Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz De Queiroz”

Potencial antimicrobiano e identificação molecular de actinobactérias isoladas de
ilhas oceânicas

Lucianne Ferreira Paes de Oliveira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2019

Lucianne Ferreira Paes de Oliveira
Bacharelado em Zootecnia

Potencial antimicrobiano e identificação molecular de actinobactérias isoladas de ilhas oceânicas

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profª Drª **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Co-orientadora:

Drª **SUIKINAI NOBRE SANTOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Oliveira, Lucianne Ferreira Paes de

Potencial antimicrobiano e identificação molecular de actinobactérias isoladas de ilhas oceânicas / Lucianne Ferreira Paes de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

94 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Actinomicetos 2. Antibacteriano 3. Antifúngico 4. Ilha de Alcatrazes 5. Ilha das Palmas 6. *Streptomyces fulvissimus* I. Título

*Aos meus avós, **Siléa e Cristovam**, e às minhas irmãs **Marianne**
e **Joanne**, por serem meu porto seguro.*

DEDICO

*Às mulheres que foram meu exemplo de força e dedicação, que me
ensinam e me inspiram a ser cada vez melhor, minha mãe **Marilene**
e minhas queridas professoras **Júlia Kuklinsky** e **Simone Lira**.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me proporcionar a realização deste trabalho, por sempre colocar boas pessoas ao meu lado.

Aos órgãos de fomento, ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos (processo 133910/2017-2), à CAPES pelo suporte financeiro (código de financiamento 001) e à FAPESP (projeto temático nº 2013/50228-8 e projeto regular nº 2014/15760-3).

Ao IBAMA e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pelo apoio para chegar até as ilhas e realizar as coletas. Autorizações: SISBio (37256 e 55972) e SISGEN (nº cadastro A046A6C).

Aos que fazem a Escola Superior “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este trabalho.

À minha orientadora, Dr^a Simone Possedente de Lira, por toda confiança, paciência, dedicação e ensinamentos durante esse período. Agradeço por acreditar no meu potencial, por contribuir no meu crescimento e amadurecimento pessoal e profissional, por ser amiga, além de orientadora. Não tenho palavras para expressar minha gratidão.

À minha co-orientadora, Dr^a Suikinai Nobre Santos, por toda dedicação, pelos ensinamentos, pelas “horas extras” no laboratório e reuniões, por ter concedido as linhagens testes dos bioensaios, por ter cedido espaço e equipamentos do Laboratório de Microbiologia da EMBRAPA Meio Ambiente para as análises moleculares.

Ao professor Dr. Roberto Berlinck por disponibilizar os materiais e equipamentos para as análises químicas, e à técnica Fabiana Rodrigues por todo auxílio na utilização dos equipamentos.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica de Produtos Naturais, especialmente aos técnicos Dr. Luiz Humberto Gomes e M.e Felipe Andrino, que me ensinaram com muito cuidado e atenção. Aos colegas da “salinha”: Luís Cláudio, Diana, Gislaine, Richtier, Andressa, Gabriel, Tomoki e Naydja.

À minha família, especialmente aos meus avós Cristovam e Siléa, minha mãe Marilene, minhas irmãs Joanne e Marianne, por todo apoio psicológico, por me incentivarem a continuar a caminhada e por todo amor que têm por mim, amo vocês.

À professora Júlia Kuklinsky-Sobral, pelos conselhos, pela amizade, por ter me proporcionado a vivência no PET Biotecnologia (UAG/UFRPE) e no LGBM, por ter me incentivado a seguir carreira acadêmica e fazer a pós-graduação na ESALQ.

Aos amigos pernambucanos que estão na ESALQ, que continuam sendo família, Caio, Márcio, Marcos, Shilton e Yasmin, obrigada pelas frequentes “reuniões” que relembram os momentos vividos no PET Biotec.

Aos amigos que mesmo distante continuam me dando apoio e me lembrando quem eu sou. Obrigada por toda força e companheirismo: Douglas, Edjane, Jaciara, Monique, Priscila, Rafaela, Rodolfo, Wellington e William.

Aos amigos que fiz em Piracicaba, sejam eles da ESALQ, Vila Estudantil ou dos GOUs e GPP, obrigada por todos os momentos partilhados e por todas as alegrias vividas. Agradeço especialmente a Alinne, Ana Paula, Carolinne, Deborah, Flaviane, Isabel, Geovani, Guilherme Nacata, Guilherme Novaes, Leandro Otávio, Mariana Marinho, Mariane, Marina Pacheco, Paul, Nathália, Rebecca, Rubmara, Tamires e Thaís. Aos meninos da casa 3, Antônio (Neto), Antônio Marcos (Tony) e Octávio, obrigada por todas as noites com café, biscoito e bolo, por todas as risadas durante o período “apertado” e noites em claro. Às meninas que são meu maior sinal de amizade, que me mostraram que ser amigo não tem a ver com tempo, mas com carinho, cuidado e reciprocidade, juntas formamos o “quarteto fantástico”: Beatriz, Giovana e Letícia, amo vocês!

Ao DVATCOM pela oportunidade de morar na Vila Estudantil da Pós-Graduação, às assistentes sociais Eliana e Solange, e à Maria das Graças.

A todos os funcionários da ESALQ, às pessoas que fazem parte das secretarias, aos que fazem parte da biblioteca e aos funcionários das empresas terceirizadas, que se dedicam para garantir o bom funcionamento da instituição.

A todos, o meu sincero agradecimento!

“O papel dos infinitamente pequenos na natureza é infinitamente grande.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. BIODIVERSIDADE EM ILHAS	15
2.2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS	17
2.3. PEPTÍDEO SINTETASE NÃO RIBOSSÔMICA (NRPS) E POLICETÍDEOS SINTASE (PKS)	20
3. HIPÓTESE	23
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. OBJETIVO GERAL	25
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1. COLETA, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS ACTINOBACTÉRIAS	27
5.1.1. <i>Preservação dos isolados</i>	28
5.2. REATIVAÇÃO	28
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	29
5.3.1. <i>Extração de DNA</i>	29
5.3.2. <i>Amplificação da região 16S do gene rRNA</i>	29
5.3.3. <i>Reação para sequenciamento</i>	30
5.3.4. <i>Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados</i>	31
5.4. REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE NRPS E PKS TIPO I.....	31
5.5. CULTIVO PARA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS CONTENDO METABÓLITOS.....	32
5.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS	33
5.6.1. <i>Avaliação do potencial antibacteriano</i>	34
5.6.2. <i>Avaliação do potencial antifúngico</i>	35
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5.8. SELEÇÃO DE UM ISOLADO PARA CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS	36
5.8.1. <i>Obtenção das frações</i>	36
5.8.2. <i>Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-MS-MS)</i>	37
5.8.3. <i>Cromatografia em Camada Delgada</i>	37
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS DAS ILHAS DE ALCATRAZES E PALMAS	39
6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM FUNÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO	44
6.2.1. <i>Avaliação do potencial antibacteriano</i>	44
6.2.2. <i>Avaliação do potencial antifúngico</i>	47
6.3. DETECÇÃO DOS GENES DE NRPS E PKS TIPO I	49
6.4. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS POR A32	53
6.4.1. <i>Frações acetato com atividade antibacteriana</i>	53
6.4.2. <i>Frações aquosas com atividade antifúngica</i>	62
6.4.3. <i>Fluxograma resumindo os procedimentos do estudo químico</i>	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
8. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	85

RESUMO

Potencial antimicrobiano e identificação molecular de actinobactérias isoladas de ilhas oceânicas

Actinobactérias estão presentes nos mais diversos ambientes e são conhecidas por produzirem compostos com aplicabilidade, principalmente, na área médico-farmacológica e agrônômica. Nos últimos anos, as pesquisas com micro-organismos de ambientes pouco explorados têm aumentado significativamente, a fim de isolar novas espécies e novos compostos bioativos eficazes no controle de patógenos resistentes. Nesse contexto, a exploração de ilhas desponta como uma alternativa promissora. Ilhas oceânicas apresentam um habitat particular, com características diferentes do continente, muitas vezes abrigando organismos endêmicos. Neste estudo foram realizados o isolamento e o estudo químico e biológico de actinobactérias isoladas das ilhas de Alcatrazes e Palmas, localizadas no litoral norte de São Paulo. Amostras de solo rizosférico, folhas, raízes e pecíolo foram coletadas das plantas *Anthurium alcatrazense* e *Anthurium urvilleanum*. O material coletado foi inoculado em três meios de cultivo, resultando no isolamento de 23 actinobactérias, que foram identificadas majoritariamente como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, com exceção de um isolado, pertencente ao gênero *Amycolatopsis*. Os isolados foram avaliados quanto à presença de genes de policetídeos (PKS-I) e peptídeos não ribossômicos (NRPS), e foram também cultivados em quatro meios de cultivo, para explorar a produção de metabólitos secundários. Os extratos foram particionados e avaliados frente a bactérias patogênicas e fungos fitopatogênicos. Extratos de seis linhagens inibiram o crescimento de pelo menos um destes patógenos: *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. Todos os isolados positivos no bioensaio, foram positivos para uma das vias biossintéticas (PKS-I ou NRPS). O isolado identificado como *Streptomyces fulvissimus* (A32), foi selecionado para investigação dos metabólitos secundários. Este é o primeiro relato do isolamento de actinobactérias das ilhas de Alcatrazes e Palmas, bem como do estudo do potencial antimicrobiano destes micro-organismos.

Palavras-chave: Actinomicetos; Antibacteriano; Antifúngico; Ilha de Alcatrazes; Ilha das Palmas; *Streptomyces fulvissimus*

ABSTRACT

Antimicrobial potential and molecular identification of actinobacteria isolated from oceanic islands

Actinobacteria are present in the most diverse environments and are known to produce compounds with applicability, mainly in the medical-pharmacological and agronomic area. In recent years, research with microorganisms from poorly explored environments has increased significantly in order to isolate new species and new bioactive compounds effective in the control of resistant pathogens. In this context, the exploration of islands emerges as a promising alternative. Oceanic islands have a particular habitat, with different characteristics of the continent, often harboring endemic organisms. In this study were carried out the isolation and chemical and biological study of actinobacteria isolated from the Palmas and Alcatrazes islands, north coast of São Paulo. Samples of rhizospheric soil, leaves, roots and petiole were collected from plants *Anthurium alcatrazense* and *Anthurium urvilleanum*. The collected material was inoculated in three culture media, resulting in the isolation of 23 actinobacteria, which were identified mainly as belonging to the genus *Streptomyces*, with the exception of one isolate belonging to the genus *Amycolatopsis*. The isolates were evaluated for the presence of polyketide (PKS-I) and non-ribosomal peptides (NRPS), in addition, were cultured in four culture media to explore the production of secondary metabolites. The extracts were partitioned and evaluated against pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. Extracts from six isolates inhibited the growth of at least one of these pathogens: *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. All the positive isolates in the bioassay were positive for one of the biosynthetic pathways (PKS-I or NRPS). The isolate identified as *Streptomyces fulvissimus* (A32) was selected for investigation of secondary metabolites. This is the first report of the isolation of actinobacteria from the Alcatrazes and Palmas islands, as well as the study of the antimicrobial potential of these microorganisms.

Keywords: Actinomycetes; Antibacterial; Antifungal; Alcatrazes Island; Palmas Island; *Streptomyces fulvissimus*

Lista de abreviaturas e siglas

ACA	meio de cultivo amido-caseína-ágar
Ac1	extrato acetato de etila do meio Czapek
Ac2	extrato acetato de etila do meio BD
Ac3	extrato acetato de etila do meio R5
Ac4	extrato acetato de etila do meio B
AcOEt	acetato de etila
Aq1	extrato aquoso do meio Czapek
Aq2	extrato aquoso do meio BD
Aq3	extrato aquoso do meio R5
Aq4	extrato aquoso do meio B
BD	meio de cultivo batata-dextrose
BDA	meio de cultivo batata-dextrose-ágar
C ₁₈	sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano
CCD	cromatografia em camada delgada
Da	Dalton
DMATS	dimetilail difosfato triptofano sintase
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GY	meio de cultivo glicose-extrato de levedura
kDa	quilo daltons
LB	meio de cultivo Luria-Bertani
<i>m/z</i>	razão massa carga
[M+H] ⁺	molécula protonada
[M+Na] ⁺	molécula sodiada
NRPS	peptídeo não-ribossomal sintetase
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIC	percentual de inibição do crescimento
PKS – I	policetídeo sintase tipo I
PKS – II	policetídeo sintase tipo II
PKS	policetídeo sintase

R5	meio de cultivo para produção de metabólitos secundários
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
t _R	tempo de retenção
TS	terpeno sintase
UFC	unidades formadoras de colônia
UPLC	cromatografia líquida de ultra eficiência

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais microbianos são fontes de vários medicamentos importantes de alto valor terapêutico, desde agentes antitumorais (KARPINSKY; ADAMCZAK, 2018), antibióticos (WU et al., 2017), agentes imunossupressores (YOO et al., 2017) até inibidores enzimáticos (DANG; SUSSMUTH, 2017). A maioria dos produtos farmacêuticos comercialmente disponíveis são metabólitos secundários ou seus derivados produzidos por fungos e bactérias (MIAO; DAVIES, 2010).

Atualmente, as actinobactérias são consideradas importantes produtores de metabólitos secundários, obtidos de diferentes vias biossintéticas. Este fato é corroborado por estas apresentarem elevada diversidade funcional, produção de enzimas extracelulares, síntese e excreção de diversos compostos secundários de interesse biotecnológico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). São responsáveis por cerca de dois terços dos produtos clínicos inspirados em produtos naturais (BARKA et al., 2016) e apresentam grande importância no desenvolvimento da biotecnologia, possibilitando a descoberta de compostos com aplicações industriais, médicas e agrícolas.

Actinobactérias são encontradas nos mais diversos ambientes, tais como solo, trato gastrointestinal, como comensais de plantas e em ambientes marinhos (LETEK et al., 2012). A sua presença em vários habitats ecológicos e ambientes marinhos permitiu a investigação e exploração do seu enorme potencial como a fonte mais promissora de produtos biologicamente ativos (BULL; STACH, 2007).

Dentre os ambientes ainda pouco explorados, as ilhas vêm se destacando na busca por promissoras moléculas bioativas sintetizadas por micro-organismos, plantas e animais marinhos, com potencial como agentes terapêuticos. Esses ambientes possuem uma biodiversidade particular, apresentando espécies endêmicas com grande potencial para descoberta de novos compostos ativos com aplicabilidade nas mais diversas áreas (HASSAN; SHAIKH, 2017; LAM, 2006; ZHANG, 2005).

O Litoral Norte do estado de São Paulo apresenta 18,6% de sua área representada por ilhas, ilhotas e lajes (IPT, 2000). Dentre elas, a Ilha de Alcatrazes situada no município de São Sebastião, e a Ilha das Palmas localizada no município de Ubatuba. Ambas possuem alguns estudos relativos à sua fauna e flora, entretanto, ainda são poucos os estudos sobre a microbiota destes locais.

Diante disto, o nosso objetivo é contribuir no conhecimento da microbiota de ilhas, isolando e identificando actinobactérias da Ilha de Alcatrazes e da Ilha das Palmas, e avaliar os metabólitos secundários com potencial biotecnológico produzidos por estes isolados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biodiversidade em ilhas

As ilhas costeiras são ecossistemas que se desenvolveram independente de outros ambientes, resultando em ambientes únicos que podem incluir *hotspots* de biodiversidade, responsáveis por afetar a diversidade de espécies microbianas, plantas e animais, representando uma enorme fonte para a descoberta de novas moléculas (NG; TAN, 2018).

O litoral norte do estado de São Paulo pertence à Mesorregião do Vale do Paraíba paulista e se estende de Ubatuba à Bertioga, incluindo Caraguatatuba, São Sebastião e Ilhabela (AB'SABER; 2006). No município de São Sebastião encontra-se a Estação Ecológica Tupinambás (Esec Tupinambás), uma Unidade de Conservação criada em 1987 (Decreto Federal nº 94.656), administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A Esec Tupinambás, em conjunto com a Marinha do Brasil, é responsável pela proteção de dois conjuntos de ilhas; o primeiro compreende o Arquipélago de Alcatrazes, no município de São Sebastião – São Paulo, e o segundo abrange as ilhas de Cabras, Palmas e a laje do Forno no Arquipélago da Ilha Anchieta, no município de Ubatuba – São Paulo (ICMBio, 2017).

