



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias
de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina**

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências
e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Ciências, Área: Química

Ribeirão Preto

2016

ANA PAULA FERRANTI PETI

**Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias
de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina**

Tese apresentada a Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Ciências, Área: Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Aberto Beraldo de Moraes

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Peti, Ana Paula Ferranti

Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina. Ribeirão Preto, 2016.

131 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Moraes, Luiz Alberto Beraldo de.

1. Espectrometria de massas. 2. Produtos naturais. 3. Actinobactérias 4. Mastite Bovina. 5. Fracionamento guiado por bioensaio.

Nome: PETI, Ana Paula Ferranti

Título: Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

- Prof Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

FFCLRP - USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 2

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 3

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 4

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

- PROF 5

Instituição

Julgamento: _____

Assinatura: _____

A meus pais, Cleonice e Paulo, assim como ao meu irmão Julio, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Isso significou segurança e a certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de chegar até aqui, iluminando sempre o meu caminho.

Agradeço ainda a minha família por toda a compreensão, dedicação e paciência que mostraram em todos esses anos. Àquelas que sempre estiveram presentes, minhas tias Cleusa, Cleide e Cléia apoiando todos os meus sonhos e me dando suporte para transpor qualquer obstáculo que aparecesse.

A todos os que contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho, em especial meus irmãos científicos Ana Flávia, Eduardo, Fernanda e Julia que ao longo do caminho se tornaram parte indispensável de minha vida. Em especial aos meus pupilos Izadora e Geraldo, por terem me auxiliado nos experimentos e me concedido a oportunidade de ensiná-los o pouco do que sei. As amizades de todos vocês foram essenciais para tornar meus dias mais leves e produtivos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto de Moraes, que sempre se mostrou um grande mestre e amigo, dedicando-se não só ao ensino do conhecimento científico, mas nos auxiliando em quaisquer situações. Sua participação foi fundamental para que este trabalho se concretizasse.

Aos colaboradores Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos da USP *campus* Pirassununga, Prof. Dr. Itamar Soares de Mello do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa em Jaguariúna e aos funcionários do DQ-FFCLRP Vinícius Palaretti e Lâmia Melloni Antunes e Silva.

Ao CNPq e ao Departamento de Química da FFCLRP - USP.

"Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim"

Isaac Newton

Resumo

PETI, A. P. F. Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Neste trabalho foi explorado o potencial das actinobactérias como produtoras de agentes antimicrobianos contra bactérias causadoras da mastite bovina. Para este fim, foram otimizados dois diferentes bioensaios um de antagonismo e o outro de antibiose, contra 13 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas relacionadas a mastite bovina. Através do bioensaio de antagonismo 120 actinobactérias foram triadas, sendo 55% delas consideradas ativas. Para o ensaio de antibiose foram triados 70 extratos brutos e 60% mostram a formação de halos de inibição. Os extratos brutos Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25 foram considerados os mais promissores dentre todos os extratos estudados. Esses extratos brutos foram submetidos a estudos de desreplcação empregando LC-PAD-MS/MS e isolamento guiado por bioensaio para a identificação de seus metabolitos ativos. Os extratos Caat 1-54 e Caat 2-63 foram ativos principalmente contra as linhagens de bactérias Gram-positivas e a ação antimicrobiana observada foi atribuída a presença da lisolipina I e actinomicina D e V, respectivamente. O extrato Caat 8-25 foi ativo tanto contra bactérias Gram-positivas como para as Gram-negativas, sendo a oxitetraciclina associada a atividade contra as linhagens Gram-positivas e a herbicidina B ativo contra linhagens Gram-negativas. O estudo de desreplcação por LC-MS/MS também possibilitou a identificação de outros metabolitos secundários presentes nos diferentes extratos estudados. Para o extrato Caat 2-63 foi identificada a presença de outros peptídeos provenientes da via biossintética da actinomicina D e, no extrato bruto Caat 8-25 também foi identificado herbicidina F. Um estudo de mudança no metabolismo também foi realizado para a actinobactérias Caat 1-54 produtora de lisolipina. Através da suplementação de íons brometo no meio de cultivo em diferentes períodos da fermentação foi observada a produção de um análogo da lisolipina com bromo e da lisolipina clorada e bromada. Estudos de DESI-TLC-MS associado a bioautografia em TLC também foram aplicados para análise do extrato bruto Caat 2-63 e mostraram a potencialidade desta metodologia para acelerar a identificação de compostos ativos, pois a análise por espectrometria de massas na região da placa cromatográfica correspondente ao halo de inibição revelou a presença de actinomicina D e V, as quais já haviam sido associadas a atividade antimicrobiana deste extrato bruto. Assim os resultados obtidos nesta tese confirmam o grande potencial das actinobactérias como fonte promissoras de compostos bioativos e que a espectrometria de massas empregada nos seus diferentes modos de análise acelera o processo de identificação desses compostos.

Abstract

PETI, A. P. F. Identification of antimicrobials compounds produced by actinomycetes from soil with potential application to control bovine mastitis. Thesis (Doctorate) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

In this work were used two different bioassays to evaluate the antimicrobial potential of some actinomycetes against bacteria that cause bovine mastitis. For this propose an antagonism and antibiose assays were optimized against 13 Gram-positive and Gram-negative bacteria related with bovine mastitis. Through antagonism bioassay 120 actinomycetes were screened and 55% were considered active. In disk diffusion bioassay, 70 crude extracts were screened and 60% showed inhibition zones. The crude extracts Caat 1-54, Caat 2-63 and Caat 8-25 were considered the most promising of all the extracts. Dereplication studies and fractionation guided by bioassay were procedure with this extracts to identify the actives metabolites. The extracts Caat 1-54 and Caat 2-63 were active against strains of Gram-positive bacteria and the antimicrobial effect was related to lysolipin I and actinomycin D and V, respectively. The extract Caat 8-25 was active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Oxytetracycline were associated with activity against Gram-positives strains and a herbicidin B was active against Gram-negative bacteria. Using dereplication strategies by LC-MS/MS others compounds were characterized in different crude extracts. The extract Caat 2-63 was also identified the presence of other peptides from the same biosynthetic pathway of actinomycin D and for crude extract Caat 8-25 were identified herbicidin F. In addition, studies of the shift in secondary metabolism carried out for actinobacteria Caat 1-54 (lysolipin producer). Culture medium supplementation by bromide ions at different stages of fermentation induce the production of bromine lysolipin analog and a chloro-bromine lysolipin. DESI-MS TLC studies associated with TLC bioautography were used to analyze a crude extract Caat 2-63. This study showed how this method could be used to accelerate the identification of active compounds, because mass spectrometry analysis *in situ* at bioautography inhibition zone showed the presence of actinomycin D and V, which had been associated with antimicrobial activity of this crude extract. Therefore, the results of this thesis confirm the potential of actinobacteria as bioactives compounds source and the importance of mass spectrometry experiments to accelerate the identification of these compounds.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estruturas químicas dos principais antibióticos empregados no tratamento da mastite bovina. 3
- Figura 2.** Estrutura química de antibióticos produzidos por actinobactérias. 6
- Figura 3.** Representação esquemática da comunicação química existente na rizosfera. Pode-se observar alelopatia em (a); atração de micro-organismos para colonização da rizosfera em (b), (c) e (d); a formação dos nichos após a colonização microbiana em (e) e (f); além de relação de parasitismo em (g) ⁴² 9
- Figura 4.** Estruturas químicas de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias de ambientes extremos. 10
- Figura 5.** Representação esquemática das etapas envolvidas no fracionamento guiado por bioensaio..... 11
- Figura 6.** Representação esquemática da metodologia de desreplicação, empregada para acelerar a identificação de metabólitos de interesse..... 16

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Mastite Bovina.....	1
1.2. Actinobactérias: Importância como produtoras de compostos com atividade antimicrobiana	4
1.3. Micro-organismos de rizosfera e ambientes extremos	7
1.4. Fracionamento guiado por bioensaio.....	11
1.5. Espectrometria de massas no processo de desreplicação	13
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. Conclusões.....	20
4. Referências Bibliográficas	23

