

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VITOR BRUNO LOURENZON

Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em
***Streptomyces* sp. ICBG311**

Ribeirão Preto
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

VITOR BRUNO LOURENZON

Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em
***Streptomyces* sp. ICBG311**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 30/07/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lourenzon, Vitor Bruno.

Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em *Streptomyces* sp. ICBG311, 2021.

69 p; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

1. Micro-organismos simbiotes. 2. Insetos sociais. 3. Biossíntese. 4. *Streptomyces*. 5. Cifomicina. 6. Atividade Leishmanicida. 7. Atividade antifúngica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Bruno Lourenzon

Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em *Streptomyces* sp. ICBG311.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu sobrinho e afilhado Miguel, que tanto me inspira e ensina.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o suporte. À minha mãe Ana pelas noites em claro incentivando meus estudos. Às minhas avós Conceição e Rosa por todos os ensinamentos e carinhos. À minha irmã Luana por ter se tornado minha melhor amiga e ao meu sobrinho Miguel por me dar novas perspectivas e me ensinar tanto.

À Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, por ter me recebido e me orientado com tanto carinho, dedicação e paciência durante todos esses anos de iniciação científica e mestrado. Por ter sido tão compreensiva e atenciosa em meio a crise política e sanitária que vivemos. Obrigado por todas as oportunidades e por ser um exemplo de professora, orientadora e pessoa.

À técnica Claudia Castania de Macedo, por ser tão atenciosa, por estar sempre disposta a ajudar a todos, e principalmente, por todo o cuidado e carinho que tem por todos nós.

A todos meus colegas de trabalho do LQMo e agregados, que com os anos se tornaram grandes amigos. Por toda a parceria durante as discussões científicas e conversas de bar e por terem sido tão prestativos e atenciosos em me ensinar e me ajudar sempre. Em especial à Dra. Carla Menegatti por toda a parceria e paciência me guiando nos primeiros anos como IC e também, à Dra. Weilan G. Paixão Melo, Taise T. H. Fukuda e Carlismari O. Grundmann por toda ajuda e ensinamentos.

A todos meus amigos que me acompanham, por serem meu suporte emocional, por participarem do meu crescimento pessoal e profissional de forma tão carinhosa, me aceitando e me incentivando a melhorar cada vez mais.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e a Universidade de São Paulo por toda a estrutura. Em especial todos os professores e funcionários que participaram direta ou indiretamente na minha formação ao longo dos sete anos e meio como aluno de graduação e mestrado.

Às agências de fomento por todo o suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2019/16559-3 e projeto temático FAPESP-FIC/NIH 2013/50954-0) e ao CNPq. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

*“.... Enquanto houver ignorância, haverá quem acredite e compactue com a intolerância;
A ignorância do outro é a minha morte no futuro...”*

Rita Von Hunty

RESUMO

LOURENZON, V. B. **Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em *Streptomyces* sp. ICBG311**. 2021. 69f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os produtos naturais desempenham um importante papel na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos. Neste contexto, os micro-organismos possuem notável contribuição, visto que são profícuos produtores de metabólitos secundários ativos frente aos mais diversos patógenos. Em função disso, a associação com micro-organismos se mostrou uma importante vantagem evolutiva para os mais diversos seres vivos como plantas, insetos e diversos outros animais. Um exemplo bem conhecido desse tipo de simbiose é associação de formigas da subtribo Attina com actinobactérias que produzem compostos ativos frente patógenos específicos que ameaçam a colônia das formigas. Em estudos recentes realizados no Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo – FCFRP) foram identificados, a partir do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311, isolada de machos alados de formigas criadoras de fungos *Cyphomyrmex*, três policetídeos estruturalmente relacionados, sendo um deles inédito, a cifomicina (**15**), e dois já descritos na literatura, caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**). Os compostos apresentaram potencial antifúngico contra linhagens de fungo entomopatogênico e também contra patógenos humanos, além de elevada atividade antiparasitária frente as formas amastigotas intracelulares e promastigotas de *Leishmania donovani*. Dispondo dessas informações, o presente projeto contribuiu com a determinação da via de biossíntese da cifomicina e seus análogos e com a avaliação da produção dos compostos em diferentes condições de cultivo. A partir de análises do genoma de *Streptomyces* sp. ICBG311 usando o software AntiSMASH, foi identificado o cluster de genes biossintéticos (BGC) 1.4 que possui 220 Kpb de comprimento, contendo 83 genes, sendo 25 deles putativamente relacionados com a biossíntese dos compostos **15-17**. O esqueleto policetídeo é biossintetizado por uma policetídeo sintase (PKS) tipo I, e posteriormente modificado por citocromos P450 que promovem oxidações pontuais que marcam as diferenças entre os três compostos. Os açúcares presentes nas estruturas são biossintetizados a partir da glicose-1-fosfato pela ação de nove enzimas, e por fim, a alquilnaftoquinona tem como precursor biossintético um intermediário da via da menaquinona e o restante de sua biossíntese é realizada pelo produto de três outros genes. Com o objetivo de otimizar as condições de cultivo, a linhagem ICBG311 foi cultivada em diversos meio de cultura, porém a produção dos compostos não foi reprodutível na maioria das condições testadas, com a exceção do meio ISP2 ágar. O cultivo da linhagem ICBG311 em meio ISP2 ágar também se destacou nas análises metabolômicas usando dados de LC-ESI-MS/MS e a plataforma “Global Natural Product Social Molecular Networking” (GNPS), apresentando 53 íons que não estavam presentes nos extratos dos cultivos em outros meios de cultura. Com isso, o meio ISP2 ágar se mostrou promissor tanto para a produção dos compostos **15-17** como para explorar o potencial biossintético apresentado por essa actinobactéria. Sendo assim, este trabalho relata a via de biossíntese da cifomicina e seus análogos, além de contribuir com a determinação das condições de cultivo que podem ser utilizadas em trabalhos futuros com a linhagem bacteriana.

Palavras-chave: Micro-organismos simbiotes, Insetos sociais, Biossíntese, *Streptomyces*, Cifomicina, Atividade Leishmanicida, Atividade antifúngica.

ABSTRACT

LOURENZON, V. B. **Biosynthetic studies of bioactive macrolactone polyketide from *Streptomyces* sp. ICBG311**. 2021. 69f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Natural products play an important role in the discovery and development of new drugs. In this context, microorganisms have a remarkable contribution since they are capable of producing several secondary metabolites that are active against different pathogens. The association with microorganisms proved to be an important evolutionary advantage for the most diverse living beings such as plants, insects, and animals. A well elucidate example of this kind of symbiosis is the association of fungus-growing ants of *Attina* subtribe with actinobacteria, which produce active compounds against specific parasites that threaten the ant colony. In recent studies carried out at the Lab of Microbial Chemistry (LQMo - FCFRP), three chemically related polyketides were identified from the culture of the actinobacteria *Streptomyces* sp. ICBG311, isolated from a winged male of *Cyphomyrmex* fungus-growing ant, the novel compound, cyphomycin (**15**), and two analogues already reported, caniferolide C (**16**) and GT-35 (**17**). The compounds presented antifungal potential against entomopathogenic fungus strains and also against human pathogens, in addition to high antiparasitic activity against intracellular amastigote and promastigote forms of *Leishmania donovani*. In this context, this project contributed to the knowledge about the biosynthetic pathway of cyphomycin and analogs, besides the evaluation of the compounds production in different culture conditions. By analyzing *Streptomyces* sp. ICBG311's genome on AntiSMASH software, the biosynthetic gene cluster (BGC) 1.4 was identified as responsible for the biosynthesis. The BGC is 220 Kb in length containing 83 genes, 25 of them are putatively related to the biosynthesis of compounds **15-17**. The polyketide chain is biosynthesized by a type I polyketide synthase (PKS), and modified by cytochrome P450 enzymes that promote punctual oxidations that lead to the differences observed among the three compounds. Sugar biosynthesis starts with glucose-1-phosphate and is performed by nine enzymes. Finally, an intermediate of menaquinone pathway is used as the precursor for the alkylnaphthoquinone biosynthesis, which is completed by the product of three other genes. Aiming to optimize culture conditions, *Streptomyces* sp. ICBG311 was cultivated in several culture media. However, the production of compounds **15-17** was not reproducible in most of the tested conditions, except for ISP2 agar media. ICBG311 culture in ISP2 agar also presented 53 exclusive ions, when compared with the other media tested, on the metabolomics analyses performed with the LC-ESI-MS/MS data at the Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) platform. Based on that, ISP2 agar is a promising culture media for future studies regarding the compounds **15-17** production, and the biosynthetic potential presented by the strain ICBG311. Therefore, this study reports the biosynthetic pathway of cyphomycin and analogs and contributes to the optimization of the strain ICBG311 culture conditions for future studies.

Keywords: Symbiotic microorganisms, Social insects, Biosynthesis, *Streptomyces*, Cyphomycin, Leishmanicidal activity, Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Produtos naturais bioativos envolvidos na simbiose de *Streptomyces* com formigas cultivadoras de fungos.4
- Figura 2** - Estruturas químicas dos compostos antifúngicos cifomicina (**15**), caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**).7
- Figura 3** - Fluxograma das metodologias de cultivo, obtenção e análises dos extratos a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meios líquidos.19
- Figura 4** - Fluxograma das metodologias de cultivo, obtenção e análises dos extratos a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio **ISP2 ágar**.20
- Figura 5** - *Cluster* de genes biossintéticos proposto como responsável pela biossíntese dos compostos **15-17**. As cores relacionam os genes que participam da biossíntese das três partes das estruturas: cadeia policetídica (vermelho e roxo), açúcares (azul) e alquilnaftoquinona (verde).23
- Figura 6** - Análise filogenética dos 22 domínios AT presentes nas oito PKS presente no BGC da cifomicina em comparação com domínios específicos para metilmalonil-CoA e malonil-CoA conhecidos.25
- Figura 7** - Alinhamento das sequências de aminoácidos dos 19 domínios KR presentes. Destacadas com caixas rosas, estão as quatro regiões conservadas utilizadas para classificar os domínios de acordo com a estereoquímica do produto formado. As regiões **1** e **2** são responsáveis pela estereoquímica da hidroxila β -carbonílica (classificação A e B) e as regiões **3** e **4** são responsáveis pela estereoquímica da metila α -carbonílica, quando presente (classificação 1 e 2).27
- Figura 8** - Alinhamento dos oito domínios DH presentes. As regiões conservadas estão destacadas em rosa. O domínio DH presente no módulo M6 marcado com * é inativo.28
- Figura 9** - Alinhamento dos quatro domínios ER com regiões conservadas destacadas com caixas rosas.29

Figura 10 - Via de biossíntese proposta para a cadeia policetílica macrocíclica. O domínio DH presente no módulo M6 destacado em vermelho é inativo, os domínios DH e ER destacados em amarelo no módulo M9 podem não participar da biossíntese e o domínio DH destacado em verde no módulo M13 está ativo, porém, não é acompanhado de um domínio KR.....30

Figura 11 – Liberação da cadeia policetílica, com a formação da macrolactona, pela ação do domínio tioesterase (TE) presente no último módulo da PKS multimodular e formação do anel hemiacetal.31

Figura 12 – Diferenças entre o policetídeo macrolactônico predito e a porção policetílica dos compostos **15-17**. Diferenças que podem ser explicadas pela presença de citocromos P450 destacadas em roxo. Diferença estereoquímica da metila ligada ao C4 destacada em vermelho.....32

Figura 13 - Biossíntese proposta para os carboidratos L-axenose e D-aminocetose. NDP: Nucleotídeo difosfato.33

Figura 14 - Biossíntese proposta para a alquilnaftoquinona.35

Figura 15 - Cromatogramas dos padrões de cefomicina (**15**), caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**), com destaque para a região entre 11 min e 20 min. Análises realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em 254 nm.....37

Figura 16 - Cromatogramas dos extratos obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp ICBG311 nos meios de cultura A, A simplificado, ISP2, ISP2 ágar, A3M, A1G e M9. Com destaque para a região de tempo de retenção entre 15,8 min e 16,3 min (rosa), referente ao tempo de retenção dos compostos **15-17**. Todas as análises foram realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em λ 254 nm.....38

Figura 17 - Cromatogramas dos extratos obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp ICBG311 nos meios **ISP2** e **A3M** com tempo de incubação de 2, 4, 6 e 8 dias. Com destaque para a região de tempo de retenção entre 15,8 min e 16,3 min (rosa), referente ao tempo de retenção dos compostos **15-17**. Todas as análises foram realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em 254 nm.....39

Figura 18 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **ISP2 ágar**, e extrações dos íons (EIC)

<i>m/z</i> 1463,7721 (15) , <i>m/z</i> 1479,7715 (16) e <i>m/z</i> 1495,7709 (17) . Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos 15-17	41
Figura 19 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria <i>Streptomyces</i> sp. ICBG311 em meio de cultivo ISP2 ágar em escala ampliada, e extrações dos íons (EIC) <i>m/z</i> 1463,7721 (15) , <i>m/z</i> 1479,7715 (16) e <i>m/z</i> 1495,7709 (17) . Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos 15-17 . ..	42
Figura 20 – Comparação entre os cromatogramas e as extrações dos íons (EIC) <i>m/z</i> 1463,7721 (15) , <i>m/z</i> 1479,7715 (16) e <i>m/z</i> 1495,7709 (17) dos extratos obtidos do primeiro cultivo da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. ICBG311 em meio ISP2 ágar (vermelho) e o aumento de escala realizado no mesmo meio (azul).	43
Figura 21 – Diagrama de Venn contendo a quantidade de nodos apresentados pela rede molecular para cada um dos extratos obtidos do cultivo da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. ICBG311 nos meios de cultura ISP2 , ISP2 ágar e A3M	44
Figura 22 – Nodo referente ao íon <i>m/z</i> 655,27 presente nos extratos do cultivo da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. ICBG 311 em meios A3M e ISP2 . Estruturas químicas das coproporfirinas I (18) , II (19) , III (20) e IV (21) . Comparação entre os espectros de MS/MS da biblioteca GNPS (picos pretos) e nossos dados experimentais (picos vermelhos) relativos ao íon de <i>m/z</i> 655,2726.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade dos compostos cifomicina (15) , caniferolídeo C (16) e GT-35 (17) contra as formas amastigota intracelular e promastigotas de <i>L. donovani</i>	8
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ACP	Domínio proteína carreadora de acila
AT	Domínio acetiltransferase
BGC	<i>Cluster</i> de genes biossintéticos
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CHCl ₃	Clorofórmio
CTAB	Brometo de Cetrimônio
DH	Domínio desidratase
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ER	Domínio enoila redutase
FeSO ₄ -7H ₂ O	Sulfato de Ferro hepta hidratado
GNPS	<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
HPC	<i>High performance computing</i>
ICBG	<i>International Cooperative Biodiversity Group</i>
ISP2	<i>International Streptomyces Project-Medium 2</i>
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de monopotássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
KR	Domínio cetorredutase
KS	Domínio cetoacila sintase
LC-HR-MS/MS	<i>High Resolution – Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MgSO ₄ -5H ₂ O	Sulfato de magnésio penta hidratado
MnCl ₂ -4H ₂ O	Cloreto de Manganês tetra hidratado

Na ₂ PO ₄	Fosfato disódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
PKS	Policetídeo sintase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tampão TE	Tampão tris-EDTA
TE	Domínio tioesterase
Tris	<i>Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Trizma® base)</i>
UV	Ultravioleta
ZnSO ₄ -7H ₂ O	Sulfato de Zinco hepta hidratado

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVEATURA E SÍGLAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Naturais de micro-organismos e simbiose.....	2
1.2. Produtos naturais provenientes da associação entre formigas da tribo Attini e micro-organismos.....	3
1.3. Biossíntese de policetídeos	5
1.4. Cifomicina e derivados.....	6
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Meios de cultura	13
3.2. Coleta e isolamento de micro-organismos de formigas cultivadoras de fungo	14
3.3. Extração do DNA, sequenciamento e montagem do genoma	15
3.4. Análises bioinformáticas	16
3.5. Reativação da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. ICBG311	17
3.6. Otimização das condições de cultivo para a produção dos compostos.....	17
3.7. Otimização do tempo de cultivo nos meios líquidos A3M e ISP2	17
3.8. Cultivo em meio sólido ISP2 ágar.....	18
3.9. Aumento de escala em meio ISP2 ágar.....	18
3.10. Obtenção dos extratos.....	19
3.10.1. Extração de cultivos em meio líquido	19
3.10.2. Extração de cultivos em meio sólido	20
3.11. Análise do perfil químico dos padrões e dos extratos.....	20
3.12. Análises metabômicas por Molecular Networking (GNPS)	21

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Cluster de genes biossintéticos da cefomicina	23
4.2. Predição da biossíntese do policetídeo macrolídeo.....	24
4.2.1. Caracterização dos domínios acetiltransferase (AT).....	25
4.2.2. Caracterização dos domínios cetorreductase (KR).....	26
4.2.3. Caracterização dos domínios desidratase (DH)	28
4.2.4. Caracterização dos domínios enoila redutase(ER)	29
4.2.5. Proposta de biossíntese para a cadeia policetídic.....	29
4.2.6. Liberação da cadeia policetídic e formação da macrolactona	31
4.2.7. Modificações no policetídeo macrolactônico	31
4.3. Predição da biossíntese dos açúcares	33
4.4. Predição da biossíntese da alquilnaftoquinona.....	34
4.5. Otimização das condições de cultivo para a produção dos compostos.....	35
4.6. Otimização do tempo de cultivo nos meios A3M e ISP2.	38
4.7. Cultivo em meio ISP2 sólido.	40
4.8. Aumento de escala de cultivo em meio ISP2 sólido.	41
4.9. Análises metabôlômicas por Molecular Networking (GNPS)	43
5. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais de micro-organismos e simbiose

Os compostos de origem natural são utilizados para o tratamento das mais diversas enfermidades desde os primórdios da medicina (KOEHN; CARTER, 2005). Ainda hoje, os produtos naturais representam uma fonte fundamental para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Os micro-organismos são profícuos produtores de metabólitos especializados, sendo capazes de produzir uma ampla variedade de substâncias de alta complexidade química (LOPES; GUIMARÃES; PUPO, 2011; WOODRUFF, 1980). Em suas revisões sobre produtos naturais, Newman e Cragg enfatizam a importância dos estudos de produtos naturais de micro-organismos, destacando o grande número de compostos bioativos produzidos por estes ou pela interações dos micro-organismos simbiotes com o hospedeiro de onde foram isolados, resultando em um grande número de fármacos desenvolvidos e/ou inspirados a partir desta fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2016, 2020).

Em um ecossistema os organismos estão constantemente interagindo entre si e, dessa forma, muitos encontraram uma vantagem evolutiva nessas interações, gerando assim relações íntimas entre duas ou mais espécies, chamada simbiose (MARTIN; SCHWAB, 2012; ROSENBERG et al., 2010). Um exemplo de simbiose observada entre micro-organismos e os mais diversos hospedeiros é o mutualismo, onde ambos os envolvidos se beneficiam da relação, podendo ou não se tornarem dependentes para sobrevivência (BRONSTEIN, 2009). Nessas interações, os micro-organismos encontram um ambiente favorável para sobrevivência e, em contrapartida, fornecem alguma vantagem evolutiva para o hospedeiro, como por exemplo a produção de compostos bioativos que podem ser usados como agentes de defesa (MORAN, 2006). Assim, é muito provável que os produtos naturais sejam resultados das complexas interações dos organismos entre si e destes com o ambiente, e que desempenhem funções precisas e definidas nestas associações simbióticas.

1.2. Produtos naturais provenientes da associação entre formigas da tribo Attini e micro-organismos

Insetos compreendem um dos grupos mais diversos e populosos dos seres vivos (SCHWENTNER et al., 2017). Ao longo da evolução, alguns insetos desenvolveram uma relação mutualística com fungos, que são utilizados como fontes de nutrientes. Para isso, os insetos cultivam esses fungos dentro de suas colônias através do fornecimento de matéria orgânica (BEEMELMANN et al., 2016). Esse fenômeno foi reportado em diversos insetos como formigas (CURRIE; STUART, 2001), cupins (AANEN et al., 2002), besouros (SCOTT et al., 2008) e, mais recentemente, abelhas sem ferrão (MENEZES et al., 2015; PALUDO et al., 2018).

Dentre os exemplos de insetos que cultivam fungos, podemos destacar as formigas da subtribo Attina, que é composta por 14 gêneros com cerca de 300 espécies descritas. São encontradas em regiões neotropicais, e todas dependem do cultivo do fungo mutualista (Basidiomycota; Agaricales: Lepiotaceae e Pterulaceae) para sobrevivência (CURRIE; STUART, 2001; MUELLER et al., 2018). O jardim de fungos cultivado pelas formigas está susceptível ao ataque de patógenos, como os fungos do gênero *Escovopsis*, que comprometem a viabilidade dos ninhos. Assim, para garantir sua sobrevivência, ao longo da evolução as formigas estabeleceram outra relação simbiótica, associando-se a actinobactérias capazes de produzir compostos antimicrobianos que atuam seletivamente frente ao fungo parasita (CAFARO et al., 2011).

O filo Actinobactéria é reconhecido como um dos mais importantes para a biotecnologia, medicina e agricultura. Isso se dá em função da capacidade de seus representantes de produzir uma extensa variedade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (BARKA et al., 2016). Nos últimos anos, foram relatadas diversas linhagens de actinobactérias (como *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Amycolatopsis*), isoladas de interações com insetos, que produzem metabólitos capazes de auxiliar na proteção de seus hospedeiros (CHEVRETTE et al., 2019; MENEGATTI et al., 2021; VAN MOLL et al., 2021).

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção da maioria dos produtos naturais microbianos biologicamente ativos, com uma grande

variedade de aplicações, como antibióticos, antifúngicos, imunossupressores e antitumorais (IKEDA; SHIN-YA; OMURA, 2014; LIU; DENG; LIU, 2018). Porém, o extensivo estudo de linhagens desse gênero isoladas do solo nas últimas décadas levou a uma diminuição na descoberta de novos compostos. Em função disso, novos ecossistemas estão sendo explorados em busca de *Streptomyces* capazes de produzir metabólitos secundários ativos e inéditos.

Nesse contexto, as linhagens isoladas em associação com insetos têm se mostrado como fonte promissora de compostos que, além de inéditos, apresentam uma atividade maior contra patógenos resistentes aos antibióticos conhecidos, em comparação com a dos metabólitos produzidos por linhagens de *Streptomyces* isoladas do solo ou em associação com plantas (CHEVRETTE et al., 2019). São exemplos de produtos naturais, com atividade antimicrobiana, descritos a partir de *Streptomyces* associadas a formigas *Attina*: antimicinas A1 (1), A2 (2), A3 (3), A4 (4), actinomicina D (5), actinomicina X2 (6), valinomicina (7) (SCHOENIAN et al., 2011), griseorrodinas A (8) e C (9) (ORTEGA et al., 2017), nigericina (10), nigericina (10), Mer-A2026B (11), piericidina-A1 (12), dinactina (13) (ORTEGA et al., 2019a) e ciclooctasulfur (14) (ORTEGA et al., 2019b) (Figura 1).

