

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências da Saúde

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Streptomyces*
spp. ISOLADOS DE SOLOS DO MARANHÃO**

FLAVIO AUGUSTO BARROS NOGUEIRA

São Luís

2022

FLAVIO AUGUSTO BARROS NOGUEIRA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Streptomyces*
spp. ISOLADOS DE SOLOS DO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valério Monteiro Neto.

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Augusto Barros Nogueira, Flávio.
INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
Streptomyces spp. ISOLADOS DO SOLO DO MARANHÃO / Flávio
Augusto Barros Nogueira. - 2022.
56 f.

Orientador(a): Valerio Monteiro Neto.
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão (UFMA), 2022.

1. Actinobactérias. 2. Atividade antimicrobiana. 3.
Metabolitos Secundários. I. Monteiro Neto, Valerio. II.
Título.

CANDIDATO: **Flavio Augusto Barros Nogueira**

Título da Dissertação: **INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE Streptomyces spp. ISOLADOS DE SOLOS DO MARANHÃO.**

A Banca Examinadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de mestrado, em sessão pública realizada em 30 / 11 / 2022, considerou o(a) candidato(a)

APROVADO(A) (x)

REPROVADO(A) ()

1) Examinador _____



Documento assinado digitalmente
LEONARDO TEIXEIRA DALL AGNOL
Data: 27/09/2023 18:58:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

2) Examinador _____



Documento assinado digitalmente
AFONSO GOMES ABREU JUNIOR
Data: 27/09/2023 13:06:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

3) Examinador _____



Documento assinado digitalmente
EDUARDO MARTINS DE SOUSA
Data: 27/09/2023 11:52:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

4) Presidente _____



Documento assinado digitalmente
VALERIO MONTEIRO NETO
Data: 27/09/2023 08:46:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

“Não temas, porque eu sou contigo;
não te assombres, porque eu sou o teu
Deus; eu te esforço, e te ajudo, e te
sustento com a destra da minha justiça”.

Isaías 41:1

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valério Monteiro Neto, pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação, à minha mãe Silvanda e ao meu pai Augusto, que mesmo distante sempre estiveram perto ligando e me incentivando a ir mais longe. Aos meus amigos do Laboratório pelos conselhos, pela ajuda nos experimentos e pelas palavras de conforto. À Profa. Dra. Maria Rosa que me ajudou muito na parte genotípica. À Universidade Federal do Maranhão. À equipe do Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão, em especial à Profa. Dra. Claudia Quirino por sempre estarem à disposição. À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo incentivo à pesquisa. A todos que estiveram envolvidos na concretização deste projeto, meu muitíssimo obrigado.

LISTA DE ABREVIações

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BTT	Meio de Bennett
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MHA	Mueller-Hinton agar
µg	Micrograma
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PBS	Solução salina-tamponada com fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SAB	Ágar Sabouraud
SFB	Soro fetal bovino
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diâmetro médio dos halos de inibição dos isolados de *Streptomyces* contra as diferentes microrganismos indicadores.....33
- Tabela 2.** Atividade antimicrobiana dos isolados de *Streptomyces* após aquecimento34
- Tabela 3.** Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poços dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. N^o 516 extraídos com diferentes solventes38
- Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *Streptomyces* sp. No. 516 obtidos com diferentes solventes.....39
- Tabela 5.** Compostos identificados no extrato de *Streptomyces* sp. 51639

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evolução da descoberta dos antibióticos, incluindo alguns produzidos por *Streptomyces*. Fonte: De Lima Procópio et al., 2012.....16
- Figura 2.** Ciclo de vida de *Streptomyces* spp.17
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,0% do material genético obtido dos isolados bacterianos amplificados por PCR com os iniciadores específicos da região 16S do rDNA.....30
- Figura 4 -** Árvore filogenética construída pelo Programa Mega 6.0 a partir das sequências obtidas no estudo (em destaque) e sequências de referência do *Genbank*.....32
- Figura 5:** Avaliação da biomassa microbiana (em mg), pH e da atividade antimicrobiana (halo em mm) em diferentes tempos de incubação. A atividade antimicrobiana foi determinada contra *C. albicans* SWSC 5314.....35
- Figura 6:** Análise da influência das condições de cultivo na produção de metabolitos por *Streptomyces* com relação a mudanças no pH e atividade antimicrobiana nos diferentes tempos de incubação em cultivo estático (CE) e em cultivo sob agitação (CA).....37
- Figura 7:** Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de bactérias; (II, 516 *Streptomyces* sp) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo positivo (roxo) – Expansão na região de 0 – 20 min.....40
- Figura 8:** Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de bactérias; (516 *Streptomyces* sp, II) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo negativo (azul); – Expansão na região de 0 – 20 min.....41
- Figura 9 –** Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de 516 *Streptomyces* sp; (I) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo positivo (roxo); (II) – Expansão na região de 50 – 60 min.....41
- Figura 10 –** Compostos identificados nos extratos brutos etanólicos de *Streptomyces* ssp. 516.....42

RESUMO

As investigações focadas em Actinobactérias resultaram na descoberta de muitas drogas antimicrobianas cruciais que ainda salvam inúmeras vidas humanas em todo o mundo. No entanto, o surgimento da resistência aos antibióticos e antifúngicos muitas vezes torna os medicamentos disponíveis ineficazes, sendo essencial a prospecção de novos compostos em novas espécies ou em espécies pouco estudadas de Actinobactérias. Desta forma, este estudo avaliou cinco actinobactérias do solo de três cidades do Maranhão com intuito de investigar a potencial atividade antimicrobiana. Após fermentação e extração dos metabólitos com diferentes solventes, foram realizados ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana, caracterização química e identificação genotípica de cada isolado do solo. Foi observado que os isolados de actinobactéria exibiam atividade antimicrobiana contra uma ou todas as linhagens analisadas, incluindo *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) e contra *Candida albicans* (SWSC 5314). Para os testes de fermentação submersa o cultivo em 96 h em meio Bennett suplementado com 1% de glicose mostrou ser a melhor fonte de carbono para obtenção dos compostos antimicrobianos. A extração dos metabólitos com diferentes solventes, demonstrou um bom espectro de atividade inibitória contra as espécies de *Candida*, principalmente o extrato etanólico da biomassa (Et) do isolado *Streptomyces* sp. N° 516 com valor de CIM de 0,156 mg/mL. Dos cinco isolados, só o N° 220 foi identificado em nível de espécie (*Streptomyces owasiensis*). Os demais foram identificados como *Streptomyces* sp., sugerindo-se que possam ser espécies ainda não conhecidas. Na prospecção química dos extratos brutos da biomassa do isolado 516, foi demonstrada a presença de Desferrioxamina A1, Desferrioxamina B e Ferrioxamina B, os quais são considerados sideróforos ou compostos quelantes de ferro. Outros compostos estavam presentes, mas não foram identificados. Em síntese, os nossos dados demonstram que os microrganismos analisados solo são produtores de compostos antimicrobianos e termoestáveis, com um isolado promissor (No. 516) em termos de produtor de composto antifúngico, aparentemente não conhecido.

Palavras-chave: Actinobactérias; Atividade antimicrobiana; *Streptomyces*; Metabólitos Secundários.

ABSTRACT

Investigations focused on Actinobacteria resulted in the discovery of many crucial antimicrobial drugs that still save countless human lives around the world. However, the emergence of resistance to antibiotics and antifungals often makes available drugs ineffective, making it essential to prospect for new compounds in new species or in poorly studied species of Actinobacteria. Thus, this study evaluated five actinobacteria from the soil of some cities of the State of Maranhão in order to investigate their potential antimicrobial activity. After fermentation and extraction of metabolites with different solvents, assays were carried out to evaluate the antimicrobial activity, chemical characterization and genotypic identification of each soil isolate. The actinobacteria isolates were observed to exhibit antimicrobial activity against one or all strains analyzed, including *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) and against *Candida albicans* (SWSC 5314). For submerged fermentation tests, cultivation in 96 h in Bennett's medium supplemented with 1% glucose proved to be the best carbon source for obtaining antimicrobial compounds. Extraction of the metabolites with different solvents demonstrated a good spectrum of inhibitory activity against *Candida* species, mainly the ethanolic extract of the biomass (Et) of the isolate *Streptomyces* sp. No. 516 with MIC value of 0.156 mg/ml. Of the five isolates, only N^o 220 was identified at the species level (*Streptomyces owasiensis*). The others were identified as *Streptomyces* sp., suggesting that they may be species not yet known. In the chemical prospection of the crude extracts of the biomass of isolate 516, the presence of Desferrioxamine A1, Desferrioxamine B and Ferrioxamine B, which are considered siderophores or iron chelating compounds, was demonstrated. Other compounds were present but not identified. In summary, our data demonstrate that the microorganisms analyzed in the soil are producers of antimicrobial and thermostable compounds, with a promising isolate (No. 516) in terms of producing antifungal compound, apparently not known.

Keywords: Actinobacteria; Antimicrobial activity; *Streptomyces*; Secondary metabolites.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	13
2- REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
2.1- Características gerais das actinobactérias.....	15
2.2 <i>Streptomyces</i>	16
2.3 Identificação das Actinobactérias	18
2.4 Metabólitos produzidos por Actinobactérias	18
2.5 Resistência microbiana	19
3- OBJETIVOS	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos	22
4- MATERIAL E METODOS.....	23
4.1 Obtenção das actinobactérias	23
4.2 Extração do material genético dos isolados	23
4.3 Ensaios de PCR específica, purificação dos produtos amplificados e sequenciamento genômico	23
4.4 Análise Computacional das sequências.....	24
4.5 Microrganismos indicadores utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana	24
4.6 Ensaio em meio de cultura sólido – blocos de gelose	24
4.7 Teste de resistência ao calor	24
4.8 Análise da produção de compostos em meios líquidos.....	25
4.9 Condições de cultivo	25
4.10 Cultivo das Bactérias por Fermentação Submersa (FS).....	26
4.10.1 Fermentação	26
4.10.2 Produção dos extratos Brutos.....	26
4.11 Determinação da concentração mínima Inibitória (CIM).....	27
4.12 Teste de citotoxicidade	29
4.13 Análise estatística.....	29
5- RESULTADOS	30
5.1 Ensaios de PCR Específica e Sequenciamento Genômico	30
5.2 Triagem da Atividade Antimicrobiana dos Isolados de Actinobacterias	32
5.3 Ensaio de Resistência ao calor.....	32

5.4 Atividade Antimicrobiana - Curva de produção de metabolitos	33
5.5 Análise da influência das condições de cultivo na produção de metabolitos.....	34
5.6 Ensaio de extração dos compostos bioativos - Biomassa e líquido metabólico	35
5.7 Concentração Inibitória Mínima das Frações Extraídas dos isolados.....	38
5.8 Prospecção Química	39
6- DISCUSSÃO	43
7- CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	46

1- INTRODUÇÃO

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos representa uma ameaça crescente à saúde do ser humano, contribuindo com os índices elevados de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ROSINI et al., 2020). A pesquisa e o desenvolvimento farmacêutico não têm obtido êxito em atender à necessidade clínica crescente por novos antibióticos (WHO, 2014). Em particular, a necessidade de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para tuberculose tem sido destacado pela OMS há vários anos (WHO, 2016; 2018). Quanto às outras bactérias resistentes a antibióticos, nos últimos 20 anos, apenas duas novas classes de antibióticos (lipopeptídeos e oxazolidinonas) foram desenvolvidas e aprovadas por agências internacionais de medicamentos (*US Food and Drug Administration e European Medicines Agency*) – ambas oferecem cobertura apenas contra bactérias Gram-positivas (LUEPKE et al., 2017). Na realidade, as quinolonas, descobertas em 1962, foram à última “nova” classe de antimicrobianos identificada como ativa também contra bactérias Gram-negativas. Na atualidade, dos 44 novos antibióticos em preparação para uso clínico intravenoso, apenas 15 mostraram alguma atividade contra bactérias Gram-negativas e apenas cinco (todos agentes modificados de classes conhecidas de antibióticos) progrediram para testes de fase 3 (THE PEWCHARITABLE TRUSTS, 2017).

