

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas

Larissa Varella

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 04/03/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

Ribeirão Preto
2015

RESUMO

VARELLA, L. **Estudo químico e estratégias para modular o metabolismo secundário de actinobactérias endofíticas.** 2015. 179p. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os micro-organismos são profícuas fontes de produtos naturais bioativos. Diversos fármacos de importância clínica são de origem microbiana, sendo que a maioria dos antibióticos usados clinicamente é produzida por actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*. A resistência a múltiplas drogas por micro-organismos patogênicos e também pelas células tumorais leva à necessidade por novos fármacos antibacterianos e antitumorais. Actinobactérias endofíticas têm demonstrado grande potencial para a busca de produtos naturais bioativos. O presente trabalho relata o estudo químico de duas linhagens de actinobactérias endofíticas, *Streptomyces* sp. RTd 22 e *Streptomyces* sp RTd 31, isoladas das raízes de *Tithonia diversifolia*. As frações ativas nos ensaios biológicos foram fracionadas para a identificação dos compostos bioativos, sendo eles os antibióticos macrolídeos concanamincinas A (**S31-1**) e B (**S31-2**), anidro-agliconas das concanamincinas A (**S31-3**) e B (**S31-4**), todos produzidos por *Streptomyces* sp RTd31, e o ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**), produzido por *Streptomyces* sp. RTd22. Foi realizado o monitoramento da produção desses compostos bioativos por UPLC-MS através do modo SIM. As concanamincinas A e B tiveram um máximo de produção com 96h, já a grisorixina obteve um máximo com 192h. Outros compostos identificados por desreplicação dos extratos butanólicos de ambas as actinobactérias foram os sideróforos norcardamina (**S31-7**) e desoxi-nocardamina (**S31-8**), já o sideróforo desferrioxamina B (**S31-9**) foi identificado apenas nos extratos butanólicos de *Streptomyces* sp RTd31. Experimentos de variação do meio de cultivo e co-cultura com bactérias patogênicas foram empregados a fim de estimular a biossíntese de novos compostos, porém nenhum novo metabólito foi identificado. O sequenciamento genético da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 permitiu verificar a presença de vários *clusters* biossintéticos nesse micro-organismo através da análise feita pelo antiSMASH. Foi possível identificar o *cluster* da himastatina (**S22-4**) e da coeliquelina (**S22-5**), sendo que ambos os compostos não foram biossintetizados nas condições de cultivo utilizadas. O *cluster* biossintético da grisorixina foi determinado e o experimento de recombinação homóloga para a deleção do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina *nigC* foi realizado. Dois mutantes foram obtidos e um deles foi cultivado para a análise do perfil metabólico por espectrometria de massas. Não houve a produção da grisorixina nem do seu possível precursor pelo mutante, mas outros metabólitos foram produzidos.

Palavras-chaves: actinobactérias endofíticas, *Streptomyces*, policetídeos, desreplicação, co-cultura, recombinação homóloga

1. INTRODUÇÃO

1.1 O papel dos micro-organismos na descoberta de fármacos

Ao longo das últimas décadas, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel de grande importância como fonte promissora de novos compostos bioativos e como precursores para a síntese de novos fármacos (QIN et al., 2011).

Segundo a última revisão de Newman e Cragg (2012) acerca dos produtos naturais como fonte de novos fármacos desenvolvidos de 1981 a 2010, compreendendo 30 anos, pode-se observar que das 1073 pequenas moléculas aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), 64% compreendem produtos naturais (N), fitoterápicos (NB), seus derivados semissintéticos (ND), mímicos de produtos naturais (S*/MN e S/MN) e compostos sintéticos cujas estruturas farmacofóricas foram inspiradas em produtos naturais (S*) e 36% são substâncias totalmente sintéticas (S) (Figura 1).

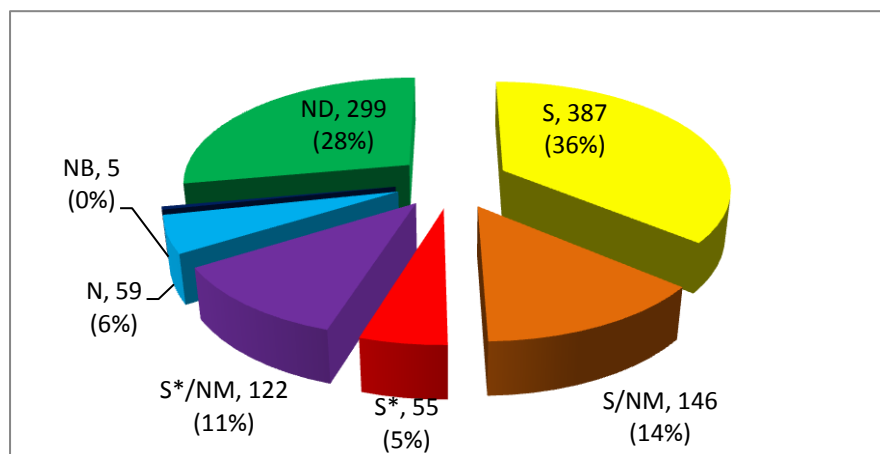


Figura 1 - Fontes de pequenas moléculas aprovadas pela FDA como fármacos (adaptado de Newman e Cragg, 2012)

Além das plantas, os micro-organismos representam uma rica fonte de metabólitos bioativos e têm gerado importantes produtos para a indústria farmacêutica, dentre eles: agentes antibacterianos como os β -lactâmicos (**1**, penicilina G e **2** cefalosporina C), tetraciclina (**3**, clortetracilina), aminoglicosídeos (**4**, estreptomicina), macrolídeos (**5**, eritromicina), glicopeptídeos (**6**, vancomicina),

lipopeptídeos (**7**, daptomicina); agentes imunossupressores como ciclosporina (**8**) e rapamicina (**9**); agentes hipolipêmicos como a lovastatina (**10**) e fármacos anti-helmínticos e antiparasitários como a ivermectina (**11**) (CRAGG; NEWMAN, 2013; GUIMARÃES et al., 2010) (Figura 2). Cerca de 47% dos metabólitos microbianos (aproximadamente 33000 compostos) apresentam algum tipo de atividade biológica e cerca de 40% (aproximadamente 28000 compostos) são antibióticos convencionais. As actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas como grandes produtoras de metabólitos bioativos, produzindo cerca de 39% de todos os metabólitos microbianos (BÉRDY, 2012).

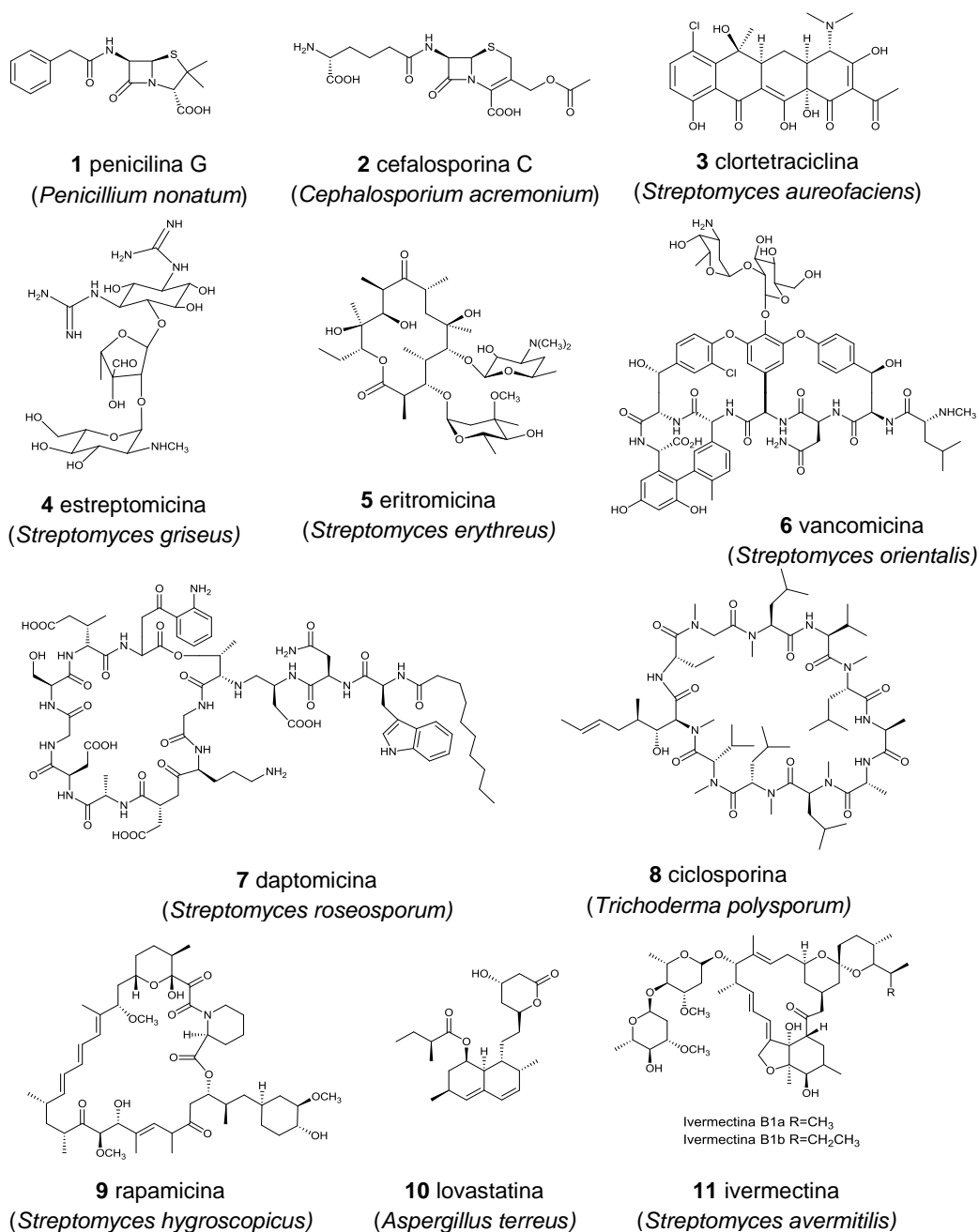


Figura 2 - Fármacos produzidos por micro-organismos

Durante a "Era Dourada dos Antibióticos", entre os anos 1940-1950, quase todos os grupos de importantes antibióticos clínicos foram descobertos, sendo a maioria isolada de espécies de *Streptomyces*, representando cerca de 70-80% de todos os compostos isolados. Este período marca também o início da descoberta de antitumorais e antivirais (BÉRDY, 2005).

