



PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

AMANDA DE LIMA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DE *Streptomyces* sp. ISOLADO DE SOLO DE VÁRZEA NA AMAZÔNIA**

SANTARÉM – PA

2024

AMANDA DE LIMA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DE *Streptomyces* sp. ISOLADO DE SOLO DE VÁRZEA NA AMAZÔNIA**

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

Orientadora: Prof^a Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva.

SANTARÉM-PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

S586c Silva, Amanda de Lima
Caracterização química e atividade biológica de compostos obtidos de *Streptomyces sp* isolado de solo de várzea na Amazônia./ Amanda de Lima Silva. - Santarém, 2024.
55 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientadora: Silvia Katrine Rabelo da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Instituto de Saúde Coletiva, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Amazônia. 2. Streptomyces. 3. Várzea. 4. Antimicrobianos. 5. Antitumorais. I. Silva, Silvia Katrine Rabelo da, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 616.904109811

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843



PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE


UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PPGCSA


ATA Nº 23

Aos 02 (dois) dias do mês de abril de 2024 (dois mil e vinte e quatro), às 16h00min., por meio da tecnologia de comunicação à distância "Google Meet" sob o link <https://meet.google.com/hvq-vrun-qqo>, conforme orientação da CAPES - Portaria Nº36 de 19 de março de 2020, realizou-se a defesa de Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde de autoria de Amanda de Lima Silva, intitulada "CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE *Streptomyces* sp. ISOLADO DE SOLO DE VÁRZEA NA AMAZÔNIA". A Banca Examinadora constituiu-se por: Profa. Dra. Sara Freitas de Sousa Ramos (Avaliador 1); Profa. Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin (UFOPA – Avaliador 2) e; Profa. Dra. Isabella Cristhina Gonçalves Costa (Avaliador 3). Seguindo o regimento interno do curso, o presidente da banca Profa. Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva (Orientadora) abriu a sessão, passando a palavra para a mestrand, que fez a exposição da sua Dissertação. Findada a arguição, a banca examinadora e o orientador reuniram-se em outra sala virtual, sem a presença da candidata e do público, tendo a Banca Examinadora deliberado por sua: (x) APROVAÇÃO, condicionada às correções sugeridas pela Banca Examinadora e entrega da versão corrigida no prazo de 30 dias a contar da data da defesa; () REPROVAÇÃO, condicionada as correções sugeridas pela Banca Examinadora e reapresentação do Plano de Mestrado no prazo de 60 dias a contar da primeira defesa. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, Presidente (orientador(a)) e mestrando(a).

Santarém-Pará. 02 de abril de 2024.

Documento assinado digitalmente
 SARA FREITAS DE SOUSA
Data: 10/04/2024 10:48:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 1

Documento assinado digitalmente
 SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN
Data: 10/04/2024 09:08:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 2



PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Documento assinado digitalmente



ISABELLA CRISTHINA GONCALVES COSTA

Data: 10/04/2024 10:01:00-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 3

Documento assinado digitalmente



SILVIA KATRINE RABELO DA SILVA

Data: 10/04/2024 08:57:41-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente (Orientador(a))

Documento assinado digitalmente



AMANDA DE LIMA SILVA

Data: 10/04/2024 10:53:24-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestrando(a)



PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PARECER DO ORIENTADOR SOBRE A VERSÃO CORRIGIDA

Declaro, para fins de homologação, que as modificações, sugeridas pela banca examinadora, acima mencionada, foram cumpridas integralmente.

Profa. Silvia Katrine Rabelo da Silva
Orientador(a)

AMANDA DE LIMA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS
OBTIDOS DE *Streptomyces* sp. ISOLADO DE SOLO DE VÁRZEA NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Oeste do Pará, como requisito para a obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva.

Conceito:

Data de aprovação: ___/___/_____

Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva - Orientadora
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dra. Sara Freitas de Sousa Ramos
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dra. Isabella Cristhina Gonçalves Costa
Instituto Federal do Piauí

Dedico este trabalho a meu esposo, minha família e amigos, por nunca terem duvidado que aqui eu chegaria e que foram meu alicerce e porto seguro nesta caminhada.

AGRADECIMENTO

Primeiro a quem me rege, me guarda, ilumina, e me coloca no caminho que é pra mim. O segredo e o sagrado que foram a minha base nesta caminhada de altos e baixos. Agradeço aos meus Orixás e entidades, que me colocaram o sorriso no rosto e vontade no coração de fazer acontecer.

Ao meu esposo Gean Mumberger por ter sido meu apoio e suporte todos os dias, nos bons e principalmente nos difíceis. Por ter me empurrado pra cima, pra frente, acreditado em mim muitas vezes até mais do que eu mesma. Nos apertos da vida e nas noites em claro, ele sempre esteve lá por mim, me fazendo acreditar em dias melhores. E ao nosso cachorrinho Tadeu pelo suporte emocional e por arrancar sorrisos em momentos de incertezas.

Aos meus pais, Pérola e Fernando, pela vida e por me incentivarem a buscar o conhecimento e as oportunidades. Às minhas irmãs e irmão, Rui, Fernanda e Danielle, por ter, cada um, me deixado um pouquinho de sua personalidade. Às minhas sobrinhas, Luísa, Eduarda, Isabelle e Helena pelos sorrisos sempre que me escutam contar sobre como é ser cientista.

Aos amigos Bárbara Moura e Jeosafá Vieira, pela força e momentos de descontração, pelos conhecimentos repassados, pelas metodologias ensinadas e pelos cafés cheios de ciência. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Às amigas Ramillys Carvalho e Kamila Brielle, que tantas vezes ouviram minhas preocupações e me tranquilizaram como ninguém. Tudo acontece no tempo que tem que acontecer e vocês são a prova disso.

Aos amigos e colegas do LabMicro, que mal sabem, mas foram meus maiores encorajadores, me fazendo perguntas difíceis e me dando credibilidade nas nossas “miniaulas” sobre Actinobactérias. Obrigada meus colegas, aprender para ensinar vocês, foi um marco neste mestrado.

À minha orientadora e amiga, Katrine Rabelo. Grata por todo conhecimento repassado e grata pelas oportunidades concedidas. Já é uma longa caminhada essa que traçamos juntas, e esse é mais um fruto que colhemos juntas. Obrigada por ter ido lá me buscar quando eu achava que já não tinha mais jeito.

À UFOPA, que é casa, minha Universidade do coração, espero um dia poder trazer para gerações futuras todo o conhecimento que adquiro aqui.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

O uso extensivo dos antibióticos na terapia de doenças infecciosas contribuiu para o surgimento de cepas bacterianas resistentes, representando um desafio significativo para a saúde pública. A resistência a tratamentos não está limitada apenas à terapia antibiótica; o tratamento do câncer apresenta desafios semelhantes. Nesse contexto, a procura por novos agentes antimicrobianos e anticâncer provenientes de fontes naturais pode ser uma estratégia importante na descoberta de novos bioativos. Nesse estudo foram isoladas actinobactérias nativas de solo de várzea coletado na comunidade Saracura, às margens do rio Amazonas, e realizado um estudo químico a partir do extrato bruto através de análise por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG-EM e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa. A identificação dos isolados foi realizada através de caracterização morfológica, bioquímica e molecular através do sequenciamento do gene RNAr 16S. Os estudos de atividade antimicrobiana foram realizados através do teste de bloco de agar frente a 15 patógenos de interesse clínico para seleção do isolado promissor e obtenção do extrato bruto utilizando o solvente acetato de etila. O extrato bruto obtido foi utilizado para estudo da atividade antioxidante, antitumoral e investigação química. Foram obtidos 4 isolados de actinobactérias, identificadas como *Streptomyces* sp., renomeadas como VAR1, VAR2, VAR4 e VAR5. Foram amplificados genes biossintéticos do tipo PKS e NRPS em todos os isolados. Na avaliação de antagonismo foi verificado que todos os isolados foram ativos contra pelo menos 1 patógeno de interesse clínico, com destaque para *Streptomyces* sp. VAR2 que produziu um halo de inibição de crescimento de 18mm frente a *Aeromonas hydrophyla*, e de 16mm para *Proteus vulgaris*. O extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2 promoveu a inibição do crescimento celular de linhagem de carcinoma colorretal humano em 95,87% em uma concentração de 10 µg/ml. Além disso, foi verificada uma atividade de eliminação de radicais livre de DPPH de 7,90% e de ABTS de 20,75%. A análise por CG-EM do extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2 revelou a presença majoritária do composto 2-Decanol, éter metílico, ainda não reportado na literatura como bioativo, seguido pelo 2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico, composto já descrito na literatura com atividade antioxidante. Os resultados desta pesquisa indicam a capacidade dessas bactérias de produzirem compostos com variada atividade biológica, podendo indicar, no futuro, novas opções terapêuticas para problemas de saúde global emergentes como a resistência microbiana e o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Amazônia. *Streptomyces*. Várzea. Antimicrobianos. Antitumorais.

ABSTRACT

The extensive use of antibiotics in the therapy of infectious diseases has contributed to the emergence of resistant bacterial strains, representing a significant challenge to public health. Treatment resistance is not limited to just antibiotic therapy; cancer treatment presents similar challenges. In this context, the search for new antimicrobial and anticancer agents from natural sources can be an important strategy in the discovery of new bioactives. In this study, native actinobacteria were isolated from floodplain soil collected in the Saracura community, on the banks of the Amazon River, and a chemical study was carried out using the crude extract through analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) in reversed phase. The identification of the isolates was carried out through morphological, biochemical and molecular characterization through sequencing of the 16S rRNA gene. Antimicrobial activity studies were carried out using agar block testing against 15 pathogens of clinical interest to select the promising isolate and obtain the crude extract using the solvent ethyl acetate. The crude extract obtained was used to study antioxidant and antitumor activity and to a chemical investigation. 4 isolates of actinobacteria were obtained, identified as *Streptomyces* sp., renamed as VAR1, VAR2, VAR4 and VAR5. PKS and NRPS biosynthetic genes were amplified in all isolates. In the antagonism assessment, it was verified that all isolates were active against at least 1 pathogen of clinical interest, with emphasis on *Streptomyces* sp. VAR2 which produced a growth inhibition halo of 18mm against *Aeromonas hydrophyla*, and 16mm for *Proteus vulgaris*. The crude extract of the isolated *Streptomyces* sp. VAR2 promoted cell growth inhibition of human colorectal carcinoma lineage by 95.87% at a concentration of 10 µg/ml. Furthermore, a free radical scavenging activity of DPPH of 7.90% and ABTS of 20.75% was verified. The GC-MS analysis of the crude extract of the isolated *Streptomyces* sp. VAR2 revealed the majority presence of the compound 2-Decanol, methyl ether, not yet reported in the literature as bioactive, followed by 1-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate, a compound already described in the literature with antioxidant activity. The results of this research indicate the ability of these bacteria to produce compounds with varied biological activity, which may indicate, in the future, new therapeutic options for emerging global health problems such as microbial resistance and cancer treatment.