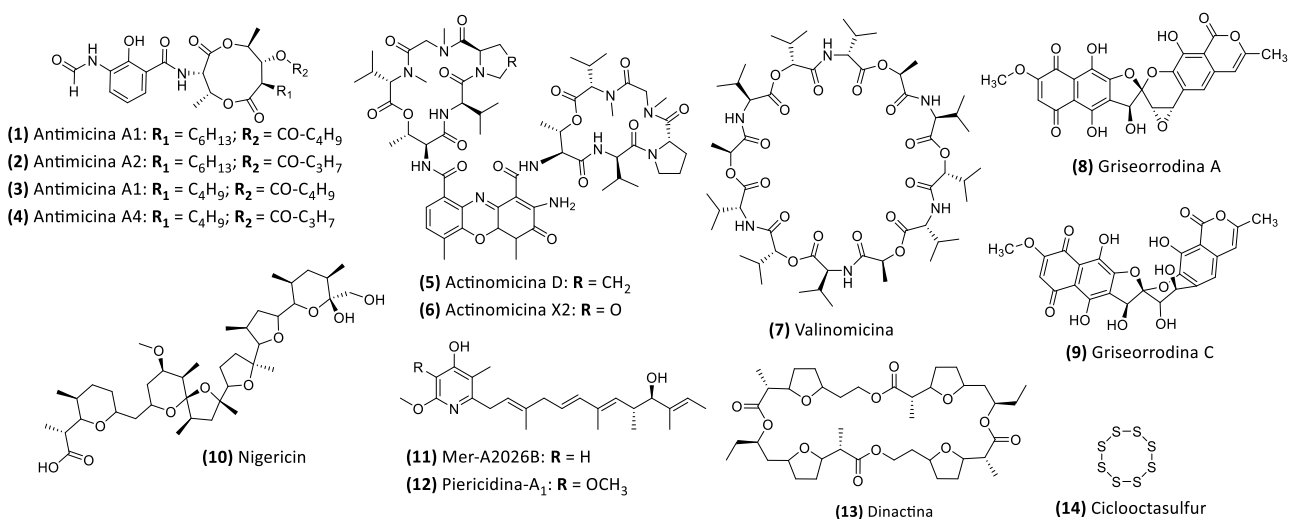


Figura 1 - Produtos naturais bioativos envolvidos na simbiose de *Streptomyces* com formigas cultivadoras de fungos.

1.3. Biossíntese de policetídeos

Os policetídeos são uma extensa classe de produtos naturais, encontrados em bactérias, fungos e plantas, e incluem compostos com diversas propriedades biológicas como antibióticos, antifúngicos, anticâncer, imunossupressores, etc (SHEN, 2003; STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

São sintetizados a partir da condensação de unidades de acila por enzimas chamadas de policetídeo sintases (PKS). As PKSs são divididas em três tipos de acordo com sua estrutura e funcionalidade (DONADIO et al., 1991). PKSs do Tipo I são enzimas multifuncionais que contêm um maquinário biossintético complexo dividido em módulos, que por sua vez se subdividem em domínios, sendo cada módulo responsável pela incorporação de uma unidade de acila. Podem ser separadas, ainda, em dois grupos de acordo com sua forma de atuação: PKSs tipo I não interativas, em que cada ciclo de extensão da cadeia policetídica é promovido por um módulo específico, e as PKSs tipo I iterativas, em que um módulo promove múltiplos ciclos de alongamento da cadeia, usando seus domínios catalíticos várias vezes (CASTOE et al., 2007). As PKSs do tipo II, são complexos multienzimáticos que catalisam um conjunto de reações para a biossíntese de policetídeos aromáticos. Por fim, as PKSs do tipo III, promovem o processamento e alongamento da cadeia em apenas um sítio ativo, produzindo policetídeos aromáticos (normalmente mono ou bicíclico) (CASTOE et al., 2007; SHEN, 2003).

Um módulo de PKS tipo I deve conter no mínimo três domínios essenciais para promover um ciclo de alongamento da cadeia: proteína carreadora de acila (ACP), responsável por carrear a cadeia policetídica em formação, domínio acetiltransferase (AT), que recruta a subunidade formadora de cadeia que será incorporada no ciclo em questão, e o domínio cetoacila sintase (KS), que catalisa uma reação de condensação de Claisen, promovendo a formação de uma ligação C-C entre a cadeia que está sendo formada e a nova subunidade a ser incorporada. Ao final do último módulo, está presente o domínio tioesterase (TE), responsável pela saída do policetídeo do complexo enzimático através de uma reação de transesterificação que leva a formação de uma macrolactona por clivagem intermolecular, ou de uma hidrólise gerando um grupo ácido carboxílico (PAULO; SIGRIST; OLIVEIRA, 2019; PAWLIK et al., 2007).

Além dos obrigatórios, é possível encontrar em um módulo domínios facultativos, que promovem modificações à cadeia policetídica que está sendo construída. Os principais domínios facultativos são: domínio cetorredutase (KR), que reduz a carbonila de cetona a álcool, domínio desidratase (DH), responsável pela formação de um alceno através de uma reação de desidratação, e domínio enoila redutase (ER), que promove a redução do alceno a cadeia saturada (PAULO; SIGRIST; OLIVEIRA, 2019; PAWLIK et al., 2007).

A análise individual das regiões conservadas de cada domínio ainda pode fornecer informações sobre qual subunidade formadora de policetídeo será recrutada pela AT em cada ciclo e também sobre a estereoquímica da cadeia após as modificações promovidas pelos domínios facultativos (PAULO; SIGRIST; OLIVEIRA, 2019).

1.4. Cifomicina e derivados

Em estudos recentes realizado em nosso grupo de pesquisa no âmbito do Projeto FAPESP/FIC-NIH (2013/50954-0) e do CEPID-CIBFar (2013/07600-3) foram isolados três compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 (depositada no banco de dados NCBI sob o código PRJNA558800), isolada de machos alados de formigas *Cyphomyrmex*, sendo um deles inédito, nomeado de cifomicina (**15**) (CHEVRETTE et al., 2019) e dois deles já descritos na literatura: caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**) (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019; TAKAHASHI et al., 1997) (**Figura 2**). As estruturas químicas dos compostos **15-17**, incluindo configurações relativas, foram estabelecidas com base em estudos extensivos de dados de RMN (ORTEGA, 2018; ORTEGA; LOURENZON, et al., 2021).

Os três compostos apresentaram inibição similar à obtida com o controle positivo (miconazol) contra quatro diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. (ORTEGA, 2018). A cifomicina (**15**) também apresentou atividade *in vitro* frente aos patógenos fúngicos humanos *Aspergillus fumigatus* 11628 (resistente a equinocandina), *C. glabrata* 4720 (resistente a triazol), e *C. auris* B11211 (resistente a equinocandina, triazol, e anfotericina B), com concentrações inibitórias mínimas (MIC) de 0,5; 0,5 e 4 µg/mL, respectivamente (CHEVRETTE et al., 2019).

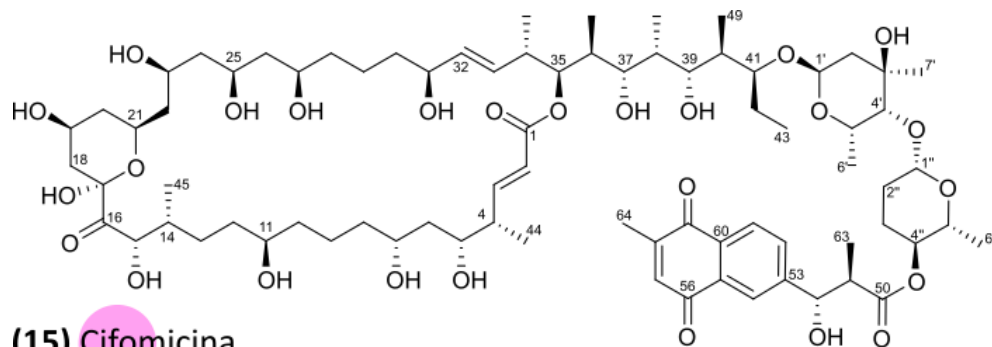
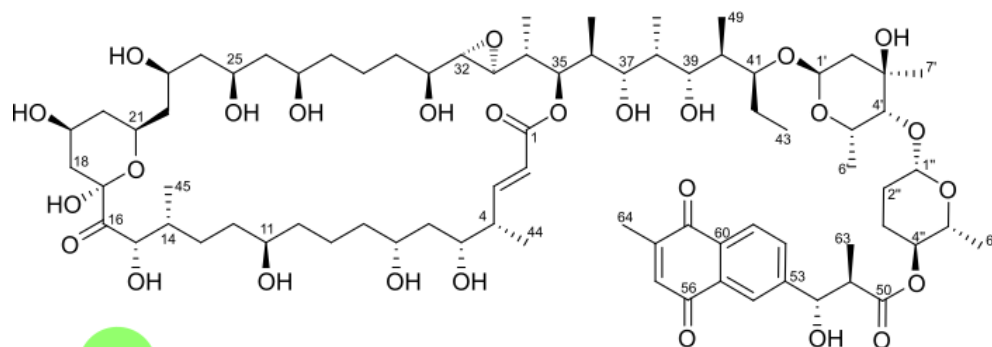
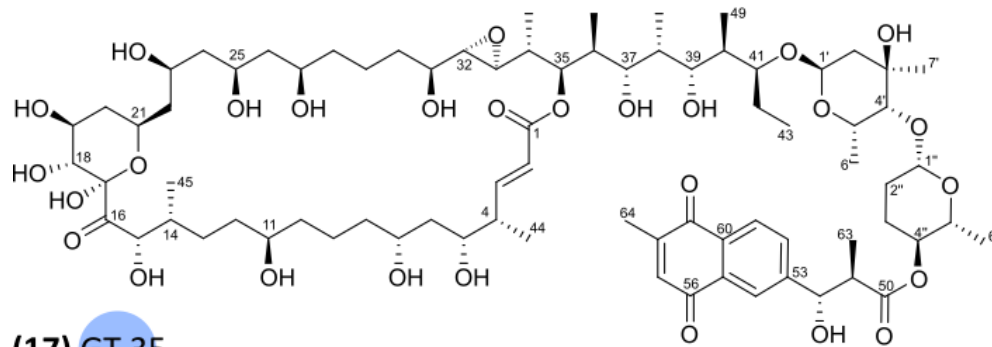
**(15) Cifomicina****(16) Caniferolide C****(17) GT-35**

Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos antifúngicos cifomicina **(15)**, caniferolídeo C **(16)** e GT-35 **(17)**.

Em estudo *in vivo* de dose única em modelo de camundongo neutropênico disseminado com candidíase (ZHAO et al., 2018) a cifomicina **(15)** exibiu uma dose resposta de 0,56 e 0,66 log de redução da carga infecciosa quando tratados com 20 e 40 mg/Kg, respectivamente e o caniferolídeo C **(16)** apresentou uma redução de 0,53 log

com a administração de 40 mg/Kg, demonstrando a efetividade e relevância clínica desses dois compostos (CHEVRETTE et al., 2019; ORTEGA, 2018).

Os compostos **15-17** também se mostraram mais ativos contra ambas as formas de *Leishmania donovani* testadas (amastigota intracelular e promastigota) que o controle positivo miltefosina (**Tabela 1**), com bons índices de seletividade (ORTEGA; LOURENZON, et al., 2021).

Tabela 1 - Atividade dos compostos cifomicina (**15**), caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**) contra as formas amastigota intracelular e promastigotas de *L. donovani*.

Compostos	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µM)	Índice de seletividade**
	amastigota intracelular	Promastigota	THP-1*	
Cifomicina (15)	2,25 ± 0,15	0,112 ± 0,015	10,95 ± 1,41	4,87
Caniferolídeo C (16)	0,087 ± 0,015	0,033 ± 0,006	6,54 ± 0,73	75,17
GT-35 (17)	0,068 ± 0,013	0,040 ± 0,006	5,76 ± 1,20	84,71
Doxorrubicina	--	--	0,71±1,20	--
Miltefosina	5,80 ± 0,59	4,47 ± 0,25	--	--

*THP-1 células hospedeiras da *L. donovani* (macrófagos humanos)

**Índice de seletividade = CC₅₀ THP-1 / IC₅₀ amastigota intracelular

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada, acometendo em torno de 250 a 300 mil e matando em torno de 20 a 30 mil pessoas por ano ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). A miltefosina, originalmente autorizada para o tratamento de câncer, foi o único medicamento aprovado para o tratamento de leishmaniose entre 1981 e 2019 (DORLO et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2020). Os medicamentos utilizados atualmente para o tratamento de leishmaniose visceral (forma mais grave da doença) como antimoniato de meglumina, estibogluconato de sódio, anfotericina B, paromomicina e miltefosina, possuem diversas limitações como toxicidade, eficácia inconstante, administração invasiva e longo tempo de tratamento (BARRETT; CROFT, 2012), portanto, o estudo e descoberta de novas opções de tratamento se faz urgente.

Infecções causadas por fungos continuam sendo um grande problema de saúde pública ao redor do mundo. As infecções dérmicas são a grande maioria dos casos

(THOMAS et al., 2010), porém as infecções invasivas são responsáveis pela maior taxa de mortalidade (aproximadamente 1,5 milhões de pessoas por ano) se igualando a doenças como tuberculose e malária (BROWN et al., 2012). Os principais gêneros associados aos casos de morte são: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, e *Pneumocystis* (BROWN et al., 2012). Nas últimas décadas, algumas classes de medicamentos antifúngicos foram descobertas, como equinocandina e os triazóis (OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010), porém, complicações como alta toxicidade, interações medicamentosas e o desenvolvimento de resistência a antifúngicos têm emergido nos últimos anos, tornando extremamente importante o estudo de novos compostos com potenciais antifúngicos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho envolve elucidar a via de biossíntese da cifomicina e seus análogos, através da realização análises *in silico* do genoma bacteriano, e determinar a melhor condição de cultivo para a produção desses compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura

Meio ISP2	(pH: 7,2)
Extrato de levedura	4 g
Dextrose	4 g
Extrato de malte	10 g
Água destilada	1 L
Ágar*	20 g

*Adicionado apenas para meio **ISP2 ágar**

Meio A	(pH: 7,0)
Amido solúvel	20 g
Glicose	10 g
Peptona	5 g
Extrato de levedura	5 g
CaCO ₃	5g
Água destilada	1 L

Meio A simplificado	(pH: 7,0)
Amido solúvel	20 g
Glicose	10 g
Peptona	5 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada	1 L

Meio A3M	(pH: 7,0)
Amido solúvel	20 g
Glicerol	20 g
Glicose	5 g
Pharmamedia	15 g
(Proteína de semente de algodão)	
Extrato de levedura	3 g
Água destilada	1 L

Meio A1G	(pH: 7,0)
Glicose	9 g
Peptona	2 g
Extrato de levedura	4 g

Água destilada	1 L
Meio M9 enriquecido	(pH: 7,0)
Glicose (2%)	2 mL
MgSO ₄ (1M)	0,2mL
CaCl ₂ (1M)	10 µL
Água MiliQ qsp.	100 mL.
Solução salina M9 (5X)	20 mL:
3,39% Na ₂ PO ₄	
1,5% KH ₂ PO ₄	
0,25% NaCl	
Água MiliQ (deionizada).	
Meio quitina	(pH: 7,0)
Quitina	4 g
K ₂ HPO ₄	0,7 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,01 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 L

3.2. Coleta e isolamento de micro-organismos de formigas cultivadoras de fungo

A coleta de operárias e machos alados de uma colônia de formigas *Cyphomyrmex* foi realizada no dia primeiro de outubro de 2015 no campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (coordenada geográfica: S 21° 10'04.4" W 47° 50'49.5"). A coleta é vinculada aos projetos FAPESP/FIC-NIH (2013/50954-0) e CEPID-CIBFar (2013/07600-3), de acordo com as permissões para coleta e acesso ao patrimônio genético emitidas pelo SISBIO (#46555-1 a #46555-7) e pelo CNPq (#010936/2014-9).

As formigas coletadas foram adicionadas em frascos Eppendorf contendo 500 µL de água deionizada e autoclavada, os frascos foram agitados em vortex por 30 segundos e o conteúdo foi então inoculado em placas contendo meio quitina suplementada com antifúngicos (0,04 g/L de nistatina e 0,05 g/L de cicloheximida). Após 14 dias de

incubação a 28 °C, as colônias de bactérias foram inoculadas individualmente em placas contendo ISP2 ágar suplementado com antifúngicos (0,04 g/L de nistatina e 0,05 g/L de cicloheximida). Após 14 dias de incubação, as bactérias isoladas foram armazenadas em freezer à -80 °C em tubos criogênicos de 2 mL contendo 500 µL de meio ISP2 suplementados com 20% de glicerol (CHEVRETTE et al., 2019; ORTEGA, 2018; ORTEGA; LOURENZON, et al., 2021). Esta etapa foi realizada previamente a este trabalho, por outros membros do grupo de pesquisa.

3.3. Extração do DNA, sequenciamento e montagem do genoma

A extração do DNA da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi realizada utilizando o protocolo de Kumar com adaptações (KUMAR et al., 2010). A actinobactéria foi cultivada em meio TSB (Tryptona de soja líquido, BF, Estados Unidos) por 5 dias a 30 °C e 300 rpm. Após esse período a cultura foi transferida para microtubo Eppendorf e centrifugado a 10,000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi congelado a -20 °C. O *pellet* foi lavado com 500 µL de solução de sacarose 10,3%, centrifugada por 1 min a 10,000 x g, e o sobrenadante foi descartado. Então, 450 µL de tampão TSE (50% sacarose; 0,5 M EDTA pH 8 e 1M tampão Tris pH 8,0) suplementados com lisozima (20 mg/mL) foram adicionados e incubados por 20 min a 37 °C. Após esse período, 13 µL de proteinase K foram adicionados e incubados por 15 min a 55 °C, e então, 250 µL de SDS 2% foram adicionados e agitados gentilmente até a formação de uma solução clara. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de fenol:clorofórmio (1:0,96, pH 8,0), a solução foi agitada e centrifugada por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, ao qual também foram adicionados 60 µL de solução de NaOAc (3 M, pH 6,0) e 700 µL de isopropanol. O conteúdo foi agitado até o aparecimento de *pellets* brancos, e então, foi centrifugado por 1 min a 10,000 x g, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 1 min a 10,000 x g. Após a secagem completa do etanol, o DNA foi ressuscitado em 30 µL de água deionizada.

Alguns passos foram adicionados para o sequenciamento do genoma da actinobactéria. O *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0,1

mM EDTA; pH 8,1) acrescido de 10 µL de RNase, o tubo foi agitado por 15 min em temperatura ambiente. Então, foram adicionados 100 µL de solução de NaCl (5 M, pH 6,0) e a mistura foi agitada. Em seguida, foram adicionados 70 µL de solução CTAB/NaCl (10 mL 1 M Tris (pH 8,4), 5 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0), 28 mL 5 M NaCl, 2 g CTAB, 57 mL de água deionizada), a mistura foi agitada e incubada por 10 min a 55 °C, e em seguida, arrefecida até 37 °C. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada e centrifugada por 10 min em temperatura ambiente. A camada superior foi transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 300 µL de fenol e 150 µL de clorofórmio, a mistura foi agitada e centrifugada por 10 min a 4 °C. Novamente, a camada superior foi transferida com uma ponteira de furo largo para um novo tubo contendo 300 µL de solução de CHCl₃. A mistura foi agitada e centrifugada por 1 min e a camada superior foi transferida para um tubo contendo 50 µL de NaOAc (pH 6,0) e 400 µL de isopropanol. A mistura foi agitada até a formação de um *pellet* branco e a solução se tornar uniforme. O DNA foi então centrifugado rapidamente, o sobrenadante foi retirado, e o DNA foi ressuscitado em 100-200 µL de água ultrapura. A quantificação do DNA e a análise de pureza da solução foi feita com NanoDrop® (Thermo Scientific).

O sequenciamento, utilizando tecnologia Illumina, e a montagem do genoma da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi realizado no Centro de Genética e Biotecnologia da Universidade de Wisconsin, Madison, EUA (CHEVRETTE et al., 2019).

Estas etapas também foram realizadas previamente a este trabalho, por outros membros do grupo de pesquisa.

3.4. Análises bioinformáticas

O genoma foi analisado no AntiSMASH 4.0 (BLIN et al., 2017) para a anotação dos *clusters* de genes biossintéticos (BGC) presentes nos 103 contigs. Todas as edições, anotações e alinhamentos com as sequências de aminoácidos e nucleotídeos foram realizadas no Software Geneious Prime 2020.1.1. Os alinhamentos foram feitos com o algoritmo Muscle 3.8.425 (EDGAR, 2004).

Os genes presentes nos BGC foram comparados com o banco de dados NCBI GenBank para buscar por genes homólogos na literatura (BENSON et al., 2013).

A construção da árvore filogenética dos domínios acetiltransferase (AT) foi realizada com o Software IQ-TREE (NGUYEN et al., 2015) utilizando sequências de aminoácidos do banco de dados AntiSMASH *database 3* (BLIN et al., 2020), com auxílio dos recursos de HPC (*High performance computing*) disponibilizados pela Superintendência de Tecnologia da Informação da Universidade de São Paulo (<https://hpc.usp.br/>). A formatação da filogenia foi feita na ferramenta interativa online ITOL (LETUNIC; BORK, 2019).

3.5. Reativação da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311

A linhagem de actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 foi armazenada em freezer -80 °C em meio ISP2 20% glicerol. A reativação da linhagem foi realizada com a adição de 50 µL do estoque em 4 mL de meio ISP2 em frasco falcon de 15 mL. A cultura foi mantida por cinco dias à 30 °C e 200 rpm.

3.6. Otimização das condições de cultivo para a produção dos compostos.

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi cultivada em diversos meios de cultivo, com o objetivo de otimizar e padronizar a produção dos compostos **15-17**. Para isso, foram utilizados os meios líquidos: **meio A, meio A simplificado, meio ISP2, meio A3M, meio A1G e meio mínimo M9**.

Para cada um dos seis meios de cultivo, foram preparados pré-inóculos em tubos Falcon de 50 mL contendo 19,5 mL do meio e 0,5 mL do cultivo reativado. Os pré-inóculos foram incubados por cinco dias a 30 °C e 200 rpm.