Metabólitos produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* também deram contribuições importantes para a quimioterapia antineoplásica, que inclui antibióticos anticancerígenos como bleomicina B2 (**12**), actinomicina D (**13**), mitomicina C (**14**), antraciclina (**15**, daunorubicina e **16**, doxorubicina) e pentostatina (**17**) (PUPO et al., 2006) (Figura 3).

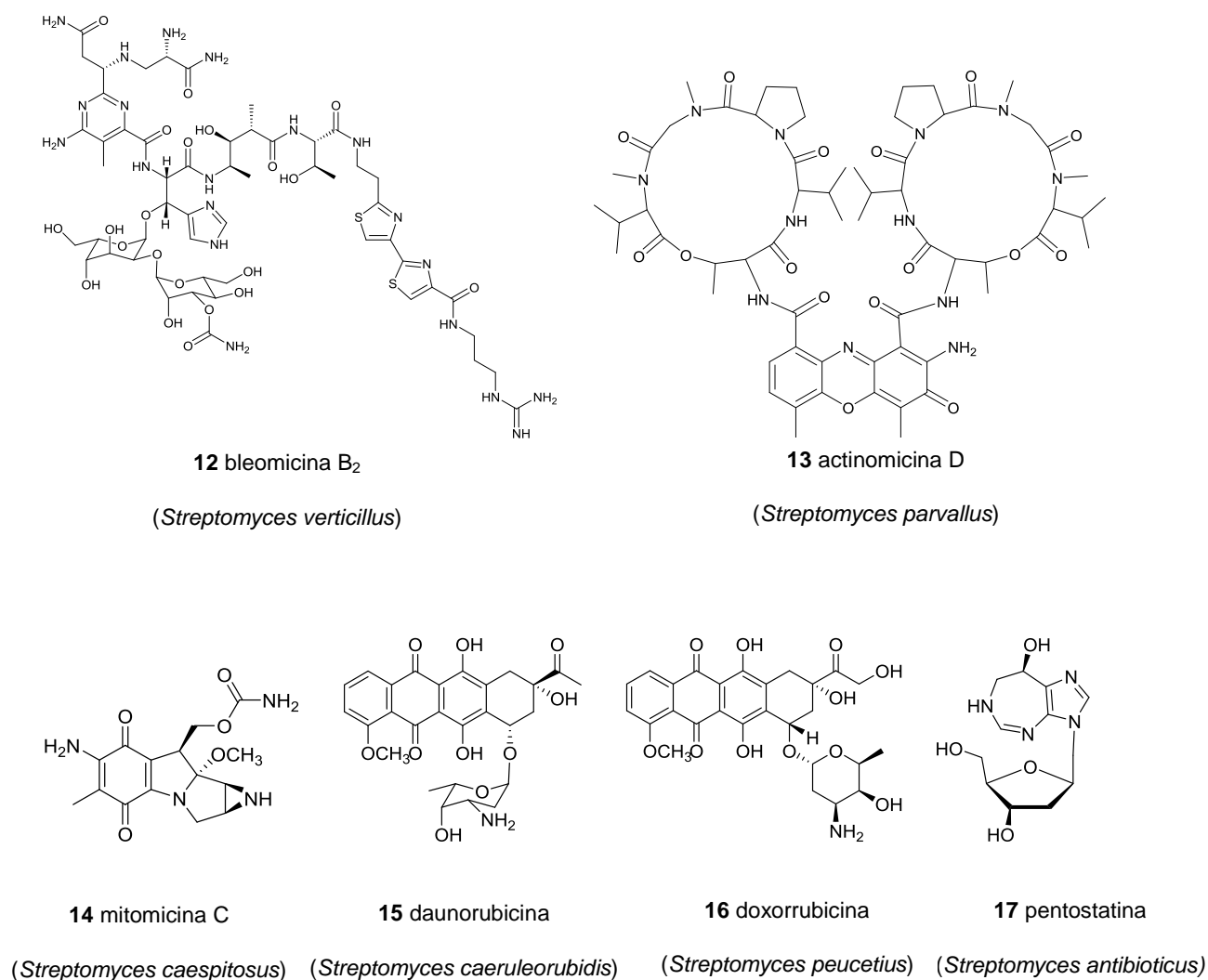


Figura 3 - Anticancerígenos produzidos por micro-organismos do gênero *Streptomyces*

1.2 O problema da resistência

Apesar da descoberta dos antibióticos ter revolucionado o tratamento médico, ocasionando a redução da mortalidade causada por agentes patogênicos, o uso indiscriminado destes fármacos, inevitavelmente, leva à seleção de micro-organismos resistentes e, apesar dos diversos antibióticos em uso clínico, existe a necessidade de novos fármacos antimicrobianos (CLARDY et al., 2006). O número de patógenos multirresistentes está constantemente aumentando. Atualmente, mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes à maioria dos antibióticos comerciais. A mortalidade por infecções multirresistentes é de 50 a 80%. Nos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões pessoas adquirem infecções bacterianas nos hospitais, resultando em cerca de 100.000 mortes por ano (BÉRDY, 2012).

A terapia do câncer também sofre com graves problemas de resistência a múltiplas drogas (MDR), na qual as células tumorais apresentam uma resistência simultânea a diferentes agentes quimioterápicos estruturalmente e funcionalmente não relacionados (GONG et al., 2012; RUMJANEK et al., 2003).

Segundo relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/OMS (*World Cancer Report 2008*), o impacto global do câncer mais que dobrou em 30 anos. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2014, também válidas para o ano de 2015, apontavam para a ocorrência de aproximadamente 567 mil casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (Instituto Nacional de Câncer/ Ministério da Saúde, 2014).

Devido a esses fatos, há a necessidade de buscar novos fármacos com atividade antibiótica (antibacteriana e antitumoral). Para isso, algumas estratégias podem ser adotadas na pesquisa em produtos naturais, tais como, utilizar organismos que habitam biótopos únicos, como os micro-organismos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Organismos e seus biótopos que são submetidos a constantes interações metabólicas e ambientais devem produzir ainda mais metabólitos secundários. Endófitos são micro-organismos que habitam tais biótopos, ou seja, as plantas superiores, razão pela qual eles são atualmente considerados

como uma fonte de novos metabólitos secundários com grande potencial para usos médicos, agrícolas, e/ou aproveitamento industrial (STROBEL, 2003). Atualmente, os endófitos são vistos como uma excelente fonte de produtos naturais bioativos, porque há muitos deles ocupando milhões de nichos biológicos exclusivos (plantas superiores) e crescendo em muitos ambientes incomuns. Existem quase 300.000 espécies de plantas na terra capazes de abrigar um ou mais endófitos exclusivos, portando os micro-organismos endofíticos são uma fonte rica e confiável de diversidade genética e de novas espécies de micro-organismos não descritos e que podem gerar novos produtos naturais (QUIN, et al., 2011; STOBEL; DAISY, 2003; STROBEL 2003).

1.3 A busca por novos antibióticos

1.3.1 Micro-organismos endofíticos como fontes de produtos naturais

A palavra endofítico vem do grego (*éndon + phytón*), significando “dentro da planta” e abrange bactérias, fungos, algas e insetos que convivem de uma forma simbiótica com a planta hospedeira (SCHULZ; BOYLE, 2005). A aplicabilidade do termo refere-se, principalmente, a bactérias e fungos (GUNATILAKA, 2006).

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam internamente os tecidos da planta hospedeira sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO, et al., 2000). Segundo Petrini (1991), estes micro-organismos vivem no interior das plantas pelo menos em um período do seu ciclo de vida. Além disso, eles distinguem-se dos fitopatogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais (AZEVEDO, 1999).

Nas interações simbióticas estes micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas, tais como controle de insetos e animais herbívoros, o aumento da tolerância a estresses abióticos, controle de outros micro-organismos fitopatogênicos e também ajudam no crescimento da planta (KUSARI et al., 2012; QIN et al., 2011; SCHARDL et al., 2004).