Keywords: Amazon. *Streptomyces*. Floodplain. Antimicrobials. Antitumor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Antibióticos de origem natural.....	12
Figura 2 - Actinobactéria cultivada em meio de cultura específico.	15
Figura 3 - Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i>	16
Figura 4 - Várzea amazônica: (a): em período de cheia do rio; (b): em período de vazante do rio.....	18
Figura 5 - Mapa das várzeas do município de Santarém-PA, com destaque, no círculo amarelo, para a localização da comunidade Saracura.	20
Figura 6 - Amostra de solo de várzea	21
Figura 7 - Registros fotográficos dos isolados semeados no formato “esgotamento”, em Ágar ISP2. a: VAR1, b: VAR2, c: VAR4, d: VAR5.	28
Figura 8 - morfologia do isolado VAR2; a: micélio aéreo; b: micélio vegetativo; c: registro de colônia em lupa eletrônica; d: registro de colônia em lupa eletrônica; e: microscopia eletrônica de varredura em escala 10 μm ; f: microscopia eletrônica de varredura em escala 2 μm	30
Figura 9: isolados demonstrando produção de pigmento em suas colônias. A: VAR2 apresentando colônia levemente cor de rosa; b: VAR5 demonstrando micélio aéreo branco e micélio vegetativo de cor rosa escuro.	31
Figura 10 - Árvore filogenética do isolado <i>Streptomyces</i> sp. VAR2	33
Figura 11- Cromatograma do extrato bruto do isolado <i>Streptomyces</i> sp. VAR2	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Patógenos de interesse clínico utilizados para o teste de antagonismo.	24
Tabela 2 - Características morfológicas dos isolados isoladas.....	30
Tabela 3 - Índices enzimáticos dos isolados de actinobactérias (IE: índice enzimático; +: positivo para produção; -:negativo para produção)	32
Tabela 4 - Halos de inibição em mm dos isolados <i>Streptomyces</i> sp. VAR frente a patógenos de interesse clínico	34
Tabela 6 - Compostos, porcentagem de área, fórmula química e atividade biológica dos compostos identificados no extrato bruto do isolado <i>Streptomyces</i> sp. VAR2.....	38

LISTA DE SIGLAS

ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
VAR	Renomeação dos isolados de Várzea
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1.	Antibióticos e Resistência Microbiana	12
2.2.	Câncer	13
2.3.	Actinobactérias.....	14
2.4.	Amazônia	17
2.4.1.	Solos de Várzea	17
3	OBJETIVOS	19
3.1.	Objetivo geral.....	19
3.2.	Objetivos específicos.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1.	Local de coleta da amostra de solo.....	20
4.2.	Isolamento.....	20
4.3.	Caracterização Macromorfológica	21
4.4.	Caracterização Micromorfológica.....	21
4.5.	Produção de enzimas	21
4.5.1.	Amilase	Erro! Indicador não definido.
4.5.2.	Lipase e esterase.....	22
4.5.3.	Caseinase e Gelatinase.....	22
4.5.4.	Hemolisina	22
4.5.5.	Determinação do Índice Enzimático.....	22
4.6.	Identificação Molecular a partir do RNAr 16S.....	22
4.7.	Mineração Genômica.....	23
4.8.	Avaliação de isolados produtores de substâncias antimicrobianas	24
4.9.	Obtenção do extrato bruto.....	25

4.10.	Atividade antitumoral do extrato bruto.....	25
4.11.1.	Captura do radical livre ABTS.....	25
4.11.2.	Captura do radical DPPH.....	26
4.12.	Caracterização química do extrato bruto.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1.	Isolamento das actinobactérias.....	28
5.2.	Caracterização Morfológica.....	30
5.3.	Produção de enzimas	32
5.4.	Identificação Molecular e Mineração Genômica	33
5.5.	Atividade antimicrobiana.....	34
5.6.	Atividade antitumoral.....	35
5.7.	Determinação da atividade antioxidante total.....	36
5.8.	Análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..	36
5.9.	Análise do extrato por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas - CG-EM	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O papel dos antibióticos na medicina é fundamental, salvando milhões de vidas desde a descoberta da penicilina no século XX. Contudo, o uso extensivo desses fármacos na terapia de doenças infecciosas contribuiu para o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, criando um desafio crescente para a saúde pública. A resistência microbiana surgiu como uma ameaça global, destacando a necessidade urgente de compreender e buscar novas fontes de agentes antimicrobianos (MORRISON, 2020; DADGOSTAR, 2019).

Microrganismos resistentes a medicamentos são um desafio de magnitude global e reconhecido pela Organização Mundial da Saúde. Porém, a resistência à tratamentos não é exclusiva à terapia antibiótica. O câncer, uma das principais causas de mortalidade no mundo, apresenta desafios semelhantes, com a recidiva de células estaminais cancerígenas e a resistência a tratamentos tradicionais. Nesse contexto, a busca por novos agentes anticâncer provenientes de fontes naturais, incluindo actinobactérias, torna-se imprescindível (OMS, 2001, YANG, 2020).

As actinobactérias, membros do filo Actinomycetota, destacam-se por sua capacidade de produzir uma variedade de compostos bioativos, incluindo antibióticos e antitumorais, onde o gênero *Streptomyces* assume um papel notável, sendo responsável por mais de 80% dos antibióticos de origem natural. Essa riqueza química torna as actinobactérias alvos ideais na busca por novos agentes antimicrobianos, essenciais para combater a resistência bacteriana crescente (AL-SHAIBANI, 2021; DONALD, 2022).

A Amazônia, como o maior bioma tropical do mundo, não apenas oferece uma biodiversidade única, mas também abriga ambientes ricos em nutrientes, como os solos, particularmente nas áreas de várzea, que são áreas que acompanham a dinâmica hidrológica dos rios amazônicos: em um período do ano, submersa, em outro, não. Apesar da importância desses solos na sustentabilidade do ecossistema, pouco se sabe sobre a diversidade microbiana neles presentes. Este estudo se concentra nos solos de várzea amazônicos, explorando a microbiota e, em particular, as actinobactérias que podem ser fontes valiosas de compostos bioativos (LOBO JUNIOR, 2004; CAMARA DOS REIS, 2019).

Esta pesquisa visa aumentar o entendimento sobre a diversidade metabólica e atividade biológica das actinobactérias isoladas de solos de várzea amazônicos, contribuindo não apenas para a compreensão da biodiversidade microbiana na região, mas também para o

desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e anticâncer. Ao cruzar os caminhos da microbiologia e da biotecnologia, esse estudo objetiva isolar, caracterizar e identificar linhagens de actinobactérias de solo de várzea da Amazônia, bem como realizar a investigação química de compostos bioativos oriundos de seu metabolismo secundário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

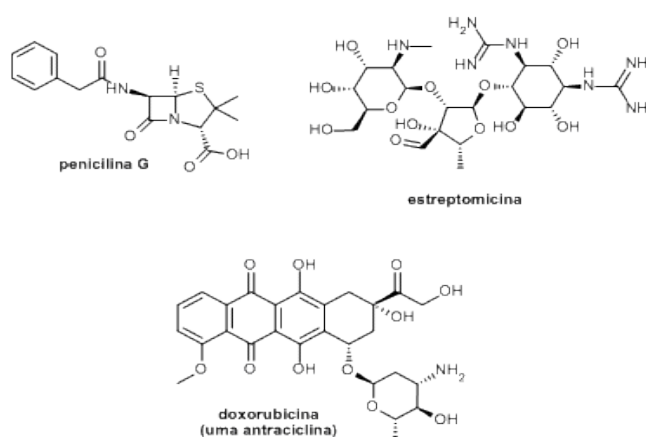
2.1. Antibióticos e Resistência Microbiana

Antibióticos são moléculas naturais ou sintéticas, geralmente de baixo peso molecular, capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. São classificados como bactericida, quando causa a morte de bactérias, ou bacteriostáticos, quando apenas promovem a inibição do crescimento destas (WALSH, 2020).

Ainda não se conhece completamente o papel das moléculas antibióticas nos ambientes naturais. Acredita-se que microrganismos secretam estes tipos de substâncias para adquirir vantagem competitiva, inibindo competidores e aumentando as chances de sobrevivência. Porém, as quantidades secretadas na natureza são difíceis de medir, e provavelmente sejam mais baixas do que aquelas alcançadas em condições de laboratório, o que aumenta a dúvida sobre a real função dos antibióticos na natureza (SURETTE, 2017).

Desde que essas moléculas se transformaram em medicamentos, milhões de vidas foram salvas no mundo. Sua ação depende de diversos fatores, ligados principalmente a fisiologia e a bioquímica das bactérias, seja uma ação de inibição à síntese da parede celular, como as penicilinas e as cefalosporinas, ou até mesmo atuando como inibidores da síntese de proteínas, no caso dos macrolídeos e aminoglicosídeos, como a estreptomicina. (NADEEM, 2020).

Figura 1 - Antibióticos de origem natural



Fonte: PALMER, 2010

Desde a descoberta da penicilina, no século XX, os antibióticos se tornaram grandes aliados da medicina. Seu uso, associado a melhorias em saneamento, alimentação e moradia levou a uma queda expressiva no número de mortes por infecções bacterianas e um consequente aumento da expectativa de vida mundial. Porém, com o aumento do uso desses

fármacos na terapia das doenças infecciosas, foram, gradativamente, selecionadas cepas resistentes a cada vez mais antibióticos, levando a formas graves de infecções extremamente difíceis de serem tratadas. As infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos não respondem ao tratamento, elevando o tempo de doença e o risco de morte. Tratamentos falhos também selecionam cepas resistentes, bem como um maior tempo de infecção, aumentando a circulação dessas cepas e, proporcionalmente, a exposição da sociedade a infecções (MORRISON, 2020; DADGOSTAR, 2019).

A resistência microbiana é um problema sério que pode ter um impacto devastador na saúde pública. É importante tomar medidas para reduzir o uso inadequado de antibióticos e para educar a população sobre os riscos. A contínua resistência aos antibióticos pode levar a uma era pós-antibiótico, na qual ferimentos leves e infecções comuns poderão ser tão perigosos quanto doenças infecciosas mais graves. Desde 2001, a Organização Mundial da Saúde reconhece a resistência microbiana como um problema de saúde global, e chama a atenção para um uso mais consciente de antibióticos, bem como para a prospecção de novas moléculas com ação antimicrobiana, visto que o uso de antibióticos é o principal fator de seleção de cepas resistentes (OMS, 2001; ABUSHAHEEN, 2020).

O surgimento de novas formas de bactérias resistentes aos antibióticos ameaça a capacidade de tratar doenças comuns, além de comprometer o sucesso e segurança de quimioterapias para o câncer, transplantes de órgãos e até mesmo procedimentos mais simples como cirurgias odontológicas. Adquirir uma infecção bacteriana resistente a antibióticos pode levar a tratamentos mais longos e caros, com riscos de incapacidade permanente e, em casos mais graves, morte (ABUSHAHEEN, 2020)

Uma alternativa para o desenvolvimento de uma nova geração de medicamentos com ação antibiótica é a descoberta de novos produtos naturais microbianos (NPs), uma vez que esses compostos são bastante diversos em composição química e ação antimicrobiana: os actinomicetos filamentosos, por exemplo, produzem 64% das classes conhecidas de antibióticos de origem natural, sendo o restante produzido por outras bactérias e fungos (HUTCHINGS, 2019).

2.2. Câncer

O câncer é uma doença que ocorre quando as células do corpo crescem e se dividem de forma descontrolada, saindo de um estado de célula normal para célula neoplásica. As células

cancerosas podem invadir tecidos e órgãos saudáveis de qualquer parte do corpo, incluindo pele, pulmões, mama, próstata, intestinos, sangue e cérebro. É a segunda doença que mais causa mortes no mundo, e estima-se que em 2021 tenha sido a causa da morte de mais de 600.000 pessoas só nos EUA (HANAHAN, 2022; SIEGEL, 2021).

O tratamento do câncer se dá por meio de diversas estratégias terapêuticas, como cirurgias, radioterapia, quimioterapia e terapia direcionada. Um dos agentes de malignidade tumoral são as células estaminais cancerígenas, que podem causar a recidiva do câncer, além de metástase, heterogeneidade e até mesmo resistência a medicamentos e à radiação (YANG, 2020).

Esforços coletivos da comunidade acadêmica trouxeram à tona uma série de medicamentos com origem em produtos naturais para o tratamento do câncer, e essa busca segue até os dias atuais. A diversidade química de compostos naturais, fruto do metabolismo de plantas, animais ou microrganismos abre um leque de possibilidades para a descoberta de novas opções terapêuticas. Por exemplo, a camptotecina, um inibidor da topoisomerase utilizado para tratamento de câncer, é um produto obtido a partir da casca da *Camptotheca acuminata*, árvore chinesa. (HUANG, 2021; MARTINO, 2017).

Os microrganismos também tem se mostrado grandes agentes na busca por novas opções de fármacos anticâncer. Algumas cianobactérias, por exemplo, produzem compostos anticâncer como a dolastina 10, curacina A e criptoficina. Além disso, trabalhos recentes têm identificado compostos com ação anticâncer produzidos por actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces* (BARZKAR, 2019; LAW, 2020).

2.3. Actinobactérias

As actinobactérias ou actinomicetos pertencem ao domínio *Bacteria*, filo *Actinomycetota*. Este filo é formado por 6 classes, 18 ordens, 14 subordens, 63 famílias e 374 gêneros, sendo *Streptomyces* o maior gênero deste filo. Alguns dos gêneros mais importantes são: *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Streptomyces* (DONALD, 2022).

A morfologia das actinobactérias se apresenta com o desenvolvimento de um micélio vegetativo opaco aderido ao meio, que é responsável pela sustentação e pela captação de nutrientes, excretando principalmente enzimas no substrato a fim de facilitar a absorção de fontes de carbono. Há, também, o desenvolvimento de um micélio aéreo, de aparência

avelulada e opaca, que se projeta sobre o substrato, sendo este o micélio reprodutivo (DHANASEKARAN, 2016).

Figura 2 - Actinobactéria cultivada em meio de cultura específico.



