM 4588	24,3	[21.0 - 27.9]	25,2	[22.9 - 27.7]	23,3	[20.5 - 26.4]	1,58
<i>Streptomyces</i> sp. nov. LaBMicrA B294	<i>Streptomyces galliaeus</i> JCM 4757	24,9	[21.5 - 28.5]	25,2	[22.9 - 27.7]	23,8	[20.9 - 26.9]	0,77

MS4 - TABELAS COM OS RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS NA PLATAFORMA Secondary Metabolites Analysis Shell Bacterial (antiSMASH), versão 7.1.0 para as linhagens ‘Tipo’ com similaridade > 50% com os de LaBMicrA B280.

Streptomyces costaricanus (murinus) DSM 41827

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 2.1	T1PKS,NRPS	82,404	240,865	pentamycin	100
Region 2.2	NRPS	263,36	307,871	diisonitrile antibiotic SF2768	66
Region 2.3	NRPS-like,T1PKS	315,923	364,319	borrelidin	11
Region 2.4	terpene	524,503	546,176	-	0
Region 2.5	other,NRPS	941,972	1,009,690	actinomycin D	89
Region 2.6	crocagin	1,157,938	1,186,024	foxicin A/foxicin B/foxicin C/foxicin	12
Region 2.7	ectoine,NRPS,NAPAA	1,350,113	1,465,850	stenothricin	27
Region 2.8	T3PKS	1,469,403	1,510,467	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 2.9	T1PKS,hglE-KS	1,564,063	1,616,057	hexacosalactone A	13
Region 2.10	ectoine	2,220,986	2,231,396	ectoine	100
Region 2.11	lanthipeptide-class-iii	2,926,423	2,949,113	-	0
Region 2.12	melanin	3,155,197	3,165,802	melanin	60
Region 2.13	NI-siderophore	3,231,035	3,260,804	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 2.14	lassopeptide	3,407,986	3,430,539	albusnodin	100
Region 2.15	tripeptide	3,726,217	3,747,600	-	0
Region 2.16	T2PKS,T1PKS	3,892,919	3,965,524	spore pigment	83
Region 2.17	terpene	5,524,473	5,545,558	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5	25
Region 2.18	terpene	5,865,999	5,887,045	-	0
Region 2.19	NRPS,NI-siderophore,T1PKS	6,179,929	6,259,273	kinamycin	25
Region 2.20	other,T1PKS,PKS-like	6,393,040	6,450,673	meilingmycin	5
Region 2.21	RiPP-like	6,522,342	6,533,646	-	0
Region 2.22	terpene	6,543,768	6,565,930	geosmin	100
Region 2.23	T1PKS,NRPS,RRE-containing,NI-siderophore	6,692,669	6,819,413	omnipectin	17
Region 2.24	NRPS,NRPS-like,betalactone,phosphonate	7,044,622	7,138,010	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 2.25	terpene,thiopeptide,LAP	7,233,514	7,286,437	hopene	92
Region 2.26	transAT-PKS-like,NRPS-like,T1PKS	7,440,625	7,490,443	cinnabaramide A	18
Region 2.27	NRPS,lanthipeptide-class-i,lanthipeptide-class-ii	7,655,694	7,720,438	bleomycin	12
Region 2.28	NRP-metallophore,NRPS	7,738,419	7,800,121	mirubactin	78
Region 2.29	T1PKS	7,826,602	7,871,137	tetronasin	3
Region 2.30	RiPP-like	7,934,491	7,944,706	informatipeptin	28
Region 2.31	betalactone	8,043,349	8,072,825	fusaricidin B	25
Region 2.32	NRPS,T1PKS,NRPS-like	8,129,706	8,213,992	petrichorin A/petrichorin B	11
Region 2.33	terpene	8,218,702	8,239,982	ebelactone	5
Region 2.34	other,hydrogen-cyanide	8,286,210	8,331,458	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	7

Streptomyces gramineus JCM 6923

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	T1PKS,NRPS	168,971	325,239	pentamycin	100
Region 1.2	NRPS	352,217	396,647	diisonitrile antibiotic SF2768	66
Region 1.3	NRPS-like,T1PKS	396,962	445,364	borrelidin	11
Region 2.1	other,T1PKS,PKS-like	33,328	91,048	tambjamine BE-18591	21
Region 2.2	RiPP-like	149,147	160,451		0
Region 2.3	terpene	172,697	194,859	geosmin	100
Region 2.4	T1PKS,NRPS,RRE- containing,NI-siderophore	306,164	433,231	friulimicin A/friulimicin B/friulimicin C/friulimicin D	21
Region 5.1	RiPP-like	90,632	101,069		0
Region 5.2	terpene	218,469	239,554	julichrome Q3-3/julichrome Q3- 5	25
Region 6.1	T1PKS	67,344	115,779	A54145	3
Region 6.2	ectoine	124,906	135,283	showdomycin	23
Region 6.3	NRPS,NAPAA	148,672	191,923	stenothricin	13
Region 6.4	T3PKS	195,327	236,391	flaviolin/1,3,6,8- tetrahydroxynaphthalene	100
Region 7.1	lanthipeptide-class-iii	86,809	109,499		0
Region 7.2	NRPS-like	182,35	225,895	SCO-2138	64
Region 9.1	RiPP-like	85,544	95,759	informatipeptin	28
Region 10.1	other,NRPS	250,228	317,982	actinomycin D	89
Region 11.1	melanin	130,254	140,868	melanin	60
Region 11.2	NI-siderophore	210,852	240,621	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 14.1	T1PKS	1	35,965	tetronasin	3
Region 14.2	NRP-metallophore,NRPS	62,499	125,392	coelibactin	54
Region 15.1	ectoine	79,678	90,088	ectoine	100
Region 16.1	NRPS,lanthipeptide-class- i,lanthipeptide-class-ii	92,24	157,203	bleomycin	12
Region 16.2	NRP- metallopore,NRPS,lassopepti de	174,191	257,764	mirubactin	78
Region 18.1	T1PKS	1	2,515		0
Region 19.1	T1PKS	1	13,76	JBIR-100	38
Region 21.1	T1PKS,NRPS,butyrolactone	48,973	119,472	5-isoprenylindole-3-carboxylate β -D-glycosyl ester	47
Region 23.1	T1PKS,NRPS-like,transAT- PKS-like	49,489	99,328	cinnabaramide A	18
Region 25.1	T1PKS	1	56,62		0
Region 25.2	other,lanthipeptide-class-iv	61,391	102,764	A-503083 A/A-503083 B/A- 503083 E/A-503083 F	7
Region 25.3	terpene	150,883	172,199	ebelactone	5
Region 25.4	T1PKS	174,758	215,666	petrichorin A/petrichorin B	14
Region 26.1	lanthipeptide-class-i	5,014	31,44	desulfoclethramycin/clethramyc in	4
Region 27.1	hglE-KS,T1PKS	43,283	95,421	hexacosalactone A	13
Region 31.1	lassopeptide	58,117	80,667	albusnodin	100
Region 34.1	thiopeptide,LAP,terpene	103,64	156,267	hopene	92
Region 34.2	NRPS,phosphonate,NRPS- like,betalactone,PKS- like,NRP-metallophore	239,357	373,702	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 39.1	lanthipeptide-class- v,T1PKS,T2PKS	112,527	166,946	spore pigment	83
Region 44.1	lassopeptide	1	5,387		0
Region 53.1	T1PKS,NI-siderophore,NRPS	101,601	182,416	kinamycin	25
Region 56.1	butyrolactone	9,576	20,511	s56-p1	3

Streptomyces phaeogriseichromatogenes DSM 40710

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1		116,13	163,818	carbapenem MM4550	10
Region 1.2	T1PKS,NRPS	235,318	398,193	pentamycin	100
Region 1.3	T1PKS	1,239,650	1,288,085		0
Region 1.4	ectoine,NRPS,NAPAA	1,306,145	1,418,905	stenothricin	27
Region 1.5	T3PKS	1,422,142	1,463,206	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 1.6	T1PKS,hglE-KS	1,500,475	1,552,394	hexacosalactone A	13
Region 1.7	ectoine	2,147,139	2,157,549	ectoine	100
Region 1.8	NRPS-like	2,717,068	2,760,595	SCO-2138	64
Region 1.9	melanin	3,014,235	3,024,831	melanin	60
Region 1.10	NI-siderophore	3,088,221	3,117,990	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 1.11	T2PKS	3,730,348	3,802,859	spore pigment	83
Region 1.12	butyrolactone	4,462,940	4,473,872	s56-p1	3
Region 1.13	terpene	5,285,583	5,306,668	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5	25
Region 1.14	NRPS,NI-siderophore	5,866,654	5,924,422	kinamycin	13
Region 1.15	other,T1PKS,PKS-like	6,097,884	6,155,440	meilingmycin	5
Region 1.16	RiPP-like	6,205,126	6,216,430		0
Region 1.17	terpene	6,227,254	6,249,416	geosmin	100
Region 1.18	T1PKS,NRPS,RE-containing,NI-siderophore	6,356,381	6,483,026	omnipeptin	17
Region 1.19	terpene,NRPS,betalactone,NRP S-like,phosphonate	6,706,631	6,801,922	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 1.20	terpene,thiopeptide,LAP	6,886,975	6,939,399	hopene	92
Region 1.21	transAT-PKS-like,NRPS-like,T1PKS	7,097,737	7,147,564	cinnabaramide A	18
Region 1.22	NRPS,lanthipeptide-class-i,lanthipeptide-class-ii	7,259,960	7,324,387		0
Region 1.23	T1PKS	7,391,128	7,435,663	tetronasin	3
Region 1.24	RiPP-like	7,460,349	7,470,564	informatipeptin	28
Region 1.25	NRPS,T1PKS,NRPS-like,terpene	7,643,360	7,747,669	petrichorin A/petrichorin B	17
Region 1.26	other,lanthipeptide-class-iv	7,786,940	7,828,313	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	7
Region 1.27	NI-siderophore	7,828,318	7,859,639	peucechelin	10
Region 1.28	NAPAA,hydrogen-cyanide	7,870,716	7,907,443	ϵ -Poly-L-lysine	100
Region 1.29	NRPS-like,NRPS,T1PKS	8,051,378	8,117,297	carbapenem MM4550	10
Region 2.1	terpene,T2PKS,butyrolactone,T1PKS,transAT-PKS,NRPS,redox-cofactor	58,782	244,653	lankamycin	100

Streptomyces griseofuscus NRRL B-5429

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 3.1	NI-siderophore	157,173	186,942	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 3.2	melanin	250,288	260,884	melanin	60
Region 4.1	NRPS,T1PKS,NRPS-like,terpene	1	102,707	petrichorin A/petrichorin B	17
Region 4.2	other,lanthipeptide-class-iv	142,733	184,106	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	7
Region 4.3	NI-siderophore	184,512	215,833	peucechelin	10
Region 4.4	NAPAA,hydrogen-cyanide	227,003	263,704	ϵ -Poly-L-lysine	100
Region 5.1	T1PKS	35,697	80,232	tetronasin	3
Region 5.2	RiPP-like	103,825	114,04	informatipeptin	28
Region 7.1	T2PKS	68,753	141,264	spore pigment	83
Region 10.1	other,T1PKS,PKS-like	150,765	201,941	tambjamine BE-18591	21
Region 12.1	NRPS,betalactone,NRPS-like,phosphonate	81,37	169,164	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 13.1	NRPS-like	139,371	173,966	SCO-2138	64
Region 14.1	RiPP-like	87,504	98,829		0
Region 14.2	terpene	109,794	131,956	geosmin	100
Region 19.1	ectoine	78,749	89,159	ectoine	100
Region 20.1	NRPS,T1PKS	1	73,514	meridamycin	23
Region 21.1	NRPS,lanthipeptide-class-i,lanthipeptide-class-ii	73,712	137,83		0
Region 23.1	thiopeptide,LAP,terpene	68,783	116,469	hopene	92
Region 26.1	T1PKS,NRPS	1	35,971	meilingmycin	2
Region 27.1	T1PKS,hglE-KS	10,992	62,938	hexacosalactone A	13
Region 31.1	T3PKS	53,931	93,235	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 32.1	T1PKS	65,088	92,62	filipin	84
Region 33.1	T1PKS	50,787	89,81		0
Region 34.1	2PKS,T1PKS,butyrolactone,terpene	1	81,356	lactonamycin	26
Region 38.1	NRPS-like	49,83	71,372	paulomycin	13
Region 40.1	terpene	1	19,843	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5	21
Region 43.1	ansAT-PKS-like,NRPS-like,T1PKS	22,926	62,843	cinnabaramide A	18
Region 46.1	NRPS	1	23,183	arthrofactin A	50
Region 46.2	ectoine	23,938	34,315	showdomycin	23
Region 49.1	NI-siderophore,RRE-containing	5,16	50,141	enduracididine	23
Region 55.1	lanthipeptide-class-i	12,512	37,694		0
Region 56.1	terpene	25,112	45,644	carotenoid	63
Region 61.1	NRPS-like	4,646	42,388		0
Region 64.1	NRPS,NAPAA	1	39,597	glycinocin A	9
Region 66.1	NRPS,NRPS-like,T1PKS	1	37,089		0
Region 67.1	T1PKS	30,816	68,421	carbapenem MM4550	10
Region 68.1	butyrolactone	26,001	36,933	s56-p1	3
Region 70.1	NI-siderophore,NRPS	12,318	63,259	kinamycin	13
Region 73.1	ransAT-PKS,NRPS,redox-cofactor	1	55,332	lankacidin C	100
Region 82.1	T1PKS	1	21,938	lankamycin	56
Region 87.1	T1PKS	1	18,774	piericidin A1	41
Region 93.1	T1PKS,transAT-PKS	1	25,139	tetrafibricin	100
Region 102.1	T1PKS	1	8,642	niddamycin	71
Region 105.1	NRPS	1	5,834	enduracidin	6

