UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de micro-organismos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Rita de Cássia Pessotti
Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/12/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

RESUMO

PESSOTTI, R. C. **Estudo químico-biológico do metabolismo secundário de micro-organismos**. 2016. 177f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A crescente resistência dos micro-organismos patogênicos aos fármacos já existentes gera intensa demanda por novos agentes terapêuticos. Em contrapartida, a eficiência na descoberta de compostos com novas estruturas químicas diminuiu nos últimos anos. Tendo em vista a vasta biodiversidade existente de micro-organismos, a redução da eficiência na descoberta de novos produtos naturais não indica que todos compostos existentes já foram descritos, mas sim que as metodologias para isolamento dos mesmos devem ser aperfeiçoadas e diversificadas, e novos nichos devem ser explorados. Esta tese compreende três capítulos, que trazem abordagens que podem ser utilizadas na busca por produtos naturais. O capítulo 1 aborda a aplicação de conhecimentos de biologia molecular na pesquisa de produtos naturais, através da metagenômica. O capítulo 2 aborda o conceito de química ecológica para estimular o metabolismo secundário, através da utilização de interações microbianas. O capítulo 3 aborda o uso de *genome mining* para entender a capacidade metabólica de uma linhagem bacteriana, bem como o uso de variações nos parâmetros da cultura para alterar o metabolismo desta. Metagenômica: a triagem anti-parasitária das bibliotecas metagenômicas detectou clones bioativos contra *Leishmania major*. As análises químicas e biológicas das culturas destes clones não permitiram a identificação dos compostos responsáveis pelas atividades observadas. Esta abordagem apresenta grandes desafios técnicos e tem passado por ajustes envolvendo sequenciamento e bioinformática para aumentar a taxa de sucesso em seu uso. Interações microbianas: esta metodologia mostrou-se promissora para a busca por compostos bioativos, tendo em vista que diversos pares exibiram nova atividade antibiótica, corroborando a hipótese que interações microbianas podem levar à expressão diferenciada do metabolismo secundário. Foi escolhida para caracterização química e biológica a interação entre uma actinobactéria rara (*Krasilnikovia* sp. T082) e uma actinobactéria endossimbionte de besouro (*Streptomyces* sp. SPB78). Esta interação é robusta e estimula a biossíntese de um antibiótico polar capaz de inibir o crescimento de uma bactéria multirresistente. Diversas técnicas foram testadas para o isolamento do composto indutor e do antibiótico induzido. Este processo foi desafiador devido ao caráter polar de ambos compostos e pelo fato da atividade antibiótica ser instável. Foi demonstrado que o antibiótico induzido é capaz de inibir o crescimento do micro-organismo indutor, sugerindo importância ecológica deste composto. A utilização desta abordagem metodológica permitiu a identificação de uma linhagem pertencente a um gênero de actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo secundário estudado (*Krasilnikovia*). Isto foi realizado através da investigação de seu genoma e também através do isolamento de compostos produzidos por esta linhagem. Esta linhagem demonstrou potencial para a produção de metabólitos secundários, apresentando pelo menos 21 potenciais *clusters* gênicos biossintéticos detectados pelo antiSMASH em seu genoma. Esta linhagem foi cultivada em dois meios de cultura (ISP2 e TSB) e diferentes metodologias de extração foram empregadas. O metabolismo secundário desta linhagem é expresso de maneira diferente de acordo com a metodologia de cultivo, evidenciando a importância da variação da composição do meio de cultura para o acesso da real capacidade metabólica de micro-organismos. Foram identificadas algumas dicetopiperazinas, que são conhecidas por seu amplo espectro de atividades biológicas, e três compostos pertencentes a uma classe de peptídeos não-ribossomais não usuais com atividade antibiótica, que possuem estrutura química complexa e incomum para produtos naturais.

Palavras-chave: Produtos naturais. Compostos bioativos. Actinobactéria. Interações microbianas. Metagenômica.

ABSTRACT

PESSOTTI, R. C. **Chemical-biological study of microbial secondary metabolism**. 2016. 177p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Increasing drug resistance among microbial pathogens is a public health threat; therefore, new antibiotics are needed. On the other hand, the rate of discovering new compounds has diminished. Considering the wide biodiversity of microorganisms, reduced efficiency on the discovery of new natural products does not indicate that all existing compounds have been described, but that methods for isolation should be improved and diversified and new niches should be explored. This thesis comprises three chapters that demonstrate approaches that can be used in the search for natural products. Chapter 1 demonstrates the application of molecular biology tools on the search for natural products through metagenomics. Chapter 2 discusses the concept of chemical ecology for the stimulation of secondary metabolism by the use of microbial interactions. Chapter 3 discusses the use of genome mining to understand the metabolic capacity of a bacterial strain as well as the use of different culture parameters to alter bacterial metabolism. The anti-parasitic metagenomic screening on metagenomic libraries detected bioactive clones against *L. major*. Chemical and biological analysis of cultures of these clones did not permit identifying the compounds responsible for the observed activities. This approach faces diverse technical challenges and is currently being improved by the use of sequencing and bioinformatics analysis in order to increase its hit rate. Microbial interactions: this approach has shown to be promising in the search for bioactive compounds, considering that several pairs exhibited new antibiotic activity, supporting the hypothesis that microbial interactions can stimulate differential expression of secondary metabolism. It was chosen for chemical and biological characterization the interaction between a rare actinobacteria (*Krasilnikovia* sp. T082), which belongs to a genus that its secondary metabolism has not yet been studied in the literature, and an endosymbiont actinobacteria of beetle (*Streptomyces* sp. SPB78). This interaction is robust and stimulates the biosynthesis of a polar antibiotic capable of inhibiting the growth of multi-resistant bacteria. Several techniques have been tested for the isolation process of the inducer compound and the induced antibiotic. This process has been particularly challenging due to the polar character of both compounds, and because the antibiotic activity is unstable. It has been shown that the induced antibiotic is capable of inhibiting the growth of the inducer microorganism, suggesting an ecological importance of this compound. The use of this co-culture approach led to the identification of a strain belonging to a rare actinobacteria genus whose secondary metabolism has never been studied before (*Krasilnikovia*). This was accomplished through sequencing and analysis of its genome and also by isolating compounds produced by this strain (chapter 3). This strain has shown great potential for the production of secondary metabolites, exhibiting at least 21 biosynthetic gene clusters detected by antiSMASH in its genome, and only four of them showed high similarity to any known gene cluster. This strain was cultured in two different culture media (ISP2 and TSB), and different methods of extraction were used. The secondary metabolism of this strain is expressed differently according to the method of cultivation, showing the importance of variation in the composition of the culture medium to access the actual metabolic capacity of microorganisms. Some diketopiperazine were isolated, which are known for their wide spectrum of biological activities, and also three compounds belonging to a class of non-ribosomal peptides known for their high bioactivity, which have complex and unusual chemical structures for natural products.

Keywords: Natural products. Bioactive compounds. Actinobacteria. Microbial interactions. Metagenomics.

Introdução Geral

A crescente resistência aos fármacos em diversos organismos como bactérias, fungos e parasitas gera intensa demanda por novos agentes terapêuticos (BERENDONK et al., 2015; LAXMINARAYAN et al., 2016; TAUBES, 2008). Em contrapartida, a eficiência na descoberta de compostos com novas estruturas químicas diminuiu nos últimos anos, sendo a grande maioria dos novos compostos resultante de variações de elementos estruturais já conhecidos (BROWN e WRIGHT, 2016; WALSH e FISCHBACH, 2010).

Produtos naturais ainda representam importante papel na pesquisa de novos fármacos devido a sua grande diversidade de atividades biológicas (NEWMAN e CRAGG, 2016). Dentre todas fontes de produtos naturais, micro-organismos se destacam. Por exemplo, dentre todos os agentes antibacterianos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981-2014, 73% são derivados de micro-organismos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Tendo em vista a ampla biodiversidade existente deste grupo, a redução da eficiência na descoberta de novos produtos naturais não indica que todos compostos existentes já foram descritos, mas sim que as metodologias para isolamento dos mesmos devem ser aperfeiçoadas e diversificadas, e novos nichos devem ser explorados (QIN et al., 2011).

Análises independentes de cultura microbiana sugerem que ainda há muita biodiversidade a ser explorada. Métodos usados tradicionalmente na busca por esses metabólitos, baseados no isolamento e cultivo de micro-organismos, têm negligenciado a maioria dos micro-organismos existentes na natureza. Estima-se que cerca de 99% das bactérias e 95% dos fungos não crescem quando utilizadas metodologias clássicas de cultivo *in vitro* (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Além disso, conhecimentos advindos do progresso das técnicas de sequenciamento e anotação gênica para diversas linhagens microbianas têm evidenciado que há também uma grande perda da capacidade metabólica das próprias linhagens facilmente cultiváveis, limitando ainda mais a descoberta de novos metabólitos de origem microbiana (KATZ; HOVER; BRADY, 2016). O número de *clusters* gênico biossintéticos (CGB) encontrado nesses estudos é muito maior do que os metabólitos conhecidos para a respectiva linhagem, sugerindo que o potencial biossintético de produtos naturais microbianos tem sido sub-explorado pelos métodos tradicionais. Acredita-se que alguns CGB que codificam produtos naturais ficam silenciados ou pouco expressos em condições laboratoriais, necessitando talvez de influências ambientais para serem ativados, como por exemplo nutrientes específicos ou até mesmo interações microbianas (BERTRAND et al., 2014).