Para cada meio de cultura foram preparados 400 mL de cultivos divididos em dois Erlenmeyers de 500 mL contendo 180mL de meio cada, 20 mL do pré-inóculo (10%) e 14 g de resina HP20 (70 g/L). Os cultivos foram incubados por 7 dias a 30 °C e 200 rpm.

3.7. Otimização do tempo de cultivo nos meios líquidos A3M e ISP2

Em função dos resultados obtidos pelo cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 nos seis diferentes meios de cultura, os meios ISP2 e A3M foram selecionados para análises da variação do metabolismo da linhagem em função do tempo de cultivo.

Para isso, foram preparados para cada um dos dois meios de cultura, quatro Erlenmeyers de 1 L contendo 315 mL do meio de cultivo, 35 mL do pré-inóculo previamente preparado (10%) e 24,5 g de resina HP20 (70 g/L). Os cultivos foram incubados a 30 °C e 200 rpm. Os pré-inóculos foram preparados em tubos Falcon de 50 mL contendo 34 mL do meio e 1 mL do cultivo reativado. Os pré-inóculos foram incubados por cinco dias a 30 °C e 200 rpm.

Cada um dos quatro Erlenmeyers de cada meio de cultura foi extraído com um tempo diferente de incubação: 2, 4, 6 e 8 dias.

Também foram preparados controles para cada um dos meios, contendo apenas o meio de cultivo e a resina HP20, e também, um controle da resina, contendo água destilada e a resina HP20.

3.8. Cultivo em meio sólido ISP2 ágar

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi cultivada em meio sólido **ISP2 ágar**. Para isso um pré inóculo foi preparado em tubo Falcon de 50 mL contendo 19,5 mL de meio **ISP2** e 0,5 mL do cultivo reativado. O pré inóculo foi incubado por 5 dias a 30 °C e 200 rpm.

500 µL de pré inóculo foram inoculados em cinco placas de Petri de 150 mm contendo 60 mL de meio **ISP2 ágar** cada. O pré inóculo foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa BOD por 7 dias a 30 °C.

3.9. Aumento de escala em meio ISP2 ágar

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi cultivada em escala aumentada em meio **ISP2 ágar**. Para isso foram preparados cinco frascos de pré inóculo em tubos Falcon de 50 mL contendo 19,5 mL de meio ISP2 e 0,5 mL do cultivo reativado. Os pré inóculos foram incubados por cinco dias a 30 °C e 200 rpm.

Para o aumento de escala, foram utilizadas 100 placas de Petri contendo 60 mL de meio ISP2 ágar em cada, totalizando 6 L de meio de cultivo. Em cada placa, foram

espalhados 500 μ L de pré inoculo com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa BOD por 7 dias a 30 $^{\circ}$ C.

3.10. Obtenção dos extratos

3.10.1. Extração de cultivos em meio líquido

Para a obtenção dos extratos dos cultivos em meio líquido, as culturas e os controles foram filtrados a vácuo. A resina e o pellet de bactérias retidos no filtro foram transferidos para béqueres contendo 500 mL de acetona para cada 70 g de resina HP20 presente no cultivo. As misturas foram então submetidas a 30 minutos de agitação e 15 minutos de sonicação por ultrassom.

O conteúdo dos béqueres foi filtrado e o extrato em acetona obtido foi seco em rotaevaporador sob pressão reduzida.

A metodologia de cultivo, obtenção e análise dos extratos a partir dos cultivos da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 realizados em meios líquidos estão sumarizadas na **Figura 3**.

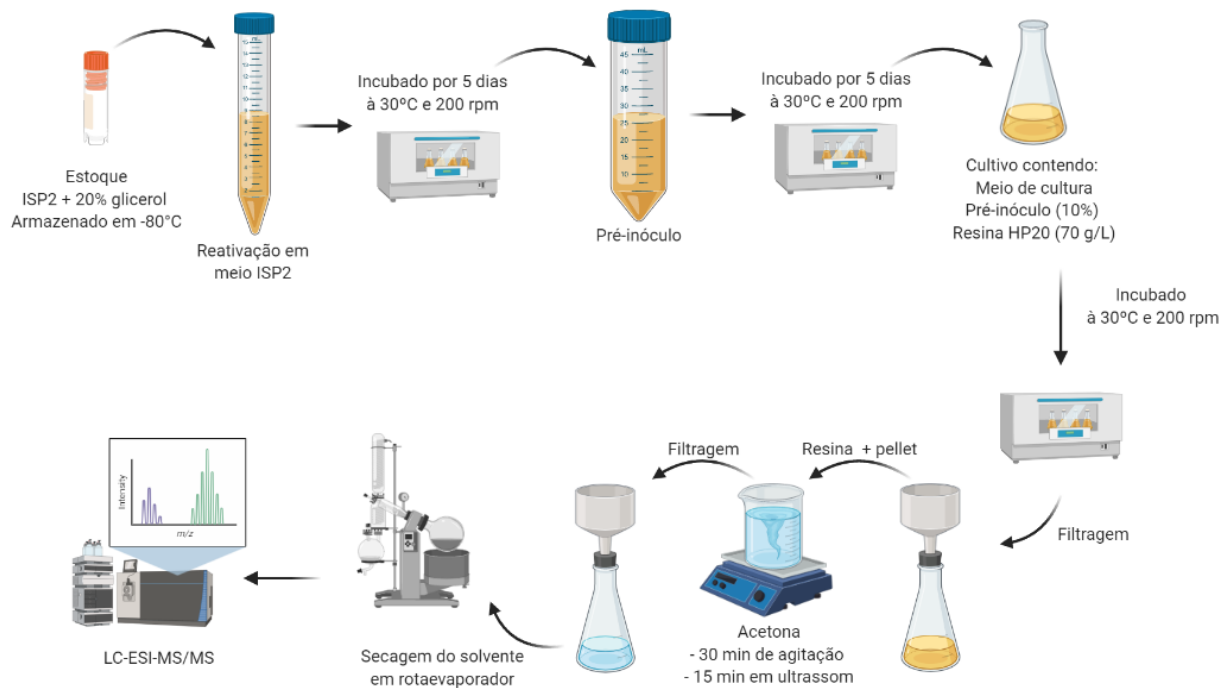


Figura 3 - Fluxograma das metodologias de cultivo, obtenção e análises dos extratos a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meios líquidos.

3.10.2. Extração de cultivos em meio sólido

Para a obtenção dos extratos dos cultivos em meio sólido, foram feitos cortes no ágar com a ajuda de uma espátula e os pedaços de ágar foram transferidos para Erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL de acetato de etila (AcOEt). As suspensões foram submetidas a sonicação por ultrassom por 15 min. O conteúdo dos Erlenmeyers foi então filtrado, e o extrato em AcOEt obtido foi seco em rotaevaporador sob pressão reduzida.

A metodologia de cultivo, obtenção e análise dos extratos a partir dos cultivos da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 realizados em meio **ISP2 ágar**, estão sumarizadas na **Figura 4**.

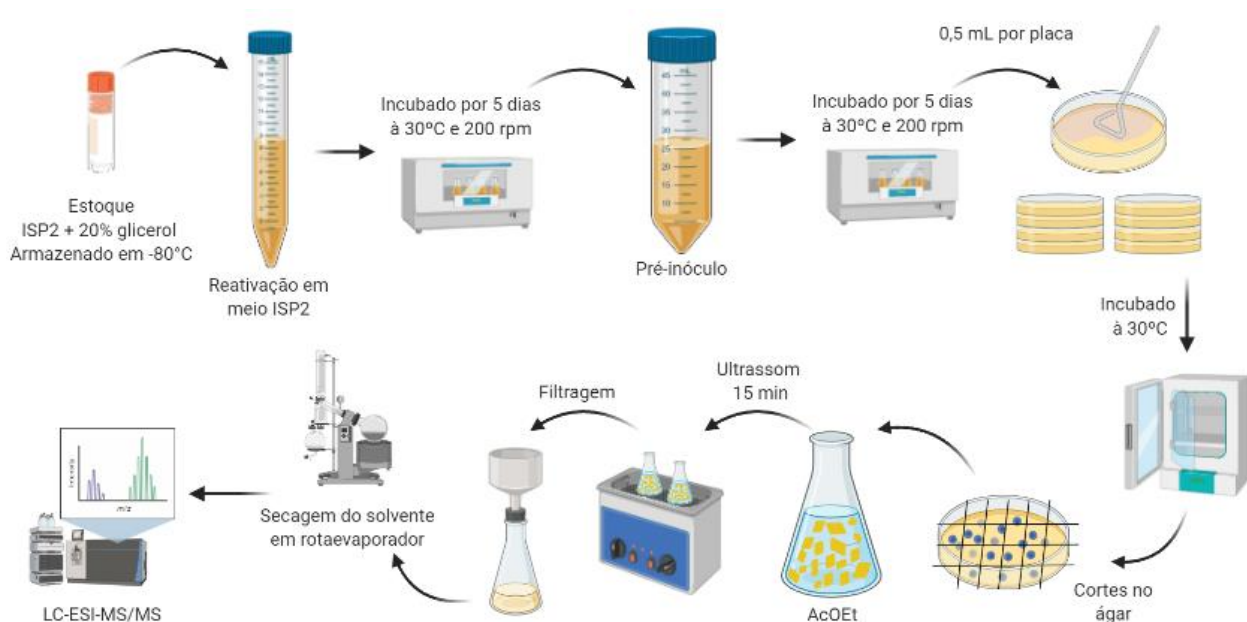


Figura 4 - Fluxograma das metodologias de cultivo, obtenção e análises dos extratos a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio **ISP2 ágar**.

3.11. Análise do perfil químico dos padrões e dos extratos.

Padrões previamente isolados dos compostos **15**, **16** e **17** (ORTEGA, 2018; ORTEGA; LOURENZON, et al., 2021), e os extratos obtidos a partir do cultivo da

actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em diferentes condições de cultivo foram analisados por LC-ESI-MS/MS em um sistema de cromatografia líquida Shimadzu (duas bombas de solvente LC20AD, um desgaseificador DGU-20A, um forno de coluna CTO20A ajustado para 35 °C, um amostrador automático SIL20A e um controlador CBM20A acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF – Q II (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA) com fonte de ionização electrospray e um analisador de tempo de voo (*time-of-flight*). O espectrômetro de massas foi operado em modo de ionização positivo com os seguintes parâmetros: capilar de 3,5 kV, com gás seco (N₂) com temperatura de 220 °C, fluxo de 10 L/min e pressão de 5,5 bar. Uma solução de trifluoroacetato de sódio (Na-TFA), na concentração de 500 mg/L, foi utilizada para calibrar o equipamento. A aquisição e análise dos dados foi realizada no software Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bremen, Alemanha).

As amostras foram preparadas em concentração de 1 mg/mL de solução de acetonitrila água (1:1). As amostras (10 µL) passaram por uma coluna C₁₈ Kinetex (100 mm x 4,6 mm; partículas de 2,6 µm), e esta foi mantida a 35 °C. Os solventes usados foram H₂O (Bomba A) e acetonitrila (Bomba B) com fluxo de 1 mL.min⁻¹ com o seguinte gradiente de concentração: 0-2 min (10% de B), 2-10 min (10% a 50% de B), 10-18 min (50% de B), 18-30 min (50% a 100% de B), 30-32 min (100% de B), 32-34 min (100% a 10% de B) e 34-37 min (10% de B).

3.12. Análises metabolômicas por Molecular Networking (GNPS)

As análises metabolômicas foram realizadas através da construção de uma rede molecular (*molecular networking*), construído pela plataforma GNPS (WANG et al., 2016). Os dados brutos de LC-ESI-MS/MS gerados pelo equipamento da Bruker foram convertidos para o formato mzXML através do software MSConvert (CHAMBERS et al., 2012). Em seguida, os dados convertidos foram submetidos na plataforma GNPS (gnps.ucsd.edu) e a rede molecular resultante foi visualizada e editada no software Cytoscape versão 3.6.1 (SHANNON et al., 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cluster de genes biossintéticos da cifomicina

A análise do genoma da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 no Software AntiSMASH 4.0 resultou na anotação de 37 *clusters* de genes biossintéticos (BGC) (Anexo 1).

O BGC anotado na região 1.4 se destacou por apresentar 58% de similaridade com o BGC descrito como responsável pela biossíntese dos caniferolídeos (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019).

O BGC 1.4 descrito pelo AntiSMASH apresenta 194 Kpb de comprimento, contendo 67 genes localizados entre a posição 427.968 e 622.306 do *contig* 1. Porém, comparando a sequência de aminoácidos dos genes próximos aos limites desse BGC anotado, foram identificados 16 genes a *upstream* que podem ser relacionados com a biossíntese da cifomicina e análogos. Com isso, o BGC proposto como responsável pela biossíntese dos compostos **15-17**, possui 220 Kpb de comprimento englobando 83 genes (Figura 5).

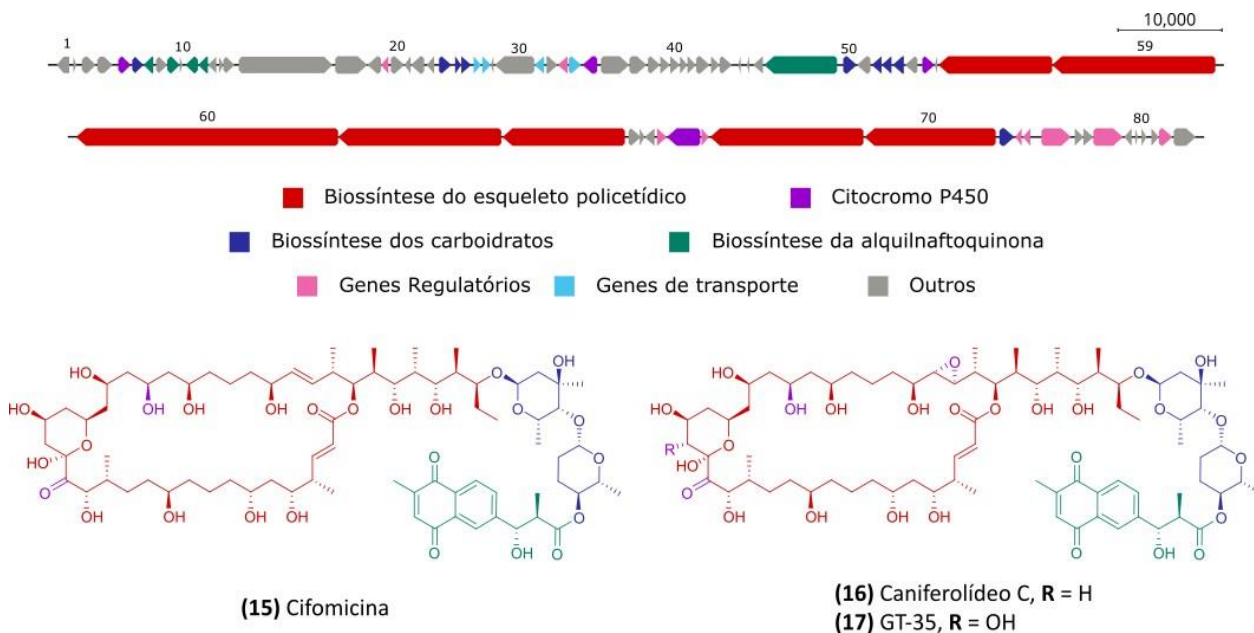


Figura 5 - *Cluster* de genes biossintéticos proposto como responsável pela biossíntese dos compostos **15-17**. As cores relacionam os genes que participam da biossíntese das três partes das estruturas: cadeia policetídica (vermelho e roxo), açúcares (azul) e alquilnaftoquinona (verde).

A função de cada um dos 83 genes foi proposta com base na comparação das sequências de aminoácidos com genes da literatura através do banco de dados NCBI -

GenBank. Além disso, também foi feita uma comparação com os 59 genes que compõem o BGC dos caniferólídeos (**Anexo 2**).

Dentre os 83 genes presentes, 25 foram diretamente relacionados com a biossíntese dos compostos **15-17**, sendo sete genes responsáveis pela biossíntese da cadeia policetílica macrocíclica (destacados em vermelho na **Figura 5**), quatro genes que codificam para citocromos P450 responsáveis por promover modificações pontuais na cadeia policetílica (roxo), nove genes responsáveis pela biossíntese dos açúcares (azul) e cinco genes que participam da biossíntese da alquilnaftoquinona (verde). Além disso, estão destacados genes regulatórios (rosa) e genes de transporte (azul claro). Por fim, os genes classificados como “outros” (cinza) são genes para os quais não foi encontrada nenhuma homologia na literatura ou genes que não possuem relação com a biossíntese dos compostos.

4.2. Predição da biossíntese do policetídeo macrolídeo.

O esqueleto policetílico macrocíclico pode ser biossintetizado pela policetídeo sintase tipo I (PKS tipo I) multimodular, codificada por sete genes: cph58-cph62, cph69 e cph70. Como descrito na tabela no **Anexo 2**, todos os sete genes apresentam mais de 80% de similaridade com os genes equivalentes scaP1-scaP7, presentes no BGC responsável pela biossíntese dos caniferólídeos (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019).

Ao todo, a PKS tipo I possui 21 módulos, sendo um módulo inicial (Load M) e 20 complementares (M1-M20), cada um responsável pela adição de uma subunidade acila. Os módulos, por sua vez, são subdivididos em domínios, que possuem os sítios catalíticos responsáveis por cada uma das etapas de incorporação e modificação da cadeia de policetílica construída.

O que caracteriza um módulo é a presença dos três domínios obrigatórios: acetiltransferase (AT), responsável por selecionar a unidade construtora de maneira específica, proteína carreadora de acila (ACP), que carrega a cadeia policetílica que está sendo construída e cetoacila sintase (KS), responsável pela formação da ligação C-C entre a unidade construtora e o restante da cadeia através de uma condensação descarboxilativa. Além disso, os módulos podem possuir domínios facultativos:

cetorreductase (KR), desidratase (DH) e enoila redutase(ER) que, quando presentes, promovem modificações específicas na cadeia policetídica.

Em função disso, a análise computacional das sequências de aminoácidos dos domínios AT, KR, DH e ER presentes nos 21 módulos, nos permite prever qual unidade de acila será incorporada em cada módulo e como a cadeia formada será modificada pelos domínios facultativos (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019).

4.2.1. Caracterização dos domínios acetiltransferase (AT)

Cada um dos 21 módulos é responsável pela incorporação de uma subunidade de acila. Os domínios responsáveis por selecionar qual substrato será incorporado em cada módulo são os domínios acetiltransferase (AT).

Para confirmar a especificidade por substrato dos 21 domínios AT presentes, foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos dos 21 domínios AT junto com 47 domínios AT específicos para malonil-CoA e 44 específicos para metilmalonil-CoA (**Figura 6**).

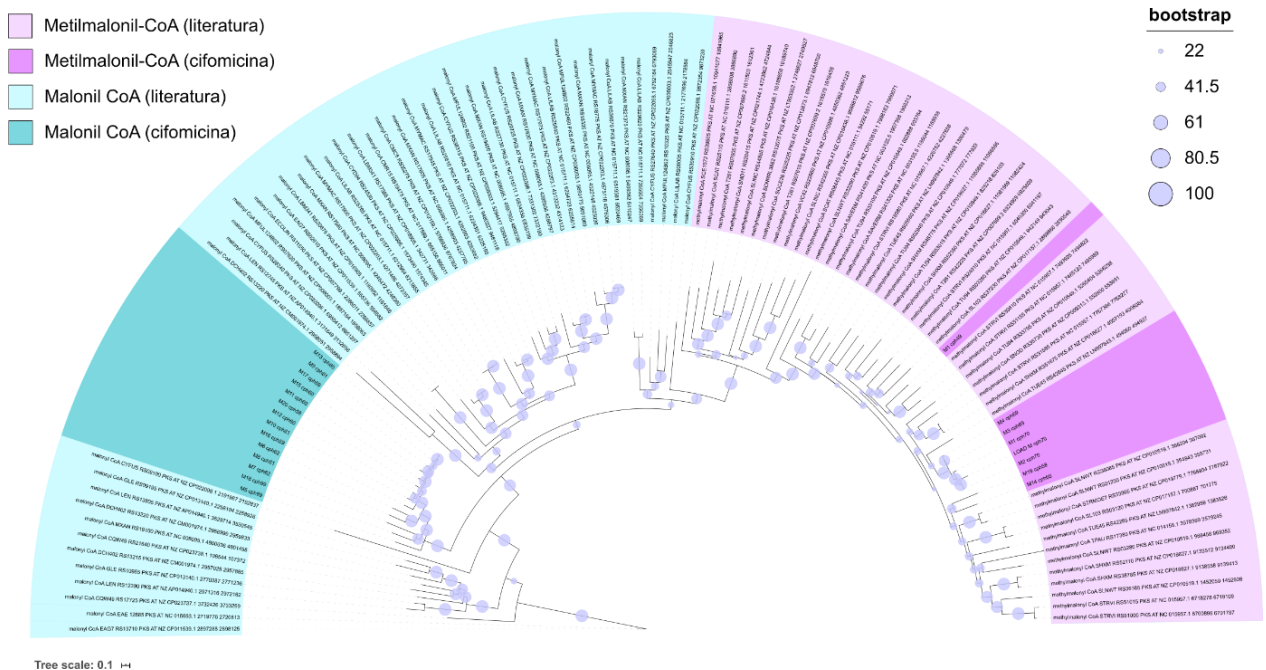


Figura 6 - Análise filogenética dos 22 domínios AT presentes nas oito PKS presente no BGC da cifomicina em comparação com domínios específicos para metilmalonil-CoA e malonil-CoA conhecidos.

A análise filogenética realizada agrupa as amostras de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos, portanto, sequências com regiões conservadas semelhantes são agrupadas próximas umas às outras. Estudos extensivos prévios identificaram que sequências de domínio AT específicas para cada substrato se agrupam em *clusters* separados em análises filogenéticas, através da identificação dos resíduos de aminoácidos que ditam a especificidade dos domínios AT, o que possibilitou a criação ferramentas de predição dessa especificidade (YADAV; GOKHALE; MOHANTY, 2003).

Como podemos observar na **Figura 6**, todas as 44 sequências de domínio AT específicos para metilmalonil CoA retiradas da literatura (destacadas em rosa claro) se agruparam à direita, juntamente com as sequências dos domínios AT dos módulos Load, M1-M4, M14 e M19 (destacadas em rosa escuro). As sequências dos domínios AT dos 14 módulos restantes: M5-M13, M15-M18 e M20 (destacados em azul escuro), se agruparam com a sequência dos 47 domínios AT específicos para malonil-CoA retirados da literatura (destacados em azul claro). Com isso podemos concluir que nos módulos M1-M4, M14 e M19 são incorporadas unidades de metilmalonil-CoA, enquanto nos módulos M5-M13, M15-M18 e M20, são incorporadas unidades de malonil-CoA.