Region 107.1	NRPS	1	5,229	skyllamycin D/skylamycin E	3
Region 109.1	T1PKS	1	4,639		0
Region 118.1	NRPS-like,NRPS	1	4,29	trioestin A	11
Region 123.1	T1PKS	1	4,156		0
Region 127.1	NRPS	1	2,695		0
Region 128.1	NRPS	1	3,053		0
Region 133.1	T1PKS	1	5,545	caniferolide A/caniferolide B/caniferolide C/caniferolide D	12
Region 145.1	NRPS	1	2,462	taromycin A	10
Region 146.1	NRPS	1	1,167	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C	100
Region 147.1	T1PKS	1	1,315		0
Region 151.1	NRPS	1	1,458		0

Streptomyces griseofuscus DSM 40191

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	T1PKS,NRPS,NRPS-like	111,752	177,078	carbapenem MM4550	6
Region 1.2	hydrogen-cyanide,NAPAA	311,877	348,578	ϵ -Poly-L-lysine	100
Region 1.3	NI-siderophore	359,748	391,069	peucechelin	10
Region 1.4	other,lanthipeptide-class-iv	391,475	432,848	A-503083 A/A-503083 B/A-503083 E/A-503083 F	7
Region 1.5	terpene,NRPS-like,NRPS,T1PKS	472,874	577,169	petrichorin A/petrichorin B	17
Region 1.6	RiPP-like	748,061	758,276	informatipeptin	28
Region 1.7	T1PKS	781,869	826,404	tetronasin	3
Region 1.8	lanthipeptide-class-i,NRPS,lanthipeptide-class-ii	893,057	957,479		0
Region 1.9	T1PKS,NRPS-like,transAT-PKS-like	1,071,652	1,121,491	cinnabaramide A	18
Region 1.10	thiopeptide,LAP,terpene	1,283,460	1,335,882	hopene	92
Region 1.11	NRPS,phosphonate,NRPS-like,betalactone	1,420,835	1,508,629	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 1.12	lanthipeptide-class-i	1,676,415	1,701,597		0
Region 1.13	NRPS-like	1,806,037	1,854,157		0
Region 1.14	NRPS,NI-siderophore,RRE-containing,T1PKS	1,916,413	2,043,080	omnipeptin	17
Region 1.15	terpene	2,149,984	2,172,146	geosmin	100
Region 1.16	RiPP-like	2,183,111	2,194,436		0
Region 1.17	PKS-like,T1PKS,other	2,320,695	2,378,251	meilingmycin	5
Region 1.18	NI-siderophore,NRPS	2,541,499	2,599,039	kinamycin	13
Region 1.19	terpene	3,158,540	3,179,625	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5	21
Region 1.20	butyrolactone	4,004,072	4,015,004	s56-p1	3
Region 1.21	T2PKS	4,642,100	4,714,611	spore pigment	83
Region 1.22	NI-siderophore	5,471,347	5,501,116	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 1.23	melanin	5,564,462	5,575,058	melanin	60
Region 1.24	NRPS-like	5,827,796	5,871,323	SCO-2138	64
Region 1.25	ectoine	6,446,222	6,456,632	ectoine	100
Region 1.26	hgIE-KS,T1PKS	7,049,867	7,101,813	hexacosalactone A	13

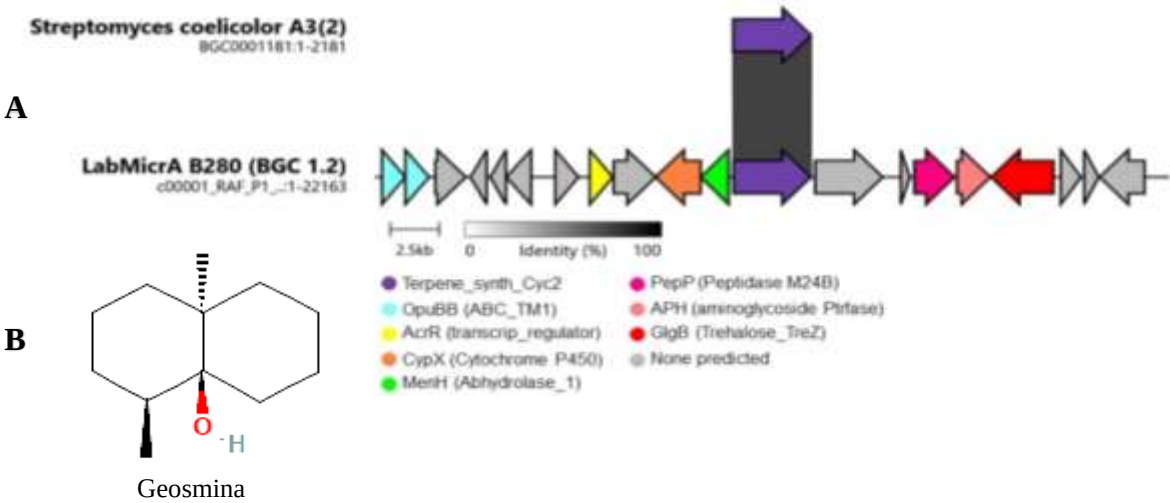
Region 1.27	T3PKS	7,167,442	7,208,506	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 1.28	NRPS,NAPAA,ectoine	7,211,733	7,324,494	stenothricin	27
Region 1.29	T1PKS	7,342,225	7,390,660		0
Region 1.30	NRPS,T1PKS	8,241,194	8,397,648	pentamycin	100
Region 1.31	T1PKS	8,471,303	8,518,949	carbapenem MM4550	10
Region 1.32	terpene	8,603,150	8,628,841	carotenoid	63

Streptomyces malaysiense MUSC 136

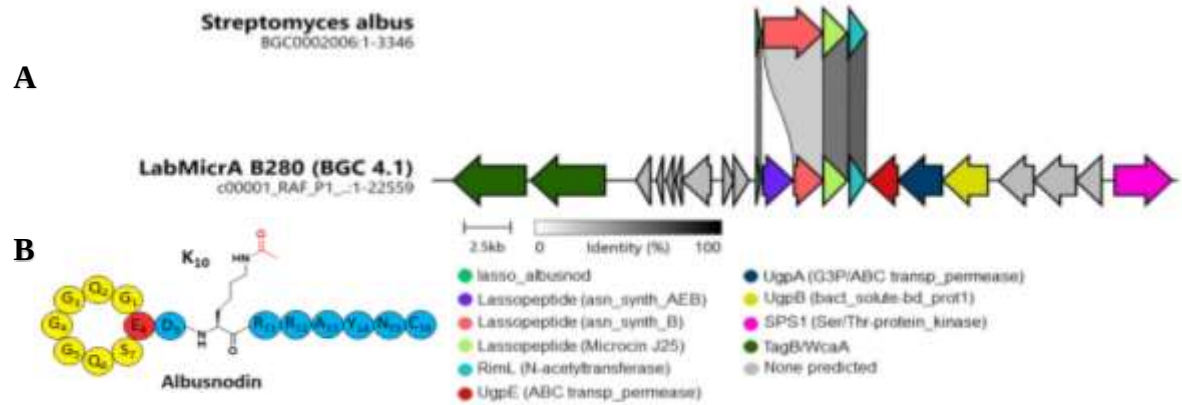
Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1.1	T1PKS	25,252	69,784	tetronasin	3
Region 1.2	RiPP-like	85,935	96,15	hexacosalactone A	4
Region 3.1	T2PKS,T1PKS	1	19,552	spore pigment	66
Region 6.1	T1PKS	1	17,45	tetronasin	3
Region 13.1	hglE-KS,T1PKS	41,631	71,625	hexacosalactone A	4
Region 20.1	NRPS,NAPAA	60,352	92,107	stenothricin	13
Region 24.1	NRPS,phenazine	217,7	336,496	diisonitrile antibiotic SF2768	55
Region 29.1	lanthipeptide-class-iv	1	12,968	labyrinthopeptin A2/labyrinthopeptin A1/labyrinthopeptin A3	40
Region 33.1	NRPS,other	1	40,89	himastatin	24
Region 38.1	NRPS	1	14,352	cadaside A/cadaside B	14
Region 60.1	NRPS	1	4,932	omnipeptin	11
Region 67.1	NRPS-like	1	2,369		0
Region 75.1	terpene	181,768	202,805	julichrome Q3-3/julichrome Q3-5	25
Region 78.1	terpene	51,601	73,763	geosmin	100
Region 78.2	RiPP-like	82,522	93,814		0
Region 79.1	NRPS-like	1	1,048	rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C	100
Region 92.1	NI-siderophore,PKS-like,T1PKS,other	24,116	102,998	meilingmycin	5
Region 92.2	T3PKS,lanthipeptide-class-iii,lanthipeptide-class-ii	149,127	191,034	germicidin	100
Region 95.1	hydrogen-cyanide	14,963	27,948	aborycin	14
Region 99.1	NRPS,NRPS-like	20,094	91,556	JBIR-34/JBIR-35	70
Region 101.1	NRPS,terpene,betalactone,NRP S-like,phosphonate	1	82,963	leupeptin Pr/leupeptin Ac	100
Region 103.1	ectoine	75,59	85,994	ectoine	100
Region 109.1	T1PKS	1	24,67	clipibyclene	4
Region 109.2	terpene	42,773	68,956	isorenieratene	100
Region 111.1	terpene	35,765	55,488	ebelactone	5
Region 112.1	LAP,thiopeptide	1	23,357	hexacosalactone A	4
Region 119.1	NRPS	3,65	49,793	pseudouridimycin	12
Region 120.1	T1PKS	1	29,531	maklamicin	8
Region 122.1	T3PKS	11,316	52,38	flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene	100
Region 123.1	NI-siderophore	36,306	67,536	enduracididine	20
Region 124.1	terpene,thiopeptide,LAP	81,047	133,545	hopene	92

Region 125.1	lanthipeptide-class-v,thioamitides	54,3	97,345	thioholgamide A/thioholgamide B	100
Region 131.1	NI-siderophore	1,359	31,128	desferrioxamin B/desferrioxamine E	100
Region 131.2	melanin	86,102	96,674	melanin	60
Region 134.1	NRPS	1	11,817	cadaside A/cadaside B	9
Region 135.1	T1PKS,NI-siderophore	1	23,791	kinamycin	13
Region 149.1	T1PKS	43,627	71,189	versipelostatin	54
Region 161.1	lanthipeptide-class-i,NRPS,lanthipeptide-class-ii	14,621	78,763	bleomycin	12
Region 165.1	transAT-PKS-like,NRPS-like	39,607	64,77	cinnabaramide A	18
Region 167.1	butyrolactone	6,441	17,388	neocarzinostatin	6