Esta tese compreende três capítulos, que trazem diferentes abordagens que podem ser utilizadas para diversificar a busca por produtos naturais. Na abordagem mais clássica,

linhagens são isoladas do meio ambiente, comumente de solo, e cultivadas de forma axênica para a obtenção de produtos naturais. O capítulo 1 desta tese aborda a aplicação de conhecimentos de biologia molecular na pesquisa de produtos naturais, através da técnica conhecida como metagenômica. O capítulo 2 aborda o conceito de química ecológica para estimulação do metabolismo secundário, através da utilização de interações microbianas (co-cultura). O capítulo 3 aborda o uso de *genome mining* para entender a capacidade metabólica de uma linhagem bacteriana, bem como o uso de variações nos parâmetros da cultura para alterar o metabolismo desta.

É válido destacar que todos os capítulos trazem o estudo de linhagens que não são usualmente exploradas: metagenômica aborda micro-organismos de difícil cultivo, as interações microbianas foram realizadas entre linhagens endofíticas e linhagens de actinobactérias raras pertencentes a gêneros pouco estudados, e o capítulo 3 mostra o estudo mais aprofundado do metabolismo secundário de um gênero de actinobactéria rara nunca estudada química- ou geneticamente.

Capítulo 1: Metagenômica de Produtos Naturais

1. Introdução

A metagenômica apresenta-se como uma estratégia diferenciada na busca por produtos naturais por dispensar o isolamento de linhagens microbianas (SINGH e MACDONALD, 2010). Metagenômica é o estudo do metagenoma, nome dado ao conjunto dos genomas presente em uma amostra. Essa abordagem é baseada no isolamento de DNA diretamente de amostras ambientais, sendo este chamado de *e*DNA (do inglês "*environmental* DNA"). Ou seja, essa abordagem permite estudar e explorar micro-organismos sem passar pela etapa de cultivo destes, evitando assim a perda de biodiversidade que este passo impõe (HANDELSMAN et al., 1998).

Na abordagem metagenômica o *e*DNA pode ser expresso de forma heteróloga em hospedeiros facilmente cultiváveis como *Escherichia coli*, e assim os respectivos produtos naturais codificados pelo metagenoma de micro-organismos de difícil cultivo podem ser expressos, isolados, determinados e avaliados biologicamente (FENG; KALLIFIDAS; BRADY, 2011; KATZ; HOVER; BRADY, 2016). Ao contrário dos métodos dependentes de cultivo, em que apenas uma linhagem é analisada por vez, a metagenômica oferece ainda a vantagem de se investigar diversos genomas microbianos simultaneamente (BANIK e BRADY, 2010).

Uma das formas de analisar o metagenoma é através de triagem fenotípica/funcional, que visa a detecção de alterações fenotípicas e/ou atividades biológicas de interesse através do cultivo e análise dos clones que constituem a biblioteca metagenômica (EKKERS et al., 2012).

1.1. Triagem fenotípica/funcional de bibliotecas metagenômicas

Na triagem fenotípica buscam-se clones com características morfológicas diferentes do hospedeiro e na funcional são detectados clones com diferentes atividades biológicas, como antibiótica e enzimática. A probabilidade de isolar compostos utilizando-se triagem fenotípica/funcional depende de vários fatores como: sistema vetor-hospedeiro, tamanho do *e*DNA inserido, método de ensaio biológico para avaliação da atividade biológica e a eficiência da expressão heteróloga no hospedeiro de escolha (KATZ; HOVER; BRADY, 2016; UCHIYAMA e MIYAZAKI, 2009).

Um exemplo de um experimento simples de triagem funcional é a busca por metabólitos com atividade antimicrobiana. A biblioteca metagenômica a ser ensaiada é semeada em diversas placas de Petri contendo meio de cultura adequado (cerca de 1.500 clones são

semeados simultaneamente em cada placa) e a bactéria indicadora de bioatividade é semeada sobre esta biblioteca na forma de *top*-ágar. Caso o clone tenha atividade contra esta bactéria, um halo de inibição é formado em volta da respectiva colônia (BANIK e BRADY, 2010). Esta abordagem permitiu o isolamento e caracterização, por exemplo, de novas aminas de cadeia longa N-aciladas, bem como um antibiótico indólico (BRADY e CLARDY, 2000; BRADY e CLARDY, 2005), violaceína (BRADY et al., 2001), indigo (LIM et al., 2005), petídeos cíclicos como nocardamina (WANG et al., 2000) e patelamida D (LONG et al., 2005) (Figura 1), e o polieno metatricicloeno (IQBAL et al., 2016).

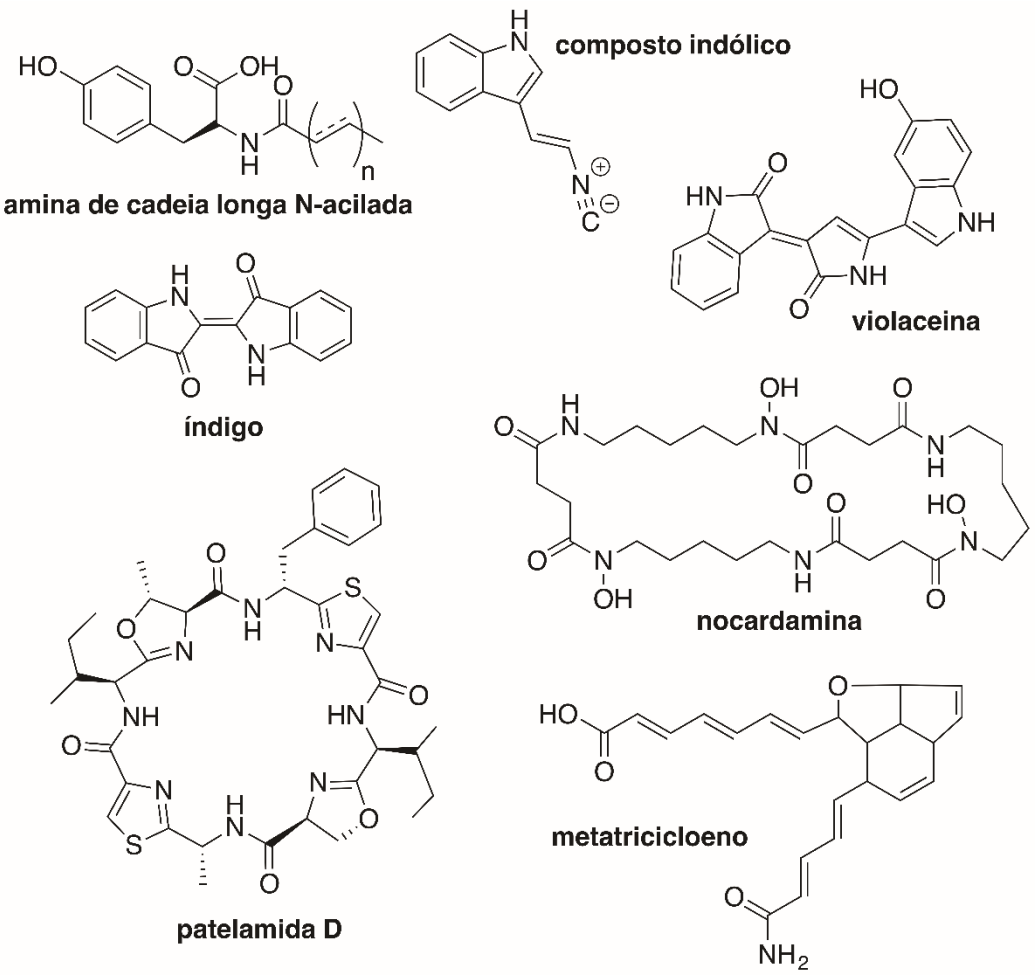

Figura 1: Exemplos de compostos bioativos que foram isolados empregando-se triagem fenotípica/funcional: aminas de cadeia longa N-aciladas, antibiótico indólico, violaceina, índigo, nocardamina, patelamida D, metatricicloeno.

1.2 Leishmaniose cutânea

Leishmaniose cutânea é uma doença parasitária que causa sérias lesões na pele, provocada por diferentes protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, como por exemplo *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania infantum* (EIRAS; KIRKMAN; MURRAY, 2015). O parasita é transmitido através do mosquito hematófago pertencente as espécies *Phlebotomys* spp. ou *Lutzomyia* spp.(ANDRADE-NETO et al., 2016). A incidência desta doença é de cerca de 0,7 - 1,3 milhões de novos casos a cada ano (ALVAR et al., 2012).