1. Introdução

Identificação de agentes antimicrobianos produzidos por actinobactérias de solo com potencial aplicação no controle da mastite bovina

1. Introdução

1.1. Mastite Bovina

A mastite é definida como uma inflamação das glândulas mamárias, e pode ser decorrente de processos infecciosos ou não, acometendo os mais diversos organismos da classe dos mamíferos.¹ Há muitos micro-organismos, hospedeiros e fatores ambientais que influenciam o desenvolvimento da doença, sendo que algumas destas variáveis são comuns a todos os mamíferos doentes, enquanto outros são inerentes a cada das espécies acometidas pela mastite. Juntas, estas variáveis influenciam quais serão os agentes etiológicos mais prevalentes para cada caso, e ainda podem determinar as possíveis formas de transmissão entre os organismos infectados e as suas consequências para a saúde pública.²

Geralmente, a mastite bovina está associada a infecção bacteriana, entretanto é também correlacionada a invasão por fungos, leveduras e algas.³ As bactérias representam uma grande parcela dos agentes etiológicos desta doença e as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* são as causas mais comuns de infecções e têm se tornado um problema crescente nos rebanhos infectados.⁴ A mastite bovina afeta diretamente a economia mundial, pois a produção leiteira pode ser extremamente prejudicada quando há focos da infecção que não são contidos devido aos patógenos resistentes, o que pode levar a medidas extremas como, por exemplo, o sacrifício dos animais para controle da doença, além das perdas inerentes a má qualidade do leite obtido, bem como os gastos no tratamento dos animais infectados.^{5,6}

Os animais que apresentam mastite podem variar quanto ao número de quartos mamários infectados, bem como o patógeno envolvido na infecção, isto faz com que

processos inflamatórios com intensidades diferentes sejam observados, fato este que dificulta o tratamento da doença, uma vez que cada caso em particular pode responder de uma forma ao tratamento empregado.⁷

A mastite bovina pode apresentar-se de duas formas distintas: a) mastite subclínica, a qual é caracterizada pela alteração na contagem de células somáticas, diminuição da produção de leite e ausência de sinais externos, como inchaço e descoloração do úbere, secreção anormal e reações sistêmicas; e b) mastite clínica, onde há sinais evidentes de alterações do úbere e, principalmente, do leite. Outra forma de classificação da doença leva em conta a forma de contágio, a qual pode ocorrer do ambiente para o animal, chamada de mastite ambiental, ou de animal para animal, denominada mastite contagiosa.⁸

O tratamento da mastite deve ser baseado nas diretrizes nacionais e internacionais sobre o uso prudente de agentes antimicrobianos e, principalmente, no diagnóstico bacteriológico, uma vez que ele facilita a seleção do antibiótico mais adequado. Entretanto, quando o diagnóstico bacteriológico não está disponível o tratamento deve ser iniciado com base em dados do rebanho. Isto faz com que não haja um tratamento único para todos os casos, sendo necessária uma avaliação individual para determinação do procedimento mais eficiente, dificultando assim o tratamento da doença.⁹ O uso de antibióticos no combate a mastite bovina vem ocorrendo desde 1940, auxiliando na eliminação dos patógenos, defesa do hospedeiro e prevenção da doença. Atualmente, diversos antibióticos inspirados em produtos naturais têm sido empregados no tratamento da mastite, os quais pertencem principalmente as classes dos: a) β -lactâmicos, como penicilina G (1), ceftiofur (2), cloxacilina (3) e amoxicilina (4); b) aminoglicosídeos, tal qual a neomicina (5); c) tetraciclina, por exemplo oxitetraciclina (6); e d) lincosamidas, como a lincomicina (7), representadas na Figura 1.¹⁰⁻¹²

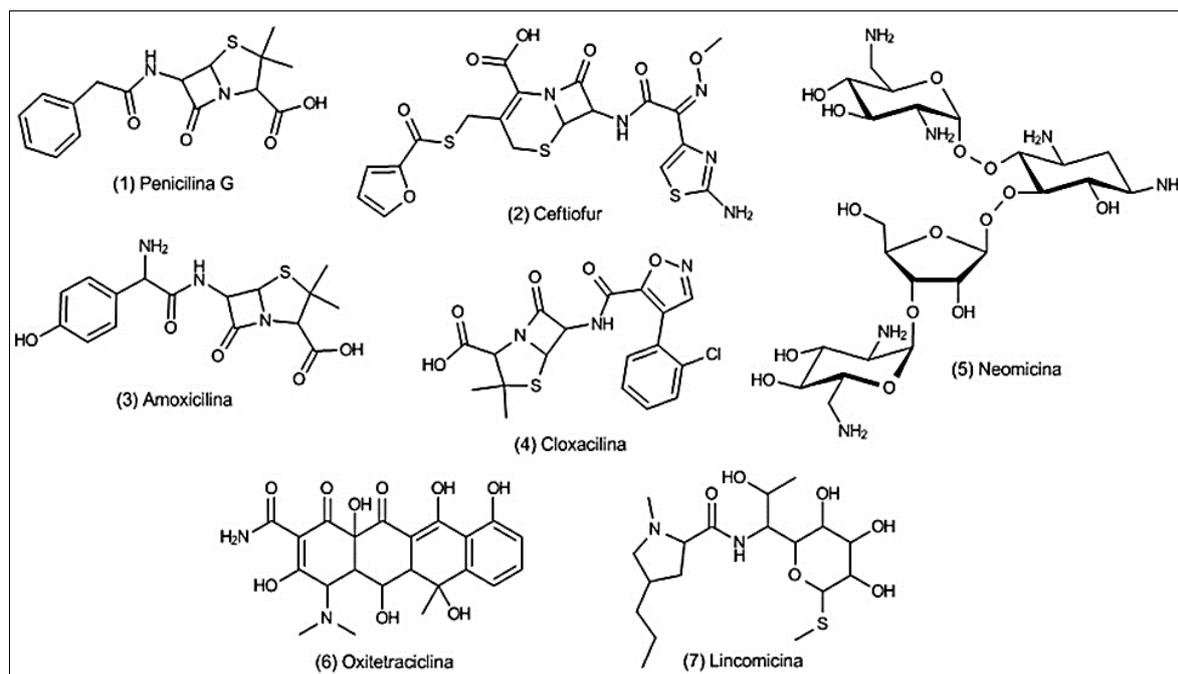


Figura 1. Estruturas químicas dos principais antibióticos empregados no tratamento da mastite bovina.

A mastite é uma doença infecciosa que leva a inúmeros custos quando acomete um rebanho, pois há perdas associadas aos custos de tratamento, abate e morte de animais, além da diminuição da produção e presença de resíduos de antibióticos no leite.¹³ Estimam-se perdas de produção entre 10 a 30% por problemas quanto a lactação, de acordo com os patógenos envolvidos, tempo de infecção, idade e nutrição do animal, bem como fatores genéticos.¹⁴ Assim, a mastite continua sendo um grande desafio para a indústria de laticínios no mundo todo, apesar da implementação de diversas estratégias de controle da doença. E, embora um declínio no número de casos reportados seja observado, uma mudança no quadro de patógenos tem sido observada, muitos dos quais estão associados ao surgimento de linhagens resistentes.^{15,16}

Tendo em vista tais fatores, a descoberta de novos antibióticos mais eficazes e seletivos para as linhagens envolvidas na mastite podem proporcionar tratamentos mais efetivos para bovinos, além de minimizar o risco de resíduos de antibióticos em leite e carne, contribuindo para a melhoria da saúde humana. Sendo assim, os produtos naturais microbianos destacam-se para a descoberta de novas moléculas com atividade antimastítica, uma vez que os

micro-organismos aparecem como uma promissora fonte de novos compostos a serem explorados devido à grande variedade de linhagens existentes, sendo que muitas delas ainda não foram descobertas, e pelo destaque na produção de um vasto número de metabólitos secundários bioativos, em especial as actinobactérias, pois foram responsáveis por avanços significativos na história do antibióticos.¹⁷

