



**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**

**KARINE RODRIGUES DO NASCIMENTO CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS**  
**OBTIDOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE ROCHAS CARBONÁTICAS**  
**NA AMAZÔNIA**

**SANTARÉM – PA**

**2024**

**KARINE RODRIGUES DO NASCIMENTO CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS  
OBTIDOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE ROCHAS CARBONÁTICAS  
NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Saúde Coletiva  
da Universidade Federal do Oeste do Pará para defesa da  
Pós-graduação em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva.

**SANTARÉM-PA  
2024**

**KARINE RODRIGUES DO NASCIMENTO CHAVES**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS  
OBTIDOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE ROCHAS CARBONÁTICAS  
NA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Oeste do Pará para defesa da Pós-graduação em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva.

Conceito:

Data de Aprovação:

Banca Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sara Freitas de Sousa Ramos

Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA

Prof.<sup>o</sup> Isabella Cristhina Gonçalves Costa

Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Layse Ferreira Sarrazin

Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA



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 \_\_\_\_\_

Aos 02 (dois) dias do mês de abril de 2024 (dois mil e vinte e quatro), às 14h00min., 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 Karine Rodrigues do Nascimento Chaves, intitulada "CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE ROCHAS CARBONÁTICAS 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 mestranda, 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: 09/04/2024 13:24:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Avaliador 1

Documento assinado digitalmente



SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN  
Data: 09/04/2024 16:51:52-0300  
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: 09/04/2024 12:51:45-0300

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

---

Avaliador 3



Documento assinado digitalmente

**SILVIA KATRINE RABELO DA SILVA**

Data: 09/04/2024 13:32:26-0300

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

---

Presidente (Orientador(a))



Documento assinado digitalmente

**KARINE RODRIGUES DO NASCIMENTO CHAVES**

Data: 09/04/2024 13:41:32-0300

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**

**FOLHA DE CORREÇÕES DA DISSERTAÇÃO**

ATA N° \_\_\_\_\_

**NOME DO MESTRANDO(A):** Karine Rodrigues do Nascimento Chaves

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS OBTIDOS DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE ROCHAS CARBONÁTICAS NA AMAZÔNIA

**Banca examinadora:**

Prof. Dra. Sara Freitas de Souza Ramos (Avaliador 1) (Assinatura)

Prof. Dra. Sandra Layse Ferreira Sarrazin (Avaliador 2) (Assinatura)

Prof. Dra. Isabella Cristhina Gonçalves Costa (Avaliador 3) (Assinatura)

Prof. Dra. Silvia Katrine Rabelo da Silva (Presidente) (Assinatura)

Os itens abaixo deverão ser modificados, conforme sugestão da banca

1.  INTRODUÇÃO
2.  REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
3.  METODOLOGIA
4.  RESULTADOS PARCIAIS
5.  FORMATAÇÃO E PADRONIZAÇÃO TEXTUAL
6.  REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

PRINCIPAIS RECOMENDAÇÕES:



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)

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

---

C512c Chaves, Karine Rodrigues do Nascimento  
Caracterização química e atividade biológica de compostos obtidos de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas na Amazônia./ Karine Rodrigues do Nascimento Chaves. -Santarém, 2024.  
59 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. Streptomyces. 2. Microbiodiversidade Amazônica. 3. Potencial biotecnológico. I. Silva, Silvia Katrine Rabelo da, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 577.509811

---

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

## RESUMO

As rochas carbonáticas da Formação Itaituba datam aproximadamente 300 milhões de anos atrás, preservando eventos geológicos e processos biogeoquímicos de degradação de matéria orgânica, sugestiva para a presença de actinobactérias com propriedades ainda não documentadas. Portanto o presente estudo propõe-se a realizar a bioprospecção de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas na Amazônia. Foram avaliados 21 isolados, PML1 à PML21, na produção de substâncias antimicrobianas pela técnica de difusão em ágar contra patógenos para identificar os isolados promissores. A caracterização morfológica e bioquímica ocorreu seguindo o *International Streptomyces Project*. A partir da obtenção dos extratos através do solvente acetato de etila, foi avaliada a ação citotóxica linhagem de células de câncer colorretal humano (HCT-116) atividade e antioxidante dos isolados mais promissores. Em seguida, foi realizado os testes CLAE-DAD e CG-EM. Morfologicamente, a maioria dos isolados apresentou micélio aéreo branco e vegetativo amarelo. Das 21 actinobactérias isoladas, 13 foram ativas contra ao menos um dos 11 patógenos testados, com espectro de ação variando entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Houve destaque para PML5 com halo de  $16 \text{ mm} \pm 0,00$  contra *Salmonella enteridis* INCQS00268, PML11 com halo de  $27 \text{ mm} \pm 0,00$  contra *Micrococcus luteus* ATCC7468 e PML15 com halo de  $17 \text{ mm} \pm 1,0$  contra *Proteus vulgaris* ATCC13315 e  $17 \text{ mm} \pm 0,00$  contra *Aeromonas hydrophyla* INQS00318. Com relação à produção enzimática, os isolados promissores apresentaram índice enzimático para Lipase, Esterase, Caseinase e positividade para Catalase. O teste citotóxico evidenciou a atividade citotóxica de PML5 com uma inibição de 96,5% do crescimento celular da linhagem de células de câncer colorretal humano (HCT-116), sendo, portanto, o isolado mais promissor. Foi constatado, também a ação antioxidante da PML5 pela captura do radical livre ABTS com uma inibição de 35,60%, e pela captura do radical livre DPPH com ação de 10,65%, na concentração testada. O extrato da linhagem PML5 foi analisado por CLAE mostrou a presença de quatro picos, onde houve padrões de absorbância semelhantes indicando a possibilidade do extrato possuir rotas metabólicas sintetizadoras de substâncias da mesma classe. O CG-EM do extrato mostrou a presença de 10 compostos voláteis. O principal composto foi o Ciclododecano em comparação com outros compostos bioativos. Esses resultados demonstram o potencial da biodiversidade amazônica, revelando o isolado de rocha carbonática PML5 como produtora de substâncias antimicrobianas, citotóxicas e antioxidante de interesse para a indústria biotecnológica.

**Palavras Chaves:** *Streptomyces*. Microbiodiversidade Amazônica. Potencial biotecnológico.

## ABSTRACT

The carbonate rocks of the Itaituba Formation date back approximately 300 million years, preserving geological events and biogeochemical processes of degradation of organic matter, suggestive of the presence of actinobacteria with properties not yet documented. Therefore, the present study proposes to perform the bioprospecting of actinobacteria isolated from carbonate rocks in the Amazon. A total of 21 isolates, PML1 to PML21, were evaluated in the production of antimicrobial substances by agar diffusion against pathogens to identify promising isolates. Morphological and biochemical characterization took place following the International Streptomyces Project. From obtaining the extracts through the solvent ethyl acetate, the cytotoxic action of the human colorectal cancer cell line (HCT-116) and antioxidant activity of the most promising isolates was evaluated. Next, the HPLC-DAD and CG-MS tests were performed. Morphologically, most isolates had white airy mycelium and yellow vegetative mycelium. Of the 21 actinobacteria isolated, 13 were active against at least one of the 11 pathogens tested, with a spectrum of action ranging from Gram-positive to Gram-negative bacteria. PML5 with a halo of 16 mm + 0.00 against *Salmonella enteridis* INCQS00268, PML11 with a halo of 27 mm + 0.00 against *Micrococcus luteus* ATCC7468 and PML15 with a halo of 17 mm + 1.0 against *Proteus vulgaris* ATCC13315 and 17 mm + 0.00 against *Aeromonas hydrophyla* INQS00318. Regarding enzyme production, the promising isolates showed enzyme index for Lipase, Esterase, Caseinase and positivity for Catalase. The cytotoxic test showed the cytotoxic activity of PML5 with an inhibition of 96.5% of the cell growth of the human colorectal cancer cell line (HCT-116), being, therefore, the most promising isolate. The antioxidant action of PML5 was also verified by the capture of the free radical ABTS with an inhibition of 35.60%, and by the capture of the free radical DPPH with an action of 10.65%, at the tested concentration. The extract of the PML5 strain was analyzed by HPLC and showed the presence of four peaks, where there were similar absorbance patterns, indicating the possibility of the extract having metabolic pathways that synthesize substances of the same class. The CG-EM of the extract showed the presence of 10 volatile compounds. The main compound was Cyclododecane compared to other bioactive compounds. These results demonstrate the potential of Amazonian biodiversity, revealing the carbonate rock isolate PML5 as a producer of antimicrobial, cytotoxic and antioxidant substances of interest to the biotechnology industry.