Fonte: a autora (2023)

Essas bactérias são Gram-positivas, com alto conteúdo de guanina e citosina (G+C) em seu DNA, e estão altamente presentes em ecossistemas terrestres e aquáticos, desempenhando papéis vitais na ciclagem de nutrientes. Possuem um metabolismo complexo, acompanhado de um metabolismo secundário capaz de produzir diversos tipos de moléculas bioativas e sinalizadores químicos importantes para a constituição de habitats microbiológicos, contribuindo para a disponibilidade de nutrientes por serem capazes de decompor moléculas complexas (JOSE, 2021).

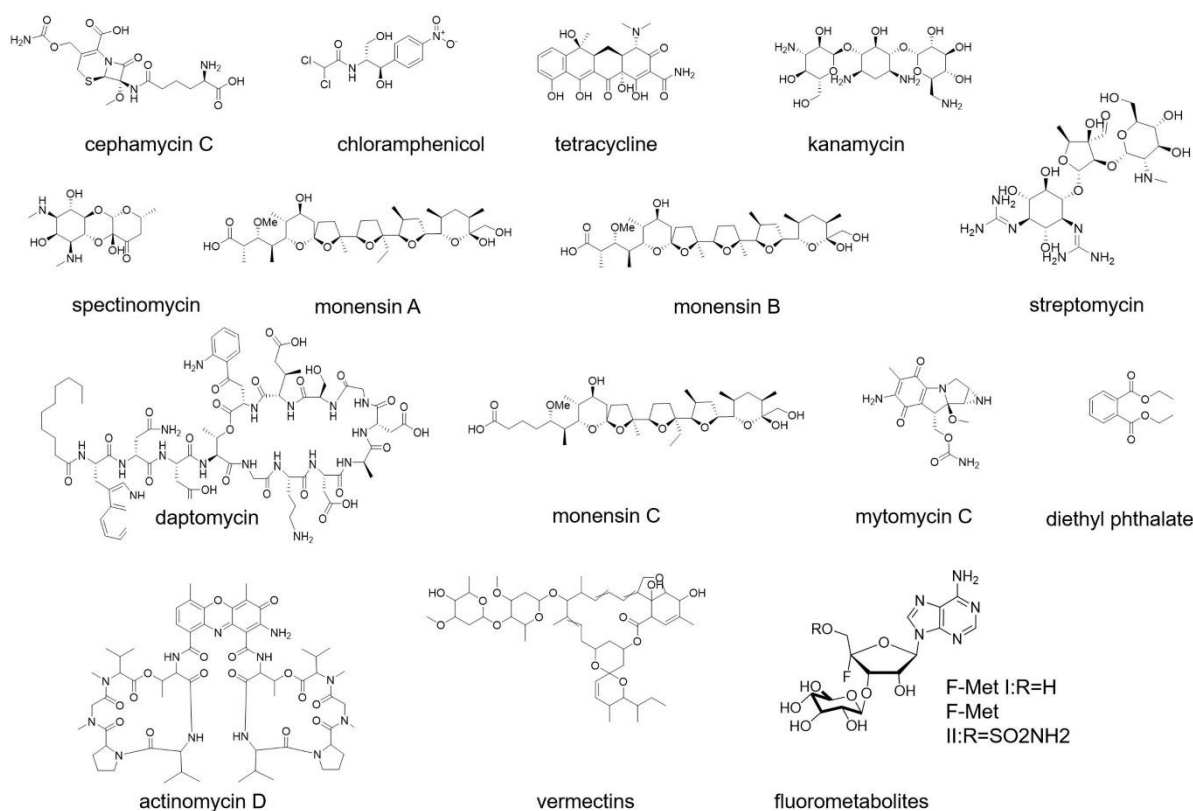
As actinobactérias são cosmopolitas e estão presentes nos mais variados habitats, como o solo, desempenhando funções importantes ao participar da degradação de compostos como celulose e hemicelulose, decomposição de serrapilheira e participando na ciclagem do hidrogênio. (ZHANG, 2019; DONALD, 2022).

Além disso, as actinobactérias são conhecidas como produtoras de diversos compostos bioativos, sendo responsáveis por produzir grande parte dos antibióticos utilizados na medicina, tendo representantes nas classes dos aminoglicosídeos, macrolídeos, lipopeptídeos, glicopeptídeos, tetraciclinas e estreptograminas. Dos metabólitos secundários descritos produzidos por microrganismos, grande parte são metabólitos bioativos produzidos por Actinobactérias, sendo que o gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de mais de 80% destes compostos (AL-SHAIBANI, 2021; GRASSO, 2016).

Dentre os mais de 300 gêneros de actinobactérias, o gênero *Streptomyces* se destaca na produção de diversas moléculas bioativas, apresentando-se como uma promissora fonte de novos antibióticos, antitumorais, antivirais, vitaminas, biosurfactantes e enzimas de interesse industrial como lipases, pectinases, amilases (DONALD, 2022; IBRAHIM, 2023; REX, 2022; MANIKKASUNDARAM, 2023; KUMAR, 2020).

As bactérias do gênero *Streptomyces* são consideradas biofábricas de metabólitos secundários, uma vez que são responsáveis pela produção de antibióticos bastante populares na medicina, como a estreptomicina, o cloranfenicol e a tetraciclina, ilustrados na figura 3, usados na terapia de quadros infecciosos ao redor do mundo (ALAM, 2022)

Figura 3 - Antibióticos produzidos por *Streptomyces*



Fonte: ALAM, 2022

2.4. Amazônia

A Amazônia é o maior bioma tropical do mundo, com uma área de aproximadamente 5,5 milhões de quilômetros quadrados. Localizada na América do Sul, abrange os territórios de nove países: Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia, Guiana, Suriname e Guiana Francesa. Este bioma é caracterizado por sua rica biodiversidade, com uma grande variedade de plantas, animais e microrganismos. Estima-se que a Amazônia abriga mais de 30 milhões de espécies diferentes, o que representa cerca de 10% de todas as espécies conhecidas no mundo. (KOHLENER, 2021; IBGE, 2022)

A Amazônia é tida como uma importante reserva de madeira no mundo, além de proporcionar a extração de diversos produtos não madeireiros e outros recursos naturais. Além de ser reserva de madeira e lar de milhares de espécies vegetais, animais e invertebrados, a Amazônia também abriga uma microbiota que tem sido alvo de cada vez mais pesquisas. Dentre os muitos ambientes da Amazônia, destaca-se o solo, por ser um componente essencial desse ecossistema, fornecendo suporte às plantas, armazenando nutrientes e água, e abriga uma grande variedade de microrganismos (JUNIOR, 2020).

O solo da Amazônia é detentor de uma microbiodiversidade inestimável, além de ser uma biblioteca ainda desconhecida de moléculas bioativas, que se encontra cada vez mais ameaçada com o aumento da atividade agropecuária. Embora seja o bioma em melhor estado de conservação do país, há um grande risco de perda de biodiversidade na região, como consequência do desmatamento e queimadas, que tem sido o grande problema ambiental da Amazônia (REBOUÇAS, 2000; NOBRE, 2016).

A microbiota do solo amazônico é extremamente diversa, com estimativas que apontam para a presença de mais de 100 mil espécies diferentes de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus, e desempenha um papel fundamental no funcionamento do ecossistema amazônico, participando de processos como a ciclagem de nutrientes, a decomposição da matéria orgânica e a manutenção da fertilidade do solo (GOI, 2023)

2.4.1. Solos de Várzea

Várzeas são áreas conhecidas na Amazônia por suas características de terras baixas, periodicamente inundáveis, que recebem anualmente sedimentos trazidos pelos rios de água barrenta. Este solo é especialmente formado por uma espessa camada de matéria orgânica

semidecomposta, além de uma elevada acidez. É um tipo de ambiente também conhecido por seu aproveitamento rural, usado muitas vezes para pastos de gado (FALESI, 1974).

A várzea é um ambiente com uma especificidade: são ambientes que, por conta da dinâmica hidrológica dos rios Amazônicos, passam parte do ano inundados e parte do tempo secos. É um ecossistema considerado delicado, e pouco se sabe sobre a diversidade microbiana presente nesses solos ácidos e ricos em matéria orgânica (LOBO JUNIOR, 2004).

Figura 4 - Várzea amazônica: (a): em período de cheia do rio; (b): em período de vazante do rio



Fonte: EMBRAPA, 2022

Sendo um solo rico em nutrientes, a várzea desperta interesse sobre a sua microbiota, uma vez que os microrganismos que ali habitam são, provavelmente, mais adaptáveis. Dentre os componentes da microbiota de solos de várzea descritos na literatura, pode-se citar os filos *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Nitrospirae*, *Acidobacteria* e *Betaproteobacteria*, identificados em estudos metagenômicos de solos de várzea na Amazônia (STEGER, 2019; CAMARA DOS REIS, 2019).

A prevalência de actinobactérias em solos de várzea já é conhecida, porém, até o momento não há estudos que tragam informações sobre a diversidade metabólica e atividade biológica dessas bactérias isoladas de solos de várzea amazônica.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Isolar, caracterizar e identificar actinobactérias em solo de várzea da Amazônia, bem como realizar uma investigação química de compostos orgânicos oriundos de seu metabolismo secundário.

3.2. Objetivos específicos

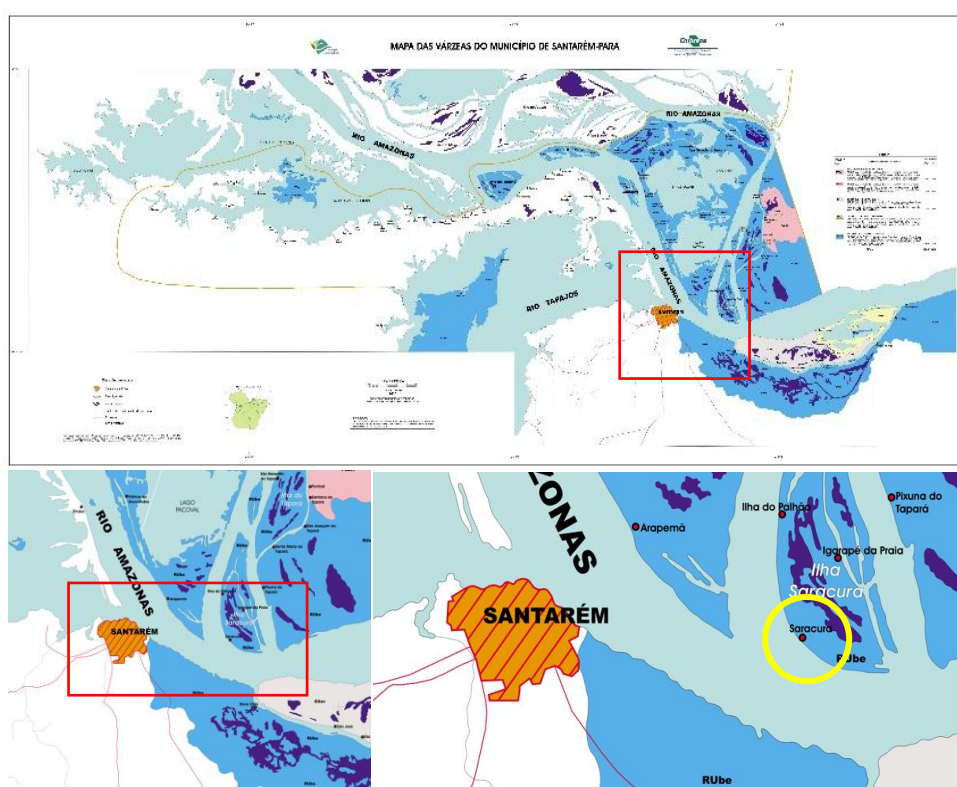
- Isolar e caracterizar a morfologia, bioquímica e fisiologia de actinobactérias de solo de várzea da Amazônia;
- Fazer a identificação molecular das actinobactérias isoladas a partir do RNAr 16S;
- Fazer um *screening* de atividade antimicrobiana das actinobactérias frente à microrganismos de interesse clínico para obtenção do isolado mais promissor;
- Realizar a mineração genômica para seleção de *clusters* gênicos de síntese de antibióticos PKS I, PKS II e NRPS;
- Obter o extrato bruto do isolado mais promissor por cultivo em meio sólido e extração com o solvente acetato de etila;
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto do isolado mais promissor;
- Determinar a atividade antioxidante total do extrato bruto do isolado mais promissor;
- Obter o perfil cromatográfico do extrato bruto do isolado mais promissor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Investigar os compostos voláteis do extrato bruto do isolado mais promissor através de análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de coleta da amostra de solo

A amostra de solo de várzea foi obtida na comunidade de Saracura ($2^{\circ}26'23''S$ $54^{\circ}36'24''W$) às margens do Rio Amazonas, próximo a cidade de Santarém, Pará, Brasil, e coletada no período de Seca Amazônica no mês de outubro, a uma profundidade de 20 cm da superfície.