Atualmente são utilizados para o tratamento desta doença antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine (RATH et al., 2003). Entretanto, ainda não há disponível nenhum tratamento satisfatório para nenhuma forma de leishmaniose cutânea. Portanto, há grande necessidade de pesquisa por fármacos que possam combater este parasita. (MEARS et al., 2015). Este fato motivou o desenvolvimento de uma triagem antiparasitária utilizando a técnica metagenômica.

2. Conclusões

O ensaio funcional realizado com as bibliotecas metagenômicas pertencentes à coleção do laboratório foi capaz de detectar clones bioativos contra *L. major*, através de um ensaio inovativo ainda não descrito na literatura para a abordagem metagenômica (ensaio antiparasitário). Contudo, a análise química dos extratos brutos obtidos das culturas destes clones não permitiu a identificação do(s) composto(s) responsável(is) pelas atividades observadas. Talvez a metodologia utilizada para cultivo e obtenção dos extratos não tenha propiciado a biossíntese do(s) composto(s) bioativo(s). As análises biológicas corroboraram esta hipótese, pois não foi possível detectar a mesma atividade antiparasitária nem nos extratos nem no filtrado das culturas. Portanto, o ensaio funcional mostrou-se promissor na busca por clones bioativos contra *L. major*; entretanto, não foi possível obter o composto ativo.

O sequenciamento e análise do *e*DNA isolado de solo de Cerrado evidenciou a qualidade do protocolo utilizado em termos de quantidade de sequências bacterianas obtidas, bem como a quantidade de genes relacionados à produtos naturais e resistência a antibióticos. Portanto, o *e*DNA isolado de solo de Cerrado pode ser considerado promissor para a construção de novas bibliotecas metagenômicas visando a busca por produtos naturais.

Para um maior sucesso na utilização desta abordagem na busca por novos produtos naturais é preciso utilizar técnicas mais modernas envolvendo engenharia genética, sequenciamento e bioinformática. A metagenômica está adentrando uma era em que é possível realizar buscas guiadas por genes conservados de classes específicas de produtos naturais,

montar CGBs completos a partir de diferentes clones de uma biblioteca metagenômica, construir vetores e hospedeiros mais eficazes na expressão do CGB de interesse, o que está revolucionando a utilização desta abordagem.

Capítulo 2: Aspectos biológicos e químicos no estudo de interações microbianas

1. Introdução

Com o avanço das técnicas de sequenciamento e da bioinformática diversos genomas de micro-organismos estão sendo sequenciados e analisados em relação ao metabolismo secundário. Estes dados têm evidenciado o vasto potencial metabólico ainda desconhecido até mesmo de linhagens já bem estudadas (BALTZ, 2008; SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016). Para a maioria dos CGBs identificados nos genomas não se sabe o que eles codificam, apesar da análise dos genes permitir a proposição das classes desses compostos. Isso porque estes compostos não são detectados nas culturas laboratoriais – seja pela sua baixa expressão e, portanto, baixa quantidade produzida, prejudicando assim sua identificação, ou pelo fato destes CGBs de fato não estarem sendo expressos nestas condições de cultivo (ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014). O entendimento da regulação e função destes compostos para os micro-organismos pode ajudar a estimular sua expressão gênica, sendo, portanto, de grande valia no estudo de produtos naturais (BIBB, 2013; SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016; ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

Produtos naturais de origem microbiana são originados do metabolismo secundário destes organismos, que, ao contrário do metabolismo primário, não é considerado vital para o organismo. Considera-se que compostos originários do metabolismo secundário aumentam o *fitness* do organismo no ambiente no qual este está vivendo (JENKE-KODAMA; MÜLLER; DITTMANN, 2008). Estes compostos estão codificados em complexos CGBs presentes no DNA ou em plasmídeos, e sua expressão envolve diversas enzimas e reações químicas com grande gasto energético e de precursores. Portanto, estes CGBs não são expressos constitutivamente e estão sob regulação de mecanismos ainda pouco conhecidos, mas que devem estar relacionados a fatores presentes no meio ambiente em que as linhagens evoluíram tendo em vista a função destes compostos (ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

Condições laboratoriais clássicas de cultivo para obtenção de produtos naturais são diferentes das condições existentes no ambiente natural dos micro-organismos, sendo menos desafiadoras e mais propensas ao bom e rápido desenvolvimento do micro-organismo (DAVIES e RYAN, 2012). Em seu nicho natural, os micro-organismos estão imersos em um

ambiente complexo com parâmetros abióticos variáveis e em constante relação com os demais seres vivos circundantes através de interações antagônicas, sinérgicas, regulatórias e modulatórias (BERDY, 2005; BERTRAND et al., 2014). Tendo em vista as atividades biológicas evidenciadas em diversos estudos, produtos naturais podem ter papel importante nessas interações, representando uma estratégia importante na sobrevivência dos indivíduos. Assim sendo, essas interações são possivelmente necessárias para ativar certas rotas metabólicas que não são vitais ao indivíduo (BERTRAND et al., 2014; SCHERLACH e HERTWECK, 2009).

Quando duas ou mais linhagens microbianas dividem o mesmo micro-ambiente estas podem competir por nutriente e espaço, gerando um estresse no crescimento dos indivíduos. Esta interação pode ser mediada por produtos naturais que, por exemplo, podem agir inibindo o crescimento do competidor como forma de eliminá-lo. Assim sendo, a presença de outros organismos em um mesmo meio de cultivo (co-cultura) pode aumentar ou até mesmo ativar a expressão de CGBs que permanecem silenciosos quando a linhagem cresce em um ambiente de baixo estresse como o seu respectivo cultivo puro, levando ao isolamento de diferentes produtos naturais (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014; PETTIT, 2009; ZHU; SANDIFORD; VAN WEZEL, 2014).

1.1. Interações interespecíficas: o uso da co-cultura

Um recente estudo desenvolvido por TRAXLER e colaboradores (2013) evidenciou a relevância da utilização de interações microbianas como ferramenta para acessar a capacidade metabólica de micro-organismos. Isto foi demostrado através do estudo metabolômico por nanoDESI e redes moleculares (*molecular networking*) da actinobactéria *Streptomyces coelicolor* quando co-cultivada aos pares com outras linhagens. Apesar de *S. coelicolor* já ter sido vastamente estudada e ser bem caracterizada na literatura, TRAXLER e colaboradores mostraram que o seu co-cultivo com outras actinobactérias é capaz de estimular a biossíntese de diversos compostos que ainda não haviam sido descritos para esta linhagem, como um grupo de acil-desferroxaminas (figura 20), sendo que cada par apresentou compostos exclusivos decorrentes da interação específica, além de diversos outros compostos ainda não descritos na literatura (TRAXLER et al., 2013). Portanto, esse estudo mostra que mesmo linhagens já conhecidas e caracterizadas podem ser fonte de novos compostos através do uso de ferramentas que sejam capazes de ativar rotas metabólicas silenciadas no clássico cultivo simples, evidenciando o potencial deste tipo de abordagem para o estudo de produtos naturais.

Outros exemplos de compostos obtidos utilizando esta metodologia são: alchivemicina A (figura 20), composto antibacteriano e antifúngico produzido pelo fungo *Tsukamurella pulmonis* quando em co-cultura com *Streptomyces lividans* ou *Streptomyces endus* (ONAKA et al., 2011); os compostos fumiformamida e N,N'- ((1Z,3Z)-1,4-bis(4-metoxifenil)buta-1,3-dieno-2,3-dilil)di-formamida (figura 20), produzidos quando o fungo *Aspergillus fumigatus* é co-cultivado com *Streptomyces peucetius* (ZUCK; SHIPLEY; NEWMAN, 2011); e o compostos N-demetilofiosetina, pallidorosetina A e pallidorosetina B (figura 20), produzidos quando o fungo *Fusarium pallidoroseum* é co-cultivado com a actinobactéria *Saccharopolyspora erythrae* (WHITT et al., 2014).