**Key words:** *Streptomyces*. Bioinnovation. Biotechnological potential.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1:</b> Mapa da Formação Itaituba.	24
<b>Figura 2:</b> Morfologia dos isolados promissores. (A) Morfologia das colônias de PML5 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias. (B) Morfologia das colônias de PML11 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias. (C) Morfologia das colônias de PML15 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias.	34
<b>Figura 3:</b> Pigmento de PML15 em meio ISP2 após incubação em 30°C por 15 dias.	35
<b>Figura 4:</b> Registro de Microscopia Eletrônica de Varredura, da esquerda para a direita (A) PML5, (B) PML11, (C) PML15.	36
<b>Figura 5:</b> Cromatografia Líquida e Espectrometria de massas do isolado PML5.	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Halos de inibição de crescimento dos isolados frente aos patógenos testados.	32
<b>Tabela 2:</b> Lista de isolados, meio de crescimento, esporulação, cor do micélio aéreo, cor do micélio vegetativo, pigmento e tipos de esporos.	34
<b>Tabela 3:</b> Características enzimáticas (lipase, esterase, amilase, caseinase e catalase) dos isolados de rochas carbonáticas amazônicas.	36
<b>Tabela 4:</b> Utilização das fontes de carbono e nitrogênio pelas linhagens de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas da Amazônia.	38
<b>Tabela 5:</b> Identificação de compostos químicos do isolado PML5 utilizando análise CG-MS.	45

## LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

BIOACTA – Biobanco de Actinobactérias Amazônicas

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectro de Massas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAS – Agar Sabouraud Dextrose

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNAr – Ácido Desoxirribonucleico Ribossômico

DMSO – Dimetilsulfóxido

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

GaTE – Laboratório de Genômica e Elementos de Transposição

HCT116 – Células Tumorais de Câncer do Cólon Retal

HeLa – Células Cancerígenas Cervicais Humanas

IC50 – Concentração Inibitória Média

ISP – International Streptomyces Project

ISP1 – International Streptomyces Project 2

Labmicro – Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará

MCF7 – Células Tumorais de Câncer de Mama

MEGA – Molecular Evolutionary Genetic Analysis

NRPS – Sínteses de Peptídeos não Ribossomais

PKS II – Sintases de Policetídeos II

RNAm – Ácido Ribonucleico Mensageiro

RNA – Ácido Ribonucleico

tRNA – Ácido Ribonucleico Transportador

T47D – Células de câncer de mama

UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)

DPPH – 2,2-difenil1-picrilhidrazina

g.L<sup>-1</sup> – Gramas por Litro

rpm – Rotações por Minuto

μL – Microlitros

μg/mL – Microgramas por Mililitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

μM – Micron

nm – Nanômetro

kV – Kilovolts



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Diversidade Microbiana Amazônica.....	16
2.2 Rochas Carbonáticas Da Formação Itaituba .....	16
2.3 Actinobactérias.....	17
2.4 Gênero Streptomyces .....	18
2.5 Metabólitos secundários com potencial antimicrobiano .....	19
2.6 Metabólitos secundários com potencial antitumoral .....	20
2.7 Metabólitos secundários com potencial antioxidante.....	21
3. OBJETIVO GERAL .....	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	24
5.1 Local de Coleta.....	24
5.2 Avaliação de isolados produtores de substâncias antimicrobianas .....	24
5.3 Caracterização Morfológica E Bioquímica .....	25
5.4 Prospecção de <i>clusters</i> gênicos de síntese de PSK e NRPS .....	26
5.5 Obtenção do extrato .....	27
5.6 Avaliação Da Atividade Citotóxica.....	27
5.7 Avaliação da Atividade Antioxidante .....	28
5.8 Análise de CLAE-DAD do extrato acetatoetilico do isolado promissor.....	29
5.9 Análise do extrato da PML5 por CG-EM .....	29
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
6.1 Seleção do isolado com potencial antimicrobiano .....	31
6.2 Caracterização Morfológica .....	33
6.3 Caracterização Bioquímica .....	36
6.4 Prospecção de clusters gênicos de síntese de PSK e NRPS .....	40

6.4	Avaliação Da Atividade Citotóxica.....	40
6.5	Avaliação da Atividade Antioxidante .....	41
6.6	Análise do extrato bruto da PML5 por CLAE .....	42
6.7	Análise do extrato do isolado PML5 por CG-EM.....	44
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1. INTRODUÇÃO

A bioprospecção representa um campo multidisciplinar voltado para a descoberta e aprimoramento de novos produtos, processos e aplicações a partir de recursos biotecnológicos. Este campo incorpora conhecimentos das áreas de Biologia, Química, Farmacologia, Microbiologia e Ecologia com o intuito de identificar e explorar novos compostos químicos, enzimas e produtos naturais. Dentro do amplo espectro de abordagens e técnicas empregadas na prospecção biológica, destacam-se duas vertentes: a triagem de produtos naturais, que envolve a avaliação da atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante de compostos químicos e o desenvolvimento de novos fármacos (GAUDÊNCIO, *et al.*, 2023).

A exploração de microrganismos ricos em compostos bioativos é uma prática que encontra raízes na literatura desde o século XX, e neste cenário, actinobactérias emergem como uma fonte de metabólitos secundários, caracterizados por suas notáveis propriedades farmacológicas e uma estrutura química excepcionalmente diversificada. Esses microrganismos, de morfologia filamentosa, pertencentes à classe gram-positiva e notáveis por sua elevada proporção de guanina e citosina no DNA, desempenham um papel fundamental na reciclagem de resíduos orgânicos de valor nutricional, além de serem proeminentes na produção de uma vasta gama de metabólitos secundários (YUN *et al.*, 2023).

Adicionalmente, Actinobactérias isoladas de ambientes extremos revelam um potencial em ascensão devido à sua notável adaptação a condições desafiadoras de sobrevivência, o que lhes confere características únicas e propriedades biotecnológicas específicas, razão a qual cerca de 70% dos antimicrobianos de origem natural sejam produzidos por *Streptomyces*. Para corroborar com essa afirmativa, as vias de biossíntese de actinobactérias do gênero *Streptomyces* envolvem enzimas multifuncionais, como as Sintases de Peptídeos Não-ribossômicos (NRPs) e as Sintases de Policetídeos (PKSs). As NRPs desempenham um papel importante na produção de antibióticos, tais como penicilinas, vancomicinas e ciclosporinas, enquanto as PKSs sintetizam eritromicinas e outras substâncias relacionadas (NIELSEN *et al.*, 2022).

Contudo, apesar dos benefícios econômicos e biotecnológicos inerentes aos isolados de actinobactérias, a região amazônica mantém-se relativamente subexplorada nesse âmbito. A extensa biodiversidade e ecossistemas singulares da região sugerem a possibilidade de abrigar *Streptomyces* com propriedades ainda não documentadas. Assim, a bioprospecção de

actinobactérias oferece uma perspectiva inovadora na busca por recursos antimicrobianos, com destaque às regiões pouco exploradas, como rochas carbonáticas amazônicas (MATOS NETO, 2022).

Com 300 milhões de anos, as rochas sedimentares da Formação Itaituba oferecem um ecossistema singular, possivelmente abrigando microrganismos que se adaptaram de maneiras únicas ao longo dos milênios, o que sugere a presença de uma microbiota capaz de sobreviver em condições desafiadoras. A pesquisa do material rochoso pode, portanto, oferecer a oportunidade de descobrir novos compostos bioativos e enzimas, ampliando as possíveis aplicações farmacológicas, ambientais e industriais (MATOS NETO, 2022).

Dessa forma, o presente estudo propõe-se a bioprospectar actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas na Amazônia.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Diversidade Microbiana Amazônica

A Amazônia exibe diversidade biológica e alto grau de endemismo com uma extensão de aproximadamente 4 milhões de quilômetros quadrados do território brasileiro presentes em oito Estados, a saber: Pará, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Acre, Amapá, Rondônia e Roraima (AZEVEDO, 2021; DE AZEVEDO; CAMPOS, 2021).

Este bioma amazônico ostenta a maior extensão de floresta tropical em todo o planeta, sendo amplamente reconhecido por sua riqueza biológica abundante. No entanto, é importante notar que, apesar da essencial contribuição dos microrganismos aos ecossistemas e seu papel crítico em processos ecológicos e biogeoquímicos, a pesquisa e exploração da microbiodiversidade permanecem relativamente escassas quando comparadas às investigações que envolvem plantas e animais (SANTOS; PES; MORAIS, 2021).

Nesse contexto, destaca-se o crescente interesse pelo potencial antimicrobiano de Actinobactérias da Amazônia, conforme demonstrado em estudos como o de Silva *et.al.* (2019), que avaliaram 25 microrganismos desse filo bacteriano isolados de sedimentos do Rio Purus, na região amazônica. Dentre essas cepas, 8 revelaram potencial contra fitopatógenos, incluindo *Coletotrichum siamensis*, *Fusarium decemcellulare* e *Moniliophthora perniciosa*.

A pesquisa e a identificação de Actinobactérias na região oeste do Pará têm ocorrido desde 2012, no Laboratório de Microbiologia (LabMicro) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), campus Tapajós, resultando em 21 Actinobactérias isoladas de rochas sedimentares.

### 2.2 Rochas Carbonáticas Da Formação Itaituba

A Formação Itaituba, situada na região oeste do Pará, na Amazônia brasileira, constitui um notável depósito geológico datado aproximadamente de 300 milhões de anos atrás. Majoritariamente composta por rochas carbonáticas, um tipo de rocha sedimentar composta principalmente de minerais de carbonato, como calcita (carbonato de cálcio) e dolomita (carbonato de cálcio e magnésio), essa formação oferece uma rica fonte de informações sobre

as condições ambientais e geológicas que prevaleciam durante o Permiano (MATOS NETO, 2022).

Inserida na Bacia do Amazonas, essa formação compõe uma das maiores e mais antigas bacias sedimentares do Brasil, preservando eventos geológicos cruciais que influenciaram a deposição dos sedimentos e moldaram a paisagem local ao longo do tempo, sendo principalmente constituídas por minerais como calcita e dolomita, composição que reflete a intensa atividade biogênica que ocorreu durante o Permiano. As características dessas rochas sobreviventes ao tempo indicam a presença de processos biogeoquímicos de degradação da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e liberação de substâncias químicas no ambiente, que podem estar relacionados à presença de actinobactérias (CABRAL *et al.*, 2018).

Um aspecto relevante a ser considerado é o potencial de Actinobactérias em produzir metabólitos secundários bioativos, como antibióticos e compostos com atividades antifúngicas e antitumorais. A simbiose entre *Streptomyces* e rochas pode estar relacionada à capacidade dessas bactérias em secretar enzimas e produtos metabólicos que influenciam a mineralização e a dissolução de minerais presentes nos sedimentos (ABDEL-RAZEK *et al.*, 2020).

A compreensão do papel dessa classe bacteriana e de seus benefícios potenciais presentes nos sedimentos carbonáticos pode fornecer informações valiosas e contribuir no desenvolvimento de novas terapias na área da saúde humana, incluindo a investigação e desenvolvimento de novos antibióticos, substâncias antitumorais e antioxidantes.