4.2.2. Caracterização dos domínios cetorredutase (KR)

O domínio KR é facultativo, mas quando presente promove a redução da carbonila da subunidade acila inserida no módulo anterior a álcool.

Estudos da estrutura cristalográfica de domínios KR, que levam a formação de produtos com diferentes quiralidades, mostraram que os resíduos de aminoácidos presentes em algumas posições específicas são responsáveis por direcionar o policetídeo para o sítio ativo de diferentes tipos de KR, gerando assim, produtos com centros quirais diferentes (KEATINGE-CLAY, 2007). A presença dos resíduos **LDD** (L: leucina e D: ácido aspártico) na região conservada 1 (destacada em rosa na **Figura 7**), caracteriza as KR do tipo B, que produzem hidroxilas com configuração absoluta R na posição β -carbonila. As KR tipo A por sua vez, são caracterizadas pela ausência dos resíduos **LDD** na região 1 e a presença de um resíduo **W** (triptofano) na região conservada 2 e produzem hidroxilas com configuração absoluta S na posição β -carbonila.

Os resíduos presentes nas regiões conservadas 3 e 4 permitem a predição da estereoquímica do grupo alquila, quando presente, na posição α -carbonila (KEATINGE-CLAY, 2007) (**Figura 7**).

As seqüências de aminoácidos dos 19 domínios KR presentes foram alinhadas para a comparação de quatro regiões conservadas que possibilitam a predição da configuração absoluta dos centros estereogênicos do policetídeo (**Figura 7**).

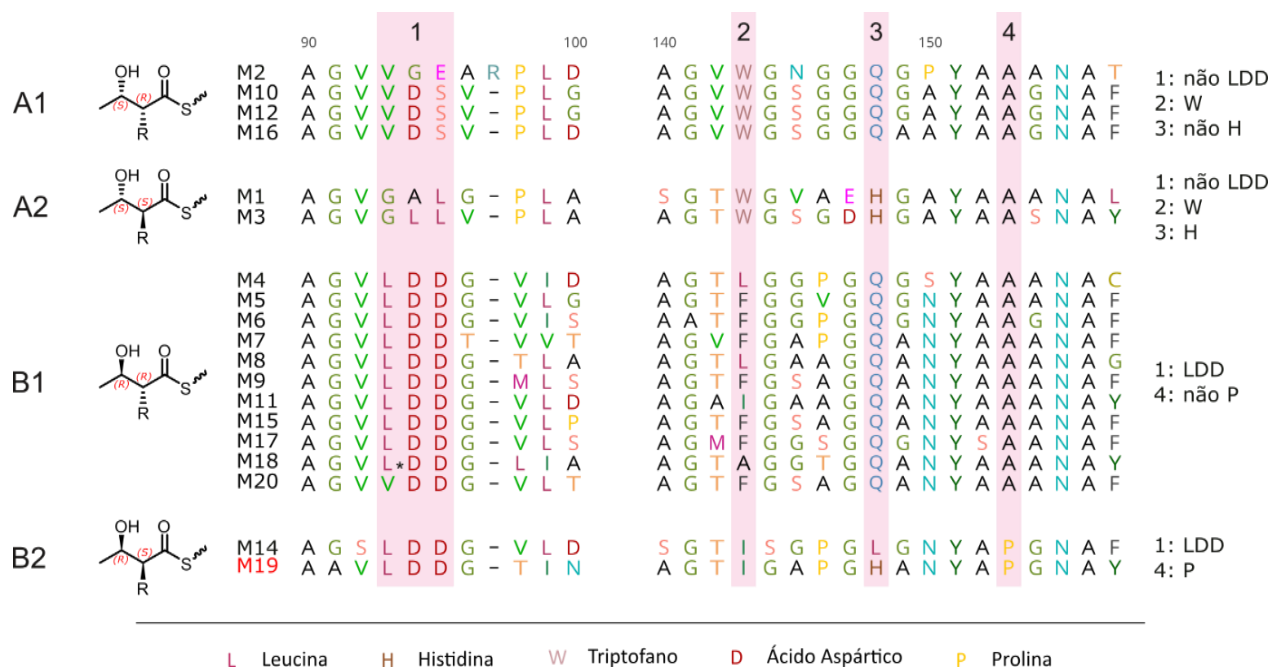


Figura 7 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos 19 domínios KR presentes. Destacadas com caixas rosas, estão as quatro regiões conservadas utilizadas para classificar os domínios de acordo com a estereoquímica do produto formado. As regiões 1 e 2 são responsáveis pela estereoquímica da hidroxila β -carbonílica (classificação A e B) e as regiões 3 e 4 são responsáveis pela estereoquímica da metila α -carbonílica, quando presente (classificação 1 e 2).

A predição das configurações absolutas da grande maioria dos centros quirais foi condizente com as configurações relativas determinadas através de análises extensivas de dados de RMN bidimensionais, com exceção da configuração da metila presente no C4. Segundo a predição baseada nas regiões conservadas do domínio 19, a metila presente no C4 deveria apresentar configuração S, porém, segundo dos dados de RMN bidimensionais, a metila em questão apresenta configuração R. Essa discrepância pode ser resultado de um atividade catalítica diferente do esperado pelo domínio KR do módulo 9, ou ainda, pela ação de uma possível metil epimerase adicional, como proposto na

biossíntese dos caniferolídeos A-D (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019). Porém, nenhum gene para metil epimerase foi identificado nas buscas realizadas no genoma da linhagem.

4.2.3. Caracterização dos domínios desidratase (DH)

O domínio DH é facultativo e dependente da presença do domínio KR, pois catalisa uma reação de desidratação eliminando a hidroxila formada pelo domínio KR.

Estudos comparativos com a sequência de aminoácidos de diversos domínios DH identificaram algumas regiões conservadas essenciais para a funcionalidade do domínio. Mutações em resíduos de aminoácidos presentes nessas regiões provocam a inativação do domínio (BACHMANN; RAVEL, 2009).

As sequências de aminoácidos dos oito domínios DH presentes foram alinhadas para comparação das regiões conservadas. A mutação do aminoácido presente em qualquer uma das seis regiões destacadas com uma caixa rosa compromete a atividade do domínio DH (**Figura 8**). O domínio DH6 apresenta mutação nas regiões conservadas 2 e 5, portanto não é capaz de catalisar a desidratação.

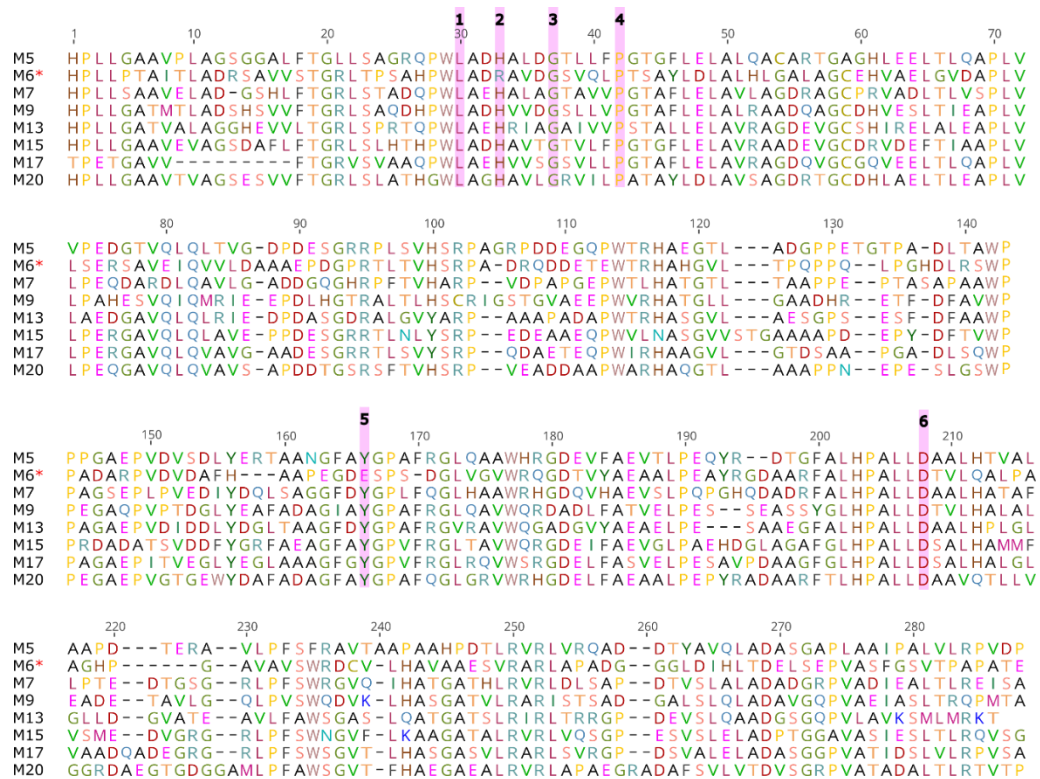


Figura 8 - Alinhamento dos oito domínios DH presentes. As regiões conservadas estão destacadas em rosa. O domínio DH presente no módulo M6 marcado com * é inativo.

4.2.4. Caracterização dos domínios enoila redutase(ER)

O domínio ER também é facultativo e dependente da presença dos domínios KR e DH, pois catalisa a redução da ligação dupla formada pela desidratação catalisada pelo domínio DH. Assim como relatado para os domínios DH, os domínios ER também possuem regiões conservadas essenciais para sua atividade catalítica, portanto, uma mutação em uma dessas regiões promove a inativação do domínio (BACHMANN; RAVEL, 2009; XIE et al., 2017).

As seqüências de aminoácidos dos quatro domínios ER presentes foram alinhadas para comparação das regiões conservadas (**Figura 9**). Mutações em qualquer uma das três regiões conservadas destacadas com caixas rosas promovem a inativação do domínio. A análise realizada evidenciou que todos os quatro domínios no CBG se mostraram ativos, promovendo, portanto, as reações de redução das ligações duplas.

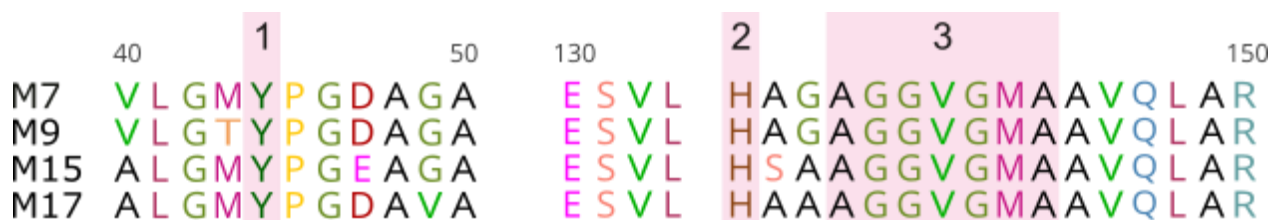


Figura 9 - Alinhamento dos quatro domínios ER com regiões conservadas destacadas com caixas rosas.

4.2.5. Proposta de biossíntese para a cadeia policetídic

Com base nessas análises foi proposta a via de biossíntese da subunidade policetídic macrolactônica presente nos compostos **15-17** (**Figura 10**).

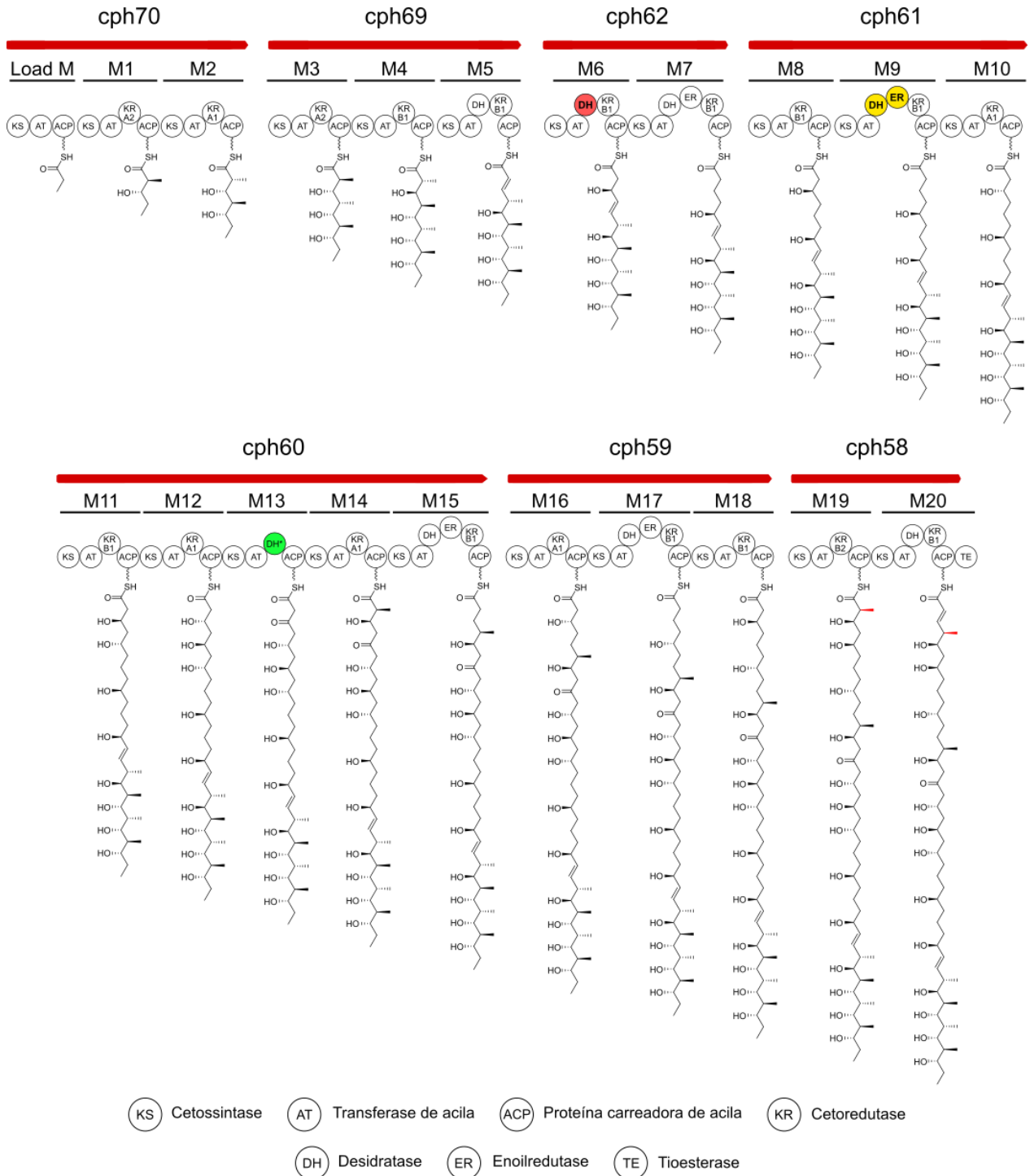


Figura 10 - Via de biossíntese proposta para a cadeia policetídic macrocíclica. O domínio DH presente no módulo M6 destacado em vermelho é inativo, os domínios DH e ER destacados em amarelo no módulo M9 podem não participar da biossíntese e o domínio DH destacado em verde no módulo M13 está ativo, porém, não é acompanhado de um domínio KR.

4.2.6. Liberação da cadeia policetídicica e formação da macrolactona

Ao final do último módulo de alongamento da cadeia policetídicica está presente um domínio tioesterase (TE), que é responsável pela liberação da cadeia policetídicica, que ocorre com o ataque nucleofílico promovido pela hidroxila ligada ao C35 à carbonila ligada ao domínio tioesterase. Com isso temos a liberação da cadeia policetídicica com a formação da macrolactona (**Figura 11**).

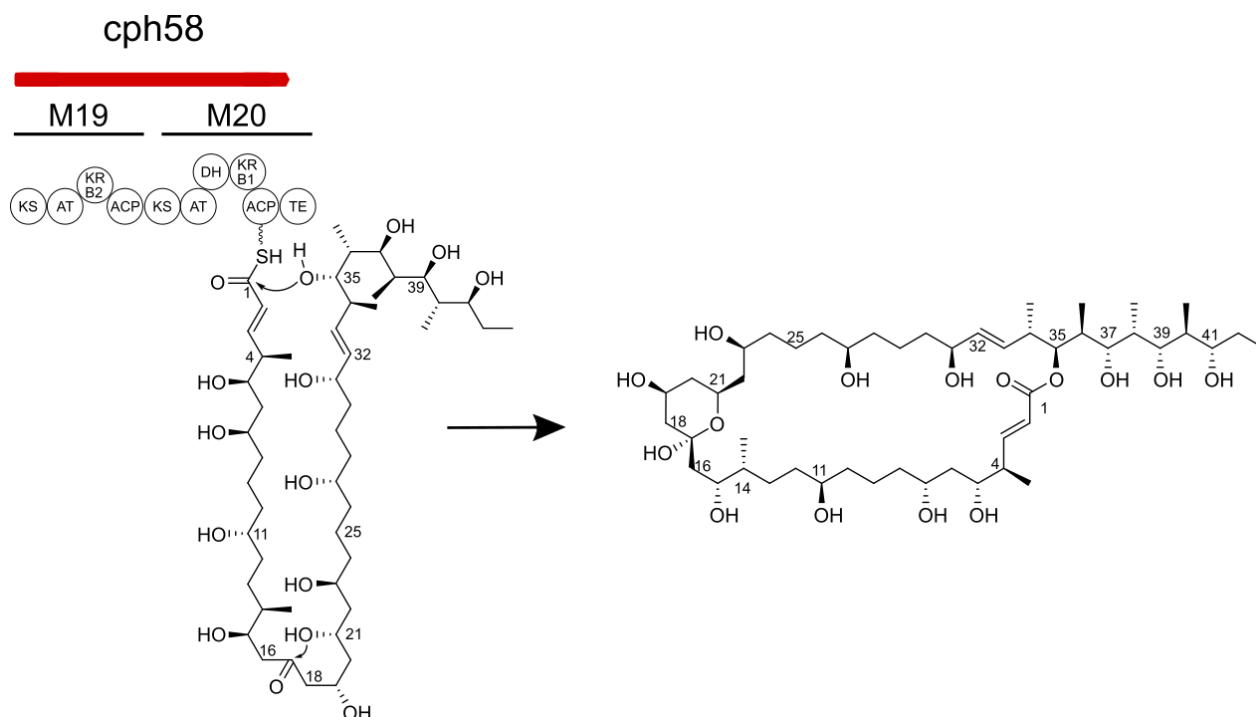


Figura 11 – Liberação da cadeia policetídicica, com a formação da macrolactona, pela ação do domínio tioesterase (TE) presente no último módulo da PKS multimodular e formação do anel hemiacetal.

4.2.7. Modificações no policetídeo macrolactônico

As estruturas identificadas a partir das técnicas espectroscópicas possuem algumas diferenças pontuais em comparação a estrutura predita através das análises *in silico* (ORTEGA, 2018; ORTEGA; LOURENZON, et al., 2021). Todas as três estruturas (**15-17**) possuem uma carbonila no C16 e uma hidroxila no C25, que não estão presentes na estrutura predita. Adicionalmente, Caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**) possuem um

grupo epóxido que substitui a instauração predita entre os carbonos C32 e C33. Por fim, GT-35 (17) possui um grupo hidroxila no C18 que não é observado nas outras estruturas.

Essas diferenças podem ser explicadas por modificações pós biossíntese pelas PKS. Os genes *cph05*, *cph35*, *cph56* e *cph67* codificam para citocromos P450, que são uma família de proteínas capazes de oxidar uma ampla variedade de substratos (DENISOV et al., 2005), portanto podem ser responsáveis pela epoxidação da ligação dupla presente entre os carbonos 32 e 33, além das oxidações nos carbonos 16, 18 e 25 (Figura 12).

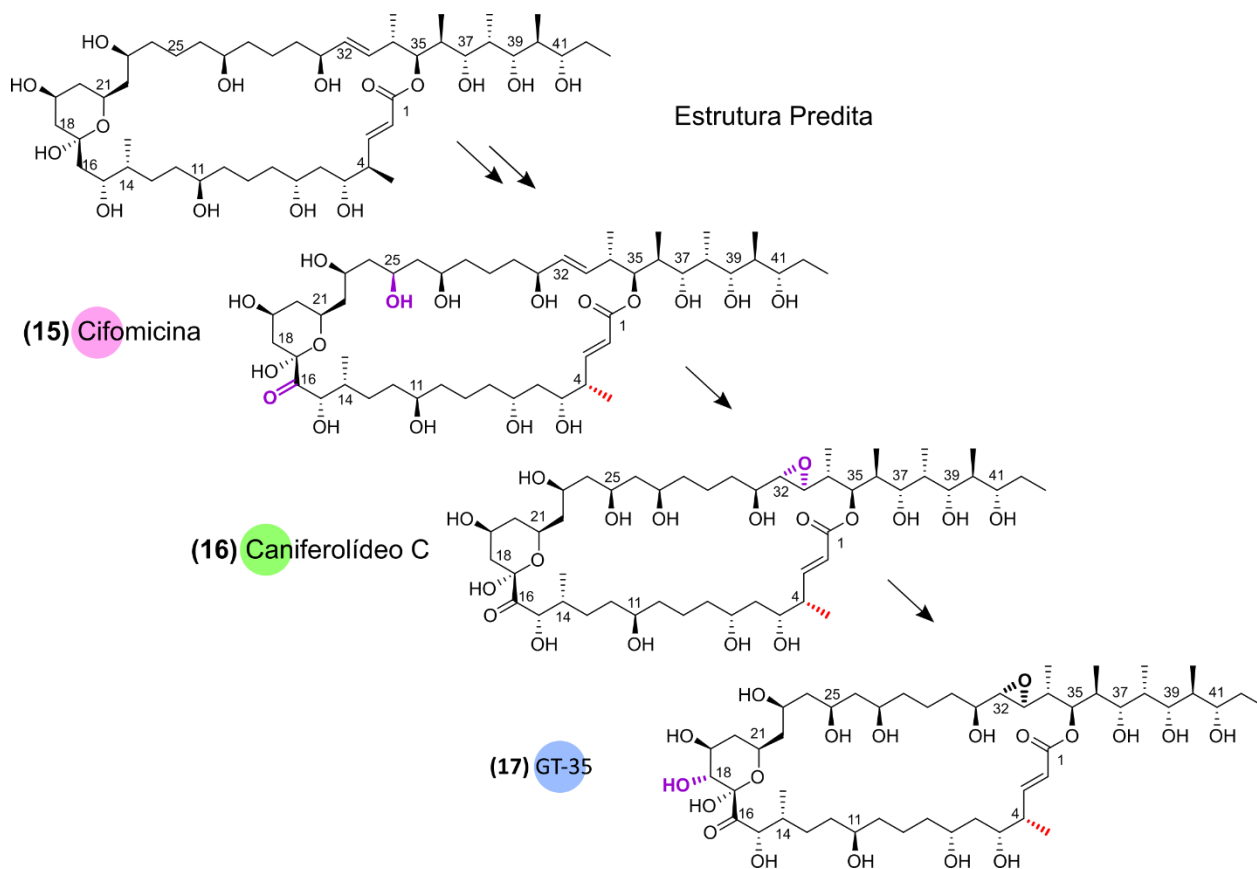


Figura 12 – Diferenças entre o policetídeo macrolactônico predito e a porção policetídica dos compostos 15-17. Diferenças que podem ser explicadas pela presença de citocromos P450 destacadas em roxo. Diferença estereoquímica da metila ligada ao C4 destacada em vermelho.