Outro fato a ser considerado é que os endófitos podem produzir antibióticos de toxicidade celular reduzida, caso contrário ocorreria a morte do

tecido do hospedeiro, que é composto de células eucarióticas. Este é um fato importante devido a grande preocupação da comunidade médica com a toxicidade latente de qualquer fármaco (STROBEL, 2003).

Os endófitos podem penetrar nos tecidos vegetais através da zona radicular e das partes aéreas das plantas como flores, caules e cotilédones, através dos estômatos e ferimentos. Os micro-organismos endofíticos podem permanecer no ponto de entrada, ou disseminarem-se pelo sistema vascular e alojarem intra e/ou intercelularmente (KOBAYASHI; PALUMBO 2000; ZINNIEL et al., 2002).

Alguns endófitos podem produzir alguns compostos químicos que são característicos do hospedeiro. Isto pode estar relacionado a uma recombinação genética dos endófitos com o hospedeiro que ocorre no tempo evolutivo (TAN; ZOU, 2001). Um dos casos mais interessantes é o da produção do paclitaxel (Taxol[®]) (**18**), um diterpenoide utilizado contra certos tipos de câncer e que, além de ser produzido por alguns vegetais, como *Taxus brevifolia* (Taxaceae), também é produzido por fungos que habitam esta planta, como *Taxomyces andreanae* (STIERLE et al., 1993, STROBEL; LONG, 1998). Outros importantes anticancerígenos de origem vegetal também têm sido isolados de fungos endofíticos. A vincristina (**19**) foi isolada do fungo endofítico *Mycelia sterilia*, associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). *Entrophospora infrequens*, um endofítico isolado de *Nothapodytes foetida*, produziu a camptotecina (**20**) (PURI et al., 2005). Outro produto natural vegetal, podofilotoxina (**21**), precursor de diversos agentes anticancerígenos semissintéticos, foi produzido por *Trametes hirsute*, um novo endofítico de *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2006), e também por *Phialocephala fortinii*, fungo associado com *Podophyllum peltatum* (EYBERGER et al., 2006). A hipericina (**22**), que apresenta diversas atividades biológicas, foi produzida pelo fungo endofítico *Hypericum perforatum* isolado da planta *Thielavia subthermophila* que é produtora do mesmo composto (KUSARI et al., 2008). As estruturas químicas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 4.

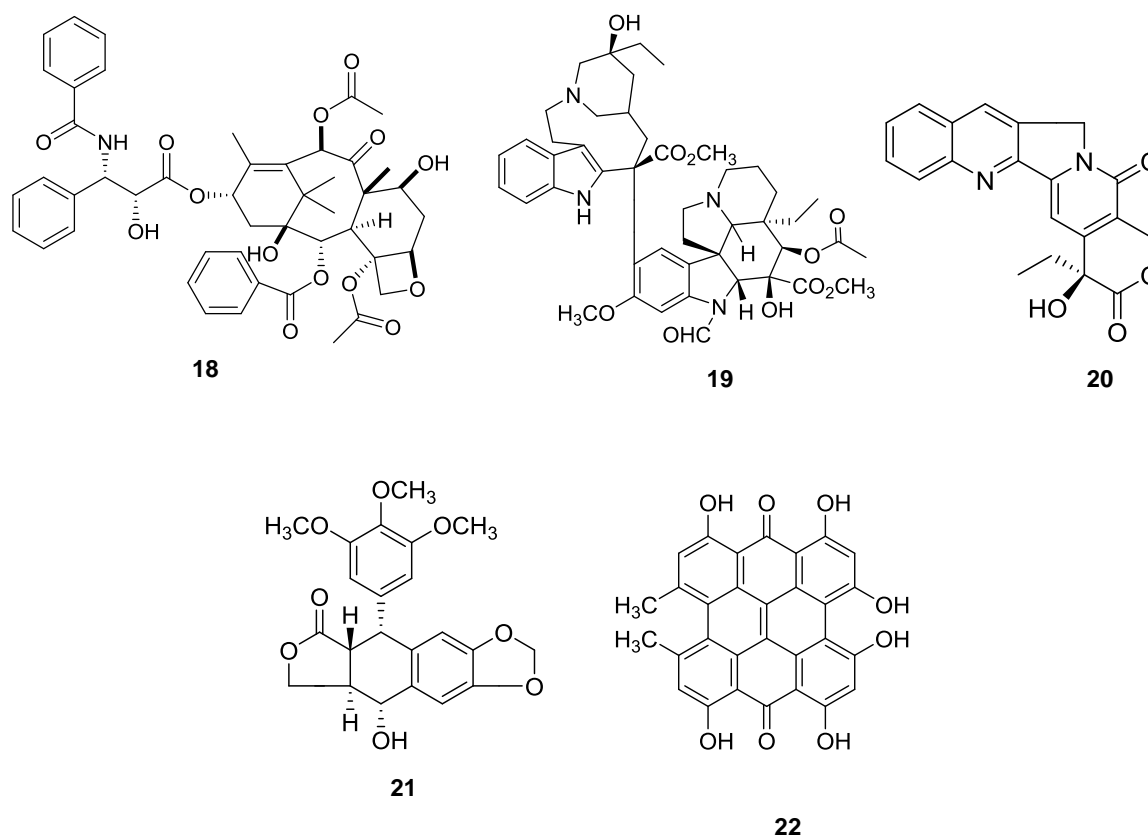


Figura 4 - Estruturas químicas de compostos produzidos por micro-organismos endofíticos e também produzidos pelas plantas hospedeiras

1.3.2 Produtos naturais bioativos de actinobactérias endofíticas

Apesar de mais recente, a pesquisa com actinobactérias endofíticas tem conduzido ao isolamento de metabólitos secundários com atividade antibiótica (antimicrobiana e antitumoral).

Os compostos (23) e (24), foram isoladas do endófito *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 presente no tecido da raiz de *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). Estes compostos apresentaram atividades antifúngica, antitumoral e anti-inflamatória (TAECHOWISAN et al., 2005; TAECHOWISAN et al., 2007a; TAECHOWISAN et al., 2007b). As munumbicinas A, B, C, D, E-4 e E-5 são antibióticos produzidos por *Streptomyces* NRRL 30562 um endófito de *Kennedia igriscans*, uma planta presente no território norte da Austrália. Estas munumbicinas são descritas com um amplo espectro de atividade incluindo atividade antimicrobiana e antimalárica (CASTILLO et al., 2006; CASTILLO et al., 2002). As coronamicinas são um complexo de peptídeos produzidos por *Streptomyces* sp.

(MSU-2110), um endófitico de uma videira *Monstera* sp., que apresentaram atividade antifúngica e antimalárica (EZRA et al., 2004). Duas novas antraquinonas, lupinacidinas A e B (**25** e **26**), foram isoladas de uma nova linhagem endofítica pertencente ao gênero *Micromonospora*. As lupinacidinas mostraram significativos efeitos antitumorais (IGARASHI et al., 2007). O endófitico *Streptomyces* sp. NRRL 30566 foi descrito e caracterizado parcialmente a partir de folhas *Grevillea pteridifolia* árvore que cresce no território do norte da Austrália. Esta actinobactéria produziu um novo antibiótico, a kakadumicina A (**27**), que apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas (CASTILLO et al., 2003). Uma nova ansamicina, naftomicina K (**28**) e cinco novos macrolídeos pertencentes à família das bafilomicinas (**29-33**), foram isolados da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp CS, isolada da planta medicinal *Maytenus hookeri*. Naftomicina K apresentou atividade citotóxica contra linhagens celulares P388 e A-549 e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. As bafilomicinas apresentaram atividade citotóxica para células de melanoma (LU; SHEN, 2007; LI et al., 2010). Uma nova γ -butirolactona (**34**) e mais nove compostos conhecidos foram isolados da actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp W5 isolada da planta *Trewia nudiflora* L (WEI et al., 2010). As estruturas químicas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 5.