### **2.3 Actinobactérias**

Actinobactérias constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, predominantemente aeróbios e heterotróficos, pertencentes ao domínio *Bacteria*, filo *Actinobacteriae* e classe *Actinobacteria*. Esses microrganismos são distintos de outras bactérias devido a sua morfologia filamentosa, que se manifesta sob a forma de cadeias ou hifas, conferindo-lhes semelhanças com fungos filamentosos. Além disso, sua capacidade de formar micélio permite a exploração eficaz do ambiente em busca de nutrientes e a adaptação a condições variáveis (DING *et al.*, 2020).

Esses microrganismos exibem uma notável variedade de colorações, com a capacidade de produzir pigmentos que abrangem desde tons brancos a matrizes de amarelo, laranja, rosa, vermelho e até mesmo cores mais escuras. Um traço característico de Actinobactérias é a formação de esporos resistentes, o que lhes concede a habilidade de sobreviver em condições adversas. Quando liberados em um ambiente propício, esses esporos têm a capacidade de germinar e dar origem a um novo crescimento (IBRAHIM, *et al.*, 2023).

O crescimento desses microrganismos tende a ser notoriamente lento, devido à sua morfologia filamentosa influenciada pela presença de mureína na sua rígida parede celular. Além disso, Actinobactérias são reconhecidas por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades bioativas. Esses microrganismos desempenham um papel essencial na decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes e na produção de enzimas. Por esse motivo, elas têm despertado considerável interesse no campo da biotecnologia (GUSMAO *et al.*, 2017).

#### **2.4 Gênero *Streptomyces***

Encontrados em ambientes aquáticos, em plantas e em solos, particularmente em solos alcalinos e neutros, os microrganismos do gênero *Streptomyces* se destacam por apresentar cromossomos lineares de tamanhos variados, podendo atingir até 9 megabases (Mb). A diversidade morfológica, bioquímica e a classe dos metabólitos produzidos por essas espécies estão refletidas em seus genomas. Nas extremidades dos cromossomos de *Streptomyces*, observam-se telômeros com proteínas ligadas covalentemente, permitindo que o gênero assumira uma forma circular (ABDELAZIZ *et al.*, 2023).

É notável que, em geral, mais de 70% das bases nucleotídicas do DNA dessas bactérias consistem de guanina (G) e citosina (C). Essa composição influencia a codificação de funções relacionadas à regulação, secreção, diferenciação, transporte e biossíntese de antibióticos (ABREU, 2020).

*Streptomyces* apresentam filamentos com diâmetro que varia entre 0,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  e comprimento indefinido, sem a formação de paredes transversais durante a fase vegetativa. A reprodução desses microrganismos ocorre por meio da produção abundante de esporos, a partir dos quais se origina um novo organismo. O crescimento subsequente começa a partir da ponta dos filamentos, acompanhado pela formação de ramificações. Durante a fase vegetativa, a

intrincada matriz de filamentos entrelaçados dá origem a um micélio compacto e, posteriormente, a uma colônia (BELKNAP *et.al.*, 2020).

Os esporos de *Streptomyces* geralmente apresentam pigmentação, conferindo uma coloração característica às colônias em diferentes meios de cultura, facilitando a identificação das espécies em meios sólidos. A morfologia dessas colônias pode variar entre as diferentes espécies, mas, em sua maioria, são lisas e exibem micélio aéreo e vegetativo, além de possuírem a capacidade de degradar lignocelulose e quitina, desempenhando um papel fundamental nos ciclos biológicos da matéria orgânica (LOUGHRAN *et al.*, 2020).

## 2.5 Metabólitos secundários com potencial antimicrobiano

Metabólitos secundários são compostos químicos produzidos por organismos vivos, como bactérias, fungos e plantas, que não desempenham um papel direto na sobrevivência ou no crescimento desses organismos, mas frequentemente possuem propriedades bioativas que podem ser exploradas em diversas aplicações (LACEY; RUTLEDGE, 2022).

Muitos dos antibióticos amplamente utilizados na medicina são produzidos por Actinobactérias. Entre esses compostos, merecem destaque os glicopeptídeos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, polienos, policetídeos, actimonicinas, tetraciclina (MATOS NETO, 2022).

Os glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, são produzidos principalmente por Actinobactéria *Streptomyces orientalis*. Esses antibióticos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, interferindo na formação da parede de peptidoglicano, levando à morte da bactéria. Eles são especialmente eficazes contra bactérias Gram-positivas (ALAM *et al.*, 2022).

Os beta-lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas, são produzidos por várias espécies de Actinobactérias, especialmente do gênero *Streptomyces*. Esses antibióticos interferem na síntese da parede celular bacteriana, inibindo a atividade da enzima transpeptidase, resultando na lise da parede celular e na morte da célula bacteriana (ADEYEMO; JA'AFARU; ADAMS, 2021).

Os aminoglicosídeos, como a estreptomicina e a neomicina, são produzidos por diferentes espécies de Actinobactérias, como *Streptomyces griseus*. Esses antibióticos atuam inibindo a síntese proteica nas bactérias, causando erros na tradução dos códons de Ácido

Ribonucleico Mensageiro (RNAm) e, assim, impedindo a síntese de proteínas essenciais (BRADY; WHITTAKER; TAN; KRISTENSEN II *et al.*, 2020).

Os polienos, como a anfotericina B, são produzidos por Actinobactérias do gênero *Streptomyces*, que atuam afetando a integridade da membrana celular das células fúngicas, ligando-se a seus esteróis e causando a formação de poros na membrana, levando à morte da célula (BOBEK; FILIPOVÁ; BERGMAN; ČIHÁK *et al.*, 2022).

Os poliketídios são uma classe diversificada de antibióticos produzidos por Actinobactérias, como a tetraciclina, derivada de *Streptomyces aureofaciens*. Eles inibem a síntese de proteínas nas bactérias, interferindo na ligação do Ácido Ribonucleico Transportador (tRNA) ao ribossomo e bloqueando a síntese de proteínas (ARABY *et al.*, 2020).

As actimonicinas, como actinomicina D, são produzidas por diferentes espécies de Actinobactérias, inclusive *Streptomyces sp.* Elas interferem na replicação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), inibindo a atividade da Ácido Ribonucleico (RNA) polimerase, o que impede a transcrição do DNA e a síntese de RNA (WU *et al.*, 2021).

Os metabólitos secundários produzidos por Actinobactérias têm aplicações em diversas indústrias, como a farmacêutica, a agrícola e a de produtos químicos. Além disso, a engenharia genética e a biotecnologia permitem a modificação e a otimização da produção desses compostos para atender às necessidades específicas (CHO *et al.*, 2020).

## **2.6 Metabólitos secundários com potencial antitumoral**

No contexto antitumoral, os metabólitos secundários produzidos por Actinobactérias têm demonstrado influenciar várias vias celulares envolvidas na carcinogênese. Um exemplo notável é a descoberta de actinomicetos que produzem a rifamicina, uma classe de antibióticos que exibe propriedades antitumorais. Além disso, outros compostos bioativos, como ansamicinas, mitramicina, e bleomicina, têm sido isolados de Actinobactérias e exibem potencial antitumoral significativo (IBRAHIM *et al.*, 2023).

A rifamicina, uma classe de antibióticos produzidos por *Streptomyces mediterranei* demonstrou que seu efeito antimicrobiano pode se estender para células tumorais através do

mecanismo de ação que impede a síntese de ácidos nucleicos, por meio da inibição da RNA polimerase bacteriana, o que pode interferir na transcrição de genes relacionados ao crescimento e à proliferação celular, levando à supressão do crescimento tumoral (GUIMARÃES *et al.*, 2020).

As ansamicinas são um grupo de compostos bioativos derivados de Actinobactérias do gênero *Streptomyces* capazes de inibir a atividade da enzima topoisomerase. A inibição da topoisomerase leva à quebra do DNA e, conseqüentemente, à interrupção do ciclo celular e à indução do apoptose em células cancerosas (DE KONING; NGWIRA; ROUSSEAU, 2020).

A mitramicina é outra substância derivada de *Streptomyces argillaceus*, com potencial antitumoral ocasionado por sua ligação específica ao DNA, capaz de inibir a transcrição e a síntese de RNA. A bleomicina é uma substância antitumoral isolada de cepas específicas de *Streptomyces verticillus*, capazes de gerar radicais livres e causar danos oxidativos ao DNA das células cancerosas, sendo uma opção valiosa em regimes de quimioterapia (CHEN *et al.*, 2020).

A diversidade genética de Actinobactérias também contribui para a descoberta de novos compostos com potencial antitumoral. A aplicação de técnicas avançadas de genômica e metagenômica permite a identificação de clusters de biossíntese de produtos naturais em genomas bacterianos, levando à descoberta de novas moléculas bioativas (LAW *et al.*, 2020).

## **2.7 Metabólitos secundários com potencial antioxidante**

O estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre a produção de Espécies Reativas De Oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo de neutralizá-las, está intimamente ligado a uma série de doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Surge então, o potencial antioxidante de Actinobactérias com a capacidade intrínseca de produzir uma variedade de compostos bioativos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A capacidade de sequestro de radicais livres é uma característica fundamental do potencial antioxidante das Actinobactérias, aos quais se incluem polifenóis, flavonoides, terpenoides e outros antioxidantes com papel crucial na neutralização de EROs, como peróxido de hidrogênio e superóxidos, impedindo danos oxidativos às biomoléculas celulares através de

mecanismos de doação de elétrons ou de inibição de enzimas pró-oxidantes (BORODINA *et al.*, 2020).

A análise dos mecanismos bioquímicos e genéticos subjacentes ao potencial antioxidante das Actinobactérias é essencial para compreender como esses microrganismos sintetizam e regulam a produção de compostos antioxidantes, através de pesquisas genômicas para identificar clusters de genes envolvidos na síntese de antioxidantes e fornecer insights sobre as vias metabólicas e os processos bioquímicos responsáveis pela produção desses compostos (TSAI *et al.*, 2021).