Além disso, como já discutido, segundo as predições das configurações dos centros estereogênicos baseadas nas análises *in silico* das PKS tipo I, a configuração predita para a metila presente no C4 seria S, o que difere da configuração observada pelas análises dos dados de RMN bidimensionais. Essa discrepância também foi

observada na análise biossintética dos análogos caniferolídeos A-D (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019) (**Figura 12**).

4.3. Predição da biossíntese dos açúcares

As estruturas **15-17** possuem dois açúcares ligados à cadeia policetílica: L-axenose e D-aminocetose (destacados em azul na **Figura 5**). Ao todo, nove enzimas participam da biossíntese, todas elas codificadas por genes presentes no BGC proposto.

O precursor da biossíntese dos dois carboidratos é a glicose-1-fosfato e ambos compartilham os primeiros quatro passos biossintéticos que são catalisados pelas enzimas glicose-1-fosfato timidil transferase (cph54), duas desidratases (cph53 e cph71) e uma cetorredutase (cph06) (**Figura 13**).

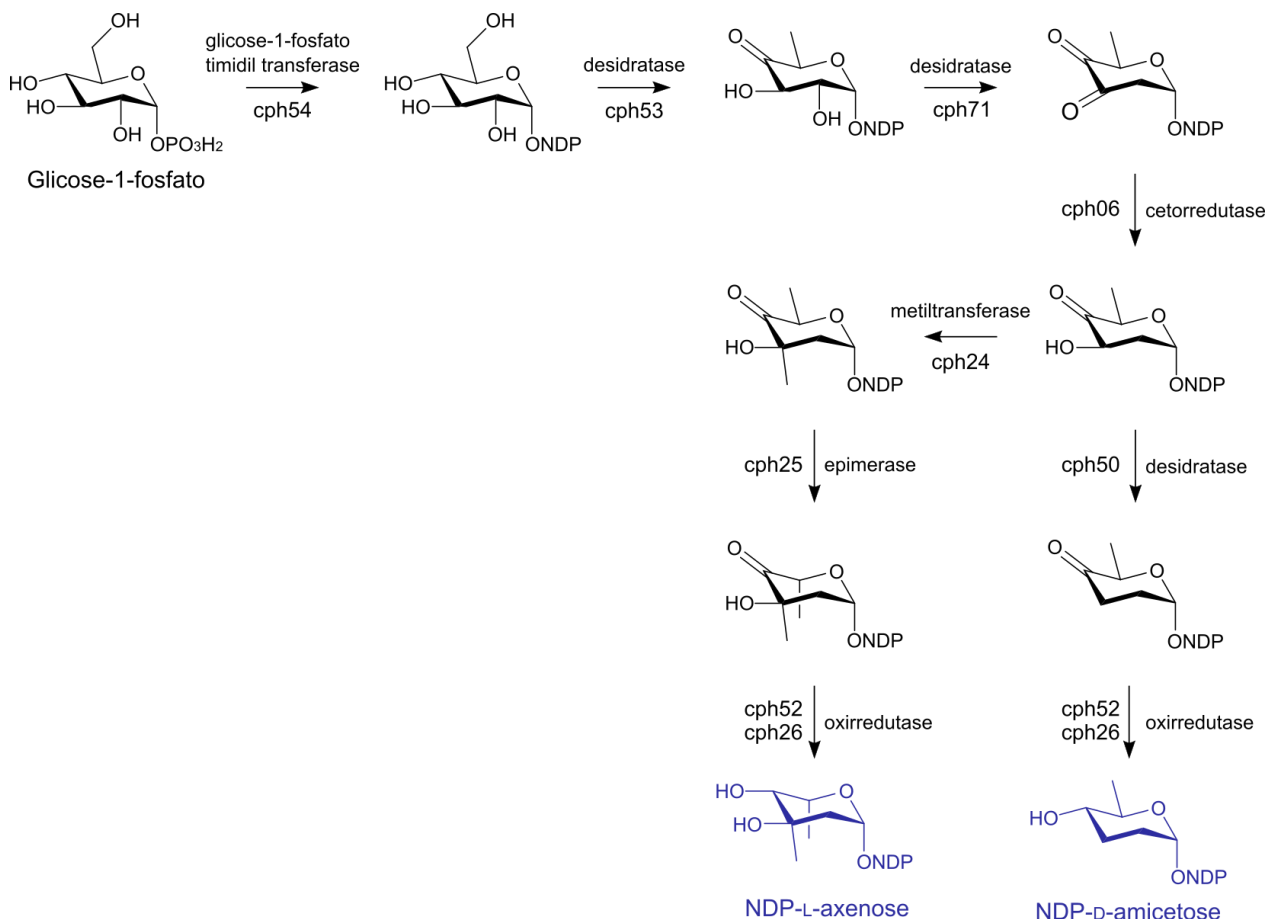


Figura 13 - Biossíntese proposta para os carboidratos L-axenose e D-aminocetose. NDP: Nucleotídeo difosfato.

As etapas subsequentes para a biossíntese de D-aminocetose são catalisadas por uma enzima desidratase (cph50) e uma oxirredutase (cph52 ou cph26). Por outro lado, a biossíntese de L-axenose é realizada por uma metiltransferase (cph24), uma epimerase (cph25) e por fim, uma oxirredutase (cph52 ou cph26) (**Figura 13**).

Os carboidratos L-axenose e D-aminocetose também estão presentes nas estruturas das caniferolídeos A-D (PÉREZ-VICTORIA et al., 2019). Todos os genes que codificam as enzimas envolvidas na biossíntese desses açúcares possuem mais de 85% de similaridade com os genes equivalentes no BGC das caniferolídeos A-D.

4.4. Predição da biossíntese da alquilnaftoquinona

A biossíntese da alquilnaftoquinona se inicia a partir do ácido 1,4-diidroxi-6-naftoico (DH6N), um intermediário da biossíntese de menaquinona pela via da fualosina, produzido por ação das proteínas codificadas pelos genes cph12, cph11, cph09 e cph07 (KEATINGE-CLAY, 2008).

O ácido DH6N sofre uma metilação no C3, porém, nenhum dos 83 genes presentes no BGC codifica uma metiltransferase. Entretanto, buscas no restante do genoma da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 mostraram um gene que codifica uma proteína com 78,8% de similaridade com GonMT, metiltransferase apontada como responsável por essa metilação na biossíntese dos compostos análogos PM100117 e PM100118 (**Figura 14**) (PÉREZ et al., 2016).

Em seguida, a oxidação do grupo hidroxila pode ser realizada por um dos quatro citocromos P450 presentes no BGC, e por fim, uma unidade metilmalonil é adicionada pela PKS codificada pelo gene cph49 (**Figura 14**). A seletividade de substrato do domínio AT presente na PKS foi confirmada pela análise filogenética apresentada na **Figura 6**.

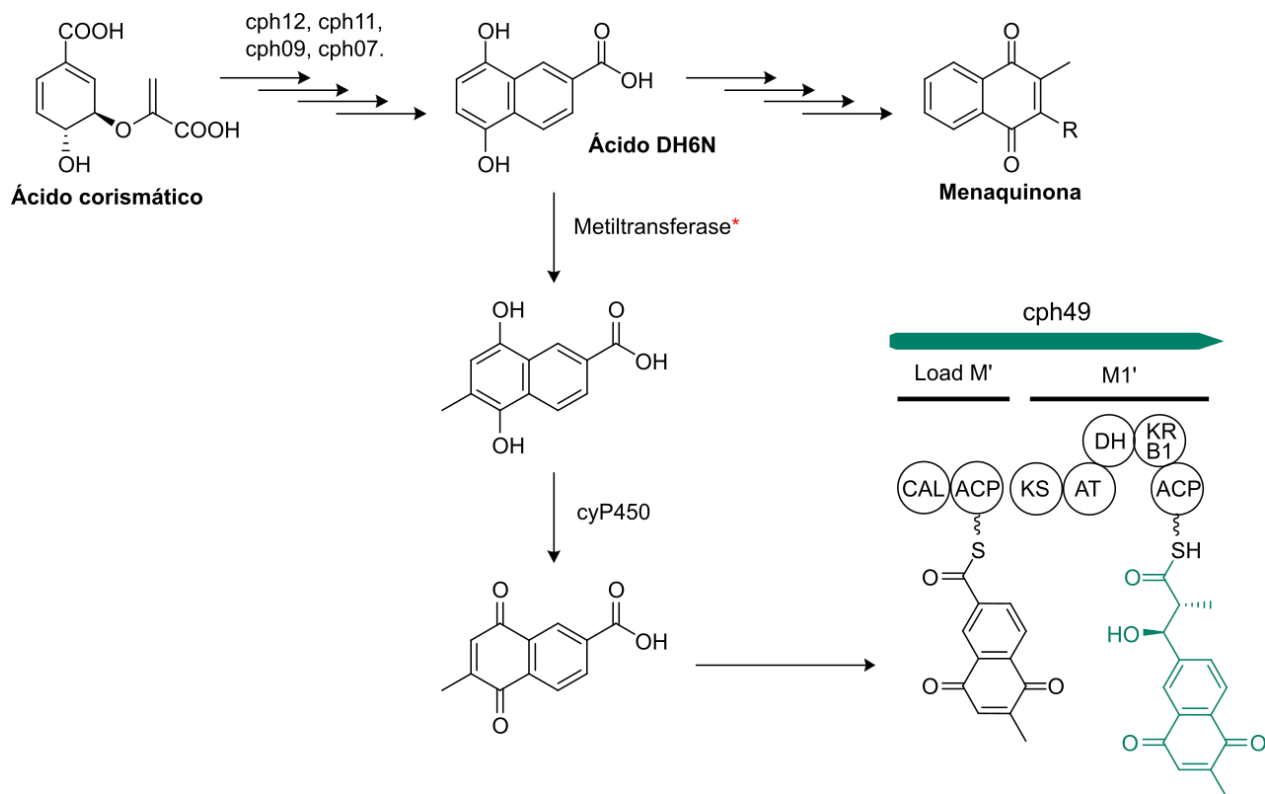


Figura 14 - Biossíntese proposta para a alquilnaftoquinona.

4.5. Otimização das condições de cultivo para a produção dos compostos.

Os compostos cifomicina (**15**), caniferólídeo C (**16**) e GT-35 (**17**) foram isolados pela primeira vez em 2017, a partir do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio **A** (ORTEGA, 2018). Porém, alguns dos componentes presentes nesse meio, como a peptona e carbonato de cálcio (CaCO_3), tornam o meio turvo e com muitos precipitados, o que dificulta a padronização dos processos de extração, e consequentemente, os ensaios de incorporação de precursores isotopicamente marcados com ^{13}C . Em função disso, outros meios de cultura foram selecionados, com o objetivo de determinar a melhor condição de cultivo em que tivéssemos uma produção estável dos compostos **15-17**, e também, que permitisse a padronização dos processos de extração, isolamento e caracterização dos compostos em questão. A determinação da via biossintética experimentalmente usando precursores isotopicamente marcados com ^{13}C era uma das

propostas iniciais deste trabalho, que não foi concretizada em função das limitações impostas pela pandemia COVID-19.

Os meios selecionados foram: meio **A simplificado**, que possui composição semelhante ao meio A porém sem CaCO_3 , meio **ISP2**, recomendado pelo *International Streptomyces Project* para o cultivo de linhagens do gênero *Streptomyces* (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), meio **A3M** e meio **A1G**, utilizados em ensaios de incorporação de precursores isotopicamente marcados em trabalhos da literatura (HARUNARI; et al., 2017; OZAKI et al., 2019; ROMO et al., 2019), e o meio **mínimo M9**, que por possuir poucos nutrientes, pode estressar o metabolismo da linhagem. Além disso, também foi feito o cultivo em meio **A** para ser utilizado como padrão da produção dos compostos **15-17**.

Os extratos obtidos a partir dos seis cultivos foram analisados em LC-ESI-MS/MS para verificar a produção dos compostos **15-17**. Para isso, os cromatogramas dos extratos foram comparados aos cromatogramas dos padrões dos compostos **15-17** analisados sob mesmas condições.

Os padrões foram obtidos em estudos prévios realizados em nosso laboratório durante o doutorado do Dr. Humberto E. Ortega-Domínguez (ORTEGA, 2018) e armazenados em freezer $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Os cromatogramas obtidos a partir dos padrões mostram a presença de mais de um pico cromatográfico, indicando que as amostras não estão totalmente puras, ou que os compostos sofreram degradação. Os íons com m/z referentes aos compostos protonados são: cifomicina (**15**) ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1463,7599), caniferolídeo C (**16**) ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1479,7273) e GT-35 (**17**) ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 1495,7193) foram observados nos picos com tempos de retenção em 15,9 min, 16,3 min e 15,8 min respectivamente (**Figura 15**).

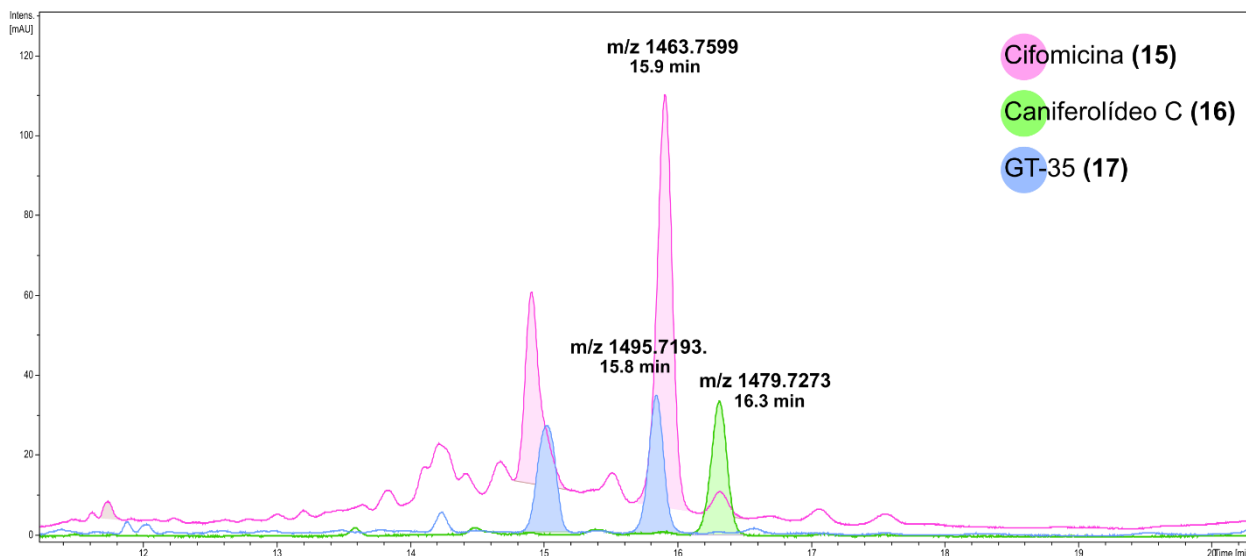


Figura 15 - Cromatogramas dos padrões de cifomicina (15), caniferolídeo C (16) e GT-35 (17), com destaque para a região entre 11 min e 20 min. Análises realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em 254 nm.

A análise dos seis extratos mostrou que existe uma diferença significativa no perfil químico dos metabólitos produzidos pela linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 de acordo com a variação dos nutrientes disponíveis durante o cultivo. Porém, como destacado em rosa na **Figura 16**, apenas o extrato obtido do cultivo em meio **A3M** apresentou picos cromatográficos com tempo de retenção condizente aos compostos **15-17**.

A partir dos cromatogramas obtidos pelas análises de massas (BPC), foram extraídos os íons (EIC) referentes a m/z teórica dos compostos **15-17** protonados ($[M+H]^+$ m/z 1463,7721, $[M+H]^+$ m/z 1479,7715 e $[M+H]^+$ m/z 1495,7709, respectivamente). Como observado nas análises preliminares, apenas o extrato do meio **A3M** apresentou os íons referentes aos compostos **15-17** (**Anexo 3 - Anexo 8**).

Além disso, pode-se destacar que o extrato do cultivo em meio **ISP2** apresentou uma maior quantidade de picos cromatográficos exclusivos, como por exemplo, os com tempo de retenção de 23,3 min e 24,8 min (**Figura 16**).

Em função disso, os meios **A3M** e **ISP2** foram selecionados para dar sequência na padronização da produção dos compostos de interesse (**15-17**), no caso de **A3M**, e também para estudos de metabolômica, com objetivo de explorar o potencial biossintético da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311, no caso do meio **ISP2**.

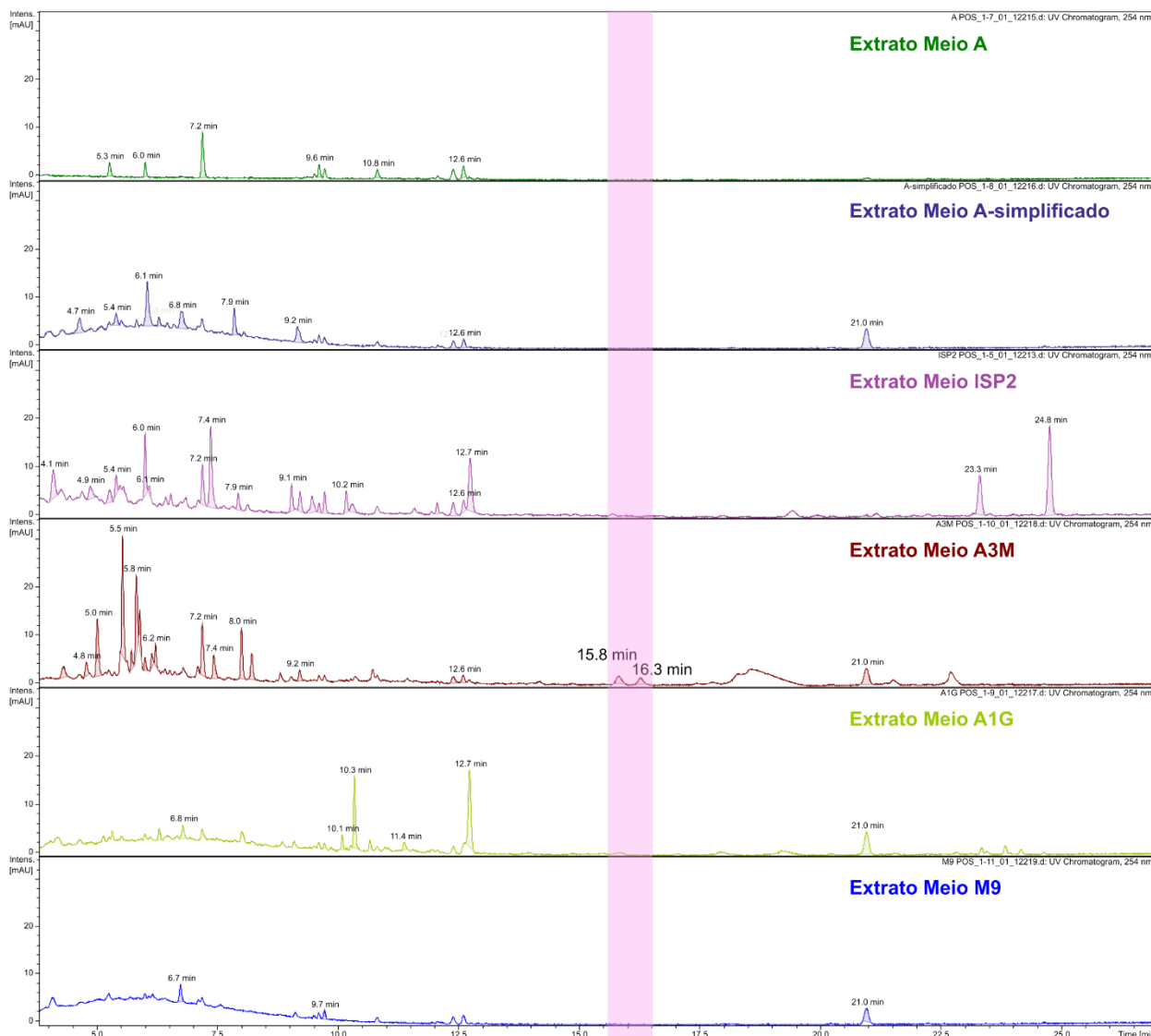


Figura 16 - Cromatogramas dos extratos obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 nos meios de cultura A, A simplificado, ISP2, ISP2 ágar, A3M, A1G e M9. Com destaque para a região de tempo de retenção entre 15,8 min e 16,3 min (rosa), referente ao tempo de retenção dos compostos 15-17. Todas as análises foram realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em λ 254 nm.

4.6. Otimização do tempo de cultivo nos meios A3M e ISP2.

A linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 foi cultivada nos dois meios selecionados (A3M e ISP2) nas mesmas condições de cultivo anteriores, porém, foram realizadas extrações com 2, 4, 6 e 8 dias de incubação, com o objetivo de avaliar a influência do tempo de incubação na produção dos compostos 15-17, assim como os demais

metabólitos. Os oito extratos obtidos, assim como os controles do meio e da resina, foram analisados em LC-ESI-MS/MS. Porém, não foram observados picos cromatográficos com tempo de retenção similares aos dos compostos **15-17** em nenhuma das oito análises (Figura 17).