A diminuição do interesse na pesquisa e desenvolvimento de antibióticos das indústrias farmacêuticas, nas últimas décadas, provavelmente está relacionada às dificuldades no desenvolvimento clínico e questões científicas, regulatórias e econômicas. A descoberta de novas classes de antibióticos altamente ativas, com propriedades farmacocinéticas aceitáveis e razoavelmente seguras é complexa. Nesse contexto, o estímulo à pesquisa e ao desenvolvimento de antibióticos tem um papel fundamental no desenvolvimento de estratégias para lidar com a ameaça global de bactérias resistentes a antibióticos (KOSTYANEV et al, 2016).

Alguns microrganismos, incluindo-se bactérias e fungos, têm sido utilizados como fontes de antibióticos, principalmente os do solo (YILMAZ et al, 2006; MÜLLER E WINK, 2014; PIDOT, 2014). Estima-se que apenas 10% dos

isolados microbianos do solo já foram investigados e menos de 1% do número total de compostos foram identificados, o que poderia significar que um grande número dos metabólitos pode ainda ser descoberto e estudado, principalmente entre os microrganismos ainda desconhecidos (WATVE et al, 2001; FISCHBACH E WALSH, 2009).

Dentro do filo Actinobacteria, as espécies de *Streptomyces* de origem terrestre tem sido as principais bactérias produtoras de antibióticos utilizados na indústria farmacêutica; mais de 60% dos cerca de 6.000 compostos com atividade antimicrobiana de origem microbiana são produzidos por membros da família Streptomycetaceae. Conseqüentemente, *Streptomyces* spp. têm sido continuamente estudados como fontes prolíficas de um número maior de novos compostos. No entanto, a descoberta de novas moléculas bioativas produzidas por membros da família Streptomycetaceae, a partir de fontes como o solo, vem diminuindo (QUINN et al., 2020).

Neste cenário em que é essencial a prospecção de novos ambientes como fontes de microrganismos produtores de antibióticos, deve-se levar em consideração a importância da localização geográfica do estado do Maranhão, o qual está situado em uma região de transição entre as regiões Norte e Nordeste do Brasil, com uma variedade de ecossistemas, incluindo florestas de mangue, savanas, restingas, florestas e campos (SPINELLI-ARAÚJO, et al, 2016). Tal variedade de ambientes pode apresentar uma diversidade de microrganismos que são ainda desconhecidos e, portanto, com potencial para produzir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana.

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa identificaram mais de 500 microrganismos isolados de 19 municípios do estado do Maranhão, sendo que desses 5 apresentaram atividade antimicrobiana, mas não se conhece todo o espectro de ação dessa atividade e nem todos foram caracterizados em nível de espécie. Portanto, poderiam representar potenciais produtores de antibióticos ainda não conhecidos.

2- REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1- Características gerais das actinobactérias

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que apresentam uma grande diversidade morfológica e reprodutiva comparados com outros microrganismos Gram-positivos, como o crescimento de forma lenta, contendo um genoma linear rico em CG com um robusto potencial biossintético para produzir metabólitos secundários de ampla diversidade estrutural e importância biotecnológica e comercial (BARKA et al., 2016). A presença dessas bases nitrogenadas pode exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% a mais de 70% em *Corynebacterium* e *Streptomyces*, respectivamente (GOODFELLOW et al., 2012).

Taxonomicamente as actinobactérias constituem um dos principais filos classificados no domínio das bactérias. Esse filo contém 6 classes, 18 ordens, 14 subordens, 63 famílias e 374 gêneros registrados e centenas de espécies (PARTE, 2020). O gênero mais frequente é *Streptomyces*, que são aeróbios obrigatórios comumente encontrados no solo, recebendo uma atenção maior devido à sua ampla diversidade de espécies e de capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos (DONALD, 2022).

Curiosamente, microrganismos que prosperam em ambientes extremos e diversos, incluindo actinomicetos, estão sendo investigados em pesquisas recentes. Esse direcionamento é atribuído ao conjunto de processos fisiológicos que esses organismos exibem como medidas adaptativas à sobrevivência. Assim, tem sido descrita a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários detectados em isolados de *Streptomyces* presentes em ambientes reservados, inexplorados ou extremos (NIKE, 2020).

Desde a descoberta da estreptomicina, um maior número de antibióticos foi introduzido no mercado a partir das pesquisas com actinobactérias, incluindo carbapenêmicos, macrolídeos, ansamicinas, glicopeptídeos e tetraciclina (Figura 1) (JOSE, 2021). O fato de que apenas uma fração dos produtos químicos bioativos desses microrganismos foram descobertos até o momento, justifica a necessidade de continuar sua bioprospecção como a fonte mais promissora de novas moléculas bioativas (VAN DER HEUL et al., 2018).



Figura 1: Evolução da descoberta dos antibióticos, incluindo alguns produzidos por *Streptomyces*. Fonte: De Lima Procópio et al., 2012.

Quando se trata de compostos bioativos produzidos por actinobactérias encontramos antibióticos, agentes antioxidantes, agentes tumorais, compostos anti-inflamatórios, entre outros de grande importância para a indústria farmacêutica (BARKA et al., 2016).

Entre as actinobactérias, o gênero mais estudado é *Streptomyces*. Esse gênero ganha destaque entre as actinobactérias quanto à diversidade da produção de metabólitos bioativos, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasitários, antitumorais, antitrombótico, imunossuppressores e diversas enzimas extracelulares de interesse industrial (LEE et al., 2019).

2.2 *Streptomyces*

Membros do gênero *Streptomyces* são bactérias aeróbias, filamentosas, Gram-positivas, heterotróficas, caracterizadas por crescimento ramificado e formação de micélios aéreos que se diferenciam em cadeias de esporos. São

microrganismos comumente encontrados no solo, porém podem ser isolados de outros habitats como a água do mar (LIPUN, 2020).

Os filamentos de *Streptomyces* normalmente apresentam de 0,5-1,0 μm e geralmente são desprovidas de paredes transversais na forma vegetativa. Os actinomicetos têm uma forma muito peculiar de divisão e crescimento celular. Esses microrganismos produzem micélio, e muitos organismos produtores de micélio eventualmente se reproduzem por meio de esporos. De fato, os actinomicetos são considerados uma forma intermediária entre bactérias e fungos devido às suas características peculiares de crescimento, porém, essa comparação é apenas superficial. Como todas as bactérias, os actinomicetos possuem uma parede celular composta por peptidoglicano e são suscetíveis a agentes antibacterianos (ZHOU, 2014).

A germinação do *Streptomyces* se inicia com a germinação dos esporos (conídios), em resposta nutricional ou estresse produzem hifas aéreas reprodutivas que sofrem divisão celular para formação dos esporos que crescem por toda extensão da ponta e se ramificam pelo solo, à procura de nutrientes (Figura 2). Eles secretam muitas enzimas que quebram polímeros orgânicos insolúveis, incluindo quitina e celulose, em açúcares substituintes para ligação e absorção por vários transportadores (SEIPKE et al., 2012).

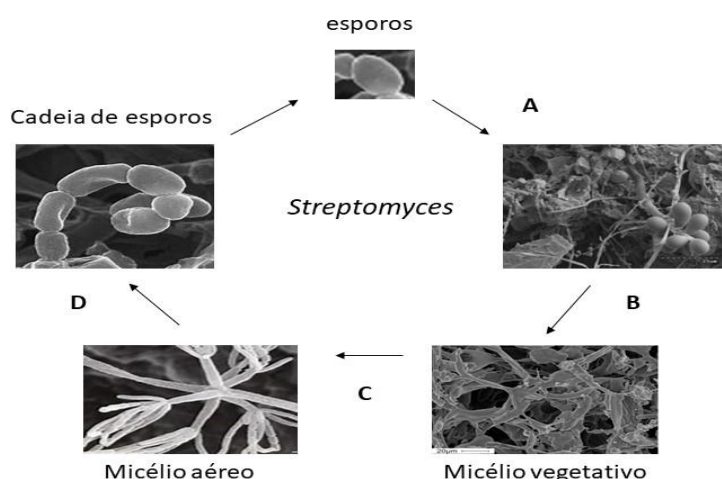


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. A: germinação dos esporos; B: Crescimento do micélio vegetativo; C: Crescimento do micélio aéreo; D: Esporulação. Fonte: McGregor J. F. (1954).

O ciclo de vida de *Streptomyces* é complexo, iniciando-se com a germinação do esporo, dando origem a um micélio vegetativo, que é formado por hifas ramificadas que penetram no substrato auxiliando na metabolização das fontes orgânicas pela ação de enzimas extracelulares (JOSE, 2021). Esse micélio vegetativo (hifas primárias) dá origem ao micélio aéreo (hifas secundárias) que por sua vez, passam por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário, em que são produzidos principalmente antibióticos e pigmentos. A liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento (HWANG et al., 2014).

2.3 Identificação das Actinobactérias

Os actinomicetos podem ser identificados por análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. Neste caso, as técnicas moleculares mais utilizadas incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de regiões intergênicas, que ajudam a identificar muitas espécies de microrganismos e suas relações filogenéticas (STRINGARI, 2004).

O sequenciamento de regiões intergênicas 16S - 23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes rDNA da subunidade menor dos ribossomos (16S rRNA) de todas as bactérias e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas que são espécie-específicas. A molécula de 16S rRNA é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação. A amplificação, por PCR, de sequências de DNA complementares a sequências variáveis do 16S rDNA de um microrganismo desconhecido e sua comparação com sequências variáveis do 16S rRNA de espécies conhecidas, fornece informação suficiente para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou colocá-lo em uma nova espécie (LIMA, 2021).

2.4 Metabólitos produzidos por Actinobactérias

O perfil metabólico deste filo é muito diversificado, e muitos organismos pertencentes a ele têm a capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários quimicamente diversos. Eles são conhecidos por

produzir moléculas bioativas com propriedades antitumorais, anti-inflamatórias e antibacterianas e, portanto, desempenham um papel importante nas indústrias farmacêutica e de biotecnologia (PATZER, 2010).

Apesar de todo esse potencial para produção de compostos bioativos, o filo Actinobacteria ainda não foi explorado ao máximo quanto a sua capacidade de produzir tais compostos. Com o emprego de técnicas moleculares, como o sequenciamento completo de genoma, foi possível observar que, em algumas espécies de certos gêneros desse filo, existe um potencial muito maior do que o já observado com o uso de técnicas de cultivo usuais (CRUZ-MORALES, 2015). E os microrganismos do solo têm sido muito importantes na descoberta de novos antibióticos, sendo que o número de espécies de microrganismos no solo variadiretamente com as condições ambientais como a disponibilidade de nutrientes, textura do solo e tipo de vegetação (ARASU et al., 2009).

A maioria das moléculas orgânicas que são produzidas por microrganismos são metabólitos secundários e estes apresentam diferentes estruturas químicas, assim como atividades biológicas variadas (BERVANAKIS, 2008). Esses compostos podem ser peptídeos, policetídeos, carboidratos, lipídeos, terpenoides, esteroides, alcaloides, entre outros (O'BRIEN, 2011).

Entre os metabólitos mais conhecidos produzidos por actinomicetos está a anfotericina B, que possui propriedades antifúngicas. A anfotericina B é um antimicrobiano polieno com amplo espectro de atividade, mas também com muitos efeitos colaterais que limitam seu uso clínico (SOLECKA et al., 2012). Existe uma variedade de antibióticos muito importantes produzidos por actinomicetos, como tetraciclina, eritromicina, vancomicina e estreptomicina, além de outros compostos com efeitos diferentes que também são de importância clínica (WEBER et al., 2014).

2.5 Resistência microbiana

O aumento considerável nos índices de resistência microbiana aos antimicrobianos convencionais disponíveis vêm se tornando um problema de saúde global gerando um impacto negativo sobre o tratamento de várias doenças infecciosas bacterianas e fúngicas (VISWANATHAN et al, 2009; WALKER et al, 2013; LIU, et al, 2012; MURRAY et al., 2022). Esse aumento é um fator

importante para a elevação dos índices de mortalidade, além de dificultar a resolução da infecção o que eleva os gastos com a assistência à saúde (LIU, et al, 2012; MURRAY et al., 2022).

Entre os fatores que contribuem de forma direta e indireta para o aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos estão os fatores socioeconômicos e políticos, bem como o acesso inadequado aos antibióticos. Adicionalmente, o uso indiscriminado dessas drogas na medicina humana e veterinária é também responsável por promover uma pressão seletiva elevada sobre os microrganismos, aumentando a sua resistência aos antimicrobianos atualmente disponíveis, resultando na necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas (BARROS et al, 2012; BLAIR et al., 2015; FAUCI; MARSTON, 2014, VENTOLA, 2015).