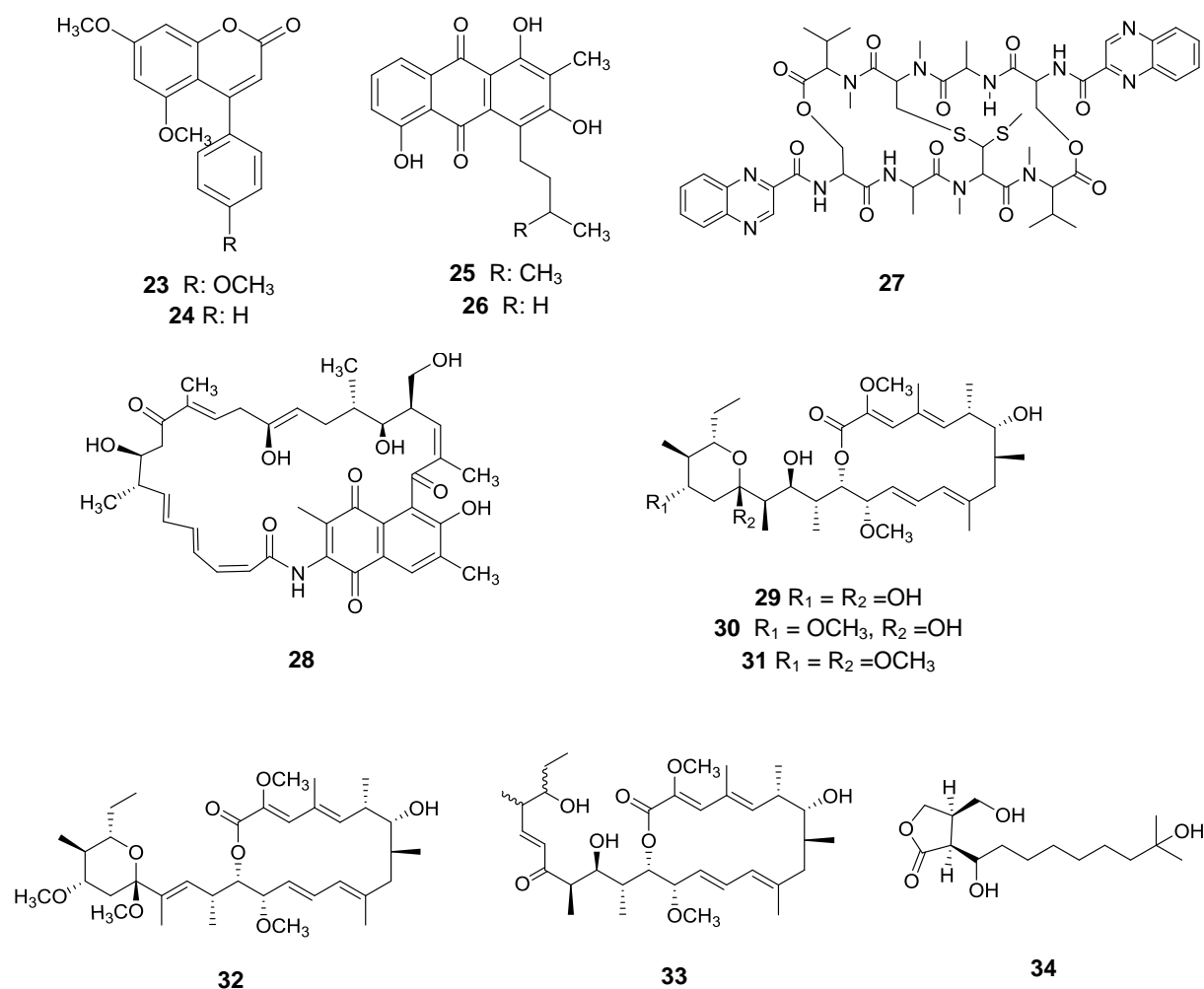


Figura 5 - Estruturas químicas de novos metabólitos produzidos por actinobactérias endofíticas.

1.4 Estratégias para acessar produtos naturais de micro-organismos

Um dos maiores desafios na pesquisa de produtos naturais é a busca por novos compostos, uma vez que re-isolamento de moléculas previamente identificadas é muito comum. Estima-se que a frequência de isolamento de antibióticos já conhecidos é de $1-2 \times 10^7$, ou seja, a frequência de distribuição dos antibióticos comuns supera o menos comum. Cerca de 10^7 actinobactérias precisam ser rastreadas para encontrar um antibiótico cuja abundância está abaixo do limiar (BALTZ, 2007).

Evitar o re-isolamento demanda análises químicas precisas dos extratos e uma busca detalhada em banco de dados de todos os compostos já conhecidos. Essa estratégia, conhecida como desreplacação, tem auxiliado nos estudos de

metabolômica e na descoberta de novas substâncias farmacologicamente ativas em um extrato (ITO; MASUBUCHI, 2014; NIELSEN et al., 2012; WOLFENDER et al., 2010; SILVA et al., 2010). As análises por espectrometria de massas (MS) tanto em baixa quanto em alta resolução (HRMS) são utilizadas como ponto de partida na busca por compostos cadastrados nos bancos de dados de produtos naturais como Dicionário de Produtos Naturais, MassBank, Metlin e Antibase. A desreplicação é uma tarefa difícil especialmente quando um banco de dados contém muitos candidatos com similaridades de massas. Para a exclusão dos candidatos, a utilização de dados como espectro de absorção no UV, fragmentação induzida por colisão (MS/MS) e o conhecimento taxonômico do organismo produtor auxiliam na identificação (ITO; MASUBUCHI, 2014; WOLFENDER et al., 2010).

Além disso, os micro-organismos são capazes de produzir muito mais compostos dos que são observados nas condições normais de laboratório. Muitos *clusters* de genes biossintéticos são silenciados ou são pouco expressos na ausência de um estímulo particular, como determinados nutrientes, sinais ambientais, compostos sinalizadores, dentre outros muitas vezes desconhecidos (SCHERLACH; HERTWECK, 2009). Dessa forma, para buscar novos metabólitos, várias metodologias têm sido empregadas para induzir a quimiodiversidade que os micro-organismos possuem. Isso pode ser alcançado em nível de genoma, transcriptoma, proteoma ou metaboloma (Figura 6) (BERTRAND et al., 2014). Serão discutidas algumas das metodologias que foram empregadas neste trabalho, tais como a cultura mista, variações das condições de cultivo e manipulação genética.

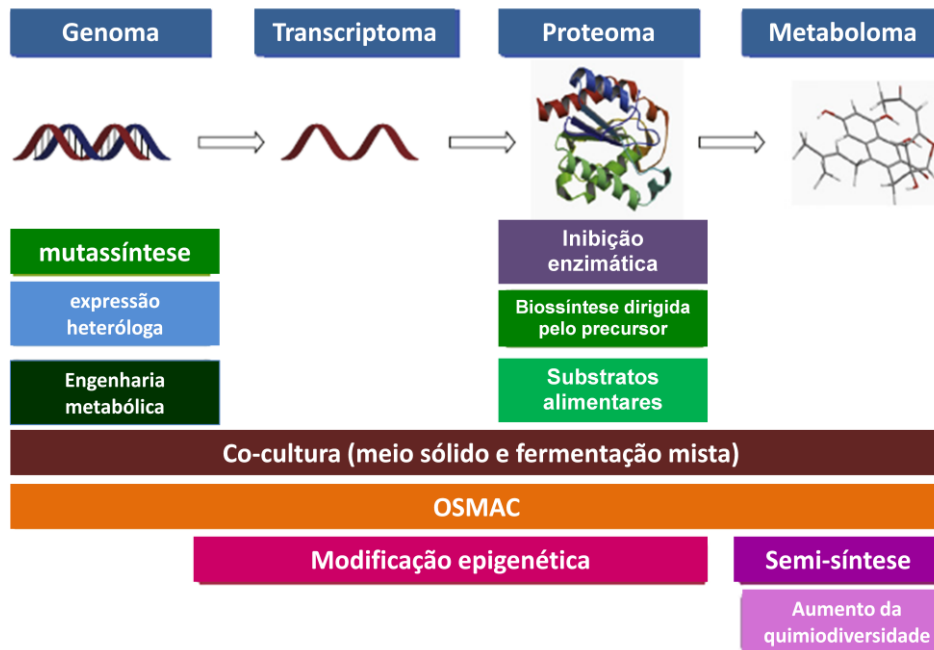


Figura 6 - Métodos que influenciam a biossíntese de metabólitos secundários nos micro-organismos. OSMAC - *one strain many compounds* (adaptado de BERTRAND et al., 2014)

1.4.1 Cultura mista

Nos bioprocessos industriais e pesquisas laboratoriais para a produção de antibióticos e de outros produtos farmacêuticos, é comum o uso de culturas microbianas puras. Porém na natureza, os micro-organismos não existem isoladamente, eles fazem parte dos minúsculos ecossistemas (OH et al., 2005). O número de cepas endofíticas encontradas dentro do tecido da planta pode variar de algumas para centenas por planta. A competição microbiana por espaço limitado e nutrientes pode ser a grande ferramenta da produção ecológica de metabólitos secundários bioativos (MARMANN et al., 2014). Acredita-se que diversas sinalizações e retroalimentação aconteçam entre os organismos, o que gera a produção de novos compostos (KNIGHT et al., 2003). Há evidências que a ativação de vias biossintéticas silenciadas requer a presença física de um segundo micro-organismo (interação célula-célula) e que metabólitos isolados (ex. parede celulares de células mortas, sobrenadantes livres de células ou extratos) não são suficientes para induzir a produção de metabólitos secundários (BERTRAND et al., 2014). Assim, a cultura de micro-organismos diferentes juntos (co-cultura ou cultura mista),

força a interação direta o que pode induzir a produção de compostos que não são previamente observados quando as linhagens são cultivadas independentemente (PETTIT, 2009). A aplicação desta técnica de cultura mista representa uma estratégia potencialmente importante para a descoberta de novos metabólitos secundários. Estudos têm demonstrado que a utilização de técnicas de co-cultura pode induzir a biossíntese de novos compostos, além disso, pode aumentar os teores e rendimentos de alguns metabólitos devido à co-culturas competitivas (RATEB et al., 2013; TRAXLER et al., 2013; MOREE et al., 2012; NONAKA et al., 2011; LUTI & MAVITUNA, 2011; PETTIT 2009; OH et al., 2007; OH et al., 2005).

Um exemplo é descrito por OH e colaboradores (2005) que relatam a aplicação de co-culturas entre o fungo *Libertella sp.*, isolado de uma ascídia, e uma α -proteobactéria marinha. A interação das células microbianas na co-cultura levou a produção de diterpenos libertelenonas A-D (35-38), sendo que a libertelenona D demonstrou potente atividade citotóxica contra HCT-116 uma linhagem de células de adenocarcinoma humano (Figura 7).