Na indústria farmacêutica, os compostos antioxidantes produzidos por Actinobactérias, como *Streptomyces spp.*, *Actinomadura spp.*, *Micromonospora spp.*, *Nocardia spp.*, *Saccharopolyspora sp.*, são explorados no desenvolvimento de medicamentos para combater doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Na indústria cosmética, esses compostos podem ser incorporados a produtos anti-envelhecimento e de cuidados com a pele. Além disso, na indústria alimentar, o potencial antioxidante das Actinobactérias pode ser utilizado para preservar alimentos de forma natural (NOËL *et al.*, 2020).

### 3. OBJETIVO GERAL

Realizar a bioprospecção de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas.

### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antimicrobiana de actinobactérias presente em sedimento de rochas carbonáticas amazônicas;

Caracterizar morfológicamente e bioquimicamente os potenciais isolados;

Investigar a presença de *clusters* gênicos de biossíntese de rotas metabólicas envolvidas na produção de Sintases de Policetídeos e Sínteses de Peptídeos não Ribossomais;

Analisa se há ação antitumoral nas linhagens promissoras;

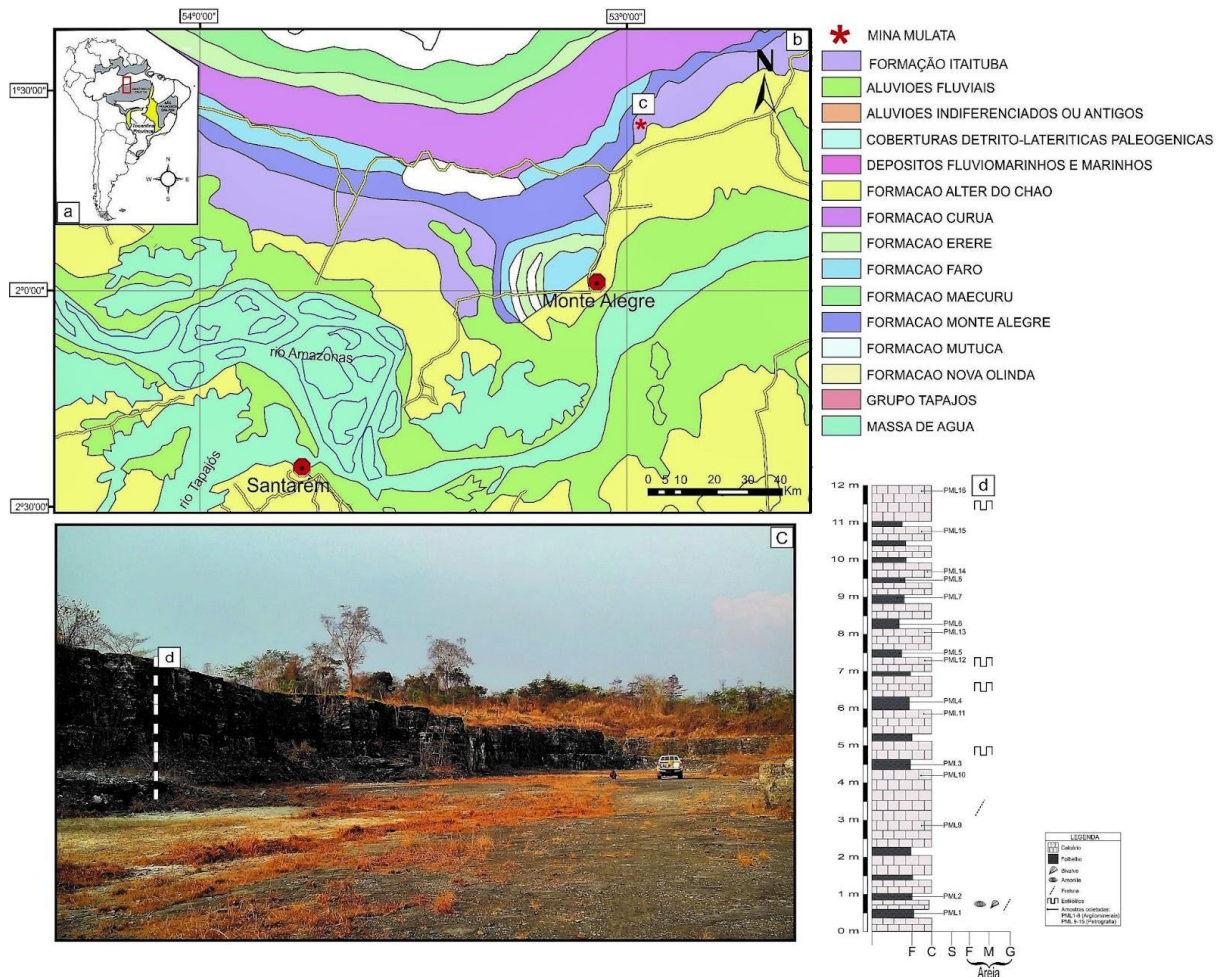
Identificar se há ação antioxidante do extrato da linhagem mais promissora.

## 5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 5.1 Local de Coleta

Para realização da pesquisa foi usado o Biobanco de Actinobactérias Amazônicas (BIOACTA) da Universidade Federal do Oeste do Pará que contém 21 cepas de actinobactérias isoladas de Rochas Carbonáticas da Formação Itaituba, localizada no município brasileiro Itaituba, no sudoeste do Estado do Pará, com latitude  $04^{\circ}16'34''$  sul e a uma longitude  $55^{\circ}59'01''$  oeste (OLIVEIRA, 2005).

**Figura 1:** Mapa da Formação Itaituba.



**Fonte:** Autora, 2024.

### 5.2 Avaliação de isolados produtores de substâncias antimicrobianas

Os isolados bacterianos de rochas carbonáticas foram identificados como PML, seguidos por números de 1 a 21 para realização da pesquisa, para inoculação em Placas de Petri contendo meio Agar ISP2 até completa esporulação e posteriormente foram recortados blocos de ágar de 6 mm de diâmetro, contendo as colônias bacterianas, para a realização do teste de antagonismo pelo método do bloco de gelose (ICHIKAWA *et al.*, 1971). Foram utilizados 11 patógenos de interesse clínico: *Streptococcus pneumoniae* ATCC700699; *Micrococcus luteus* ATCC 7468; *Staphylococcus aureus* ATCC14458; *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228; *Aeromonas hydrophyla* INCQS00318; *Klebsiella pneumoniae* OXA48; *Escherichia coli* ATCC10536; *Acinetobacter baumannii* ATCC19606; *Proteus vulgaris* ATCC13315; *Escherichia coli* ATCC25922 e *Salmonella enteritidis* INCQS00268.

A intensidade da atividade inibitória foi determinada de acordo com o tamanho do halo de inibição segundo o tamanho da zona de inibição dividido em quatro grupos distintos: grupo passivo - zona de inibição menor que 10mm; grupo ligeiramente ativo - zona de inibição entre 11 e 20mm; grupo moderadamente ativo - zona de inibição entre 21 e 30 mm; e grupo altamente ativo, cuja zona de inibição é maior que 31mm (ŞAHİN; UĞUR, 2003).

### 5.3 Caracterização Morfológica E Bioquímica

Para caracterização morfológica e bioquímica de Actinobactéria isolada de rochas carbonáticas, foi realizado o protocolo recomendado pelo International Streptomyces Project (ISP) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

A micromorfologia foi feita pela técnica de microcultivo e a caracterização das colônias bacterianas para o detalhamento do aspecto do micélio vegetativo, aéreo e produção de pigmentos, em meio International Streptomyces Project 2 (ISP2). A microscopia eletrônica de varredura foi realizada após cultivo das Actinobactérias em meio Ágar ISP2 a 30 °C graus durante 7 dias, em microscópio eletrônico de varredura (LEO 5410LV) em 10 Kilovolts (kV), para detalhamento da cadeia de esporos (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966).

Para avaliar a produção de lipase e esterase, as linhagens de actinobactérias foram inoculadas na forma de bloco de gelose em triplicata, em meio contendo (10 g Peptona, 5 mL NaCl, 10 mL Tween 80 [10mLTween 80 e 40 mL Água destilada], 15g Ágar, 1000 mL Água destilada) (SIERRA, 1957). Para avaliação da esterase o meio base foi o mesmo citado anteriormente. Após incubação em estufa a 28°C por 10 dias para posterior observação de um halo branco difuso constituído de precipitados de oleato de cálcio indicou a presença da enzima.

Para determinar amilase as linhagens de actinobactérias foram inoculadas na forma de bloco de gelose de 6 mm de diâmetro em triplicata no meio de cultura Agar-amido (5g Digestão péptica de tecido animal, 5g NaCl, 1,5g Extrato de carne bovina, 1,5g Levedura, 2g Amido solúvel, 15g Ágar, 1,5g Ácido glutâmico, 1000 mL Água destilada, pH 7,4) para verificar a presença de amilase e incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Posteriormente foram adicionados 10mL da solução de lugol a 1% nas placas (KUPIECKI; COON, 1957).

A triagem das linhagens de *Streptomyces* produtoras da enzima caseinase foi realizada em meio sólido contendo caseína como substrato indutor. Para avaliar a produção de Catalase as linhagens de actinobactérias foram cultivadas em meio de cultura NB (8g Caldo nutritivo, 15g Ágar, 1000 Água destilada) e incubadas em estufa por 10 dias a 28°C. Após esse período, amostras das colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina para lâminas de microscopia estéreis e adicionado peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MARIANO *et al.*, 2000).

Para avaliação da produção em meios com fonte de nitrogênio, foi vertido em 10 placas de petri estéril o 18ml de Meio Ágar Basal de Sais Minerais e 2 ml de cada fonte de nitrogênio para cada placa, são elas: Treonina, L-cisteína, L-histidina, L-tirosina, L-metionina, Serina, L-fenilalanina, Valina, Glutamina e L-asparagina. Com a finalidade de avaliar o crescimento mediante fontes de carbono, também foi vertido em 13 placas 18ml com Meio Ágar Basal de Sais Mineirais e 2 ml de cada fonte de carbono para cada placa, são elas: D-xilose, Inositol, D-galactose, Sacarose, Maltose, D-manose, D-lactose, D-frutose, D-rufinose, L-ramnose, Larabnose, Manitol e Glicose. Todas as amostras foram inoculadas em esgotamento e ficaram na estufa por 15 dias à 30°C (MARIANO *et al.*, 2000).