Neste contexto, ressalta-se o aumento na prevalência de infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, entre outras bactérias responsáveis pela maior parte dos casos de infecções em pacientes internados em unidades de terapia intensiva e outras infecções hospitalares (WHO, 2019).

O genoma bacteriano tem fácil adaptação a novos ambientes e possuem mecanismos de defesa sob o estresse de antibiótico, como mutações, transferência de genes, rearranjo genômico e a recombinação, tendo estas características relacionadas à evolução microbiana. A compreensão de como as bactérias desenvolvem ou adquirem genes de resistência a antibióticos tem um papel crítico no desenvolvimento de proposições para combater esses patógenos e na busca de novas drogas (PONTES et al., 2018).

Além das bactérias, os fungos do gênero *Candida* causam infecções que afetam especialmente indivíduos imunocomprometidos, crianças, idosos, indivíduos hospitalizados (PAPPAS et al, 2018). Fatores como o uso de drogas imunossupressoras, antibióticos de amplo espectro e agentes antifúngicos para profilaxia aumentaram o número de pacientes suscetíveis a doenças oportunistas por *Candida*, particularmente as causadas por espécies não *albicans*, como *C. krusei* e *C. parapsilosis* (PEDROSO, 2019; DÍAZ-GARCÍA, et al., 2021). Dessa forma, a importância da descoberta e o desenvolvimento de novos antimicrobianos é extremamente necessário, para combater os

patógenos resistentes emergentes (HUANG et al., 2012).

Desta forma, considerando a contínua elevação da prevalência de bactérias e fungos resistentes às drogas convencionais e que o gênero *Streptomyces* apresenta um grande potencial para a prospecção de novos compostos antimicrobianos, este estudo visou a investigação da atividade antimicrobiana de cinco actinobactérias previamente isoladas de amostras de solos de três municípios do Estado do Maranhão.

3- OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a caracterização da atividade antimicrobiana de isolados de *Streptomyces* detectados em solos do Maranhão.

3.2 Específicos

- ✓ Realizar a identificação bacteriana através de testes moleculares para a caracterização em nível de espécie;
- ✓ Determinar o espectro de ação da atividade antimicrobiana dos isolados do solo;
- ✓ Verificar a influência das condições de meios de cultura na produção de compostos antimicrobianos;
- ✓ Realizar a caracterização química dos extratos com melhor atividade antimicrobiana.

4- MATERIAL E METODOS

4.1 Obtenção das actinobactérias

Foram analisadas cinco actinobactérias do gênero *Streptomyces*, isoladas de solos do Estado do Maranhão, sendo as amostras N° 216, 219 e 220 oriundas de solos da cidade de Morros localizada na latitude -2.85379 e longitude -44.0357; N° 430 da cidade de Matinhas localizada na latitude -3.09849 e longitude -45.035 e a de N° 516 isolada da cidade de Vitoria do Mearim que fica localizada na latitude -3.45125 e longitude -44.8643 (MOREIRA, 2015). As bactérias isoladas foram armazenadas em caldo BHI com 20% de glicerol e armazenadas a -20°C no Núcleo de Imunologia Básica (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.2 Extração do material genético dos isolados

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído com o kit de extração MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit (PROMEGA, USA) seguindo-se as recomendações do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em Nanodrop (ND1000 -Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e estocados a -20°C até a sua utilização.

4.3 Ensaios de PCR, purificação dos produtos amplificados e sequenciamento genômico

As amplificações por PCR específica foram feitas em termociclador Mycycler Biorad modelo 580BR3578, num volume de 50 µL contendo, 10 picomoles de cada iniciador universal para a região 16S do DNA ribossomal: FW 27 - 5' AGTTTGATCCTGGCTCAG -3' e 1492 RV - 5'-ACCTTGTTACGACTT-3' (EDEN et al., 1991), acrescidos de 25 µL de PCR Master Mix - Promega® (*Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, tampão de PCR [pH 8,5]), 100 ng do DNA molde e água livre de nuclease para completar o volume final. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94 °C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 1,5 minutos, 52 °C por 1,5 minutos e 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C

por 10 minutos. Para a determinação do perfil molecular foi feita eletroforese em gel de agarose 1%, onde em cada canaleta foi aplicado 8 μ L do produto amplificado, em tampão TBE 0,5X a 85 mV durante 1 hora. Em seguida o gel foi corado com Brometo de etídio (0,5 mg/mL) e o produto amplificado foi visualizado em transiluminador de UV, conforme previamente descrito (MANIATS; FRITCH; SAMBROOK, 1989). Como padrão comparativo para a confirmação do tamanho do produto amplificado utilizou-se, durante a eletroforese, o marcador de tamanho molecular de 100 pb DNA *Ladder* (Promega®, USA, com fragmentos de 100 a 1500 pares de base).

O restante dos produtos amplificados foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA), seguindo-se as orientações do fabricante. Em seguida, foi feita a quantificação de 1 μ L em Nanodrop (ND1000 -Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

A reação de sequenciamento de cada produto purificado foi feita pelo método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER; NICKELLEN; COULSON, 1977), em ambas as direções da dupla fita (senso positivo e senso negativo) com o “Kit ABI Prism BigDye” no sequenciador automático ABI3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas pelo menos duas vezes em cada sentido da fita perfazendo um total de quatro sequências da mesma amostra. Todos os sequenciamentos foram feitos na Fundação Rene Rachou (FioCruz-MG) sediada em Belo Horizonte-MG.

4.4 Análise Computacional das sequências

Para verificar a qualidade das sequências os eletroferogramas obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados no programa de dados ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A similaridade entre as sequências foi verificada com o auxílio do programa BLASTn do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL et al., 1997), de onde foram selecionadas sequências da região 16S de diferentes espécies bacterianas análises comparativas pelo programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.5 Microrganismos indicadores utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana

Para determinar a atividade antimicrobiana dos isolados, foram utilizadas as seguintes linhagens de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Listeria monocytogenes* ATCC 25923, *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 700084), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida albicans* (SWSC 5314), *Candida krusei* (ATCC6258) e *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019). Suspensões padronizadas de cada microrganismo foram feitas em solução salina estéril de acordo com o tubo N°. 0,5 da escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para realização dos testes antimicrobianos.

4.6 Pesquisa de atividade antimicrobiana em meio de cultura sólido

Para o ensaio em meio sólido, o teste de atividade antimicrobiana foi realizado segundo o “método do bloco de gelose”, descrito previamente (ICHIKAWA; DATE; ISHIKURA; OZAKI, 1971). O microrganismo testado foi semeado de forma a se obter crescimento confluyente. As actinobactérias foram semeadas em Agar Bennett e incubados a 28 °C, por 10 dias. Após incubação, blocos circulares, com 9 mm de diâmetro, foram retirados com o auxílio de um furador estéril da área de crescimento confluyente das actinobacterias e transferidos para placas de Petri previamente inoculadas com os microrganismos indicadores, em suspensão padronizadas de acordo com a escala de McFarland nº 0,5. Os microrganismos indicadores foram semeados na superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller- Hinton (para as bactérias) ou em ágar Sabouraud (para os fungos).

4.7 Teste de resistência ao calor

Para avaliar se o composto bioativo era resistente ou não ao calor, blocos de 9 mm de diâmetro foram submetidos à fervura em microtubos, durante 10 minutos. Após a solidificação do ágar, os blocos foram depositados com o auxílio de uma alça descartável, na superfície do ágar Mueller-Hinton (para bactérias) e do ágar Sabouraud (para fungos). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24h. Os testes foram considerados positivos quando continuava a haver a formação de halo de inibição em torno dos blocos após a ebulição (ICHIKAWA; DATE; ISHIKURA; OZAKI, 1971).

4.8 Análise da produção de compostos em meios líquidos

Foi realizada uma análise da produção da atividade antimicrobiana em meios líquido, comparando-se o cultivo estático e o cultivo com aeração. Os isolados foram cultivados em meio líquido e sob diferentes condições nutricionais. O teste foi realizado com os seguintes meios de cultivo:

- Meio Bennett (MB) (peptona 2g/L, extrato de carne 1g/L e extrato de levedura 1g/L).
- Meio Bennett + Amido 10g/L (MBA).
- Meio Bennett + Glicose 10g/L (MBG).

Os três meios foram inoculados com a linhagem de *Streptomyces* selecionada e colocados em agitador orbital com uma velocidade 142 rpm. Em paralelo, foi realizada a cultura em meio Bennett, porém sem agitação e em estufa a 30 °C. A produção de compostos antimicrobianos foi avaliada através do método de antibiose em poço contra *C. albicans* (SC 5314). Este cultivo teve como objetivo avaliar a melhor fonte de carbono, quantidade de compostos e com maior velocidade (HECK, 2007).

4.9 Condições de cultivo

Para avaliar as condições ideais de cultivo foi utilizado o método determinado por Riahi et al. (2019) com algumas modificações. O isolado foi

cultivado em caldo Bennett (BTT) à temperatura de 30 ± 2 °C por 96 h, sob agitação constante de 142 rpm. A atividade antimicrobiana, o pH e a biomassa (massa seca) foram avaliadas a cada 24 horas. Para este ensaio de atividade antimicrobiana foram utilizados os microrganismos testes. Cultivo das Bactérias por Fermentação Submersa (FS)

4.10.1 Fermentação

Após cultivo de *Streptomyces* sp. por 10 dias, em meio sólido, nove blocos de 9 mm de diâmetro foram obtidos e utilizados para inocular 50 mL de Meio Bennett (BTT) (peptona 2 g/L, extrato de carne 1 g/L e extrato de levedura 1g/L + Glicose 10g/L) e incubar a 27 °C a 30 °C por 48h, sob agitação (180 rpm). Em seguida 5 ml de cada cultura foi utilizado para inocular frascos Erlenmeyers de 125 mL, de modo que preencha 30% da capacidade total do mesmo e cultivados nas mesmas condições de rotação e temperatura por 7 dias (LYRA, 1964).

4.10.2 Produção do extrato bruto

Após o período de fermentação, a fase líquida foi separada do micélio formado por meio de filtração a vácuo. Após a filtração do micélio, o material presente na parte líquida foi extraído duas vezes por meio de uma partição líquido/líquido com 30 mL acetato de etila (AcOEt) e 30 mL de hexano P.A. e filtrado com sulfato de sódio (Na_2SO_4). Após a extração rotativa a vácuo, a fase acetato de etila foi armazenada e a fase hexânica concentrada em frascos previamente pesados e codificados para posterior fraconamento.

Ao micélio, foram adicionados 30 mL de Etanol em cada uma das triplicatas e submetidos a banho ultrassônico por 15 minutos para penetração do solvente no micélio. Após esse período, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. Em seguida, os extratos foram ressuspensos em 20% dimetilsulfóxido (DMSO) e 80% da solução (PBS) e testados pelo método de agar difusão em poços para verificar sua atividade antimicrobiana (LYRA, 1964).

4.10 Determinação da concentração mínima Inibitória (CIM).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplaca de 96 poços com os extratos dos isolados de actinobactérias seco foram ressuspensos em 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 80% da solução (PBS). As suspensões bacterianas e fúngicas foram padronizadas em solução de salina estéril, de acordo a escala Nº 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) feitas a partir de culturas de 20 h de incubação, a 37 °C, em ágar Mueller-Hinton para bactérias e ágar Sabourard para fungos. Em seguida, foi avaliada por leitura espectrofotométrica (600 nm) para confirmação da concentração de microrganismos. Para uso da diluição a 1:10 em caldo Mueller-Hinton, resultando em uma suspensão com $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, utilizada nos testes. Aos poços das placas foram adicionados 100 µL de caldo MH contendo a suspensão bacteriana diluída, e 100 µL de Meio (RPMI) para suspensão dos fungos e mais 100 µL dos extratos, a microplaca foi então incubada em estufa a 37 °C por 24 h. Os testes foram feitos em triplicata. Foram utilizados como controles: poços com inóculo e meio de cultura (crescimento bacteriano e fúngico); com o solvente, meio de cultura e inóculo; apenas com o meio de cultura (esterilidade) e como controle positivo para os ensaios com fungos foi utilizado Fluconazol (2 µg/mL) e Rifampicina (4 µg/ml) para o ensaio com as bactérias. A inibição do crescimento bacteriano e fúngico foi evidenciada pela ausência de turbidez e pela coloração utilizando resazurina a 0,03%, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) como a menor concentração do metabólito microbiano capaz de inibir mais de 90% do crescimento (HAWSER; ISLAM, 1999).