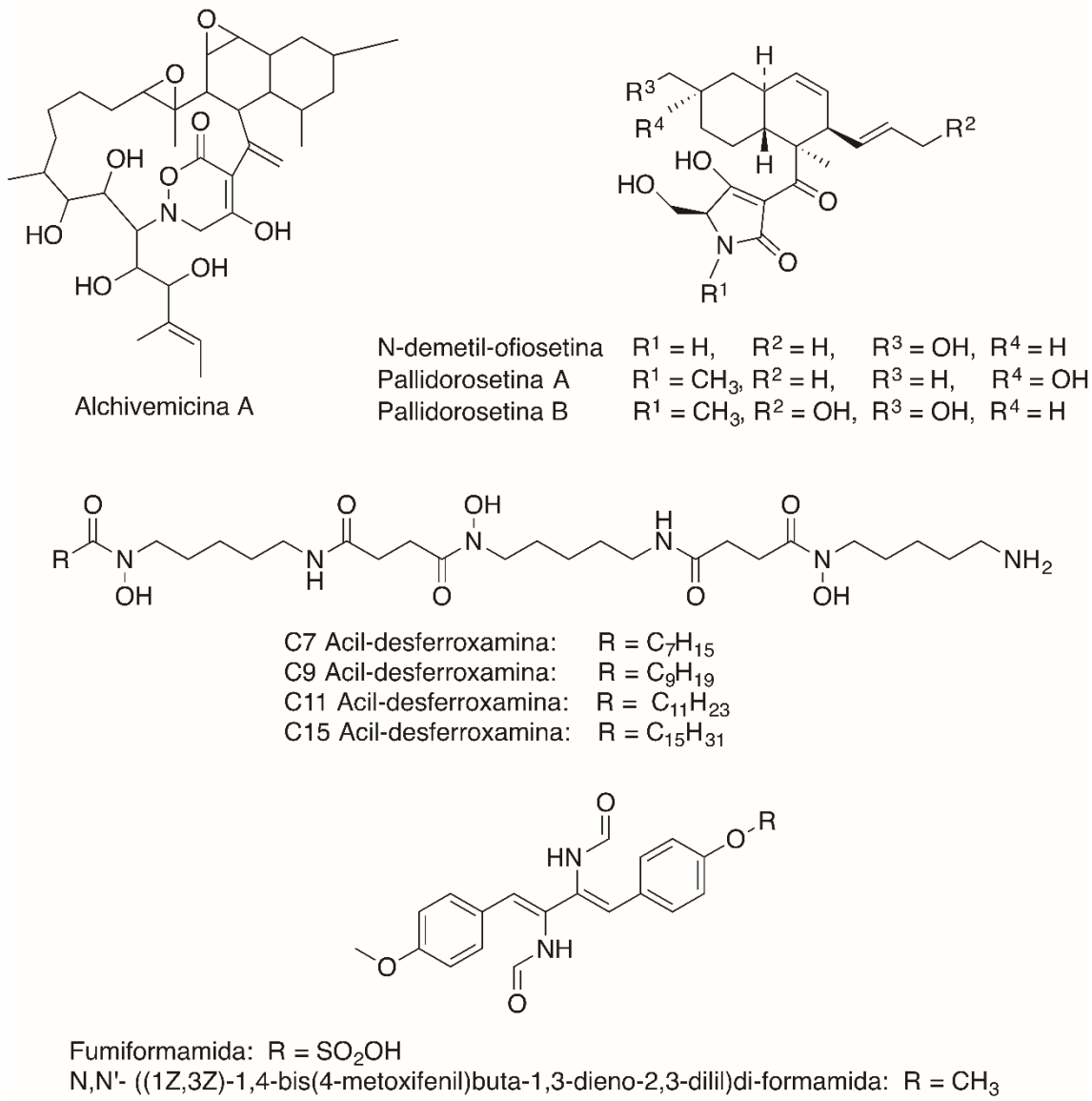

Figura 2: Exemplos de compostos que foram isolados utilizando a técnica de co-cultura.

1.2. Táxon Actinobacteria e linhagens pouco exploradas: endofíticas e raras

O sucesso do estudo de produtos naturais, principalmente quando se busca por bioatividade e novidade estrutural, depende em parte da escolha adequada dos organismos a serem explorados. O táxon Actinobacteria é conhecido por sua ampla capacidade metabólica (GUNATILAKA, 2006), sendo responsável por cerca da metade de todos os antibióticos já descobertos, como por exemplo a estreptomicina, tetraciclina e neomicina (BERDY, 2005; ZERIKLY e CHALLIS, 2009), representando, assim, uma importante fonte de produtos naturais. Portanto, o estudo de linhagens de actinobactérias ainda pouco exploradas, como, por exemplo, aquelas de origem endofítica e de gêneros considerados raros, pode ser considerado como promissor para o isolamento de novas substâncias bioativas.

1.2.1. Actinobactérias endofíticas

Endofíticos podem ser definidos como micro-organismos simbiontes que passam toda ou parte de sua vida colonizando tecidos da planta inter- ou intracelularmente de forma harmônica (SCHNEIDER; MISIEK; HOFFMEISTER, 2008). Nesta simbiose a planta oferece nutrientes, proteção e substrato; os micro-organismos, por sua vez, apresentam um metabolismo secundário diverso, podendo conferir proteção contra patógenos e herbivoria, e até mesmo influenciar no desenvolvimento, crescimento e produtividade de seu hospedeiro, aumentando, assim, sua adaptabilidade e competitividade no meio ambiente (GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; TAN e ZOU, 2001). Considerando esta hipótese como verdadeira, espera-se que ao longo da evolução haja uma seleção para micro-organismos endofíticos que tenham uma grande produção de metabólitos secundários biativos (SMANSKI; SCHLATTER; KINKEL, 2016), tornando este ambiente de grande interesse para produtos naturais com potencial terapêutico.

De fato, estudos de micro-organismos endofíticos têm levado à caracterização química de um grande número de metabólitos secundários pertencentes a diversas classes, como por exemplo, terpenoides, alcaloides, esteroides, flavonoides, lactonas, lignanas, fenilpropanoides, entre outros, com diversas atividades biológicas: antibióticas, antitumoral, anti-viral, antioxidantes, imunossupressores, anti-helmínticos, inseticidas etc. (BRADER et al., 2014; GUO et al., 2008; NEWMAN e CRAGG, 2015; STROBEL e DAISY, 2003; ZHANG; WEI; TAN, 2015). Fungos endofíticos têm sido estudados mais frequentemente, entretanto, bactérias endofíticas ainda permanecem pouco exploradas.

Alguns exemplos de compostos isolados de actinobactérias endofíticas são: o composto antifúngico saadamicina, produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. Hedaya48 isolada de

Aplysina fistularis (EL-GENDY e EL-BONDKLY, 2010); o terpenoide com atividade antibacteriana kandenol A (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. HKI0595 isolada de *Kandelia candel* (DING et al., 2012); o composto com atividade antibacteriana heraclemicina D (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. Y3111 isolada de *Heracleum souliei* (LIU et al., 2014); a antraciclina com atividade antibacteriana e citotóxica misamicina (figura 21), produzida pela linhagem *Streptomyces* sp. YIM66403 (LI et al., 2015); e o composto com atividade antibacteriana e citotóxica 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona (figura 21), produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. RLe 8 isolada de *Lychnophora ericoides* (CONTI et al., 2016).

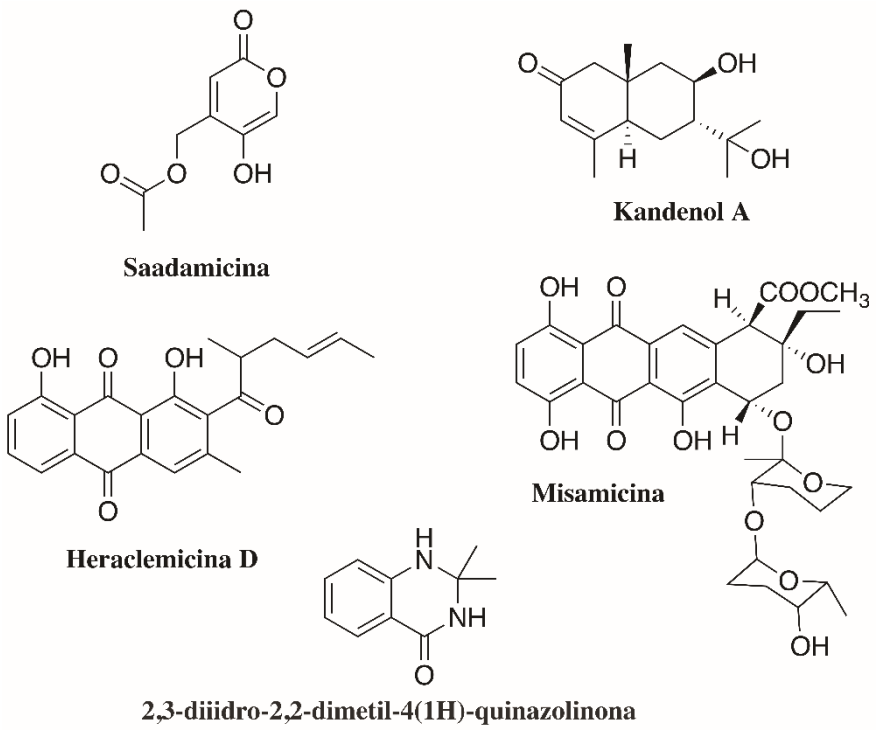

Figura 3: Exemplos de compostos isolados de actinobactérias endofíticas.

1.2.2. Actinobactérias raras

São consideradas actinobactérias raras aquelas de gêneros diferentes de *Streptomyces*, que possuem frequências menores de isolamento quando utilizadas metodologias clássicas (TIWARI e GUPTA, 2013). Alguns exemplos são os gêneros *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura, Kutzneria* e *Krasilnikovia*. Estudos de actinobactérias raras também têm levado

à caracterização química e biológica de vários metabólitos bioativos de diversas classes. Exemplos e mais detalhes sobre este grupo estão presentes no capitulo 3 desta tese.

2. Conclusões

A comunidade estudada de actinobactérias endofíticas da raiz de *T. diversifolia* não apresentou grande diversidade taxonômica, sendo todas as linhagens isoladas pertencentes ao gênero *Streptomyces* e quase metade similares a uma mesma espécie descrita na literatura como exercendo potencial influência positiva em rizosferas, evidenciando então uma possível relação positiva entre as linhagens endofíticas e a planta hospedeira, estando de acordo com a teoria da simbiose endofítica.