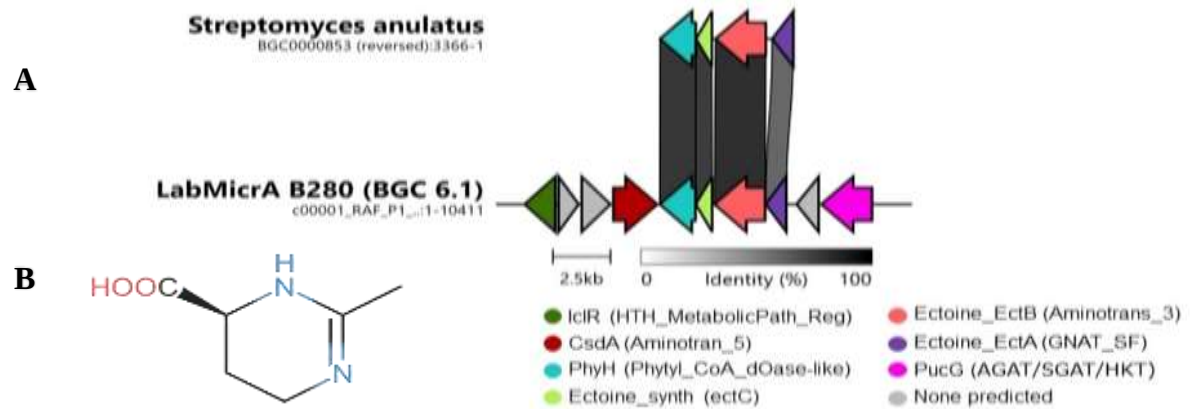
MS5 - SINTENIA ENTRE OS BGCS COM 100% DE SIMILARIDADE E SEUS PRODUTOS QUÍMICOS



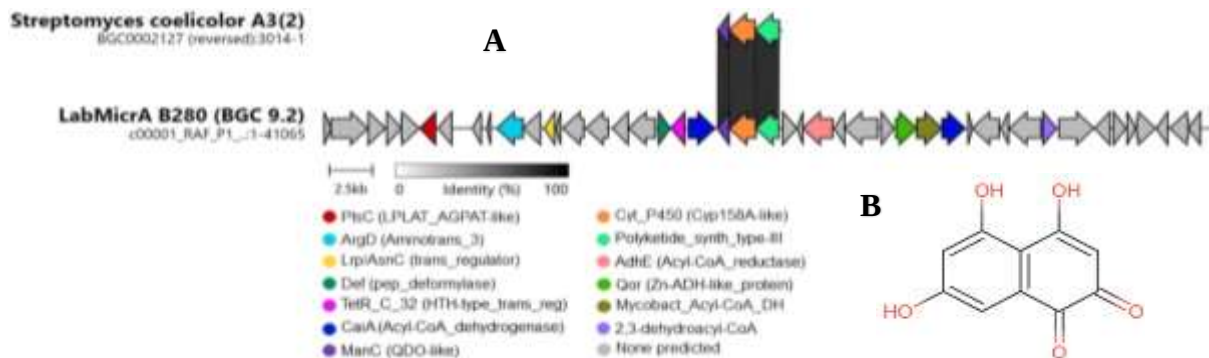
Região 1.2: (A) sintenia dos genes dos BGCS dos genomas da linhagem LaBMicrA B280 e *S. coelicolor* A3(2).
(B) Geosmina (MIBiG-BGC0001181).



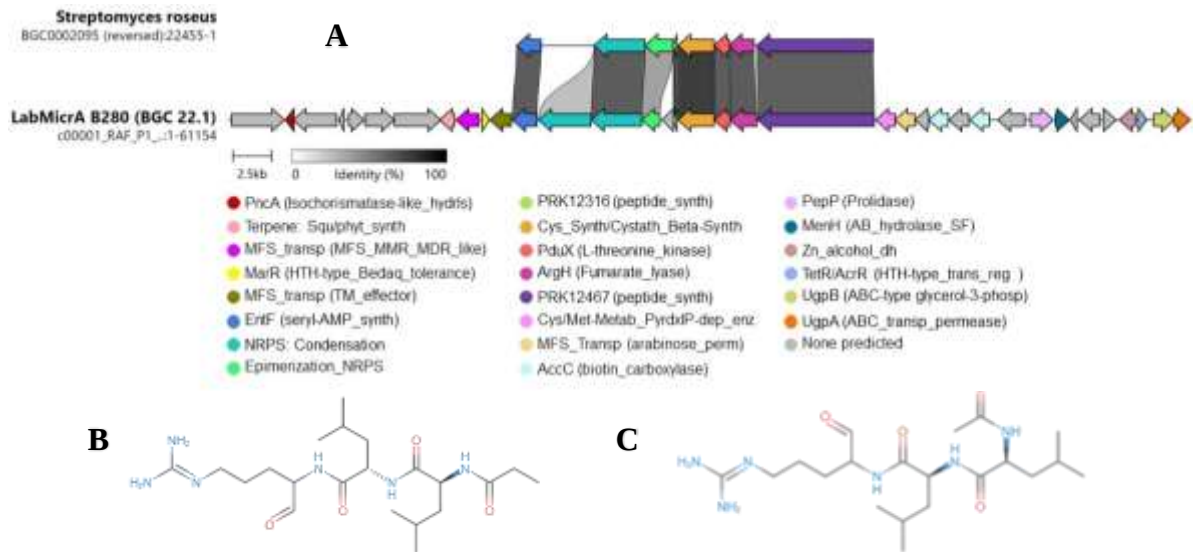
Região 4.1: (A) sintenia dos genes dos BGCs dos genomas da linhagem LabMicrA B280 e *Streptomyces albus*. (B)Albusnodin (MIBiG-BGC0002006).



Região 6.1: (A) sintenia dos genes dos BGCs dos genomas da linhagem LabMicrA B280 e *S. anulatus*. (B)Ectonina (MIBiG-BGC0000853).

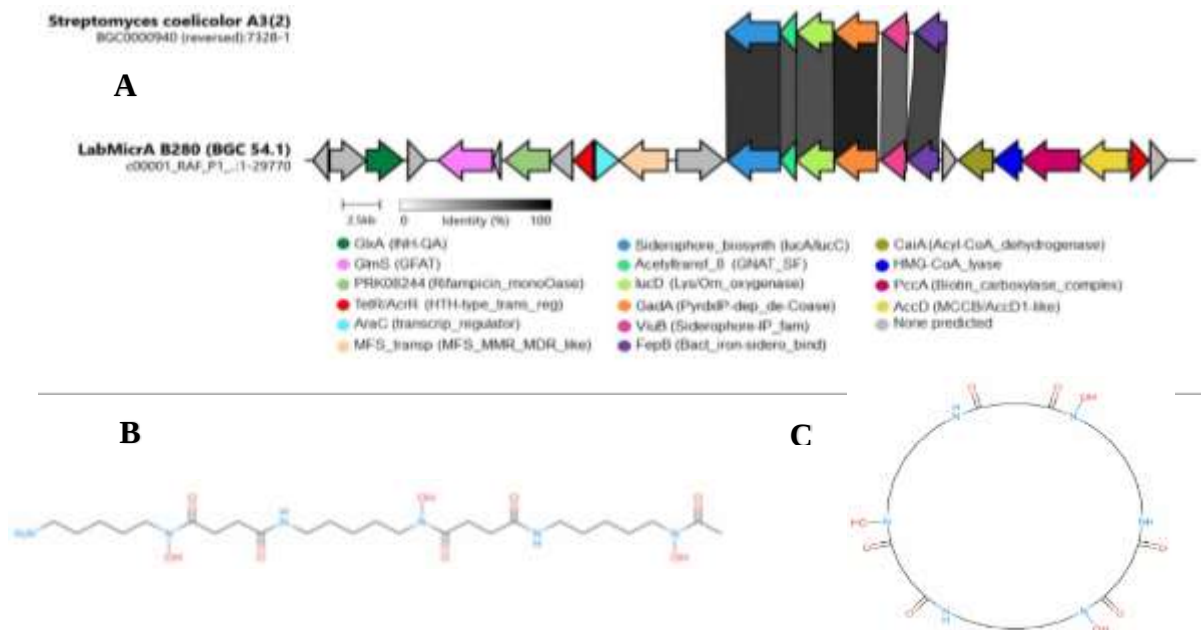


Região 9.2: (A) sintenia dos genes dos BGCs dos genomas da linhagem LabMicrA B280 e *Streptomyces coelicolor* A3(2). (B) Flaviolin/1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (MIBiG-BGC0002127).

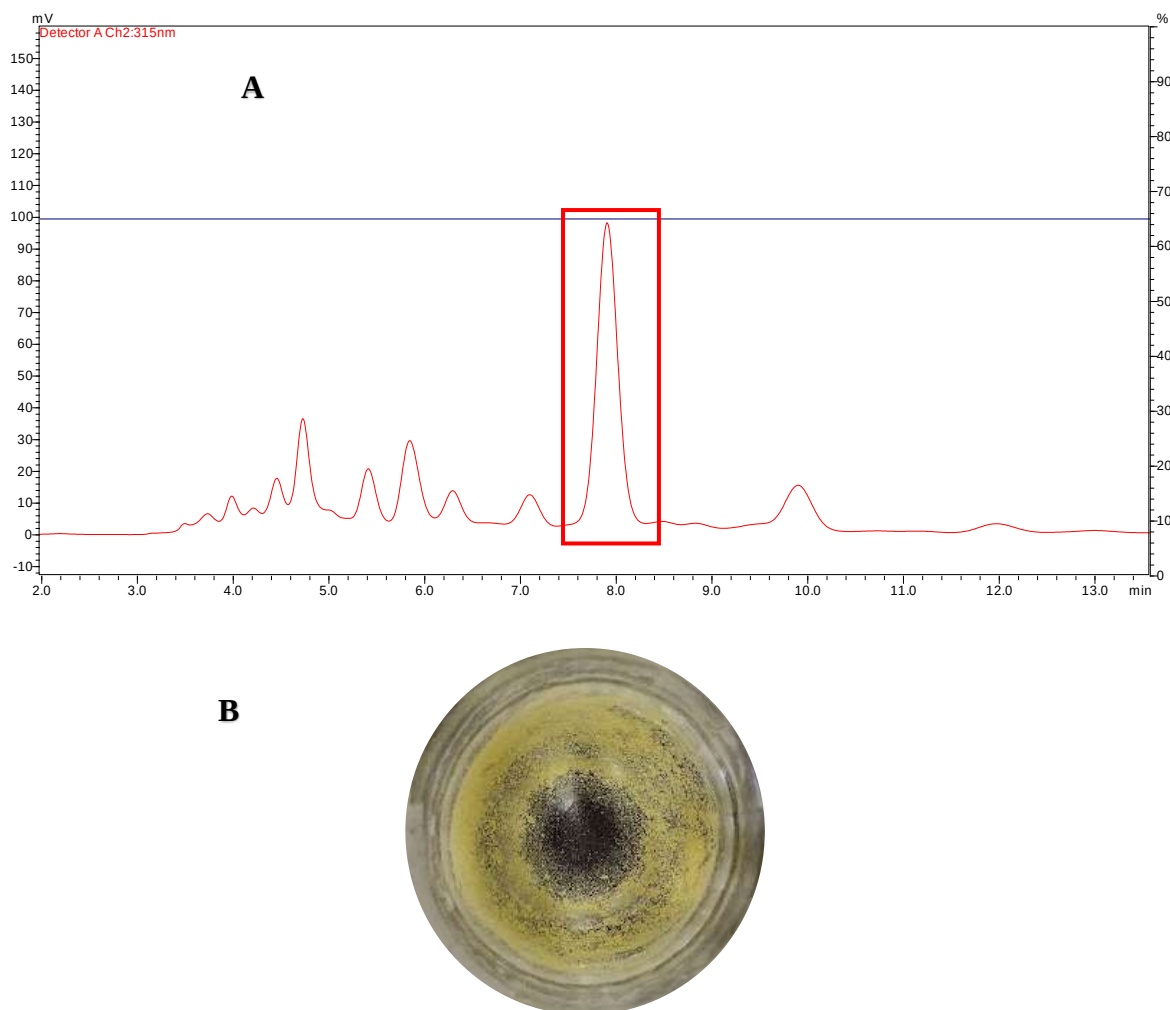


Região 22.1: sentença dos genes dos BGCs dos genomas da linhagem LabMicrA B280 e *Streptomyces roseus*.

(B) Leupeptin Pr e (C) Leupeptin Ac (MIBiG-BGC0002095).