1.2. Actinobactérias: Importância como produtoras de compostos com atividade antimicrobiana

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas com elevada teor de citosina e guanina em seu DNA e constituem-se como um dos maiores filos do reino Bacteria. Elas são organismos procariotos, possuem organização filamentosa, sofrem diferenciação morfológica complexa e estão distribuídas principalmente nos ecossistemas aquáticos e terrestres. São caracterizadas também pela sua ampla diversidade de metabólitos secundário, responsável pela produção de cerca de dois terços de todos os antibióticos de uso clínico inspirados em produtos naturais (PN).¹⁸

Por mais de 70 anos, actinobactérias foram reconhecidas como importantes fontes de compostos naturais bioativos e dentre seus quase 18.000 compostos ativos conhecidos, mais de 10.000 foram descritos a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*, tornando a família Streptomycetaceae a principal representante deste filo.¹⁹ Atualmente mais de 200 medicamentos baseados em metabólitos produzidos por estes micro-organismos estão em ensaios clínicos ou aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), sendo utilizados para o tratamento de infecções, câncer, distúrbios do sistema imune, entre outros.²⁰

Em 1941, Waksman e Woodruff reportaram o primeiro isolamento de metabólito com atividade antibiótica produzido por actinobactérias, chamado actinomicina e, em 1942, foram

responsáveis pela descoberta de estreptotricina (8), isolada de uma linhagem de *Streptomyces*. Após dois anos, foi relatada a descoberta da estreptomomicina (9), permitindo que os tratamentos para a tuberculose fossem possíveis²¹ e, a partir de então, o termo antibiótico foi utilizado pela primeira vez por Waksman.²² Os resultados promissores para a atividade antimicrobiana dos compostos citados anteriormente, aliado ao desenvolvimento dos tratamentos a base de penicilina, fizeram com que os cientistas intensificassem a busca por antibióticos microbianos, especialmente aqueles produzidos pelo gênero *Streptomyces*, tornando as actinobactérias uma das fontes mais promissoras para a prospecção de antibióticos.²³

A produção da maioria dos antibióticos é específica da espécie, e estes metabólitos secundários são importantes para que as actinobactérias possam competir com outros organismos presentes no mesmo ambiente. Outro processo que contribui para a produção de antibióticos é a simbiose com plantas, cujo exsudato da planta auxilia no desenvolvimento do micro-organismo e o metabólito microbiano protege a planta contra patógenos.^{24,25} Além disso, alguns relatos da literatura também sugerem que alguns antibióticos podem atuar como moléculas sinalizadores, as quais são capazes de produzir alterações na expressão de alguns genes do receptor em resposta a exposição do estímulo recebido.²⁶

As actinobactérias são capazes de produzir uma grande variedade de metabólitos, desde compostos com estruturas químicas semelhantes (séries homólogas) ou até mesmo moléculas pouco usuais.²⁷ Desta forma, estes metabólitos secundários podem estar associados não somente a ação antibiótica, mas também a outras atividades biológicas, como antitumoral, imunossupressora, inibidora de enzimas, antiparasitária, bioherbicida, reguladora de crescimento, biopesticida ou bioinseticida.²⁸ Esta diversidade química encontrada para as actinobactérias resulta da necessidade de defesa, comunicação e competição por espaço e nutrientes entre os organismos, que desenvolveram diversos mecanismos biossintéticos para sobrevivência ao longo do processo evolutivo.²⁹ Desta forma, um micro-organismo é capaz de

produzir diversas classes de compostos, de acordo com as condições nutricionais e os parâmetros físicos utilizados nos processos fermentativos.³⁰ A diversidade química dos antibióticos produzidos por actinobactérias pode ser observada na Figura 2, como mostram os compostos ciclomarina (10), esporolida A (11), aculeximicina (12), lipomicina (13), salfredina (14) e asterobactina (15).

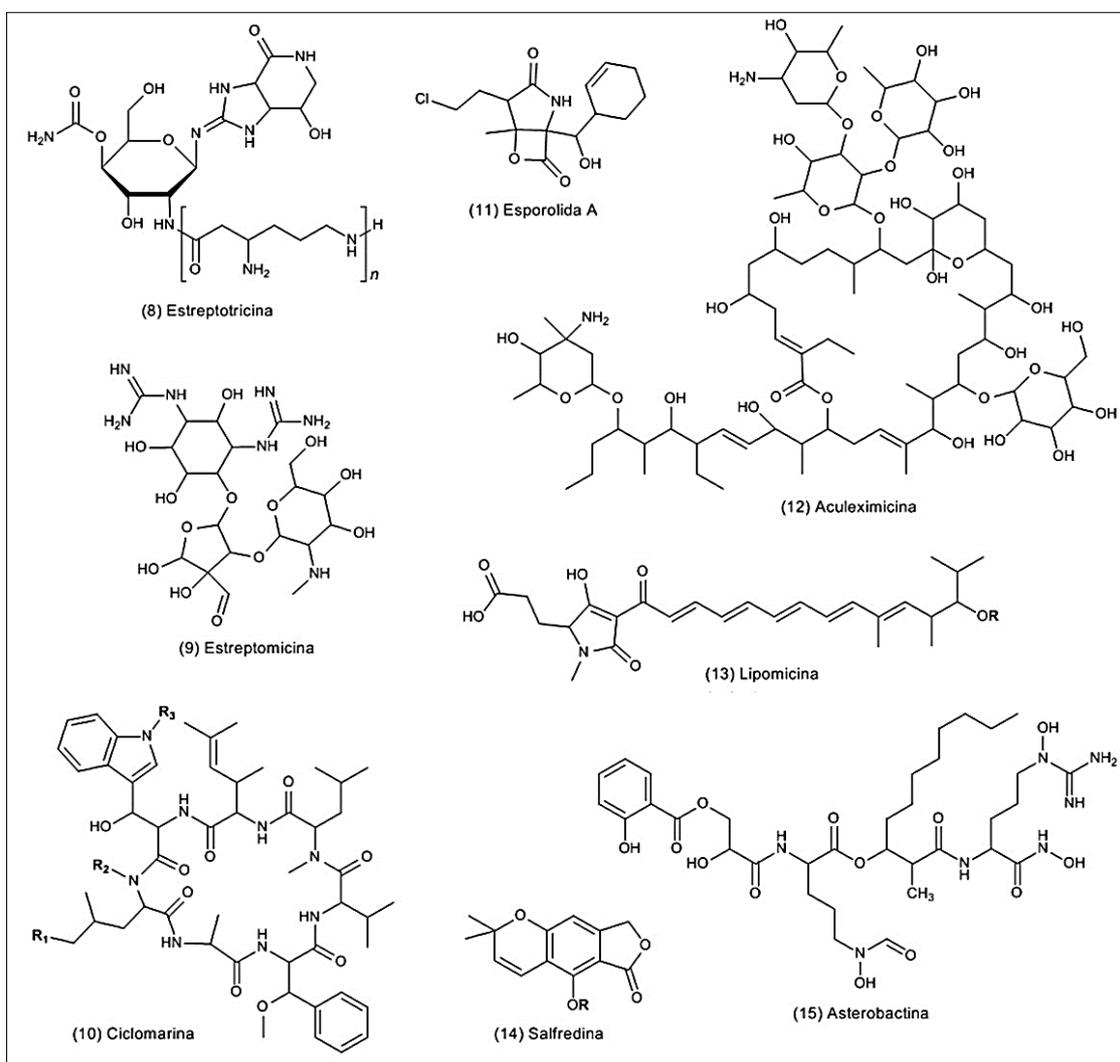


Figura 2. Estrutura química de antibióticos produzidos por actinobactérias.