O Arquipélago de Alcatrazes (Figura 1) encontra-se a 36 km da costa do município de São Sebastião, é composto por cinco ilhas maiores: Alcatrazes, Sapata (ou ilha Amigo), Paredão, Porto (ou ilha do Farol) e Oratório, além de cinco ilhas menores não nominadas. Possui também três lajes e dois parciais (ÂNGELO, 1989; KODJA et al., 2012). A ilha principal é a Ilha de Alcatrazes, a maior do arquipélago, que abrange 135 hectares e é o habitat de vertebrados endêmicos, como a jararaca-de-alcatrazes e a perereca-de-alcatrazes (BERTANI et al., 2017; MUSCAT et al., 2014). A ilha possui uma vegetação típica de Mata Atlântica com estrato arbóreo e sub-bosque. Pode-se encontrar cerca de 170 espécies de plantas, sendo algumas consideradas endêmicas da ilha como o antúrio negro (*Anthurium alcatrazense*) e a rainha do abismo (*Sinningia insularis*) (KODJA et al., 2012).

No passado, a ilha estava ocupada por poucas pessoas que viviam e exploravam os recursos naturais de Alcatrazes (LUEDERWALDT; FONSECA, 1923). A partir de 1980, a ilha foi usada para a prática de tiro ao alvo pela Marinha do Brasil, porém esta atividade cessou, pois colocava em risco a fauna e flora local (FRANCINI; RAMOS, 2014). Em 2016 foi criado o Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes, assegurando as condições para a

existência ou reprodução de espécies da flora local e da fauna residente ou migratória, visto que Alcatrazes abriga o maior ninhal de aves marinhas das costas Sul e Sudeste (ICMBio, 2017).

Figura 1. Localização do Arquipélago de Alcatrazes, São Sebastião – SP, distante 36 Km da costa do município de São Sebastião – SP

A Ilha das Palmas (Figura 2) encontra-se a 6 km da costa de Ubatuba e faz parte do entorno do Arquipélago da Ilha Anchieta. O arquipélago da ilha Anchieta apresenta vasto contexto histórico e cultural desde antes da criação do Parque Estadual da Ilha Anchieta, por ter sido um importante porto na rota do descobrimento e ocupação portuguesa do litoral, contudo, não há informações sobre a ocupação da Ilha das Palmas. A ilha é utilizada para a reprodução pela espécie de ave marinha *Larus dominicanus*, além de servir como abrigo, fonte de alimentação e repouso de outras espécies de aves marinhas, como trinta-réis, biguás e garças. Assim como Alcatrazes, a Ilha das Palmas apresenta vegetação típica de Mata Atlântica com estrato arbóreo e sub-bosque. Foram relatadas cerca de 105 espécies de plantas, entretanto a ilha não possui espécies endêmicas (ICMBio, 2017).

A importância ecológica das ilhas é inegável, são habitats de espécies raras e endêmicas e apresentam grande importância como ninhais para diversas aves marinhas (PENTEADO, 2009).

Figura 2. Localização da Ilha das Palmas, Ubatuba – SP, distante 6 Km da costa do município de Ubatuba – SP

A exploração de ecossistemas e habitats incomuns e extremos é uma das formas mais promissoras para triagem e isolamento de micro-organismos raros (HUG et al., 2018). Estes estudos podem revelar a presença de novas moléculas com atividade biológica, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos produtos para a agricultura e a indústria farmacêutica.

2.2. Potencial biotecnológico de Actinobactérias

Os primeiros compostos secundários isolados de actinobactérias, foram os antibióticos descritos por Waksman e Woodruff na década de 40 como actinomicina (1), estreptotricina (2) e estreptomicina (3) (Figura 3), todos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Desde então, diversos outros compostos com atividade antibiótica foram descritos, como os antibióticos cloranfenicol (4), vancomicina (5), tetraciclina (6) e eritromicina (7) (Figura 3) (ABBAS, 2010).

Metabólitos secundários geralmente são sintetizados na fase estacionária ou no final da fase de crescimento do micro-organismo, não desempenham funções essenciais no crescimento e/ou reprodução, mas conferem funções adaptativas aos organismos que os produzem. São extremamente diversificados em termos funcionais, muitos atuam como antibióticos, pigmentos, toxinas e neuropeptídeos (BALTZ, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dentre as bactérias, os membros do filo Actinobacteria são descritos como os que possuem maior potencial na síntese de metabólitos bioativos e tem sido o foco de interesse industrial há décadas, por exemplo, na produção de eritromicina, estreptomicinas e tetraciclina (WEBER et al., 2015). Dentre as aplicações de metabólitos secundários, podem ser citados compostos com atividade antidiabéticas (CHEN et al., 2016), anti-helmínticos (OMURA; CRUMP, 2014), antifúngicas e herbicidas (GANDOTRA et al., 2012).

O gênero *Streptomyces* é responsável pela síntese de quase 40% de todos os compostos bioativos conhecidos (SILVA et al., 2013; WEBER et al., 2015), os metabólitos secundários sintetizados por este gênero têm variadas atividades biológicas. Os herbicidas e fungicidas inspirados em produtos naturais de origem microbiana utilizados na agricultura, como por exemplo, o herbicida glufosinato de amônio, derivado do produto natural bialafos (**8**) (Figura 3), foi isolado de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces viridochromogenes* (LATORRE et al., 2013; LYDON; DUCKE, 1999).

As principais classes dos compostos químicos isolados de actinobactérias incluem policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos e alcaloides. Estes compostos são sintetizados, respectivamente, por complexos enzimáticos conhecidos como policetídeo sintase (PKS), peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS), terpeno sintase (TS) e dimetilail difosfato triptofano sintase (DMATS) (COLLEMARE, et al., 2008; IZUMIKAWA, 2006).

Compostos da classe dos peptídeos são comumente produzidos por actinobactérias e podem ser sintetizados em duas vias, a ribossomal e a não-ribossomal que incluem peptídeos modificados e amplamente produzidos por bactérias (NETT; IKEDA; MOORE, 2009). Policetídeos e peptídeos não ribossomais são metabólitos secundários importantes que apresentam enorme diversidade estrutural e diversas aplicações farmacêuticas, que incluem uma série de medicamentos clinicamente importantes, tais como o tacrolimo (FK506) (**9**) (imunossupressor) e bleomicinas (**10**) (antitumorais) (Figura 3) (IZUMIKAWA et al., 2006; LETUNIC et al., 2008; WANG et al., 2015).

Os programas de sequenciamento de genoma têm revelado o potencial biossintético de actinobactérias, mas somente com o uso das técnicas tradicionais não é possível explorar todas as possibilidades que esses organismos oferecem. Logo, métodos mais eficientes para a caracterização funcional de genes são de grande importância para obter informações sobre o potencial destes micro-organismos na produção de metabólitos secundários (QIN et al., 2011).

Figura 3. Estrutura química de alguns antibióticos produzidos por diferentes espécies do gênero *Streptomyces*. Adaptado de Guimarães; Momesso, Pupo (2010)

2.3. Peptídeo sintetase não ribossômica (NRPS) e policetídeos sintase (PKS)

Peptídeos não ribossomais e policetídeos são duas grandes famílias de produtos naturais que incluem muitos medicamentos de importância clínica, tais como compostos com atividade antibacteriana: estreptomicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol; compostos com atividade antifúngica: nistatina, niconomicina, rimocidina; atividade antiviral: tunicamicina; atividade antiparasítica: avermectina, tiamicina; atividade imunossupressora: rapamicina; atividade antitumoral: actinomicina, himastatina, antraciclina; e inibidor enzimático: ácido clavulânico (BÉRDY, 2005; ZHANG, 2005; SOLANKI; KHANNA; LAL, 2008; CHAUDHARY et al., 2013).

Os NRPS e PKS usam estratégias muito semelhantes para montagem das respectivas moléculas com uma sequência condensada de aminoácidos ou ácidos carboxílicos curtos (DORRESTEIN; KELLEHER, 2006). Tal similaridade estrutural, funcional e catalítica entre os NRPS e os PKS, tem impulsionado a busca por sistemas híbridos NRPS-PKS que interagem em ambos os módulos construtores a fim de explorar as vias biossintéticas reguladas e seus produtos decorrentes para identificação e caracterização dos genes envolvidos como pré-requisitos para descobrir as vias integradas (LAMBALOT et al., 1996; STEIN et al., 1996; HILL, 2006; IZUMIKAWA et al., 2006).

Sabe-se que processos biossintéticos realizados por NRPSs e PKSs são enzimas multi-modulares (> 100 kDa), que contêm uma grande variedade de domínios catalíticos individuais, cada um específico para cada grupo de produto natural e para cada organismo produtor (FINKING; MARAHIEL, 2004; FISCHBACH; WALSH, 2006; IZUMIKAWA et al., 2006). Cada módulo é responsável pela incorporação de um bloco construtor dentro da molécula sintetizada, semelhando-se a uma linha de montagem, com os NRPS compostos de unidades monoméricas de aminoácidos e os PKS construídos a partir de unidades monoméricas de acetil e/ou malonil (BALTZ et al., 1997; HILL, 2006; LETUNIC et al., 2008).

Em bactérias, policetídeos estruturalmente complexos, como macrolídeos, são montados por PKSs modulares tipo I (PKS-I), enquanto os PKSs modulares tipo II codificam policetídeos aromáticos (RUTLEDGE; CHALLIS, 2015). Os NRPSs possuem “arquitetura modular” semelhante à dos PKS-I, contudo os produtos naturais sintetizados derivam da modificação pós-traducional dos precursores sintetizados nos ribossomos (STRIEKER et al., 2010).

Um dos grandes desafios da genômica e metabolômica é descobrir os genes envolvidos nas sínteses de moléculas bioativas, além de melhorar a produção destes compostos tornando-os viáveis para uma linha de produção industrial. Em geral, a produtividade nas linhagens

recém-isoladas é extremamente baixa, tornando prioritário o desenvolvimento de processos de melhoria visando ao aumento da produtividade. Isto porque, os processos de desenvolvimentos de novas drogas são extremamente lentos, levando cerca de oito anos com investimentos cerca de 300 milhões de dólares por projeto, então estudos que objetivam a otimização da produção de moléculas alvos, minimizando tempo, preço e maximizando rendimento e eficiência são relevantes e cruciais para o avanço biotecnológico na produção de fármacos (CHABNER; ROBERTS, 2005).

O recente avanço no sequenciamento de genomas microbianos tem alterado substancialmente nosso conhecimento das capacidades metabólicas dos micro-organismos. Tais avanços, como o sequenciamento de genomas de *Streptomyces* e fungos filamentosos, revelaram que genes responsáveis pela síntese de metabólitos secundários encontram-se agrupados no que se conhece como *cluster* gênicos (BISHOP et al., 2004; KOMAKI et al., 2015; VILA-FARRES et al., 2017).

As análises genômicas de actinobactérias tem revelado que vários *clusters* de genes biossintéticos de metabólitos secundários são codificados em seus genomas. Cerca de metade a três quartos destes blocos de genes estão associados às vias não-ribossômicas sintetase e policetídeo sintase (KOMAKI et al., 2018; SANCHEZ et al., 2008), o que sugere que os peptídeos não ribossômicos, policetídeos e seus compostos híbridos são os principais metabólitos secundários de actinobactérias.

3. HIPÓTESE

Locais pouco explorados, como as ilhas, abrigam uma diversidade particular de micro-organismos com potencial para a descoberta de novos compostos com atividade antimicrobiana.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Neste estudo objetivou-se a bioprospecção de extratos de actinobactérias isoladas de amostras da Ilha de Alcatrazes e da Ilha das Palmas para avaliação do potencial antimicrobiano dos respectivos compostos, assim como a detecção de alguns genes (NRPS e PKS I) responsáveis pelas vias biossintéticas promotoras de metabólitos secundários.

4.2. Objetivos específicos

- Purificar e preservar as actinobactérias isoladas das ilhas;
- Identificar os isolados por técnicas de biologia molecular;
- Detectar a presença de genes de peptídeos não ribossomais e policetídeos dos sistemas NRPS e PKS tipo I no genoma;
- Cultivar os isolados em quatro meios de cultivo;
- Prospectar os extratos dos meios metabólicos dos isolados e avaliar a atividade em ensaios antimicrobianos;
- Selecionar uma linhagem mais promissora para caracterização do perfil químico dos metabólitos produzidos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Coleta, isolamento e purificação das actinobactérias

A coleta do material foi realizada em outubro de 2016 na Ilha de Alcatrazes (24°10'S, 45°70'W), município de São Sebastião – São Paulo e na Ilha das Palmas (23°33'S, 45°02'W), município de Ubatuba – São Paulo. Este procedimento foi realizado pelas colaboradoras Diana Fortkamp e Joelma Marcon.

Foram coletadas amostras de plantas do gênero *Anthurium* (para coleta de folhas, pecíolos e raízes), solo rizosférico e material rochoso. Todos os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos perfurados, identificados e transportados imediatamente para o laboratório do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP), onde ocorreu o processamento inicial.

As amostras de plantas coletadas foram: *Anthurium urvilleanum* (Ilha das Palmas), nativa da Mata-Atlântica e *Anthurium alcatrazense* (Ilha de Alcatrazes), endêmica da ilha de Alcatrazes. As plantas foram previamente identificadas e depositadas no Herbário Rio-clarense (HRCB) do Instituto de Biociências (UNESP/Rio Claro) sob os números de tombo HRCB 64643 (*A. urvilleanum*) e HRCB 64645 (*A. alcatrazense*).

As amostras de folha e rocha passaram por um processo de desinfecção superficial, de acordo com o método de Petrini (1991) modificado. O processo consistiu em seis lavagens: 1 minuto em água destilada esterilizada, 1 minuto em solução de etanol 70%, 2 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2,5%, um mergulho em etanol 70% e, para finalizar, dois mergulhos em água destilada esterilizada por 1 minuto. Para a confirmação da eficácia do método, uma alíquota de 100 µL da água proveniente da sexta lavagem foi inoculada em uma placa contendo meio sólido batata-dextrose-água (BDA). Após este processo as folhas, raízes e pecíolos foram cortados em fragmentos de 8-12 mm com bisturi esterilizado, sendo três destes fragmentos dispostos em placas de Petri contendo três meios de cultivo diferentes em triplicata (Tabela 1).

O solo rizosférico passou por um processo de diluições seriadas. As diluições seriadas foram realizadas adicionando-se 10 g de solo em 90 mL do diluente (solução salina – NaCl a 0,85%), obtendo-se a diluição 10^{-1} g mL⁻¹, a partir desta foram preparadas, da mesma maneira, as suspensões subsequentes nas concentrações de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} g mL⁻¹. O isolamento se deu por meio do método de espalhamento na superfície de meio de cultura contido em placa de Petri, utilizando 100 µL das suspensões seriadas nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} g mL⁻¹.

Todos os meios de cultivo foram acrescidos dos antibióticos tetraciclina (0,1 mg mL⁻¹) e nistatina (0,1 mg mL⁻¹).