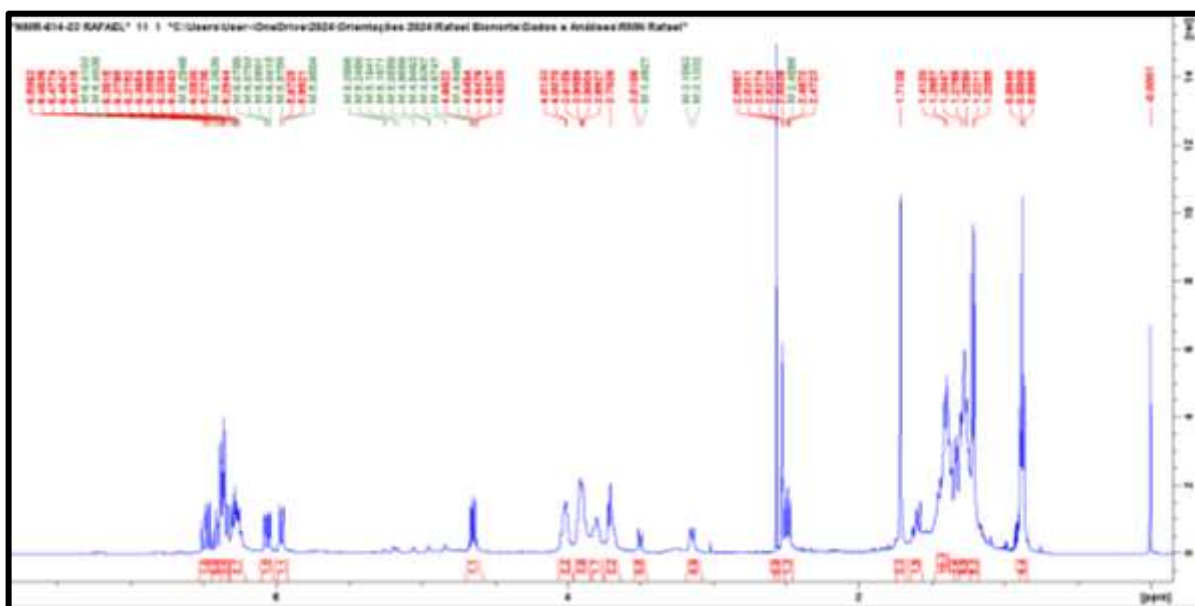
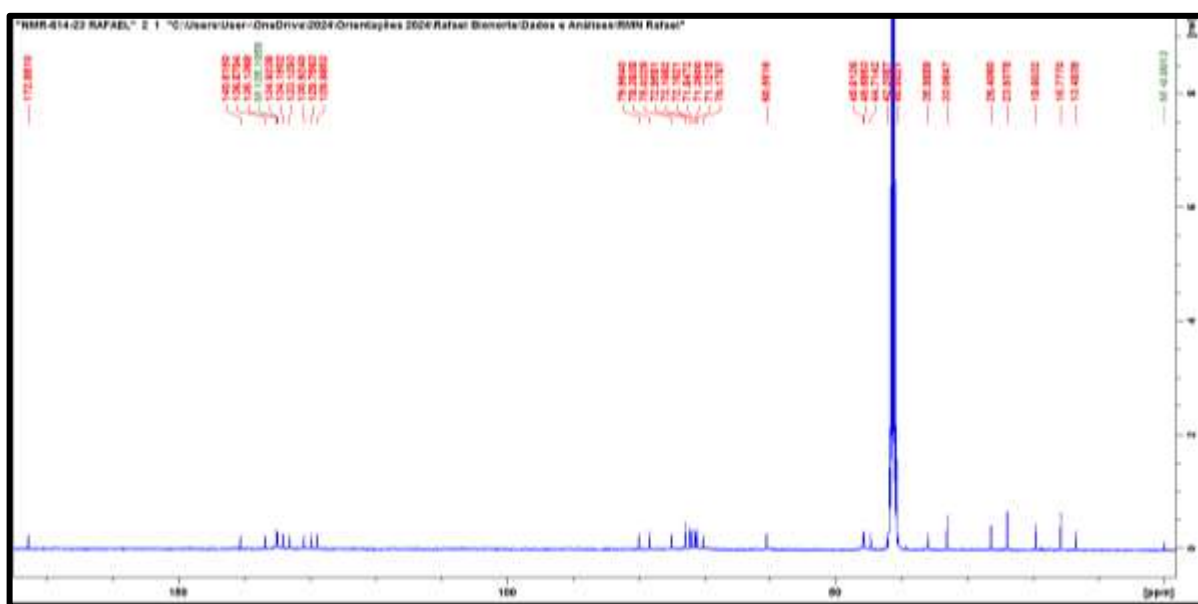


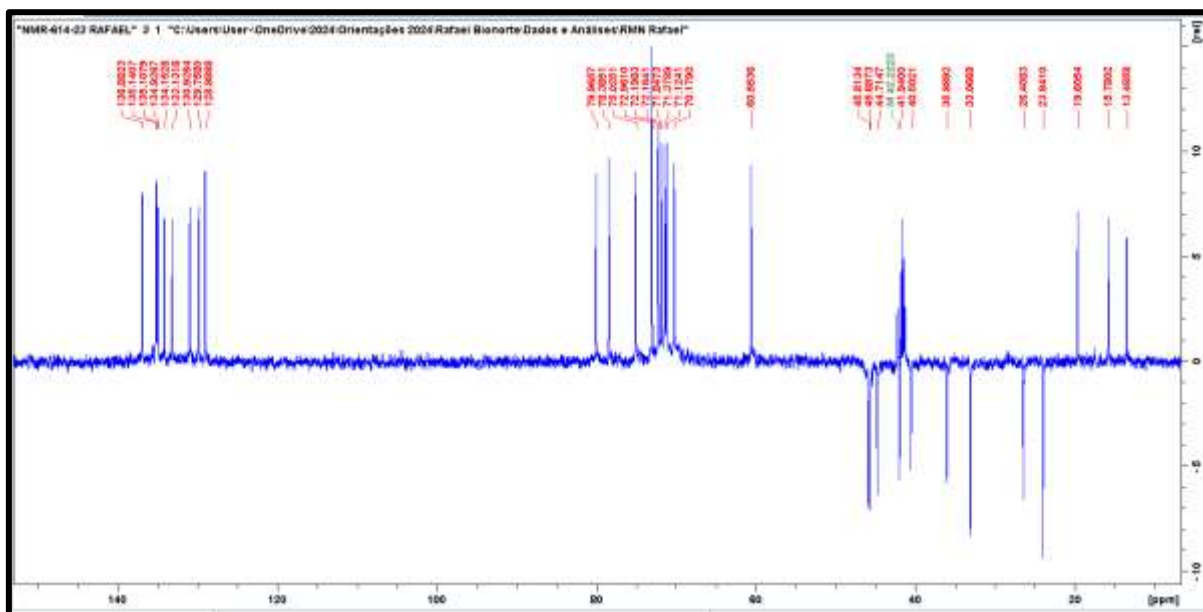
Região 54.1 relacionada com a síntese de Desferrioxamina B/Deferoxamina E (MIBiG-BGC0000940). Sentença dos genes dos BGCs dos genomas da linhagem LabMicrA B280 e *Streptomyces coelicolor* A3(2).

MS6 – Fracionamento de FR3 e isolamento do macrolídeo Pentamicina

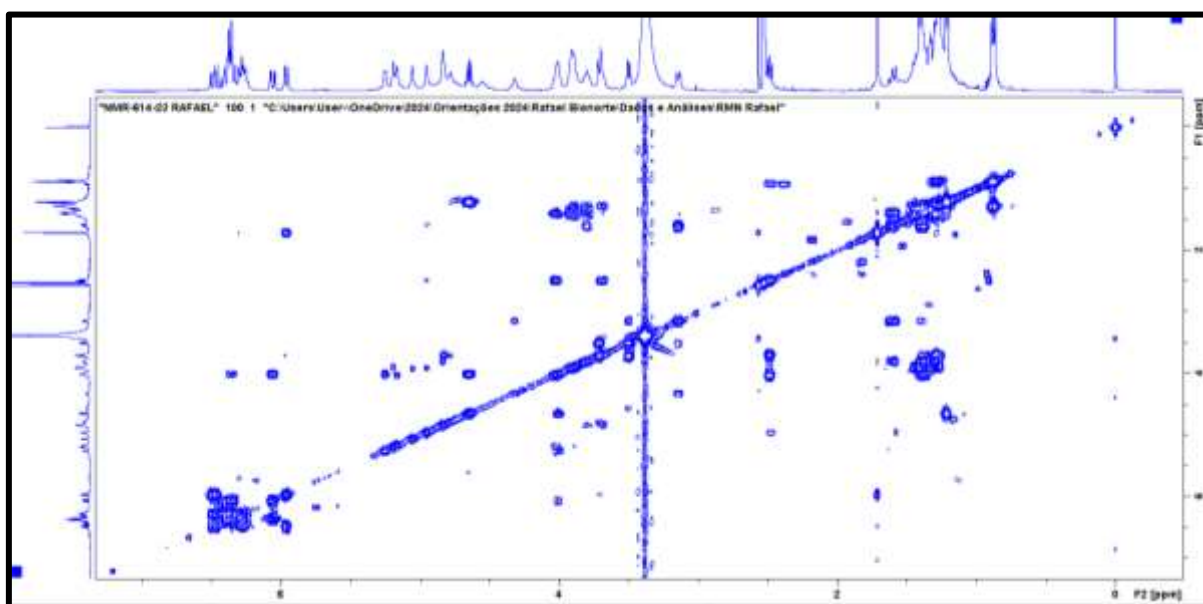
Cromatograma da fração RF3 destacando o pico principal (pentamicina); B) substância isolada (cor amarela).

MS7 – dados e RMN 1D e 2D.

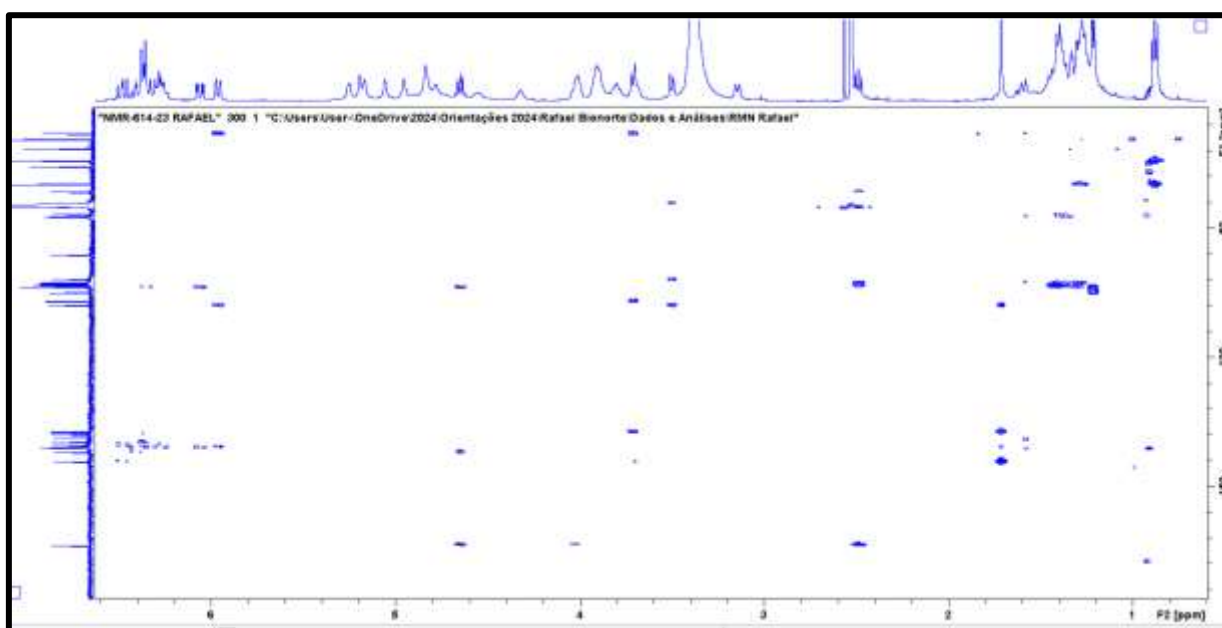
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da amostra FR3.Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO-d6) da amostra FR3.



RMN-DEPT-135 (500 MHz, DMSO-d6) da amostra FR3.



Espectro de RMN-COSY (500 MHz, DMSO-d6) da amostra FR3.



ANEXO 3

Imagens das culturas dos isolados do Ponto 1 de coleta com 10 dias de cultivo.



Imagens das culturas dos isolados do Ponto 2 de coleta com 10 dias de cultivo.