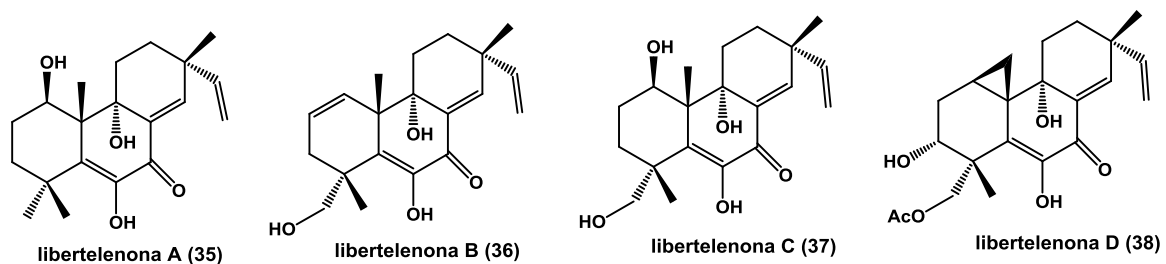


Figura 7 - Libertelenonas A-D produzidas em co-cultura

1.4.2 Variações nas condições de cultivo

Variações nas condições de cultivo podem afetar o perfil metabólico do micro-organismo, mostrando a importância de serem realizados experimentos com diferentes meios de cultura para otimizar a produção de um determinado metabólito ou buscar novos compostos. Esta metodologia é conhecida como OSMAC ("*one strain many compounds*"), que visa alterar as condições de cultivo de um micro-organismo a fim de simular diferentes ambientes e conseqüentemente induzir a produção de diferentes metabólitos (BODE et al., 2002). Os parâmetros que são variados incluem luz (TISCH; SCHMOLL, 2010), pH, temperatura e aeração. No meio de cultura podem-se variar a fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, sais

inorgânicos e traços de metais (RUIZ et al., 2010; TAKUR et al., 2009; GESHEVA et al., 2005; SANCHEZ; DEMAIN, 2002; IWAI; OMURA, 1982). O meio de cultura pode ser suplementado com outras pequenas moléculas ou metais pesados que funcionam como indutores ou supressores ou através de mecanismos desconhecidos (PETTIT, 2011).

A aplicação da estratégia OSMAC tem levado a produção de compostos semelhantes a fármacos e também a produção de novos metabólitos (BODE et al., 2000a, BODE et al., 2000b; BODE et al., 2002; MASUMA et al., 1986). Um exemplo dessa metodologia é descrita por Bode e colaboradores (2002) que isolaram mais de 100 compostos de mais de 25 classes estruturais de seis diferentes micro-organismos pela alteração das condições de cultivo.

A fonte de carbono é um dos principais fatores requeridos para controle do metabolismo secundário (ILIC et al., 2013). Um exemplo de antibióticos cuja produção é regulada pela fonte de carbono incluem os antibióticos β -lactâmicos e policetídeos macrocíclicos. A cefamicina C é um β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus* cuja síntese é inibida pelo glicerol através da repressão das enzimas cefamicina C sintetase e expandase. Além da cefamicina C, *S. clavuligerus* produz ácido clavulânico, um inibidor da beta-lactamase. Embora estruturalmente relacionados, estes dois beta-lactâmicos são derivados de diferentes precursores biossintéticos. Surpreendentemente, apesar de glicerol abolir a produção de cefamicina C, ele, concomitantemente, aumenta a formação de ácido clavulânico. Dessa forma, o glicerol se torna uma boa fonte de carbono para a produção de ácido clavulânico para este micro-organismo (RUIZ et al., 2010).

A glicose também causa a inibição na produção de actinorrodina por *S. lividans*, devido repressão da síntese de *afsR2* mRNA, que codifica uma proteína regulatória global envolvida na estimulação da biossíntese de metabólitos secundários. Como esperado, nenhuma repressão é observada quando a glicose é substituída por glicerol neste micro-organismo (KIM et al., 2001).

Micro-organismos também usam uma variedade de fontes de nitrogênio para crescimento, mas nem todas as fontes suportam igualmente o crescimento. Em geral, as melhores fontes de nitrogênio são glutamina, amônia e asparagina, enquanto prolina e uréia qualificam-se como pobres fontes de nitrogênio. A fim de selecionar a melhor fonte dentre uma grande diversidade de fontes de nitrogênio disponíveis, os micro-organismos têm sensores desenvolvidos e mecanismos

regulatórios, os quais permitem a utilização da melhor fonte de nitrogênio presente no meio (SANCHEZ; DEMAIN, 2002).

O mesmo acontece com sais inorgânicos, nas fermentações microbianas, a produção de enzimas extracelulares e metabólitos secundários são frequentemente regulados por fosfato inorgânico. Em *S. lividans*, por exemplo, a produção de agarase é estimulada pela limitação de fosfato (SANCHEZ; DEMAIN, 2002).

Dessa forma, as variações das fontes de carbono, nitrogênio e metais presentes no meio de cultura resultam em diferenciação química (metabólitos secundários) e morfológica (morfogênese) do micro-organismo produtor de metabólitos bioativos. Portanto, quando há a necessidade de otimizar a produção de algum composto de interesse experimentos devem ser realizados variando-se as fontes destes elementos a fim de se verificar os efeitos na biossíntese do composto desejado (RUIZ et al., 2010).

1.4.3 *Genome mining* visando novos produtos naturais

Genome mining, ou exploração genômica, pode ser definido como o uso da bioinformática, da genética molecular e da química de produtos naturais para acessar os metabólitos encontrados no genoma de um organismo (GOMEZ-ESCRIBANO; BIBB 2014). Dessa forma, o sequenciamento genômico tem auxiliado os estudos de *genome mining* possibilitando a identificação de genes que não são expressos em condições usuais de cultivo em laboratório e a identificação de novos produtos naturais através das informações genéticas obtidas (GUIMARÃES et al., 2010; DE OLIVEIRA et al., 2013). Muitos dos *clusters* de genes biossintéticos não são expressos em condições laboratoriais, e métodos de biologia molecular têm sido aplicados com sucesso para estimular a biossíntese de produtos naturais *crípticos* e para entender as sequências reacionais envolvidas na produção de produtos naturais por micro-organismos. Actinobactérias, mixobactérias e outros prolíficos produtores de metabólitos secundários dedicam, em média, cerca de 5% da sua capacidade codificação para a síntese de metabólitos secundários (MONCIARDINI et al., 2014).

O *genome mining* pode auxiliar tanto na ativação da expressão de um *cluster* de genes silenciado através da manipulação genética, utilizando a deleção ou a super-expressão de supostos reguladores transcricionais positivos ou negativos quanto na clonagem de gene de interesse e a sua expressão através de um hospedeiro heterólogo aceitável (GOMEZ-ESCRIBANO & BIBB, 2014).

A coeliquelina (**39**), um peptídeo não-ribossomal (NRPS) de *Streptomyces coelicolor* (LAUTRU et al., 2005) e a orfamida A (**40**), um lipopeptídeo cíclico com atividade antifúngica produzido por *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (GROSS et al., 2007), são exemplos de compostos descobertos através do *genome mining*. As estruturas dos compostos podem ser visualizadas na Figura 8. A coeliquelina foi identificada através das análises genômicas e posterior nocaute de genes específicos e análise do perfil metabólico. A orfamida A combinou a análise genômica com o fracionamento guiado pelo isótopo para a identificação de compostos desconhecidos (DE OLIVEIRA et al., 2013; GROSS et al., 2007; LAUTRU et al., 2005).

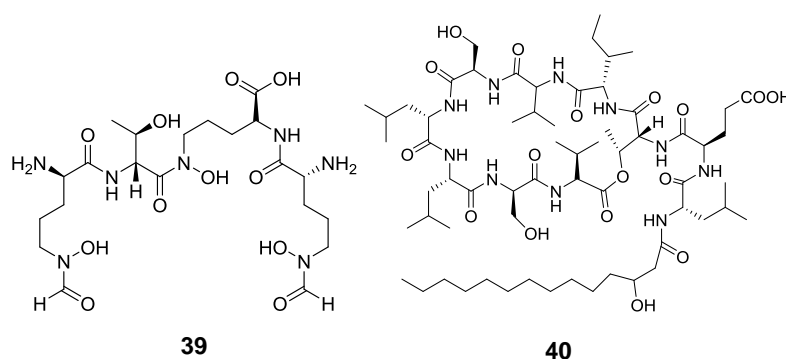


Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos identificados por *genome mining*

Fungos endofíticos foram isolados de *Tithonia diversifolia* e estudos químicos foram realizados para a identificação de compostos produzidos por esses micro-organismos (BORGES; PUPO, 2006; GUIMARÃES et al., 2008; BORGES, 2008). Recentemente, 28 linhagens de actinobactérias endofíticas foram isoladas das raízes de *Tithonia diversifolia*, uma planta pertencente à família Asteraceae e também conhecida como margaridão ou girassol mexicano (CONTI, 2012). As linhagens pertencem a coleção do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

Na triagem biológica realizada, os extratos etanólicos dos cultivos em arroz parboilizado por 21 dias (30°C) de duas linhagens de actinobactérias, *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp RTd31 (Figura 9), destacaram-se pelas elevadas atividades citotóxicas em células tumorais (Tabela 1).