Figura 5 - Mapa das várzeas do município de Santarém-PA, com destaque, no círculo amarelo, para a localização da comunidade Saracura.



Fonte: EMBRAPA, 2000

4.2. Isolamento

Os isolados de actinobactérias foram obtidos através de cultivo de uma amostra de 10g de solo de várzea em meio ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) a partir de diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} em tampão fosfato. Após a semeadura de 100 μ L das diluições no meio, as placas foram acondicionadas em estufa por um período de 21 dias a 30°C, sendo diariamente observadas as características das colônias para seleção das colônias de actinobactérias. Os aspectos morfológicos utilizados

como parâmetro para classificar visualmente as colônias de actinobactérias incluíram a observação de colônias aderidas ao meio, observando a saliência do meio ao redor da colônia que se afunda no mesmo; colônias normalmente enrugadas, secas e não viscosas, micro hifas, excreção de pigmentos no meio e no micélio aéreo.

Figura 6 - Amostra de solo de várzea



Fonte: a autora

As colônias selecionadas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio ISP2 (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958) e posteriormente purificadas, através de sucessivos repiques, neste mesmo meio, para então serem depositadas no BIOBANCO do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará.

4.3. Caracterização Macromorfológica

A caracterização dos aspectos culturais dos isolados foi determinada visualmente durante o cultivo no meio de cultura ISP-2, à 30°C durante 20 dias. Foram avaliadas a formação de micélio vegetativo e aéreo, a coloração das colônias, sua forma e produção de pigmentos. (WHITMAN, 2012).

4.4. Caracterização Micromorfológica

Foi realizada por meio de microcultivo seguindo a recomendação do manual *International Streptomyces Project* (ISP), onde, após a inoculação por estriamento das actinobactérias em placas de ISP2, lamínulas foram inseridas a um ângulo de 45°, e as placas incubadas a 30°C por 14 dias. O detalhamento da organização da cadeia de esporos foi realizado por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) em 10kV.

4.5. Produção de enzimas

4.5.1. Lipase e esterase

Para determinar a produção de lipase e esterase a actinobactéria foi inoculada na forma de spots em meio base contendo (10g Peptona, 5mLNaCl, 10mLTween 80 [10mLTween 80 e 40mL Água destilada], 15g Ágar, 1000mL Água destilada) (SIERRA, 1957), em triplicata, sendo que para avaliação da esterase foi modificada a fonte de carbono do meio base para Tween 20, e incubada à 28°C durante 10 dias. A presença da enzima foi reconhecida pela formação de um halo branco difuso constituído de precipitados de oleato de cálcio.

4.5.2. Gelatinase

Para determinar a produção de gelatinase pela actinobactéria foi utilizado meio sólido contendo gelatina como substrato indutor. A actinobactéria foi cultivada em tubos de ensaio contendo o meio ágar nutriente acrescido de 12% de gelatina, e mantida a 37°C durante 7 dias. Posteriormente, os tubos foram refrigerados entre 4° e 10°C para verificação do estado do meio, indicando positividade do teste se o meio estiver liquefeito.

4.5.3. Hemolisina

Para determinar a atividade hemolítica, a actinobactéria foi cultivada em meio ágar sangue suplementado com 5% de sangue desfibrinado e incubada à 30°C durante 7 dias. A produção da enzima foi observada pela presença de um halo claro ao redor da colônia.

4.5.4. Determinação do Índice Enzimático

A determinação do índice enzimático (IE) foi realizada pela relação: $IE = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{halo}} \times 100$, sendo considerado com potencial enzimático aquelas que apresentaram índice enzimático acima de 1,5.

4.6. Identificação Molecular a partir do RNAr 16S

Foi realizada a análise da sequência do RNAr 16S e a construção da árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* para a confirmação em nível de espécie. O isolamento do DNA genômico foi obtido da biomassa microbiana após cultivo em meio YEME (Extrato de levedura 3g.L⁻¹, Peptona bacteriológica 5 g.L⁻¹, Extrato de malte 3 g.L⁻¹, Glicose 10 g.L⁻¹, Sucrose 250 g.L⁻¹) a 30°C sob agitação de 180 rpm durante 72h, utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). As reações de amplificação do DNAr 16S foram realizadas em termociclador Bioneer MyGenie 96 Thermal block (Global Genomics Partner) com o par de oligonucleotídeos 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-

TACCTTGTTACGACTT-3'), sob as seguintes condições: 98°C por 30''; 30 ciclos de 98°C (10''), 58°C (30''), 72°C (30''/ kb); extensão de 72°C (10'). A reação de PCR (50µL) continha template 100 ng (1µL), 5x Trans start Fast Pfu buffer (10µL), primer 10µM (1 µL), 2,5 mM DNTP's (4µL), Trans Start Fast Pfu polymerase (1µL), PCR stimulant (5x) (5µL), MgSO₄ 50mM (2µL e ddH₂O 25 µL). Os *amplicons* positivos foram avaliados pelo tamanho e purificados (PROMEGA, USA) e sequenciados em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems/Hitachi no Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição (GaTE) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os oligonucleotídeos utilizados foram 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3').

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o [BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit](#) (código 4337456). As corridas foram feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7 e os *contigs* gerados analisados pelo software *Sequencing Analysis 7.0* utilizando o Base Caller KB. As sequências adquiridas foram alinhadas manualmente usando o banco de dados *GenBank* com BLAST. Sequências com 98-100% de homologia foram consideradas para análise taxonômica molecular. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado para cada sequência gerada e as sequências do banco de dados do *GeneBank* com o programa CLUSTAL X. A árvore filogenética foi construída usando os métodos de *neighbor-joining* e máxima parsimônia no software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA versão 11.0.13) com base em valores de bootstrap de 1.000 replicações.

4.7. Mineração Genômica

Foi realizada uma busca pelos clusters gênicos relacionados a rota de biossíntese de antibióticos denominados Policetídio Sintase (PKS-I, PKS-II e PKSE) e Peptídeos não ribossomais (NRPS). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região de interesse foram: PKS I: K1F (5'-TSA AGT CSA ACA TCG GBC A-3') e M6R (5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3') Ayuso-Sacido e Genilloud 2005); PKSE: EdyA/EdyE (5'-CCGCVCACATCACSGSCCTCGCSGTGAACATGCT-3'/5'- GCAGGCKCCGT CSACSGTGTABCCGCCGCC-3'; Liu et al. 2003); PKSII: ,KS α (5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3') e KS β (5'- TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3') Metsä-Ketelä et al. 1999); NRPS: A3F (5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3') e A7R (5'-SAS GTC VCC SGT SCG GTA S-3') Ayuso-Sacido and Genilloud 2005).

A reação de PCR (50µL) foi constituída de DNA genômico 100 ng (1µL), 5x Trans start Fast Pfu buffer (10µL), primer 10µM (1 µL), 2,5 mM DNTP's (4µL), Trans Start Fast Pfu polymerase (1µL), PCR stimulant (5x) (5µL), MgSO4 50mM (2µL) e ddH2O 25 µL). O ciclo de PCR ocorreu segundo as condições: 98°C por 4'; 30 ciclos de 94°C (1'), 57,5°C (30''), 72° C (1' / kb); extensão de 72°C (10'). Todos os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2 % e bandas entre 1.200-1.400, 600, 1.400 e 700-800 pb foram classificadas como produtos dos genes PKS I, PKS II, PKSE e NRPS.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As corridas foram feitas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7 e os contigs gerados foram analisados pelo software Sequencing Analysis 7.0 utilizando o Base Caller KB. As sequências adquiridas foram alinhadas manualmente usando o banco de dados GenBank com BLAST. Sequências com 98-100% de homologia foram consideradas para análise taxonômica molecular. O alinhamento múltiplo de sequências foi realizado para cada sequência gerada e as sequências do banco de dados do GeneBank com o programa CLUSTAL X. A árvore filogenética foi construída usando os métodos de neighbor-joining e máxima parsimônia no software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA versão 11.0.13) com base em valores de bootstrap de 1.000 replicações.

4.8. Avaliação de isolados produtores de substâncias antimicrobianas

Os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo meio Agar ISP2 até completa esporulação. Posteriormente, foram recortados blocos de ágar de 6 mm de diâmetro para a realização do teste de antagonismo pelo método do bloco de gelose (ICHIKAWA; DATE; ISHIKURA; OZAKI, 1971). Foram utilizados 15 patógenos de interesse de interesse clínico, expostos na tabela 1. A intensidade da atividade inibitória foi determinada de acordo com o tamanho do halo de inibição segundo Şahin e Uğur (ŞAHİN; UĞUR, 2003).

Tabela 1 - Patógenos de interesse clínico utilizados para o teste de antagonismo.

Isolado
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27859
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352
<i>Salmonella enteritidis</i> INCQS00268
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC700669
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC10100

Staphylococcus aureus ATCC14458
Staphylococcus epidermidis ATCC12228
Micrococcus luteus ATCC7468
Streptococcus equii CBMAI265
Aeromonas hydrophyla INCQS00318
Bacillus subtilis ATCC28109
Candida albicans ATCC102642

Fonte: a autora.

4.9. Obtenção do extrato bruto

O isolado com melhor desempenho no teste de antagonismo foi selecionado para a extração de metabólitos secundários, utilizando o solvente acetato de etila ($C_4H_8O_2$). A linhagem selecionada foi cultivada em placas de Petri com meio MPE, pela técnica de espalhamento, e incubada em estufa a 30°C por 7 dias. Após a esporulação, foram realizados recortes com bisturi estéril na placa e a cultura foi transferida para tubos falcon, onde posteriormente foram adicionados 10ml de acetato de etila. O material foi agitado manualmente por 20 minutos e mantido em repouso por uma noite. Em seguida, foi realizada a concentração a vácuo em SpeedVac (40min a 45°C), para obtenção do extrato bruto.

4.10. Atividade antitumoral do extrato bruto

Os isolados celulares de tumores sólidos (HCT 116 e MCF 7) foram plaqueadas 2×10^3 células por poço, em placas de 96 poços (1×10^4 células/ml em 200 μ L de meio para HCT 116) e 10×10^3 células por poço, em placas de 96 poços (5×10^4 células/mL em 200 μ L de meio, para a linhagem MCF 7). Após 24 horas, o extrato bruto foi adicionado em concentrações de 100 μ M a 0,0064 μ M, cada concentração em duplicata, e incubado por 69 horas. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações de 0,0032 a 50 μ M e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após 69 horas de incubação, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo formazan de MTT foi dissolvido em 150 μ L de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (MOSMANN, 1983). Os valores de concentração inibitória média (IC50) juntamente com intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 5.

4.11. Determinação da atividade antioxidante total

4.11.1. Captura do radical livre ABTS

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS de foi realizada em espectrofotômetro. Preparou-se o radical ABTS a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL da solução de persulfato de potássio (140 mM) e manteu-se em temperatura ambiente no escuro por 16 horas. Após o tempo necessário diluiu-se 1 mL da mistura em álcool etílico até obter a absorbância de 0,7 nm ± 0,05 nm a 734 nm em espectrômetro Shimadzu UV 1800 (Shimadzu® 1800, Kyoto, Japão). Em seguida, construiu-se uma curva padrão de trolox (2.000 µM) com concentrações variando de 100 µM a 2.000 µM. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 30 µL de cada solução de trolox (100 µM, 500 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2.000 µM) para tubos de ensaio e misturou-se 3,0 mL da solução do radical ABTS. Em seguida, homogeneizou-se em vórtex e após 6 min da mistura realizou-se as leituras a 734nm. Utilizou-se o álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. Para a determinação da atividade antioxidante na amostra repetiu-se o mesmo procedimento acima com a diluição do extrato (RE et al., 1999). O percentual de inibição foi calculado conforme a Equação 1 e a concentração final expressa em µM Trolox /g. A análise foi realizada em triplicata.