4.11 Prospecção Química

A separação e identificação do extrato foi analisado utilizando-se um sistema de cromatografia líquida Shimadzu Prominence com duas bombas injetoras automáticas Shimadzu LC-20AD (SIL-20A HT). Uma coluna C18 Phenomenex Gemini (250 x 4,6mm – 5 µm) foi utilizada nas análises. A fase móvel foi água ultrapura acidificada (HCOH a 0,1%) e metanol grau de HPLC, também acidificado (HCOH a 0,1%), a uma vazão de 1,0 mL/min, com gradiente de metanol: metanol de 20-100% em 0-35 min e 100% em 50 min) ou no modo íon do produto (m/z 50-500, 50-330) da ionização negativa. O LC foi

acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon X, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por eletrospray (ESI) e analisador do tipo ion-trap (IT) em modo negativo, sob as seguintes condições: tensão capilar de 5 kV, temperatura capilar 325 °C, fluxo de gás de arrastamento (N₂) 12 L/min, pressão do nebulizador de nitrogênio a 10 *psi*. A faixa de aquisição foi de *m/z* 100–1500, com dois ou mais eventos. (LECH, 2014). As análises ocorreram no Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão.

Análises estatísticas

Student (dois grupos). Foram considerados como significativos os valores de $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 7.0).

RESULTADOS

5.1 Ensaios de PCR Específica e Sequenciamento Genômico

Os resultados da amplificação por PCR com os iniciadores específicos para a região 16S rDNA que amplificam um fragmento de aproximadamente 1.542 pares de base, para cada DNA extraído dos isolados bacterianos oriundos do solo estão mostrados na Figura 3. Esses produtos de amplificação foram sequenciados.

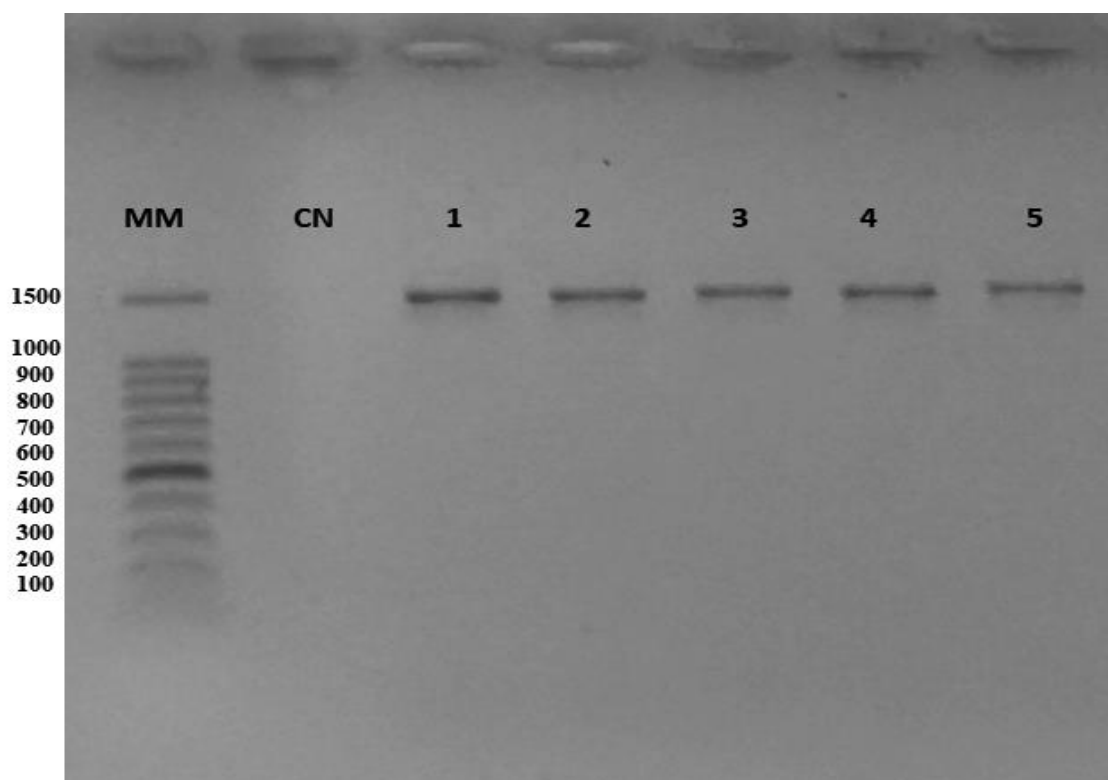


Figura 3. Perfis eletroforéticos em gel de agarose 1,0% do material genético obtido dos isolados bacterianos amplificados por PCR com os iniciadores específicos da região 16S do rDNA. MM: 100 pb marcador de tamanho molecular (Promega, USA), Canaletas 01 a 05, perfis obtidos por PCR para os isolados 216, 219, 220,430 e 516, respectivamente. CN= controle negativo dos reagentes utilizados na amplificação.

As sequências gênicas obtidas foram analisadas no programa BLASTn para a busca de similaridade genética, que identificou como *Streptomyces owasiensis* o isolado 220, com similaridade de 99.03%, os demais foram identificados apenas em nível de gênero como *Streptomyces* sp., os quais apresentaram similaridade gênica variando de 99.13 a 100% para o gênero, sem proximidade a uma espécie conhecida. As sequências obtidas foram

depositadas no Genbank sob número de acesso ON552252, ON552253, ON552254, ON552255 e ON552256. Durante o processo de depósito das sequências no Genbank as três amostras de isolados de solo do município de Morros receberam a seguinte identificação: MoMA216, MoMA219 e MoMA 220. O isolado de Matinha foi nomeado como MaMA430 e de Vitória do Mearim, ViMeMA516.

Para a construção da árvore filogenética (Figura 4) utilizou-se as sequências obtidas no presente estudo (n=5). Como grupos internos de comparação das sequências de referência *Streptomyces* sp. (n=5), *Streptomyces owasiensis* (n=1), *Streptomyces misionensis* (n=3) e *Streptomyces malaysiense* (n=2) existente no Genbank, que foram selecionadas de acordo com a similaridade genética para estas espécies. Como grupo externo (*outgroup*), que funciona como um ponto de comparação genética com o ponto interno, utilizou-se a sequência de *Achromobacter* sp. que também é encontrada em solos.

A história evolutiva entre as sequências foi inferida usando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), o qual formou a árvore consenso inferida a partir de 1000 réplicas – *bootstrap* (Figura 4). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de 2 parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por sítio. A análise envolveu 17 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências. Sendo um total de 1.597 posições no conjunto de dados final.

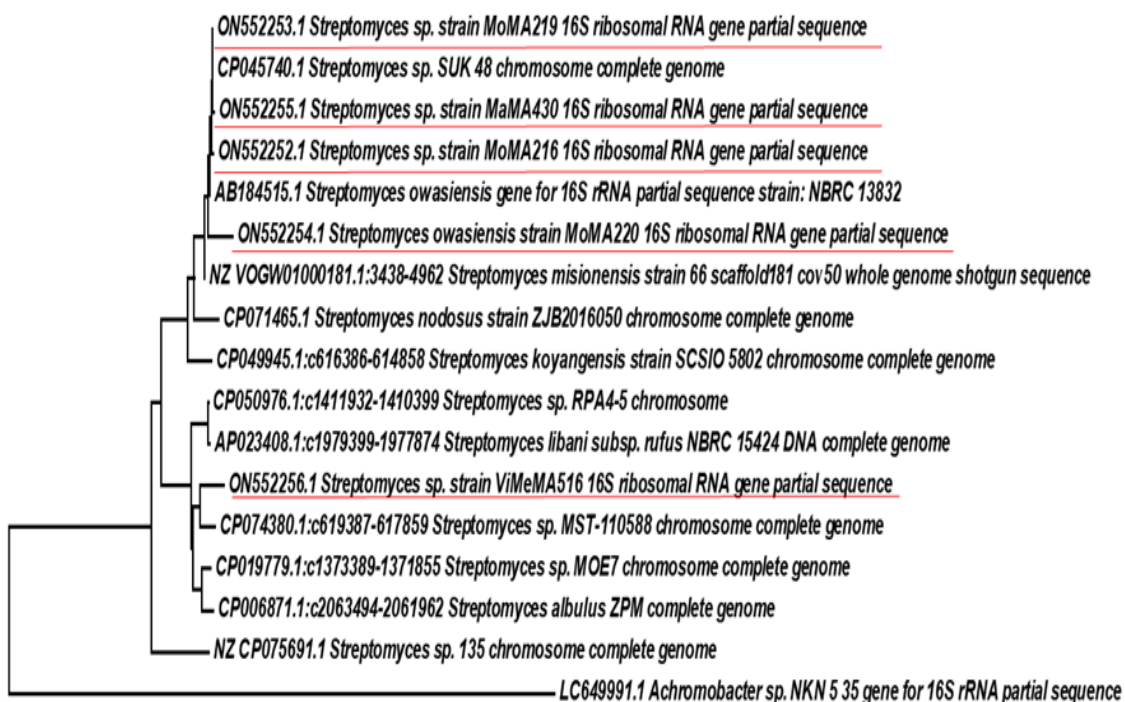


Figura 4 - Árvore filogenética construída pelo programa Mega 6.0 a partir das sequências obtidas no estudo (em destaque) e sequências de referência do Genbank.

5.2 Triagem da Atividade Antimicrobiana dos Isolados de Actinobacterias.

Os resultados mostraram que dos cinco isolados de *Streptomyces*, a amostra 516 apresentou atividade inibitória contra um número maior de microrganismos, uma vez que houve a formação de halos de inibição contra quatro linhagens fúngicas (*C. albicans* SWSC5314, *C. albicans* 90028, *C. parapsilosis* 22019 e *C. krusei* 6558) e uma bacteriana (*M. smegmatis* ATCC 700084). Os halos de inibição variaram de 8 a 18 mm, principalmente para as espécies do gênero *Candida*, sugerindo assim, o grande potencial desta linhagem como produtora de compostos antifúngicos.

Os isolados não foram capazes de inibir bactérias Gram-negativas e a maioria das Gram-positivas. A tabela 1 mostra os isolados com atividade antimicrobiana e os microrganismos inibidos por ele.

Tabela 1. Diâmetro médio dos halos de inibição dos isolados de *Streptomyces* contra diferentes microrganismos indicadores.

Linhagens indicadoras	Halo de inibição em mm (\pm DP)*				
	516	430	220	219	216
Fungos					
<i>C. albicans</i> SWSC5314	18,0 (2,00)	16,5 (2,25)	9,6 (1,82)	8,2 (1,64)	8,1 (1,49)
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	11,5 (1,15)	–	–	–	–
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	12,0 (1,73)	9,8 (1,90)	–	–	–
<i>C. krusei</i> 6558	8,6 (1,52)	12,7 (2,14)	–	–	–
Bactérias Gram-positivas					
<i>M. smegmatis</i> ATCC 700084	14,0 (2,50)	–	–	–	–
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	–
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 25923	–	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	–	–	–	–	–
Bactérias Gram-negativas					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	–

*Os dados mostrados correspondem a média \pm desvio padrão de triplicatas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.3 Ensaio de Resistência ao calor

As amostras foram analisadas para estudos posteriores de diferentes aspectos da atividade antimicrobiana, incluindo a estabilidade térmica. Os blocos de gelose com os isolados de *Streptomyces*, após crescimento por 10 dias, foram submetidos à fervura e mostraram grande estabilidade térmica, mantendo 100% da atividade antimicrobiana após a fervura, não havendo diferenças de halos de inibição com os que não foram fervidos, comparando-se aos resultados do ensaio da tabela 1, halos de inibição variando 9,5 a 17 mm mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana dos isolados de *Streptomyces* após aquecimento.