A diversidade estrutural e as características físico-químicas dos metabólitos secundários microbianos é bastante diferente quando comparadas as moléculas sintéticas, uma vez que os produtos microbianos frequentemente apresentam esqueletos carbônicos maiores e mais

complexos, além de muitos centros estereogênicos, enquanto que os compostos sintéticos são mais limitados em tamanho, estrutura e complexidade. Assim, os antibióticos naturais e seus derivados podem ser mais específicos em seu modo de ação, pois sua estrutura química mais complexa pode facilitar uma maior afinidade por seus alvos biológicos.³¹

Embora a crescente dificuldade de encontrar novas moléculas tenha levado a um declínio na pesquisa de antibióticos naturais, as doenças infecciosas associadas à resistência a múltiplos fármacos estão se espalhando rapidamente, e como consequência, os tratamentos disponíveis no mercado não são mais eficazes na terapia. Assim, a preocupação em encontrar novos compostos com ação antibiótica ressurgiu, devido a atual necessidade de combater as linhagens patogênicas resistentes.³² Diante deste cenário e da história dos antibióticos naturais, os produtos naturais microbianos voltam a se destacar como ponto de partida para a inovação da química medicinal e, embora muitos compostos já sejam conhecidos e tenham sua ação antimicrobiana comprovada, as espécies de *Streptomyces* ainda têm sido amplamente estudadas para o combate das doenças infecciosas associadas a resistência, como por exemplo, a mastite.^{33,34} Entretanto, novas estratégias têm surgido para aumentar as chances de identificação de compostos inéditos, explorando linhagens de actinobactérias menos estudadas ou raras, provenientes de ambientes extremos, além da utilização de condições de cultivo não usuais, expressão/supressão de genes, bem como estratégias de monitoramento químico e isolamento guiado pela atividade biológica para acelerar o processo de caracterização dos compostos considerados promissores como novos antibióticos.³⁵⁻³⁷

1.3. Micro-organismos de rizosfera e ambientes extremos

As raízes das plantas têm a capacidade de influenciar os organismos que a circundam, isto é, o microbioma da rizosfera, através da criação de nichos específicos no solo mediada

pela liberação de entidades químicas de acordo com vários fatores, tais como: tipos de organismos envolvidos, propriedades do solo, e as condições climáticas e nutricionais.³⁸

A rizosfera é caracterizada pela grande diversidade microbiana a qual abriga e, dentre os micro-organismos mais abundantes estão as actinobactérias, que diante da sua capacidade de produção de compostos bioativos podem oferecer vantagens na associação com plantas, melhorando suas condições de defesa e saúde.³⁹ A densidade microbiana da rizosfera varia de 10^8 a 10^9 bactérias por grama de solo, sendo tipicamente mais elevada do que em outras regiões do solo, que têm aproximadamente 10^4 espécies bacterianas por grama de solo.⁴⁰

Como consequência da diversidade de organismos presentes na rizosfera, a dinâmica desta região é marcada pela presença de inúmeros mediadores químicos, os quais são responsáveis pela comunicação entre as comunidades que ali habitam. Tal sinalização pode ocorrer de vários modos e basicamente pode ser dividida em três categorias: (a) entre os micro-organismos de uma mesma espécie ou de espécies distintas, (b) de plantas para micro-organismos, e (c) emitida de micro-organismos a planta.⁴¹ Assim, a rizosfera contém uma série de metabólitos primários e secundários que podem atrair, repelir ou eliminar organismos, com a finalidade de manutenção das espécies existentes ali.⁴² A Figura 3 apresenta um esquema da comunicação química que ocorre na rizosfera.

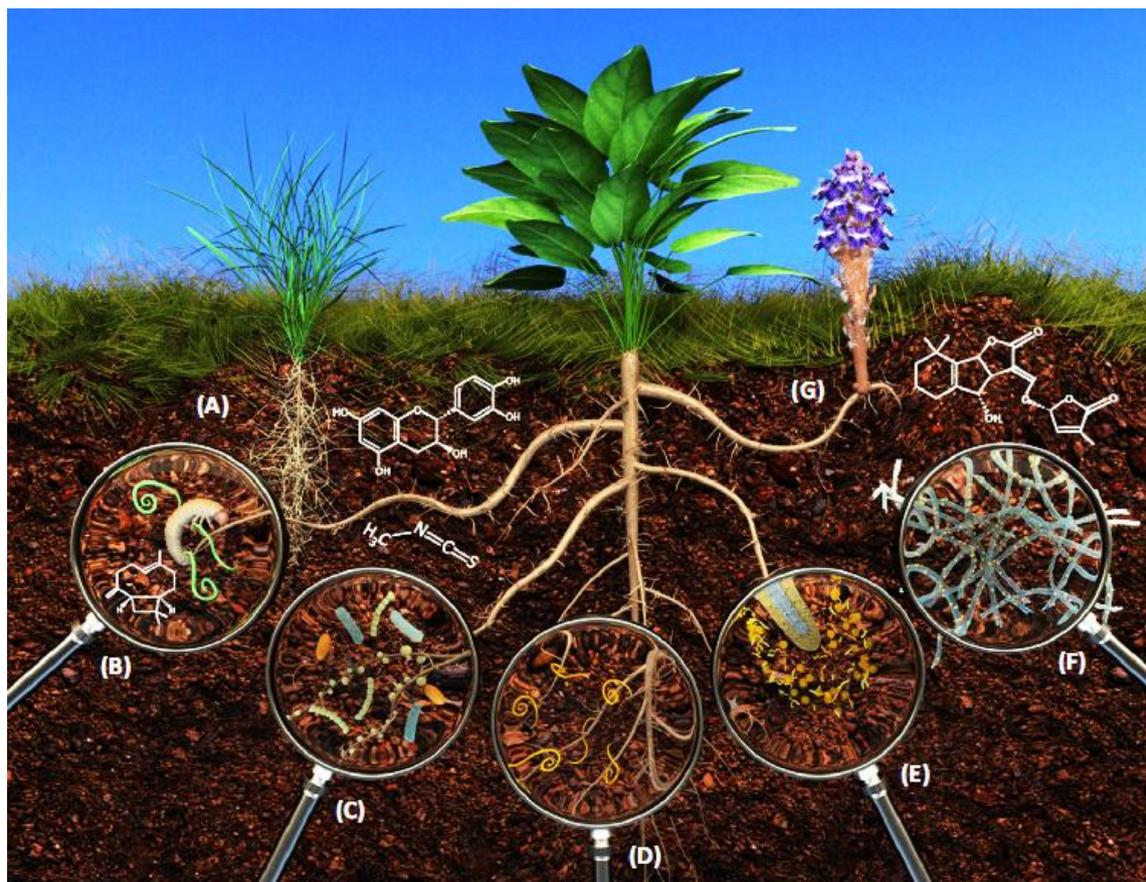


Figura 3. Representação esquemática da comunicação química existente na rizosfera. Pode-se observar alelopatia em (a); atração de micro-organismos para colonização da rizosfera em (b), (c) e (d); a formação dos nichos após a colonização microbiana em (e) e (f); além de relação de parasitismo em (g) ⁴²

Um fator extremamente importante que define a comunidade microbiana que constitui a população da rizosfera, assim como o perfil metabólico apresentado, são os fatores ambientais e nutricionais. A disponibilidade ou escassez de fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes, bem como o estresse hídrico, salinidade, pH e índices de radiação são fatores-chaves na ativação ou silenciamento de rotas biossintéticas capazes de garantir a sobrevivência do organismo em um ambiente pouco favorável.⁴³ A competição entre micro-organismos por espaço e nutrientes em ambientes extremos tem sido uma força seletiva significativa que leva à evolução, através do desenvolvimento de estratégias adaptativas para sobrevivência nestes ambientes complexos.⁴⁴

Os ambientes extremos são qualificados por características físicas e químicas que diferem significativamente daqueles encontrados em ambientes que suportam formas de vida

mais abundantes e variadas.⁴⁵ Assim, os micro-organismos presentes nestes ambientes podem ser classificados de acordo com as características encontradas lá, como por exemplo termófilos para ambientes com altas temperaturas, acidófilos quando o pH é ácido, halófilos para alta salinidade, metalotolerantes em locais com elevadas concentrações de metais, radiorresistentes para lugares onde há grande incidência de radiação (por exemplo, radiação ultravioleta).⁴⁶