Ensaios biológicos de cultivos em meio sólido e líquido demonstraram grande potencial das linhagens endofíticas para produção de compostos bioativos. Vale destacar a elevada bioatividade observada contra *P. syringae*, um fitopatógeno Gram-negativo, reforçando uma possível relação positiva entre as linhagens isoladas e a planta hospedeira.

Os resultados aqui obtidos demonstram que interações microbianas são capazes de alterar o metabolismo de micro-organismos. Interações entre as linhagens endofíticas sugerem que linhagens relacionadas entre si são mais propensas a interagir entre si e ter seu desenvolvimento alterado devido ao co-cultivo, comprovando a relevância de se estudar este ambiente. Foram observadas muitas relações antagônicas, o que pode representar um possível controle populacional que poderia ser relevante para manter o *status* endofítico destas linhagens dentro do hospedeiro. Além disso, a maioria dos fitopatógenos Gram-positivos descritos são do táxon Actinobacteria, portanto este antagonismo entre actinobactérias endofíticas poderia também proteger a planta contra estes fitopatógenos. Portanto, as metodologias utilizadas permitiram a realização de algumas inferências ecológicas da comunidade de actinobactérias endofíticas isoladas da raiz de *T. diversifolia*.

A metodologia de co-cultivo mostrou-se promissora para a busca por compostos bioativos. Entretanto, apesar de apresentar grande potencial para o estudo de metabolismo secundário de micro-organismos, principalmente pela capacidade de estimular a expressão de *clusters* biossintéticos crípticos, esta técnica apresentou resultados não-reprodutíveis com as linhagens em estudo e condições utilizadas, provavelmente devido a variações naturais do metabolismo bacteriano frente a parâmetros bióticos e abióticos.

Foi escolhida para caracterização química e biológica a interação entre uma actinobactéria rara, pertencente a um gênero que ainda não apresenta nenhum estudo na literatura (*Krasilnikovia* sp. T082) e uma actinobactéria endossimbionte de besouro

(*Streptomyces* sp. SPB78). Análises por imageamento por espectrometria de massas revelaram que esta interação é complexa, representando, portanto, um rico material de estudo para compreensão de interações interespecíficas. Foram selecionados dois compostos para isolamento: o antibiótico e o composto que induz sua biossíntese. Diversas técnicas foram testadas para o processo de isolamento destes. Este processo apresentou grande complexidade devido ao caráter polar de ambos compostos, e pelo fato da atividade antibiótica ser instável. Apesar de não ter sido possível elucidar a estrutura dos compostos propostos foi possível realizar diversas caracterizações químicas e biológicas acerca do fenômeno observado. Análises biológicas demonstraram que o antibiótico induzido tem atividade bacteriolítica e é capaz de inibir o crescimento do micro-organismo indutor, sugerindo importância ecológica deste composto, o que também não tem sido demonstrado com frequência em estudos de interações interespecífica no campo de produtos naturais. Com relação ao composto indutor, os dados obtidos sugerem natureza diversa deste, provavelmente sendo alguns compostos de natureza glicosídica e/ou peptídica, e que não se trata de um único composto específico já que diversas outras linhagens de actinobactérias foram capazes de induzir o mesmo fenômeno e diversas frações apresentaram atividade durante o fracionamento guiado por bioatividade.

Vale ressaltar que o uso da metodologia de co-cultivo permitiu neste estudo a seleção de uma linhagem pertencente a um gênero de actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo secundário estudado (*Krasilnikovia*). Isto foi realizado através da investigação de seu genoma e também através do isolamento de compostos produzidos por esta linhagem, dados que estão descritos no capitulo 3 desta tese.

Capítulo 3: Estudo genômico e químico do metabolismo secundário de *Krasilnikovia* sp. T082

1. Introdução

Grande parte da pesquisa em produtos naturais de micro-organismos tem sido realizada com linhagens do gênero *Streptomyces*, dando origem a compostos pertencentes a diversas classes de antibióticos: macrolídeos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, polienos dentre outros (KATZ e BALTZ, 2016). O gênero *Streptomyces* tem dominado o cenário de produtos naturais devido ao fato de ser mais facilmente isolado e cultivado dentre os gêneros pertencentes ao táxon Actinobacteria (TIWARI e GUPTA, 2013). Cerca de 76% dos compostos bioativos isolados deste táxon entre os anos de 1940-2010 são provenientes deste único gênero, sendo o

restante isolado de linhagens pertencentes ao grupo das chamadas “actinobactérias raras” (actinobactérias de outros gêneros de isolamento mais difícil), que, apesar de ainda pouco representadas na pesquisa de produtos naturais, compreendem uma vasta diversidade biológica (BERDY, 2012; TIWARI e GUPTA, 2012).

O sequenciamento do genoma de diversas linhagens de actinobactérias raras tem demonstrado que sua capacidade de metabolismo secundário é tão surpreendente quanto a de actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Portanto, este grupo representa uma importante fonte de produtos bioativos (CHOI et al., 2015; TIWARI e GUPTA, 2012, 2013). Estudos de actinobactérias raras têm levado à caracterização química e biológica de vários metabólitos bioativos de diversas classes, como lactonas, macrolídeos, aminoglicosídeos, piperidinas, terpenoides, quinonas entre outros. Alguns exemplos de importantes compostos bioativos isolados de actinobactérias raras são: teicoplanina (*Actinoplanes teichomyceticus*), gentamicina (*Micromonospora purpurea*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*) e eritromicina (*Saccharopolyspora erythraea*) (figura 56) (TIWARI e GUPTA, 2012).

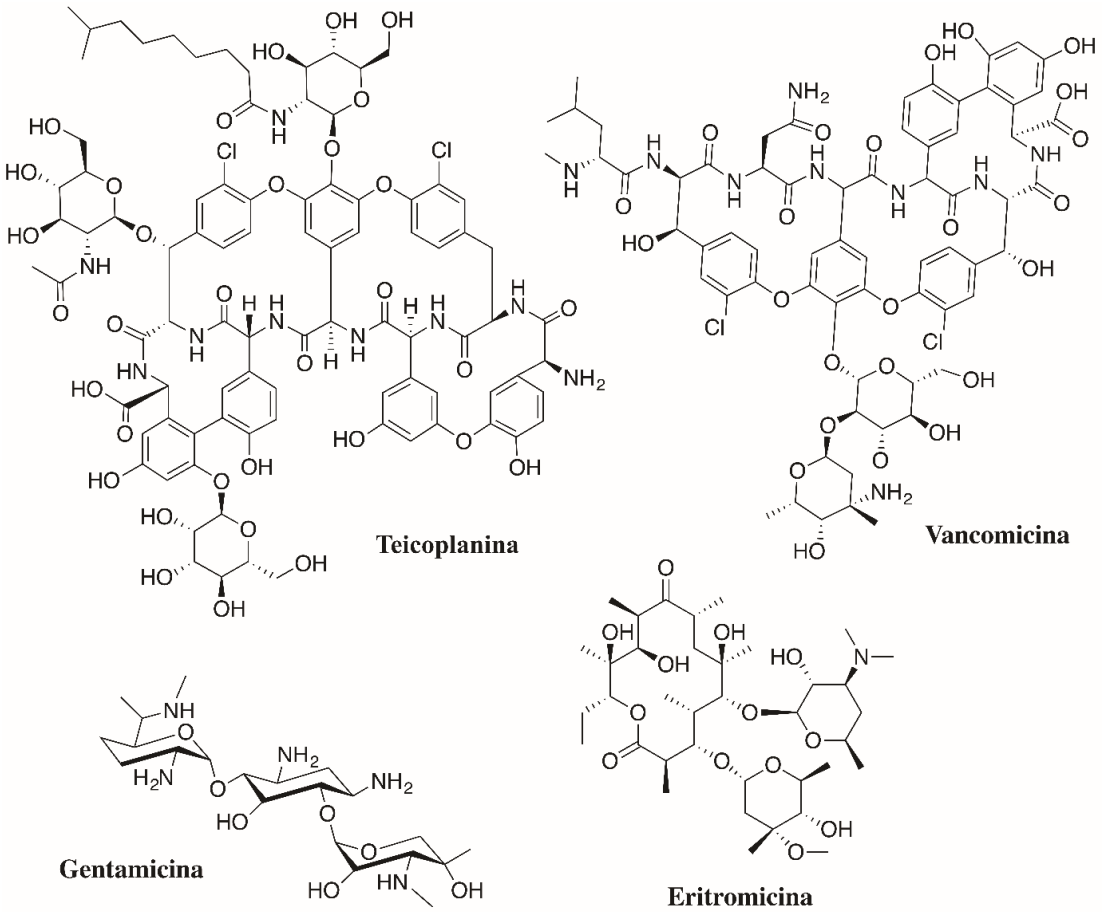

Figura 4: Exemplos de produtos naturais bioativos isolados de actinobactérias raras: teicoplanina (*Actinoplanes teichomyceticus*), gentamicina (*Micromonospora purpurea*), vancomicina (*Amycolatopsis orientalis*) e eritromicina (*Saccharopolyspora erythraea*) (TIWARI e GUPTA, 2012).