Linhagem indicadora	Halo de inibição em mm (\pm DP)*				
	516	430	220	219	216
<i>C. albicans</i> SWSC 5314	17,0 (1,56)	13,5 (0,97)	9,0 (0,00)	8,5 (2,64)	9,5 (0,70)
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	12,6 (1,52)				
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	13,7 (1,44)	8,5 (1,45)			
<i>C. krusei</i> ATCC 6558	8,5 (0,70)	12,5 (0,70)			
<i>M. smegmatis</i> ATCC 700084	13,0 (1,70)				

*Os dados mostrados na tabela 2 correspondem à média \pm desvio padrão de triplicatas. Fonte: elaborado pelo autor (2022)

5.4 Curva de produção de metabólitos antimicrobianos

Foi investigada as melhores condições de crescimento do isolado 516, bem como o melhor tempo para a produção dos metabólitos secundários (Figura 5). Foi observado que o pH diminuiu a cada 24 h de fermentação e atingindo pH 6 após 96 h de cultivo (Figura 5b). O diâmetro dos halos verificados a cada 24 horas possibilitou determinar o melhor tempo de fermentação do microrganismo.

O melhor tempo para produção de compostos bioativos foi de 96 h, onde foi observado o aumento no halo de inibição quando comparado com aos tempos de incubação. A variação nos diâmetros dos halos de inibição do isolado 516 foi de 13 mm em 24h a 20 mm em 96h de incubação (5c)

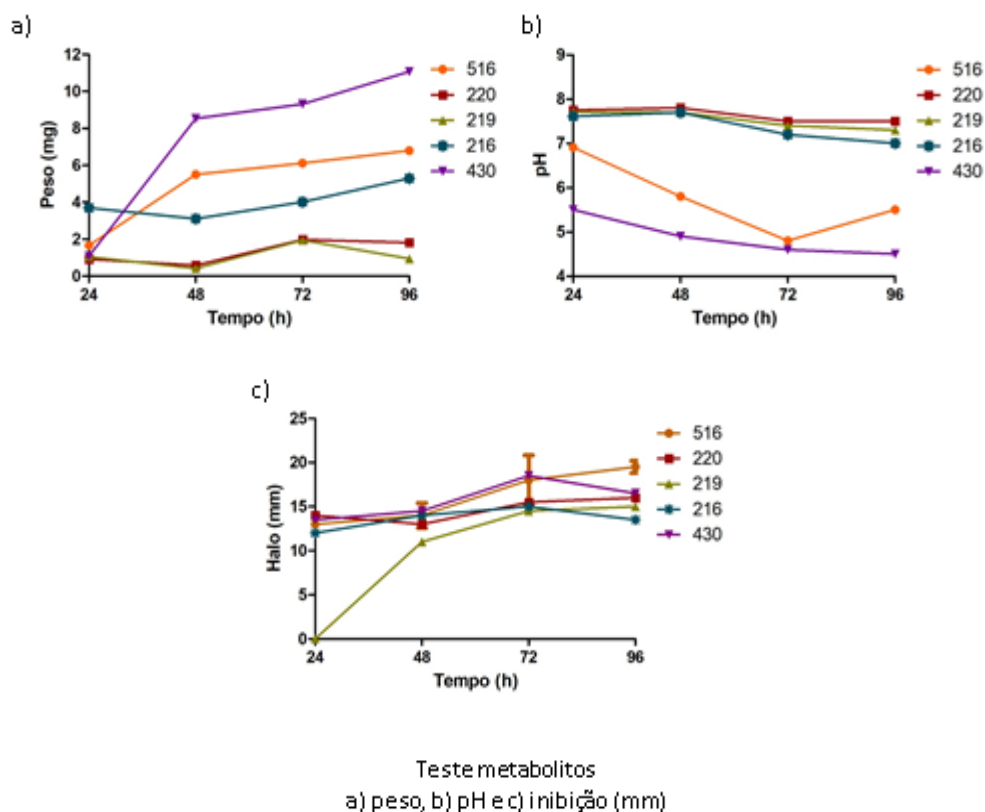
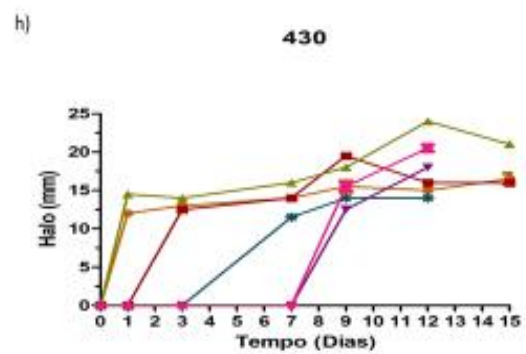
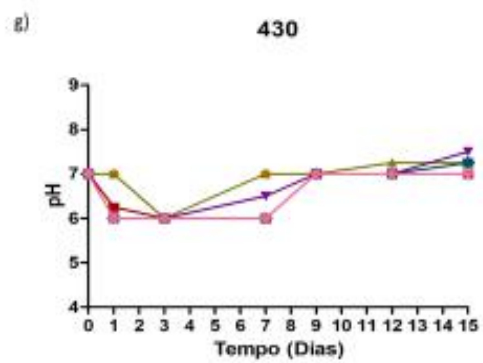
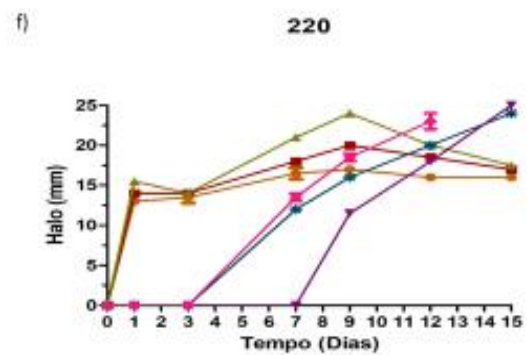
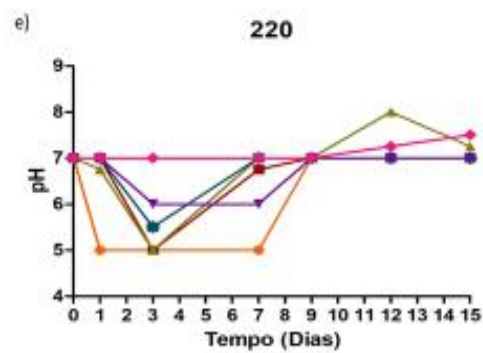
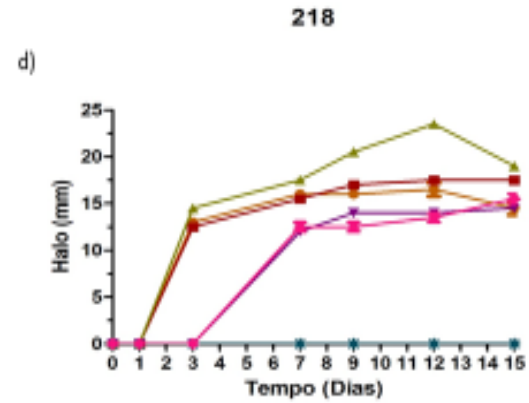
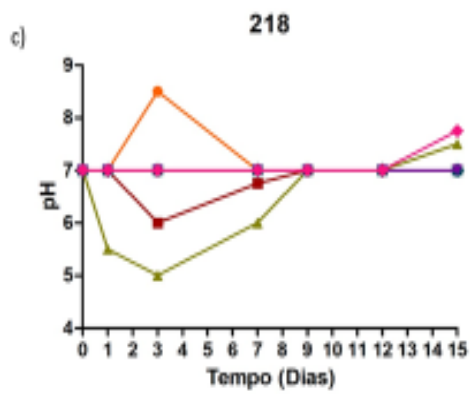
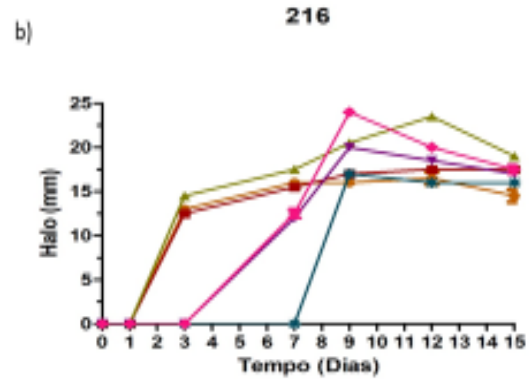
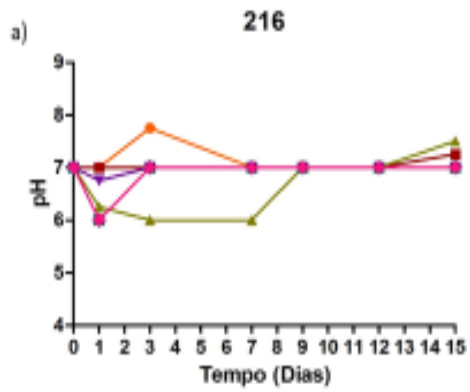


Figura 5: Avaliação da biomassa microbiana (em mg), pH e da atividade antimicrobiana (halo em mm) em diferentes tempos de incubação. A atividade antimicrobiana foi determinada contra *C. albicans* SWSC 5314.

5.5 Análise da influência das condições de cultivo na produção de metabolitos.

Para verificar se uma maior oxigenação da cultura influenciava a produção de compostos antimicrobianos, os isolados foram cultivados com aeração, submetendo-se o cultivo a agitação contínua. Este ensaio demonstrou que o cultivo sob agitação (CA) foi capaz de induzir a produção de metabólitos contra a *C. albicans* SC 5314, com halos de inibição variando de 12 e 15 mm no período de 3 a 9 dias de incubação. Além disso, o meio Bennett + Glicose foi o mais adequado para a produção de metabolitos. Nos cultivos estáticos não foi observada a produção de compostos durante o mesmo período, apenas entre 13 e 15 dias de ensaio. A incubação com pH corrigido entre 7 e 8 resultou em uma maior produção de metabólitos pelos *Streptomyces* testados.



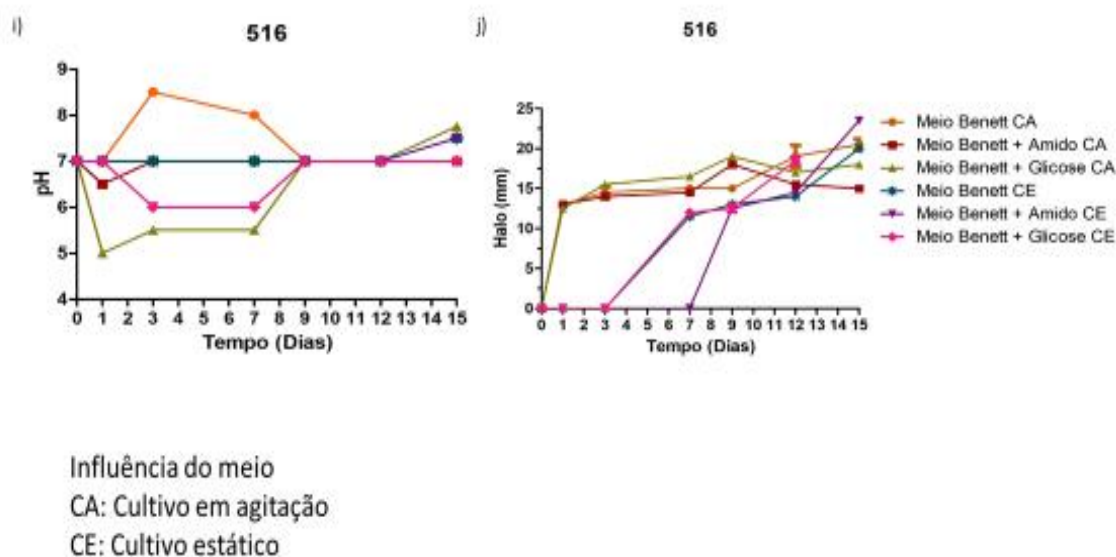


Figura 6: Análise da influência das condições de cultivo na produção de metabolitos por *Streptomyces* com relação a mudanças no pH e atividade antimicrobiana nos diferentes tempos de incubação em cultivo estático (CE) e em cultivo sob agitação (CA).

5.6 Ensaio de extração dos compostos bioativos - Biomassa e sobrenadante da cultura.

Considerando o espectro de ação inibitória e a performance nas diferentes condições de cultivo, a actinobactéria *Streptomyces* sp. 516 foi selecionada para outras análises, o qual incluiu o processo fermentação e extração do composto bioativo da biomassa e do sobrenadante.