Tabela 1. Composição dos meios de cultivos utilizados para isolamento das actinobactérias

Meio de cultivo	Composição do meio de cultivo
Amido Caseína Ágar (ACA)	10 g L ⁻¹ de amido solúvel, 0,3 g L ⁻¹ de caseína; 2 g L ⁻¹ de nitrato de potássio (KNO ₃); 2 g L ⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl); 2 g L ⁻¹ de fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄); 0,05 g L ⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO ₄); 0,02 g L ⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO ₃); 0,01 g L ⁻¹ de sulfato de ferro (FeSO ₄); 18 g L ⁻¹ de ágar (pH 7,0)
Ácido húmico com vitaminas do complexo B	1,0 g L ⁻¹ de ácido húmico (diluído em 10 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M); 0,5 g L ⁻¹ de fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄); 1,7 g L ⁻¹ de cloreto de potássio (KCl); 0,05 g L ⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO ₄); 0,01 g L ⁻¹ de sulfato de ferro (FeSO ₄); 0,01 g L ⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO ₃); vitaminas do complexo B (Anexo A); 18 g L ⁻¹ de ágar (pH 7,2)
Vitamina- arginina-ágar	0,8 mL L ⁻¹ de glicerol; 1 g L ⁻¹ de dextrose; 0,3 g L ⁻¹ de fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄); 0,3 g L ⁻¹ de L-arginina; 0,3 g L ⁻¹ de hidróxido de sódio (NaOH); 0,2 g L ⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO ₄); 1 mL L ⁻¹ de solução de elementos traço (Anexo B); 1 mL L ⁻¹ de solução de vitaminas (Anexo B); 18 g L ⁻¹ de ágar (pH 7,0)

As placas de Petri inoculadas foram levadas ao Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais da ESALQ/USP, onde foram acondicionadas em incubadora do tipo B.O.D. a 28°C. Foram realizadas inspeções diárias e, à medida que foi observado o crescimento de actinobactérias nas placas, estas foram codificadas e transferidas para novas placas contendo meio sólido ACA, para constatar a pureza dos isolados. Verificada a pureza, deu-se início ao processo de preservação.

5.1.1. Preservação dos isolados

Os isolados foram preservados por dois métodos: preservação em água destilada esterilizada, também conhecido como método Castellani (CASTELLANI, 1939; PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989) e criopreservação, que consiste na manutenção das células em glicerol 20% sob baixas temperaturas, em freezers a - 80 °C, tendo como principal objetivo manter a integridade dos materiais biológicos (WOLFE; BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009).

Posteriormente, serão depositados na Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da EMBRAPA Meio Ambiente (CNPMA), localizada em Jaguariúna, São Paulo, Brasil.

5.2. Reativação

O cultivo inicial consistiu no preparo de pré-inóculos de meio de cultura GY (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de dextrose; pH 7,0). Os isolados que estavam sendo mantidos

em placas de Petri contendo o meio de cultivo ACA, tiveram três plugues (7 mm de diâmetro) transferidos para Erlenmeyers, com capacidade de 125 mL, contendo 50 mL de meio GY e foram mantidos sob agitação de 150 rpm à temperatura de 28 °C. Este procedimento foi realizado tanto para dar início ao processo de extração de DNA, como para adquirir os metabólitos secundários.

5.3. Identificação dos isolados

5.3.1. Extração de DNA

Os isolados de actinobactérias foram cultivados em meio líquido, segundo descrito no item 5.2, por seis dias. Após o crescimento, 6 mL do cultivo foram transferidos para tubos *falcons*, concentrados por centrifugação e o precipitado foi transferido para tubos tipo *eppendorfs* de 2 mL. Posteriormente, foi realizada uma etapa prévia para facilitar a quebra da parede celular dos isolados, visto que actinobactérias possuem a parede celular bastante resistente. Essa etapa prévia consistiu em um processo composto por cinco etapas: 1) centrifugação ($10.000 \times g$) dos tubos com as amostras, por um minuto; 2) descarte do sobrenadante; 3) adição, em cada tubo, de 1 mL de água ultrapura autoclavada; 4) agitação em vórtex por cinco segundos; 5) centrifugação ($10.000 \times g$) por mais um minuto. Este procedimento foi repetido por até cinco vezes ou até que o sobrenadante estivesse transparente. Após este processo, a extração do DNA foi realizada com o kit *Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MoBio*, de acordo com especificações do fabricante.

A integridade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose à 0,8% (m/v) em tampão TAE 1x (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA), onde foram aplicados 3 µL dos DNAs extraídos junto a 2 µL do revelador *Cyber Green™ Loading buffer*; como marcador foi utilizado o *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo Fischer Scientific) com peso molecular de 1 kb. A quantificação e a qualidade do DNA foram determinadas utilizando o Nanodrop 2000, onde foi feita a leitura de 1 µL de cada amostra, no comprimento de ondas de 340 nm. As quantidades iniciais de DNAs extraídos variaram entre 5 e 300 ng µL⁻¹; as leituras da relação 260/280 variaram entre 1,60 e 2,30; já as leituras da relação 260/230 variaram entre 1,99 e 2,55.

5.3.2. Amplificação da região 16S do gene rRNA

A amplificação da região 16S do gene rRNA foi realizada pela reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores oligonucleotídeos 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3') e 27F (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'), de acordo com Lane (1991). As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas para um volume de 25 µL, contendo 17,35 µL de água ultrapura autoclavada, 2,5 µL de Taq buffer (10X) (Fermentas), 0,9 µL de MgCl₂ (25 mM) (Fermentas), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 0,1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas), 0,8 µL de DMSO e 1 µL de DNA molde (10 a 20 ng). As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C; 1 minuto a 55 °C; 2 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,0%), corados com Gel Red, juntamente com o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder para a observação do fragmento de aproximadamente 1500 pb amplificado em fotodocumentador com luz ultravioleta.

A purificação do produto de PCR foi realizada utilizando o kit de purificação *Promega Wizard SV gel and PCR clean-up system – Ref A9282*.

5.3.3. Reação para sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram submetidos para sequenciamento no equipamento *3500 Sanger Genomic Analyzer* (Applied Biosystems), utilizando o kit de sequenciamento *BigDye*, nas seguintes condições: 2 µL de tampão ABI 5x, 1 µL de cada iniciador (27F, 357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R e 1492R {5 mM} – Tabela 2), em reações independentes, 1 µL de *Big Dye*, 1 µL de produto de PCR (40 ng) e água ultrapura autoclavada para um volume final de 20 µL. As reações foram submetidas a um termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 1 minuto a 96 °C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 96 °C; 15 segundos a 50 °C; 4 minutos a 60 °C.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para o sequenciamento da região 16S do gene rRNA

Iniciador	Sequência	Referências
27F	5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'	Lane, 1991
357F	5' – CTC CTA CGG GAG GCA GCA G – 3'	Turner et al., 1999
357R	5' – CTG CTG CCT YCC GTA – 3'	Turner et al., 1999
704F	5' – GTA GCG GTG AAA TGC GTA GA – 3'	Lane, 1991
704R	5' – TCT ACG AAT TTC ACC ACT AC – 3'	Lane, 1991
1114F	5' – CGG CAA CGA GCG AAC CC – 3'	Liu et al., 2007
1114R	5' – GGG TTG CGC TCG TTR C – 3'	Liu et al., 2007
1492R	5' - TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT - 3'	Lane, 1991

5.3.4. Análise das sequências e construção da árvore filogenética dos isolados

A qualidade das sequências foi checada utilizando-se o programa FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.) e as sequências de cada oligonucleotídeo iniciador foram manualmente unidas utilizando o programa BioEdit 7.0.5. (HALL, 1999). As sequências foram alinhadas com ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas pelo método de distância de *Maximum Likelihood Method* (TAMURA; NEI, 1993), com *bootstrap* de 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985), através do programa MEGA 7.01 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (KUMAR; STECHER, TAMURA, 2016). A similaridade entre as sequências foi obtida por meio do programa PHYDIT versão 3.1, um editor de sequência para filogenia (CHUN, 2001). As sequências foram comparadas com as depositadas no banco de dados do *EzTaxon* (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) para identificação de procariotos (KIM et al., 2012).

5.4. Reação de PCR para amplificação dos genes de NRPS e PKS tipo I

O DNA extraído dos isolados, foi submetido à detecção de genes NRPS e PKS – I. Para isso, foram realizadas amplificações por PCR de sequências conservadas, a partir da utilização de iniciadores degenerados específicos, descritos na literatura (Tabela 3).

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 50 µL, contendo 24,4 µL de água ultrapura autoclavada; 10,0 µL de Taq buffer (10X) (Fermentas), 3,0 µL de MgCl₂

(25 mM) (Fermentas), 2,0 µL de dNTP (2,5 mM), 0,25 µL de cada iniciador (10 µM), 0,35 µL de Taq DNA polimerase (Fermentas), e 5,0 µL de BSA, 3,0 µL de DNA molde.

Tabela 3. Sequências dos iniciadores degenerados utilizados para amplificação dos genes de NRPS e PKS tipo I

Iniciador	Sequência 5' – 3'	Fragmento (pb)	Gene	Referências
A3F	GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG	700 – 800	NRPS	Ayuso-Sacido; Genilloud, 2005
A7R	SAS GTC VCC SGT SCG GTA S	700 – 800	NRPS	
K1F	TSA AGT CSA ACA TCG GBC A	1200 - 1400	PKS-I	
M6R	CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA	1200 - 1400	PKS-I	Edlund et al., 2011
KSF	CCS CAG SAG CGC STS TTS CTS GA	500 – 600	PKS-I	
KSR	TSG AGG CSC ACG GSA CSG GSA C	500 – 600	PKS-I	

As reações de amplificação foram submetidas a um termociclador (Applied Biosystems), programado para realizar:

- A3F/A7R: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 2 minutos a 59 °C; 4 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C;
- K1F/M6R: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 2 minutos a 55 °C; 4 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C;
- KSF/KSR: desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C; 2 minutos a 58 °C; 4 minutos a 72 °C, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) sendo corado com Gel Red, juntamente com o marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder, a fim de confirmar a amplificação das regiões gênicas de interesse.

5.5. Cultivo para obtenção dos extratos contendo metabólitos

Os isolados de actinobactérias foram inicialmente cultivados seguindo metodologia descrita no item 5.2. Posteriormente, o volume de 5 mL contendo meio de cultivo mais células foi transferido para Erlenmeyers, com capacidade para 250 mL, contendo 150 mL de meio de cultivo. Cada isolado foi cultivado em quatro meios (Tabela 4), para estimular as vias biossintéticas e explorar a produção dos compostos de interesse a partir de diferentes fontes

nutricionais. Os caldos de cultivo foram incubados a 28 °C, sob agitação constante de 150 rpm, por um período de 20 a 22 dias.

Após o crescimento, as culturas foram submetidas a um sistema de filtração a vácuo, com funil de Buchner e papel filtro qualitativo (80 g m⁻²), para retirada das células; o material filtrado foi recolhido em Kitassato.

Os filtrados foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido utilizando água e o solvente orgânico acetato de etila, na proporção de 1:1 (repetindo-se por 3 vezes), de modo que foram obtidos dois extratos: o aquoso e o acetato de etila. O extrato aquoso foi concentrado em liofilizador para retirada de toda a água presente na amostra. O extrato acetato de etila foi concentrado em um evaporador rotativo (MA 120 – Marconi). Ambos extratos foram codificados, pesados em balança analítica e armazenados sob refrigeração (10 °C ± 1), para utilização nos ensaios biológicos.

Tabela 4. Composição dos meios de cultivo utilizados para a fermentação das actinobactérias

Meio de cultivo	Composição do meio de cultivo
Czapek, modificado (1)	10,0 g L ⁻¹ de dextrose; 6,0 g L ⁻¹ de extrato de levedura; 3,0 g L ⁻¹ de nitrato de sódio (NaNO ₃); 1,0 g L ⁻¹ de fosfato dipotássico (K ₂ HPO ₄); 0,5 g L ⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O); 0,5 g L ⁻¹ de cloreto de potássio (KCl); 0,01 g L ⁻¹ de sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O); (pH 7,0)
BD (2)	200 g L ⁻¹ de caldo de batata, 20 g L ⁻¹ de dextrose; (pH 7,0)
R5 (adaptado de Hopwood, 1985) (3)	5,0 g L ⁻¹ de extrato de levedura; 10,0 g L ⁻¹ de dextrose; 0,10 g L ⁻¹ de NZ Amina A; 3,09 g L ⁻¹ de Tris; 0,25 g L ⁻¹ de sulfato de potássio (K ₂ SO ₄); 10,12 g L ⁻¹ de cloreto de magnésio (MgCl ₂ . 6H ₂ O); (pH 7,0)
Meio B (Janso; Carter, 2010) (4)	12,5 g L ⁻¹ de farinha de soja; 2,0 g L ⁻¹ NZ amina A; 12,5 g L ⁻¹ de dextrose; 1,0 g L ⁻¹ de carbonato de cálcio (CaCO ₃); 1,5 g L ⁻¹ de cloreto de amônio (NH ₄ Cl); 5,0 g L ⁻¹ de Diaion HP20; (pH 6,8)

5.6. Ensaios biológicos

Os extratos tiveram seu potencial antimicrobiano avaliado através de ensaios antagonistas contra bactérias patogênicas humanas e contra fungos fitopatogênicos, conforme descrito nos itens a seguir. Inicialmente, foi realizado um pré-ensaio com todos os extratos, os que apresentaram alguma atividade inibitória, foram reavaliados em triplicata.

Os micro-organismos testes foram obtidos da coleção de cultura de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil.

5.6.1. Avaliação do potencial antibacteriano

Para o ensaio antibacteriano foram utilizadas sete linhagens patogênicas humanas, os isolados clínicos: Gram-negativos *Salmonella typhi* (CMAA 85), *Burkholderia cepacia* (CMAA 92), *Pseudomonas aeruginosa* (CMAA 120), *Klebsiella pneumoniae* (CMAA 540), *Escherichia coli* (CMAA 1340); e os Gram-positivos *Staphylococcus schleiferi* (CMAA 178) e *Staphylococcus aureus* (CMAA 190). As linhagens bacterianas foram crescidas em meio de cultivo LB (10 g L⁻¹ de triptona, 10 g L⁻¹ de NaCl, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 18 g L⁻¹ de ágar, pH 7,0), a 28 °C por 24 horas.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de difusão em disco de papel, com adaptações da metodologia de Bauer et al. (1966). Com auxílio de uma alça bacteriológica colônias bacterianas isoladas foram colhidas e ressuspensas em solução salina a 0,85%, para obtenção de uma turvação correspondente com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. A concentração foi aferida em espectrofotômetro na absorvância de 550 nm.

A suspensão bacteriana (200 µL) foi plaqueada em meio de cultivo LB com auxílio de uma alça estéril; para as placas de Petri de dimensão 150 x15 mm, e para as placas de Petri de dimensão 90 x15 mm, foram utilizados 100 µL da suspensão bacteriana.

Discos de papel estéreis foram impregnados com 5 µL (na concentração de 1mg mL⁻¹) dos extratos ressuspensos em metanol. Para estes ensaios, foram realizados três controles: placas somente com as bactérias teste, placas com o solvente metanol, placas com fármacos controle (Sensidisc DME): cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), norfloxacin (10 µg) e sulfonamidas (300 µg).

Após o período de 24 horas de incubação a 28 °C, foi realizada a avaliação dos ensaios, verificando-se a presença ou ausência de um halo translúcido ao redor do disco de papel.

Os extratos que inibiram o crescimento bacteriano foram submetidos a reavaliação em placas únicas, em triplicata, utilizando a mesma metodologia. A atividade inibitória foi medida aferindo-se o diâmetro dos halos de inibição, que foram interpretados de acordo com os critérios preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, antigo NCCLS) (2011).

O documento do CLSI (2011), indica o cloranfenicol e as sulfonamidas como agente antimicrobiano para todas as linhagens testadas. A eritromicina é indicada para o controle de

Staphylococcus sp., enquanto a norfloxacin é utilizada como agente antimicrobiano para *B. cepacia* e *E. coli*. Cada antimicrobiano possui valores preconizados (Tabela 5) que representam a susceptibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos.

Tabela 5. Padrões interpretativos de diâmetros de halo de inibição preconizados pelo CLSI (2011)

Agente antimicrobiano	Diâmetro do halo de inibição em milímetros (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Cloranfenicol (30 µg)	≤12	13-17	≥18
Eritromicina (15 µg)	≤13	14-22	≥23
Norfloxacin (10 µg)	≤12	13-16	≥17
Sulfonamidas (300 µg)	≤12	13-16	≥17

5.6.2. Avaliação do potencial antifúngico

O potencial antifúngico foi avaliado também por difusão em disco de papel. Os micro-organismos testes foram três linhagens fúngicas fitopatogênicas: *Rhizoctonia solani* (CMAA 1589 – isolado de orégano (*Oreganum vulgare*)), *Sclerotinia sclerotiorum* (CMAA 1149 – isolado de feijão (*Phaseolus vulgaris*)) e *Sclerotium rolfsii* (CMAA 352 – isolado de orquídea (*Phalaenopsis* sp.)).