1.1 Isolamento de actinobactérias raras

Tendo em vista que actinobactérias do gênero *Streptomyces* possuem crescimento mais rápido, há uma necessidade em utilizar métodos específicos para evitar o crescimento destes e facilitar o crescimento/isolamento de actinobactérias raras (JOSE e JEBAKUMAR, 2013). Esses métodos levam em consideração características específicas dos diferentes gêneros de actinobactérias, como resistência a altas temperaturas, a exposição em luz UV e outros tipos de irradiações, uso de fontes de carboidrato e nitrogênio especificas, antibióticos, etc (TIWARI e GUPTA, 2013).

Alguns grupos de actinobactérias apresentam esporos móveis, sendo este um fenótipo útil no isolamento específico de actinobactérias raras, tendo em vista que *Streptomyces* não possuem esta característica. Alguns exemplos são *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Actinokineospora*, *Actinosynnema* e *Kineosporia* (HAYAKAWA et al., 2000). Hayakawa e colaboradores desenvolveram em 2000 um método de isolamento considerando esta característica, que foi chamado de "Reidratação-Centrifugação" (RC). Este método também leva em consideração o fato de que alguns grupos possuem esporos resistentes a desidratação. Em linhas gerais, este método consiste em desidratar a amostra de interesse e depois reidratar para facilitar a liberação dos esporos móveis. Em seguida, esta solução contendo esporos passa por uma série de centrifugações consecutivas em que apenas o sobrenadante é coletado. Desta forma, espera-se que a amostra final esteja enriquecida com esporos móveis, ou seja, com linhagens de actinobactérias raras (HAYAKAWA et al., 2000).

1.2 *Krasilnikovia* sp. T082

No ano de 2011 o pós-doutorando Dr. Matthew Traxler (atual professor da *University of California,* Berkeley) realizou um grande isolamento de actinobactérias raras de solo de várias partes do mundo no laboratório do Prof. Roberto Kolter (*Harvard Medical School*), utilizando a técnica RC descrita no tópico anterior.

As linhagens pertencentes a esta coleção foram cultivadas aos pares, experimento no qual a linhagem T082 se destacou (capítulo 2 desta tese). Esta linhagem interagiu com diversas outras linhagens, produzindo um composto com atividade antibiótica que foi somente detectado durante essas interações (resultado descrito no capitulo 2 desta tese). Esta resposta evidenciou que esta linhagem é capaz de sentir seu micro-ambiente e responder a mudanças ajustando seu metabolismo secundário.

A linhagem T082 foi isolada de solo do estado de Oklahoma, EUA. Análise da sequência do gene do 16S rRNA evidenciou similaridade de 99% com a linhagem *Krasilnikovia*

cinnamonea, uma linhagem isolada de solo de Bangladesh (ARA e KUDO, 2007). Como a linhagem T082 não exibiu produção de esporos em meio de cultura em que foi relatado produção de esporos no artigo de descrição de *Krasilnikovia cinnamonea* (ARA e KUDO, 2007), decidiu-se denominar a linhagem T082 de *Krasilnikovia* sp. T082.

O gênero *Krasilnikovia* foi descrito pela primeira vez em 2007 e pertence à família Micromonosporaceae, sendo mais próximo filogeneticamente aos gêneros *Couchioplanes* e *Actinoplanes* (ARA e KUDO, 2007). Esta família é descrita na literatura como importante fonte de produtos naturais, tendo sido relatado o isolamento de compostos variados, como macrolídeos, lactonas, peptídeos cíclicos, ribonuclueosídeos, dentre outros. Dentro desta família destaca-se o gênero *Micromonospora* para produção de produtos naturais. Também há diversos metabólitos bioativos descritos para o gênero *Actinoplanes*, como a já citada teicoplanina (figura 56) a naftoquinona purpuromicina (figura 57, *Actinoplanes ianthinogenes*) (CORONELLI et al., 1974) e a xantona SCh 42137 (figura 57, *Actinoplanes* sp. SCC 1906) (COOPER et al., 1992).

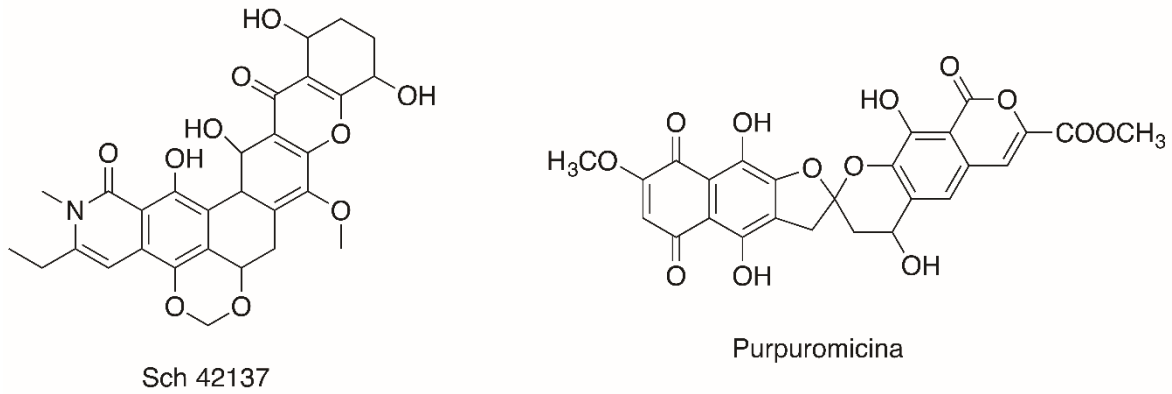

Figura 5: Produtos naturais bioativos isolados de actinobactérias raras pertencentes ao gênero *Actinoplanes*.

Até o momento há apenas uma espécie descrita para este gênero *Krasilnikovia*: *Krasilnikovia cinnamonea* (ARA e KUDO, 2007). Esta é a única publicação a respeito deste gênero. Portanto, ainda não há nenhum estudo químico ou genômico a respeito do metabolismo secundário deste gênero, o que desperta interesse no estudo deste.

2. Conclusões

A análise do genoma de *Krasilnikovia* sp. T082 demonstrou que esta linhagem tem um alto potencial para biossíntese de produtos naturais novos, apresentando pelo menos 21 CGBs detectados pelo antiSMASH. Destes 21 CGBs, apenas quatro apresentaram alta similaridade

com algum CGB já depositado nos bancos de dados disponíveis, evidenciando o potencial desta linhagem em biossintetizar compostos novos.

Esta linhagem foi cultivada em dois meios de cultura diferentes, e diferentes metodologias de extração foram empregadas. Foram identificadas algumas dicetopiperazinas, que são conhecidas por seu amplo espectro de atividades biológicas, e três compostos pertencentes a uma classe de peptídeos não-ribossomais que possuem estrutura química complexa e incomum para produtos naturais. Estes últimos apresentaram boa atividade contra bactérias Gram-positivas inclusive contra diferentes linhagens MRSA. Este estudo demonstrou também a relevância em utilizar a estratégia de *genome mining* no estudo de produtos naturais, já que os dados genômicos obtidos e analisados auxiliaram na rápida determinação de três compostos de estrutura química complexa e não-usual em produtos naturais.

Os resultados obtidos mostram que a linhagem *Krasilnikovia* sp. T082 tem crescimento influenciado e metabolismo secundário expresso de maneira diferente dependendo do meio de cultura utilizado, evidenciando a importância da variação da composição do meio de cultura para o acesso da real capacidade metabólica de micro-organismos.

Considerações Finais

É de amplo conhecimento a necessidade de buscar novos produtos naturais bioativos devido ao alarmante crescimento do número de linhagens microbianas clínicas multirresistentes. Entretanto, para aumentar as chances de encontrar produtos novos, tem-se percebido cada vez mais a importância de compreender mais amplamente o funcionamento do metabolismo secundário microbiano (principal fonte de produtos naturais) para tirar o máximo de proveito deste. Isto exige o uso de técnicas diferenciadas e cada vez mais multidisciplinares.

Informações advindas de sequenciamento do genoma de diversos micro-organismos têm evidenciado o grande potencial que tem sido perdido tanto em biodiversidade quanto em inúmeros CGBs crípticos relacionados ao metabolismo secundário. Esta tese uniu nas abordagens utilizadas e interpretação dos resultados conhecimentos provenientes de várias esferas para a investigação do metabolismo secundário microbiano, com especial enfoque em actinobactérias.

Na abordagem metagenômica tratada no capítulo 1 e *genome mining* tratado no capítulo 3 foram utilizadas ferramentas de bioinformática, conhecimentos sobre expressão gênica, sobre organização e função de genes dentro de CGBs relacionados à produtos naturais, e relação estrutura química-genes. Portanto, foram reunidos conhecimentos advindos de genômica,

biologia molecular, bioinformática e química de produtos naturais para explorar o potencial de micro-organismos dificilmente cultiváveis (no caso da metagenômica) e de uma actinobactéria rara que nunca teve seu metabolismo investigado (no caso de *genome mining*).