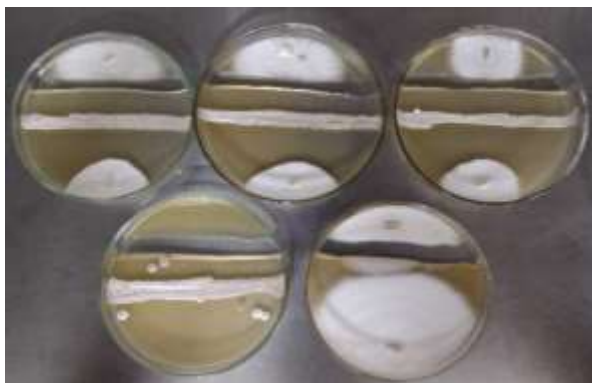
Imagens das culturas dos isolados do Ponto 3 de coleta com 10 dias de cultivo.



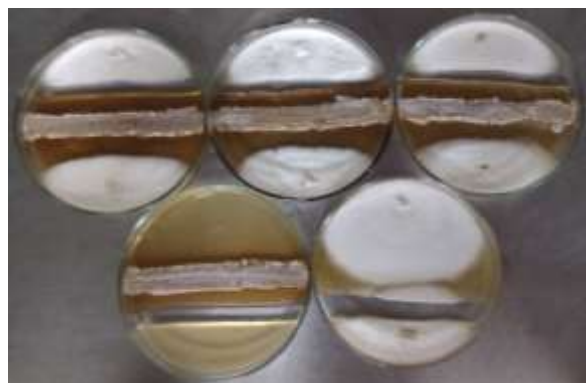
ANEXO 5

Imagens das co-culturas

Fitopatógeno *Pestalotiops sp.* (nas extremidades das placas) isolado de pé de guaraná e actinobactérias no centro das placas.



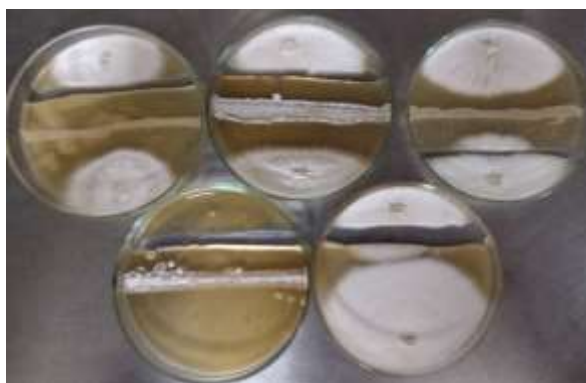
P1-06



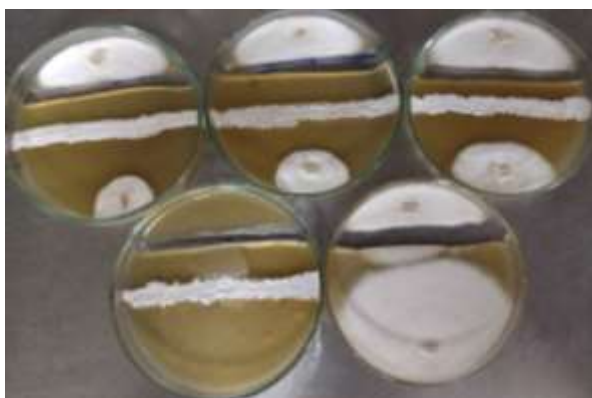
P1-17



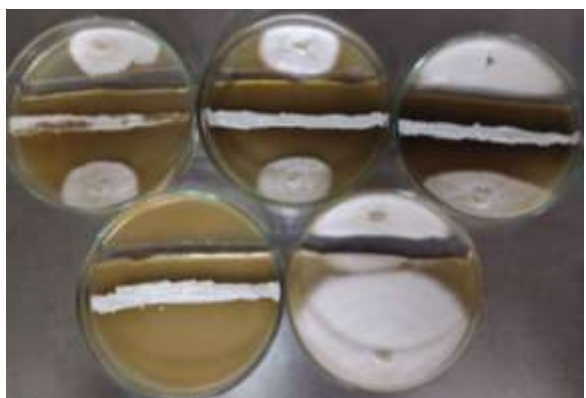
P2-05



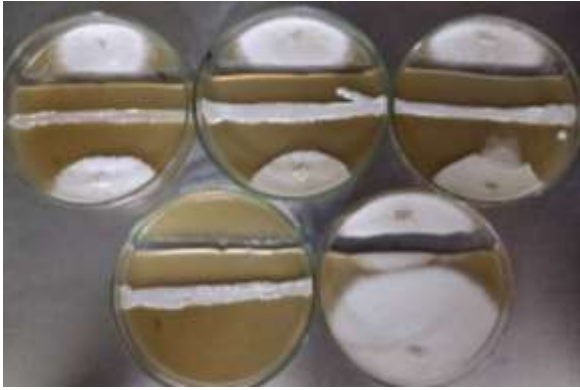
P3-25



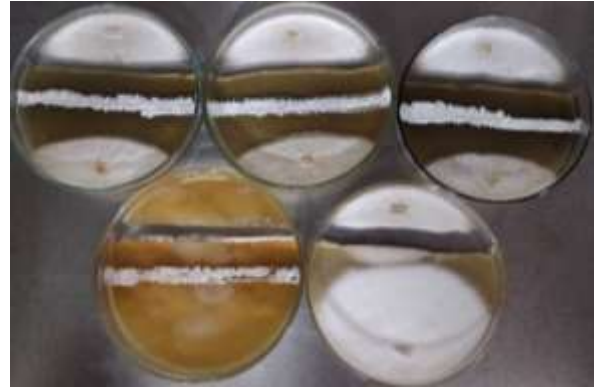
P1-22



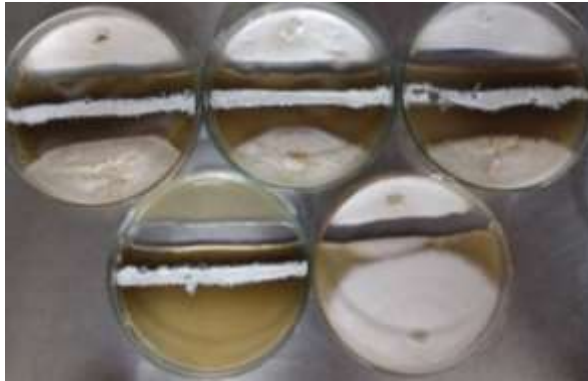
P2-11



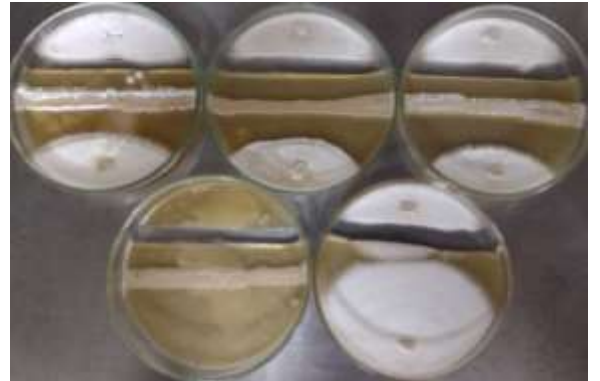
P1-05



P1-02



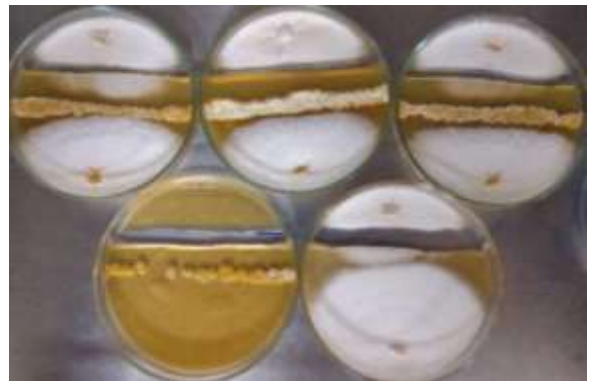
P2-02



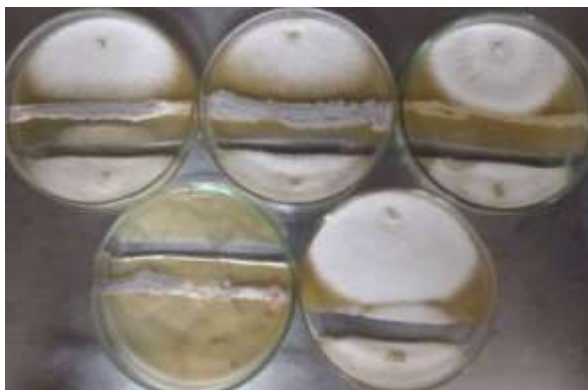
P2-20



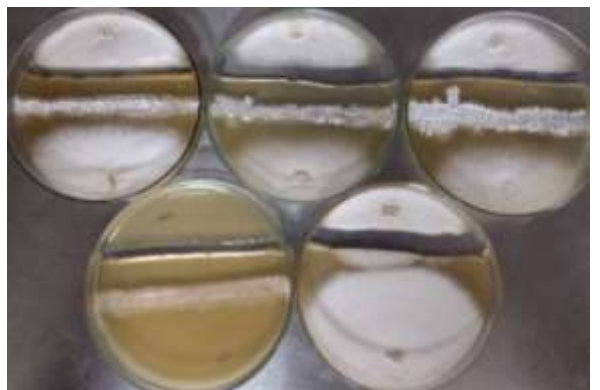
P3-15



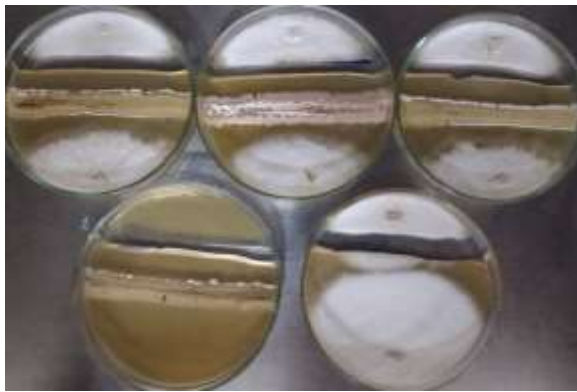
P2-06



P2-14



P3-09



P2-27



P1-07

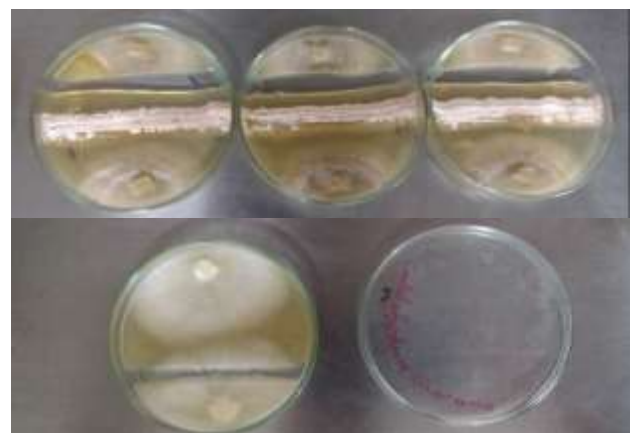


P2-19

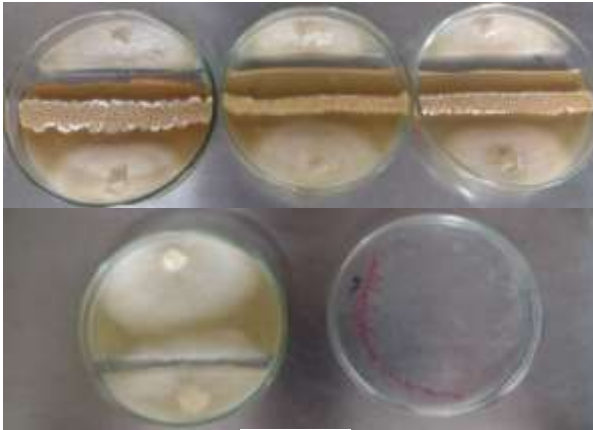
Fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola* (nas extremidades das placas) e actinomiceto no centro das placas