As linhagens fúngicas foram crescidas em meio de cultivo BDA, a 28 °C por um período de seis dias. Após o crescimento, fragmentos de micélio retirados da borda (5 mm de diâmetro) foram transferidos para o centro de novas placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA. Ao redor do fragmento, foram dispostos discos de papel estéreis, impregnados com 5 µL (1 mg mL⁻¹) dos extratos ressuspensos em metanol. As placas controles continham apenas os fitopatógenos, e outra apenas o solvente metanol.

Após o período de seis dias de incubação a 28 °C, tempo suficiente para o fungo crescer em toda placa, foi realizada a avaliação dos ensaios, verificando-se a inibição do crescimento micelial como atividade positiva.

Os extratos que inibiram o crescimento fúngico foram submetidos a reavaliação em placas únicas, em triplicata, utilizando a mesma metodologia, onde em uma borda da placa de Petri foi adicionado o disco de papel com os extratos ativos e, na borda oposta, um inóculo do patógeno (7 mm de diâmetro). Após o período de incubação, o percentual de inibição do

crescimento micelial (PIC) dos fitopatógenos, em relação ao controle, foi medido através da fórmula:

$$PIC = \frac{(\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}) \times 100}{\text{diâmetro da testemunha}}$$

5.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando detectadas diferenças ($p < 0,05$), as médias dos tratamentos foram comparadas com seus respectivos controles pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando o programa estatístico R® (R CORE TEAM, 2017).

5.8. Seleção de um isolado para caracterização do perfil químico dos metabólitos produzidos

A partir dos resultados dos ensaios biológicos, foi selecionado uma linhagem mais promissora para a análise do perfil químico detalhado, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas.

5.8.1. Obtenção das frações

Os quatro extratos acetato de etila, obtidos da linhagem selecionada e cultivada em 4 meios de cultivo, tiveram seus compostos separados através da extração em fase sólida em coluna do tipo Sep-Pak (Waters Sep-Pak® Vac 12cc) contendo 2 g de fase estacionária de sílica derivatizada com grupos cianopropila. A fase móvel consistiu em um gradiente: cloreto de metileno: acetato de etila (50:50); 100% acetato de etila; acetato de etila: metanol (50:50) e 100% metanol, sendo os solventes de grau analítico P.A. (*Synth*). De cada extrato acetato obteve-se quatro frações (A – D) que foram testadas em bioensaio e analisadas quimicamente.

Os quatro extratos aquosos foram ressuspendidas em 30 mL de água ultrapura e transferidos para *Erlenmeyers* (de 50 mL) com 3 g de uma mistura das resinas XAD2, XAD4 e XAD7 (na proporção de 1:1:1), permanecendo por 12 horas sob agitação (150 rpm, 28 °C). Após este período, foram filtrados e a resina passou por três lavagens: com água ultrapura; com

metanol (P.A.) e com metanol:acetona (50:50). As frações orgânicas foram reunidas, concentradas em evaporador rotativo até retirada completa dos solventes e posteriormente submetidas a extração em fase sólida em coluna do tipo Sep-Pak (SPE C₁₈ - Discovery® DSC-18 SPE), utilizando um gradiente de água em metanol nas seguintes proporções: 100% água (posteriormente descartada); água:metanol (75:25); água:metanol (50:50) e 100% metanol; obtendo-se quatro frações (1 – 4). A fração 1 foi descartada e as demais frações foram testadas em bioensaio e analisadas quimicamente.

No total, foram obtidas 28 frações, sendo 16 frações, provenientes dos extratos acetato de etila, e 12 frações provenientes dos extratos aquosos.

5.8.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-MS-MS)

As 28 frações foram ressuspensas em acetonitrila, na concentração de 1 mg mL⁻¹, sendo injetado 10 µL.

A espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-MS) foi adquirida em espectrômetro de massas Xevo G2-XS QToF Quadrupolo Tempo-de-voo (Waters) operando em modo *eletrospray* positivo com faixa de detecção entre 100 a 1500 Da e energia de ionização 1,2 Kv. Os valores de *m/z* foram gravados no modo centroide. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa MassLynx.

A fase estacionária utilizada foi uma coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de (A) água ultrapura (acrescida 0,1% de ácido fórmico) em (B) acetonitrila (acrescida 0,1% de ácido fórmico), iniciando a corrida em 90A:10B (durante seis minutos), 50A:50B (por três minutos), 2A:98B (um minuto), totalizando dez minutos de análise, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

As análises para determinação das massas moleculares dos compostos presentes nas frações foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, no Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo (IQSC – USP), em colaboração com o professor Dr. Roberto G. S. Berlinck.

5.8.3. Cromatografia em Camada Delgada

As frações foram monitoradas quimicamente segundo similaridade química por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se de cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram inspecionadas sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada de emissão nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Isolamento e identificação de actinobactérias das Ilhas de Alcatrazes e Palmas

Ao todo, foram isoladas 23 actinobactérias das duas ilhas, Alcatrazes e Palmas, do litoral norte de São Paulo. Destes, 83% (19 isolados) são da Ilha das Palmas, associados à planta *Anthurium urvilleanum*. Os demais foram isolados de Alcatrazes, sendo três associados à *Anthurium alcatrazense* e um de rocha.

As actinobactérias foram provenientes de diferentes partes amostradas, sendo 57% isolados da rizosfera, 13% de raiz, 13% de folhas, 13% de pecíolo e 4% de rocha. O meio de cultivo com o maior número de isolados (52%), foi o meio ácido-húmico.

O meio ácido-húmico é um meio seletivo e está entre os mais indicados para o isolamento de actinobactérias endofíticas e do solo (JIANG et al., 2016). Ele foi desenvolvido por Hayakawa e Nonomura (1987), tendo como diferencial o ácido-húmico do solo como única fonte de carbono e nitrogênio. Por este motivo, este meio de cultivo restringe o crescimento de colônias bacterianas não filamentosas, favorecendo o crescimento de actinobactérias (KUMAR et al., 2012).

A maior prevalência de micro-organismos em rizosferas, pode ser atribuída aos exsudatos radiculares que favorecem a sua existência. Actinobactérias desempenham um papel importante na dinâmica da rizosfera, pois podem secretar compostos promotores de crescimento vegetal e compostos antimicrobianos que impedem o crescimento de fitopatógenos (ÁLVAREZ-PÉREZ, 2017; JOG et al., 2012), visto que no ambiente rizosférico há uma enorme competição pelos nutrientes que garantem a sobrevivência de cada micro-organismo.

Os 23 isolados foram caracterizados através do sequenciamento da região 16S do gene rRNA, obtendo-se fragmentos de genes variando entre 1112-1491 pares de base, utilizados para análise baseada no alinhamento da sequência parcial do gene 16S rRNA, e comparados com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor GenBank (Tabela 6).

Tabela 6. Classificação e afiliação genética dos isolados de actinobactérias de acordo com o sequenciamento da região 16S do rRNA

Local	Código	Planta	Espécies similares no NCBI	Código de Acesso	Tamanho do fragmento (pares de base)	Identidade (%)
Raiz	A3	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces michiganensis</i> NBRC 12797	AB184153	1336	100,00
	A15A	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1480	100,00
	A15B	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1468	100,00
Folha	A5.1	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1491	100,00
	A54A	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1478	100,00
	A54B	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1465	100,00
Rizosfera	A18	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Amycolatopsis albidoflavus</i> NBRC 100337	NR_112695.1	1474	100,00
	A19	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Streptomyces exfoliatus</i> NRRL B-2924	NZ_KL647057.1	1122	99,89
	A20	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Streptomyces exfoliatus</i> NRRL B-2924	DQ026647.1	1466	99,64
	A23	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces albospinus</i> NBRC 13846	NR_112418.1	1454	99,00
	A27A	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lactacystinicus</i> OM-6519	NR_136866.1	1400	99,78
	A27B	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces lactacystinicus</i> OM-6519	NR_136866.1	1409	99,85
	A28	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces manipurensis</i> MBRL 201	NR_118275.1	1483	99,00
	A31	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces vinaceus</i> NBRC 13425	AB184394	1298	99,87
	A32	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces fulvissimus</i> DSM 40593	NC_021177.1	1474	99,00
	A35	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces aburaviensis</i> CSSP531	NR_115387.1	1482	99,00
	A36A	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> NBRC 15873	NR_041194.1	1474	99,00
	A36B	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces manipurensis</i> MBRL 201	NR_118275.1	1470	99,00
	A37	<i>A.urvilleanum</i>	<i>Streptomyces goshikiensis</i> NRRL B-5428.	NR_044147.1	1445	99,00
Rocha	A12.2	-	<i>Streptomyces albospinus</i> NBRC 13846.	NR_112418.1	1454	99,00
Pecíolo	A40	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NRRL B-1773.	DQ02663.1	1292	99,77
	A42A	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Streptomyces longwoodensis</i> NBRC 14251	DSM 41677	1475	99,57
	A42B	<i>A. alcatrazense</i>	<i>Streptomyces lunalinharesii</i> RCQ1071	NR_043541.1	1489	99,00

Os estudos moleculares evidenciaram que os isolados apresentam alta similaridade, em sua maioria, para o gênero *Streptomyces* (22 isolados), com exceção de um isolado da rizosfera, que pertence ao gênero *Amycolatopsis*. Embora tenham sido usados meios diversos para o isolamento, diante das condições utilizadas neste estudo, não foi possível isolar gêneros diversificados.

Os meios usados para o isolamento são o fator chave para adquirir micro-organismos cultiváveis, alguns estudos indicam que a utilização de meios de cultivo à base de amido e acrescidos de sais inorgânicos, podem facilitar o isolamento de actinobactérias não-*Streptomyces* (GONG, 2018).

Poucos estudos têm relatado o isolamento de actinobactérias altamente diversas e cultiváveis em ambientes marinhos. Ao estudar sedimentos marinhos de uma ilha oceânica, NG e TAN (2018) também utilizaram três meios seletivos diferenciados: peptona-asparagina ágar, manitol-arginina ágar (ZHANG et al., 2008) e o meio ácido-húmico. Com isso, isolaram 123 actinobactérias pertencentes a 18 gêneros diferentes, contudo, a maioria (47,97%) foi identificada como *Streptomyces* spp. Neste mesmo estudo, o meio ácido-húmico também foi o que recuperou a maioria dos isolados.

A predominância de *Streptomyces* é compatível com os resultados relatados por Lee et. al (2014), ao estudarem actinobactérias de amostras de solo de manguezais, utilizando seis meios de cultivo seletivos: ISP2, ISP7 (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), amido-caseína-ágar (KUSTER; WILLIAMS, 1964), *Streptomyces* ágar (ATLAS, 1993), “actinomycetes-isolation agar” (MACFADDIN, 2000) e ágar nutriente (WILLIAMS; DAVIES, 1965).

Das linhagens de *Streptomyces* isoladas neste trabalho, 26,08% (seis isolados) apresentaram similaridade com a espécie *Streptomyces lunalinharesii*. Esta espécie foi isolada pela primeira vez por Souza et al. (2008), em amostras de solo do cerrado brasileiro, recebendo este nome em homenagem ao microbiologista de solo Luiz Fernando de Toledo Luna Linhares. A *S. lunalinharesii* foi descrita como uma actinobactéria quinolítica e sugere-se que seja promissora para fins biotecnológicos, principalmente para degradação de resíduos contendo quitina.

As demais espécies de *Streptomyces* isoladas, já foram encontrados em diversas partes do mundo nas últimas décadas, com exceção das espécies *S. manipurensis* e *S. lactacystinicus*. A espécie *S. manipurensis* foi isolada uma única vez, em 2012, na Índia (NIMAICHAND et al., 2012), de uma amostra de solo de calcário e não há relatos sobre atividade biológica. Já a espécie *S. lactacystinicus* foi isolada em 2015, de amostras de solo no Japão (TAKÉ et al.,

2015) e relata-se a produção de “lactacystin”, um inibidor de proteassoma. Estes são os únicos trabalhos relatados na literatura para essas espécies.

A única linhagem não-*Streptomyces* isolada, foi a *Amycolatopsis albidoflavus*. Esta espécie já foi também isolada de amostras de solo no Japão, sendo descrita e caracterizada por Lee e Hah (2001). Recebeu este nome em decorrência da coloração amarelo-esbranquiçada do micélio aéreo (*albido* = branco) e do micélio vegetativo (*flavus* = amarelo). Foi relatada como uma actinobactéria capaz de reduzir nitrato a nitrito, além de conseguir crescer em meios com 7% de NaCl, sugerindo-se que seja promissora para fins biotecnológicos, relacionados à promoção de crescimento vegetal sob estresse salino.

Todas as linhagens obtidas foram analisadas em função das relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, comparando com as linhagens relatadas no banco de dados do *EzTaxon* (Figura 4).

Figura 4. Relações filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA, comparando as linhagens obtidas neste estudo, com as linhagens relatadas no banco de dados do EzTaxon

O alinhamento foi construído utilizando o programa MEGA 7.01 (KUMAR et al., 2016), com o método de distância *Maximum Likelihood Method* (TAMURA; NEI, 1993). Ramificações correspondentes a partições reproduzidas em menos de 50% de réplicas de bootstrap são reduzidas. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas) são mostradas próximas às ramificações (FELSENSTEIN, 1985). A análise envolveu 63 sequências nucleotídicas. Como grupo externo utilizou-se a linhagem *Streptoalloteichus tenebrarius* NBRC 16177.

Apesar da grande maioria dos isolados, ser do gênero *Streptomyces*, pode-se observar que foi obtido uma grande diferença de espécies. Analisando as espécies de clados próximos, não foram encontradas semelhanças quanto ao ambiente de isolamento, bem como na produção de metabólitos secundários ativos.

6.2. Avaliação da atividade biológica em função dos meios de cultivo

As 23 linhagens de actinobactérias foram cultivadas em 4 meios de cultivo e posteriormente particionadas com o solvente acetato de etila, totalizando 184 extratos, sendo 92 extratos acetato de etila e 92 extratos aquosos.

Segundo a avaliação biológica, a metodologia de partição líquido-líquido foi eficiente, pois não foram observadas atividades simultaneamente em ambos extratos, sugerindo que o composto ativo estava somente em uma das fases.

6.2.1. Avaliação do potencial antibacteriano

Os 184 extratos foram avaliados em ensaio antibacteriano, por difusão em disco, frente aos isolados clínicos Gram-negativos *Salmonella typhi*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*; e Gram-positivos *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e no Anexo C.

Tabela 7. Tamanho dos halos de inibição na atividade antibacteriana dos extratos brutos ativos

Amostra	<i>S. aureus</i> (Gram +)	<i>S. schleiferi</i> (Gram +)	<i>B. cepacia</i> (Gram -)	<i>E. coli</i> (Gram -)
A3 – meio BD (5 µg)	20 mm±0 ^d	16 mm±2,08 ^{de}	16mm±0,58 ^e	-
A3 – meio B (5 µg)	13 mm±2,64 ^f	-	-	-
A20 – meio BD (5 µg)	-	16 mm±0,58 ^{de}	14 mm±2,00 ^d	9 mm±0,58 ^f
A20 – meio R5 (5 µg)	16 mm±1,53 ^e	17 mm±2,6 ^{de}	9 mm±1,52 ^e	9 mm±0,58 ^f
A20 – meio B (5 µg)	19 mm±1,16 ^{de}	17 mm±3,6 ^{de}	17 mm±0,58 ^c	12 mm±0,58 ^e
A23 – meio Czapek (5 µg)	-	16 mm±0,58 ^e	24 mm±1,15 ^b	13 mm±1,16 ^e
A23 – meio BD (5 µg)	-	20 mm±0,58 ^{cd}	11 mm±0,58 ^e	12 mm±0,58 ^e
A23 – meio R5 (5 µg)	-	20 mm±1,52 ^{cd}	24 mm±1,15 ^b	15 mm±0,58 ^d
A23 – meio B (5 µg)	24 mm±3,21 ^c	21 mm±1,00 ^c	23 mm±0,58 ^b	16 mm±0,58 ^c
A32 – meio B (5 µg)	12 mm±0,58 ^f	10 mm±0,58 ^f	-	-
Cloranfenicol (30 µg)	28 mm±2,51 ^b	22mm±0,58 ^{bc}	29 mm±0,58 ^a	18 mm±1,15 ^b
Eritromicina (15 µg)	28 mm±1,00 ^b	24mm±0,58 ^b	17 mm±0,58 ^c	-
Norfloxacina (10 µg)	41 mm±1,15 ^a	25mm±1,00 ^b	15 mm±0,58 ^{cd}	17 mm±0,58 ^{bc}
Sulfonamidas (300 µg)	-	27mm±0,58 ^a	-	26 mm±1,15 ^a

Ensaios realizados em triplicata; médias±erro padrão seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Dentre os extratos testados, somente dez foram considerados bioativos, o que corresponde a 5,4%, mostrando a sensibilidade do teste. Estes dez extratos foram obtidos do extrato acetato de etila de quatro linhagens: *S. michiganensis* (A3), *S. exfoliatus* (A20), *S. albospinus* (A23) e *S. fulvissimus* (A32).