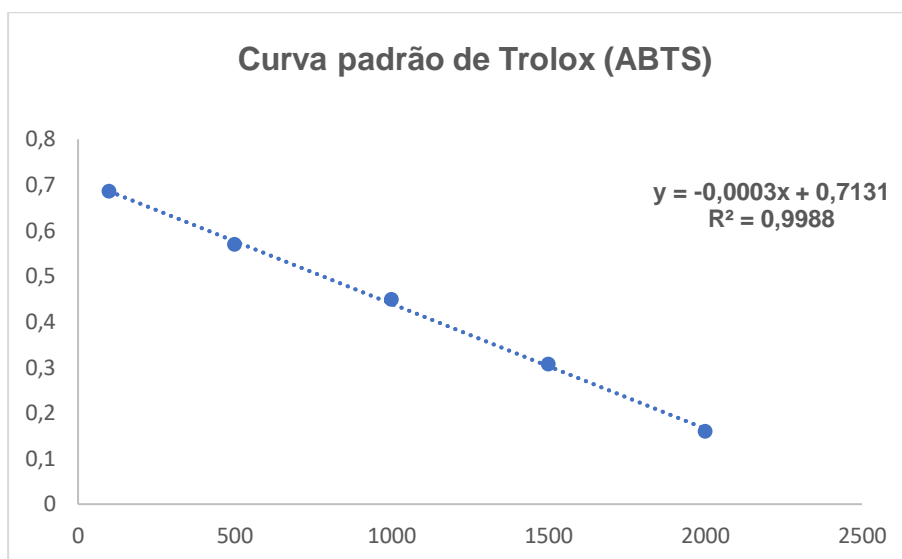
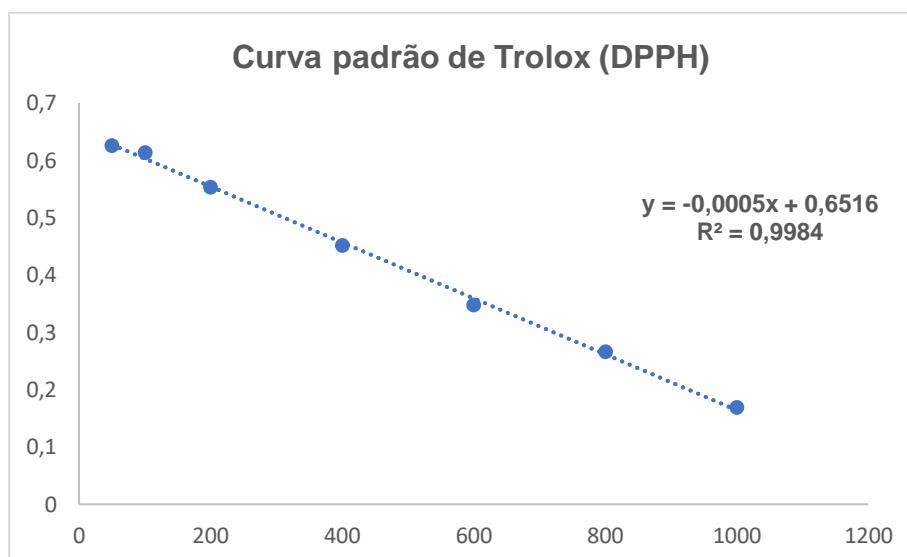
Equação 1

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

4.11.2. Captura do radical DPPH

A atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi realizada em espectrofotômetro UV 1800 (Shimadzu®, Kyoto, Japan) a um comprimento de onda de 515 nm. Preparou-se a solução do radical DPPH a partir de 24 mg de DPPH em 100 mL de etanol. Em seguida retirou-se 10 mL da solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com etanol para obtenção da solução trabalho. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 150 µL da amostra para tubos de ensaio, misturou-se com 5.085 mL do radical DPPH da solução trabalho e homogeneizou-se em vórtex. Após 30 minutos de reação realizou-se a leitura em espectrofotômetro. Utilizou-se o álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. A atividade antioxidante foi calculada baseando-se em uma curva padrão de Trolox (50µM-1000 µM). O percentual de inibição foi calculado conforme equação 1 e a concentração final expressa em µM Trolox /g (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Curvas:

ABTS**DPPH****4.12. Caracterização química do extrato bruto**

O extrato bruto obtido foi submetido a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa, a partir de uma eluição gradiente, tendo como constituintes da fase móvel, H₂O e como solvente orgânico Acetonitrila (ACN), segundo Snyder e Dolan (1997), via HPLC em Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC) usando coluna C18 Gemini Phenomenex[®] (250 x 0,46mm, 5µm, Å) acoplada a uma pré-coluna C18 da Phenomenex[®] (4 x 3mm, 5µm, Å). A separação dos compostos foi monitorada por um detector de fotodiodo UV-Vis a 280 nm.

Foi também realizada análise química por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) para identificação de compostos orgânicos voláteis.

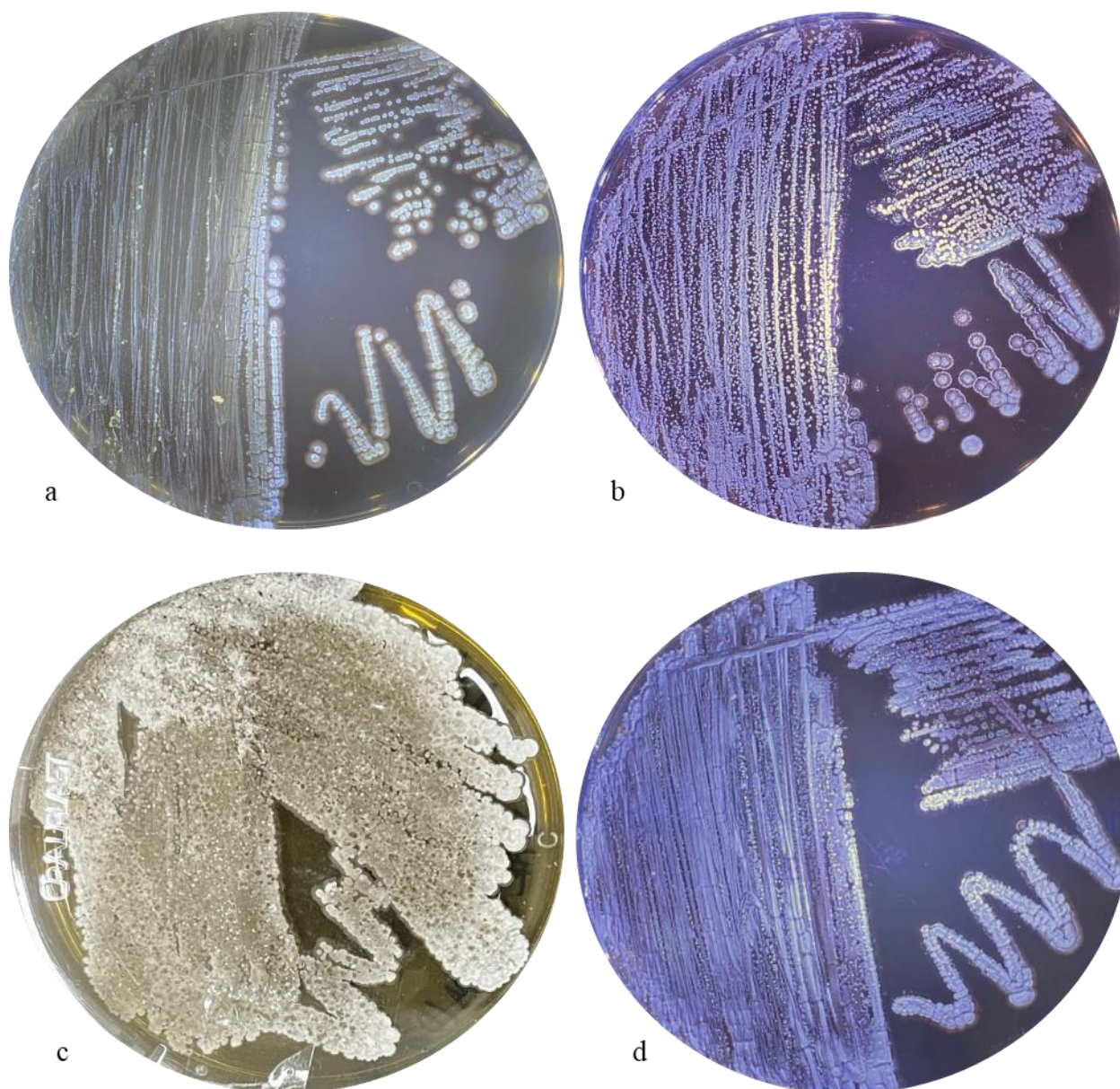
A análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os extratos foram diluídos em solvente diclorometano ($\mu\text{g/mL}$) e a detecção foi feita em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas da marca Shimadzu GC-MS2020 com uma coluna da marca JWDB5MS, 0.25mm/0.25 micra, Fluxo 1,8 ml/min, Temperatura inicial do injetor 50°C-280°C (com rampa de 3°C/min) ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane) - 30m. Os perfis de clivagem dos compostos da cromatografia foram comparados ao banco de dados NIST4, o qual reportou as moléculas com maiores similaridades.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das actinobactérias

Foram isoladas 4 linhagens de actinobactérias, nomeadas como VAR1, VAR2, VAR4 e VAR5. Estas foram identificadas nas placas de isolamento a partir de características morfológicas inerentes a actinobactérias. Na figura 7 é possível observar a característica macromorfológicas destes isolados.

Figura 7 - Registros fotográficos dos isolados semeados no formato “esgotamento”, em Ágar ISP2. a: VAR1, b: VAR2, c: VAR4, d: VAR5.



Fonte: a autora.

Em um estudo metagenômico de uma região de várzea amazônica, Câmara dos Reis e colaboradores (2019) encontraram o filo *Actinomycetota* como o mais abundante nas amostras, seguido dos filios *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, *Nitrospirota*, *Acidobacteriota* e *Betaproteobacteria*. Já Golovchenko e colaboradores (2022), encontram o gênero *Streptomyces* como componente majoritário da microbiota de amostras de solos de várzea na Rússia. A ocorrência de actinobactérias em solos de várzea já é conhecida, porém, este é o primeiro estudo que envolve o isolamento e traz dados sobre a diversidade metabólica e atividade biológica de actinobactérias do gênero *Streptomyces* isolada de solo de várzea amazônica.

5.2.Caracterização Morfológica

Os isolados foram caracterizados macromorfológicamente após observação dos aspectos visuais das colônias obtidos após o cultivo. As informações sobre a morfologia estão na tabela 2.

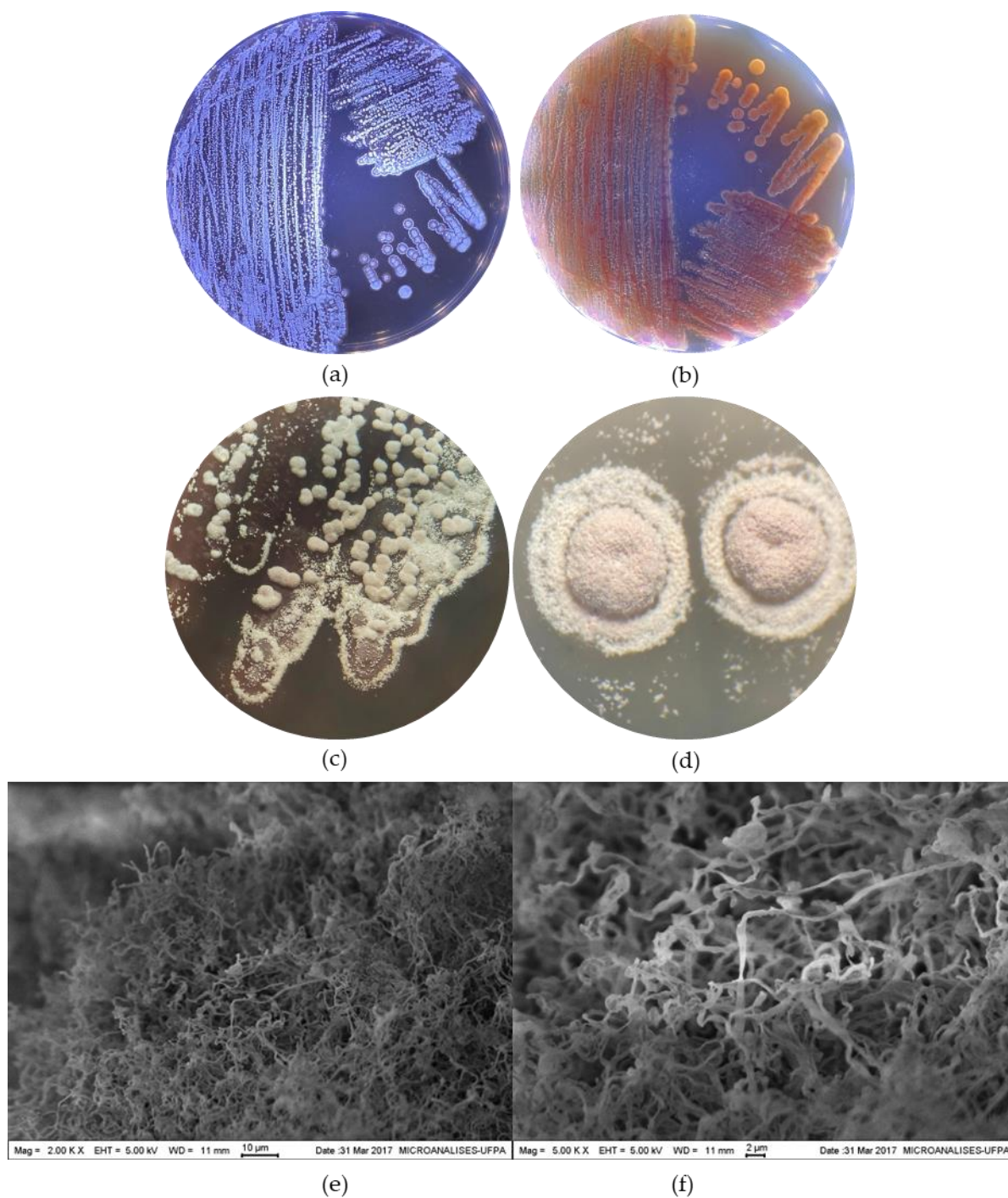
Tabela 2 - Características morfológicas dos isolados isoladas