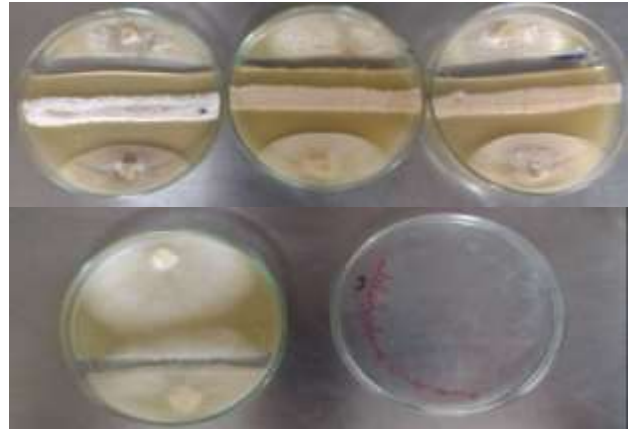
P1-15



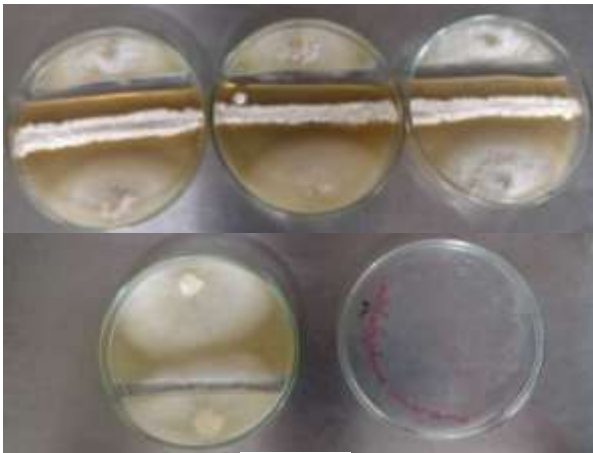
P2-27



P1-05



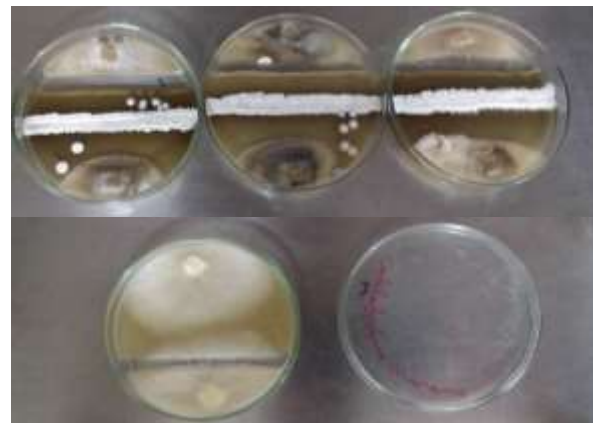
P2-20



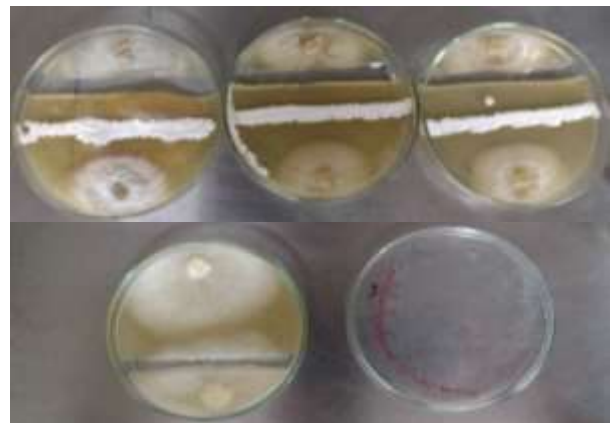
P1-07



P2-19



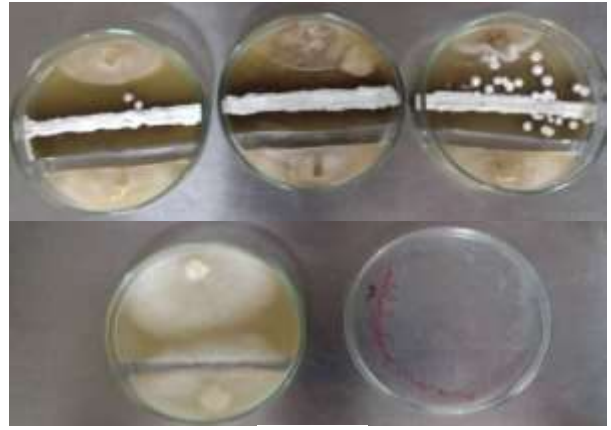
P2-05



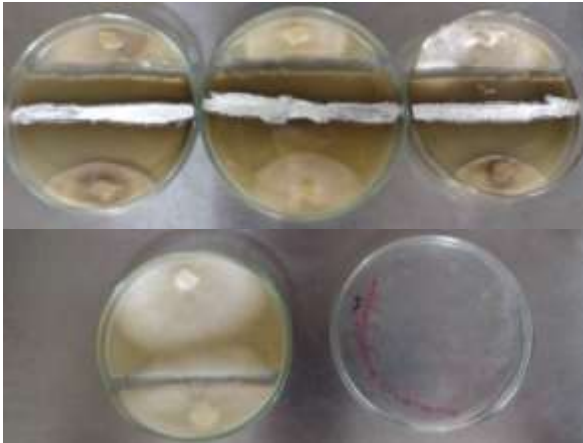
P1-22



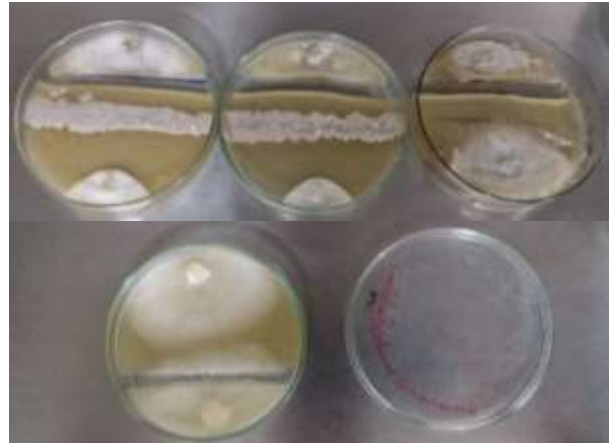
P1-02



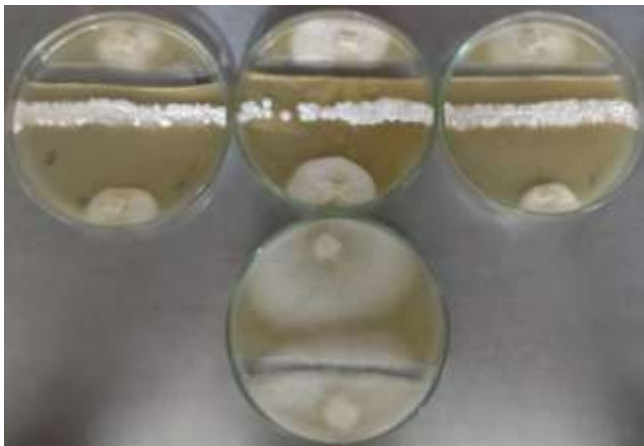
P2-11



P2-02

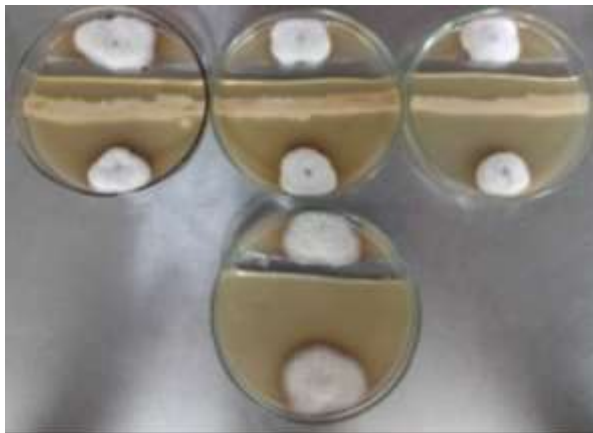


P1-06

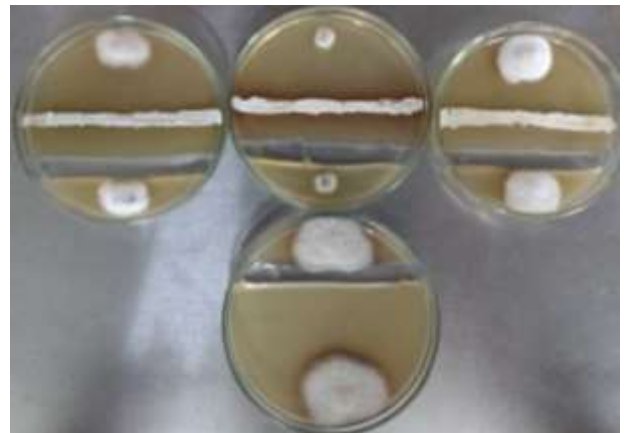


P1-17

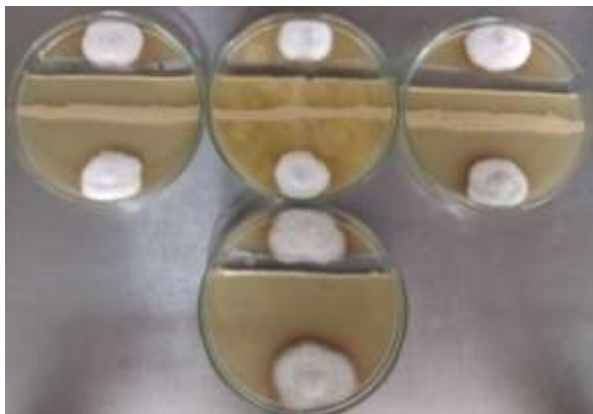
Fitopatógeno *Corynespora cassiida* (IS079) isolado de pé de tomate e actinomiceto no centro das placas