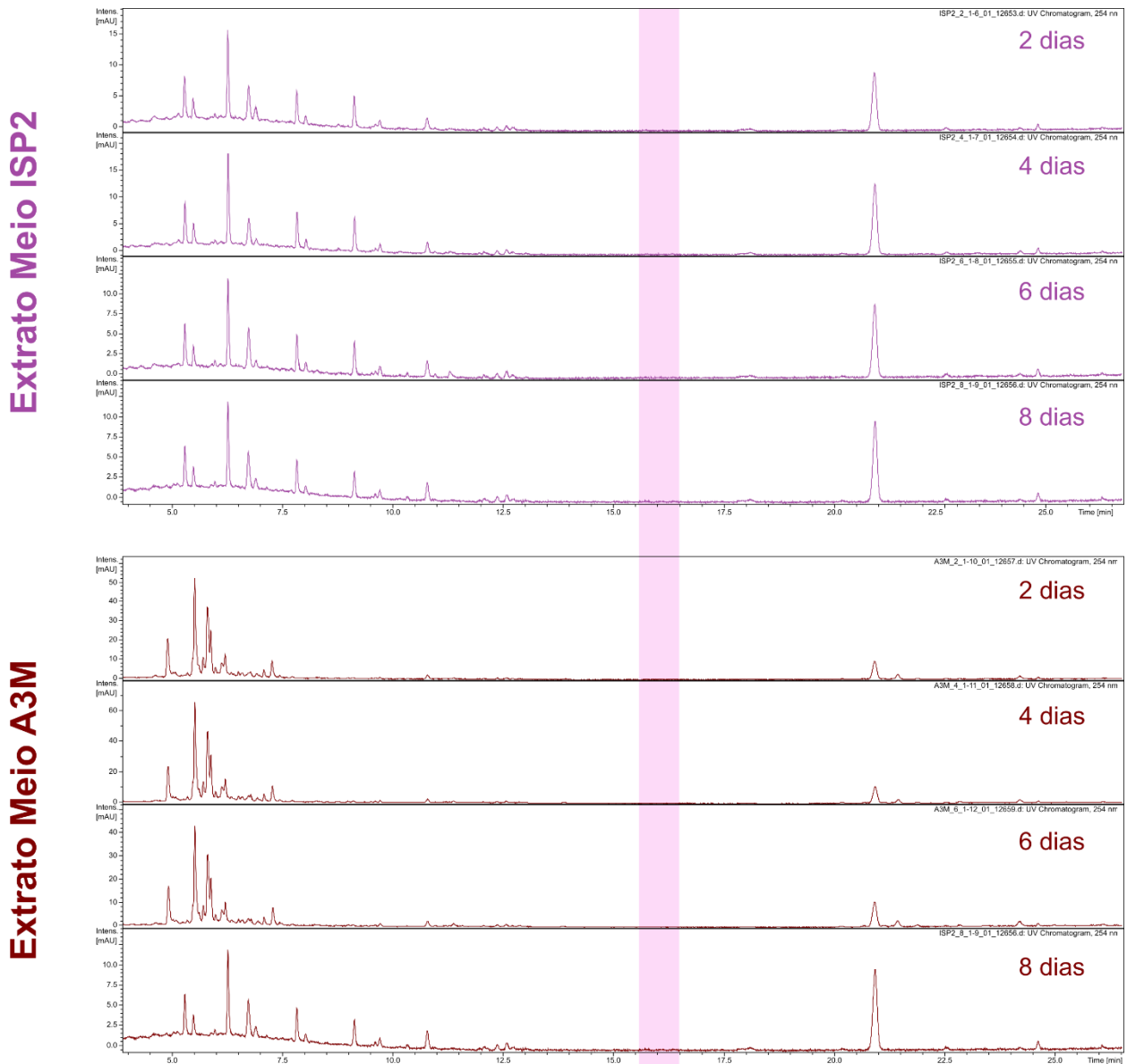


Figura 17 - Cromatogramas dos extratos obtidos do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 nos meios **ISP2** e **A3M** com tempo de incubação de 2, 4, 6 e 8 dias. Com destaque para a região de tempo de retenção entre 15,8 min e 16,3 min (rosa), referente ao tempo de retenção dos compostos **15-17**. Todas as análises foram realizadas em LC-HR-MS/MS e detector UV. Cromatograma UV em 254 nm.

Assim como anteriormente, foi realizada a extração dos íons (ESI) referentes a m/z teórica dos compostos **15-17** protonados ($[M+H]^+$ m/z 1463,7721, $[M+H]^+$ m/z 1479,7715 e $[M+H]^+$ m/z 1495,7709, respectivamente). Porém, não foi observada a presença dos íons em nenhum dos oito extratos.

Os dados obtidos mostram que a produção dos compostos **15-17** pela linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 não foi reprodutível nas diferentes condições de cultivos testadas. Os compostos foram isolados pela primeira vez no cultivo líquido em meio **A** (ORTEGA, 2018), e posteriormente, foram observados também no cultivo líquido em meio **A3M**. Porém, em análises posteriores nas mesmas condições, não foi possível identificar a presença dos compostos no cultivo da actinobactéria em nenhum dos dois meios de cultura. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que não conseguimos reproduzir em laboratório as condições exatas às quais essa linhagem era exposta no ambiente. Dessa forma, a linhagem pode estar sendo privada dos estímulos necessários para a ativação da via biossintética dos compostos em questão (LEE et al., 2020).

4.7. Cultivo em meio ISP2 sólido.

Inicialmente os cultivos foram planejados em meio líquido por facilitarem a realização dos ensaios de incorporação de precursores isotopicamente marcados com ^{13}C . Porém, tendo em vista que a produção dos compostos **15-17** não se mostrou reprodutível nos meios líquidos, foi realizado o cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio **ISP2 ágar** em placas de Petri como uma tentativa de eliciar a produção dos compostos. O meio **ISP2** foi escolhido para o teste em meio sólido por ser recomendado para o cultivo de linhagens do gênero *Streptomyces* (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966), além de ser um meio sólido frequentemente usado em nosso laboratório para o cultivo de linhagens de actinobactérias simbiotes de insetos sociais.

O extrato bruto em acetato de etila obtido do cultivo em **ISP2 ágar** foi analisado em LC-ESI-MS/MS nas mesmas condições apresentadas anteriormente. Como pode-se observar na **Figura 18**, o extrato apresentou picos com tempos de retenção semelhantes aos compostos **15-17**.

Novamente foram extraídos os íons (EIC) referentes a m/z teórica dos compostos **15-17** protonados ($[M+H]^+$ m/z 1463,7721, $[M+H]^+$ m/z 1479,7715 e $[M+H]^+$ m/z 1495,7709, respectivamente), o que confirmou que os picos em questão são referentes aos compostos **15-17** (Figura 18).

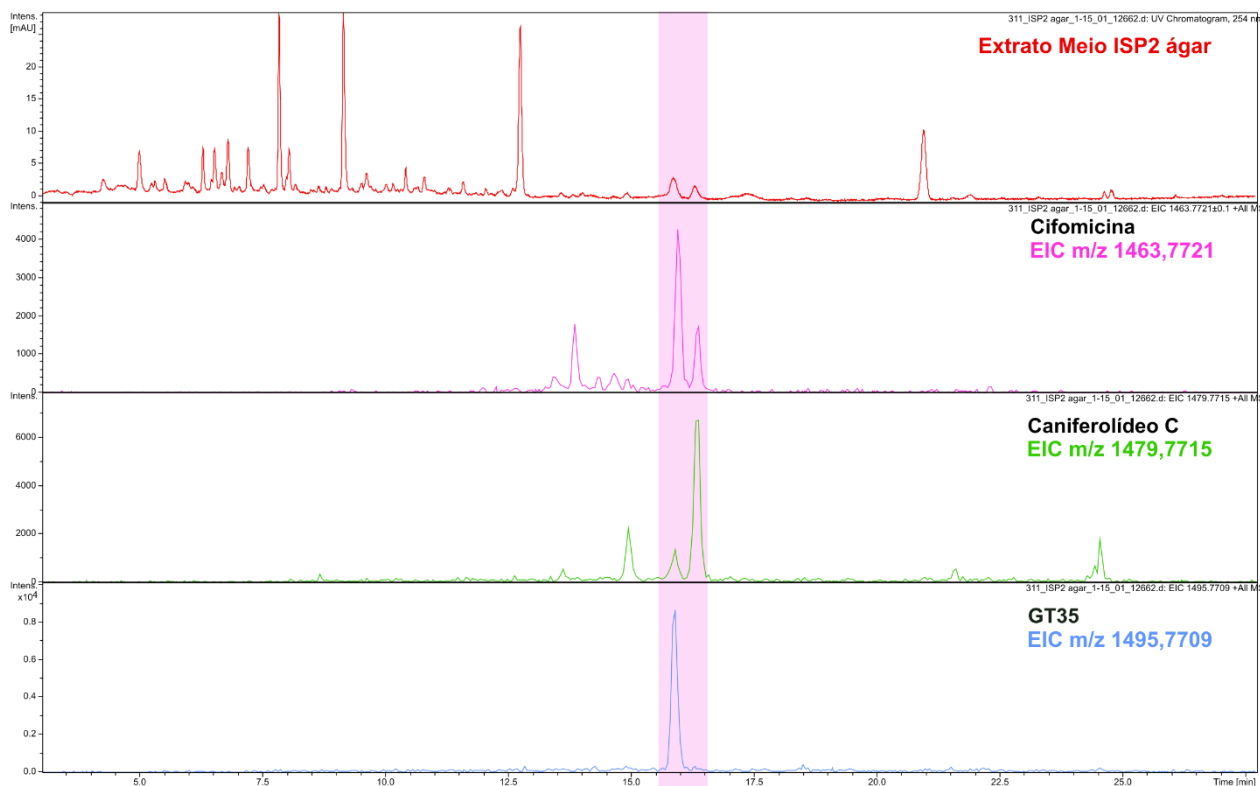


Figura 18 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **ISP2 ágar**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.

4.8. Aumento de escala de cultivo em meio ISP2 sólido.

O cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio sólido foi repetido, porém dessa vez, em escala ampliada para que fosse possível a padronização do processo de extração e isolamento dos compostos **15-17**.

O extrato bruto em acetato de etila obtido do cultivo em escala ampliada em **ISP2 ágar**, foi analisado em LC-ESI-MS/MS. E assim como observado no cultivo em pequena escala, o extrato apresentou picos com tempos de retenção semelhantes aos compostos **15-17**. A presença dos compostos foi confirmada pela extração dos íons (EIC) referentes

a m/z teórica dos compostos **15-17** protonados ($[M+H]^+$ m/z 1463,7721, $[M+H]^+$ m/z 1479,7715 e $[M+H]^+$ m/z 1495,7709, respectivamente) (**Figura 19**).

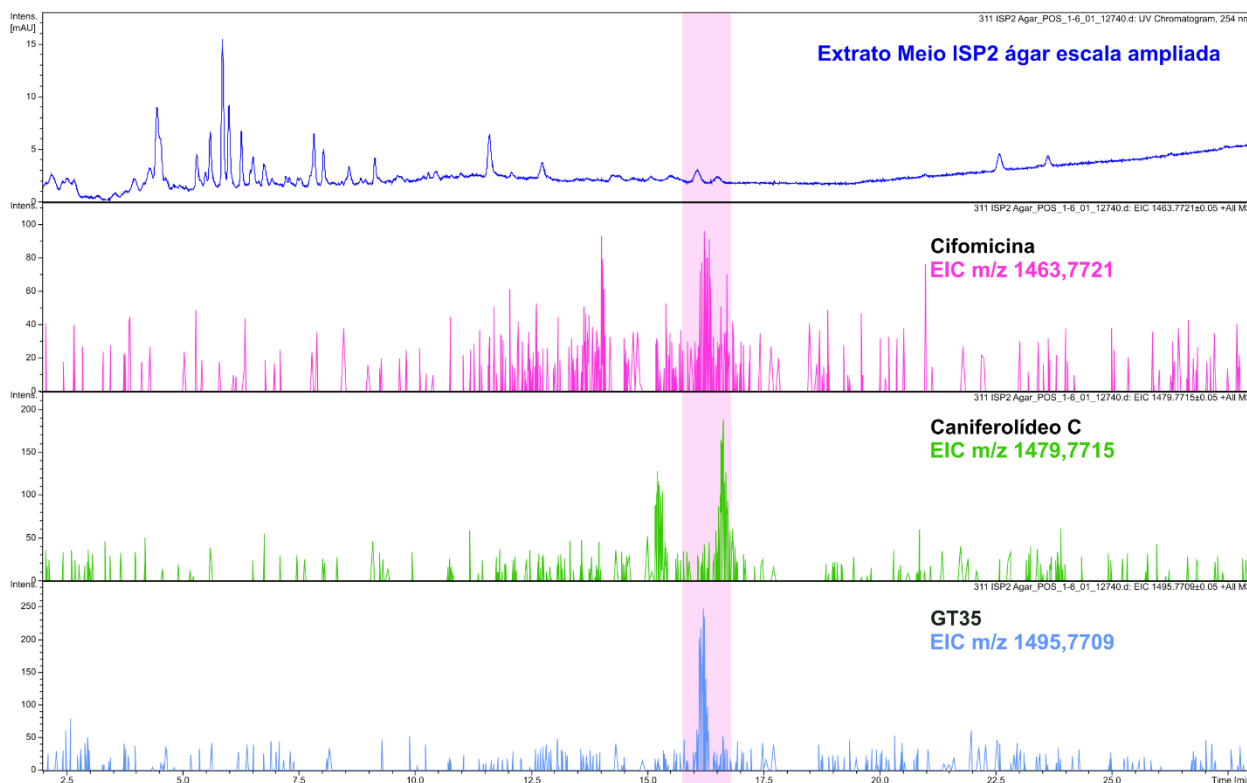


Figura 19 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo ISP2 ágar em escala ampliada, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.

Porém, quando compara-se a intensidade dos picos observados nas análises do extrato obtido do primeiro cultivo da linhagem em meio **ISP2 ágar** com o extrato obtido do aumento de escala, pode-se observar que os picos cromatográficos e os íons extraídos nas análises do aumento de escala são significativamente menos intensos que os obtidos do primeiro cultivo (**Figura 20**). É importante ressaltar que as análises de HR-ESI-MS/MS realizadas não são quantitativas, entretanto, podem indicar que os compostos **15-17** estão presentes no extrato do aumento de escala, porém, não em grandes quantidades.

A presença dos compostos **15-17** nos extratos obtidos dos dois cultivos realizados em meio **ISP2 ágar** em momentos distintos, sugere que essa pode ser uma condição de cultivo mais adequada para a padronização da produção dos compostos. Porém mais

experimentos são necessários para confirmar se a produção será mantida. Além disso, diversos fatores podem ser explorados para otimizar a produção dos compostos, como por exemplo, o cultivo da linhagem em outros meios de cultivo sólidos, a variação das condições de preparação do inóculo utilizado e o tempo de incubação das placas contendo o cultivo.

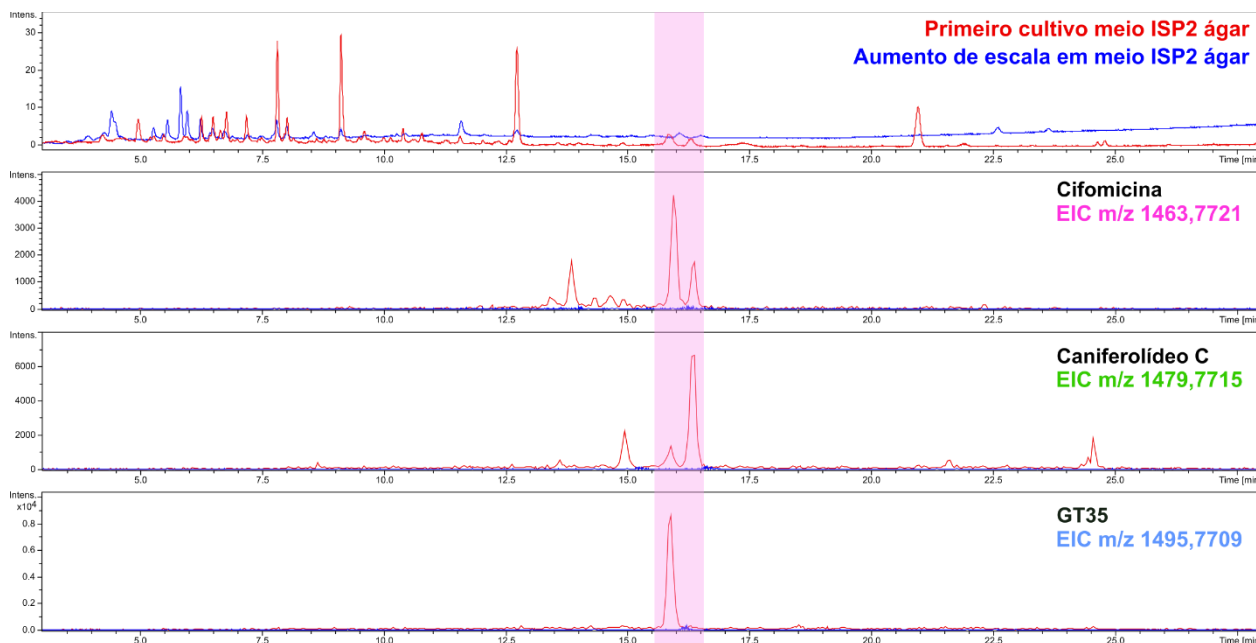


Figura 20 – Comparação entre os cromatogramas e as extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**) dos extratos obtidos do primeiro cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio **ISP2 ágar** (vermelho) e o aumento de escala realizado no mesmo meio (azul).

4.9. Análises metabolômicas por Molecular Networking (GNPS)

Tendo em vista as variações do metabolismo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 observadas nas diferentes condições de cultivo testadas, foi construída uma rede molecular (*molecular networking*) com os dados de LC-ESI-MS/MS obtidos dos extratos dos cultivos em meio **A3M, ISP2** (cultivos incubados por 8 dias), meio **ISP2 ágar** (aumento de escala) além dos extratos de seus respectivos controles (**Anexo 9**).

A rede molecular foi construída através da plataforma GNPS (WANG et al., 2016). Para a interpretação dos dados apresentados pela rede molecular, é importante ressaltar que cada nodo é a representação de um espectro de consenso referente à um íon

identificado em diferentes varreduras (*scans*) em pelo menos uma das análises. A distribuição em setores (gráfico de pizza) em cada nodo contém duas informações: as cores mostram quais amostras apresentaram o íon em questão, e a proporção entre as cores é referente a quantidade de varreduras (*scans*) em que o íon foi identificado em cada amostra. Além disso, os nodos são conectados por linhas e a espessura de cada linha é determinada pelo cosseno da similaridade dos espectros de MS/MS dos íons conectados. Ou seja, quanto mais similar o padrão de fragmentação dos íons em questão, maior o cosseno, e conseqüentemente, mais espessa a linha que conecta os nodos. Por fim, os aglomerados de nodos conectados entre si, são chamados de *clusters*.

A rede molecular construída apresenta ao todo 1035 nodos, ou seja, foram encontrados 1035 espectros MS/MS diferentes em todas as análises combinadas. Dentre eles, 874 nodos foram observados em pelo menos uma das análises referentes ao extrato do controle dos três meios de cultivo. Portanto, a rede molecular apresentou 161 nodos observados apenas no cultivo da linhagem nos meios de cultivo analisados.

Dentre os 161 nodos destacados, 42 são referentes a íons presentes em mais de um meio de cultivo, os 119 restantes foram observados em apenas uma das condições testadas. Dentre eles, 28 nodos foram observados apenas no cultivo em meio **ISP2**, 38 em meio **A3M** e 53 em meio **ISP2 ágar** (**Figura 21**).



Figura 21 – Diagrama de Venn contendo a quantidade de nodos apresentados pela rede molecular para cada um dos extratos obtidos do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 nos meios de cultura **ISP2**, **ISP2 ágar** e **A3M**.

Todos os espectros de fragmentação presentes nas análises foram comparados com as bibliotecas do GNPS (WANG et al., 2016). Entre os 161 nodos não observados

nas análises dos controles, apenas um foi anotado. Ele corresponde a m/z 655,27 e seu padrão de fragmentação foi consistente com os dados das coproporfirinas (**18-21**) reportados na literatura (erro 6,5 ppm) (**Figura 22**) (FATEEN et al., 2011).

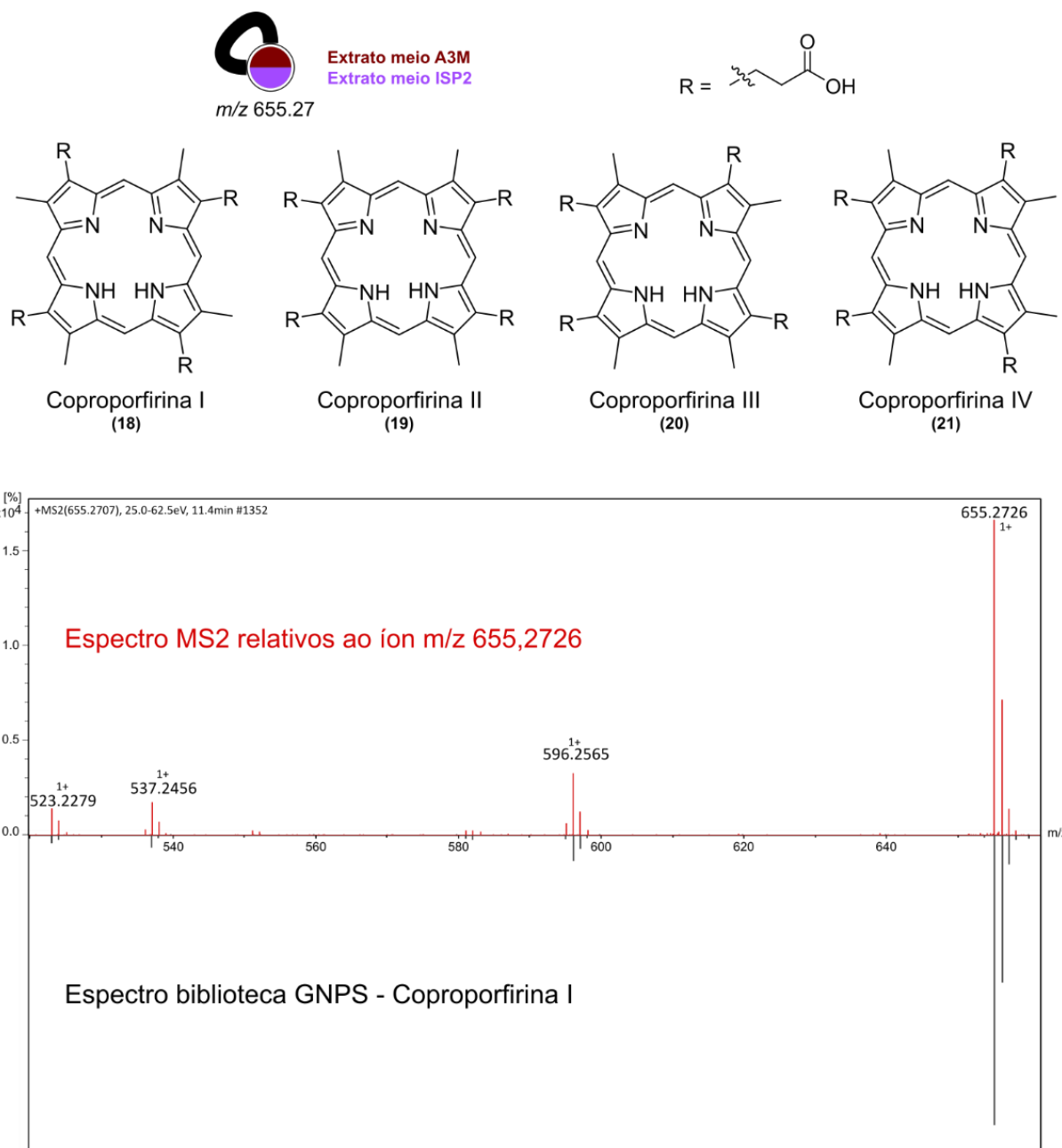


Figura 22 – Nodo referente ao íon m/z 655,27 presente nos extratos do cultivo da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG 311 em meios **A3M** e **ISP2**. Estruturas químicas das coproporfirinas I (**18**), II (**19**), III (**20**) e IV (**21**). Comparação entre os espectros de MS/MS da biblioteca GNPS (picos pretos) e nossos dados experimentais (picos vermelhos) relativos ao íon de m/z 655,2726.