Os resultados obtidos mostram que metabólitos bioativos da biomassa dos isolados de *Streptomyces* extraídos com o etanol apresentaram uma atividade antimicrobiana maior contra as espécies de *Candida*. A cepa de *M. smegmatis* analisada só foi inibida na fração hexânica, juntamente com *C. krusei*. Essa fração foi a que apresentou a menor atividade inibitória sobre os microrganismos. Os diâmetros dos halos de inibição variaram de 19,66 mm ($\pm 1,24$) a 21,33 mm ($\pm 0,47$). O extrato obtido com acetato de etila apresentou atividade contra as linhagens de *C. albicans* testadas e a de *C. krusei* (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poços dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. N° 516 extraídos com diferentes solventes.

Linhagens	Zona de inibição em mm (\pm DP)*				
	Etanol	Acetato de etila	Hexano	FLU	RIP
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	19,66 (1,24)	14,66 (0,47)	-	18,4 (0,7)	-
<i>C. albicans</i> SWS 5314	20,33 (0,95)	17,5 (0,88)	-	20 (0,2)	-
<i>C. krusei</i> ATCC 6558	21,33 (0,47)	17,2 (0,56)	12,6 (0,47)	21,2 (0,1)	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	20 (0,81)	-	-	19,5 (0,3)	-
<i>M. smegmatis</i> ATCC 700084	-	-	18 (0,45)	-	26,4 (0,4)

* **FLU** = Fluconazol para controle positivo para testes com fungo; **RIP** = Rifampicina como controle para testes com bactéria. -: não se aplica. Os dados mostrados correspondem a média \pm desvio padrão da triplicata. O dimetilsulfóxido em salina-tamponada com fosfato foi analisado como controle do solvente e não apresentou atividade inibitória. Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

5.7 Concentração Inibitória Mínima das Frações Extraídas dos isolados.

O ensaio de microdiluição com o extrato bruto etanólico da amostra 516 apresentou melhor resultado de CIM comparados aos extratos obtidos com acetato de etila e hexano. Os valores das CIM variaram de 0,156 mg/mL a 3,67 mg/mL, sem demonstrar inibição de *M. smegmatis* ATCC 700084 (tabela 4). Os microrganismos testes escolhidos para a determinação da CIM foram os mesmos utilizados no teste antimicrobiano por difusão em poços.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *Streptomyces* sp. No. 516 obtidos com diferentes solventes.

Linhagens	Extratos em mg/mL			FLU ($\mu\text{g/mL}$)	RIP ($\mu\text{g/mL}$)
	Etanol	Acetato de etila	Hexano		
<i>C. albicans</i> ATCC90028	0,625	7,5	-	2	NA
<i>C. albicans</i> SWS5314	0,156	3,75	-	1	NA
<i>C. krusei</i> ATCC6558	0,312	7,5	0,059	2	NA
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	3,67	-	-	16	NA
<i>M. smegmatis</i> ATCC700084	-	-	34,5	NA	0,312

*FLU = Fluconazol para controle positivo para testes com fungo e RIP = Rifampicina como controle para testes com bactéria; - = ausência de atividade; NA = não se aplica. Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

5.8 Prospecção química

Foi realizada a prospecção química do extrato bruto etanólico da biomassa de *Streptomyces* N° 516, pois os metabólitos deste microrganismo extraídos com este solvente mostrou uma boa atividade antimicrobiana. Alíquotas foram submetidas à análise por cromatografia de UV e de MS/MS. Nos extratos brutos da biomassa, foi possível verificar a presença de Desferrioxamina A1, Desferrioxamina B e Ferrioxamina B (Tabela 5 e figura 13). Contudo, outros compostos foram evidenciados, mas que não foi possível evidenciar a identificação dos mesmos.

Tabela 5 – Compostos identificados no extrato de *Streptomyces* sp. 516

Pico	Tempo de retenção	Nome	Modo de ionização	Fragmentos	Referência
1	3,6	Desferrioxamina B	[M + H] ⁺	MS^2 561/ 443; 401; 361; 319; 243 ; 201 MS^3 561→243/ 243 ; 201 MS^2 319/ 201 ; 153 MS^3 319→201/ 201	(Acquah et al., n.d.; Pluháček et al., 2016; Winkelmann et al., 1999)
2	8,7	Ferrioxamina B	[M + H] ⁺	MS^2 614 / 597; 496; 454;	(Armin et al., 2021; Pluháček et al., 2016;

				414; 314	Winkelman et al., 1999)
				MS² 361/ 342; 243; 201; 165	
				MS³ 361→243/ 243; 201; 165	
3	13,6	Desferrioxamina A1	[M + H] ⁺	547/ 529; 443; 361; 305; 243 ; 201	(Senges et al., 2018)
				MS³ 547→243/ 243; 201; 165	
				MS⁴ 305/ 201	
			[M - H] ⁻	545/ 441; 303 ; 241	-
				MS³ 545→303/ 303 ; 199	
4	14,5	Isômero da desferrioxamina B	[M + H] ⁺	561/ 443; 401; 361; 319; 243 ; 201	-
				MS³ 561→243/ 243; 201; 165	
				MS⁴ 319/ 201	
				MS² 319→201/ 201	
			[M - H] ⁻	559/ 441; 317 ; 199	
				MS³ 559→317/ 317; 199	

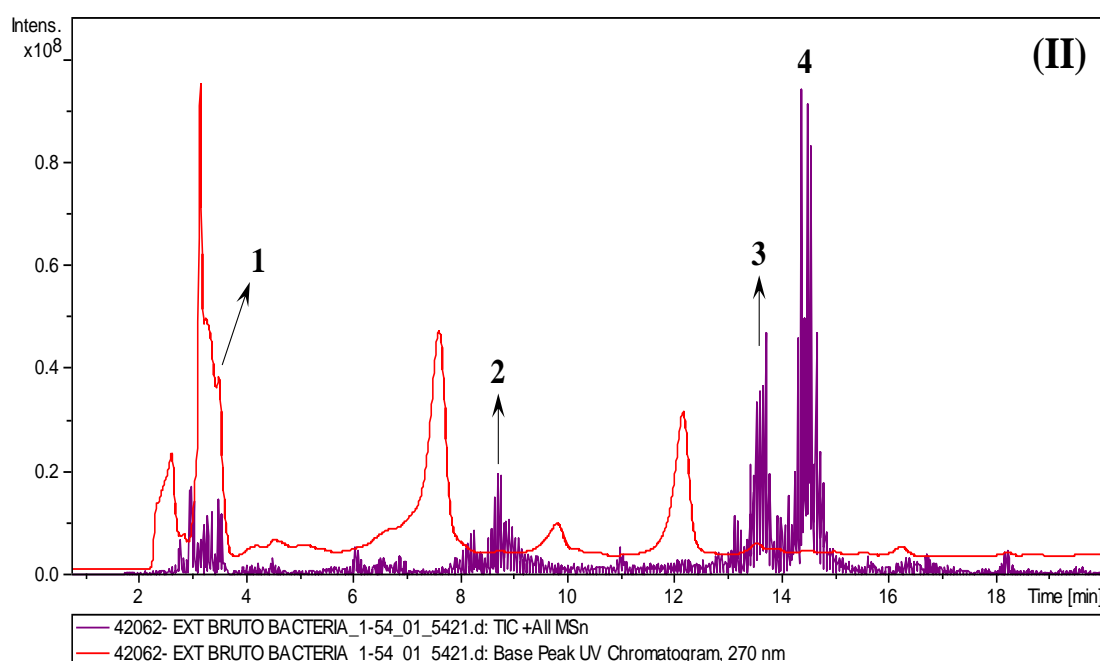


Figura 7 – Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de bactérias; (II, *Streptomyces* sp. 516) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo positivo (roxo); – Expansão na região de 0 – 20 min.

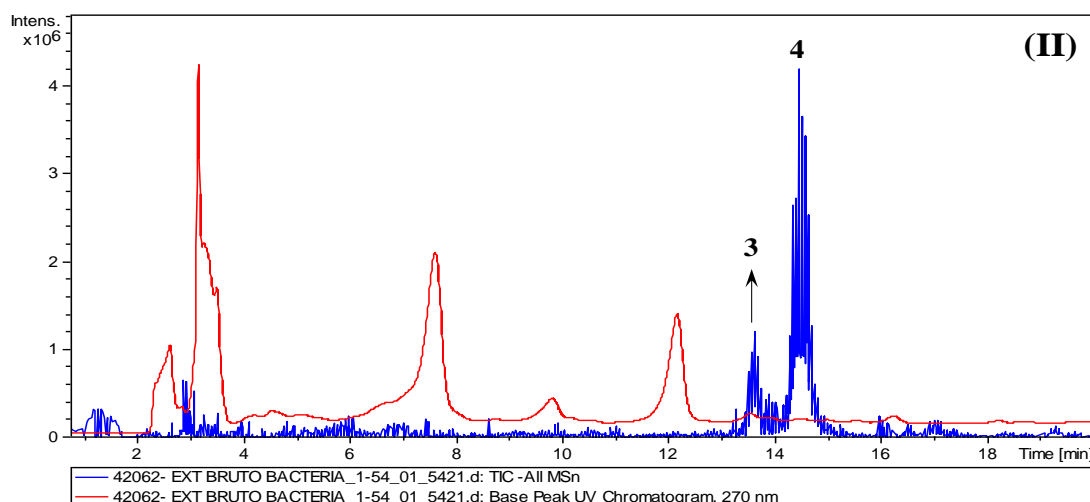


Figura 8 – Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de bactérias; (*Streptomyces* sp 516, II) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo negativo (azul); Expansão na região de 0 – 20 min.

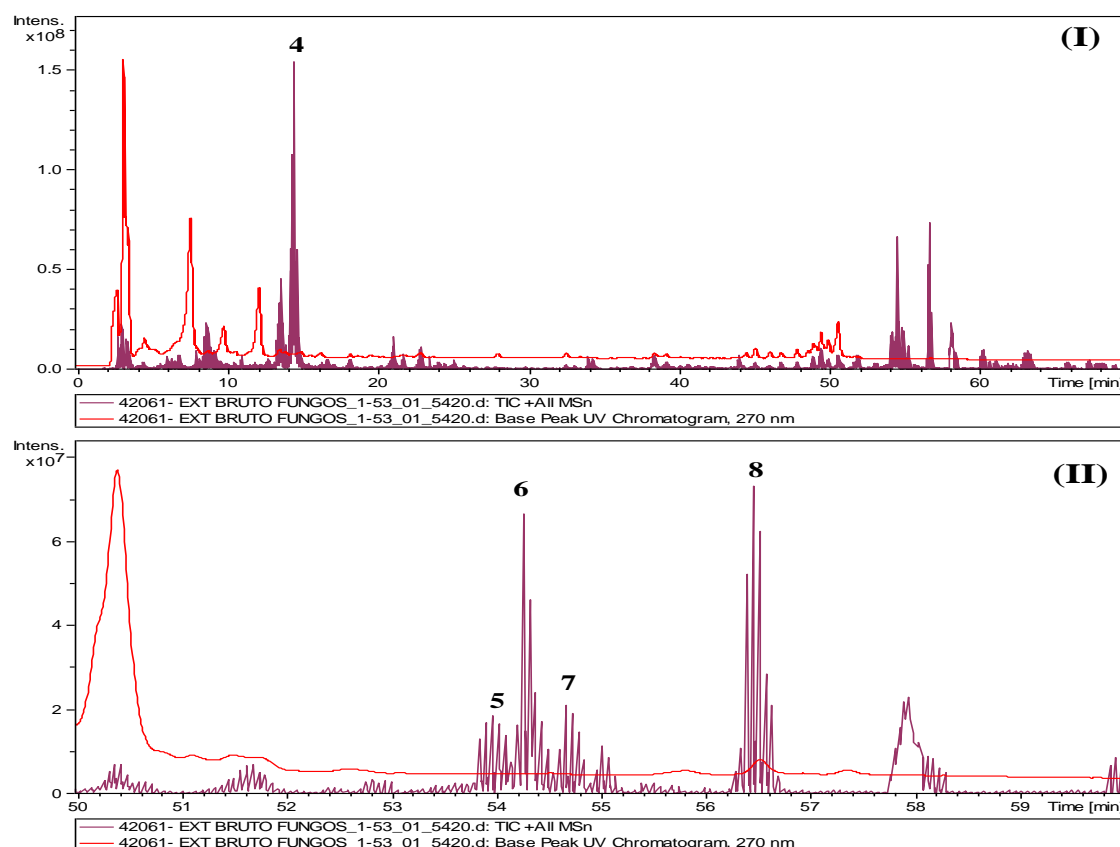


Figura 9 – Cromatograma de UV e de MS/MS do extrato bruto de 516 *Streptomyces* sp; (I) – cromatograma de UV em 270 nm (vermelho) e massas modo positivo (roxo); (II) – Expansão na região de 50 – 60 min.