	Micélio aéreo	Micélio vegetativo	Cadeira de esporos
VAR 1	Branco	Amarelo	<i>Retinaculum apertum</i>
VAR 2	Branco/Rosa	Coral	<i>Retinaculum apertum</i>
VAR 4	Branco/Cinza	Amarelo	<i>Retinaculum apertum</i>
VAR 5	Branco	Vinho	<i>Retinaculum apertum</i>

Fonte: a autora

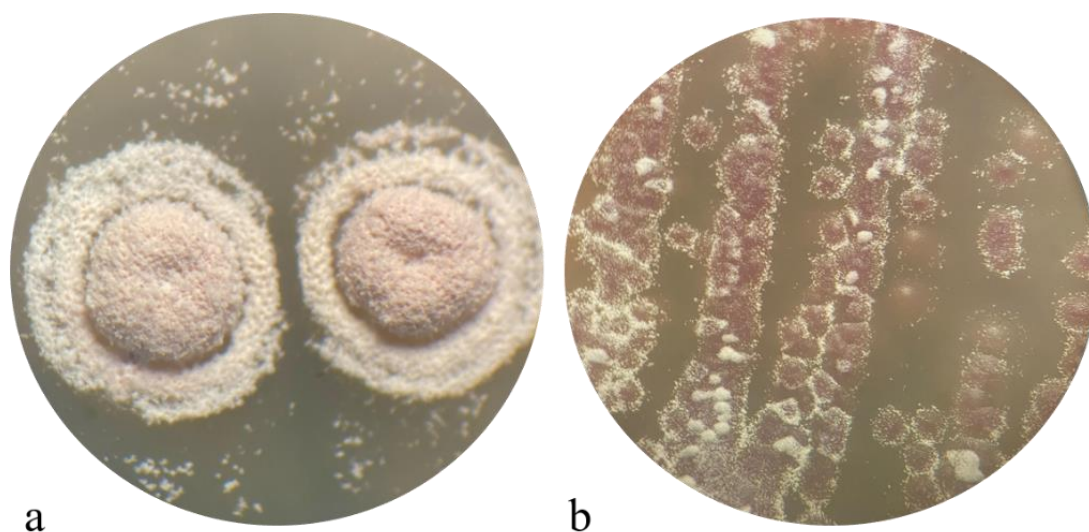
As colônias apresentaram micélios aéreos com aspecto aveludado e pulverulento, característicos de actinobactérias, variando sua cor entre branco, cinza e vinho. Os isolados formaram colônias bem aderidas ao meio, com aspecto seco e não viscoso, como pode ser observado nas figuras 7 e 8. A microscopia eletrônica de varredura (figura 8) revelou a organização de esporos do tipo *Retinaculum apertum* para todos os isolados. Este é um formato de cadeia de esporos comum a actinobactérias principalmente do gênero *Streptomyces* de acordo com Pridham e colaboradores (1958).

Figura 8 - morfologia do isolado VAR2; a: micélio aéreo; b: micélio vegetativo; c: registro de colônia em lupa eletrônica; d: registro de colônia em lupa eletrônica; e: microscopia eletrônica de varredura em escala 10 µm; f: microscopia eletrônica de varredura em escala 2 µm.



A linhagem *Streptomyces* sp. VAR2 produz um pigmento de cor alaranjado no micélio vegetativo, levemente excretado no meio de cultura, enquanto a linhagem VAR5 produz um pigmento cor de rosa de tom escuro no micélio vegetativo, excretado no meio de cultura e modificando a coloração deste, como indicado na figura 9.

Figura 9: isolados demonstrando produção de pigmento em suas colônias. A: VAR2 apresentando colônia levemente cor de rosa; b: VAR5 demonstrando micélio aéreo branco e micélio vegetativo de cor rosa escuro.



5.3. Produção de enzimas

Todos os isolados apresentaram produção de enzimas de interesse biotecnológico, com destaque para VAR1 e VAR2, que apresentaram os maiores índices enzimáticos para a produção da enzima Lipase. Os índices enzimáticos para lipase, esterase e hemolisina, bem como os resultados para produção de gelatinase estão na tabela 3.

Tabela 3 - Índices enzimáticos dos isolados de actinobactérias (IE: índice enzimático; +: positivo para produção; -:negativo para produção)

	Lipase (IE)	Esterase (IE)	Hemolisina (IE)	Gelatinase (IE)
VAR1	3,79	2,66	1,36	+
VAR2	3,77	2,42	1,95	+
VAR4	1,9	1,97	1,89	+
VAR5	2,78	2,48	1,13	+

Fonte: a autora

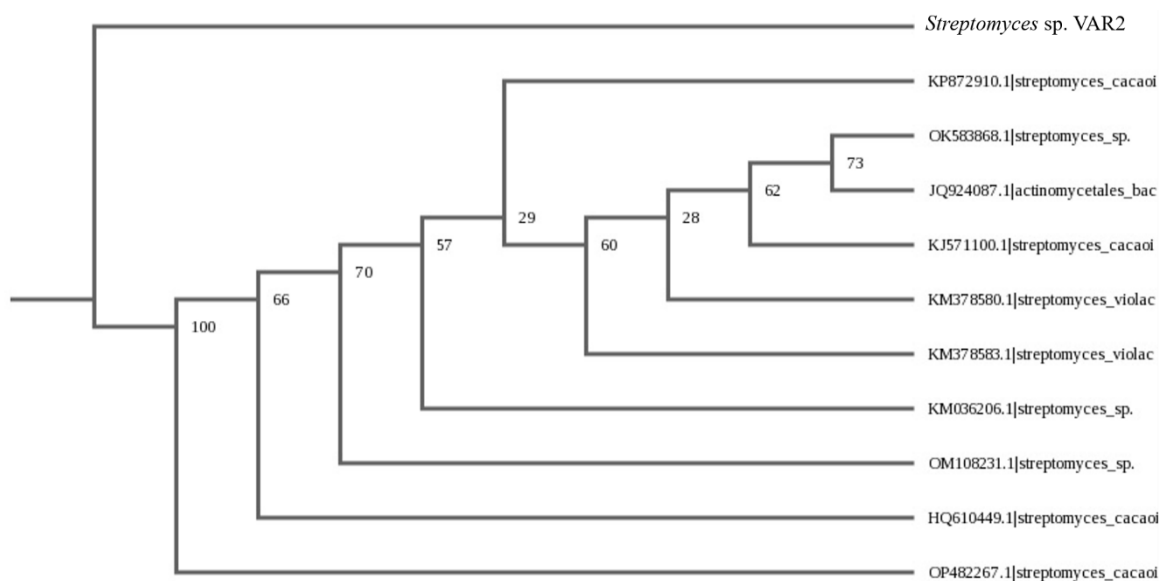
São consideradas com potencial enzimático aqueles isolados que apresentam índice enzimático acima de 1,5. Neste estudo, todos os isolados apresentaram índices enzimáticos acima deste valor. As enzimas são catalizadores naturais, necessárias para processos de síntese e reações de degradação e são indispensáveis no metabolismo de todos os organismos. Essas moléculas tem potencial de aplicação em muitas áreas, como agricultura, indústria química,

indústria alimentícia, indústria têxtil, farmacêutica, no processamento da madeira, aplicações analíticas, indústria de cosméticos e controle de poluição ambiental. Al-Dhabi e colaboradores (2020) estudaram a produção extracelular de Lipase por uma cepa de *Streptomyces* isolada de solo da Arábia Saudita, otimizando a produção desta enzima, demonstrando a capacidade desse gênero de bactérias de produzir moléculas de interesse industrial (PATEL, 2023; LIU, 2023; AL-DHABI, 2020)

5.4. Identificação Molecular e Mineração Genômica

Todos os isolados foram identificados a nível de gênero, como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Como pode ser observado na figura 10, o isolado *Streptomyces* sp. VAR2 apresentou proximidade filogenética com a cepa *Streptomyces cacaoi*, porém, formou um clado distinto na árvore filogenética, indicando a necessidade de estudos genômicos mais direcionados para avaliar a possibilidade de tratar-se de uma nova espécie.

Figura 10 - Árvore filogenética do isolado *Streptomyces* sp. VAR2



Fonte: a autora

Saygin (2020) ao estudar um isolado de *Streptomyces* isolado de solo de um deserto, encontrou uma cepa que formou um novo clado na árvore filogenética e, ao aprofundar seus estudos, concluiu que se tratava de uma nova espécie, a qual propôs a denominação *Streptomyces cahuitamycinicus* sp. nov.

Nos estudos de mineração genômica, foi constatada, no isolado *Streptomyces* sp. VAR2, a presença dos clusters gênicos PKSI, PKSII e NRPS. PKS (policetídeo sintase) e

NRPS (peptídeo não-ribossomais sintetases) que são clusters gênicos envolvidos na biossíntese de moléculas do metabolismo secundário com atividade antimicrobiana. Peng e colaboradores (2020), ao estudarem cepas de *Streptomyces* isoladas de solo rizosférico de *Panax notoginseng* encontraram a presença dos genes PKS e NRPS, além de observarem a produção de metabólitos secundários com ação antibacteriana e antifúngica.

Pesquisas sobre a identificação de metabólitos secundários de microrganismos produzem um grande número de informações sobre metabólitos biologicamente ativos que podem vir a ser opções terapêuticas. Atuando como importante ferramenta, e com o auxílio da bioinformática, a prospecção de genes (mineração genômica) tem sido cada vez mais utilizada para a descoberta de moléculas bioativas (SALWAN, 2020).

5.5. Atividade antimicrobiana

Nos ensaios de antagonismo, foi possível observar resultados positivos promissores de atividade antimicrobiana frente à patógenos de interesse clínico humano. Na tabela 4, podem ser observados os resultados, expressos em milímetros (mm).

Tabela 4 - Halos de inibição em mm dos isolados *Streptomyces* sp. VAR frente a patógenos de interesse clínico

Isolado	VAR1	VAR2	VAR4	VAR5
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27859	0	0	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	0	0	13	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC4352	11	0	0	0
<i>Salmonella enteritidis</i> INCQS00268	0	0	14	0
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	0	16	12	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC700669	13	15	12	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC10100	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC14458	12	15	14	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	13	13	17	0
<i>Micrococcus lutteus</i> ATCC7468	12	16	0	14
<i>Streptococcus equi</i> CBMAI265	14	12	0	12
<i>Aeromonas hydrophyla</i> INCQS00318	14	18	0	11
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC28109	0	12	0	0
<i>Candida albicans</i> ATCC102642	12	15	0	0

Fonte: a autora.

Foi observada uma grande variedade de atividade inibitória para diversos microrganismos, com destaque para o isolado *Streptomyces* sp. VAR2, que apresentou os melhores resultados para o maior número de patógenos testados, como o halo de inibição de

18mm frente a *Aeromonas hydrophyla*, e de 16mm para *Proteus vulgaris*, por exemplo. Por isso, este isolado foi escolhido como o mais promissor.

As bactérias do gênero *Streptomyces* são consideradas biofábricas de metabólitos secundários, uma vez que são responsáveis pela produção de antibióticos bastante populares na medicina, como estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina, usados na terapia de quadros infecciosos ao redor do mundo (ALAM, 2022). O isolado *Streptomyces* sp. VAR2 apresentou boa variabilidade de atividade antimicrobiana frente a patógenos de interesse clínico humano, entre bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e um fungo, evidenciada por um halo de inibição de 15mm frente a *Staphylococcus aureus*, e 18mm frente a *Aeromonas hydrophyla*, bem como uma inibição de 15mm frente a *Candida albicans*. Estudos recentes evidenciam a capacidade dessas bactérias de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, como o de BISWAS e colaboradores (2022) que encontraram resultados positivos ao testar metabólitos produzidos por actinobactérias isoladas na Índia frente a patógenos de interesse clínico. Lima e colaboradores (2021) também encontraram resultados positivos ao testarem a atividade antimicrobiana de uma linhagem de actinobactéria isolada de solo da Amazônia frente a patógenos de interesse clínico.