P2-27



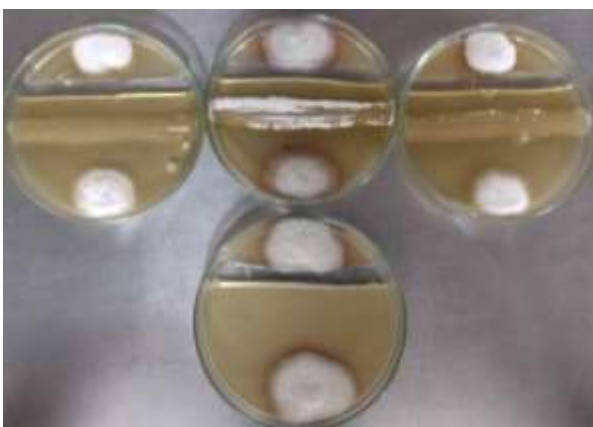
P1-02



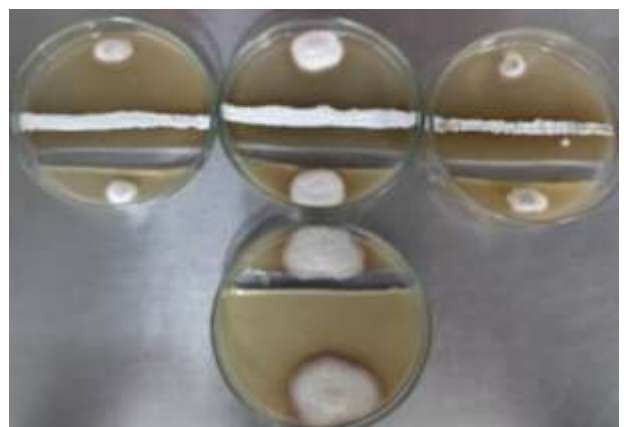
P2-14



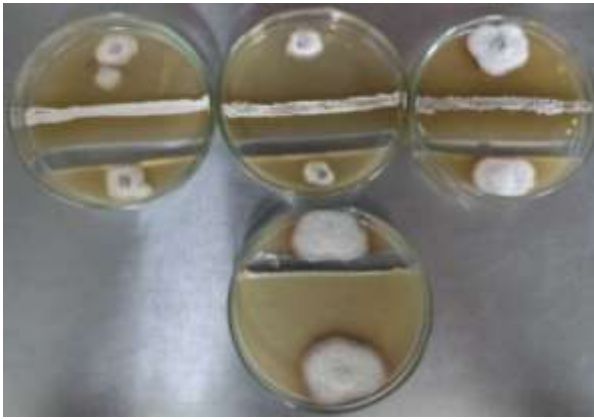
P2-15



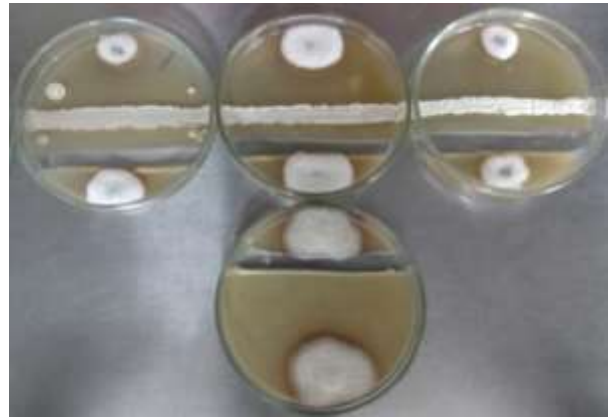
P3-09



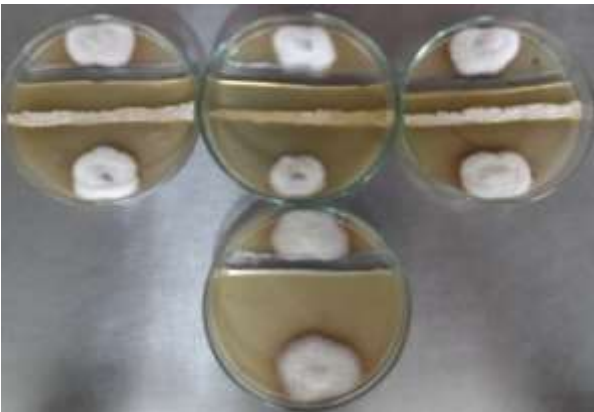
P2-05



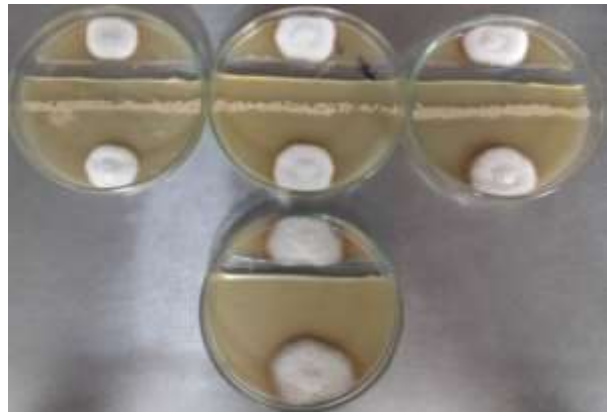
P2-11



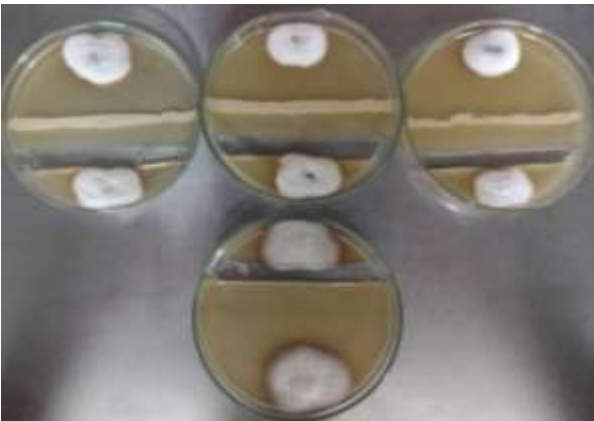
P1-06



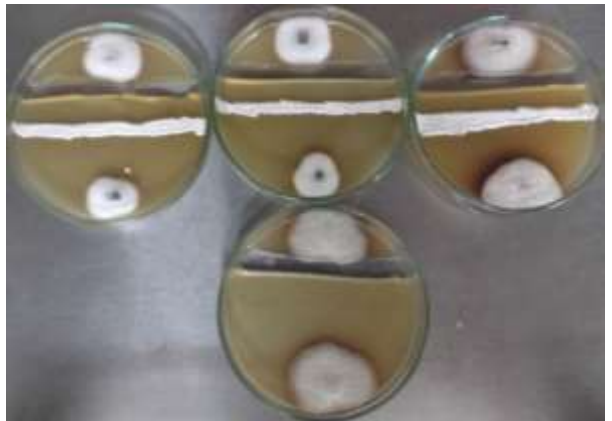
P1-07



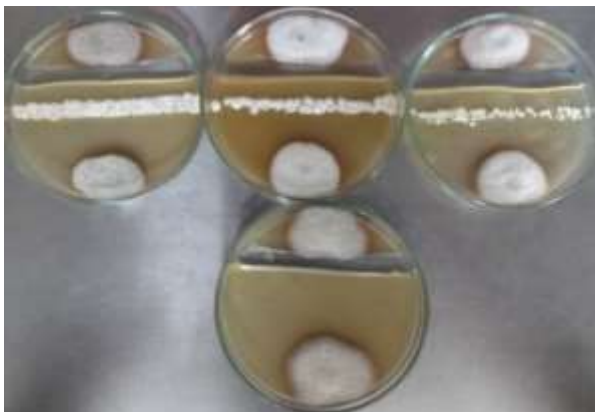
P1-19



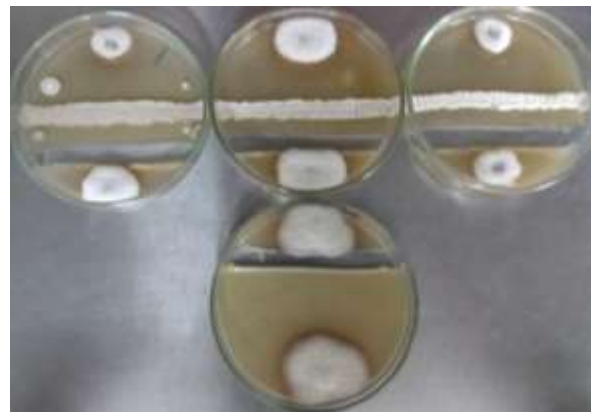
P2-20



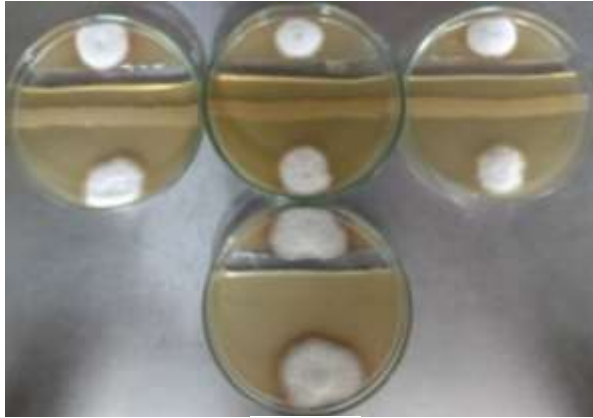
P1-22



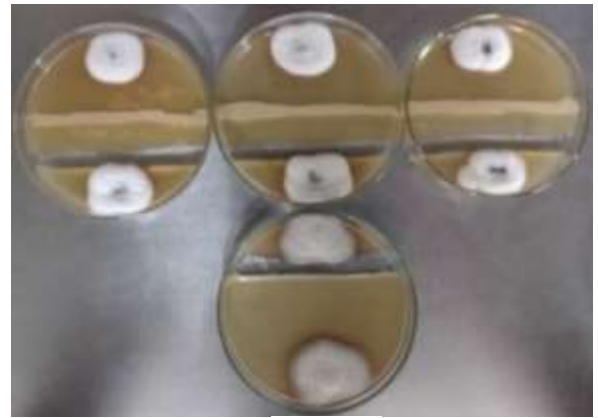
P1-06



P1-17



P2-17



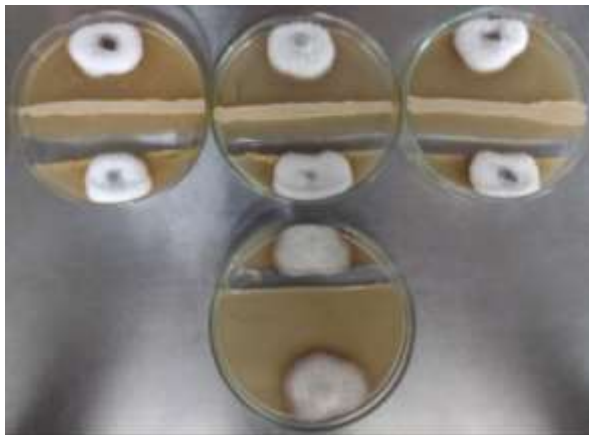
P3-25



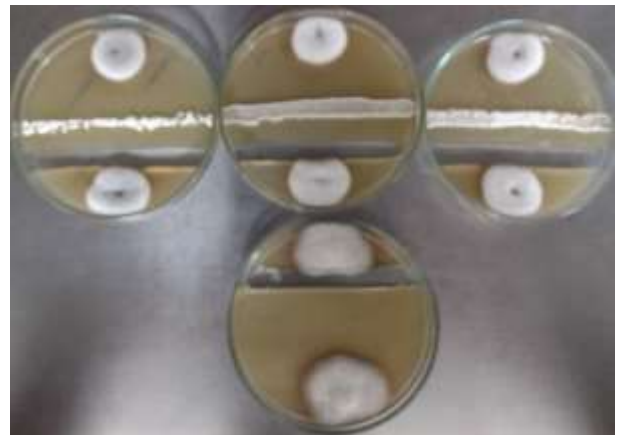
P3-07



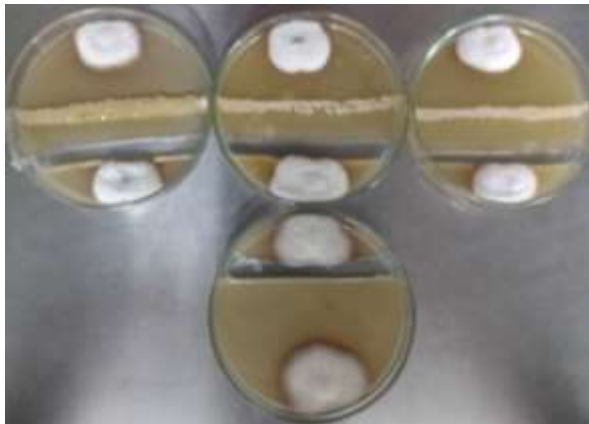
P2-20



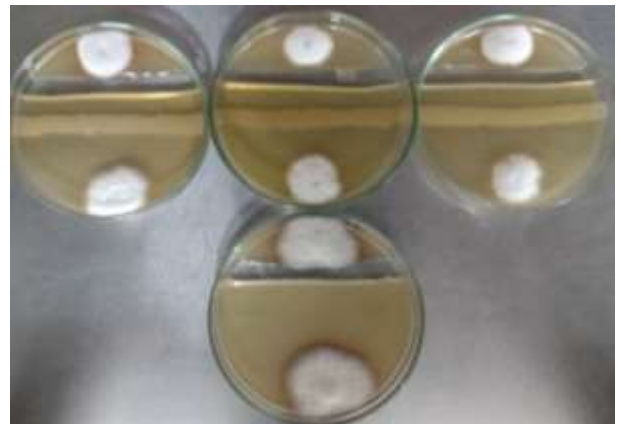
P2-23



P1-15

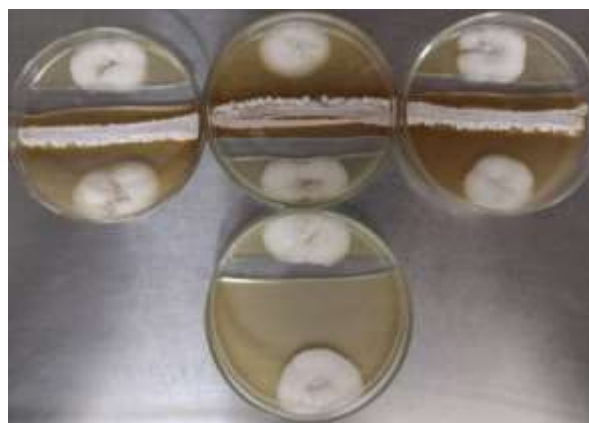


P1-05

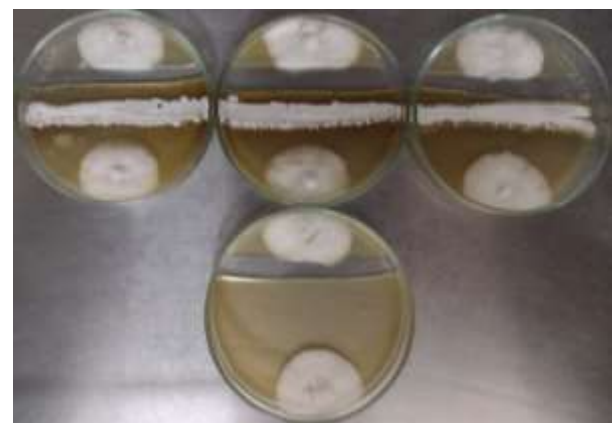


P2-17

Fitopatógeno *Colletotrichum* sp. (nas extremidades das placas) isolado de pé de pimenta-de-cheiro e actinomiceto no centro das placas