Segundo o CLSI (2011), a sensibilidade das bactérias aos compostos presentes nos extratos pode ser definida de acordo com o tamanho do halo de inibição em milímetros; onde as que apresentam halos de inibição ≤ 12 mm, são consideradas resistentes; entre 13 e 16 mm, consideradas intermediárias; e ≥ 17 mm, consideradas sensíveis.

As linhagens patogênicas Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tiphy* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram maior resistência frente à ação dos extratos. Por outro lado, as linhagens *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus schleiferi* e *Burkholderia cepacia* foram as mais sensíveis, com halos de inibição ≥ 17 mm.

Para o isolado *S. fulvissimus*, o meio de cultivo pode ter sido um fator determinante já que o(s) composto(s) ativo foi produzido somente no meio B. Os metabólitos presentes nesse extrato apresentaram atividade apenas para as linhagens bacterianas Gram-positivas. Na

literatura são relatadas atividades antimicrobiana (RIZK et al., 2007) e anticancerígena (RASHAD et al., 2018).

Os isolados *S. exfoliatus* e *S. albospinus* apresentaram atividade inibitória a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, nos diversos meios de cultivo. Logo, as fontes nutricionais não foram determinantes para a produção dos compostos com atividade antibacteriana.

Já o isolado de *S. michiganensis*, comportou-se de forma diferente, produzindo compostos inibitórios a uma bactéria Gram-positiva no meio B, e compostos que inibiram bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quando cultivado no meio BD.

Nos últimos anos, o aparecimento de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos configura um problema de saúde pública ao redor do mundo. Dentre os maiores causadores de problemas, a espécie *S. aureus* é a que mais contribui para o desenvolvimento da resistência a antibióticos (KACZOR et al., 2017), sendo responsável por diversas infecções, como doenças de pele e no trato respiratório. Além de *S. aureus*, linhagens resistentes de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, também tem aumentado (MURIMA et al., 2014), o que impulsiona a busca por novos compostos eficientes no controle de bactérias resistentes a antibióticos.

No trabalho relatado por Siddharth e Vittal (2018), foi avaliado o potencial antimicrobiano de uma linhagem de *Streptomyces* coletada de sedimentos marinhos, os extratos acetato de etila foram avaliados por difusão em disco, aplicando-se 30 μL (1 mg mL^{-1}) de extrato em cada disco. Eles verificaram que a linhagem produziu compostos que inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *M. luteus*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*K. pneumoniae* e *E. coli*), com halos de inibição de 16 mm para *M. luteus* e *S. epidermidis*, 14 mm para *B. cereus*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, e 10 mm para *E. coli*. Os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana foram identificados como peptídeos não ribossômicos. Em comparação com este trabalho, os extratos dos isolados *S. exfoliatus* e *S. albospinus* apresentam resultados mais promissores, visto que a quantidade de extrato aplicada no disco foi 5 μL (1 mg mL^{-1}) e os halos de inibição para *S. aureus* e *E. coli* foram $\geq 16 \text{ mm}$ e $\geq 9 \text{ mm}$, respectivamente.

No trabalho realizado por Quintero et al. (2018), extratos acetato de etila de actinobactérias isoladas de sedimentos marinhos, tiveram seu potencial antibacteriano avaliado contra linhagens de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Os extratos mais promissores ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentaram halos de inibição de 13,3 mm para *K. pneumoniae*; 11,6 mm para *E. coli* e 21,2 mm para *S. aureus*; semelhantes ao que está sendo relatado no presente estudo.

Das et al. (2018), relatam o potencial antimicrobiano de 24 actinobactérias no controle de linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus saprophyticus* e *Bacillus pumillus*. Os extratos acetato de etila foram avaliados por difusão em disco de papel, utilizando 10 µL de extrato (1 mg mL⁻¹). Os mais promissores apresentaram halos de inibição de 34,6 mm para *S. aureus*; 36,3 mm para *E. coli*; 33 mm para *S. aureus* resistentes à meticilina. Os compostos presentes nas frações ativas são predominantemente compostos fenólicos e ácido benzenoacético.

No presente estudo, nota-se que a produção de compostos com atividade antibacteriana pode ser estimulada pela composição dos meios de cultivo. Apesar de na literatura serem relatados diversos estudos, tanto com atividades mais promissoras quanto menos promissoras, o presente estudo apresenta resultados relevantes que contribuem no conhecimento sobre a produção de compostos inibidores do crescimento de bactérias de importância clínica.

6.2.2. Avaliação do potencial antifúngico

Os 184 extratos foram avaliados em ensaio antifúngico, por difusão em disco, contra os fungos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de inibição micelial dos fitopatógenos

Amostra	<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>
A3 – meio R5 – Acet (5 µg)	0	18,82%±1,17 ^d
A20 – meio B – Acet (5 µg)	19,22%±2,71 ^b	22,35±2,04 ^c
A23 – meio R5 – Acet (5 µg)	25,10%±2,45 ^a	32,16%±1,35 ^a
A32 – meio B – Aq (5 µg)	27,45%±1,79 ^a	26,27±2,95 ^b
A42B – meio Czapek – Acet (5 µg)	16,47%±2,35 ^{bc}	0
A54A – meio B – Aq (5 µg)	13,73%±1,35 ^c	0
Controle	0	0

Ensaios realizados em triplicata; médias±erro padrão seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Legenda: Acet: extrato acetato de etila; Aq: extrato aquoso

O fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* mostrou-se resistente frente à ação dos compostos, que não inibiram o crescimento fúngico. Por outro lado, os fungos *Rhizoctonia*

solani e *Sclerotium rolfsii* apresentaram sensibilidade aos compostos presentes nos extratos ativos.

Apenas 3,26% (correspondente a seis extratos), apresentaram atividade inibitória a algum dos fitopatógenos. Sendo quatro oriundos do extrato acetato de etila: *S. michiganensis* (A3), *S. exfoliatus* (A20), *S. albospinus* (A23), *S. lunalinharesii* (A42B); e dois do extrato aquoso: *S. fulvissimus* (A32) e *S. lunalinharesii* (A54A).

Também verificou-se que o meio de cultivo influenciou diretamente na produção dos metabólitos, pois cada isolado produziu compostos antifúngicos em um meio específico. Nota-se que a maioria dos metabólitos ativos neste ensaio foram produzidos no meio R5 e o meio B, o que reforça o fato de que as condições nutricionais podem afetar a produção de moléculas bioativas.

Fungos fitopatogênicos são capazes de infectar os tecidos das plantas em qualquer estágio de crescimento (RAMIREZ-MARES; HERNANDEZ-CARLOS, 2015), causando prejuízo no campo e na pós-colheita. O *S. rolfsii* e o *R. solani* são patógenos economicamente importantes em culturas em todo o mundo, comumente ocorrem nos trópicos, regiões subtropicais e outras regiões temperadas quentes (KOTASTHANE et al., 2015) onde causam problemas, principalmente, em culturas de arroz, batata e leguminosas.

Nos últimos cinco anos (2014 – 2018), a maioria dos trabalhos na literatura têm relatado, para estes fitopatógenos, a atividade antifúngica pelo método de cultivo pareado, seguidos de bioensaios *in vivo*, com menor ênfase no isolamento de compostos.

No trabalho realizado por Goudjal et al. (2014), foi avaliada a atividade antifúngica de actinobactérias endofíticas frente ao fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. As actinobactérias foram avaliadas pelo método de estrias, e exibiram forte atividade contra o fitopatógeno, com zonas de inibição maior que 20 mm. Os isolados promissores foram avaliados em ensaio *in vivo* com sementes de tomate, plantadas em solos infectados com *R. solani*. Os pesquisadores relatam que quatro isolados reduziram a incidência da doença em 75%, quando comparados ao controle negativo.

Resultados semelhantes são descritos por Thampi e Bhai (2017), avaliando o potencial de 50 actinobactérias isoladas da rizosfera, frente aos fitopatógenos *Phytophthora capsici* e *Sclerotium rolfsii*. Os isolados foram avaliados pelo método de cultivo pareado e sete deles apresentaram inibição de 90% aos fitopatógenos, sendo três deles selecionados para ensaio *in vivo* com plantas de pimenta em solos infectados com os fitopatógenos. As actinobactérias mais promissoras diminuíram a incidência de doenças em 98,1% para *S. rolfsii* e 83,77% para *S. capsici*.

Embora os ensaios *in vivo* apresentem resultados promissores e animadores, é importante que haja também a preocupação em identificar os compostos ativos, visto que alguns fungicidas químicos já perderam sua eficácia no campo (CHEVAL et al., 2017), trazendo a necessidade de descobrir novas moléculas com potencial antifúngico para substituir ou servir de base para novas inspirações de ativos, preferencialmente com diferentes mecanismos de ação.

Portanto, para explorar ao máximo todo potencial de produção de metabólitos secundários por técnicas dependentes de cultivo, tanto se faz necessário variar os nutrientes fornecidos como também realizar estudos para detecção de genes que codificam para a síntese de metabólitos secundários ativos.

6.3. Detecção dos genes de NRPS e PKS tipo I

Foi realizado o estudo gênico das principais vias biossintéticas envolvidas na síntese de moléculas bioativas através da detecção de genes que codificam enzimas multifuncionais pertencentes aos NRPS e PKS-I (Tabela 9).

Tabela 9. Estudos moleculares para detecção dos genes codificadores para as enzimas multifuncionais PKS-I e NRPS

Código	Espécie	PKS-I KSF/KSR	PKS-I K1F/M6R	NRPS A3F/A7R
A3	<i>Streptomyces michiganensis</i>	(+)	(-)	(-)
A15A	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(+)	(+)	(-)
A15B	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(+)	(-)	(-)
A5.1	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(-)	(+)	(+)
A54A	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(+)	(-)	(-)
A54B	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(+)	(+)	(-)
A18	<i>Amycolatopsis albidoflavus</i>	(+)	(-)	(-)
A19	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	(+)	(-)	(+)
A20	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	(+)	(-)	(+)
A23	<i>Streptomyces albospinus</i>	(+)	(-)	(+)
A27A	<i>Streptomyces lactacystinicus</i>	(+)	(-)	(+)
A27B	<i>Streptomyces lactacystinicus</i>	(+)	(-)	(+)
A28	<i>Streptomyces manipurensis</i>	(-)	(-)	(+)
A31	<i>Streptomyces vinaceus</i>	(+)	(+)	(+)
A32	<i>Streptomyces fulvissimus</i>	(-)	(-)	(+)
A35	<i>Streptomyces aburaviensis</i>	(-)	(-)	(-)
A36A	<i>Streptomyces cinnamomensis</i>	(+)	(-)	(+)
A36B	<i>Streptomyces manipurensis</i>	(+)	(-)	(+)
A37	<i>Streptomyces goshikiensis</i>	(+)	(-)	(-)
A12.2	<i>Streptomyces albospinus</i>	(+)	(+)	(-)
A40	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>Ardesiacus</i>	(-)	(-)	(-)
A42A	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	(-)	(+)	(+)
A42B	<i>Streptomyces lunalinharesii</i>	(+)	(-)	(-)

A investigação específica das enzimas multifuncionais mostrou a prevalência de sequências gênicas pertencente as enzimas do grupo policetídeos I. Do total dos isolados, 73,9% apresentaram amplificação positiva para os iniciadores KSF/KSR, enquanto apenas 30,4% foram detectados pelos iniciadores K1F/M6R. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao fato de que o conjunto KSF/KSR é utilizado para detectar genes do domínio cetosintase (KS), regiões que transcrevem as principais enzimas iniciadoras da cadeia de montagem das moléculas antibióticas, mais facilmente encontrado em bactérias (EDLUND et al., 2011), enquanto o conjunto K1F/M6R é utilizado para detectar genes dos domínios cetosintase (KS) e

aciltransferase (AT) de PKS-I, que possuem uma sequência maior de genes, o que pode dificultar a sua detecção (AYUSO-SACIDO: GENILLOUD, 2005).

Os PKS-I estão amplamente distribuídos nos três domínios da vida, sendo mais abundantes nos filos *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*, em bactérias, e *Ascomycota* em fungos (WANG et al., 2015). Os policetídeos representam um grupo altamente diversificado de produtos naturais, cujos compostos compreendem principalmente as classes dos polifenóis, macrolídeos, polienos, enedienos e poliéteres, que podem atuar como agentes antifúngicos, antibacterianos, imunossupressores, antiparasitários e agentes antitumorais (HERTWECK, 2009).

Para os genes de NRPS, 47,8% foram detectados pelos iniciadores A3F/A7R. Assim como os PKS-I, os NRPS são abundantes em bactérias e fungos, capazes de sintetizar metabólitos clinicamente importantes, derivados de peptídeos, tais como penicilinas, cefalosporinas, glicopeptídeos e ciclosporina. Essas multi-enzimas têm uma arquitetura modular semelhante à dos PKSs-I, o que facilita previsões estruturais sobre seus produtos metabólico (STRIEKER et al., 2010).

Um único isolado, *S. vinaceus* (código A31) foi positivo para os três iniciadores, enquanto dois isolados, *S. aburaviensis* (A35) e *S. diastaticus* (A40) foram negativos para todos os genes. Os resultados sugerem que os meios de cultivo utilizados neste estudo podem não ter fornecido os nutrientes e as condições necessárias para estimular a produção de metabólitos secundários em todos os isolados e que alguns dos isolados podem produzir metabólitos intracelulares que não são excretados para o meio de cultivo.

Actinobactérias geralmente possuem os genes que codificam para as vias biossintéticas de PKS e NRPS, características para a produção de metabólitos secundários (SALOMON et al., 2004), entretanto, nem todas conseguem expressar esses genes.

Relacionando a produção de compostos antibacterianos à detecção de genes de PKS-I e NRPS, nota-se que todos os resultados biológicos positivos, apresentaram genes que codificam para pelo menos uma dessas vias biossintéticas.

O isolado *S. fulvissimus*, positivo para a via de NRPS, inibiu o crescimento de duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. schleiferi*) e dois fungos fitopatogênicos (*R. solani* e *S. rolfisii*); enquanto o isolado *S. michiganensis*, positivo para a via de PKS-I, inibiu apenas o crescimento de um fungo fitopatogênico (*S. rolfisii*), além de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. schleiferi*) e uma bactéria Gram-negativa (*B. cepacia*). Por outro lado, os isolados (*S. exfoliatus* e *S. albospinus*) positivos para PKS-I e NRPS, produziram compostos com amplo espectro de atuação ou produziram diversos compostos ativos, inibindo

tanto os fungos fitopatógenos (*R. solani* e *S. rolfii*), como as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. schleiferi*) e Gram-negativas (*B. cepacia* e *E. coli*).