Aqui neste trabalho o uso de metagenômica descrito no capítulo 1 mostrou-se promissor por ter utilizado um novo ensaio funcional antiparasitário, mas também evidenciou a necessidade de utilizar técnicas mais modernas envolvendo sequenciamento em massa, análises bioinformáticas mais detalhadas e técnicas de biologia molecular mais profundamente visando aumentar a chance de sucesso. Análises prévias de sequenciamento de *e*DNA permitem já prever que tipos de compostos estão codificados e depois deve ser estudada a melhor forma de acessar essa informação, utilizando conhecimentos sobre estrutura de um CGB e o que é necessário para correta expressão dos genes nele contidos. A metagenômica voltada à diversidade taxonômica já está bem estabelecida, mas a metagenômica voltada ao estudo de produtos naturais ainda está sendo aprimorada.

No estudo de interações microbianas (tratado no capítulo 2) exemplificou-se a importância de levar em consideração aspectos ecológicos no momento de decidir os experimentos a serem realizados com as linhagens em estudo. Relações simbióticas são produto de um longo processo evolutivo, sendo que o metabolismo secundário dos indivíduos apresenta papel importante nessas interações, e isto deve ser explorado ao estudar um micro-organismo. Deve-se aproximar cada vez mais o modo de cultivo às condições naturais das linhagens em estudo, pois estas podem conter os estímulos necessários para expressão de CGBs que permanecem crípticos em condições clássicas laboratoriais. Relações simbióticas são complexas e diversas interações microbianas devem ocorrer em seu meio ambiente natural. Portanto, entender como diferentes linhagens microbianas interagem entre si é fundamental para acessar de forma mais completa o potencial metabólico presente em seus genomas.

Os experimentos aqui realizados (descritos no capítulo 2) permitiram algumas inferências a respeito das relações ecológicas envolvidas na simbiose planta-micro-organismos, principalmente entre actinobactérias isoladas de um mesmo hospedeiro, ao ver como uma linhagem se comporta frente a outra. Muitas alterações fenotípicas foram observadas, o que é um indicativo que esta metodologia influenciou no metabolismo secundário das linhagens em estudo, sendo, portanto, uma ferramenta para expressá-lo de maneira diferenciada. Estas alterações evidenciaram uma possível competição entre as linhagens simbióticas, o que pode ser importante para manter um *status* endofítico destas linhagens e seu hospedeiro através de um possível controle populacional. Além disso, os micro-organismos endofíticos aqui estudados mostraram-se promissores pelo fato de muitas linhagens terem apresentado atividade

antimicrobiana, sendo, portanto, uma boa fonte de produtos naturais. Esta característica é um indicativo que estas linhagens possam talvez conferir proteção à planta hospedeira contra fitopatógenos.

O *genome mining* descrito no capitulo 3 permitiu acessar a capacidade metabólica da linhagem de actinobactéria rara em estudo, sendo possível analisá-la sem a necessidade de cultivo. Os cultivos realizados evidenciaram que as condições laboratoriais não permitem acessar facilmente este potencial. Apesar de terem sido encontrados diversos CGBs interessantes, foram isolados apenas compostos simples da classe das dicetopiperazinas e um grupo de NRPs análogos previstos durante o *genome mining*. Os demais CGBs identificados permaneceram ou crípticos, ou foram pouco expressos (produzindo compostos em baixas quantidades).

Os NRPs isolados possuem estrutura química interessante e peculiar para produtos naturais, e a informação gênica obtida permitiu uma determinação estrutural mais focada e rápida, mostrando a importância de combinar diversas metodologias até mesmo na determinação estrutural, algo que classicamente tem sido apenas realizado com conhecimentos da área de química. O estudo biológico da linhagem mostrou que essa produção dos NRPs isolados está ligado à fase de crescimento da linhagem, demonstrando a importância de investigar a parte biológica e química no estudo de produtos naturais, pois o entendimento do desenvolvimento de uma linhagem e como o metabolismo é alterado ao longo das diferentes fases de crescimento pode aumentar as chances de isolamento de diferentes compostos de uma mesma linhagem.

A ciência não é estática e tem se tornado evidente a importância da multidisciplinaridade para ter um real entendimento e explorar ao máximo o material de estudo. É de grande relevância acadêmica a formação de pesquisadores capazes de entender e transitar entre as diferentes áreas do saber, e o desenvolvimento desta tese permitiu isso de maneira satisfatória.

Bibliografia

ABED, R. M., et al. Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 759-772, 2013.

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R. ; CREWS, P. New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx* cf. *podatypa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.

ALTSCHUL, S. F., et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVAR, J., et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDRADE-NETO, V. V., et al. Antileishmanial activity of ezetimibe: inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles and efficacious in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, *In press*. 2016.

ARA, I. ; KUDO, T. *Krasilnikovia* gen. nov., a new member of the family Micromonosporaceae and description of *Krasilnikovia cinnamonea* sp. nov. **Actinomycetologica**, v. 21, n. 1, p. 10, 2007.

ARIYO, B., et al. Enhanced penicillin production by oligosaccharides from batch cultures of *Penicillium chrysogenum* in stirred-tank reactors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 166, n. 1, p. 165-170, 1998.

AWAKAWA, T., et al. Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. **Chembiochem**, v. 12, n. 3, p. 439-448, 2011.

AZIZ, R. K., et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. p. 75, 2008.

BALTZ, R. H. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 557-563, 2008.

BANIK, J. J. ; BRADY, S. F. Recent application of metagenomic approaches toward the discovery of antimicrobials and other bioactive small molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 603-609, 2010.

BELIN, P., et al. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 961-979, 2012.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 65, n. 8, p. 385-395, 2012.

BERENDONK, T. U., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2015.

BERTRAND, S., et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.

BEZERRA, D. P., et al. Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from *Piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 6, 2012.

BIBB, M. J. Understanding and manipulating antibiotic production in actinomycetes. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 6, p. 1355-1364, 2013.

BRADER, G., et al. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, n. p. 30-37, 2014.

BRADY, S. F. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1297-1305, 2007.

BRADY, S. F.; CHAO, C. J. ; CLARDY, J. Long-chain N-acyltyrosine synthases from environmental DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6865-6870, 2004.

BRADY, S. F., et al. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. **Organic Letters**, v. 3, n. 13, p. 1981-1984, 2001.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental. DNA **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 51, p. 12903-12904, 2000.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. Cloning and heterologous expression of isocyanide biosynthetic genes from environmental DNA. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 43, p. 7063-7065, 2005.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.

CHARLOP-POWERS, Z.; MILSHTEYN, A.; BRADY, S. F. Metagenomic small molecule discovery methods. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, n. p. 70-75, 2014.

CHARLOP-POWERS, Z., et al. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. **eLife**, v. 4, n. p. e05048, 2015.

CHOI, S.-S., et al. Genome mining of rare actinomycetes and cryptic pathway awakening. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1184-1193, 2015.

CHUNG, E. J., et al. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 723-730, 2008.

CLSI. Twenty-second informational supplement. CLSI document M100-S22. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012, Wayne, PA, EUA.

CLSI. Twenty-third informational supplement. CLSI document M100-S23. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013, Wayne, PA, EUA.

CONTI, R., et al. Endophytic actinobacteria from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the biological potential of their secondary metabolites. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 6, p. 727-736, 2016.

COOPER, R., et al. Sch 42137, a novel antifungal antibiotic from an *Actinoplanes* sp. Fermentation, isolation, structure and biological properties. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 45, n. 4, p. 444-453, 1992.

CORONELLI, C., et al. Purpuromycin, a new antibiotic isolated from *Actinoplanes ianthinogenes* N. sp. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 27, n. 3, p. 161-168, 1974.

CRAIG, J. W.; CHANG, F. Y. ; BRADY, S. F. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 1, p. 23-28, 2009.

CRAIG, J. W., et al. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1633-1641, 2010.

D'COSTA, V. M., et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374-377, 2006.

DANIEL, R. The soil metagenome - a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2004.

DAVIES, J. ; RYAN, K. S. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 252-259, 2012.

DELL, A., et al. Structure revision of the antibiotic echinomycin. **Journal of American Chemical Society**, v. 97, n. 9, p. 2497-2502, 1975.

DEMAIN, A. L. ; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DING, L., et al. Kandenols A-E, eudesmenes from an endophytic *Streptomyces* sp. of the mangrove tree *Kandelia candel*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2223-2227, 2012.

DUNCAN, K. R., et al. Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. **Chemical Biology**, v. 22, n. 4, p. 460-471, 2015.

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A. ; MURRAY, H. W. Cutaneous leishmaniasis: current treatment practices in the USA for returning travelers. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 2015.

EKKERS, D. M., et al. The great screen anomaly--a new frontier in product discovery through functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1005-1020, 2012.

EL-GENDY BEL, D.; RATEB, M. E. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. **Bioorganic Medicinal Chemical Letters**, v. 25, n. 16, p. 3125-3128, 2015.

EL-GENDY, M. M.; EL-BONDKLY, A. M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 831-841, 2010.