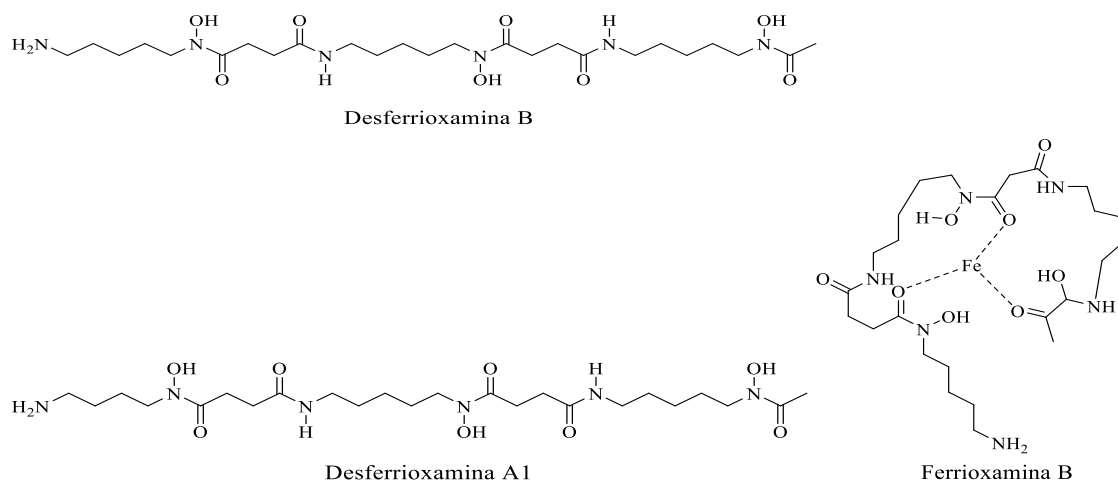


Figura 10. Compostos identificados nos extratos brutos etanólicos de *Streptomyces* spp. 516.

5- DISCUSSÃO

Nos estudos de bioprospecção de novos microrganismos produtores de antimicrobianos tem sido constatado que diferentes ambientes, especialmente marinhos e desérticos, abrigam actinomicetos que são fontes de compostos bioativos potentes (VALLI et al. 2012; NITHYA et al. 2018). O mesmo pode ser dito de lagos, onde os actinomicetos já foram investigados por seus compostos bioativos (GEBREYOHANNES et al. 2013).

Este estudo foi realizado para avaliar o potencial antimicrobiano de Actinobactérias de solos do Maranhão e identificar os isolados em nível de espécie. Principalmente, porque o Estado do Maranhão apresenta uma ampla diversidade de ecossistemas, com condições climáticas bem variadas (SPINELLI-ARAÚJO, et al, 2016). Tais aspectos poderiam refletir uma possibilidade de detecção de microrganismos produtores de antibióticos ainda não conhecidos. De fato, Moreira (2015), em seu estudo prévio, relatou que, de 599 microrganismos isolados de solos do Maranhão, 95 (15,9%) tinham o potencial de exibir atividade antimicrobiana contra pelo menos um microrganismo. Nesse estudo, cinco actinobactérias, que não tinham sido identificadas em nível de espécie, foram selecionadas para uma investigação mais detalhada na expectativa de que poderiam ser espécies novas, o que implicaria em um potencial elevado de produção de novos compostos antimicrobianos.

Dos cinco microrganismos, apenas o isolado 220 foi identificado como uma provável de espécie, *Streptomyces owasiensis*, com similaridade 99.03% da região 16S DNA. Esse microrganismo já tinha sido descrito previamente por Nascimento et al. (2014) a partir de isolamento de solo da região Amazônica. Segundo esses autores, a espécie *S. owasiensis* foi capaz de produzir quitinase, com diversas aplicações, incluindo o isolamento de protoplastos de fungos e leveduras, biocontrole de fungos, no tratamento de resíduos contendo quitina e no controle da transmissão da malária. Por outro lado, neste estudo, o isolado 220 teve atividade inibitória apenas contra *C. albicans*. Os demais isolados não apresentaram similaridade elevada (> 97%) com sequências de alguma espécie de *Streptomyces* depositadas no GenBank.

Dos quais quatro isolados não identificados, o 516 apresentou atividade inibitória contra uma variedade maior de microrganismos, incluindo todas as espécies de *Candida* avaliadas, bem como contra *M. smegmatis*. Um aspecto

interessante é que nenhum dos isolados apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas. Provavelmente, porque a membrana externa das bactérias Gram-negativas representa uma barreira importante à penetração de vários agentes antimicrobianos (GUIMARÃES; MONESSO; PUPO, 2010).

Na realidade, a atividade antimicrobiana mais restrita ou específica tinha sido descrita na literatura. Aouiche et al (2012) descreveram actinobactéria isolada de uma amostra de solo do Saara na região de Ghardaia (centro da Argélia) e observaram que o isolado PAL111 *Streptomyces ambofaciens*, tinha espectro de atividade antimicrobiana restrito, limitado principalmente contra fungos e bactérias Gram-positivas. Esses achados têm sido corroborados por outros autores (CHAUDHARY et al., 2013; ATTA, 2015; SHRIVASTAVA et al., 2015; DALITZ et al., 2017).

Dependendo da natureza química, compostos antimicrobianos produzidos pelo *Streptomyces* spp. são termoestáveis ou termorresistentes. Essa propriedade é importante, pois impede que seus compostos percam a atividade antimicrobiana diante de uma determinada temperatura elevada e, portanto, possibilitaria uma estabilidade de armazenagem maior. Vale mencionar que os *Streptomyces* desenvolveram estratégias adaptativas específicas para terem sucesso na competição contra outros microrganismos em seu próprio ecossistema (BARKA et al., 2016). Portanto, produzir um composto termoestável seria essencial nesse contexto.

Esse aspecto também é muito importante em termos de produção industrial, sendo necessário conhecer os diferentes fatores ambientais, como pH, temperatura, nutrientes específicos necessários para o preparo dos meios de isolamento (SEIPKE, 2011). Na análise da influência das condições de cultivo na produção de metabolitos, os isolados do solo, tiveram maiores halos de inibição com o meio Bennett + glicose tanto em cultivo estático (CE) quanto em cultivo sob agitação (CA) mostrados na (figura 9). De acordo com Wang (2017), diferentes fontes de carbono têm sido usadas nesses meios de isolamento para *Streptomyces*, incluindo ácido húmico, glicose, dextrose, metanol e amido. As principais fontes de carbono-nitrogênio em meios de isolamento são extratos de carne bovina ou levedura. Fgura (2005) avaliou a atividade antimicrobiana de seu isolado em meio Bennett suplementado com 1% das seguintes fontes de carbono: amido, frutose, glicose, glicerol e sacarose. Obtendo o máximo de atividade no meio suplementado com glicose. Em outro estudo, Sujatha (2005) também utilizou

o meio de cultura sintético como base de estudo para diferentes fontes de carbono e nitrogênio e obteve a produção máxima de metabólitos utilizando glicose, como fonte de carbono e amônio como fonte de nitrogênio.

Após ser submetido à cultura com fermentação, o isolado 516 teve seus compostos extraídos com diferentes solventes. Os resultados obtidos mostraram que os metabólitos bioativos da biomassa desse isolado, os quais foram extraídos com etanol, apresentaram um espectro de ação com atividade inibitória predominante contra as espécies de *Candida* analisadas. Em consonância ao relatado por Lima et al (2021) com *Streptomyces* isolados da região amazônica.

É importante ressaltar que os resultados da CIM dos extratos brutos obtidos neste estudo variaram de 59 µg/mL a mais de 57 mg/mL, dependendo do isolado e do solvente. O que demonstra a necessidade uma adequação dos procedimentos de extração e das condições de cultivo. Por outro lado, demonstra também a possibilidade de obtenção de compostos com potência adequada e perspectivas de aproveitamento industrial, uma vez que foi observada inibição de crescimento de leveduras em concentrações da ordem de µg/mL. Contudo, vários fatores podem afetar a produção de metabólitos em meio de cultura líquido, entre eles estão a composição do meio de cultura, a aeração e a maior facilidade nas condições de crescimento e reprodução (MATSUURA, 2004).

Na prospecção química dos extratos brutos da biomassa do isolado 516, foi demonstrada a presença de Desferrioxamina A1, Desferrioxamina B e Ferrioxamina B, os quais são considerados sideróforos ou composto quelantes de ferro (SANDY; BUTLER, 2009). Esses compostos auxiliam na absorção de metal em ambientes deficientes em ferro e são produzidos por todos os microrganismos (KRAMER, ÖZKAYA, KÜMMERLI, 2020). Desferrioxaminas (DFO) são o grupo de sideróforos mais amplamente observado em *Streptomyces* spp., usado principalmente para eliminação de Fe(III) (SANDY; BUTLER, 2009; SAHA, R. et al., 2013), bem como de alguns outros metais pesados (CASENTINI, PETTINE, 2010; JONES, et al., 2017; NEUBAUER, FURRER, SCHULIN, 2002). Uma vez que a grande maioria dos organismos requer Fe(III) para manter a função adequada da parede celular, eles captam o metal e eliminam outros organismos concorrentes ao indisponibilizar o ferro (SANDY; BUTLER, 2009).

Outros picos indicativos de compostos químicos presentes no extrato analisado do isolado 516 foram evidenciados na análise dos cromatogramas, mas não foram caracterizados quimicamente. Se um ou mais deles correspondem a

compostos antimicrobianos, ainda é prematuro afirmar. Contudo, considerando-se o nível da atividade antimicrobiana evidenciada no extrato (da ordem de $\mu\text{g/mL}$) é muito provável que sim. Desta forma, haveria a necessidade de estudos de análise química mais aprofundada para a sua completa identificação.

6- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

- Dos cinco isolados de *Streptomyces* analisados neste estudo, quatro não foram identificados em nível de espécie e podem representar espécies ainda não descritas ou pouco estudadas na literatura, uma vez que somente a amostra N° 220 foi identificada como *Streptomyces owasiensis*;
- Os isolados produzem metabólitos com atividade antifúngica, uma vez apresentaram atividade antimicrobiana direcionada principalmente às leveduras, particularmente o isolado 516;
- A fermentação em cultivo submerso por 96 h em meio Bennett suplementado com 1% de glicose na temperatura de 30° C representam as melhores condições para obtenção dos compostos antimicrobianos desses isolados;
- Além de compostos antifúngicos, há a possibilidade da produção de metabólitos com atividade contra Micobactérias, uma vez que ocorreu a inibição do crescimento de *Mycobacterium smegmatis* 700084 pelo isolado de *Streptomyces* sp. N° 516;

REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN, Usama Ramadan et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 798-811, 2015.

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

ALVAN, Gunnar; EDLUND, Charlotta; HEDDINI, Andreas. The global need for effective antibiotics—a summary of plenary presentations. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 2, p. 70-76, 2011.

ARASU, M. Valan et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, n. 1, p. 22-28, 2009.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. A new antibiotic and the evolution of resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 12, p. 1168-1170, 2015.

ATTA, H. M. et al. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 360-371, 2015.

BARKA, Essaid Ait et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-43, 2016.

BARROS, L. M. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev Cien Farmac Basica Apl.**, v. 33, p. 429-435, 2012.

BARTON, P.; RILEY, R.J. A new paradigm for navigating compound property related drug attrition. **Drug Discov. Today**, v. 21, p. 72–81, 2016.

BASSETTI, M.; FRANCESCA, G.; MALGORZATA, M. “New Treatment Options against Gram-Negative Organisms. **Critical Care**, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2011.