As coproporfirinas pertencem à classe das porfirinas, compostos com esqueleto macrocíclico tetrapirrólico conectados por ligações metínicas, formando em seu centro, uma região propícia para formação de complexos metálicos (**Figura 22**) (MILGROM, 1998). A diferença entre os diversos tipos de porfirinas se dá pelas substituições presentes nos anéis pirróis. No caso das coproporfirinas, cada um dos quatro anéis pirróis possui dois substituintes: um grupo metila e um grupo ácido propanoico. A diferença entre os quatro isômeros **18-21** é a posição dos substituintes em cada um dos anéis (**Figura 22**). De acordo com essas características, não é possível diferenciar os isômeros apenas com o padrão de fragmentação obtidos pelas análises de LC-ESI-MS/MS.

As porfirinas complexadas com ferro, são chamadas de complexo heme e podem ser encontradas em diversos organismos eucariotos e procariotos. Os complexos heme podem desempenhar diversas funções de acordo com a porção heme e a proteína a qual está conjugada (DAILEY et al., 2017). Um exemplo de proteína dependente de grupo heme em bactérias, são os citocromos respiratórios que utilizam o grupo heme como transportadores de elétrons através de reações redox (MAYFIELD; DEHNER; DUBOIS, 2011).

Os compostos **18-21** foram reportados previamente em diferentes linhagens de *Streptomyces* (SATO; SHIMIZU; FUKUI, 1968; SUZUKI et al., 1993; TORIYA et al., 1993). A identificação desses compostos se mostra recorrente, pois a coproporfirina III (**19**) é um intermediário da via de biossíntese de grupo heme (DAILEY et al., 2015). Porém, em estudos recentes realizados no LQMo, foi observado que, em co-cultivo com linhagens do fungo patogênico *Escovopsis*, diversas linhagens de *Streptomyces* spp. isoladas de formigas da subtribo Attina, apresentam um aumento considerável na produção de coproporfirinas (resultados não publicados). Em função disso, a linhagem *Streptomyces* sp. ICBG 311 será incorporada aos trabalhos para investigar as possíveis funções ecológicas desses compostos.

5. CONCLUSÕES

As análises de predição *in silico* realizadas com o genoma da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 permitiram inferir que a biossíntese da cifomicina (**15**), caniferolídeo C (**16**) e GT-35 (**17**) é realizada por um BGC presente no *contig* 1 do genoma da linhagem, com 220 Kpb de comprimento, contendo 83 genes, sendo 25 deles diretamente relacionados com a biossíntese dos compostos.

O esqueleto policetídeo presente nas três estruturas é biossintetizado a partir de uma policetídeo sintase do tipo I, uma enzima multimodular codificada por sete genes presentes no BGC. O policetídeo formado pela PKS tipo I sofre algumas modificações posteriores promovidas por citocromos p450 que diferenciam as estruturas **15**, **16** e **17**. Os açúcares L-axenose e D-aminocetose presentes na estrutura são biossintetizados a partir da glicose-1-fosfato pela ação de nove enzimas. Por fim, a biossíntese da alquilnaftoquinona se inicia com um intermediário da via de biossíntese da menaquinona e é realizada por uma metiltransferase (codificada por um gene fora do BGC), um citocromo P450 e uma PKS.

A elucidação da via de biossíntese dos compostos, além de possibilitar estudos posteriores, nos fornece diversas informações estruturais sobre os compostos, como por exemplo, a predição da configuração absoluta dos centros estereoquímicos formados durante a biossíntese da cadeia policetídea. As informações estruturais obtidas pelas análises *in silico* corroboram com a elucidação estrutural e as configurações relativas aferidas através das análises de RMN realizadas com os compostos isolados. Em função disso, os resultados obtidos pelas análises *in silico* foram reunidos em um artigo com a determinação estrutural completa dos compostos e atividade antileishmania. O artigo intitulado “Antileishmanial polyketide macrolides from ant-associated *Streptomyces* sp.” foi publicado em janeiro de 2021 na revista *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (ORTEGA; LOURENZON et al., 2021).

Análises em diferentes condições de cultivo líquido, mostraram que a linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 não apresenta uma produção estável dos compostos **15-17** nas condições testadas inicialmente. Os compostos foram observados em apenas dois dos seis meios de cultivo e essa produção não foi reproduzida em cultivos posteriores realizados em mesmas condições. Esse fenômeno pode ocorrer pela falta dos estímulos

necessários para eliciar a biossíntese dos compostos. Em estudos subsequentes, a linhagem foi cultivada em dois momentos diferentes no meio sólido **ISP2 ágar**, e a presença dos compostos **15-17** foi observada em ambos os cultivos. Mais estudos se fazem necessário para otimizar a produção dos compostos em meio sólido além da padronização dos processos de extração e isolamento para permitir a realização dos ensaios de incorporação de precursores marcados com ^{13}C .

As análises metabolômicas através das redes moleculares geradas pela plataforma GNPS, mostraram 161 nodos referentes aos cultivos da linhagem ICBG311 nos meios **A3M**, **ISP2** e **ISP2 ágar**, com ênfase em 53 que foram presentes apenas no cultivo no meio **ISP2 ágar**. Dentre os 161 nodos destacados, um deles referente a m/z 655,27, foi anotado como coproporfirina, um grupo de compostos isômeros comuns no metabolismo de actinobactérias. Os demais nodos não foram anotados na plataforma GNPS, sugerindo a possibilidade de produção de novos compostos. Vale mencionar que o genoma dessa bactéria apresenta outros 36 BGC segundo as análises realizadas AntiSMASH. Portanto, a linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 possui um grande potencial biossintético que pode ser explorado em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

AANEN, D. K. et al. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts PNAS-2002-Aanen-14887-92.pdf. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 23, p. 14887–14892, 2002.

BACHMANN, B. O.; RAVEL, J. **Chapter 8 Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 458

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of. **American Society for Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.

BEEMELMANN, C. et al. Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 314–327, 2016.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 1 jan. 2013.

BLIN, K. et al. AntiSMASH 4.0 - improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. **Nucleic Acids Research**, 2017.

BLIN, K. et al. The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes. **Nucleic Acids Research**, 2020.

BRONSTEIN, J. L. The evolution of facilitation and mutualism. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1160–1170, 2009.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.

CAFARO, M. J. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal**

Society B: Biological Sciences, v. 278, n. 1713, p. 1814–1822, 2011.

CASTOE, T. A. et al. A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. **Gene**, v. 392, n. 1–2, p. 47–58, 2007.

CHAMBERS, M. C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.

CHEVRETTE, M. G. et al. The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications**, v. 10, n. 516, 2019.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033–1039, 2001.

DAILEY, H. A. et al. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 7, p. 2210–2215, 2015.

DAILEY, H. A. et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, 2017.

DENISOV, I. G. et al. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, 2005.

DONADIO, S. et al. Modular Organization of Genes Required for Complex Polyketide Biosynthesis. **Science**, v. 252, p. 675–679, 1991.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FATEEN, E. et al. Porphyrins profile by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the diagnosis of porphyria. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 12, n. 1, p. 49–58, 2011.

HARUNARI, E.; KOMAKI, H.; IGARASHI, Y. Biosynthetic origin of butyrolactol A, an antifungal polyketide produced by a marine-derived *Streptomyces*. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, n. Figure 1, p. 441–450, 2017.

IKEDA, H.; SHIN-YA, K.; OMURA, S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 233–250, 2014.

KEATINGE-CLAY, A. Crystal Structure of the Erythromycin Polyketide Synthase Dehydratase. **Journal of Molecular Biology**, v. 384, n. 4, p. 941–953, 2008.

KEATINGE-CLAY, A. T. A Tylosin Ketoreductase Reveals How Chirality Is Determined in Polyketides. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 8, p. 898–908, 2007.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

KUMAR, V. et al. An Improved Method for Isolation of Genomic DNA from Filamentous Actinomycetes. **Journal of Engineering and Technology Management**, v. 2, n. July, p. 10–13, 2010.

LEE, N. et al. Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*. **ISME Journal**, v. 14, n. 5, p. 1111–1124, 2020.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new

developments. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W256–W259, 1 jul. 2019.

LIU, R.; DENG, Z.; LIU, T. Streptomyces species: Ideal chassis for natural product discovery and overproduction. **Metabolic Engineering**, v. 50, n. May, p. 74–84, 2018.

LOPES, A. A.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Quando os microrganismos salvam vidas. **Ciência Hoje**, v. 286, p. 6, 2011.

MARTIN, B. D.; SCHWAB, E. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. **International Journal of Biology**, v. 5, n. 1, 2012.

MAYFIELD, J. A.; DEHNER, C. A.; DUBOIS, J. L. Recent advances in bacterial heme protein biochemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 2, p. 260–266, 2011.

MENEGATTI, C.; FUKUDA, T. T. H.; PUPO, M. T. Chemical Ecology in Insect-microbe Interactions in the Neotropics. **Planta Medica**, v. 87, n. 1–2, p. 38–48, 2021.

MENEZES, C. et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851–2855, 2015.

MILGROM, L. R. The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds Lionel. **Journal of Chemical Education**, v. 75, n. 4, 1998.

MORAN, N. N. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, p. 7, 2006.

MUELLER, U. G. et al. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 10, p. 2414–2434, 2018.

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.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over

the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, mar. 2020.

NGUYEN, L. T. et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

ORTEGA, H. E. et al. Absolute configurations of griseorhodins A and C. **Tetrahedron Letters**, v. 58, p. 4721–4723, 2017.

ORTEGA, H. E. **Antifungal and Antileishmanial Natural Products from Actinobacteria Associated to Brazilian Fungus-Growing Ants Doctoral**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2018.

ORTEGA, H. E. et al. Antifungal compounds from *Streptomyces* associated with attine ants also inhibit *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, 2019a.

ORTEGA, H. E. et al. Structure and Absolute Configuration of Secondary Metabolites from Two Strains of *Streptomyces chartreusis* Associated with Attine Ants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2672–2680, 2019b.

ORTEGA, H. E. et al. Antileishmanial macrolides from ant-associated *Streptomyces* sp. ISID311. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 32, n. October 2020, p. 116016, 2021.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. An insight into the antifungal pipeline: Selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 2010.

OZAKI, T. et al. Identification of the common biosynthetic gene cluster for both antimicrobial streptoaminals and antifungal 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 2370–2378, 2019.

PALUDO, C. R. et al. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.

PAULO, B. S.; SIGRIST, R.; OLIVEIRA, L. G. DE. AVANÇOS RECENTES EM BIOSSÍNTESE COMBINATÓRIA DE POLICETÍDEOS: PERSPECTIVAS E DESAFIOS. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 71–83, 2019.

PAWLIK, K. et al. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 2, p. 87–99, 2007.

PÉREZ-VICTORIA, I. et al. Structure elucidation and biosynthetic gene cluster analysis of caniferolides A-D, new bioactive 36-membered macrolides from the marine-derived: *Streptomyces caniferus* CA-271066. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 2954–2971, 2019.

PÉREZ, M. et al. PM100117 and PM100118, new antitumor macrolides produced by a marine *Streptomyces caniferus* GUA-06-05-006A. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, n. 5, p. 388–394, maio 2016.

ROMO, A. J. et al. The Amipurimycin and Miharamycin Biosynthetic Gene Clusters: Unraveling the Origins of 2-Aminopurinylyl Peptidyl Nucleoside Antibiotics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 36, p. 14152–14159, 2019.

ROSENBERG, E. et al. The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 4, p. 500–506, 23 mar. 2010.

SATO, K.; SHIMIZU, S.; FUKUI, S. Studies on the corrinoids and porphyrins in streptomycetes part II. Factors influencing the accumulation of coproporphyrin III in the culture filtrate of *streptomyces livaceus* 605. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 7–11, 1968.

SCHOENIAN, I. et al. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial

communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 5, p. 1955–1960, 2011.

SCHWENTNER, M. et al. A Phylogenomic Solution to the Origin of Insects by Resolving Crustacean-Hexapod Relationships. **Current Biology**, v. 27, n. 12, p. 1818–1824.e5, 2017.

SCOTT, J. J. et al. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, v. 322, n. 5898, p. 63, 2008.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. **Genome Research**, v. 13, n. 22, p. 2498–2504, 2003.

SHEN, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Current opinion in chemical biology**, v. 7, n. 2, p. 285–95, 2003.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313–340, 1966.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: A millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380–416, 2001.

SUZUKI, K. et al. Deoxyribonuclease inhibitors produced by streptomycetes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 27–32, 1993.

TAKAHASHI, I. et al. **Fungicidal GT35 manufacture with *Streptomyces***, 1997.

THOMAS, J. et al. Toenail onychomycosis: an important global disease burden. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 35, n. 5, p. 497–519, 2010.

TORIYA, M. et al. Zincphyrin, a novel coproporphyrin III with zinc from *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 1, p. 196–200, 1993.

VAN MOLL, L. et al. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 1–18, 2021.

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.

WOODRUFF, H. B. Natural products from microorganisms. **Science**, v. 208, p. 1225–1229, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. OMS | Leishmaniasis. **WHO**, 2015.

XIE, X. et al. Elucidation of the Cryptic Methyl Group Epimerase Activity of Dehydratase Domains from Modular Polyketide Synthases Using a Tandem Modules Epimerase Assay. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 28, p. 9507–9510, 2017.

YADAV, G.; GOKHALE, R. S.; MOHANTY, D. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, n. 2, p. 335–363, 2003.

ZHAO, M. et al. In Vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of APX001 against *Candida* spp. in a Neutropenic Disseminated Candidiasis Mouse Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 1–9, 2018.

ANEXO

Anexo 1 – Tabela com os 37 BGC anotados no genoma da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311 pelo Software AntiSMASH.

Região	Classificação	De	Até	Cluster mais similar conhecido	Similaridade	
Region 1.1	NRPS ↗	110.806	176.398	thiazostatin / walssemycin A / walssemycin B	NRP	33%
Region 1.2	T3PKS ↗	195.405	236.652	virginiamycin S1 ↗	NRP + Polyketide	16%
Region 1.3	melanin ↗	391.846	402.322			
Region 1.4	NRPS-like ↗ , PKS-like ↗ , T1PKS ↗ , oligosaccharide ↗ , butyrolactone ↗	427.968	622.086	cynthomycin ↗	Polyketide	91%
Region 1.5	terpene ↗	679.217	704.080	isorenieratene ↗	Terpene	71%
Region 1.6	other ↗ , NRPS ↗	713.353	773.885	delmino-antipain ↗	NRP	66%
Region 1.7	butyrolactone ↗	838.252	849.220	coelomycin P1 ↗	Polyketide Modular type I	12%
Region 2.1	siderophore ↗	56.210	69.397	ficellomycin ↗	NRP	3%
Region 2.2	ladderane ↗ , lassopeptida ↗	261.528	303.874	citrasasin D ↗	RPP	100%
Region 2.3	butyrolactone ↗	304.667	315.644	neocarzinostatin ↗	Polyketide Iterative type I + Polyketide Ene-dryne type I	4%
Region 2.4	RPP-like ↗	382.448	393.290			
Region 2.5	T2PKS ↗	435.141	507.674	hyscolin I ↗	Polyketide	89%
Region 2.6	siderophore ↗	563.264	576.616	nalamyon ↗	Polyketide	9%
Region 3.1	lanthipeptide-class I ↗	336.045	362.491			
Region 4.1	T2PKS ↗	30.303	102.818	spore pigment ↗	Polyketide	75%
Region 4.2	RPP-like ↗	119.867	127.610			
Region 4.3	T3PKS ↗	275.313	316.377	namgenin ↗	Terpene	100%
Region 4.4	RPP-like ↗	338.671	350.602			
Region 4.5	NRPS ↗ , T1PKS ↗	360.317	485.904	ipistatin ↗	NRP	35%
Region 4.6	transAT-PKS ↗	486.493	572.244	iso-migrastatin / migrastatin / dongpocin A /	Polyketide Modular type I + Polyketide Trans-AT type I	100%
Region 5.1	terpene ↗ , thiopeptide ↗ , LAP ↗	360.050	408.290	slomycin A ↗	RPP Thiopeptide	100%
Region 6.1	T1PKS ↗	61.707	152.682	phosfadoomyacin B ↗	Polyketide	100%
Region 7.1	siderophore ↗	62.588	77.457	vinoferrin ↗	Other	18%
Region 7.2	T1PKS ↗ , ngE-KS ↗	216.337	267.833	sanglierin A ↗	NRP + Polyketide	4%
Region 8.1	T1PKS ↗	246.033	292.380	nystatin ↗	Polyketide	10%
Region 9.1	T1PKS ↗	1	26.355	loposamide A / loposamide B / loposamide C ↗	Polyketide	21%
Region 9.2	butyrolactone ↗	144.795	155.715	blasticidin S ↗	Other	7%
Region 9.3	T3PKS ↗	230.956	272.140	a201a ↗	Other:Nucleoside	10%
Region 12.1	linarin ↗	78.880	99.777	legonarinin ↗	RPP	66%
Region 17.1	ngE-KS ↗ , T1PKS ↗	1	30.095	heroxidene ↗	Polyketide	3%
Region 17.2	terpene ↗	115.666	142.299	hopene ↗	Terpene	69%
Region 24.1	T1PKS ↗	1	67.510	sceliptrioclam ↗	Polyketide	56%
Region 25.1	terpene ↗ , lassopeptida ↗	62.696	103.270	anandin C ↗	RPP	75%
Region 32.1	ectone ↗	54.154	64.570	ectone ↗	Other	100%
Region 33.1	siderophore ↗	1	9.373	desferrioxamine E ↗	Other	100%
Region 52.1	T1PKS ↗	1	5.662	methylyon ↗	Polyketide Modular type I + Saccharide Hybridization ring	57%
Region 53.1	T1PKS ↗	1	5.080			

Anexo 2 – Tabela com a descrição dos 83 genes encontrados no BGC da cifomicina. Suas funções propostas baseadas com genes similares da literatura e comparação com genes presentes no BGC proposto como responsável pela biossíntese dos caniferolídeos.