FEIL, H., et al. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11064-11069, 2005.

FENG, Z.; KALLIFIDAS, D.; BRADY, S. F. Functional analysis of environmental DNA-derived type II polyketide synthases reveals structurally diverse secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 12629-12634, 2011.

FERNÁNDEZ, J., et al. Biosynthetic modularity rules in the bisintercalator family of antitumor compounds. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2668-2699, 2014.

FERREIRA, E. G., et al. Prospecting anticancer compounds in actinomycetes recovered from the sediments of Saint Peter and Saint Paul's archipelago, Brazil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 9, p. 1149-1157, 2016.

FRANCIS, I.; HOLSTERS, M. ; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010.

GAIDA, S. M., et al. Expression of heterologous sigma factors enables functional screening of metagenomic and heterologous genomic libraries. **Nature Communications**, v. 6, n. p. 7045, 2015.

GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 10, p. 833-845, 2016.

GUIMARÃES, D. O., et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11–12, p. 1423-1429, 2010.

GUNATILAKA, A. A. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GUO, B., et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, v. 44, n. 2, p. 153-158, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, 1999.

HANDELSMAN, J., et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245-249, 1998.

HAYAKAWA, M., et al. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 2, p. 171-185, 2000.

HOPWOOD, D. A. How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 937-940, 2007.

IQBAL, H. A., et al. Natural product discovery through improved functional metagenomics in *Streptomyces*. **Journal of American Chemical Society**, v. 138, n. 30, p. 9341-9344, 2016.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JAYASURIYA, H., et al. Identification of diverse microbial metabolites as potent inhibitors of HIV-1 Tat transactivation. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 1, p. 112-122, 2005.

JENKE-KODAMA, H.; MÜLLER, R. ; DITTMANN, E. Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity. **Progress in Drug Research**, v. 65, n. p. 119, 121-140, 2008.

JOSE, P. A. ; JEBAKUMAR, S. R. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. p. 240, 2013.

KALLIFIDAS, D. ; BRADY, S. F. Reassembly of functionally intact environmental DNA-derived biosynthetic gene clusters. **Methods in Enzymology**, v. 517, n. p. 225-239, 2012.

KATZ, L. ; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KATZ, M.; HOVER, B. M. ; BRADY, S. F. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 129-141, 2016.

KIM, O. S., et al. 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. Pt 3, p. 716-721, 2012.

KODANI, S., et al. Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from *Amycolatopsis alba*. **Biometals**, v. 28, n. 2, p. 381-389, 2015.

KONIG, C. C., et al. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Chembiochem**, v. 14, n. 8, p. 938-942, 2013.

KUROSAWA, K., et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. **Journal of American Chemical Society**, v. 130, n. 4, p. 1126-1127, 2008.

LAXMINARAYAN, R., et al. Achieving global targets for antimicrobial resistance. **Science**, v. 353, n. 6302, p. 874-875, 2016.

LI, W., et al. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 68, n. 3, p. 216-219, 2015.

LIM, C. L., et al. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 67, n. 4, p. 323-329, 2014.

LIM, H. K., et al. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7768-7777, 2005.

LIN, Y. B., et al. *Streptomyces shaanxiensis* sp. nov., a blue pigment-producing streptomycete from sewage irrigation soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. Pt 8, p. 1725-1730, 2012.

LIU, M., et al. Endophytic *Streptomyces* sp. Y3111 from traditional Chinese medicine produced antitubercular pluramycins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1077-1085, 2014.

LONG, P. F., et al. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. **Chembiochem**, v. 6, n. 10, p. 1760-1765, 2005.

LOPES, A. R., et al. Molinate biodegradation in soils: natural attenuation versus bioaugmentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2691-2700, 2013.
MANTECA, A., et al. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3877-3886, 2008.

MARMANN, A., et al. Co-cultivation: a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

MEARS, E. R., et al. A Review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Ttropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003889, 2015.

MEENA, V. S.; MAURYA, B. R. ; VERMA, J. P. Does a rhizospheric microorganism enhance K^+ availability in agricultural soils? **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 337-347, 2014.

MEYER, F., et al. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. p. 386, 2008.

MICHEL, K. H., et al. The discovery, fermentation, isolation, and structure of antibiotic A33853 and its tetraacetyl derivative. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 37, n. 5, p. 441-445, 1984.

MURPHY, T., et al. Effect of oligosaccharide elicitors on bacitracin A production and evidence of transcriptional level control. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 4, p. 397-403, 2007.

NAKAYA, M., et al. Relative and absolute configuration of antitumor agent SW-163D. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 12, p. 2969-2976, 2007.

NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as "sources" of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. p. 2015.

NEWMAN, D. J. ; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

O'BRIEN, J. ; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

ONAKA, H., et al. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. **Applied Environmetal Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 400-406, 2011.

ONAKA, H., et al. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 54, n. 12, p. 1036-1044, 2001.

OTSUKA, H., et al. Structure confirmation of triostin a by ^{1}H and ^{13}C magnetic resonance. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 29, n. 1, p. 107-110, 1976.

PEREZ BAZ, J., et al. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical properties and structure determination. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 50, n. 9, p. 738-741, 1997.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 19-25, 2009.

QIN, S., et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RANCE, M. J., et al. UK-63,052 complex, new quinomycin antibiotics from *Streptomyces braegensis* subsp. *japonicus*; taxonomy, fermentation, isolation, characterisation and antimicrobial activity. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 42, n. 2, p. 206-217, 1989.

RATH, S., et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. p. 550-555, 2003.

RECIO, E., et al. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 41586-41593, 2004.

RICHTER, T. K.; HUGHES, C. C. ; MOORE, B. S. Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 2158-2171, 2015.

ROBBEL, L., et al. Erythrochelin, a hydroxamate-type siderophore predicted from the genome of *Saccharopolyspora erythraea*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 3, p. 663-676, 2010.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 1753-1760, 2009.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M. ; HOFFMEISTER, D. *In vivo* and *in vitro* production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234-242, 2008.

SHARMA, R. C. ; SCHIMKE, R. T. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. **Biotechniques**, v. 20, n. 1, p. 42-44, 1996.

SINGH, B. K. ; MACDONALD, C. A. Drug discovery from uncultivable microorganisms. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p. 792-799, 2010.

SMANSKI, M. J.; SCHLATTER, D. C. ; KINKEL, L. L. Leveraging ecological theory to guide natural product discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 115-128, 2016.

STROBEL, G. ; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STRÖM, K., et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, 2002.

TAMURA, K., et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAN, R. X. ; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TAUBES, G. The bacteria fight back. **Science**. v. 321, n. 5887, p. 356-361, 2008.

TIWARI, K. ; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 108-132, 2012.

TIWARI, K. ; GUPTA, R. K. Diversity and isolation of rare actinomycetes: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 256-294, 2013.

TRAXLER, M. F., et al. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e000459-13, 2013.

TRINDADE, M., et al. Targeted metagenomics as a tool to tap into marine natural product diversity for the discovery and production of drug candidates. **Frontiers in Microbiology**. **6:** 890, 2015.

UCHIYAMA, T. ; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616-622, 2009.

VANHULLE, S., et al. Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1712-1718, 2007.

WALSH, C. T. ; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2469-2493, 2010.

WANG, G., et al. Two diketopiperazine cyclo(pro-phe) isomers from marine bacteria *Bacillus subtilis* sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 583-585, 2010.

WANG, G. Y., et al. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. **Organic Letters**, v. 2, n. 16, p. 2401-2404, 2000.

WANG, J. H., et al. Inhibition of biofilm in *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 by diketopiperazines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 143, 2016.

WANG, M., et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WATANABE, K., et al. *Escherichia coli* allows efficient modular incorporation of newly isolated quinomycin biosynthetic enzyme into echinomycin biosynthetic pathway for rational design and synthesis of potent antibiotic unnatural natural product. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9347-9353, 2009.

WATROUS, J., et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743-1752, 2012.

WEBER, T., et al. antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W237-243, 2015.

WHITT, J., et al. Tetramic acid analogues produced by coculture of *Saccharopolyspora erythraea* with *Fusarium pallidoroseum*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 173-177, 2014.

XU, M., et al. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, n. 19, p. 5795-5805, 2016.

YANG, J. Y., et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6023-6028, 2012.

YANG, Y. L., et al. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 885-887, 2009.

YUFENG, C., et al. Screening, identification and potassium-dissolving characteristics of potassium-dissolving actinomycete in banana rhizosphere soil. **Biotechnology Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 129, 2015.

ZERIKLY, M. ; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **Chembiochem**, v. 10, n. 4, p. 625-633, 2009.

ZHANG, X.; WEI, W. ; TAN, R. Symbionts, a promising source of bioactive natural products. **Reviews Science China Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 1097-1109, 2015.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K. ; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 2, p. 371-386, 2014.

ZHU, H.; SANDIFORD, S. K. ; VAN WEZEL, G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 371-386, 2014.

ZOLOVA, O. E.; MADY, A. S. ; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Recent developments in bisintercalator natural products. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 777-790, 2010.

ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S. ; NEWMAN, D. J. Induced production of N-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 7, p. 1653-1657, 2011.