No trabalho realizado por Lee et al. (2014), utilizando os mesmos iniciadores para detecção de genes NRPS e PKS-I, relata-se que muitos isolados possuíam estes genes, entretanto, nem todos foram positivos no controle das linhagens bacterianas patogênicas testadas. Os pesquisadores associaram a ausência de atividade ao meio de fermentação utilizado (meio FM3 descrito por Garcia et al., 1999), que pode não ter fornecido as condições e nutrientes necessários para a produção de metabólitos secundários.

Passari et al. (2015), ao investigarem o potencial antimicrobiano de actinobactérias endofíticas associado à presença de genes PKS-I e NRPS. Os resultados indicaram que a maioria dos isolados possuía os genes em seu DNA, mas não foram capazes de expressá-los nos bioensaios. Por outro lado, alguns isolados negativos para PKS-I e NRPS, foram positivos no controle dos patógenos, indicando que os metabólitos secundários foram produzidos por outra via biossintética.

Embora os genes tenham sido detectados para as vias biossintéticas, nem sempre ocorrerá a produção dos metabólitos. Isso porque mesmo que os isolados possuam potencial genético para produção, a expressão depende de diversos outros fatores, como nutrientes e condições de cultivo.

Muitas estratégias foram relatadas para “despertar” *clusters gênicos* pouco expressos e/ou silenciosos em *Streptomyces*, possibilitando a descoberta de novos agentes bioativos. Duas formas principais substancialmente sobrepostas são usadas: gatilhos fisiológicos (ZHU et. al, 2014), como o cultivo sob condições de estresse, como choque térmico e/ou utilização de meios de cultivo “pobres” (YOON; NODWELL, 2014); e a utilização de manipulações sintéticas ou genéticas (XU et. al, 2018).

Os gatilhos fisiológicos também são definidos como métodos pleiotrópicos, caracterizados por abordagens mais gerais e empíricas, e podem influenciar na expressão de mais de um gene (RUTLEDGE; CHALLIS, 2015). Uma alteração nas condições de crescimento é, talvez, a maneira mais simples de induzir uma mudança na expressão de genes silenciosos, onde a produção de metabólitos pode ser estimulada alterando-se a composição do meio, a quantidade de aeração, o tempo de cultivo, adicionando-se ativadores ao meio de cultivo ou utilizando co-cultivo (BARAL et al., 2018).

A capacidade de produzir moléculas bioativas diversas, baseia-se no fato de os produtos destas vias biossintéticas serem sintetizados tanto pela regulação específica de cada

via, como por mecanismos pleiotrópicos (UNDABARRENA et al., 2017), que podem interferir na expressão de cada produto, tudo isso ao mesmo tempo.

Diante disto, fica evidente que a exploração da produção de metabólitos secundários ativos, deve levar em consideração o conhecimento dos genes codificadores para a produção, bem como a utilização de metodologias variadas durante o cultivo, como o fornecimento de diferentes fontes nutricionais, para que seja desencadeada a ativação da biossíntese de metabólitos secundários.

6.4. Caracterização do perfil químico dos metabólitos produzidos por A32

A linhagem *S. fulvissimus* (A32) foi selecionada para um estudo de perfil químico dos metabólitos, por ter sido positivo para a detecção de genes para a síntese de peptídeos não ribossomais (NRPS) e por apresentar atividade inibitória a *S. aureus*, *S. schleiferi*, *R. solani* e *S. rolfsii*. Esta foi crescida em 4 meios de cultivo, gerando os extratos brutos que foram submetidos a partição líquido-líquido e, posteriormente frações acetato de etila e aquosa que foram submetidas a separação por extração em fase sólida em coluna do tipo Sep-Pak. As frações obtidas foram submetidas a ensaios biológicos e análise do perfil químico por UPLC-MS-MS.

O fluxograma resumizando o estudo dos metabólitos secundários de *S. fulvissimus*, com atividade antibacteriana e antifúngica, encontra-se no item 6.4.3.

6.4.1. Frações acetato com atividade antibacteriana

Após o cultivo em meio B da linhagem *S. fulvissimus* (A32), o extrato bruto foi particionado e somente a fração acetato de etila se mostrou ativa às bactérias *S. aureus* e *S. schleiferi*. Esta foi submetida a cromatografia em coluna (Sep-Pak), foram obtidas 4 frações (a: 50% diclorometano: 50% acetato de etila; b: 100% acetato de etila; c: 50% acetato de etila: 50% metanol e d: 100% metanólica). Pela análise do perfil químico, observados por CCD e nos cromatogramas (UPLC-MS), as frações se mostraram distintas.

Na avaliação do ensaio antibacteriano (conforme item 5.6.1 descrito, utilizando 5µg por disco), somente a terceira fração obtida na cromatografia Sep-Pak (Ac4A32c) apresentou atividade inibitória às linhagens *S. aureus* e *S. schleiferi* (Figura 5).

Figura 5. Ensaio de atividade antibacteriana utilizando as frações obtidas da cromatografia em coluna pré-empacotada proveniente do extrato acetato de etila do meio B (Ac4)

Esta atividade da fração Ac4A32c foi considerada moderada com halos de inibição de 15 mm (*S. aureus*) e 13 mm (*S. schleiferi*). Também foi observado que o halo foi maior em comparação ao apresentado pelo extrato acetato de etila (que foi 12 mm e 10 mm, respectivamente).

Esta mesma linhagem quando crescida nos outros 3 meios de cultivo (e após partição), não apresentou atividade biológica. Ainda assim após separação cromatográfica, as frações obtidas foram reavaliadas no ensaio biológico. A terceira fração obtida na separação (oriunda do meio BD) se mostrou ativa (Figura 6).

Figura 6. Ensaio de atividade antibacteriana utilizando as frações obtidas da cromatografia em coluna pré-empacotada proveniente do extrato acetato de etila do meio BD (Ac2)

A fração Ac2A32c inibiu o crescimento de *S. aureus*, com halo de inibição de 10 mm, sendo considerada uma fraca inibição. O fato do extrato acetato não ter apresentado atividade inibitória na triagem inicial, pode estar relacionado à quantidade elevada de compostos que podem gerar falsos-negativo ou podem se encontrar em uma concentração muito baixa.

As frações ativas foram analisadas por UPLC-MS-MS, para comparar a similaridade química dos compostos presentes. Os cromatogramas das duas frações ativas apresentam três bandas cromatográficas nos mesmos tempos de retenção (t_R) em minutos: 7,37; 8,38 e 8,63; com compostos de mesma massa/carga (m/z) (Figura 7).

Figura 7. Cromatogramas das frações ativas Ac2A32c (terceira fração/meio BD) e Ac4A32c (terceira fração/meio B)

Com as informações de m/z das bandas em comum, foram realizadas buscas nos bancos de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP) e *Scifinder*.

Primeiramente para o composto com t_R 7,37 min e m/z 288,29, considerando que o valor visualizado no espectro de massas se tratava do $[M+H]^+$, utilizou-se para a busca o intervalo da massa molar “287,20 a 287,35 Da” e como fonte biológica “*Streptomyces*”. Nesta busca foram encontrados cinco compostos (Tabela 10). Para esta mesma banda, uma nova busca foi realizada, considerando que o valor poderia se tratar do $[M+Na]^+$, mudando o intervalo da massa molar para “265,20 a 265,35 Da”, onde foram encontrados três compostos (Tabela 10).

Tabela 10. Informações químicas dos compostos compatíveis com o sinal de m/z 288,29 Da no banco de dados

Composto	Peso molecular	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
clavamicina E	287,27	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₆
ácido citosilglucurônico	287,23	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₇
michigazone	287,27	C ₁₅ H ₁₃ NO ₅
mitomicina G	287,31	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₃
nikkomycin C	287,23	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₇
anisomicina	265,30	C ₁₄ H ₁₉ NO ₄
aristeromicina	265,27	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃
estreptozocina	265,22	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₇

Entre as possibilidades descritas, o composto que mais se aproxima é a anisomicina. A anisomicina é um composto da classe dos benzenóides e foi isolada de *Streptomyces griseolus* pela primeira vez, mas é muito comum o isolamento deste composto em várias espécies de *Streptomyces* (MACIAS-SILVA et al., 2010). Primeiramente, a anisomicina foi descrita como um anti-protozoário, efetivo no controle de *Trichomonas vaginalis* e *Endamoeba histolytica* (SOBIN; TANNER, 1954), mas com baixa atividade antibacteriana. Este composto é conhecido principalmente por inibir a síntese proteica em eucariontes e por apresentar atividades diversas como a antitumoral, antiviral e imunossupressora. Em 2008, um grupo de pesquisadores

descobriu que a anisomicina, em doses muito baixas, inibia os linfócitos T primários (XING et al., 2008); com base nisso, o mesmo grupo de pesquisa investigou a atividade do composto no tratamento de células Jukart de leucemia aguda em humanos, e relatam que o composto é capaz de inibir a proliferação de células Jukart e induzir apoptose (SUN et al., 2013). Recentemente, a anisomicina foi avaliada para o tratamento do carcinoma hepatocelular (CHC), relata-se que a anisomicina exerce efeitos de morte direta e efeitos imunoterapêuticos mediados por “células *natural killer*” (NK) no CHC, sugerindo a anisomicina como um novo fármaco para o tratamento do CHC (KIM et al., 2018). Apesar dessa atividade biológica não ter sido avaliada neste estudo, essas informações são importantes para trabalhos futuros e podem direcionar os próximos passos para a identificação correta do composto.

Para o composto com t_R 8,38 min e m/z 531,17, as buscas no banco de dados com o intervalo de massa molar “530,00 a 530,35 Da” e “508,00 a 508,35 Da”, não apresentou resultado.

O composto com t_R 8,63 min e m/z 332,33, quando buscado com o intervalo de massa molar “331, 25 a 331,40 Da” foi compatível com dois compostos (Tabela 11). Realizando uma nova busca com o intervalo de massa “309,25 a 309,40 Da”, não foram encontrados compostos compatíveis.

Tabela 11. Informações químicas dos compostos compatíveis com o sinal de m/z 332,33 Da no banco de dados

Composto	Peso molecular	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
Mitiromicina	331,32	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅
8,8,9-Trimethoxy-5-methylbenz[cd]isoindolo [2,1-a]indol-1(8H)-one	331	C ₂₁ H ₁₇ NO ₃	*

* Não foram encontradas informações sobre o composto

Na literatura, há relatos de que o composto “mitiromicina” pertence à classe das quinonas e foi isolado pela primeira vez de linhagens de *Streptomyces verticillatus* (LEFEMINE et al., 1962), sendo derivado do composto mitomicina C. Neste estudo, relata-se que o composto inibiu o crescimento de duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, sendo negativo para bactérias Gram-negativas. Este é o único trabalho na literatura que relata a atividade biológica da mitiromicina. Além deste trabalho, há

uma patente que estabelece um método para induzir vetores de vírus em células somáticas de bovinos (CAO et al., 2012). O método utiliza um lentivírus para infectar fibroblastos bovinos, causando mutagênese nas células, que adquirem características de células tronco. Após a formação de colônias, estas são inoculadas em camundongos tratados com mitomicina. Segundo os inventores, o método pode desempenhar ações importantes para a clonagem transgênica de bovinos, criação de novas espécies, regulação e expressão gênica, além de proporcionar ideias e referências para células de outras espécies.

Os espectros de massa das três bandas cromatográficas similares foram comparados quanto aos seus padrões de fragmentação (Figura 8).

Figura 8. Espectros de massas de alta resolução dos compostos encontrados nas frações ativas. (a) – composto com t_R 7,37 min e m/z 288,29; (b) composto com t_R 8,38 min e m/z 531,17; (c) composto com t_R 8,63 min e m/z 332,33. Em verde, os da fração Ac2A32c (terceira fração/meio BD) e em vermelho, os da fração Ac4A32c (terceira fração/meio B)

Observa-se diferenças no padrão de fragmentação, sugerindo que apesar de algumas semelhanças, provavelmente trata-se de compostos diferentes.

Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho relatam a atividade de compostos produzidos por *Streptomyces fulvissimus* contra linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi*. Com base nos resultados obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de massas, sugere-se que os compostos responsáveis por esses efeitos podem pertencer à classe dos benzenóides e das quinonas. Contudo, para a atribuição inequívoca do composto é necessário o isolamento e caracterização do(s) composto(s) ativo(s).

6.4.2. Frações aquosas com atividade antifúngica

O isolado *S. fulvissimus* (A32) foi cultivado em meio B, o extrato bruto obtido foi particionado e somente a fração aquosa mostrou atividade contra os fungos *R. solani* e *S. rolfsii*. Esta fração foi submetida a cromatografia em coluna (Sep-Pak), obtendo-se 4 frações (1: 100% água (descartada); 2: 75% água: 25% metanol; 3: 50% água: 50% metanol e 4: 100% metanol). Analisando o perfil químico, observadas por CCD e nos cromatogramas (UPLC-MS), as frações de mostraram distintas.

Na avaliação do ensaio antifúngico, apenas a quarta fração obtida na cromatografia Sep-Pak (Aq4A32b4) inibiu o crescimento dos fitopatógenos *R. solani* e *S. rolfsii* (Figura 9).

Figura 9. Ensaio de atividade antifúngica utilizando as frações obtidas da cromatografia em coluna pré-empacotada proveniente do extrato aquoso do meio B (Ac4)

A fração bioativa apresentou percentuais de inibição de 33,19% para *R. solani* e 30,2% para *S. rolfsii* quando comparados ao controle. Estes valores foram superiores aos percentuais

do extrato aquoso (precursor), e podem estar relacionados à quantidade elevada de compostos que podem gerar falsos-negativo ou podem se encontrar em uma concentração muito baixa.

Todas as frações obtidas foram analisadas UPLC-MS-MS, e a fração ativa teve seu perfil químico comparado com as frações não ativas. Foram observadas treze bandas cromatográficas que estavam presentes exclusivamente na fração ativa (anexo E).

As informações de m/z extraídas dos espectros foram comparadas com os registros existentes nos bancos de dados *Dictionary of Natural Products* (DNP) e *Scifinder*. Para todos os compostos foram realizadas buscas utilizando palavra “*Streptomyces*” como fonte biológica, e os intervalos de massas molares buscados levaram em consideração a condição de íon protonado $[M+H]^+$ e sodiado $[M+Na]^+$, sendo selecionados aqueles que apresentaram maior similaridade com a massa molar visualizada nos espectros de massa.

A relação completa dos compostos com suas respectivas m/z , t_R e compostos compatíveis com os intervalos de massa molar buscados nos bancos de dados encontra-se na tabela 12.

Tabela 12. Relação dos possíveis compostos presentes apenas na fração bioativa

Banda cromatográfica (tr – minutos)	m/z observada	Intervalos buscados	Compostos encontrados na literatura (peso molecular – g mol⁻¹)
1 (1,28)	295,1687	294,00 – 294,30 e 272,00 – 272,30	sarubicina A (294,26); antibiótico A 19009 (272,26); bimamicina A (272,25); sulfostina (272,21); 4',5,7-Trihydroxyflavanone (272,25)
2 (2,180)	183,0945	181,90 – 182,20 e 159,90 – 160, 20	ácido 3-amino-2,4-di-hidroxibenzóico (182); 1-amino-2- (4-hidroxifenil) etanol (182); ácido α -amino-5-hidroxi-2-piridinopropanoico (182,18); ácido 2-amino-5-nitrobenzóico (182,13); enaminomicina C (182,13); metilenomicina A (182,17); 2,3',4'-tri-hidroxiacetofenona (182); ácido 2-amino-4- (2-aminoetoxi) -3-butenóico (160,17); ácido 2,6-diamino-4-oxohexanóico (160); 4-hidroxi-2-metilquinazolina (160,17); 2,3,4-tri-hidroxi-6-metilciclohexanona (160,17)
3 (2,93)	431,2897	430,15 – 430,35 e 408,15 – 408,35	indimicina A (408,32)
4 (3,08)	516,3437	515,20 – 515,40 e 493,15 – 493,40	Não foram encontrados nos bancos de dados
5 (3,17)	415,3032	414,20 – 414,40 e 392,20 – 392,40	clavamicina A (414,37); fualosina (414,37); premitramicinona (414,40); anidromaggiomicina (392,36); antibiótico BE 26554A (392); cervicarcin (392,36); resistoflavina (392,36)
6 (3,45)	575,3262	574,20 – 574,40 e 552,20 – 552,40	Não foram encontrados nos bancos de dados
7 (3,66)	468,3113	467,20 – 467,40 e 445,20 – 445,40	Não foram encontrados nos bancos de dados
8 (4,03)	253,1444	252,00 – 252,30 e 230,00 – 230,40	Não foram encontrados nos bancos de dados
9 (4,30)	325,1667	324,00 – 324,30 e 302,00 – 302,40	Não foram encontrados nos bancos de dados
10 (4,70)	337,1675	336,00 – 336,20 e 314,00 – 314,20	2-Cloro-7-etil-6,8-di-hidroxi-9H-pirrólo [1,2- b] [1,3] benzoxazin-9-on (314)
11 (5,16)	339,1824	338,00 – 338,30 e 316,00 – 316,30	Não foram encontrados nos bancos de dados
12 (6,06)	295,1545	294,00 – 294,30 e 272,00 – 272,30	Sulfostina (272,21)
13 (7,95)	447,2033	446,00 – 446,40 e 424,00 – 424,40	Não foram encontrados nos bancos de dados

Diante de todas essas possibilidades, a clavamicina A (Figura 10) é descrita como um composto antifúngico.