BECHET, M.; BLONDEAU, R. Iron deficiency-induced tetracycline production in submerged cultures by *Streptomyces aureofaciens*. **Journal of applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 889-894, 1998

CASENTINI, B.; PETTINE, M. Effects of desferrioxamine-B on the release of arsenic from volcanic rocks. *Applied Geochemistry*, v. 25, n. 11, p. 1688-1698, 2010.

CHAUDHARY, Hotam S. et al. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 4, n. 2, p. 118, 2013.

CRUZ-MORALES, P. et al. The genome sequence of *Streptomyces lividans* 66 reveals a novel tRNA-dependent peptide biosynthetic system within a metal-related genomic island. **Genome biology and evolution**, v. 5, n. 6, p. 1165- 1175, 2013. 23.

DALITZ, C. A. et al. Potential for biocontrol of melanized fungi by actinobacteria isolated from intertidal region of Ilha do Mel, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 32-36, 2017.

DEPOORTER, E. et al. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215-5229, 2016.

DÍAZ-GARCÍA, J. et al. Monitoring the epidemiology and antifungal resistance of yeasts causing fungemia in a tertiary care hospital in Madrid, Spain: any relevant changes in the last 13 years? **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. e01827-20, 2021.

DONALD, L. et al. Streptomyces: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. **Microbiology Research**, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022.

EDEN, P. A. et al. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. **International journal of systematic and Evolutionary microbiology**, v.41, n. 2, p. 324-325, 1991.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in medicinal chemistry**, v. 6, p. PMC. S14459, 2014.

FAUCI, A. S.; MARSTON, H. D. The perpetual challenge of antimicrobial resistance. **JAMA**, v. 311, p. 1853-1854, 2014.

FGUIRA, Lilia Fourati-Ben et al. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 341-347, 2005
FISCHBACH, M.A; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**.v. 325, p. 1089-1093, 2009.

FREDRIKSSON, N. J.; HERMANSSON, M.; WILÉN, BM. The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

GEBREYOHANNES, G. et al. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 426-435, 2013.

GOVINDARAJAN, G.; SANTHI, V. S.; JEBAKUMAR, S. R. D. Antimicrobial potential of phylogenetically unique actinomycete, *Streptomyces* sp. JRG-04 from marine origin. **Biologicals**, v. 42, n. 6, p. 305-311, 2014.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. The basic polymerase chain reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 5, p. pdb. prot095117, 2018.

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

GUIMARÃES, Denise Oliveira, et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 2010, 33.3: 667-679.

HAMID, Mohamed E. et al. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from desert and savanna soils in Sudan. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 23, p. 8749, 2020.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 43, n. 3, p. 411-413, 1999

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S**. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

HUANG, X.L.; ZHUANG, L.; LIN, H.P.; GOODFELLOW, M.; HONG, K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.

HWANG, Kyu-Sang et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 255-268, 2014.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia microbiologica**, 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

JONES, K. E. et al. Ti (IV) and the siderophore desferrioxamine B: A tight complex has biological and environmental implications. **Inorganic Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1264-1272, 2017.

JOSE, P. A.; MAHARSHI, A.; JHA, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126708, 2021.

KIMURA, Motoo. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOSTYANEV, T. et al. The innovative medicines initiative's new drugs for bad bugs programme: European public-private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance. **J Antimicrob Chemother.**, v. 71 p. 290–95, 2016.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 152-163, 2020.

KUMAR, P. Saravana; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 30, n. 9, p. 435-446, 2014.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1245, 2001.

LEE, Namil et al. Synthetic biology tools for novel secondary metabolite discovery in *Streptomyces*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 667-686, 2019.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological indentation of Actinobacteria. In: DHANASEKARAN, D AND JIANG, Y. Biochemistry, genetic and Molecular Biology "Actinobacteria – **Basic and Biotechnological Applications**. 2016, p. 59

LECH, Katarzyna; WITKOŚ, Katarzyna; JAROSZ, Maciej. HPLC–UV–ESI MS/MS

identification of the color constituents of sawwort (*Serratula tinctoria* L.). **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 15, p. 3703-3708, 2014.

LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; JÚNIOR, R. C. V.; OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* e as Infecções Hospitalares – Revisão de Literatura. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, p.32-39, 2015.

LIMA, Sandrine Maria Arruda et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of secondary metabolites from *Streptomyces* sp. isolated of the Amazon-Brazil region. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e366101018974-e366101018974, 2021.

LIPUN, Kenika et al. *Streptomyces acidicola* sp. nov., isolated from a peat swampforest in Thailand. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-6, 2020.

LIU, L, et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**,v. 379, p. 2151-2161, 2012.

LUEPKE, K.H. et al. Past, present, and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacother**, v. 37 p. 71–84, 2017.

LYRA, F. D. A. et al. Ciclamicina e ciclacidina, dois novos Antibióticos Produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. **An. Acad. Bras. Cienc**, v. 36,p. 323-334, 1964.

MANIATIS T, Fritch EEF. Sambrook J: Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York. **Cold Spring Harbor Lab.Cold Spring Harbor**.2nd ed. 3 volumes (1989).

MAO, Xiangzhao et al. Effect of copper sulfate on biosynthesis of FR- 008/Candidin complex production in *Streptomyces* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 2033-2039, 2011.

MASETTI, P. **Biocompatibilidade de resinas acrílicas para base e reembasamento de próteses após períodos de imersão em soluções desinfetantes: análise do metabolismo celular**. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Araraquara. 2016.

MATSUURA, Takeshi. **Caracterização taxonômica de actinomicetos endofíticos produtores de antibioticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)**: Takeshi Matsuura. 2004. 55fls. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

MIRHENDI, H., DIBA, K., KORDBACHEH, P., JALALIZAND, N., MAKIMURA K. Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p.1568-1570, 2007.

MOHAMMADIPANAH, Fatemeh; WINK, Joachim. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. **Frontiers in microbiology**, 2016, 6: 1541.

MOHSENI, M. et al. Screening of antibacterial producing actinomycetes from sediments of the Caspian Sea. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 2, n. 2, p. 64, 2013.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; SONIA MAFFIOLI, SOSIO, M.; DONADIO, S.

Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v.7, n. 3, p. 209– 220, 2014.

MORAIS, JANICÉLLE FERNANDES et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Uningá Review**, v. 17, n. 1, 2014.

MOREIRA, I. V. **Detecção de atividade antimicrobiana de microrganismos isolados do solo do Maranhão**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Universidade Ceuma.

MÜLLER, R.; WINK, J. Future potential for anti-infectives from bacteria - how to exploit biodiversity and genomic potential. **Int. J. Med. Microbiol**, v. 304, p. 3-13,2014.

MURRAY, C.J.L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NEUBAUER, U.; FURRER, G.; SCHULIN, R. Heavy metal sorption on soil minerals affected by the siderophore desferrioxamine B: the role of Fe (III)(hydr) oxides and dissolved Fe (III). **European Journal of Soil Science**, v. 53, n. 1, p. 45-55, 2002.

NIKE, A. R., et al. Potentials of Actinomycetes from Reserved environments as Antibacterial Agents Against Drug-Resistant Clinical Bacterial Strains. **Ethiop J Health Sci**, 2020, 30.2: 251.

NITHYA, K. et al. Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphasis on Pyridine-2, 5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7. **Microbiological research**, v. 207, p. 116-133, 2018.

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

PAIVA, D. L.; LAOMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: a Microscale Approach**. 3.ed. Fort Worth: Saunders, 1999.

PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PARTE, A. C. et al. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607, 2020.

PATZER, Silke I.; BRAUN, Volkmar. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 426-435, 2010.36.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos et al. In Vitro and In Vivo Anti-Candida spp. Activity of Plant-Derived Products. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 494, 2019.

PIDOT, S. J.; COYNE, S.; KLOSS, F.; HERTWECK, C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 304, p.14-22, 2014.

PONTES, Daniela S. et al. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and the role of antibiotic adjuvants. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 18, n. 1, p. 42-74, 2018.

QUINN, G. A. et al. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in

- antibiotic discovery. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040, 2020.
- REBIÉRE, C. Identificação molecular e fenotípica de bactérias de solo rizosférico com tolerância ao fungicida Mancozeb, em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 37-43, 2015.
- RHODES, Katherine A.; SCHWEIZER, Herbert P. Antibiotic resistance in Burkholderia species. **Drug Resistance Updates**, v. 28, p. 82-90, 2016.
- ROSINI, Roberto et al. Vaccines Against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1048, 2020.
- SANDY, M.; BUTLER, A. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. **Chemical reviews**, v. 109, n. 10, p. 4580-4595, 2009.
- SAHA, R. et al. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of basic microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303-317, 2013.
- SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2a. ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3, 2001.
- SANGER, F.; NICKELLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.** v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SANGER, F.; Nickelen, S.; Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SEIPKE, Ryan F. et al. A single Streptomyces symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant Acromyrmex octospinosus. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22028, 2011.
- SCALES, Brittan S. et al. Microbiology, genomics, and clinical significance of the Pseudomonas fluorescens species complex, an unappreciated colonizer of humans. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 927-948, 2014.
- SPINELLI-ARAÚJO, L. et al. **Conservação da biodiversidade do estado do Maranhão: cenário atual em dados geoespaciais**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2016.
- SEIPKE, Ryan F.; KALTENPOTH, Martin; HUTCHINGS, Matthew, I. Streptomyces as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 4, p. 862-876, 2012.
- SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Method for characterization of Streptomyces species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.
- SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R.; YANDIGERI, M. S. In vitro biocontrol activity of halotolerant Streptomyces aureofaciens K20: a potent antagonist against Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 192-199, 2017.

SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 3.ed. New York: John Wiley e Sons, 1974. 350p.

SOLECKA, Jolanta et al. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Open Life Sciences**, v. 7, n. 3, p. 373-390, 2012.

STRAUME, D.; STAMSÅS, G. A.; HÅVARSTEIN, L. S. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 371–380, 2015.

STRINGARI, D. **Estudo da Variabilidade Genética de Guignardia spp por Meio de Marcadores de RAPD e Sequências ITS**. Ms Sc Thesis, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, 2004.

SUBHAN, S. A.; WAHAB, A.; MUJAHID, T. Y.; ABBAS, T.; KHAN, I.; IDREES, S. Screening of actinomycetes from indigenous soil for Production of extracellular metabolites. **International Journal of Current Research**, v. 7, n. 1, p.12078- 12083, 2015.

SUJATHA, P.; RAJU, KVVSN Bapi; RAMANA, T. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiological research**, v. 160, n. 2, p. 119-126, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

The Pew Charitable Trusts. **Antibiotics currently in clinical development**. 2017. <http://www.pewtrusts.org/~media/assets/2017/05/antibiotics-currently-in-clinical-development-03-2017.pdf?la=en>.

TOJO, Shigeo; TANAKA, Yukinori; OCHI, Kozo. Activation of antibiotic production in *Bacillus* spp. by cumulative drug resistance mutations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7799- 7804, 2015.

VALLI, S. et al. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 469-473, 2012.

VAN DER HEUL, Helga U. et al. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. **Natural product reports**, v. 35, n. 6, p. 575-604, 2018.

VENTOLA C, L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. **Pharmacy and Therapeutics**. v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VERDÚ-EXPÓSITO, C.; ROMANYK, J.; CUADROS-GONZÁLEZ, J.; TEFAMARIAM A; COPA-PATIÑO J. L, et al. Study of susceptibility to antibiotics and molecular characterization of high virulence *Staphylococcus aureus* strains isolated from a rural hospital in Ethiopia. **PLOS ONE** 15(3): e0230031, 2020.

VISWANATHAN, V. K.; HODGES, K.; HECHT, G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. **Nature Rev Microbiol.**, v.7, p.110-119, 2009.

WALKER, C. L. F. et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, v.381, p. 1405- 1416, 2013.

WATVE, M. G. R.; TICKOO, M. M. JOG, B. D. Bhole. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Arch Microbiol**, v. 176, p. 386-390, 2001.

WEBER, Tilmann et al. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. **Trends in biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 15-26, 2015.

WHO. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua.

WHO. **Global tuberculosis report 2016**. Geneva: World Health Organization, 2016. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

YILMAZ, M.; SORAN, H.; BEYATLI, Y. Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. **Microbiol. Resear.**, v. 161, p. 127-131, 2006.

ZHOU, Wei et al. Effect analysis of mineral salt concentrations on nosiheptide production by *Streptomyces actuosus* Z-10 using response surface methodology. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15507-15520, 2014.