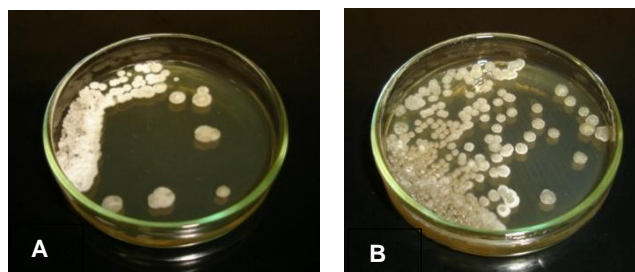


Figura 9 - *Streptomyces* sp RTd22 (A) e *Streptomyces* sp RTd31 (B); 21 dias em meio sólido ISP-2 (página 21).

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos etanólicos das actinobactérias endofíticas em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL

Amostra	Citotoxicidade em linhagens de células tumorais (%)		
	MDAMB-435 (melanoma)	HCT-8 (cólón)	SF-295 (sistema nervoso)
Branco			SA
meio	5,74	31,53	
RTd 22	89,40	98,17	94,52
RTd 31	95,32	95,40	88,71
DOX	97,30	96,94	87,67

SA – Sem Atividade; Atividade baixa – 1 ≥50%; Atividade moderada – 50 ≥75%; Atividade alta – 75 ≥ 100%.
DOX: doxorubicina (controle positivo)

O extrato etanólico da cultura em arroz de *Streptomyces* sp RTd22 também apresentou CIM de 25 µg/mL frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *S. saprophyticus*, sendo que o controle positivo penicilina G apresentou CIM de 0,0922 µg/mL para *S. aureus* e 0,1844 µg/mL para *S. saprophyticus*. Segundo dados da literatura, pode-se considerar uma boa atividade antimicrobiana quando o extrato apresenta CIM abaixo de 100 µg/mL, sendo assim, esses resultados de CIM para bactérias Gram-positivas mostraram-se muito satisfatórios (RÍOS; RECIO, 2005).

Desta forma, as duas linhagens destacam-se como promissoras para o isolamento de produtos naturais bioativos frente a células tumorais. A linhagem *Streptomyces* sp RTd22 também apresentou potencial para o estudo químico na busca por produtos naturais contra bactérias Gram-positivas.

2. CONCLUSÕES

O estudo químico das actinobactérias *Streptomyces* sp. RTd22 e *Streptomyces* sp. RTd22 levou à identificação de vários compostos produzidos por esses micro-organismos. As análises por espectrometria de massas, juntamente outros dados de RMN, UV e a utilização de banco de dados de produtos naturais foram de extrema importância para a identificação desses metabólitos.

A actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd31 é produtora dos antibióticos macrolídeos concanamícinas A (**S31-1**), B (**S31-2**) e das anidro-agliconas das concanamícinas A (**S31-3**) e B (**S31-4**). As concanamícinas A e B também foram muito ativas nos ensaios citotóxicos em células tumorais, evidenciando que a atividade antitumoral observada nas frações pode estar relacionada a presença desses compostos. Os sideróforos nocardamina (**S31-7**), desoxi nocardamina (**S31-8**) e desferrioxamina B (**S31-9**) também foram produzidos por essa linhagem e foram identificados através das análises por espectrometria de massas e busca análises no banco de dados.

Já a actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 é produtora do ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**). Esse é o principal metabólito produzido por essa linhagem e foi identificado através das análises por espectrometria de massas, busca no banco de dados e perfil de fragmentação em comparação com a nigericina. Esse metabólito é responsável pelas elevadas atividade antibacterianas e citotóxicas em células tumorais observadas para as frações e subfrações obtidas do cultivo desse micro-organismo. Essa linhagem também é produtora dos sideróforos nocardamina (**S31-7**) e desoxi-nocardamina (**S31-8**), e também foram identificados através das informações de espectrometria de massas.

Para determinar o melhor tempo de produção das concanamícinas A (**S31-1**), B (**S31-2**), anidro-aglicona da concanamícinas B (**S31-4**) e da grisorixina (**S22-2**), foi realizado o monitoramento da produção por UPLC-MS empregando a técnica SIM. Esses dados são importantes pois visam otimizar condições de cultivo das actinobactéria para a obtenção desses metabólitos em experimentos futuros.

Propostas de fragmentação por CID foram realizadas para as concanamícinas (**S31-1**, **S31-2**, **S31-3** e **S31-4**) e para a grisorixina (**S22-2**) cationizada com sódio e com cobre. As propostas de fragmentação por CID foram

importantes para a caracterização dos compostos e poderão servir para estudos futuros de desreplicação, uma vez em que não há dados na literatura para esses compostos. A fragmentação de metabólitos por espectrometria de massas é uma ferramenta muito útil em estudos metabolômicos, porém há uma escassez desse tipo de análise na literatura e em banco de dados.

Algumas metodologias foram empregadas a fim de estimular outras vias biossintéticas desses micro-organismos, incluindo o experimento de cultivo misto com bactérias patogênicas. Porém, nas análises dos extratos por espectrometria de massas, não foi observada a produção de novos compostos sendo apenas observados os compostos já produzidos pelas actinobactérias. Para a actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 também foi realizado o experimento de cultivo em outros meios de cultura, porém nenhum novo composto foi identificado sendo apenas observada a presença do ionóforo poliéter grisorixina (**S22-2**). Esses resultados confirmaram a difícil tarefa de induzir vias biossintéticas crípticas em micro-organismos em condições laboratoriais.

O sequenciamento total do genoma da actinobactéria *Streptomyces* sp. RTd22 evidenciou o alto potencial biossintético a ser explorado para esse micro-organismo, uma vez que foi possível identificar vários *clusters* biossintéticos relacionados a metabólitos secundários. Através das análises pelo antiSMASH foi possível identificar o *cluster* da himastatina (**S22-4**) e de um outro NRPS no qual apresenta alta similaridade com a coeliquelina (**S22-5**), porém esses metabólitos não foram identificados nas análises das frações, podendo ser considerados metabólitos crípticos. Os *clusters* biossintéticos poderão servir para estudos futuros de *genome mining*, podendo ser planejados experimentos de expressão heteróloga, deleção ou expressão de reguladores transcricionais, com o intuito de investigar novos compostos codificados no genoma dessa linhagem.

Os experimentos de recombinação homóloga foram realizados para o *cluster* da grisorixina visando a deleção do gene análogo a flavina mono-oxigenase da nigericina (*nigC*). Dois mutantes foram obtidos, um deles foi cultivado para a análise do perfil metabólico, no qual pode-se constatar que a grisorixina não foi produzida e nenhum precursor relacionado a esse metabólito foi observado. Porém, essa alteração genômica levou a produção de outros compostos que não foram produzidos pela linhagem selvagem.

Pode-se concluir que entre as estratégias utilizadas para a modulação das vias biossintéticas de *Streptomyces* sp RTd22, a recombinação homóloga foi a que mais interferiu no metabolismo secundário, pois além de interromper a biossíntese de grisorixina (**S22-2**), foi a única estratégia que estimulou a produção de outros metabólitos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R. M. **Handbook of Microbial Medium**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 1079 p.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Botânica Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MacCHERONI, Jr. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

BALTZ, R. H. Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. **Microbe**, v.2, n. 3, p. 125-131, 2007.

BARONA-GÓMEZ, F.; LAUTRU, S.; FRANCOU, F. X.; LEBLOND, P.; PERNODET, J. L.; CHALLIS, G. L. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. **Microbiology**, v. 152, n.11, p. 3355-3366, 2006.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: uma resposta dos micro-organismos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1155-1164, 2002.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

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

BERKEL, G. J. V. Electrolytic deposition of metals on to the high-voltage contact in an electrospray emitter: implication for gas-phase ion formation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 7, p. 773-778, 2000.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE S.; SCHUMPP O.; GINDRO K.; WOLFENDER J. L. 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.

BHATT, A.; STARK, C. B. W.; HARVEY B. M.; GALLIMORE A. R.; DEMYDCHUK Y. A.; SPENCER J. B.; STAUNTON J.; LEADLAY P. F. Accumulation of an E,E,E-triene by the monensin-producing polyketide synthase when oxidative cyclization is blocked. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, n. 43, p. 7075-7078, 2005.

BINDSEIL, K. U. & ZEECK, A. The chemistry of unusual macrolides. Part 2. Spectroscopic and biosynthetic investigations of the V-type ATPase inhibitor concanamycin A. **Liebigs Annalen Chemies**, v. 1994, n. 3, p. 305-312, 1994.

BODE, H. B.; BETHE B.; HOFES, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBiochem**, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

BODE, H. B.; ZEECK, A. Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24'707. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 597-601, 2000a.

BODE, H. B.; ZEECK, A. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes. **Phytochemistry**, v. 55, n.4, p. 311-316, 2000b.

BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Thitonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 929-934, 2008.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 2008. 350f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CASTILLO, U. F.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVER, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M.; TELOW, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v.148, n. 9, 2675-2685, 2002.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; MULLENBERG, K.; CONDRON, M. M.; TEPLow, D. B.; FOLGIANO, V.; GALLO, M.; FERRACANE, R.; MANNINA, L.; VIEL, S.; CODDE, M.; ROBISON, R.; PORTER, H.; JENSEN, J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 2, p. 296–300, 2006.