Os organismos extremófilos são então considerados promissores para a biotecnologia, em virtude de sua capacidade de produzir diversas extremoenzimas (proteases, amilases, xilanases, desidrogenases), além de metabólitos com função protetora, como ácidos graxos poli-insaturados responsáveis por manter a estrutura celular em ambientes frios; carotenos para absorção de radiação; surfactantes, para manutenção da membrana celular em ambientes salinos; dentre outros.⁴⁷⁻⁴⁹ Pode-se citar como exemplos de metabólitos secundários produzidos por extremófilos o antibiótico antineoplásico tubercidina (16) isolado de *Actinopolyspora erythraea*, uma actinobactéria halófila,⁵⁰ ou mesmo os antifúngicos abenquinas A-D (17), isolados de uma linhagem xerófila (resistente a dissecação) de *Streptomyces*.⁵¹

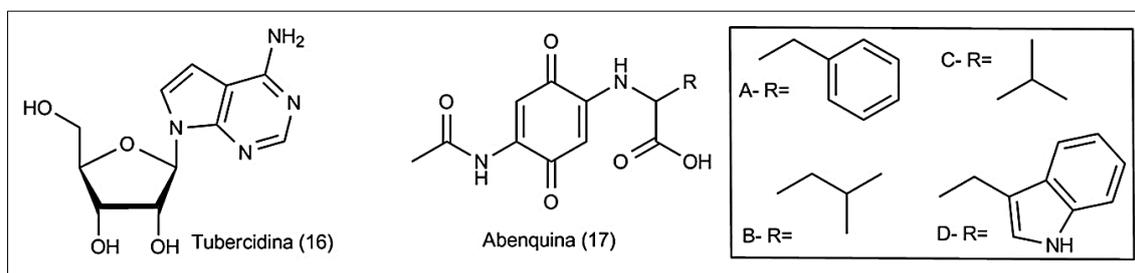


Figura 4. Estruturas químicas de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias de ambientes extremos.

1.4. Fracionamento guiado por bioensaio

Como os micro-organismos são capazes de produzir uma série de compostos através de seu metabolismo primário e secundário, os extratos brutos gerados nos processos fermentativos, normalmente, constituem-se como uma mistura complexa, o que dificulta a associação da atividade metabólica a uma molécula específica. Nestes casos, o estabelecimento de uma relação causa-efeito inequívoca não é possível. Assim, estratégias que consigam interligar técnicas analíticas e ensaios biológicos podem ser empregadas com a finalidade de identificar as substâncias isoladas quanto sua relevância biológica.⁵²

O fracionamento guiado por bioensaio consiste em alternar etapas de testes biológicos com os fracionamentos dos extratos brutos através de diferentes métodos cromatográficos. A partir da fração que produz o efeito biológico desejado realiza-se, então, o isolamento e identificação do composto ativo, isto é, somente as frações ativas nos ensaios biológicos são levadas a novas etapas de fracionamento, até que se consiga relacionar a atividade a uma fração purificada.⁵³ A Figura 5 mostra uma representação esquemática deste processo.

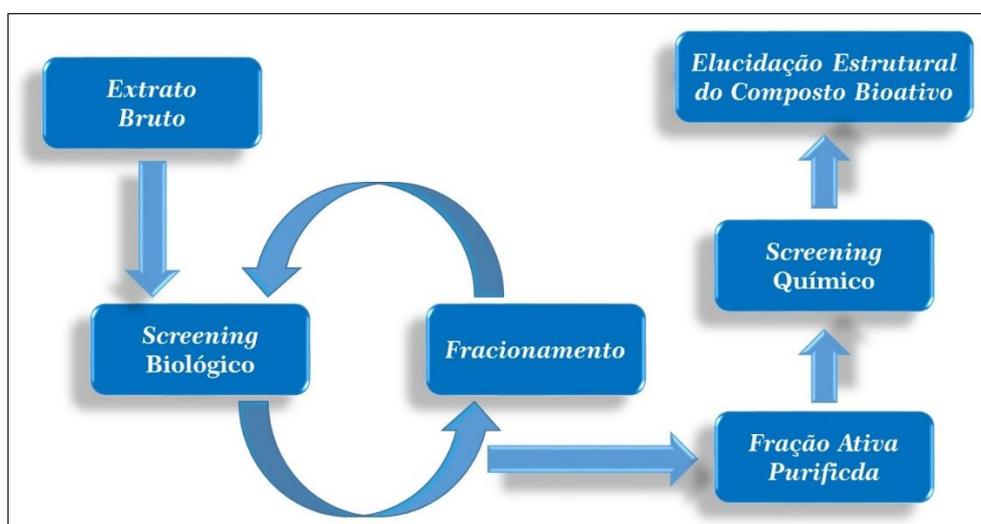


Figura 5. Representação esquemática das etapas envolvidas no fracionamento guiado por bioensaio.

Como os produtos naturais microbianos são excelentes fontes para a obtenção de uma diversidade química de candidatos potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos, diferentes ensaios podem ser empregados na triagem biológica.⁵⁴ Inicialmente, para a triagem de inúmeros extratos brutos, bioensaios com alto desempenho e respostas rápidas são empregados. Entretanto, após o fracionamento, bioensaios mais específicos podem ser utilizados para determinar o modo de ação da molécula bioativa isolada.⁵⁵ Atualmente, com as técnicas de miniaturização dos ensaios biológicos e HTS (do inglês *High Throughput Screening*) mais de uma atividade distinta podem ser monitoradas simultaneamente, potencializando ainda mais a metodologia, de forma que um maior número de *hits* sejam encontrados.⁵⁶

Entretanto, vale ressaltar que o fracionamento biomonitorado deve ser bem planejado, uma vez que existem algumas limitações. Como os compostos ativos geralmente estão presentes em pequenas quantidades, é imprescindível uma análise criteriosa para que os mesmos não sejam descartados. Além disso, a purificação dos analitos de interesse pode não ser trivial dada a complexidade de alguns extratos brutos microbianos. Finalmente, também deve-se atentar a perda da atividade por modificações estruturais que podem ocorrer no processo de separação, como a formação de artefatos ou mesmo reações de degradação, entre outros.⁵⁷

Uma vez que a avaliação biológica é realizada e a separação do metabólito bioativo tenha sido alcançada inicia-se o processo de elucidação estrutural do composto. Esta etapa de caracterização é dependente de técnicas analíticas diversas, podendo representar um conjunto de dados com diferentes informações a serem conectadas. Em geral, as técnicas mais amplamente empregadas são a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) e infravermelho (IR, do inglês *Infrared*).⁵⁸

1.5. Espectrometria de massas no processo de desreplicação

Diversos estudos mostram a importância e a eficiência dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias como antibióticos.⁵⁹ Entretanto sua obtenção pode não ser trivial, sendo necessárias diversas etapas, entre elas: produção dos extratos brutos através de processos fermentativos; extração dos compostos de interesse; fracionamento dos extratos brutos até que a atividade biológica possa ser associada a um determinado composto; e caracterização estrutural.⁶⁰ Durante todo este processo, geralmente são obtidas pequenas quantidades de extratos brutos e, principalmente, de compostos isolados, assim uma etapa crucial nos processos de desreplicação e fracionamento consiste na escolha da técnica analítica, a qual deve ser sensível, rápida e robusta. Desta forma, a espectrometria de massas faz-se uma ferramenta importante no processo de desreplicação de metabólitos em matrizes complexas, uma vez que permite uma análise rápida e sensível, bem como fornece informações valiosas, como a massa molecular e mesmo acerca da estrutura química.

Outra vantagem é que os perfis químicos gerados por MS permitem comparar extratos brutos, além de facilitarem o monitoramento e detecção de metabólitos de interesse, estreitando a busca de potenciais biomoléculas ou até mesmo evitando que extratos brutos quimicamente similares sejam estudados isoladamente em um estágio inicial do trabalho.⁶¹

As análises por MS são ideais para a triagem química e comparação detalhada dos metabólitos secundários de um conjunto de fermentações microbianas, revelando rapidamente as diferenças ou biomarcadores entre os grupos. Além disso, através da espectrometria de massas sequencial pode-se ainda obter informação estrutural de compostos numa fase inicial do trabalho, além da possibilidade de obtenção da fórmula estrutural por meio das análises por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS, do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*).