#### 5.4 Prospecção de *clusters* gênicos de síntese de PSK e NRPS

Uma série de primers foi utilizada para detectar os genes relacionados a rota de biossíntese de antibióticos como os denominados policetídio sintase (PKS-II), e Peptídeos não ribossomais (NRPS): PKSII: KS $\alpha$  (5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3') e KS $\beta$  (5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3'); 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; GENILLOUD, 2005).

A PCR foi constituída de DNA genômico 100 ng (1 $\mu$ L), 5x Trans start Fast Pfu buffer (10 $\mu$ L), primer 10 $\mu$ M (1  $\mu$ L), 2,5 mM DNTP's (4 $\mu$ L), Trans Start Fast Pfu polymerase (1 $\mu$ L), PCR stimulant (5x) (5 $\mu$ L), MgSO<sub>4</sub> 50mM (2 $\mu$ L) e ddH<sub>2</sub>O 25  $\mu$ L). O ciclo de PCR ocorrerá

segundoas 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 (AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005).

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 foram construídas 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 (AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005).

### **5.5 Obtenção do extrato**

Foi inoculado em placa de petri os isolados promissores, contendo meio sólido ISP2 para a obtenção dos metabólitos secundários. O período de incubação foi feito em estufa bacteriológica a 30 C° de 7 a 14 dias para o crescimento das actinobactérias. Finalizado esse período, foram realizados recortes em blocos no meio contendo os isolados, utilizando um bisturi e posteriormente o material foi adicionado à erlenmeyers, variando o tamanho de acordo com a quantidade de material, em seguida houve adição de 20ml do solvente acetato de etila até cobrir todo o conteúdo da vidraria para posterior agitação manual durante 20min, com pausa de 1hr, e mais 20min de agitação manual. Na fase subsequente, esse material foi deixado em overnight na capela de exaustão, para a evaporação do solvente. Para que fosse feita a separação da camada orgânica, o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo (THAKUR *et al.*, 2009).

### **5.6 Avaliação Da Atividade Citotóxica**

Foram plaqueadas  $2 \times 10^3$  células por poço, em placas de 96 poços ( $1 \times 10^4$  células/mililitro [mL] em 200 microns [ $\mu$ L] de meio) para a linhagem de células tumorais de câncer de cólon de reto (HCT116). Após 24 horas, cada extrato de PML5, PML11 e PML15 foram adicionados na concentração de 10  $\mu$ g/mL a 0,0064  $\mu$ M e incubada por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e dimetilsulfóxido (DMSO) como controle negativo. Após 72 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 azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150  $\mu$ L de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nanômetros (nm). Os valores de concentração inibitória média (IC50) com intervalos de confiança de 95% foram calculados por regressão não linear usando GraphPad Prism 8 (MOSMANN, 1983).

### 5.7 Avaliação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante ocorreu somente com a cepa mais promissora na atividade citotóxica, a PML5, que teve seu extrato testado pela captura do radical livre ABTS realizada em espectrofotômetro. Preparou-se o radical ABTS a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7 mM) com 88  $\mu$ L 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  $0,7 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  a 734 nm em espectrômetro Shimadzu UV 1800 (Shimadzu® 1800, Kyoto, Japão). Em seguida, construiu-se uma curva padrão de trolox (2.000  $\mu$ M) com concentrações de extrato variando de 100  $\mu$ M a 2.000  $\mu$ M. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 30  $\mu$ L de cada solução de trolox (100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 1500  $\mu$ M e 2.000  $\mu$ M) para tubos de ensaio e misturou-se 3,0 mL da solução do radical ABTS. Utilizou-se o álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro (RE *et al.*, 1999).

O percentual de inibição foi calculado conforme a Equação 1 e a concentração final expressa em  $\mu$ M Trolox /g. A análise foi realizada em triplicata.

Equação 1:

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

A atividade antioxidante do extrato da PML5 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, 1995).

### **5.8 Análise de CLAE-DAD do extrato acetatoetilico do isolado promissor**

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos de varredura do espectro no ultravioleta (CLAE-DAD) foram realizadas em um Cromatógrafo Agilent 1260 equipado com célula de fluxo de 60 mm com velocidade de detecção em 80 Hz e detector por arranjo de fotodiodos de varredura de espectro no Ultravioleta e visível (faixa entre 200 a 600 nm). Para as análises em escala analítica foi empregado como fase estacionária uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm) e 3,5µm de diâmetro de partícula mantida a 45°C, com um fluxo de fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e 3µL de volume de injeção de amostras, preparadas na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Os comprimentos de onda utilizados para registro dos cromatogramas foram a 254, 280, 325 e 352 nm. O sistema de eluição em modo gradiente foi constituído por água acidificada com 0,1% de ácido acético (eluente A; Synth) e acetonitrila (eluente B; Merck) na seguinte programação: 0-10min.: 10-25%B; 10-30min.: 25-50%B; 30-50min.: 50-100%B; 50-60min.: 100%B.

### **5.9 Análise do extrato da PML5 por CG-EM**

O extrato da PML5 foi analisado por Cromatografia à gás (CG) em um equipamento Agilent CG 6850 acoplado a um espectrômetro de massas (EM) Agilent 5975C contendo coluna

HP-5MS de comprimento 30m x 0,25mm e filme de 0,25 $\mu$ m. O volume de injeção da amostra foi de 1 $\mu$ L em modo *splitless*, tendo Hélio como gás carreador com taxa de 1ml.min<sup>-1</sup>. O método utilizado possui temperatura inicial do forno de 100°C, mantida por 5 minutos, e taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup> até atingir a temperatura de 320°C a qual foi mantida ao final do aquecimento por mais 8min. As temperaturas do injetor, do quadrupolo e da fonte de íons foram, respectivamente, 300°C, 180°C e 280°C. As detecções dos espectros de massas foram realizadas por ionização por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, em modo de aquisição *full-scan* na faixa de m/z 50-800 m/z a 2.66 scan.s<sup>-1</sup>. As identificações dos metabólitos foram realizadas por comparação do tempo de retenção de padrões e por comparação com a biblioteca espectral da NIST (v2.0, 2008) utilizando os valores de comparação de *Match* e *R-Match* acima de 900.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram selecionadas 21 cepas de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas amazônicas, presentes no banco de dados BIOACTA, para identificar os isolados com maior potencial de atividade antimicrobiana.

### **6.1 Seleção do isolado com potencial antimicrobiano**

Foi observado ação antimicrobiana em 13 dos 21 isolados. O teste variou entre os 13 isolados, onde 10 apresentaram resposta contra patógenos Gram-positivos e patógenos Gram-negativos, exceto PML1, PML8, PML 20 e PML21 com ação somente contra patógeno Gram-positivo, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1:** Halos de inibição e desvio-padrão médio de crescimento dos isolados frente aos patógenos testados.

	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC700699	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC14458	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC7468	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA48	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	<i>Salmonella enteritidis</i> INCQS00268	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC13315	<i>Aeromonas hydrophyla</i> INCQS00318
	<i>Halos de inibição (mm)</i>										
PML 1	0	0	0	10 ± 0,58	0	0	0	0	0	0	0
PML 3	11 ± 0,58	0	0	0	0	0	0	0	11 ± 0,57	14 ± 0,57	16 ± 0,00
PML 5	12 ± 0,58	12 ± 1,0	12 ± 0,56	12 ± 1,00	15 ± 0,00	13 ± 0,00	12 ± 0,59	13 ± 1,15	16 ± 0,00	13 ± 0,29	10 ± 0,58
PML 8	15 ± 0,58	13 ± 0,00	0	12 ± 0,57	0	0	0	0	0	0	0
PML 10	0	0	0	0	0	0	0	17 ± 0,58	0	12 ± 0,59	0
PML 11	11 ± 0,58	16 ± 1,15	23 ± 1,00	27 ± 0,00	16 ± 0,00	16 ± 0,56	10 ± 0,59	14,3 ± 0,59	15 ± 0,00	14 ± 0,58	11 ± 0,58
PML 13	15 ± 0,58	10 ± 0,56	0	12 ± 0,00	0	9 ± 0,59	0	0	0	0	0
PML 15	15 ± 0,58	14,6 ± 0,59	15,3 ± 0,59	14 ± 0,57	11 ± 0,00	15 ± 0,00	14 ± 0,56	14,3 ± 0,59	12 ± 0,58	17 ± 1,0	17 ± 0,00
PML 16	0	12 ± 0,00	0	0	0	12 ± 0,57	0	0	0	0	0
PML 18	12 ± 0,58	14 ± 1,0	0	12,5 ± 0,00	0	16,5 ± 1,0	10 ± 0,00	16,5 ± 0,57	0	13 ± 1,00	0
PML 19	0	0	13,5 ± 0,58	14 ± 0,58	0	16,5 ± 0,57	12 ± 1,00	16 ± 1,15	0	0	0
PML 20	21 ± 0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PML 21	12 ± 0,58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Fonte:** Autora.

A partir dos resultados do teste de antagonismo observou-se a PML5, PML11 e PML15 como as mais promissoras para obtenção de metabólitos secundários, pois responderam aos 11 patógenos testados, sendo registrado maior atividade da PML5 contra *Salmonella enteritidis* INCQS00268 (16mm  $\pm$  0,00), maior halo da PML11 contra *Micrococcus lutteus* ATCC7468 (27mm  $\pm$  0,00) e maior efeito antagonístico da PML15 contra *Aeromonas hydrophyla* INCQS00318 (17mm  $\pm$  00) e *Proteus vulgaris* ATCC13315 (17mm  $\pm$  1,0). O isolado que teve menor sensibilidade frente ao patógeno *Escherichia coli* ATCC10536 foi a PML13 (9mm  $\pm$  0,59).