5.6. Atividade antitumoral

O extrato bruto obtido do isolado *Streptomyces* sp. VAR2 promoveu a inibição do crescimento celular das amostras testadas em linhagem de carcinoma colorretal humano (HCT116) em 95,87% em uma concentração de 10 µg/ml.

Esforços coletivos da comunidade acadêmica trouxeram à tona uma série de medicamentos com origem em produtos naturais para o tratamento do câncer, e essa busca segue até os dias atuais. Os microrganismos também têm se mostrado grandes agentes na busca por novas opções de fármacos anticâncer. Algumas cianobactérias, por exemplo, produzem compostos anticâncer como a dolastina 10, curacina A e criptoficina. Além disso, trabalhos recentes têm identificado compostos com ação anticâncer produzidos por actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces* (BARZKAR, 2019; LAW, 2020). O extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp VAR2 apresentou uma capacidade de inibir o crescimento de células de carcinoma colorretal humano em mais de 95% quando testado em uma concentração de 10µg/ml. Bhat (2023) ao testar o extrato bruto de acetato de etila de uma linhagem de *Streptomyces* isolada de solo de caverna frente a linhagens de câncer cervical humano, obteve

inibições percentuais de $41,31 \pm 1,79$, $53,48 \pm 1,79$, $68,51 \pm 1,63$, $78,19 \pm 1,95$ e $92,05 \pm 1,79$ para concentrações de 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

5.7. Determinação da atividade antioxidante total

O extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp VAR2 apresentou uma menor atividade de eliminação de radicais livre de DPPH do que o ácido ascórbico, utilizado como controle neste ensaio, promovendo uma inibição de $7,90\% \pm 0,79$. Já em relação à atividade eliminadora de radicais livres ABTS, o extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2 apresentou uma faixa de inibição de $20,75 \pm 2,14$. Os dados de inibição (%) são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados dos testes de determinação da atividade antioxidante total

Amostras	ABTS		DPPH	
	Concentração ($\mu\text{M/Trolox/g}$)	Inibição (%)	Concentração ($\mu\text{M/Trolox/g}$)	Inibição (%)
Ácido ascórbico	$2380,04 \pm 10,96$	$91,31 \pm 0,02$	$1132,68 \pm 9,56$	$85,54 \pm 0,01$
VAR 2	$564,47 \pm 54,88$	$20,75 \pm 2,14$	$101,69 \pm 10,51$	$7,90 \pm 0,79$

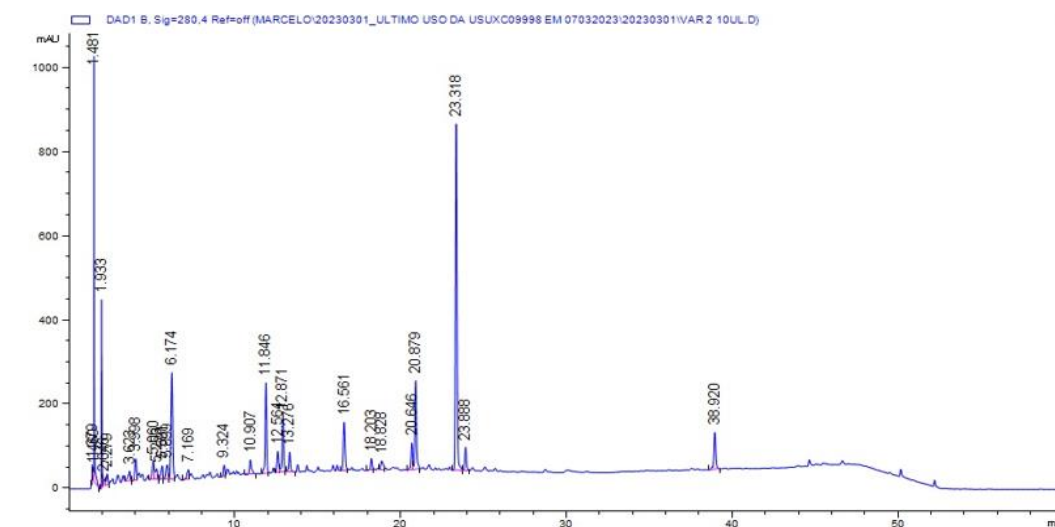
Fonte: a autora

As bactérias do gênero *Streptomyces*, conhecidas por sua alta capacidade de produzir compostos bioativos de interesse industrial, tem também demonstrando capacidade de produção de compostos com ação antirradicalar, como proposto por Paudel e colaboradores (2021). Este grupo estudou uma cepa de *Streptomyces* isolada de solo de um rio na Índia, da qual o extrato bruto de acetato de etila apresentou uma taxa de eliminação de radicais livres de DPPH de 90%. O extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp VAR2 apresentou menor atividade de eliminação de radicais livre de ABTS e DPPH do que o ácido ascórbico, uma vez que foi utilizado em concentrações menores ($2380,04 \mu\text{M/Trolox/g}$ de ácido ascórbico versus $564,47 \mu\text{M/Trolox/g}$ de extrato para o ensaio ABTS; $1132,68 \mu\text{M/Trolox/g}$ de ácido ascórbico versus $101,69 \mu\text{M/Trolox/g}$ de extrato para o ensaio DPPH), e promoveu taxas de $20,75\% \pm 2,14$ e $7,90\% \pm 0,79$ de eliminação de radicais livres para ABTS e DPPH, respectivamente. Rammali (2022) ao estudar isolados de *Streptomyces* de solos frios do Marrocos, obteve resultados na faixa de 29-35% de inibição ao testar a atividade eliminadora de radicais livres ABTS de extratos de diclorometano (PAUDEL, 2021; RAMMALI, 2022).

5.8. Análise do extrato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Após a análise via CLAE do extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2, foi possível obter o perfil dos compostos presentes. É indicada a presença de constituintes que apresentam um caráter de média a alta polaridade, uma vez que foram identificados ao início da análise, evidenciando uma alta afinidade pela fase móvel, com pouca retenção na coluna. A seguir, nas figuras 10 e 11, é possível observar os perfis cromatográficos dos isolados.

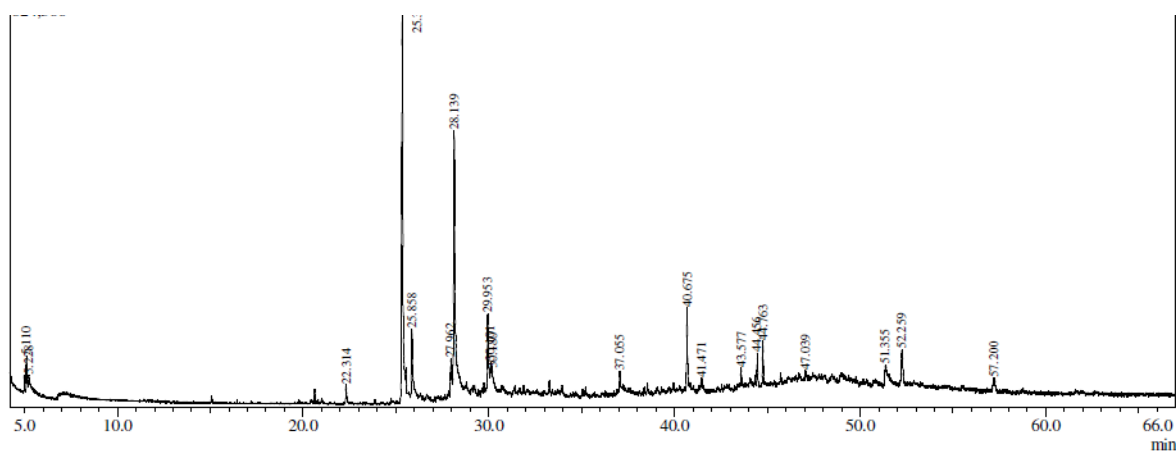
Figura 11- Cromatograma do extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2



Fonte: a autora, 2023

5.9. Análise do extrato por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas - CG-EM

Figura 11 - Cromatograma do extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2.



A caracterização química por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas revelou os compostos presentes no extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2. O cromatograma revelou a presença de 20 compostos em uma corrida cromatográfica de 66 minutos e desses, 8 deles foram picos característicos de possíveis moléculas bioativas já descritas.

O composto majoritário, ou seja, com maior pico, foi o 2-Decanol, éter metílico, ainda não reportado na literatura como bioativo, seguido pelo 2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico, composto já descrito na literatura com atividade antioxidante (BEGUM, 2017). A relação de compostos, porcentagem de área, fórmula química e atividade biológica estão listados na tabela.

Tabela 6: compostos, porcentagem de área, fórmula química e atividade biológica dos compostos identificados no extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2.

Tempo de retenção (min)	Area (%)	Peso Molecular (g/mol)	Formula Molecular	Nome do composto	Atividade biológica reportada
5.110	1.73	146	C ₆ H ₁₀ O ₄	1,1-Etanodiol, diacetato	Não relatado
5.228	0.88	104	C ₅ H ₁₂ O ₂	1,2-Pentanodiol	Atividade antimicrobiana (MORI, 2003)
22.314	1.51	218	C ₁₄ H ₁₈ O ₂	Acetato de cis-3-hexenilo fenil	Não relatado
25.345	36.39	172	C ₁₁ H ₂₄ O	2-Decanol, éter metílico	Não relatado
25.858	4.56	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido octadecanóico	Não relatado
27.962	2.47	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Ácido pentadecanóico	Atividade anti-biofilme (GALDIERO, 2021)
28.139	20.65	652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico	Atividade antioxidante (BEGUM, 2017)
29.953	6.45	652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico	Atividade antioxidante (BEGUM, 2017)
30.101	2.26	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade antioxidante (SER, 2015)
30.180	1.47	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade antioxidante (SER, 2015)

37.055	1.03	396	C ₂₄ H ₄₄ O ₄	Ácido fumárico, éster 3,3-dimetilbut-2-il tetradecil	Não relatado
40.675	5.74	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de bis(2-etilhexil)	Não relatado
41.471	1.08	398	C ₂₂ H ₃₂ F ₂ O ₄	Ácido oxálico, éster 3,5-difluorofenil tetradecil	Não relatado
43.577	1.14	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ácido 1,4-benzenodicarboxílico, éster bis(2-etilhexil)	Não relatado
44.456	2.00	426	C ₂₆ H ₅₀ O ₄	Ácido decanodióico, éster bis(2-etilhexil)	Não relatado
44.763	2.56	410	C ₃₀ H ₅₀	Esqualeno	Atividade antioxidante (MICERA, 2020); efeito hipocolesterolômico (IBRAHIM, 2020)
47.039	0.89	278	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ S	Ácido sulfuroso, éster hexiloctílico	Não relatado
51.355	1.36	336	C ₁₈ H ₂₄ O ₆	Ácido diglicólico, éster 2-acetilfenil isohexílico	Não relatado
52.259	3.63	332	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	Acetato de 5-(1-isopropenil-4,5-dimetilbicyclo[4.3.0]nonan-5-il)-3-metil-2-pentenol	Atividade antioxidante (KARAKOTI, 2022)
57.200	2.21	360	C ₂₆ H ₄₈	Antraceno, 9-dodeciltetradecahidro-	Não relatado

Fonte: Autora, 2023

No perfil de compostos presentes no extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2 foram revelados 20 compostos no intervalo de 66 minutos, sendo 8 deles picos sugestivos de moléculas bioativas já descritas. O principal composto foi o 2-Decanol, éter metílico, ainda não reportado na literatura como bioativo, seguido pelo 2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico, composto já descrito na literatura com atividade antioxidante por Abirami e colaboradores em 2022. Manigundan e colaboradores (2020) identificaram a presença de 2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico como composto majoritário em extrato bruto de acetato de etila de uma linhagem de *Streptomyces* isolada de solo rizosférico de *Capsicum annum*, que demonstrou capacidade de promover crescimento de plantas além de apresentar atividade antifúngica. Outros estudos também identificaram o 2,6-dihexadecanoato de ácido l-(+)-ascórbico em extratos de *Streptomyces* sp com atividade antimicrobiana, antioxidante e anticâncer (CHAKRABORTY et al., 2023).