Figura 10. Estrutura da clavamicina A (CAS: 103059-93-4) – adaptado de Naegeli et al. (1986)

A clavamicina A é um peptídeo da classe dos β -lactâmicos e sua produção é relatada apenas para a espécie de *Streptomyces hygroscopicus*, como inibidor de crescimento de fungos unicelulares e pluricelulares, sendo inativo contra bactérias (KING et al., 1986). Sua massa molar exata é $414,371 \text{ g mol}^{-1}$ e no espectro de massas de baixa resolução, descrito por Naegeli et al. (1986), observa-se um pico com m/z 415 Da, referente ao $[M+H]^+$.

O pico com m/z 415,3032 Da pode ser observado como o pico mais intenso no espectro de massas de alta resolução, no modo positivo (Figura 11). Contudo, não foram encontradas informações sobre o padrão de fragmentação do composto na literatura.

Figura 11. Espectro de massas de alta resolução em modo positivo, referente ao composto com t_R 3,17 minutos

Para identificação do composto, é necessário o isolamento do(s) composto(s) ativo(s) e a utilização de técnicas de ressonância magnética nuclear para comparação com os valores de deslocamento do(s) composto(s) relatado(s) na literatura e determinação da estrutura do(s) composto(s) encontrado(s) neste estudo.

6.4.3. Fluxograma summarizando os procedimentos do estudo químico

Figura 12. Esquema do estudo químico dos metabólitos secundários do isolado *Streptomyces fulvissimus* (A32) com atividade antimicrobiana. Em destaque as frações ativas: atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*; atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi*; atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. m=massa do extrato/fração.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, 23 linhagens de actinobactérias foram isoladas de amostras de duas ilhas do litoral norte de São Paulo, Alcatrazes e Palmas. Dentre os meios utilizados para o isolamento, o meio ácido-húmico foi o que obteve o maior número de isolados, provavelmente por ter o ácido-húmico do solo como única fonte de carbono e nitrogênio.

A maioria das actinobactérias isoladas foram identificadas molecularmente como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apenas uma foi identificada como pertencente ao gênero *Amycolatopsis*. Apesar de não terem sido isolados gêneros diversos, foram isoladas 12 espécies diferentes de *Streptomyces*, com maior frequência da espécie *S. lunalinharesii* (6 isolados). As espécies de *S. lactacystinicus*, *S. lunalinharesii* e *S. manipurensis* ainda são pouco conhecidas na literatura, sendo este o primeiro trabalho a investigar o potencial antimicrobiano.

Para explorar o potencial metabólito, os isolados foram crescidos em quatro meios de cultivo: Czapek, BD, R5 e Meio B. As fontes nutricionais influenciaram na produção de compostos bioativos, principalmente para os isolados de *Streptomyces fulvissimus* (A32) e *S. lunalinharesii* (A42B e A54A); que produziram compostos bioativos em um único meio de cultivo. Os isolados *S. michiganensis* (A3), *S. exfoliatus* (A20) e *S. albospinus* (A23), que produziram compostos antimicrobianos em mais de um meio de cultivo, também sofreram influência das fontes nutricionais, visto que os compostos antifúngicos foram produzidos em um único meio de cultivo. Com isso, conclui-se que variar as fontes nutricionais é de grande importância para a exploração da produção de metabólitos secundários, pois cada micro-organismo expressa o seu potencial sob diferentes condições.

Os isolados foram avaliados para detecção de genes que codificam para PKS-I e NRPS. Os genes de PKS-I foram detectados por dois conjuntos de iniciadores, onde 73,9% dos isolados foram positivos para o conjunto KSF/KSR e 30,4% positivos para o conjunto K1F/M6R. Para os genes de NRPS, foi utilizado o conjunto de iniciadores A3F/A7R e foi possível detectar que 47,8% dos isolados possuem esses genes. A detecção de genes de PKS-I e NRPS é uma indicação do potencial genético desses micro-organismos para a produção de metabólitos secundários, que podem ser explorados em outros testes e expressos se houver otimização do cultivo.

Com base nos bioensaios e na detecção de genes das vias biossintéticas, o isolado *Streptomyces fulvissimus* (A32) foi escolhido para investigação do perfil químico dos metabólitos. O resultado obtido da cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de massas, sugere que os compostos antibacterianos das frações ativas podem pertencer à classe

dos benzenóides, quinonas ou peptídeos, enquanto que os compostos antifúngicos podem pertencer à classe dos β -lactâmicos.

No entanto, o isolamento bioguiado do(s) composto(s) ativo se faz necessário para a identificação inequívoca.

8. CONCLUSÃO

Estudos químicos e biológicos de actinobactérias isoladas de ilhas são escassos no Brasil, sendo este o primeiro relato de atividade antimicrobiana dos metabólitos obtidos de actinobactérias da Ilha de Alcatrazes e da Ilha das Palmas. Este trabalho apresenta contribuição científica sobre actinobactérias do Brasil e seu potencial de compostos com aplicação na área agronômica e médico-farmacológica.

REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A.N. **Brasil, paisagens de exceção: o litoral e o Pantanal mato-grossense, patrimônios básicos**. São Paulo: Ateliê Editorial, 2006
- ABBAS, S.; SUBHAN, M.; DURRANI, F.; MEHMOOD, S.; KHAN, H.; HAMEED, A. Biosynthesis of antibiotic through metabolism of actinomycetes strain MH-9 through shake flask fermentation. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 26, n.1, p. 7-18, 2010
- ÁLVAREZ-PÉREZ, J.M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; COBOS, R.; OLEGO, M.Á.; IBÁÑEZ, A.; DÍEZ-GALÁN, A.; GARZÓN-JIMENO, E.; COQUE, J.J.R. Using endophytic and rhizospheric actinobacteria from grapevine plants to reduce fungal graft infections in nurseries that lead to young grapevine decline. **Applied and environmental microbiology**, p.AEM. 01564-17, 2017
- ÂNGELO, S. **Ilhas do Litoral Paulista**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente (Série Documentos), 1989
- ATLAS, R.M. **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, 1993
- AYUSO-SACIDO, A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v.49, n.1, p.10–24, 2005
- BALTZ, R.H. MbtH homology codes to identify gifted microbes for genome mining. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.41, n.2, p.357-369, 2014
- BALTZ, R.H.; MCHENNEY, M.A.; CANTWELL, C.A.; QUEENER, S.W.; SOLENBERG, P.J. Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.71, n.1, p.179–187, 1997
- BARAL, B.; AKHGARI, A.; METSÄ-KETELÄ, M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v.3, n.1, p.163-178, 2018
- BARKA, E.A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, G.P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.80, n.1, p.1-43, 2016
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966

- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v.58, p.1-26, 2005
- BERTANI, R.; MORI, A.; FUKUSHIMA, C.S. Spiders of the São Paulo state islands, Brazil: redescription of *Stenoterommata crassimana* (Mello-Leitão, 1923) n. comb. (Araneae, Nemesiidae). **Zootaxa**, v.4363, n.2, p.237-248, 2017
- BISHOP, A.; FIELDING, S.; DYSON, P.; HERRON, P. Systematic insertional mutagenesis of a Streptomycete genome: a link between osmoadaption and antibiotic production. **Genome Research**, v.14, n.5, p.893–900, 2004
- BULL, A.T.; STACH, J.E.M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends in microbiology**, v.15, n.11, p.491-499, 2007
- CASTELLANI, A. Variability of mold culture of fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p.225, 1939
- CAO, H.; ZHANG, X.; YANG, P.; PU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; TAO, Y.; FANG, F.; LI, Y.; REN, C.; ZHANG, Z.; LIU, H.; DING, J. Method for inducing virus vector into cattle somatic cell. **Patente número CN 102358891**, 2012
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Jr. Chemotherapy and the war on cancer. **Natural Reviews Cancer**, v.5, n.1, p.65–72, 2005
- CHAUDHARY, H.S; SONI, B.; SHRIVASTAVA, A.R.; SHRIVASTAVA, S. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n.8, p.S83-S94, 2013
- CHEN, Z.; HAO, J.; WANG, L.; WANG, Y.; KONG, F.; ZHU, W. New α -glucosidase inhibitors from marine algae-derived *Streptomyces* sp. OUCMDZ-3434. **Scientific reports**, v.6, p.20004, 2016
- CHEVAL, P.; SIAH, A.; BOMBLE, M.; POPPER, A.D.; REIGNAULT, P.; HALAMA, P. Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. **Crop Protection**, v.92, p.131–133, 2017
- CHUN, J. PHYDIT version 3.1. URL <http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit>, 2001
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement*. **CLSI document M100-S21**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011
- COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BOHNERT, H.U.; LEBRUN, M.H. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v.112, n.2, p.207-215, 2008

- COSTA, E.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; ARAUJO, S.A.C.; ROLIM, B.N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v.19, n.2, p.111-122, 2009
- DANG, T.; SÜSSMUTH, R.D. Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use. **Accounts of chemical research**, v.50, n.7, p.1566-1576, 2017
- DAS, R.; ROMI, W.; DAS, R.; SHARMA, H.K.; THAKUR, D. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. **BMC microbiology**, v.18, n.1, p.71, 2018
- DORRESTEIN, P. C.; KELLEHER, N. L. Dissecting non-ribosomal and polyketide biosynthetic machineries using electrospray ionization Fourier-Transform mass spectrometry. **Natural Product Reports**, v.23, n.6, p.893-918, 2006
- EDLUND, A.; LOESGEN, S.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Geographic distribution of secondary metabolite genes in the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00611-11, 2011
- FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v.39, n.4, p.783–791, 1985
- FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. **Annual Review of Microbiology**, v.58, n.1, p.453-488, 2004
- FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. **Chemical Reviews**, v.106, n.8, p.3468-3496, 2006
- FRANCINI, B.R.; RAMOS, R.R. Butterflies of Alcatrazes Island, São Paulo State, Brazil (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea). **Check List**, v.10, n.1, p.28–32, 2014
- GANDOTRA, S.; BISHT, G.R.S.; SAHARAN, B.S. Antifungal activity of endophytic actinomycetes (*Streptomyces*) against *Candida* species. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v.1, n.4, p.375-378, 2012
- GARCIA, G.D.; ROMERO, M.F.; PEREZ, B.J.; GARCIA, D.T. Thiodepsipeptide isolated from a marine actinomycete WO9527730. **Patente número US5681813**, 1999
- GONG, Y.; BAI, J.L.; YANG, H.T.; ZHANG, W.D.; XIONG, Y.W.; DING, P.; QIN, S. Phylogenetic diversity and investigation of plant growth-promoting traits of actinobacteria in coastal salt marsh plant rhizospheres from Jiangsu, China. **Systematic and applied microbiology**, v.41, n.5, p.516-527, 2018
- GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by

- endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological research**, v.169, n.1, p.59-65, 2014
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In **Nucleic acids symposium series**, v.41, n.41, p.95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999
- HASSAN, S.S.; SHAIKH, A.L. Marine actinobacteria as a drug treasure house. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.87, n.1, p.46-57, 2017
- HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, v.65, n.5, p.501-509, 1987
- HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition**, v.48, n.26, p.4688-4716, 2009
- HILL, A. M. The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. **Natural Products Reports**, v.23, n.2, p.256–320, 2006
- HOPWOOD, D.A.; MALPARTIDA, F.; KIESER, H.M.; IKEDA, H.; DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B.A.M.; FLOSS, H.G.; ŌMURA, S. Production of ‘hybrid’ antibiotics by genetic engineering. **Nature**, v.314, n.6012, p.642-644, 1985
- HUG, J.; BADER, C.; REMŠKAR, M.; CIRNSKI, K.; MÜLLER, R. Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes. **Antibiotics**, v.7, n.2, p.44, 2018
- ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2017). **Plano de Manejo da Estação Ecológica Tupinambás e Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago de Alcatrazes (Volume 1 – Diagnóstico)**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2017. 160 p.
- IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas. **Relatório Zero. Plano de Bacias do Litoral Norte**. Brasília: IPT, 2000
- IZUMIKAWA, M.; CHENG, Q.; MOORE, B.S. Priming type II polyketide synthases via a type II nonribosomal peptide synthetase mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.5, p.1428, 2006
- JANSO, J.E.; CARTER, G.T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. **Applied and environmental microbiology**, v.76, n.13, p.4377-4386, 2010

- JIANG, Y.; LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, C. Isolation and cultivation methods of Actinobacteria. In: **Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications**. InTech, 2016
- JOG, R.; NARESHKUMAR, G.; RAJKUMAR, S. Plant growth promoting potential and soil enzyme production of the most abundant *Streptomyces* spp. from wheat rhizosphere. **Journal of applied microbiology**, v.113, n.5, p.1154-1164, 2012
- KACZOR, A.A.; POLSKI, A.; SOBÓTKA-POLSKA, K.; PACHUTA-STEĆ, A.; MAKARSKA-BIALOKOZ, M.; PITUCHA, M. Novel antibacterial compounds and their drug targets-successes and challenges. **Current medicinal chemistry**, v.24, n.18, p.1948-1982, 2017
- KARPIŃSKI, T.; ADAMCZAK, A. Anticancer activity of bacterial proteins and peptides. **Pharmaceutics**, v.10, n.2, p.54, 2018
- KIM, M.; LEE, S.J.; SHIN, S.; PARK, K.S.; PARK, S.Y.; LEE, C.H. Novel natural killer cell-mediated cancer immunotherapeutic activity of anisomycin against hepatocellular carcinoma cells. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.10668, 2018
- KIM, O.S.; CHO, Y.J.; LEE, K.; YOON, S.H.; KIM, M.; NA, H.; PARK, S.C.; JEON, Y.S.; LEE, J.H.; YI, H.; WON, S.; CHUN, J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.62, n.3, p.716-721, 2012
- KING, H.D.; LANGHÄRIG, J.; SANGLIER, J.J. Clavamycins, new clavam antibiotics from two variants of *Streptomyces hygroscopicus*. I. Taxonomy of the producing organisms, fermentation, and biological activities. **The Journal of antibiotics**, v.39, n.4, p.510-515, 1986
- KODJA, G.; GIBRAN, F.Z.; LEITE, K.L.; MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B. **Alcatrazes**. São Paulo: Editora Cultura Sub, 2012
- KOMAKI, H.; SAKURAI, K.; HOSOYAMA, A.; KIMURA, A.; IGARASHI, Y.; TAMURA, T. Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. **Scientific reports**, v.8, n.1, p.6888, 2018
- KOMAKI, H.; TAMURA, T.; ICHIKAWA, N.; OGUCHI, A.; HAMADA, M.; SUZUKI, K.I.; FUJITA, N. Genome-based analysis of type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in a novel strain taxonomically close to the genus *Salinispora*. **Journal of Antibiotics**, v.68, n.12, p.767, 2015
- KOTASTHANE, A.; AGRAWAL, T.; KUSHWAH, R.; RAHATKAR, O. V. In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their