Diversas plataformas em MS podem ser empregadas nos estudos do metabolismo secundário microbiano, desde a injeção direta no equipamento (DI-MS, do inglês *Direct Infusion/Injection Mass Spectrometry*) até mesmo ao acoplamento com diversas técnicas cromatográficas, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), cromatografia gasosa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) ou mesmo cromatografia em camada delgada (TLC-MS do inglês *Thin Layer Chromatography Mass Spectrometry*).⁶²

A partir de todas as informações coletadas por MS (tais como massa e fórmula molecular, padrão isotópico, perfil de fragmentação, modo de ionização) é possível comparar com a literatura e/ou bancos de dados a informação estrutural fornecida. Assim, as estruturas conhecidas podem ser identificadas sem a necessidade de um processo de isolamento; além disso, os padrões de fragmentação observados no espectro MS/MS ou MSⁿ podem permitir a identificação de entidades desconhecidas dentro de uma mesma família química por meio de correlações espectrais.^{63,64} Desta forma, a MS têm contribuído imensamente para o desenvolvimento de metodologias de desreplicação dos extratos brutos cada vez mais rápidas e eficientes.

Um dos pontos fortes da espectrometria de massa é que pequenas quantidades de amostra são necessárias para realização das análises e, apenas com um único espectro é possível obter algumas informações relevantes como composição elementar e massa molecular. Além disso, grandes avanços instrumentais têm sido observados nas últimas décadas, principalmente com relação as técnicas de ionização, como exemplo a ionização ambiente, que levou à análise de amostras para um ambiente externo ao espectrômetro de massas.^{65,66}

A ionização ambiente permitiu que não só os extratos brutos pudessem ser analisados, mas também as próprias colônias microbianas. A análise direta das células de um micro-

organismo permite detectar metabólitos específicos de uma dada comunidade e, por este motivo, tem representado um crescente interesse nas pesquisas de microbiologia para o estudo das interações intra e interespecies.⁶⁷

Apesar das inúmeras vantagens da utilização de MS para desreplicação é preciso cuidado para a interpretação dos dados obtidos, pois identificações equivocadas podem ser cometidas devidos as a geração de íons protonados ($[M+H]^+$) ou coordenados com metais como sódio e potássio ($[M+Na]^+$ e $[M+NH_4]^+$).⁶⁸, Deve-se também ressaltar que as análises que não envolvem separação cromatográficas também estão sujeitas ao efeito de supressão iônica, no qual as diversas espécies presentes nos extratos brutos competem no processo de ionização e moléculas facilmente ionizáveis mascaram a presença de analitos com menor potencial de ionização.^{69,70}

No entanto, as análises espectrométricas podem não ser suficientes para se chegar a uma estrutura viável, pois a elucidação estrutural se torna difícil com altas massas moleculares e a pesquisas em bancos de dados podem gerar resultados falso-positivos. Para isso, o maior número de informações estruturais deve ser utilizado, como as técnicas espectroscópicas de RMN (ressonância magnética nuclear), IV (infravermelho), DC (dicroísmo circular), UV-Vis (ultravioleta-visível), em virtude da complementaridade entre elas.⁷¹

Assim, os protocolos de desreplicação podem envolver diversas análises para que se identifique uma molécula o mais rápido possível, evitando etapas de purificação de compostos que não sejam de interesse, confrontando os dados obtidos nas análises estruturais a dados da literatura e bancos de dados. A Figura 6 mostra uma representação esquemática abordada para a acelerar a identificação dos metabólitos de interesse.

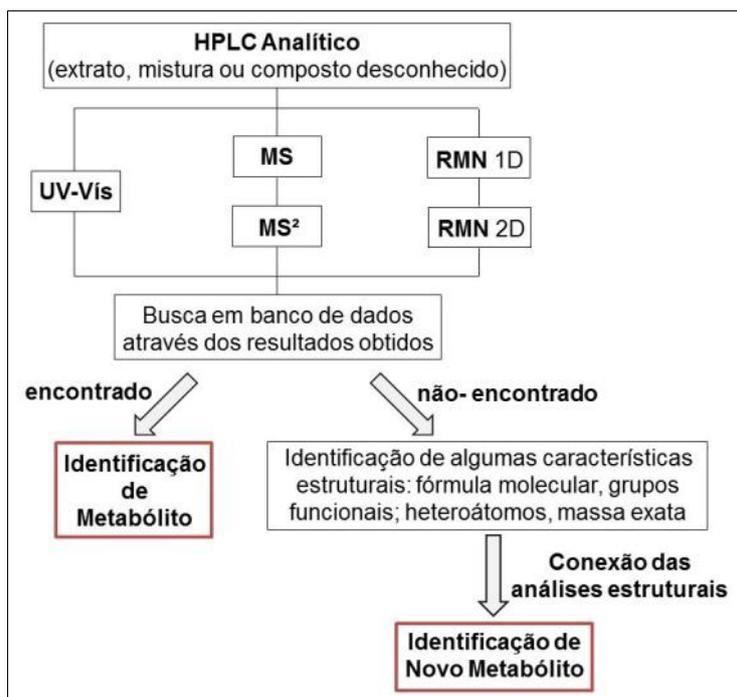


Figura 6. Representação esquemática da metodologia de desreplcação, empregada para acelerar a identificação de metabólitos de interesse.

Embora sejam necessários alguns cuidados, as metodologias em MS permitem o estudo da diversidade de metabólitos produzidos por micro-organismos e a dinâmica das comunidades microbianas a partir tanto da análise de metabólitos excretados para o meio de cultivo, quanto de amostras vivas. E os dados gerados, combinado com abordagens de informática, facilitam a caracterização destes organismos a nível molecular, resultando em inúmeros avanços na química de PN microbianos.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Neste trabalho buscou-se identificar, isolar e caracterizar compostos relacionados a atividade antimastítica empregando bioensaios de antagonismo e antibiose para triagem de actinobactérias e extratos brutos, respectivamente, utilizando técnicas em espectrometria de massas como principais ferramentas de monitoramento e caracterização estrutural.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Otimização de bioensaios de antagonismo e antibiose para avaliar a capacidade de produção de compostos com atividade antimicrobiana pelas actinobactérias estudadas;
- ❖ Realização de *screening* de atividade antimastítica de diferentes actinobactérias e seus extratos frente linhagens de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- ❖ Aplicação da estratégia de desreplicação para os extratos brutos ativos Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25;
- ❖ Estudar a regulação da produção de metabólitos secundários halogenados pela actinobactéria Caat 1-54 quando realizada fermentação com meio de cultivo suplementado com sais de bromo ou com água do mar;
- ❖ Caracterização estrutural das substâncias bioativas, presentes nos extratos brutos provenientes das actinobactérias Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25, empregando técnicas espectrométricas e espectroscópicas.

3. Conclusões

3. Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesta tese podemos concluir que as actinobactérias são uma fonte extremamente viável para a busca de compostos com atividade antimicrobiana, e que as estratégias de *screening* e desrepliação foram desenvolvidas com sucesso, pois possibilitaram a identificação rápida dos compostos ativos presentes nos extratos brutos.

Assim, para o ensaio de antagonismo foram triadas aproximadamente 120 actinobactérias contra 13 linhagens distintas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, onde 55% das actinobactérias estudadas foram consideradas ativas. Para este ensaio o meio de cultivo BDA mostrou-se mais efetivo para a produção de moléculas bioativas quando comparado ao meio TSBA.