CHAGAS, F.O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário**. 2014. 339f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

CHALLIS, G. L.; RAVEL, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 187, n.2, p. 111-114, 2000.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, n.12, p. 1541-1550, 2006.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 6th ed., Approved Standard (M7-A6)*. NCCLS/CLSI, Wayne, Pennsylvania - USA, 2003.

CONTI, R. **Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético**. 2012. 236f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n.6, p. 3670-3695, 2013.

CRAIG, M.; LAMBERT, S.; JOURDAN, S.; TENCONI, E.; COLSON, S.; MACIEJEWSKA, M.; ONGENA, M.; MARTIN, J. F.; WEZEL, G. V.; RIGALI, S. Unsuspected control of siderophore production by N-acetylglucosamine in streptomycetes. **Environmental Microbiology Reports** v. 4, n. 5, p. 512-521, 2012.

CREVELIN, E. J.; CANOVA, S. P.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D.; DA SILVA, R. E.; MORAES, L. A. B. Isolation and characterization of phytotoxic compounds produced by *Streptomyces* sp. AMC 23 from red mangrove (*Rhizophora mangle*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1602-1616, 2013.

CUER, A.; DAUPHIN G. Structure and conformation of bioconversion products of a carboxylic ionophorous antibiotic, grisorixin, by means of two-dimensional nuclear magnetic resonance, **Journal of Chemistry Society-Perkin Transactions 2**, p. 259-299,1986.

DE OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

DROSE, S.; ALTENDORF, K. Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. **The Journal of Experimental Biology**, n. 200, n. 1, p. 1-8, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

EZRA, D.; CASTILLO,U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 785–793, 2004.

FORBES, M. W.; VOLMER, D. A. A comparison of data analysis methods for determining gas phase stabilities by CID: alkali metal complexes of polyether ionophore antibiotics. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 5, p. 779-791, 2005.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992.

FUKUSHIMA, R.; WEIMWE, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n.1, p. 22-26, 2003.

GACHON, P.; KERGOMARD A.; STARON, T.; ESTEVE, C. Grisorexin, an ionophorous antibiotic of the nigericin group. I. Fermentation, isolation, biological properties and structure. **Journal of Antibiotics**, v. 28, n. 5, p. 345-350, 1975.

GARCIA, D. F.; BAIDOO, E. E.; BENKE, P. I.; PINGITORE, F.; TANG, Y. J.; VILLA, S.; KEASLING, J. D. Separation and mass spectrometry in microbial metabolomics. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 233-239, 2008.

GESHEVA, V.; IVANOVA, V.; GESHEVA, R. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 243-248, 2005.

GIBSON D. G.; YOUNG L.; CHUANG R.; VENTER J. C.; HUTCHISON III C. A.; SMITH H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; BIBB, M. J. Heterologous expression of natural products biosynthetic gene cluster in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 425-431, 2014.

GONG, J.; JAISWAL, R.; MATHYS, J.; COMBES, V.; GRAU, G.; BEBAWY, M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 3, p. 226-234, 2012.

GROENEWOLD, G. S.; STIPDONK, M. J. V.; GRESHAM, G. L.; CHIEN, W.; BULLEIGH, K.; HOWARD, A. Collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of desferrioxamine siderophore complexes from electrospray ionization of UO_2^{2+} , Fe^{3+} and Ca^{2+} solution. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n.7, p. 752-761, 2004.

GROSS, H.; STOCKWELL, V. O.; HENKELS, M. D.; NOWAK-THOMPSON, R.; LOPER, J. E.; GERWICK, W. H. The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene cluster. **Chemistry & Biology**, v. 14, n. 1, p. 53-63, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, n. 1, p. 134-144, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUINEA, R.; CARRASCO, L. Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. **Journal of Virology**, v. 69, n. 4, p. 2306-2312, 1995.

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.

HARVEY B. M.; MIRONENKO T.; SUN Y. H.; HONG H.; DENG Z. X.; LEADLAY P. F.; WEISSMAN K. J. HAYDOCK S. F. Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp DSM4137. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 6, p. 703-714, 2007.

HAYDOCK, S. F.; APPLEYARD, A. N.; MIRONENKO, T.; LESTER, J.; SCOTT, N.; LEADLAY, P. F. Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide concanamycin A in *Streptomyces neyagawaensis* ATCC 27449. **Microbiology**, v. 151, n. 10, p. 3161-3169, 2005.

HUSS, M.; VITAVSKA, O.; ALBERTMELCHER, A.; BOCKELMANN, S.; NARDMANN, C.; TABKE, K.; TIBURCY, F.; WIECZOREK, H. Vacuolar H⁺-ATPases: intra- and intermolecular interactions. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 688-695, 2011.

HUTTEL, W.; SPENCER, J. B.; LEADLAY, P. F. Intermediates in monensin biosynthesis: a late step in biosynthesis of the polyether ionophore monensin is crucial for the integrity of cation binding. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 361-368, 2014.

IGARASHI, Y.; TRUJILLO, M. E.; MARTINEZ-MOLINA, E.; YANASE, S.; MIYANAGA, S.; OBATA, T.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; FUJITA, T.; FURUMAI, T.; Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 13, p. 3702-3705 2007.

ILIĆ, S. B.; KONSTANTINOVIĆ, S. S.; CVIJOVIĆ, G. D. G.; SAVIĆ, D. S.; VELJKOVIĆ, V.B. The impact of glycerol and some carbohydrates on antibiotic production by *Streptomyces hygrosopicus* CH-7. **Medicinal Chemistry Research** v. 22, n. 2, p. 934-937, 2013.

ITO, T.; MASUBUCHI, M. Dereplication of microbial extracts and related analytical technologies. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 5, p. 353-360, 2014.

IWAI, S.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 35, n. 2, p. 123-141, 1982.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; REZANKA, T.; KRASOWSKA, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

KALINOVSKAYA, N. I.; ROMANENKI, L. A.; IRISAWA, T.; ERMAKOVA, S. P.; KALINOVSKY, A. I. Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity. **Microbiological Research**, v. 166, n. 8, p. 654-661, 2011.

KATAOKA, T.; SHINOHARA, N.; TAKAYAMA, H.; TAKAKU, K.; KONDO, S.; YONEHARA, S.; NAGAI, K. Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 10, p. 3678-3686, 1995.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTION, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics Applications Note**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KEVIN, D. A., II; MEUJO, D. A. F.; HAMANN, M. Polyether ionophores: broad-spectrum and promising biologically active molecules for the control of drug-resistant bacteria and parasites. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 109-146, 2009.

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. Practical *Streptomyces* genetics. United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000. 613 p.

KIM, E. S.; CHOI, C. Y.; COHEN, S. N. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2198-2203, 2001.

KINASHI, H.; SOMENO, K.; SAKAGUCHI, K. Alkaline degradation of concanamycin A. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 39, p. 3857-3860, 1981.

KINASHI, H.; SOMENO, K.; SAKAGUCHI, K. Isolation and characterization of concanamycin A, B and C. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 11, p. 1333-1343, 1984.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S. BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 446-458, 2003.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, In: BACON, C. W.; WHITE J. F. (eds) **Microbial endophytes**. New York: Dekker, 2000, p. 199-236.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.

KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 159-162, 2008.

KWON, H. J.; SMITH, W. C.; SCHARON, A. J.; HWANG, S. H.; KURTH, M. J. SHEN, B. C-O bond formation by polyketide synthase. **Science**, v.297, n. 5585, p. 1327-1330, 2002.

KWON, H. J.; SMITH, W. C.; XIANG, L.; SHEN, B. Cloning and heterologous expression of the macrotetrolide biosynthetic gene cluster revealed a novel polyketide synthase that lacks an acyl carrier protein. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n.14, p. 3385-3386, 2001.

LAM, K. S.; HESLER, G. A.; MATTEI, J. M.; MAMBER, S. W.; FORENZA, S.; TOMITA, K. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygrosopicus*. Part I. Taxonomy of production organism, fermentation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, n. 8, p. 956-960, 1990.

LAUTRU, S.; DEETH, R.; BAILEY, L. M.; CHALLIS, G. L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 265-269, 2005.

LEADLAY P. F.; STAUNTON J.; OLIYNYK M.; BISANG C.; CORTES J.; FROST E.; HUGHES-THOMAS Z. A.; JONES M. A.; KENDREW S. G.; LESTER J. B.; LONG P. F.; MCARTHUR H. A. I.; MCCORMICK E. L.; OLIYNYK Z.; STARK C. B. W.; WILKINSON C. J. Engineering of complex polyketide biosynthesis - insights from sequencing of the monensin biosynthetic gene cluster. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 360-367, 2001.

LEE, H. S.; SHIN, H. J.; JANG, K. H.; KIM, T. S.; OH, K. B.; SHIN, J. Cyclic peptides of nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 623-625, 2005.

LEET, J. E.; SCHROEDER, D. R.; GOLIK, J.; MATSON, J. A.; DOYLE, T. W.; LAM, K. S.; HILL, S. E.; LEE, M. S.; WHITNEY, J. L.; KRISHNAN, B. S. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* Part. III Structural Elucidation. **The Journal of Antibiotic**, v. 49, n. 3, p. 299-311, 1996.

LI, H.; LU, C.; SHEN, Y. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 10, p. 595-599, 2010.
LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; STAUNTON, J.; GATES, P. J. Evidence for gas-phase redox chemistry inducing novel fragmentation in a complex natural product. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 358-363, 2004.