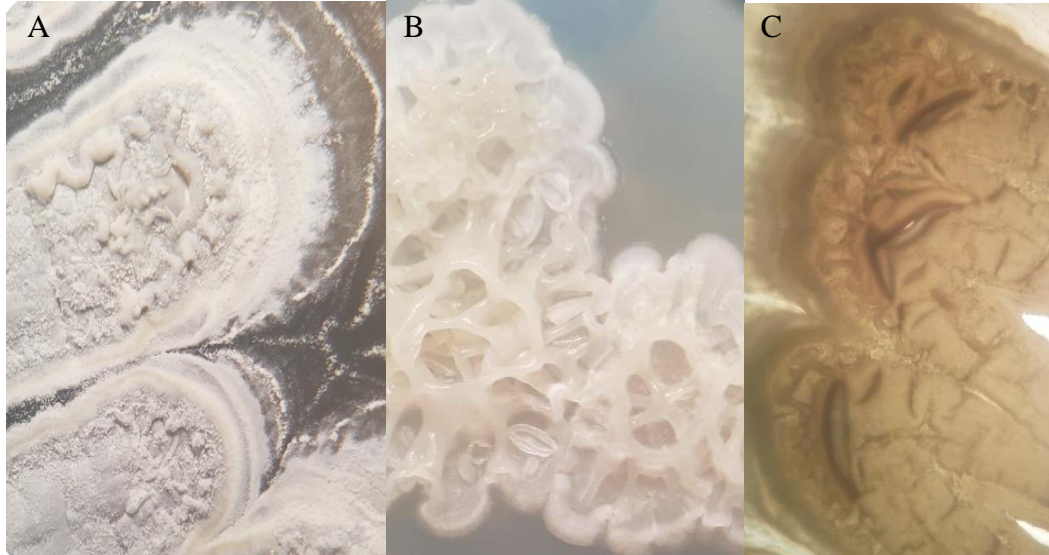
A intensidade da atividade antagonica baseada na escala de Sahin e Ugur (2003) demonstram que 58 dos 63 halos foram ligeiramente ativos contra os patógenos, enquanto 3 foram moderadamente ativos e apenas 2 foram passivos. É importante destacar a semelhança dos resultados com a pesquisa de Yucel e Yamaç (2010) que isolaram actinobactérias de rochas carbonáticas na Turquia, onde dos 290 isolados, 180 (62%) exibiram atividade ligeiramente e moderadamente ativa contra os patógenos multirresistentes *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii*.

Para Bhat e Nayaka (2023) a atividade antagonica é importante para fazer uma triagem das melhores cepas de actinobactérias para posterior teste citotóxico e antioxidante, por isso em sua pesquisa a cepa YC69, isolada de cavernas, teve maior halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* quando comparada aos outros 69 isolados, portanto foi a escolhida para fazer o teste citotóxico. Da mesma forma, Jaroszewicz *et.al.* (2021) testou isolados oriundos de rochas calcárias, onde foi escolhida a com maior espectro contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa* para teste anticâncer.

## 6.2 Caracterização Morfológica

Os três isolados promissores, PML5, PML11 e PML15 demonstraram a presença de micélio aéreo de coloração branca e reverso de coloração amarela, um critério taxonômico de relevância nas análises de Actinobactérias, conforme destacado por Mabrouk e Saleh (2014). As características morfológicas das colônias incluíram uma forma irregular e uma aparência pulverulenta. Sob o escopo da morfologia celular, foram observadas estruturas filamentosas e configurações de cocoides (Figura 2 e Tabela 2).

**Figura 2:** Morfologia dos isolados promissores. (A) Morfologia das colônias de PML5 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias. (B) Morfologia das colônias de PML11 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias. (C) Morfologia das colônias de PML15 em ágar ISP2 após incubação a 30°C por 14 dias.



**Fonte:** Autora, 2024.

**Tabela 2:** Lista de isolados de rochas carbonáticas 5, 11 e 15, seu meio de crescimento, esporulação, cor do micélio aéreo, cor do micélio vegetativo, pigmento e tipos de esporos.

Isolado	Meio	Esporulação	Micélio	Micélio	Pigmento	Tipo de Esporos
			Aéreo	Vegetativo		
PML5	ISP2	+++	Branco	Amarelo escuro	-	Flexuosa ramificada
PML11	ISP2	+++	Branco	Amarelo claro	-	Flexuosa ramificada
PML15	ISP2	++	Amarelo	Amarelo claro	Rosa	Retináculo apertum fechada curta

+: Apenas Micélio vegetativo; ++: Micélio Aéreo pouco desenvolvido; +++: Bom desenvolvimento do micélio vegetativo e aéreo; - Sem crescimento.

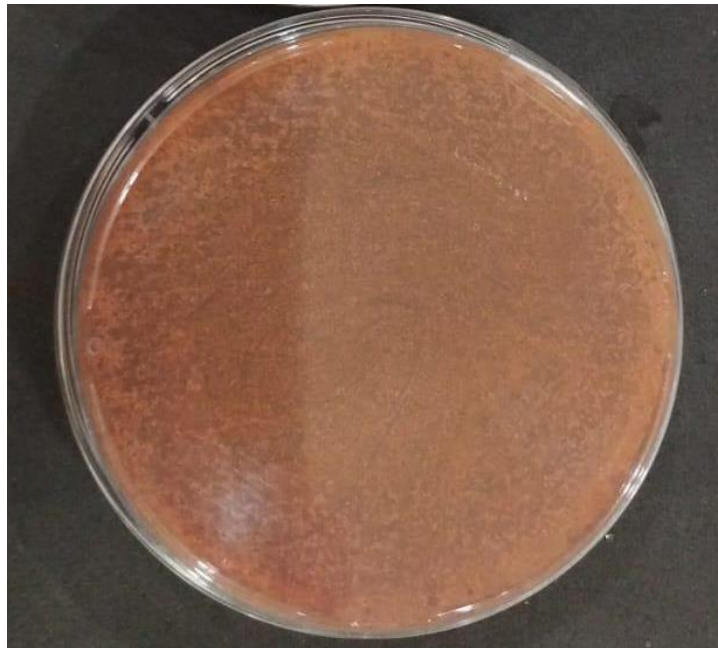
**Fonte:** Autora.

O desenvolvimento do micélio aéreo aconteceu após sete dias de cultivo em meio ISP2 em estufa a 30°C, algo comum às actinobactérias, pois seu crescimento é lento e pode levar de

7 à 15 dias para completo desenvolvimento nessa temperatura (ABDELAZIZ *et al.*, 2023; ORTEGA *et al.*, 2021).

Quando cultivado em meio ISP2, observou-se a produção de pigmentos solúveis de coloração rosa na PML15, indicativo de ativação da via de biossíntese de metabólitos nas condições oferecidas pelo meio nutriente, uma característica comum entre *Streptomyces*, o que difere de outros gêneros do grupo de Actinobactérias (Figura 3) (IBRAHIM *et al.*, 2023).

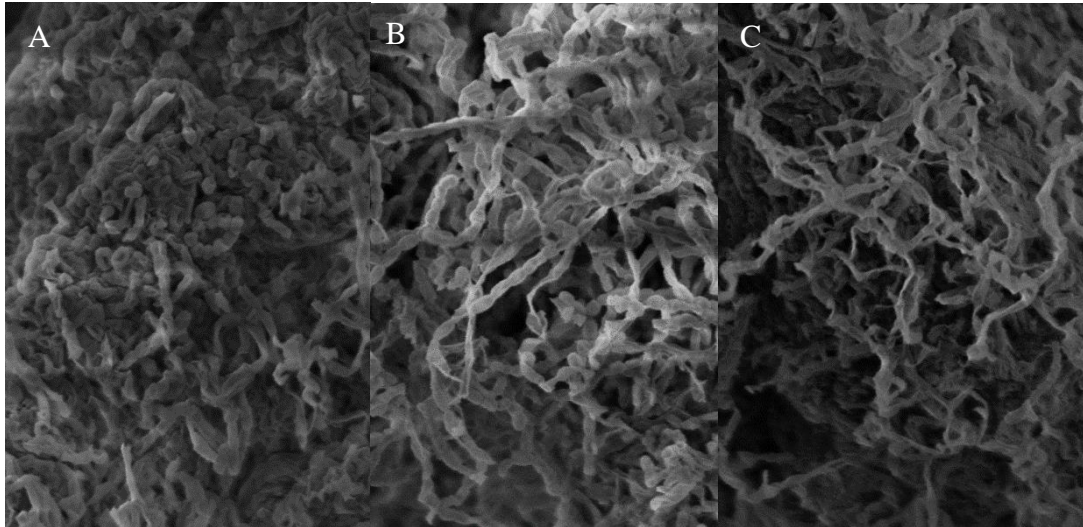
**Figura 3:** Isolado de rochas carbonáticas 15 em meio ISP2 produzindo pigmento rosa após incubação em 30°C por 15 dias.



Fonte: Autora, 2024.

Quanto à disposição dos esporos dos isolados, identificou-se a presença de filamentos flexuosos em cadeias ramificadas, filamentos fechados curtos, todas essas características convergindo com o perfil morfológico típico do gênero *Streptomyces*, citado por Azuma (2012) (Figura 4).

**Figura 4:** Registro de Microscopia Eletrônica de Varredura, da esquerda para a direita (A) isolado de rochas carbonáticas 5, (B) isolado de rochas carbonáticas 11, (C) isolado de rochas carbonáticas 15.



Fonte: Autora, 2024.

As características microscópicas observadas nos isolados apresentaram organização e formato compatíveis com o gênero *Streptomyces*, conforme descrito em literatura por Alam *et.al.* (2002).

### 6.3 Caracterização Bioquímica

Para a caracterização foi determinada a produção de Lipase, Esterase, Amilase, Caseinase e Catalase (Tabela 3).

**Tabela 3:** Características enzimáticas (lipase, esterase, amilase, caseinase e catalase) dos isolados de rochas carbonáticas amazônicas 5, 11 e 15.