Para o bioensaio de disco-difusão (antibiograma) 70 extratos brutos produzidos a partir da fermentação de meio líquido BD, foram triados e 60% deles apresentaram algum tipo de inibição de crescimento das bactérias testadas. Em relação aos dois bioensaios empregados, houve uma diferença entre a resposta de atividade antimicrobiana entre os ensaios de antagonismo e o ensaio de disco-difusão para uma mesma actinobactéria. Tal fato pode ser explicado pela diferença nas condições de cultivos dos micro-organismos, uma vez que no ensaio de antagonismo a actinobactéria é crescida em meio sólido e para o ensaio de disco-difusão a fermentação é realizada em meio líquido. Outra hipótese para explicar esta diferença é a de que os compostos bioativos não foram extraídos com eficiência do meio de cultivo líquido.

Dentre todos os extratos brutos triados, aqueles considerados mais promissores foram produzidos pelas actinobactérias Caat 1-54, Caat 2-63 e Caat 8-25. Para o extrato bruto Caat 1-54 foi observada a maior atividade contra as linhagens de bactérias Gram-positivas dentre todos os extratos estudados nesta tese. A atividade biológica do extrato foi atribuída à presença de lisolipina I. Estudos empregando fermentação de meio BD com adição de sais de

bromo e água do mar foram realizados em busca de encontrar a produção de diferentes perfis químicos. A adição de NaBr na concentração de 200 mM induziu a formação de uma lisolipina bromada. A adição de NaBr após 5 dias de cultivo da actinobactéria Caat 1-54 resultou na formação de uma lisolipina clorada e bromada. Este extrato foi considerado muito promissor devido a excelente atividade observada nos bioensaios e a possibilidade de formação de outras lisolipinas com a adição de sais de bromo no meio de cultivo.

Para a actinobactéria Caat 2-63 extrato bruto também foi ativo contra todas as linhagens Gram-positivas, apresentando halos de inibição superiores a 2 cm de diâmetro. A atividade antimicrobiana foi associada a presença de actinomicina D e V no extrato. Através do perfil de fragmentação por CID, outros peptídeos presentes no extrato bruto foram identificados como correlatos da biossíntese das actinomicinas.

Análises de DESI-TLC-MS associadas ao ensaio de bioautografia foram empregadas com eficiência para análise do extrato bruto Caat 2-63 e revelaram a potencialidade desta metodologia em acelerar a identificação do composto ativo em misturas complexas.

A actinobactéria Caat 8-25 também apresentou atividade no ensaio de antagonismo e o extrato bruto produzido foi ativo nos ensaios de disco-difusão. Diferente dos extratos anteriores, foi observada uma atividade contra ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A atividade antimicrobiana contra as linhagens Gram-positivas foi associada a presença de oxitetraciclina e a atividade contra bactérias Gram-negativas foi correlacionada a presença de herbicidinas. Estudos de desreplicação também possibilitaram a identificação da herbicina B, herbicina F e 2'-O-Demetil-herbicidina F. Desta forma, o extrato bruto da actinobactéria 8-25 mostrou-se bastante interessante, com grande potencial de aplicação, pois contém compostos antimicrobianos capazes de inibir linhagens bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas.

4. Referências Bibliográficas

4. Referências Bibliográficas

1. Zhao, X.; Lacasse, P. *Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control*. **J Anim Sci** 86:13, 57-65, 2008.
2. Contreras, G. A.; Rodriguez, J. M. *Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 16:4, 339-356, 2011.
3. Bradley, A. J. *Bovine Mastitis: An Evolving Disease*. **Vet J** 164:2, 116-128, 2002.
4. Watts, J. L. *Etiological Agents of Bovine Mastitis*. **Vet Microbiol** 16:1, 41-66, 1988.
5. Modi, C. M.; Patel, Hitesh.B.; Patel, H. B. Mody, S. K. *A Comprehensive review on pharmacotherapeutics of bovine mastitis*. **Mol Microbiol Res** 2:1, 1-9, 2012.
6. Kulkarni, A. G. Kaliwal, B. B. *Bovine Mastitis: a review*. **Int J Rec Sci Res** 4:5, 542-548, 2013.
7. Coentrão, C. N.; Souza, G.N.; Brito, J.R.F.; Paiva e Brito, M.A.V; Lilenbaum. W. *Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec** 60:2, 283-288, 2008.
8. Peters, M. D. P.; Silveira, I. D. B.; Fischer, V. *Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows*. **Animal** 9:12, 2024-2028, 2015.
9. Pyörälä, S. *Treatment of mastitis during lactation*. **Irish Vet J.** **62:Suppl 4**, S40-S44, 2009. doi: 10.1186/2046-0481-62-S4-S40
10. Pol, M.; Ruegg, P. L. *Treatment Practices and Quantification of Antimicrobial Drug Usage in Conventional and Organic Dairy Farms in Wisconsin*. **J. Dairy Sci** 90:1, 249-261, 2007.
11. Wilson, D. J.; Gonzales, R. N.; Case, K. L.; Garrison, L. L.; Grönh, Y. T. *Comparison of Seven Antibiotic Treatments with No Treatment for Bacteriological Efficacy Against Bovine Mastitis Pathogens*. **J Dairy Sci** 82:8, 1664-1670, 1999.
12. Tenhagen, B. A.; Köster, G.; Wallmann, J.; Heuwieser, W. *Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany*. **J. Dairy Sci** 89:7, 2542-2551, 2006.
13. Arif, A.; Rehman, M. U.; Bhat, S. A.; Mir, B. A.; Bhat, R. R.; Mir, M. R.; Bilal, S.; Hussain, I. *Scenario of Genetic Selection and Its Impact on Bovine Mastitis*. **IJAVMS**. 9:6, 3-14, 2015.
14. Sordillo, L. M. *New Concepts in the Causes and Control of Mastitis*. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 16:4, 271-273, 2011.
15. Halasa, T.; Huijps, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review*, **Vet Q** 29:1, 18-31, 2007.
16. Pitkälä, A.; Haveri, M.; Pyörälä, S.; Myllys, V.; Honkanen-Buzalski. T. *Bovine Mastitis in Finland 2001 - Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance*. **J. Dairy Sci** 87:8, 2433-2441, 2004.
17. Donadio S.; Monciardini P.; Alduina R.; Mazza P.; Chiocchini C.; Cavaletti L.; Sosio M.; Puglia A. M. *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*. **J. Biotechnol.**, 99:3, 187-198, 2002.
18. Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H. P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. *Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev** 80:1, 1-43, 2016.
19. 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 Biotechnol** 33:1, 15-26, 2015.