- response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. **European Journal of Plant Pathology**, v.141, n.3, p.523-543, 2015
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v.33, n.7, p.1870-1874, 2016
- KUMAR, V.; BHARTI, A.; GUPTA, V.K.; GUSAIN, O.; BISHT, G. S. Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.3, p.871-880, 2012
- KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964
- LAM, K.S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, n.3, p.245-251, 2006
- LAMBALOT, R. H.; GEHRING, A. M.; FLUGEL, R. S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M. A.; REID, R.; KHOSLA, C.; WALSH, C. T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. **Chemistry & Biology**, v.3, n.11, p.923-936, 1996
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p.115-175, 1991
- LATORRE, D.O.; SILVA, I.P.F.; JUNIOR, J.F.E.; PUTTI, F.F.; SCHMIDT, A.P.; LUDWIG, R. Herbicidas inibidores da glutamina sintetase/Herbicide inhibitors glutamine synthetasei. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v.7, n.3, p.134-141, 2013
- LEE, L.H.; ZAINAL, N.; AZMAN, A.S.; ENG, S.K.; GOH, B.H.; YIN, W.F.; MUTALIB, N.S.A.; CHAN, K.G. Diversity and antimicrobial activities of actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. **The Scientific World Journal**, v.2014, 2014
- LEE, S.D.; HAH, Y.C. *Amycolatopsis albidoflavus* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.51, n.2, p.645-650, 2001
- LEFEMINE, D.V.; DANN, M.; BARBATSCHI, F.; HAUSMANN, W.K.; ZBINOVSKY, V.; MONNIKENDAM, P.; ADAM, J.; BOHONOS, N. Isolation and characterization of mitromycin and other antibiotics produced by *Streptomyces verticillatus*. **Journal of the American Chemical Society**, v.84, p.3184-5, 1962
- LETEK M.; FIUZA, M.; VILLADANGOS, A.F.; MATEOS, L.M.; GIL, J. Cytoskeletal proteins of actinobacteria. **International Journal of Cell Biology**, v.2012, p.1-10, 2012

- LETUNIC, I.; YAMADA, T.; KANEHISA, M.; BORK, P. iPath: Interactive exploration of biochemical pathway and networks. **Trends in Biochemical Sciences**, v.33, n.3, p.101-103, 2008
- LIU, Z.; LOZUPONE, C.; HAMADY, M.; BUSHMAN, F.D.; KNIGHT, R. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. **Nucleic acids research**, v.35, n.18, p.e120, 2007
- LUEDERWALDT, H.; FONSECA, J.P da. A ilha de alcatrazes. **Revista do Museu Paulista**, v. 13, p. 441-512, 1923
- LYDON, J.; DUKE, S.O. Inhibitors of glutamine biosynthesis, In: SINGH, B.K, **Plant amino acids: Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1999
- MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3ª edição. *Lippincott Williams and Wilkins*, USA, 2000
- MACÍAS-SILVA, M.; VÁZQUEZ-VICTORIO, G.; HERNÁNDEZ-DAMIÁN, J. Anisomycin is a multifunctional drug: more than just a tool to inhibit protein synthesis. **Current Chemical Biology**, v.4, n.2, p.124-132, 2010
- MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.98, n.2, p.143-150, 2010
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006
- MURIMA, P.; MCKINNEY, J.D.; PETHE, K. Targeting bacterial central metabolism for drug development. **Chemistry & biology**, v.21, n.11, p.1423-1432, 2014
- MUSCAT, E.; SAVIOLLI, Y.J.; COSTA, A.; CHAGAS, A.C.; EUGÊNIO, M.; ROTENBERG, L.E.; OLMOS, F. Birds of the Alcatrazes archipelago and surrounding waters, São Paulo, southeastern Brazil. **Check List**, v.10, n.4, p.729–738, 2014
- NAEGELI, H.U.; LOOSLI, H.R.; NUSSBAUMER, A. Clavamycins, new clavam antibiotics from two variants of *Streptomyces hygroscopicus*. II. Isolation and structures of Clavamycins A, B and C from *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 15846, and of Clavamycins D, E and F from *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 15879. **The Journal of antibiotics**, v.39, n.4, p.516-524, 1986
- NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B.S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Product Reports**, v.26, n.11, p.1362-1384, 2009
- NG, Z.Y.; TAN, Y.A. Selective isolation and characterization of novel members of the family *Nocardiopsaceae* and other actinobacteria from a marine sediment of Tioman Island. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.111, n.1, p.727-742, 2018

- NIMAICHAND, S.; ZHU, W.Y.; YANG, L.L.; MING, H.; NIE, G.X.; TANG, S. K.; NINGTHOUJAM, D.S.; LI, W.J. *Streptomyces manipurensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a limestone deposit site in Manipur, India. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.102, n.1, p.133-139, 2012
- OMURA, S.; CRUMP, A. Ivermectin: panacea for resource-poor communities? **Trends in Parasitology**, v.30, n.9, p.445-455, 2014
- PASSARI, A.K.; MISHRA, V.K.; SAIKIA, R.; GUPTA, V.K.; SINGH, B.P. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in microbiology**, v 6, p.273, 2015
- PENTEADO, M. Arquipélago dos Alcatrazes: um modelo para monitoramento de biodiversidade. Resumo do **III Congresso Latino-Americano de Ecologia e IX Congresso de Ecologia do Brasil**, p.10–17, 2009
- PETRINI, O. Fungal Endophytes in Tree Leaves. In: Microbial Ecology of Leaves (eds. J. H. Andrews; S.S.Hirano). **Springer**. p.179-197, 1991
- PIMENTEL, C.P.V.; FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **O Biológico**, v.55, p.27-33 1989
- QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.3, p.457-473, 2011
- QUINTERO, M.; VELÁSQUEZ, A.; JUTINICO, L.M.; JIMÉNEZ-VERGARA, E.; BLANDÓN, L.M.; MARTINEZ, K.; LEE, H.S.; GÓMEZ-LEÓN, J. Bioprospecting from Marine–Coastal Sediments of Colombian Caribbean: Screening and Study of Antimicrobial Activity. **Journal of applied microbiology**, v.125, n.1, p.753-765, 2018
- RAMIREZ-MARES, M. V.; HERNANDEZ-CARLOS, B. Plant-Derived Natural Products from the American Continent for the Control of Phytopathogenic Fungi: a Review. **Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences**, v. 3, n. 4, p. 96–118, 2015
- RASHAD, F.M.; EL-NASSER, N.H.A.; DAWOUD, I. E.; FATHY, H.M.; ALI, A.M.; MOTAWA, F.H. In-vitro antimicrobial and anticancer activities of methyl nonactate and methyl homononactate produced by Egyptian isolates *Streptomyces fulvissimus* FHM275 and *Streptomyces pratensis* FHM572. **Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**, v.9, n.2, p.1069-1090, 2018

- RIZK, M.; ABDEL-RAHMAN, T.; METWALLY, H. Factors affecting growth and antifungal activity of some *Streptomyces* species against *Candida albicans*. **Journal of food, agriculture & environment**, 2007
- 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, 2015
- SALOMON, C.E.; MAGARVEY, N.A.; SHERMAN, D.H. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. **Natural product reports**, v.21, n.1, p.105-121, 2004
- SANCHEZ, J.F.; CHIANG, Y.M.; WANG, C.C. Diversity of Polyketide synthases found in the *Aspergillus* and *Streptomyces* genomes. **Molecular Pharmaceutics**, v.5, n.2, p.226-233, 2008
- SHIRLING, E.T.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v.16, n.3, p.313-340, 1966
- SIDDHARTH, S.; VITTAL, R. Evaluation of Antimicrobial, Enzyme Inhibitory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Partially Purified Volatile Metabolites of Marine *Streptomyces* sp. S2A. **Microorganisms**, v.6, n.3, p.72, 2018
- SILVA, L.J.; TAKETANI, R.G.; MELO, I.S.; GOODFELOW, M.; ZUCCHI, T.D. *Streptomyces araujoniae* sp. nov.: an actinomycete isolated from a potato tubercule. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.103, n.6, p.1235-1244, 2013
- SOBIN, B.A.; TANNER JR, F.W. Anisomycin, A new anti-protozoan antibiotic. **Journal of the American Chemical Society**, v.76, n.15, p.4053-4053, 1954
- SOLANKI, R.; KHANNA, M.; LAL, R. Bioactive compounds from marine actinomycetes. **Indian journal of microbiology**, v.48, n.4, p.410-431, 2008
- SOUZA, R.F.; COELHO, R.R.R.; MACRAE, A.; SOARES, R.M.A.; NERY, D.D.C.M.; SEMÊDO, L.T.D.A.S.; ALVIANO, C.S.; GOMES, R.C. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.58, n.12, p.2774-2778, 2008
- STEIN, T.; VATER, J.; KRUF, V.; OTTO, A.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; FRANKE, P.; PANICO, M.; MCDOWELL, R.; MORRIS, H. R. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.26, p.15428-15435, 1996
- STRIEKER, M.; TANOVIĆ, A.; MARAHIEL, M.A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. **Current opinion in structural biology**, v.20, n.2, p.234-240, 2010

- SUN, M.; XING, F.; PAN, S.; DI, J.; ZENG, S.; LIU, J. Low-dose anisomycin is sufficient to alter the bio-behaviors of Jukart T cells. **Open Life Sciences**, v.8, n.12, p.1230-1240, 2013
- TAKÉ, A.; MATSUMOTO, A.; ŌMURA, S.; TAKAHASHI, Y. *Streptomyces lactacystinicus* sp. nov. and *Streptomyces cyslabdanicus* sp. nov., producing lactacystin and cyslabdan, respectively. **The Journal of antibiotics**, v.68, n.5, p.322-327, 2015
- TAMURA, K; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, n.1, p.512-526, 1993
- TEAM, R CORE. R: A language and environment for statistical computing. **Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016, 2017**
- THAMPI, A.; BHAI, R.S. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). **Biological Control**, v.109, p.1-13, 2017
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994
- TORTORA, G.J; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012
- TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, p.327–338, 1999
- UNDABARRENA, A.; UGALDE, J. A.; SEEGER, M.; CÁMARA, B. Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. **PeerJ**, v.5, p.e2912, 2017
- VILA-FARRES, X.; CHU, J.; INOYAMA, D.; TERNEI, M.A.; LEMETRE, C.; COHEN, L.J.; CHO, W.; REDDY, B.V.B.; ZEBROSKI, H.A.; FREUNDLICH, J.S.; PERLIN, D.S.; BRADY, S.F. Antimicrobials inspired by nonribosomal peptide synthetase gene clusters. **Journal of the American Chemical Society**, v.139, n.4, p.1404-1407, 2017
- WANG, H.; SIVONEN, K.; FEWER, D.P. Genomic insights into the distribution, genetic diversity and evolution of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. **Current opinion in genetics & development**, v.35, p.79-85, 2015

- WEBER, T.; CHARUSANTI, P.; MUSIOL-KROLL, E.M.; JIANG, X.; TONG, Y.; KIM, H.U.; LEE, S.Y. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. **Trends in Biotechnology**, v.33, n.1, p.15-26, 2015
- WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. **Journal of General Microbiology**, v.38, n.2, p.251–261, 1965
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, n.1, p.438-450, 2001
- WU, Q.; CHEN, J.; LI, X.; CHEN, S.; WANG, H. Advances in antimicrobial natural products derived from marine actinomycetes. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v.14, n.6, p.501-515, 2017
- XING, F.; YU, Z.; LIU, J.; DI, J.; ZENG, S.; CHEN, D.; WANG, J. Anisomycin inhibits the behaviors of T cells and the allogeneic skin transplantation in mice. **Journal of Immunotherapy**, v.31, n.9, p.858-870, 2008
- XU, F.; WANG, S.; LI, Y.; ZHENG, M.; XI, X.; CAO, H; CUI, X.; GUO, H; HAN, C. Yield enhancement strategies of rare pharmaceutical metabolites from endophytes. **Biotechnology letters**, v.40, n.1, p.797-807, 2018
- YOO, Y.J.; KIM, H.; PARK, S.R.; YOON, Y.J. An overview of rapamycin: from discovery to future perspectives. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.44, n.4-5, p.537-553, 2017
- YOON, V.; NODWELL, J.R. Activating secondary metabolism with stress and chemicals. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.41, n.2, p.415-424, 2014
- ZHANG, H.; ZHANG, W.; JIN, Y.; JIN, M.; YU, X. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.93, n.3, p.241-248, 2008
- ZHANG, S. Integrated Approaches for Discovery Novel Drugs from Microbial Natural Products. In: Zhang L. and Demain AL. (Ed.), **Natural Products: drugs Discovery and Therapeutic Medicine**, Human Press Inc., Totowa, NJ, 2005
- ZHU, H.; SWIERSTRA, J.; WU, C.; GIRARD, G.; CHOI, Y. H.; VAN WAMEL, W.; SANDIFORD, S.K.; VAN WEZEL, G.P. Eliciting antibiotics active against the ESKAPE pathogens in a collection of actinomycetes isolated from mountain soils. **Microbiology**, v.160, n.8, p.1714-1725, 2014

ANEXOS

ANEXO A. Composição da solução de vitaminas do meio ácido húmico

Solução de vitaminas	
Tiamina	0,5 mg
Pantotenato de cálcio	0,5 mg
Meso-inositol	0,5 mg
Ácido nicotínico	0,5 mg
Ácido p-aminobenzóico	0,5 mg
Piridoxina	0,5 mg
Riboflavina	0,5 mg
Biotina	0,25 mg
Água destilada	1000 mL

ANEXO B. Composição das soluções do meio de cultivo vitamina-arginina-ágar

Solução de elementos traço	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	50 mg mL ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	50 mg
MgSO ₄ .4H ₂ O	50 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
Água destilada	50 mL
Solução de vitaminas	
Tiamina	100 mg
Pantotenato de cálcio	25 mg
Meso-inositol	25 mg
Ácido nicotínico	25 mg
Ácido p-aminobenzóico	25 mg
Piridoxina	25 mg
Riboflavina	25 mg
Biotina	12,5 mg
Água destilada	50 mL

ANEXO C. Ensaio antibacteriano dos extratos brutos positivos no pré-ensaio, reavaliados por difusão em disco de papel na concentração de 1 mg mL⁻¹

Isolado	Meio de cultivo	Patógeno						
		<i>S. aureus</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. tify</i>
<i>S. michiganensis</i> (A3)	BD
	Meio B
<i>S. exfoliatus</i> (A20)	BD
	R5
	Meio B

(continua)

(continuação) ANEXO C - Ensaio antibacteriano dos extratos brutos positivos no pré-ensaio, reavaliadas por difusão em disco de papel na concentração de 1 mg mL⁻¹

Isolado	Meio de cultivo	Patógeno						
		<i>S. aureus</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. tiphy</i>
<i>S. fulvissimus</i> (A32)	Meio B
	Czapek
	BD
	R5
	Meio B
<i>S. albospinus</i> (A23)	Czapek
	BD
	R5
	Meio B
	Meio B

ANEXO D. Ensaio antifúngico dos extratos brutos positivos no pré-ensaio, reavaliados por difusão em disco de papel na concentração de 1 mg mL⁻¹

Isolado	Meio de cultivo	Patógeno		
		<i>R. solani</i>	<i>S. rolfsii</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
<i>S. michiganensis</i> (A3)	R5
<i>S. exfoliatus</i> (A20)	Meio B
<i>S. albospinus</i> (A23)	R5
<i>S. fulvissimus</i> (A32)	Meio B
<i>S. lunalinharesii</i> (A42B)	Czapek
<i>S. lunalinharesii</i> (A54A)	Meio B

ANEXO E. Cromatograma da fração Aq4A32b4, ativa no bioensaio antifúngico

ANEXO F. Espectros de massa de alta resolução de todas as bandas cromatográficas presentes apenas na fração Aq4A32b4 (bioativa no ensaio antifúngico)

Aq4A32b4 586 (5.166) Cm (586)

1: TOF MS ES+
5.18e5

Aq4A32b4 620 (6.064)

1: TOF MS ES+
1.29e6

Aq4A32b4 692 (7.953)

1: TOF MS ES+
5.88e5