<b>Linhagem</b>	<b>Lipase (IE)</b>	<b>Esterase (IE)</b>	<b>Amilase (IE)</b>	<b>Caseinase (IE)</b>	<b>Catalase</b>
<b>PML5</b>	3,58	3,58	0	0	+
<b>PML11</b>	3,18	3,18	0	1,60	+
<b>PML15</b>	6	6,02	0	0	+

+: positivo para produção de catalase. IE: índice enzimático.

Fonte: Autora.

As características enzimáticas dos isolados possibilitou identificar o perfil bioquímico dos três isolados, onde houve síntese em lipase e esterase, enzimas biocatalisadoras que são utilizadas biotecnologicamente na síntese de surfactantes, indústria têxtil, cosmética e

farmacêutica, além de participarem da produção de biocombustíveis, atuando sem necessidade de cofatores, com alta estabilidade em solventes orgânicos e ampla especificidade de substratos (BRAULT *et al.*, 2012; CLARKE; KITNEY, 2020).

A habilidade enzimática da produção de amilase é restrita a um número reduzido de actinobactérias, como  $\alpha$ -amilases termoestáveis produzidas por actinobactérias endofíticas do gênero *Nocardiosis* sp. No gênero *Streptomyces* sp. nem todas as espécies produzem amilase, portanto a presença ou a falta de produção desta enzima não é suficiente para sugerir um perfil comum à algum grupo (RIGO *et al.*, 2021).

A produção de caseinase somadas a catalase positiva no estudo de Yang *et al.* (2021) mostrou que ambas enzimas estão diretamente envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários em 2.634 cepas de *Streptomyces*, onde existem propriedades catalíticas capazes de serem exploradas de diferentes maneiras, características comuns aos objetos dessa pesquisa.

Dos isolados, a PML5 se destacou no crescimento em 6 fontes de carbono e 4 de nitrogênio. A PML11 teve crescimento positivo em 3 fontes de carbono e 2 fontes de nitrogênio e a PML15 cresceu em 5 fontes de carbono e 2 de nitrogênio (Tabela 4).

**Tabela 4:** Teste de fontes de carbono e nitrogênio das linhagens PML5, PML11 e PML15 de actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas da Amazônia.

		PML 5	PML 11	PML 15
<b>Fontes de Carbono</b>	<b>D-xilose</b>	+	+	+
	<b>Inositol</b>	-	-	+
	<b>D-galactose</b>	-	-	+
	<b>Sacarose</b>	+	-	-
	<b>Maltose</b>	+	-	-
	<b>D-manose</b>	+	-	-
	<b>D-lactose</b>	+	+	+
	<b>D-frutose</b>	-	-	-
	<b>D-rufinose</b>	-	-	-
	<b>L-ramnose</b>	-	-	-
	<b>L-arabnose</b>	-	-	-
	<b>Manitol</b>	-	-	-
	<b>Glicose</b>	+	+	+
<b>Fontes de Nitrogênio</b>	<b>Treonina</b>	-	-	-
	<b>L-cisteína</b>	-	-	-
	<b>L-histidina</b>	+	-	-
	<b>L-tirosina</b>	-	-	-
	<b>L-metionina</b>	-	-	-
	<b>Serina</b>	+	+	+
	<b>L-fenilalanina</b>	-	-	-
	<b>Valina</b>	+	-	-
	<b>Glutamina</b>	-	-	-
	<b>L-asparigina</b>	+	+	+

**Fonte:** Autora, 2024.

*Streptomyces* são a fonte mais proeminente de metabólitos secundários, moléculas que exibem várias funções de sobrevivência na natureza, sendo capazes de defender e sinalizar o microrganismo em processos de interrupção transitória de crescimento, autotoxicidade e alterações em expressão genética. Em solos, rochas e plantas, as atividades biológicas das actinobactérias são essenciais em múltiplos ciclos geoquímicos, incluindo os ciclos do carbono e nitrogênio (ROMERO-RODRÍGUEZ, 2018).

O metabolismo do carbono acontece na integração de vias de transporte e oxidação, como a glicólise, o ciclo da pentose fosfato (PPP) e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), incluindo o desvio de glioxilato, todas presentes na maioria dos *Streptomyces* tendo

consequências significativas em diferentes aspectos regulatórios e fisiológicos desses microorganismos (HE *et al.*, 2022; ROMERO-RODRÍGUEZ, 2018).

Parte integrante das proteínas e dos ácidos nucleicos, o nitrogênio é encontrado em metabólitos secundários, cuja função pode estar relacionada às interações celulares com o meio ambiente. No entanto, a disponibilidade de nitrogênio pode mudar em ambientes adversos, como solo e rochas, o que pode alterar a taxa de formação de metabólitos secundários, de modo que o gênero *Streptomyces* ativa o mecanismo de aquisição e armazenamento de nitrogênio, garantindo sua sobrevivência em ambientes inóspitos (HUANG *et al.*, 2023).

Para a compreensão da regulação do metabolismo secundário de actinobactérias, a interferência, o efeito e interação dos mecanismos moleculares de efeitos do carbono e nitrogênio precisa ser investigado. Além disso, a regulação do metabolismo de carbono e nitrogênio pode fornecer estratégias industriais para modificação de etapas metabólicas selecionadas e redirecionar os fluxos de carbono e nitrogênio para precursores de metabólitos industrialmente relevantes (CRUZ-BAUTISTA *et al.*, 2023).

Os isolados PML5, PML11 e PML15 cresceram em meios de carbono envolvidos em diferentes atividades na indústria alimentícia e produção farmacêutica como D-xilose, Sacarose, Maltose, D-lactose, D-manose e Glicose. Essas fontes de carbono desempenham papéis na nutrição e no metabolismo de diversos organismos e têm aplicações significativas na indústria e na pesquisa científica (SANGEETHA *et al.*, 2022).

Cada um dos aminoácidos - L-histidina, Serina, Valina e L-asparagina - desempenha papéis fundamentais como fontes de nitrogênio nos processos metabólicos dos organismos. Em Actinobactérias, durante o metabolismo da L-histidina, o nitrogênio presente pode ser liberado e utilizado na síntese de outras moléculas contendo nitrogênio, como nucleotídeos e neurotransmissores (HE *et al.*, 2022).

Da mesma forma, a Serina e a L-asparagina, também contendo grupos amino, contribuem como fontes de nitrogênio em vias metabólicas. Quando metabolizadas, esses aminoácidos liberam nitrogênio, que é então utilizado na síntese de uma variedade de moléculas vitais para o funcionamento celular. A valina pode ser incorporada em outras moléculas contendo nitrogênio. Esses processos são essenciais para o equilíbrio do metabolismo nitrogenado dos organismos (HE *et al.*, 2022; ZHU; ZHANG, *et al.*, 2020).

O crescimento dos isolados nestes meios indica a capacidade das actinobactérias em utilizar fontes de carbono e nitrogênio que podem influenciar a degradação e ciclagem de

nutrientes no ambiente das rochas carbonáticas e podem estar envolvidos na produção de compostos bioativos (HE *et al.*, 2022; ZHU; ZHANG, *et al.*, 2020).

#### **6.4 Prospecção de clusters gênicos de síntese de PSK e NRPS**

Os isolados PML5, PML11 e PML15 apresentam PKSII e NRPS, clusters gênicos produtores de compostos bioativos.

Os metabólitos secundários são biossintetizados por agrupamentos de genes homólogos que servem como marcadores selecionáveis para diferentes sínteses de compostos bioativos, como toxinas, pigmentos, antibióticos, agentes antitumorais e antioxidantes. Para atender à necessidade médica persistente e urgente de candidatos a novos e melhores medicamentos, o rastreio de clusters gênicos associados ao metabolismo secundário, PKS e NRPS, proporciona uma melhor análise das capacidades genéticas de *Streptomyces*.

No caso dos isolados de rochas carbonáticas, a presença do cluster PKSII indica complexos multienzimáticos com atuação de maneira interativa, conforme Mofid (2023) que descreve a presença de PKSII em *Streptomyces* como responsável genético da interação e produção de diversas enzimas para formação de moléculas bioativas.

O NRPS são compostos por unidades catalíticas que funcionam em linha de montagem, onde cada módulo é responsável por incorporar um único monômero. Em *Streptomyces* ele é responsável por fazer o reconhecimento, ativação de aminoácido, transferência e ligação de substratos, o que confere aos microorganismos a capacidade de sintetizar agentes bioativos.

Cerca de 80% de *Streptomyces* possuem PKS e NRPS, conforme estudo realizado por de Méndez (2024) onde foi identificado, no isolado de formigas da tribo *Attini*, *Streptomyces sp.* CS113, a presença de PKSII e NRPS capaz de sintetizar diperamicina; e na pesquisa de Prado-Alonso *et al.* (2022) onde a presença desses clusters em *Streptomyces sp.* CS147 sintetiza colibrimicinas.

A triagem desses clusters nos três isolados de rochas carbonáticas verificou e confirmou a potencial produção de agentes bioativos, confirmada nas etapas de CG-EM e CLAE-EM.

#### **6.4 Avaliação Da Atividade Citotóxica**

O extrato bruto do isolado PML5 apresentou maior ação citotóxica (96,5%) frente ao crescimento de células de câncer do colorretal humano (HCT-116). A ação citotóxica dos

extratos dos isolados PML11 e PML15 frente às células HCT-116 foi de 33,40% e 58,55%, respectivamente.

Os pesquisadores Bhat e Nayaka (2023) obtiveram uma inibição de 41,98% da proliferação celular *in vitro* ao submeter ao teste citotóxico o isolado YC69 contra células cancerígenas cervicais humanas (HeLa), o que para eles demonstrou resultado promissor. Para Jaroszewicz *et.al.* (2021), os isolados de *Streptomyces sp.* selecionados para teste citotóxico reduziram a viabilidade da linha celular de câncer de mama (T47D).