Outros compostos bioativos foram identificados no extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2, como o Acetato de 5-(1-isopropenil-4,5-dimetilbicyclo[4.3.0]nonan-5-il)-3-metil-2-pentenol, que também aparece como componente de extratos com atividade antioxidante (KARAKOTI et al., 2022) e antifúngica (AI et al., 2014).

Além desses, foi revelada também a presença do composto Esqualeno, um agente antioxidante (MICERA, 2020), hipocolesterolêmico e cardioprotetor que é geralmente encontrado em óleo de fígado de tubarão, mas que tem sido cada vez mais procurado em outras fontes naturais (IBRAHIM, 2020). Dentre essas fontes, estão os microrganismos, que se apresentam como fonte promissora para a produção sustentável do Esqualeno. *S. cerevisiae*, *E. coli*, *C. glutamicum* e *Y. lipolytica* são algumas das espécies utilizadas como plataformas de produção de Esqualeno (PARAMASIVAN, 2022).

O composto Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)- também foi encontrado no extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp. VAR2. Esse composto foi observado em extratos com atividade antimicrobiana e anticâncer produzidos por *Staphylococcus xylosus* (MANGROLIA, 2020) e *Streptomyces achromogenes* (TANGJITJAROENKUN, 2021).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram isoladas, pela primeira vez, actinobactérias do gênero *Streptomyces* de solo de várzea da Amazônia. Foram isoladas 4 cepas pertencentes a este gênero, que apresentaram características morfológicas inerentes ao grupo das actinobactérias, além de apresentarem atividade antimicrobiana. O isolado *Streptomyces* sp VAR2 foi selecionado como o mais promissor, e a partir dele foi preparado o extrato bruto, que apresentou atividade antitumoral e antioxidante. O extrato acetato bruto foi analisado via cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e revelou a presença de compostos de média a alta polaridade, bem como de moléculas com perfis de bioatividade, como antimicrobiano, antibiofilme e antioxidante. Esses resultados indicam a capacidade dessas bactérias de produzirem compostos com uma variada atividade biológica, podendo vir a transformar-se em opções terapêuticas para problemas de saúde global emergentes como a resistência microbiana e o tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

ABIRAMI, Dhandapani; GOMATHI, R. Target and candidate agents for diabetes treatment in the framework of the food nexus. **Energy Nexus**, v. 5, p. 100041, 2022.

ABUSHAHEEN, Manar Ali et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.

AI, Hong-Wei et al. Antifungal properties and chemical analysis of essential oil from Vitex negundo seeds. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 5, p. 541-548, 2014.

ALAM, Khorshed et al. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 968053, 2022.

AL-DHABI, Naif Abdullah et al. Isolation and screening of Streptomyces sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 1, p. 474-479, 2020.

AL-SHAIBANI, Muhanna Mohammed et al. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum actinobacteria and its therapeutic applications. **Molecules**, v. 26, n. 15, p. 4504, 2021.

BARZKAR, Noora et al. Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 464, 2019.

BEGUM, SM Fazeela Mahaboob et al. Novel anticancerous compounds from Sargassum wightii: In silico and in vitro approaches to test the antiproliferative efficacy. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research| Jul-Sep**, v. 7, n. 3, 2017.

BHAT, Meghashyama Prabhakara; NAYAKA, Sreenivasa. Cave soil Streptomyces sp. strain YC69 antagonistic to chilli fungal pathogens exhibits in vitro anticancer activity against human cervical cancer cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 10, p. 6232-6255, 2023.

BISWAS, Kaushik et al. Evaluation of antimicrobial activity of the extract of Streptomyces euryhalinus isolated from the Indian Sundarbans. **Archives of Microbiology**, v. 204, p. 1-9, 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 1995, 28, 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

CAMARA DOS REIS, Mariana et al. Spatial heterogeneity and hydrological fluctuations drive bacterioplankton community composition in an Amazon floodplain system. *PLoS One*, v. 14, n. 8, p. e0220695, 2019.

CHAKRABORTY, Bidhayak et al. *Streptomyces filamentosus* strain KS17 isolated from microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens. *Process Biochemistry*, v. 117, p. 42-52, 2022

DADGOSTAR, Porooshat. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*, p. 3903-3910, 2019.

DHANASEKARAN, Dharumadurai; JIANG, Yi (Ed.). Actinobacteria: basics and biotechnological applications. *BoD–Books on Demand*, 2016.

DONALD, Lavinia 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.

FALESI, I. C. O solo da Amazônia e sua relação com a definição de sistemas de produção agrícola. 1974.

GALDIERO, E. et al. Pentadecanoic acid against *Candida albicans*-*Klebsiella pneumoniae* biofilm: Towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Research in microbiology*, v. 172, n. 7-8, p. 103880, 2021.

GOI, Silvia Regina; SOUZA, Francisco A. de. Diversidade de microrganismos do solo. *Floresta e Ambiente*, v. 13, p. 46-65, 2023.

GOLOVCHENKO, A.V.; Gracheva, T.A.; Lypcan, V.A.; Dobovol'skaya, T.G.; Manucharova, N.A. Actinomycete Complexes in Eutrophic Peatlands. *Eurasian Soil Sci.* 2022, 55, 1064–1073, doi:10.1134/S1064229322080026.

GRASSO, Letizia Lo; MARTINO, Delia Chillura; ALDUINA, Rosa. Production of antibacterial compounds from Actinomycetes. *Actinobacteria-basics and biotechnological applications*, v. 7, p. 177-98, 2016.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; DING, Jian. Natural products in cancer therapy: Past, present and future. **Natural products and bioprospecting**, v. 11, p. 5-13, 2021.

HUTCHINGS, Matthew I.; TRUMAN, Andrew W.; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current opinion in microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

IBRAHIM, Walaa M. et al. Exploring the antimicrobial, antiviral, antioxidant, and antitumor potentials of marine *Streptomyces tunisiensis* W4MT573222 pigment isolated from Abu-Qir sediments, Egypt. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 1-17, 2023.

IBRAHIM, Nurul 'Izzah et al. The efficacy of squalene in cardiovascular disease risk-a systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 414, 2020.

ICHIKAWA, Takatoshi et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia microbiologica*, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

JOSE, Polpass Arul; MAHARSHI, Anjisha; JHA, Bhavanath. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126708, 2021.

JÚNIOR, Nicolau da Silva Beltrão. **Análise da estrutura da cadeia produtiva de óleos vegetais florestais: um estudo no estado do Pará, Amazônia Brasileira**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade do Porto (Portugal).

KARAKOTI, Himani et al. Phytochemical profile, in vitro bioactivity evaluation, in silico molecular docking and ADMET study of essential oils of three *Vitex* species grown in Tarai Region of Uttarakhand. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, p. 1911, 2022.

KOHLER, Marisa Regina et al. O desmatamento da Amazônia brasileira sob o prisma da pecuária: a degradação dos recursos hídricos no contexto da região norte de Mato Grosso. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 11, p. e66101119252-e66101119252, 2021.

KUMAR, Munendra et al. Potential applications of extracellular enzymes from *Streptomyces* spp. in various industries. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1597-1615, 2020.

KUPIECKI, Floyd P.; COON, Minor J. The enzymatic synthesis of β -aminoisobutyrate. A product of valine metabolism, and of β -alanine, a product of β -hydroxypropionate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 229, n. 2, p. 743-754, 1957.

LAW, Jodi Woan-Fei et al. Anticancer drug discovery from microbial sources: The unique mangrove streptomycetes. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5365, 2020.

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.

LIU, Xiangyang; KOKARE, Chandrakant. Microbial enzymes of use in industry. In: *Biotechnology of microbial enzymes*. **Academic Press**, 2023. p. 405-444.

LIU, W.; Ahlert, J.; Gao, Q.; Wendt-Pienkowski, E.; Shen, B.; Thorson, J.S. Rapid PCR Amplification of Minimal EneDiyne Polyketide Synthase Cassettes Leads to a Predictive Familial Classification Model. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2003, 100, 11959–11963, doi:10.1073/pnas.2034291100

LOBO JÚNIOR, M.; DE SOUZA, J. N. G.; DOS SANTOS, A. B. Processos biológicos e densidade de microrganismos em solo de várzea tropical cultivado com forrageiras para implantação do arroz no sistema plantio direto. 2004.

MANGROLIA, Upasana; OSBORNE, W. Jabez. *Staphylococcus xylosum* VITURAJ10: Pyrrolo [1, 2 α] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)(PPDHMP) producing, potential probiotic strain with antibacterial and anticancer activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104259, 2020.

MANIGUNDAN, K. et al. Identification of biostimulant and microbicide compounds from *Streptomyces* sp. UC1A-3 for plant growth promotion and disease control. 2020.

MANIKKASUNDARAM, Vaishnavi et al. Production and characterization of glycolipid biosurfactant from *Streptomyces enissocaesilis* HRB1 and its evaluation for biomedical and bioremediation applications. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 26, n. 4, p. 491-503, 2023.

MARTINO, Emanuela et al. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 4, p. 701-707, 2017.

MICERA, Marco et al. Squalene: More than a step toward sterols. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 688, 2020.

MORI, Noriko et al. Possibility of Antiseptic Formula Employing Pionin Combination with 1, 2-Pentanediol in the Cosmetic Field. **Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan**, v. 37, n. 2, p. 92-99, 2003.

MORRISON, Lindsay; ZEMBOWER, Teresa R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NADEEM, Syeda Fatima et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 578-599, 2020.

Nobre, C. A., Sampaio, G., Borma, L. S., Castilla-Rubio, J. C., Silva, J. S., & Cardoso, M. (2016). Land-use and climate change risks in the Amazon and the need of a novel sustainable development paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 10759-10768. www.pnas.org/content/113/39/10759.full/.

PARAMASIVAN, Kalaivani; MUTTURI, Sarma. Recent advances in the microbial production of squalene. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 91, 2022.

PATEL, Anil Kumar et al. Production, purification, and application of microbial enzymes. In: *Biotechnology of microbial enzymes*. **Academic Press**, 2023. p. 25-57.

PAUDEL, Babita et al. Maculosin, a non-toxic antioxidant compound isolated from *Streptomyces* sp. KTM18. **Pharmaceutical biology**, v. 59, n. 1, p. 931-934, 2021.

PENG, Fei et al. Insights into *Streptomyces* spp. isolated from the rhizospheric soil of *Panax notoginseng*: isolation, antimicrobial activity and biosynthetic potential for polyketides and non-ribosomal peptides. **BMC microbiology**, v. 20, p. 1-16, 2020.

PRIDHAM, T. G.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. **Applied microbiology**, v. 6, n. 1, p. 52-79, 1958.

RAMMALI, Said et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Streptomyces* species from soils of three different cold sites in the Fez-Meknes region Morocco. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 17233, 2022.

RE, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radic. Biol. Med.** 1999, 26, 1231–1237, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

REX, M. Camil et al. Production of Vitamin B 12 from *Streptomyces* Species. **Methods in Actinobacteriology**, p. 661-666, 2022.

ŞAHİN, Nurettin; UĞUR, Aysel. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turkish Journal of Biology*, v. 27, n. 2, p. 79-84, 2003.

SALWAN, Richa; SHARMA, Vivek. Bioactive compounds of *Streptomyces*: biosynthesis to applications. **Studies in natural products chemistry**, v. 64, p. 467-491, 2020.

SAYGIN, Hayrettin et al. *Streptomyces cahuitamycinicus* sp. nov., isolated from desert soil and reclassification of *Streptomyces galilaeus* as a later heterotypic synonym of *Streptomyces bobili*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2750-2759, 2020.

SER, Hooi-Leng et al. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 158812, 2015.

SIEGEL, Rebecca L. et al. Cancer statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin*, v. 71, n. 1, p. 7-33, 2021.

SIERRA, Gonzalo. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 23, p. 15-22, 1957.

STEGER, Kristin et al. Floodplain soil and its bacterial composition are strongly affected by depth. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n. 3, p. fiz014, 2019.

SURETTE, Matthew D.; WRIGHT, Gerard D. Lessons from the environmental antibiotic resistome. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 309-329, 2017.

TANGJITJAROENKUN, Janpen et al. Antibacterial, antioxidant, cytotoxic effects and GC-MS analysis of mangrove-derived *Streptomyces achromogenes* TCH4 extract. **Archives of Biological Sciences**, v. 73, n. 2, p. 223-235, 2021.

WALSH, Christopher; WENCEWICZ, Timothy. Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. **John Wiley & Sons**, 2020.

WHITMAN, William B. et al. (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Springer New York, 2012.

YANG, Liqun et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 8, 2020.

ZHANG, Hongyu et al. Complete genome sequence unveiled cellulose degradation enzymes and secondary metabolic potentials in *Streptomyces* sp. CC0208. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 267-276, 2019.