P1-07



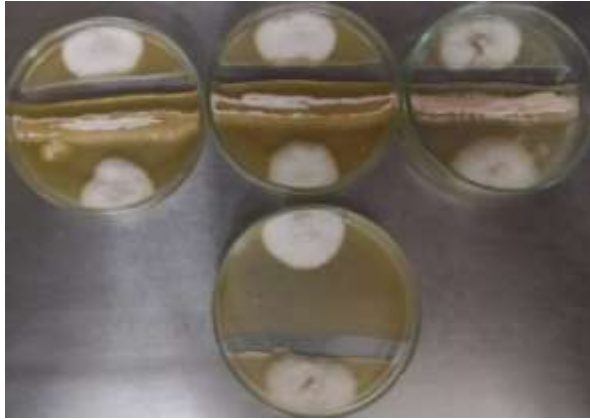
P2-17



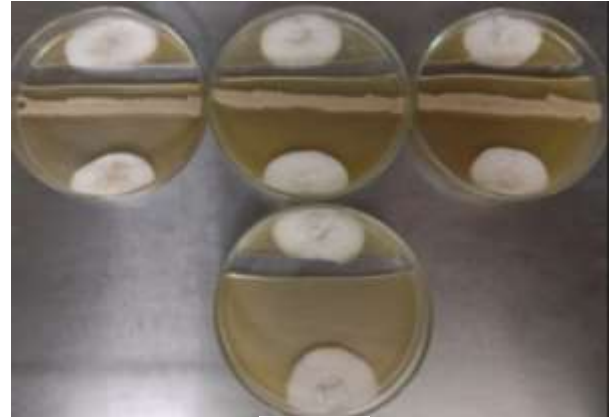
P2-23



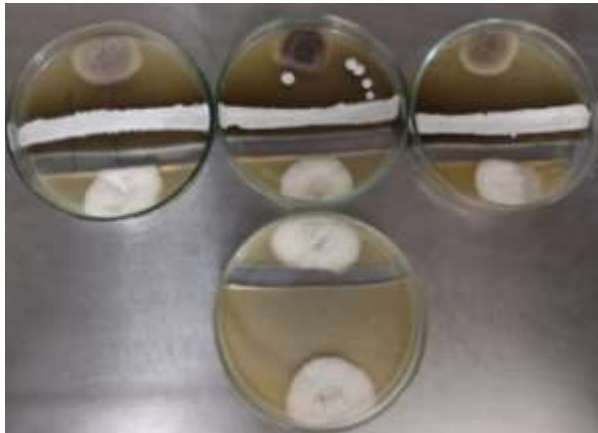
P1-05



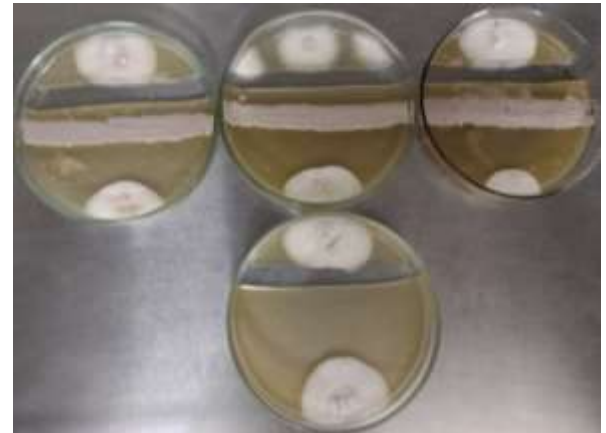
P2-27



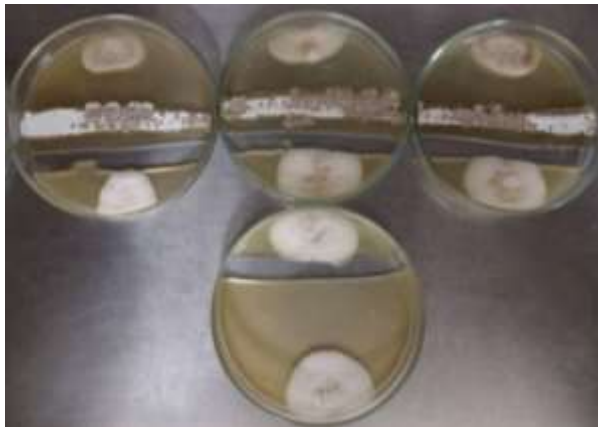
P2-19



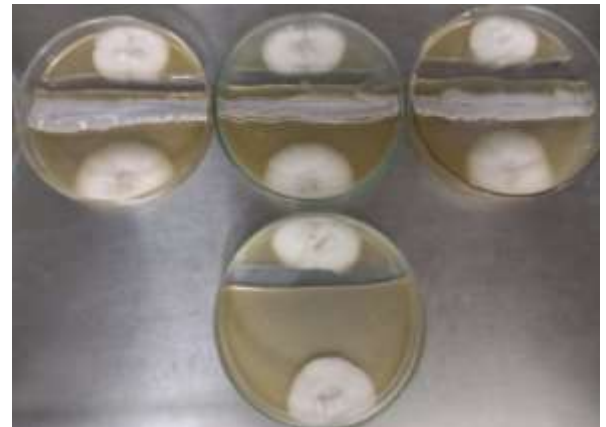
P1-02



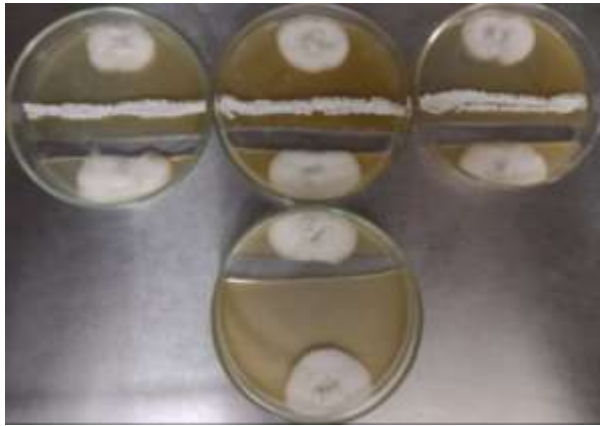
P1-06



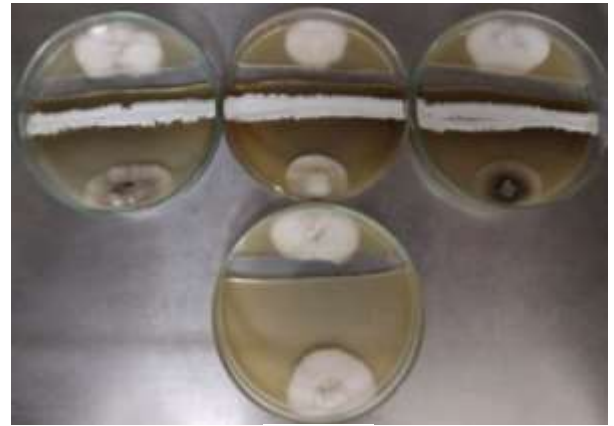
P2-02



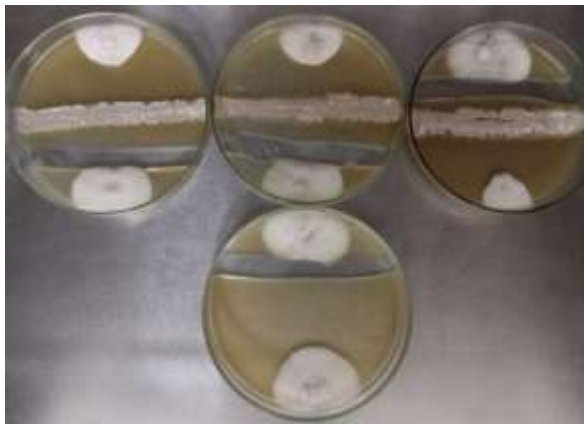
P2-15



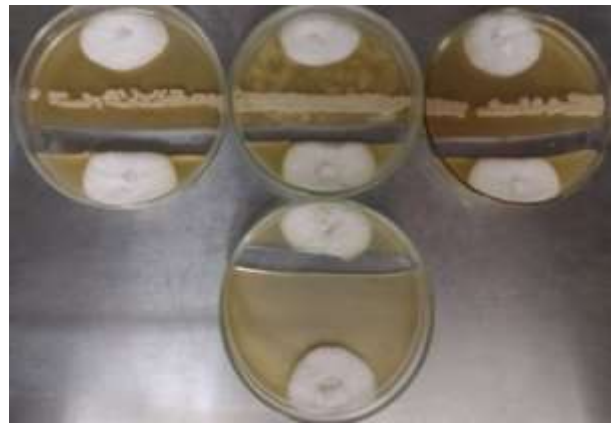
P1-22



P2-11



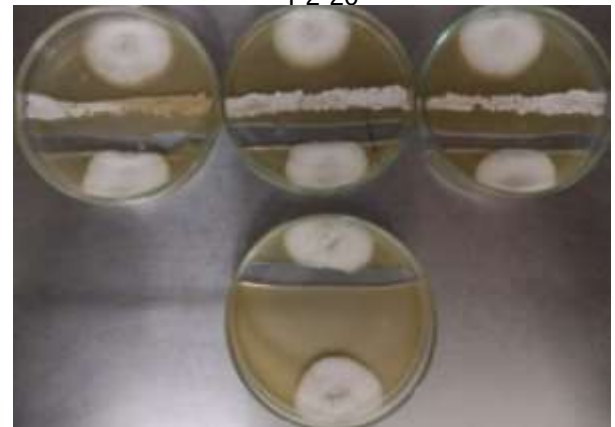
P1-15



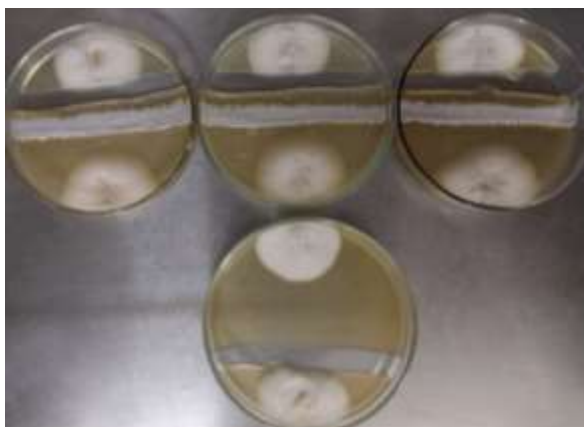
P2-20



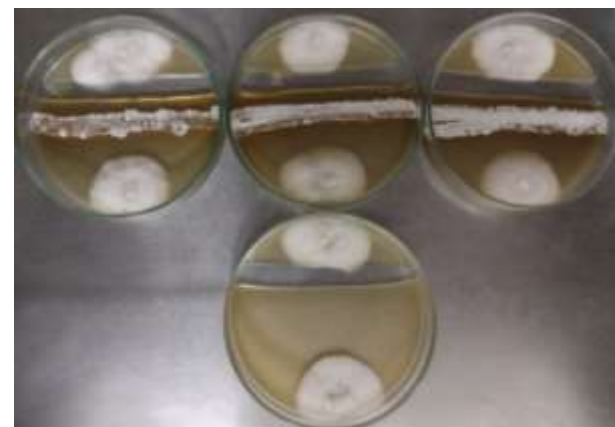
P2-23



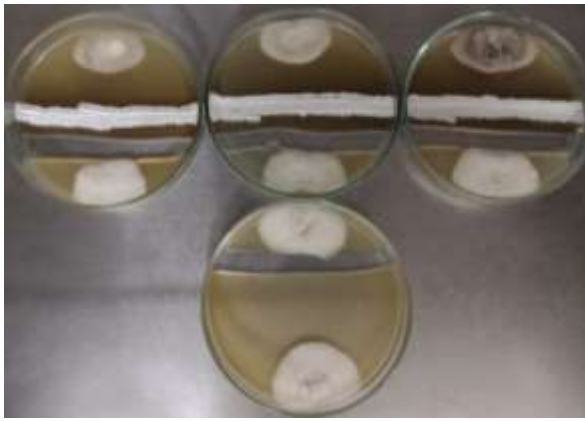
P3-07



P2-14



P3-09



P2-05

Fitopatógeno *Sclerotium coffeicola* (nas extremidades das placas) e actinomiceto no centro das placas