20. Zarins-Tutt, J. S.; Barberi, T. T.; Gao, H.; Mearns-Spragg, A.; Zhang, L.; Newman, D. J.; Goss, R. J. M. *Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products*. **Nat. Prod. Rep** 33:1, 54-72, 2016.
21. Davies, J.; Davies, D. *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*. **Microbiol Mol Biol Rev** 74:3, 417-433, 2010.
22. Waksman, S. A. *What is an antibiotic or an antibiotic substance?* **Mycologia** 39:5, 565-569, 1947.
23. Kumar, N.; Singh, R. K.; Mishra, S. K.; Singh, A. K.; Pachouri, U. C. *Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria*. **Int J Microbiol Res** 2:2, 12-16, 2010.
24. Chater, K.; Biró, K.; Lee, K. J.; Palmer, T.; Schrempf, H. *The complex extracellular biology of Streptomyces*. **FEMS Microbiol Rev** 34:2, 171-198, 2010.
25. Procópio, R. E. L.; da Silva, I. R.; Martins, M. K.; de Azevedo, J. L.; de Araújo, J. M. *Antibiotics produced by Streptomyces*. **Braz J Infect Dis** 16:5, 466-471, 2012.
26. Kumbhar, C.; Watve, M. *Why antibiotics: A comparative evaluation of different hypotheses for the natural role of antibiotics and an evolutionary synthesis*. **Nat Sci** 5:4, 26-40, 2013.
27. Demain, A. L. *Microbial biotechnology*. **Trends Biotechnol** 18:1, 26-31, 2000.
28. Demain, A. L. *Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 41:2, 185-201, 2014.
29. Strömstedt, A. A.; Felth, J.; Bohlin, L. *Bioassay in natural products research - strategies and methods in the search for anti-inflammatory and antimicrobial activity*. **Phytochem Anal** 25:1, 13-28, 2014.
30. Demain, A. L. *Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery*. **J Ind Microbiol Biotechnol** 2013, doi:10.1007/s10295-013-1325-z.
31. Silver, L. L.; *Natural products as a source of drug leads to overcome drug resistance*. **Future Microbiol** 10:11, 1711-1718, 2015.
32. Brown, E. D.; Wright, G. D. *Antibacterial drug discovery in the resistance era*. **Nature**. 529:21 336-343, 2016.
33. Genilloud, O. *The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery*. **Anton Leeuw** 106:1, 173-188, 2014.
34. Hwang K-S, Kima, H. U.; Charusanti, P.; Palsson, B. Ø.; Lee, S. Y. *Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites*. **Biotechnol Adv** 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008.
35. Gupta, C.; Prakash, D.; Gupta, S. *Natural Useful Therapeutic Products from Microbes*. **J Microbiol Exp** 1:1, 6-14, 2014.
36. Jose, P. A.; Jebakumar, S. R. D. *Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery*. **Front Microbiol**. 4:240, 1-3, 2013.
37. Tiwari, K.; Gupta, R. K. *Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics*. **Crit Rev Biotechnol** 32:2, 108-132, 2012.
38. Pii, Y.; Borruso, L.; Brusetti, L.; Crecchio, C.; Cesco, S.; Mimmo, T. *The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome*. **Plant Physiol Biochem** 99, 39-48, 2016.
39. Turner, R. T.; James, E. K.; Poole, P. S. *The plant microbiome*. **Genome Biology** 2013, 14:6, 209-219.
40. Berendsen, R. L.; Pieterse, C. M. J.; Bakker, P. A. H. M. *The rhizosphere microbiome and plant health*. **Trends Plant Sci** 17:8, 478-486, 2012.
41. Venturi, V.; Keel, C. *Signaling in the Rhizosphere*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.005.

42. van Dam, N. M.; Bouwmeester, H. J. *Metabolomics in the Rhizosphere: Tapping into Belowground Chemical Communication*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.008.
43. Mommer, L.; Kirkegaard, J.; Ruijven, J. *Root-Root Interactions: Towards a Rhizosphere Framework*. **Trends Plant Sci** 2016, doi:10.1016/j.tplants.2016.01.009.
44. Pettit, R. K. *Mar Biotechnol* **2011**, 13, 1-11. Pettit, R. K. *Culturability and Secondary Metabolite Diversity of Extreme Microbes: Expanding Contribution of Deep Sea and Deep-Sea Vent Microbes to Natural Product Discovery* **Mar Biotechnol**, 13:1, 1-11, 2011.
45. Jose, P. A.; Jebakumar, S. R. D. *Unexplored hypersaline habitats are sources of novel actinomycetes*. **Front Microbiol** 5:242, 1-3, 2014.
46. Giddings, L.; Newman, D. J. *Bioactive Compounds from Terrestrial Extremophiles*. **SpringerBriefs in Microbiology** 1-75, 2015.
47. Rothschild, L. J.; Mancinelli, R. L. *Life in extreme environments*. **Nature** 409:6823, 1092-1101, 2001.
48. Seufferheld, M. J. Alvarez, H. M.; Farias, M. E. *Role of Polyphosphates in Microbial Adaptation to Extreme Environments*. **Appl Env Microbiol** 74:19, 5867-5874, 2008.
49. Mirete, S.; Morgante, V.; González-Pastor, J. E. *Functional metagenomics of extreme environments*. **Curr Opin Biotechnol** 38, 143-149, 2016.
50. Zhao, L.; Huang, S. X.; Tang, S.; Jiang, C.; Duan, Y.; Beutler, J. A.; Henrich, C. J.; McMahon, J. B.; Schmid, T.; Bles, J. S.; Colburn, N. H.; Rajska, S. R.; Shen, B. *Actinopolysporins A-C and Tubercidin as a Pdc4 Stabilizer from the Halophilic Actinomycete Actinopolyspora erythraea YIM 90600*. **J. Nat. Prod** 74:9, 1990-1995, 2011.
51. Mohammadipanah, F.; Wink, J. *Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity*. **Front. Microbiol** 6, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2015.01541.
52. Weller, M. G. *A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques*. **Sensors** 12:7, 9181-9209, 2012.
53. Prince, E. K.; Pohnert, G. *Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology*. **Anal. Bioanal. Chem** 396:1, 193-197, 2010.
54. Sharma, S. B.; Gupta, R. *Drug Development from Natural Resource: A Systematic Approach*. **Mini-Rev Med Chem** 15:1, 52-57, 2015.
55. Strömstedt, A. A.; Felth, J.; Bohlin, L. *Bioassays in Natural Product Research - Strategies and Methods in the Search for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activity*. **Phytochem Anal** 25:1, 13-28, 2014.
56. Henrich, C. J.; Beutler, J. A. *Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products*. **Nat. Prod. Rep** 30:10, 1284-1298, 2013.
57. Kellogg, J. J.; Todd, D. A.; Egan, J. M.; Raja, H. A.; Oberlies, N. H.; Kvalheim, O. M.; Cech, N. B. *Biochemometrics for Natural Products Research: Comparison of Data Analysis Approaches and Application to Identification of Bioactive Compounds*. **J. Nat. Prod** 79:2, 376-386, 2016.
58. Simon, E.; Lamoree, M. H.; Hamers, T.; de Boer, J. *Challenges in effect-directed analysis with a focus on biological samples*. **Trends Anal Chem** 67:,179-191, 2015.
59. Baltz, R. H. *Antimicrobials from actinomycetes: back to the future*. **Microbe** 2, 125-131, 2007.
60. Prince, E. K.; Pohnert, G. *Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology*. **Anal Bioanal Chem** 396:1, 193-197, 2010.
61. Wu, C.; Kim, H. K.; van Wezel, G. P.; Choi, Y. H. *Metabolomics in the natural products field - a gateway to novel antibiotics*. **Drug Discov Today** 13, 11-17, 2015.

62. Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Goodacre, R.; Neumann, S.; Kopka, J.; Viant, M. R. *Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics*. **Metabolomics** 9, S44-S66, 2013.
63. Krug, D.; Müller, R. *Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products*. **Nat Prod Rep** 31:6, 768-783, 2014.
64. Kleigrewe, K.; Almaliti, J.; Tian, I. Y.; Kinnel, R. B.; Korobeynikov, A.; Monroe, E. A.; Duggan, B. M.; Di Marzo, V.; Sherman, D. H.; Dorrestein, P. C.; Gerwick, L.; Gerwick, H. W. *Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria*. **J Nat Prod** 78:7, 1671-1682, 2015.
65. Bouslimani, A.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Dorrestein, P. C. *Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies*. **Nat Prod Rep** 31:6, 718-729, 2014.
66. Venter, A.; Nefliu, M.; Cooks, R. G. *Ambient desorption ionization mass spectrometry*. **Trends Anal Chem** 27:4, 284-290, 2008.
67. Fang, J.; Dorrestein, P. C. *Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies*. **Curr Opin Microbiol** 19, 120-129, 2014.
68. Lang, G.; Mayudin, N. A.; Mi, M. I.; Sun, L.; Van der Sar, S.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Ellis, G.; Laatsch, H.; Munro, M. H. G. *Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts*. **J Nat Prod** 71:9, 1595-1599, 2008.
69. Garcia, D. E.; Baidoo, E. E.; Benke, P. I.; Pingitore, F.; Tang, Y. J.; Villa, S.; Keasling, J. D. *Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics*. **Curr. Opin. Microbiol** 11:3, 233-239, 2008.
70. Annesley, T. M. *Ion Suppression in Mass Spectrometry*. **Clin Chem** 49:7, 1041-1044, 2003.
71. Krug, D.; Muller, R. *Secondary metabolomics: the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products*. **Nat Prod Rep** 2014, doi: 10.1039/c3np70127a.