LU, C. H.; SHEN, Y. M. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 10, p. 649-653, 2007.

LUTI, K. J. K.; MAVITUNA, F. Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with *E. coli* in a bioreactor enhances undecyprodigiosin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 3, p. 281-285, 2011.

MA, J.; WANG, Z.; HUANG, H.; LUO, M.; ZUO, D.; WANG, B.; SUN, A.; CHENG, Y.-Q.; ZHANG, C.; JU, J. Biosynthesis of himastatin: assembly line and characterization of three cytochrome P450 enzymes involved in the post-tailoring oxidative steps. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 34, p. 7797-7802, 2011.

MACNEIL D.J.; GEWAIN K.M.; RUBY C.L.; DEZENY G.; GIBBSONS P.H.; MACNEIL T. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. **Gene**, v. 111, n. 1, p. 61-68, 1992.

MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN W.; WANG, B.; PROKSCH, P. Co-cultivation - a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043-1065, 2014.

MASUMA, R.; TANAKA, Y.; TANAKA, H.; OMURA, S. Production of nanaomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents. **Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 11, p. 1557-1564, 1986.

MATABUDUL, D.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. **Food Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 345-354, 2001.

MEDEMA; M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; DE JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. W339-346, 2011.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; MAFFIOLI, S.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MOREE, W. J.; PHELAN, V. V.; WU, C-H.; BANDEIRA, N.; CORNETT, D. S.; DUGGAN, B. M.; DORRESTEIN, P. C. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 34, p. 13811-13816, 2012.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUSLIM, J.; CUER, A.; DAVID, L.; TABET, J. C. Biosynthetic study on the polyether carboxylic antibiotic, nigericin production and biohydroxylation of grisorixin by nigericin-producing *Streptomyces hygrosopicus* NRRL B-1865. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 9, p. 1011-1014, 1995.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 30 years from 1981-2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NIELSEN, K. F.; MANSSON, M.; RANK, C.; FRISVAD, C.; LARSEN, O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2338-2348, 2011.

NISHIKAWA, M.; KATAGI, M.; MIKI, A.; TSUCHIHASHI, H. Forensic toxicological determination of surfactant by liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 2, p. 138-148, 2003.

NONAKA, K.; ABE T.; IWATSUKI, M.; MORI, M.; YAMAMOTO, T.; SHIOMI, K. OMURA, S.; MASUMA, R. Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 12, p. 769-774, 2011.

OH, D-C.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5267- 5273, 2005.

OH, D-C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in coprtng co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 515-520, 2007.

OIKAWA, H.; AIHARA, Y.; ICHIHARA, A.; SAKAMURA, S. Accumulation of grisorixin caused by treating a nigericin-producing strain with a P-450 inhibitor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 684, 1992.

OLIYNYK, M.; STARK, C. B. W.; BHATT, A.; JONES, M. A.; HUGHES-THOMAS, Z. A.; WILKINSON, C.; OLIYNYK, Z.; DEMYDCHUK, Y.; STAUNTON, J.; LEADLAY, P. F. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1179-1190, 2003.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, S. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720, 2002.

PÉREZ-SAYÁNS, M.; SOMOZA-MARTIN, J. M.; BARROS-ANGUEIRA, F.; REY, J. M. G.; GARCÍA-GARCÍA, A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment. **Cancer Treatment Review**, v. 35, n.8, p. 707-713, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. *In*: Andrews, J. & Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: String-Verlag, 179-197, 1991.

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

PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 471-478, 2011.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D.O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In Carlton A. Taft. (Org). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2006, p. 51-78.

PURI, S. C.; BAZIR, A.; CLAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RATEB, M. E.; HALLYBURTON, I.; HOUSSEN, W.; BULL, A.; GOODFELLOW, M.; SANTHANAM, R.; JASPARS, M.; EBEL, R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. **RCS Advances**, v. 3, n. 34, p. 14444-14450, 2013.

REZANKA, T.; SPIZEK, J.; PRIKRYLOVA, V.; PRELL, A.; DEMBITSKY, V.M. Five new derivatives of nonactic and homo-nonactic acids from *Streptomyces globisporus*. **Tetrahedron**, v. 60, n. 22, p. 4781-4787, 2004.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n.2005, p. 80-84, 2005.

RUIZ, B.; CHÁVES, A.; FORERO, A.; GARCIA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, M.; ROCHA, D.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUES-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

RUMJANEK, V. M.; SOUZA, K. W.; OLIVEIRA, M. C. M.; MAIA, R. C. Ciclosporina A e seus análogos como reversores da resistência a múltiplas drogas em células tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 2, p. 103-112, 2003.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. Natural Products Isolation. 2.ed. New Jersey: Humana Press, 2005. 515 p.

SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 315-340, 2004.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SEYEDSAYAMDOST, M. R.; CLARDY, J. Natural products and synthetic biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 10, p. 745-747, 2014.

SHARMA, A. D.; SINGH J. A nonenzymatic method to isolate genomic DNA from bacteria and actinomycete. **Analytical Biochemistry**, v. 337, n. 2, p. 354-356, 2005.

SHEN, J.; BRODBELT, S. Characterization of ionophore-metal complexes by infrared multiphoton photodissociation and collision activated dissociation in a quadrupole ion trap mass spectrometry. **The Analyst**, v. 125, n. 4, p. 641-650, 2000.

SILVA, M. M.; BERGAMASCO, J.; LIRA, S. P.; LOPES, N. P.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R, G. S. Dereplication of bromotyrosine-derived metabolites by LC-PDA-MS and analysis of the chemical profile of 14 *Aplysina* sponge specimens from the Brazilian coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 886-894, 2010.

SMITH L.; HONG H.; SPENCER J. B.; LEADLAY P. F. Analysis of specific mutants in the lasalocid gene cluster: Evidence for enzymatic catalysis of a disfavoured polyether ring closure. **ChemBiochem**, v. 9, n. 18, p. 2967-2975, 2008.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, v. 64, n. 5, p. 263-268, 1998.

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.

SUN Y.; HE, X.; LIANG, J.; ZHOU, Z.; DENG, Z. Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326. **Applied in Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 2, p. 303-310, 2009.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Antitumor activity of 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 86-91, 2007a.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1691-1695, 2005.

TAECHOWISAN, T.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S.; TAYLOR, W. C. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 203-211, 2007b.

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

THAKUR, D.; BORA, T. C.; BORDOLOI, G. N.; MAZUMDAR, S. Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. **Journal of Medical Mycology**, v. 19, n.3, p. 161-167, 2009.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1259-1277, 2010.

TRAXLER, M.F.; WATROUS, J.D.; ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P.C.; KOLTER, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **MBio**, v. 4, n. 4, p. e00459-13, 2013.

TRESNER, H. D.; BACKUS, E. J. A broadened concept of the characteristics of *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 243-250, 1956.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DORR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v.34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

WALCZAK, R. J.; WOO, A. J.; STROHL, W. R.; PRIESTLEY, N. D. Nonactin biosynthesis: the potential nonactin biosynthesis gene cluster contains type II polyketide synthase-like genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 171-175, 2000.

WANG, H.; LIU, N.; XI, L.; RONG, X.; RUAN, J.; HUANG, Y. Genetic screening strategy for rapid access to polyether ionophore producers and products in actinomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3433-3442, 2011.

WEI, G.; ZHU, N.; ZENG, Y.; SHEN, Y.; ZHAO P. Chemical constituents from endophytic *Streptomyces* sp. W5 isolated from *Trewia nudiflora* L. **Annals of Microbiology**, v.60, n. 2, p. 249-253, 2010.

WESTLEY, J.; LIU, C.-M.; SELLO, L. H.; EVANS, R. H.; TROUPE, N.; BLOUNT, J. F.; CHIU, A. M.; TODARO, L. J.; MILLER, P. A. The structure and absolute configuration of the 18-membered macrolide lactone antibiotic X-4357B (concanamycin A). **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 12, p. 1738-1740, 1984.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; QUEIROZ, E. F. Advances in techniques for profiling crude extracts and for the rapid identification of natural products: dereplication, quality control and metabolomics. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n.16, p. 1808-1832, 2010.

WOO, J. T.; SHINOHARA, C.; SAKAI, K.; HASUMI, K.; ENDO, A. Isolation, characterization and biological activities of concanamycins as inhibitors of lysosomal acidification. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 7, p. 1108-1116, 1992a

WOO, J. T.; SHINOHARA, C.; SAKAI, K.; HASUMI, K.; ENDO, A. Inhibition of the acidification of endosomes and lysosomes by the antibiotic concanamycin B in macrophage J774. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, n. 1, p. 383-389, 1992b.

WU, Z.; BAI, L.; WANG, M.; SHEN, Y. Structure-antibacterial relationship of nigericin derivatives. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 3, p. 333-337, 2009.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S.; Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Chinese Traditional and Herbal Drug**, v. 35, n.1, p. 79-81, 2004.

YOSHIMOTO, Y.; JYOJIMA, T.; ARITA, T.; UEDA, M.; IMOTO, M.; MATSUMURA, S.; TOSHIMA, K. Vacuolar-type H⁺-ATPases inhibitory activity of synthetic analogues of the concanamycins: is the hydrogen Bond network involving the lactone carbonyl, the hemiacetal hydroxyl group and C-19 hydroxyl group essential for the biological activity of the concanamycins? **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n.24, p. 3525-3528, 2002.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSHI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.