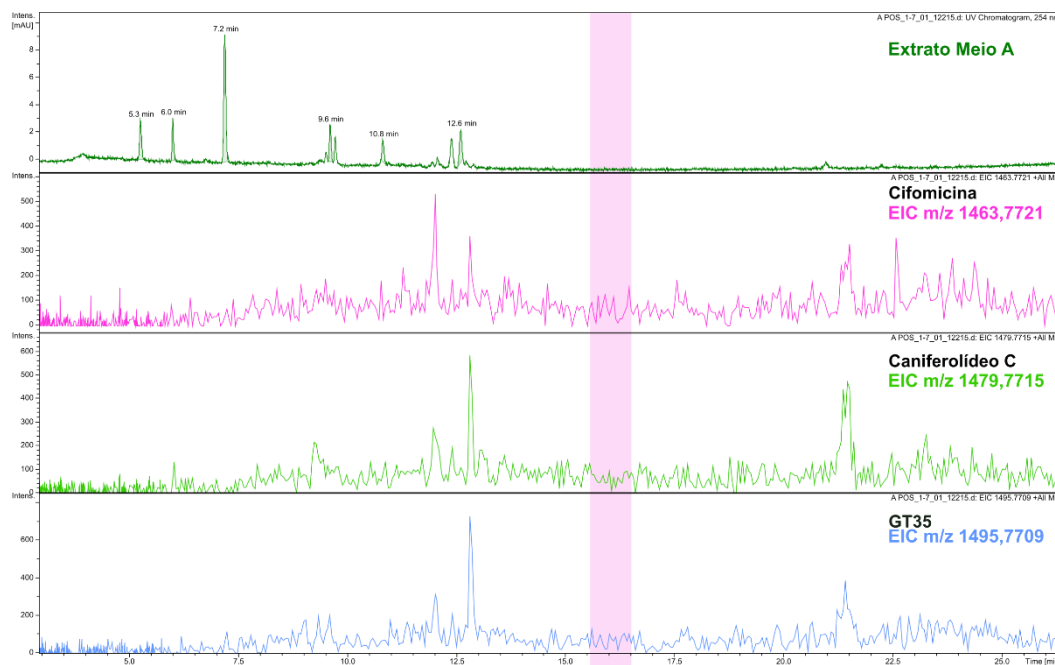
Gene	Comprimento (aa)	Função proposta	Análogo Literatura	ID(%)	Análogos caniferolídeos	ID (%)
cph01	280	alpha/beta fold hydrolase	WP_093488154.1	98,7	scaN	86,9
cph02	125	VOC Family protein	WP_093488152.1	97,6		
cph03	427	acyl-CoA synthetase (AMP-forming)/AMP-acid ligase II [<i>Streptomyces</i> sp. 2333.5]	PJJ06519.1	98,6	scaL	90,7
cph04	530	acyl-CoA carboxylase subunit beta	WP_096215236.1	99,1	scaK	92,3
cph05	406	cytochrome P450	WP_093488146.1	99,8		
cph06	364	NDP-hexose-3-ketoreductase	PJJ06516.1	97,2	scaR3	88,7
cph07	289	menaquinone biosynthesis protein 1,4-dihydroxy-6-naphthoate synthase	WP_096211624.1	99,0	scaM4	87,4
cph08	361	AMP-binding protein	WP_093488140.1	98,6	scaJ	91,7
cph09	390	menaquinone biosynthesis protein aminofutalosine synthase MqnE	WP_093488138.1	99,7	scaM3	93,2
cph10	102	ferredoxin	WP_006608177.1	99,0	scaF2	98,7
cph11	423	menaquinone biosynthesis protein de-hypoxanthine futalosine cyclase	PJJ06510.1	99,3	scaM2	93,3
cph12	302	Menaquinone biosynthesis protein	WP_093488134.1	99,7	scaM1	92,7
cph13	257	thioesterase	WP_093488132.1	98,1	scaT	93,8
cph14	134	hypotheticalprotein	WP_096211627.1	97,0	sca H6	89,3
cph15	328	malonyltransferase	WP_096211628.1	97,6	scaH5	87,8
cph16	3032	Ig-like domain repeat protein	WP_093488126.1	91,3	scaI	84,2
cph17	1039	NRPS	WP_143053694.1	98,5	scaG	89,0

cph18	448	Serine Hydrolase	WP_093489601.1	97,3		
cph19	227	(TetR) helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_093488122.1	99,1		
cph20	417	Glycosyltransferase family 1 protein	WP_093649299.1	96,2		
cph21	212	Adenylyl-sufate Kinase	WP_093649298.1	97,2	scaSK	80,7
cph22	429	Sulfotransferase Family protein	SOE09150.1	99,1	scaST	91,6
cph23	243	hypotheticalprotein	WP_093488114.1	97,9	scaH4	90,8
cph24	410	Methyltransferase domain-containing protein	WP_006608190.1	98,1	scaCM	94,2
cph25	212	dTDP-4-dehydrorhamnose 3.5-epimerase family protein	WP_096211634.1	99,1	scaE	91,3
cph26	319	NAD(P)-dependent oxidoreductase	WP_096215237.1	97,1	scaR2	88,7
cph27	260	ATP-binding cassette domain-containing protein	WP_093488108.1	99,2	scaT2	94,0
cph28	283	ABC-2 type transport system permease protein	PJJ06493.1	99,7	scaT1	91,7
cph29	77	Tautomerase PptA	WP_039630380.1	76,6		
cph30	1275	NRPS (adenylation domain-containing protein)	SOE09157.1	96,1		
cph31	311	EamA family transporter	WP_093488106.1	99,0		
cph32	349	HD domain-containing protein	WP_096215239.1	94,3		
cph33	308	LysR family transcriptional regulator	EJJ02511.1	97,4		
cph34	420	MFS transporter	WP_096211636.1	98,6		
cph35	464	Cytochrome P450	WP_093488063.1	97,8		
cph36	923	Posphoenolpyruvate synthase	WP_096211638.1	97,5		
cph37	551	Hypothetical protein	WP_093488058.1	96,9		

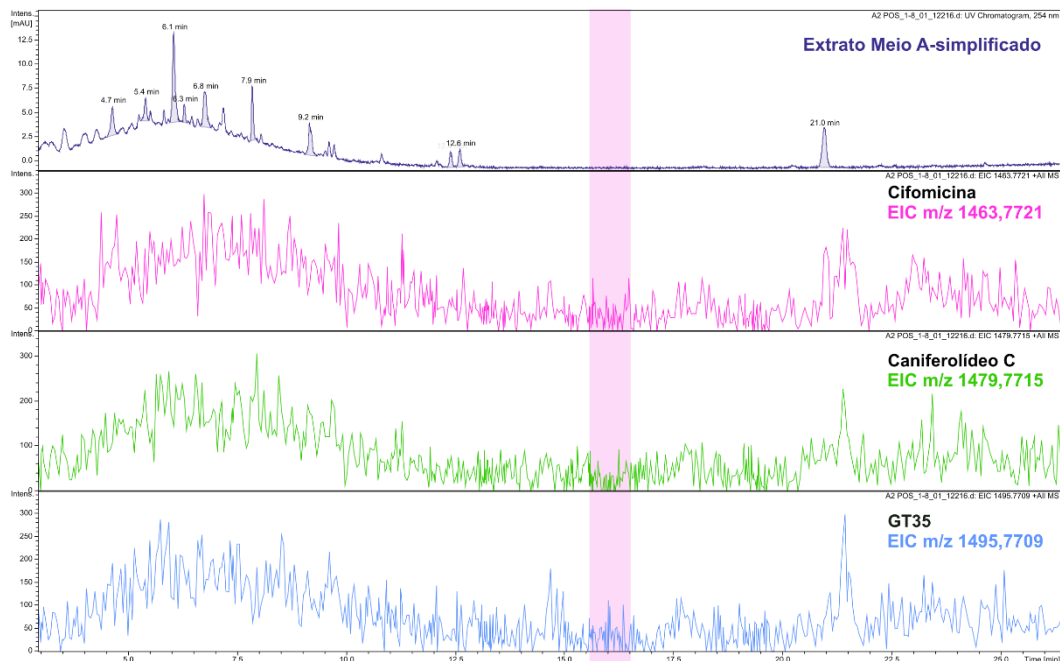
cph38	394	SDR Family oxidoreductase	WP_093488056.1	95,7		
cph39	331	nucleoside-diphosphatekinase	WP_093488054.1	97,6		
cph40	325	A-factor biosynthesis protein	WP_093488052.1	97,9		
cph41	216	Nitroreductase family protein	WP_093488050.1	97,7		
cph42	302	UbiA Family prenyltransferase	WP_051007136.1	96,0		
cph43	433	Amidohydrolase Family protein	WP_096211641.1	93,1		
cph44	289	SAM-dependent methyl transferase	WP_096211642.1	96,9		
cph45	397	glycosyltransferase	WP_096211643.1	98,2		
cph46	99	Hypothetical protein	WP_030410275.1	98,0		
cph47	116	cold shock domain-containing protein	WP_129247969.1	98,3	scaA	89,3
cph48	343	3-oxoacyl-ACP synthase	WP_093488038.1	100	scaS	92,5
cph49	2385	PKS type I	WP_093489589.1	98,2	scaP8	89,5
cph50	433	Lipopolysaccharide biosynthesis proteinRfbH	WP_093488035.1	99,5	scaDH3	94,6
cph51	408	glycosyltransferase	WP_106430622.1	99,0	scaGT2	91,7
cph52	337	NAD(P)-dependent oxidoreductase	WP_159394945.1	93,6	scaR1	87,7
cph53	333	dTDP-glucose 4.6-dehydratase	WP_093488029.1	99,4	scaDH2	94,2
cph54	358	glucose-1-phosphate thymidylyl transferase	SOE09183.1	99,2	scaGS	94,6
cph55	418	activator-dependent Family glycosyltransferase	WP_006608217.1	99,0	scaGT1	93,6
cph56	403	Cytochrome P450	SOE09185.1	99,8	scaCP1	91,1
cph57	67	Ferredoxin	WP_093488020.1	95,5	scaF1	89,2

cph58	3644	Type I polyketide synthase (M19 and M20)	WP_093649293.1	97,3	scaP7	89,3
cph59	5525	Type I polyketide synthase (M16 to M18)	WP_143048127.1	96,6	scaP6	88,7
cph60	8462	Type I polyketide synthase (M11 to M15)	WP_093649334.1	97,5	scaP5	87,6
cph61	5251	Type I polyketide synthase (M8 to M10)	WP_093488014.1	96,6	scaP4	86,9
cph62	3964	Type I polyketide synthase (M6 and M7)	WP_159394946.1	96,1	scaP3	87,8
cph63	381	molybdopterin-dependent oxidoreductase	WP_093489583.1	98,4		
cph64	133	Hypothetical protein	WP_006608232.1	94,7		
cph65	322	NADPH:quinone reductase-like Zn-dependent oxidoreductase	PJJ06453.1	96,6		
cph66	328	TetR Family transcriptional regulator	WP_093488002.1	97,6		
cph67	1068	cytochrome P450	WP_085922399.1	92,8		
cph68	216	(TetR) helix-turn-helix transcriptional regulator	WP_085922400.1	86,5		
cph69	4945	Type I polyketide synthase (M3 to M5)	WP_093488000.1	97,6	scaP2	88,8
cph70	4243	Type I polyketide synthase (Load. M1 and M2)	WP_096211654.1	95,5	scaP1	85,5
cph71	472	NDP-hexose 2.3-dehydratase	WP_093487995.1	98,1	scaDH1	91,5
cph72	203	TetR Family transcriptional regulator	WP_093487992.1	99,5	scaTR5	93,7
cph73	257	FadR family transcriptional regulator [<i>Streptomyces</i> sp. 2323.1]	WP_096211656.1	97,3	scaTR4	86,2
cph74	939	AAA Family ATPase	WP_096211657.1	97,4	scaT3	87,6
cph75	246	LuxR Family transcriptional regulator	WP_093487986.1	98,8	scaTR2	90,1
cph76	341	Hypothetical protein	SOE09205.1	83,4		
cph77	959	AAA Family ATPase	WP_159394947.1	97,9	scaTR1	89,9

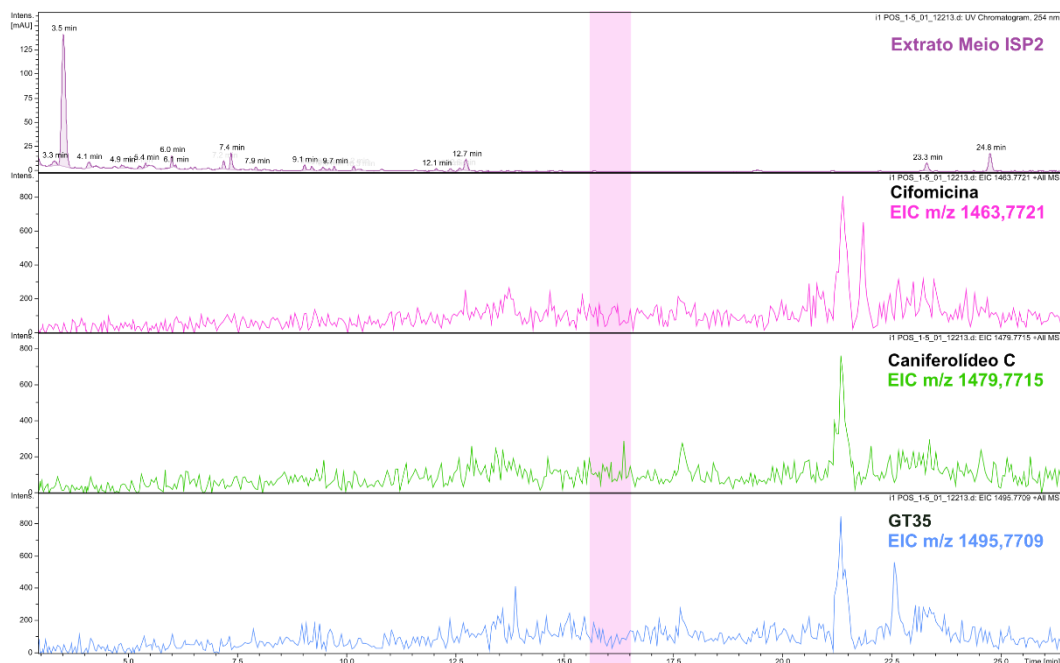
cph78	238	4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily protein	WP_093487982.1	99,6	scaPT	86,5
cph79	78	Hypothetical protein	EJJ02895.1	100	scaH3	93,6
cph80	166	Hypothetical protein	WP_093487980.1	98,2		
cph81	239	Hypothetical protein	WP_093489581.1	98,1	scaH1	83,5
cph82	427	HAMP domain-containing protein	WP_093649290.1	97,9		
cph83	694	SpoIIE Family protein phosphatase	WP_096211660.1	98,7		



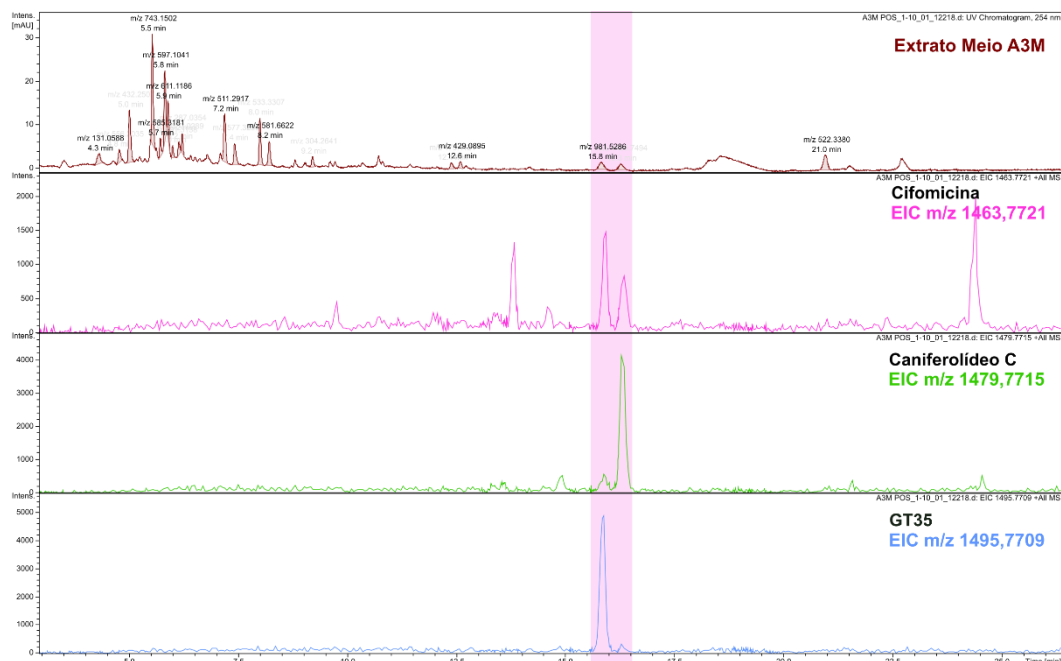
Anexo 3 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **A**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.



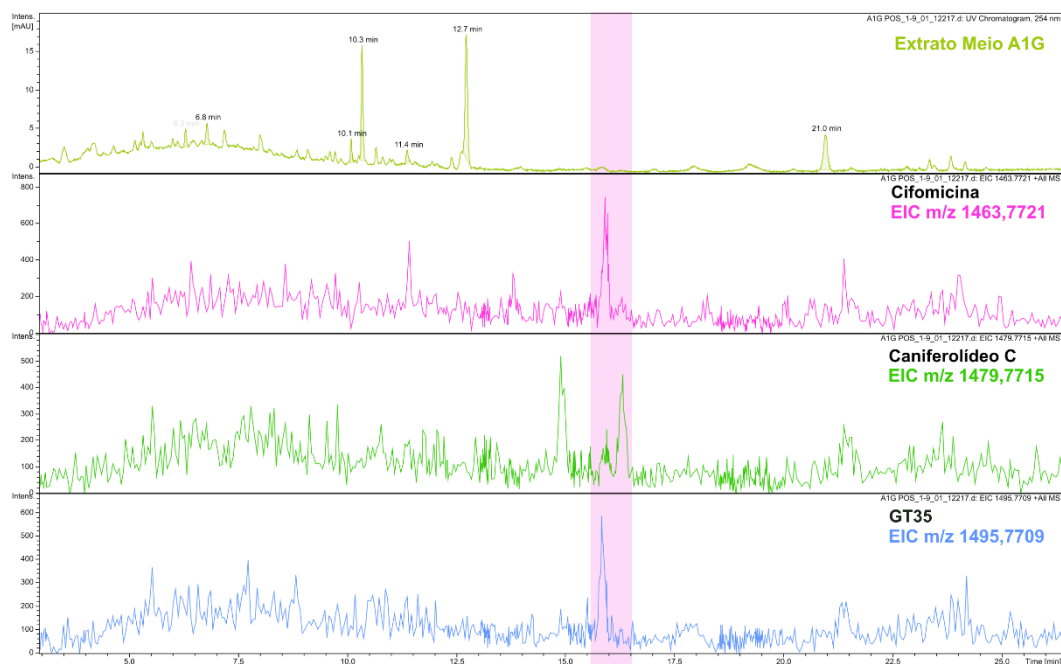
Anexo 4 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **A simplificado**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos 15-17.



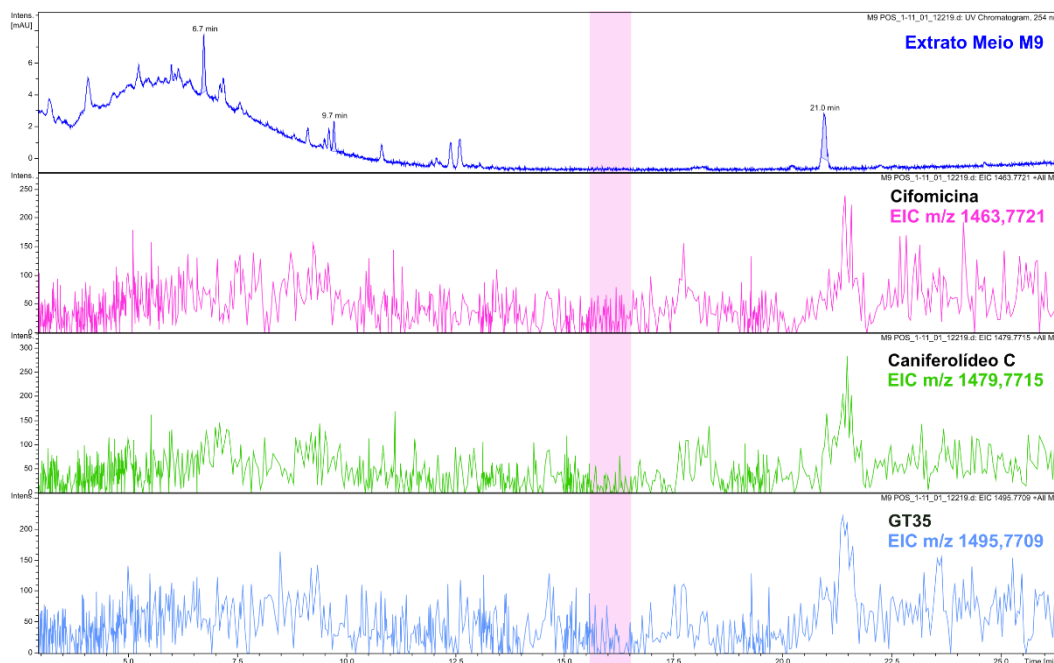
Anexo 5 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **ISP2**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos 15-17.



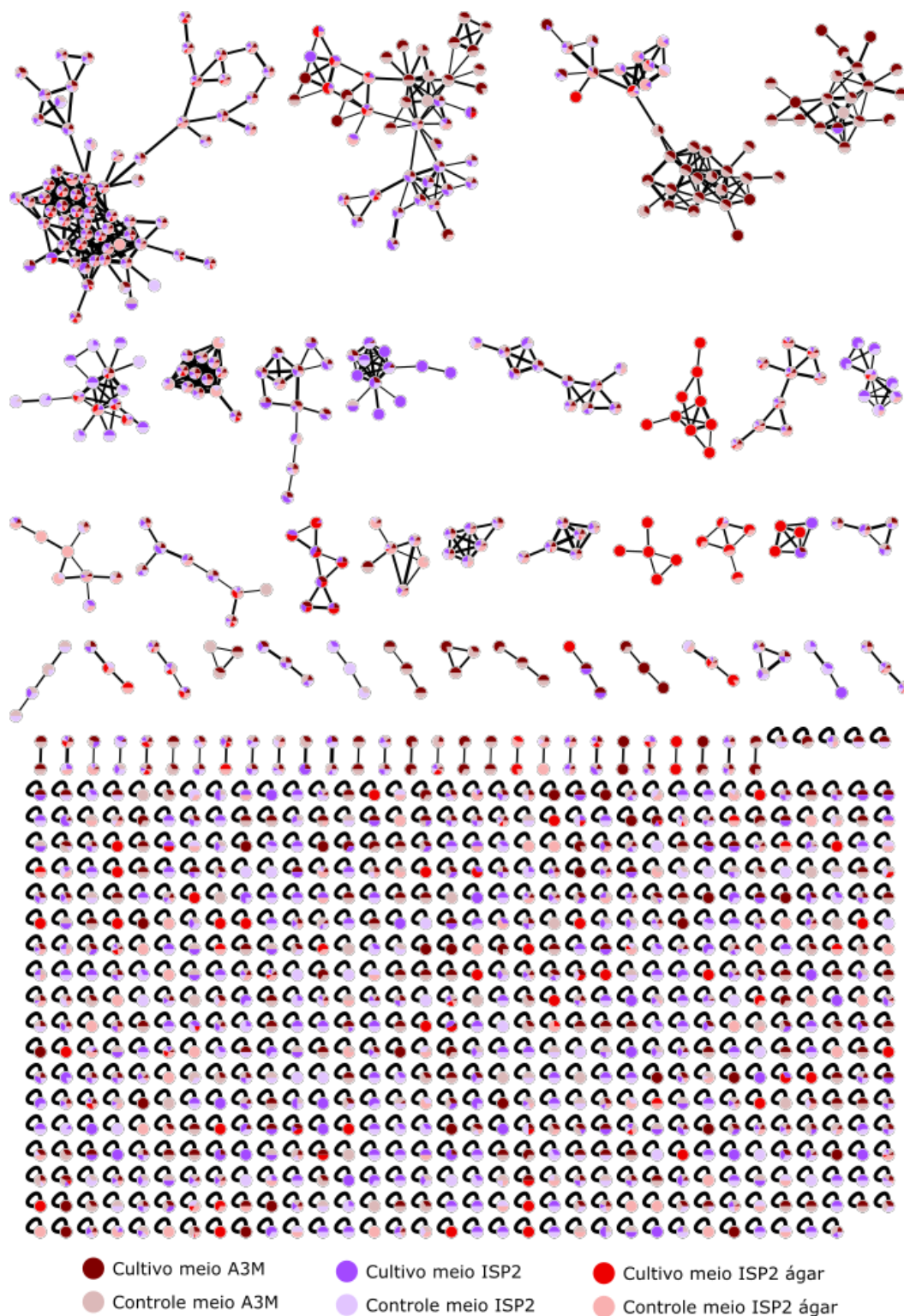
Anexo 6 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **A3M**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.



Anexo 7 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **A1G**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.



Anexo 8 - Cromatograma referente ao extrato do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ICBG311 em meio de cultivo **M9**, e extrações dos íons (EIC) m/z 1463,7721 (**15**), m/z 1479,7715 (**16**) e m/z 1495,7709 (**17**). Destacado em rosa, a região de tempo de retenção referente aos compostos **15-17**.



Anexo 9 - Rede molecular formada através das análises dos dados de LC-MS/MS dos extratos obtidos a partir dos cultivos da linhagem *Streptomyces* sp. ICBG311, nos meios de cultura **A3M** e **ISP2** e **ISP2 ágar**, e seus respectivos controles.