A utilização do ensaio MTT citotóxico determina a citotoxicidade de uma amostra, embora não esclareça seu mecanismo de ação, a análise da citotoxicidade representa um estágio crucial no processo de criação de novos medicamentos destinados ao uso clínico (LU; HU; XIE; ZHOU *et al.*, 2021).

OS pesquisadores Huang *et.al.* (2023) testou a ação citotóxica do isolado de sedimentos de mangue 4503, com propriedades morfológicas e químicas convergentes ao gênero *Streptomyces*. O isolado apresentou atividade citotóxica contra linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo (NPC) com capacidade antiproliferação, antimetástase, indução de parada do ciclo celular e apoptose, além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, o que levou a necessidade de explorar também o potencial antioxidante do isolado.

Assim, a partir do percentual de inibição frente à HCT-116, foi escolhida a PML5 como o isolado mais promissor para o teste antioxidante.

### **6.5 Avaliação da Atividade Antioxidante**

A ação antioxidante do extrato bruto da PML5 detectada pelo método ABTS apresentou ação de  $35,60 \pm 2,01\%$  em concentração de  $946,31 \pm 51,59$ , enquanto o potencial antioxidante pela captura do radical livre DPPH teve uma captura de  $10,65 \pm 1,95\%$  em concentração de  $138,56 \pm 26,10$ .

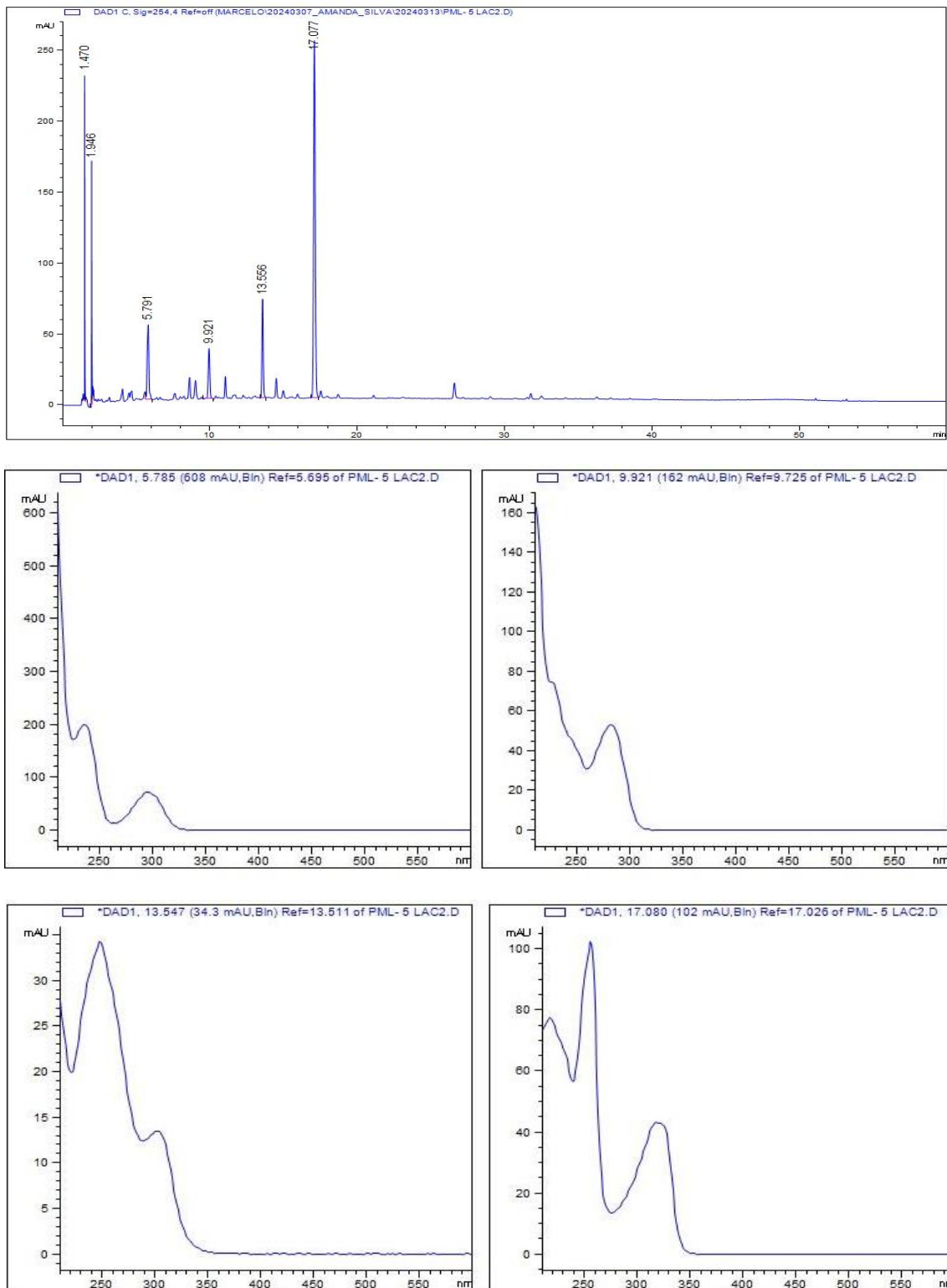
A atividade antioxidante revelada pelo método ABTS e DPPH sugere uma significativa capacidade das actinobactérias isoladas de rochas carbonáticas na Amazônia em neutralizar radicais livres, refletindo um potencial biológico promissor para aplicações em saúde e tecnologia. O uso dos métodos DPPH e ABTS demonstraram em outro estudo a capacidade de actinobactéria *Streptomyces sp.*, isolada da Caatinga, atividade antioxidante, o que valida o uso do protocolo na busca por bioatividade em rochas carbonáticas da Amazônia (MOURA *et al.*, 2021).

Para Rammali *et.al.* (2022) uma porcentagem de resposta maior que 30% demonstra a alta capacidade dos metabólitos secundários de actinobactérias capturarem o radical livre ABTS. Para Weslati *et.al.* (2023) uma resposta eliminadora de DPPH acima de 1,3 µg é altamente ativa. Ao relacionar as pesquisas com o resultado de 35,60% de atividade na captura de ABTS e 138,56 µg da PML5 em DPPH, se evidencia um potencial maior do isolado de rocha carbonática.

### **6.6 Análise do extrato bruto da PML5 por CLAE**

Explorando as informações do cromatograma obtido por CLAE e os espectro UV-Vis para o extrato de PML5 foi observado quatro substâncias diferentes, conforme figura 5, onde foram identificados picos bem definidos.

**Figura 5:** Cromatograma do extrato bruto do isolado PML5 obtido por CLAE, no comprimento de onda de 254nm.



Fonte: Autora, 2024.

No espectro UV-vis foi identificado que os tempos de retenção dos picos no cromatograma 5.791 e 13.566 foram semelhantes à 9.921 e 17.077, respectivamente. Os

padrões de absorvância iguais indicam que as substâncias possuem os mesmos cromóforos com ligações duplas conjugadas, sugerindo a possibilidade de serem da mesma classe (HAMEEDAT *et al.*, 2022).

### **6.7 Análise do extrato do isolado PML5 por CG-EM**

A análise CG-EM do extrato mostrou a presença de compostos com bioatividades antimicrobianas e antitumorais (Tabela 6). Foram identificados 10 compostos voláteis diferentes a partir do isolado PML5 (entre 14.81min e 37.53 min) e reconhecidos por suas atividades antimicrobianas e antitumoral. Ciclododecano (83,75%) foi o principal composto identificado no extrato.

**Tabela 5:** Compostos identificados do isolado de rochas carbonáticas 5 por análise de CG-EM.

Tempo (min)	Área (%)	M.W (g/mol)	Fórmula molecular	Nome do composto	Bioatividade
14.816	0.76	206.32	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	2,4-Di-tert-butilfenol	Atividade antitumoral (KAARI <i>et al.</i> , 2023)
19.029	83.75	168,32	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	Ciclododecano	Atividade antimicrobiana e antitumoral (HAI TUAN NGUYEN; HAI TUAN NGUYEN, 2022)
21.255	1.11	316.5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Ácido tetradecanóico, 12-metil-, éster metílico, (S)-	Atividade antioxidante e antitumoral (KEMUNG <i>et al.</i> , 2020)
23.144	2.76	270.5	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Ácido pentadecanóico, 14-metil-, éster metílico	Atividade antioxidante e antitumoral (SER <i>et al.</i> , 2015)
23.551	1.32	196,2	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ciclo(L-prolil-L-valina)	Atividade antimicrobiana (SHARMA <i>et al.</i> , 2024)
23.902	2.96	210.27	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade antimicrobiana (BUZON-DURÁN <i>et al.</i> , 2023)
25.262	0.62	316.5	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Ácido tetradecanóico, 12-metil-, éster metílico, (S)-	Atividade antioxidante e antitumoral (KEMUNG; <i>et al.</i> , 2020)
25.537	1.08	168.32	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	Ciclododecano	Atividade Antimicrobiana e antitumoral (HAI TUAN NGUYEN; HAI TUAN NGUYEN, 2022)
32.289	1.36	172.18	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	4-Octeno, (Z)	Atividade Antimicrobiana (BAOZHEN <i>et al.</i> , 2022)
37.536	4.27	166.13	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Ácido 1,4-benzenodicarboxílico	Atividade Antimicrobiana (ESSAM <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: Autora, 2024.

Os componentes determinados por CG-EM apresentaram em outros estudos, atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral. O 2,4-Di-tert-butilfenol foi relatado na pesquisa de Kaari *et al.*, (2023) com propriedade anticancerígena de 88% e 89% contra linhagem de câncer de cancro do cólo e cancro do útero, e atividade antioxidante.

O composto Ciclododecano, que apareceu em dois tempos de retenção (19,02min e 25,53min) no cromatograma. Na literatura, ele é descrito como substância presente em medicamentos para bronquite, hematória, epilepsia, asma, lepra, eczema, debre e icterícia, além disso possui capacidade antitumoral e antioxidante (HAI TUAN NGUYEN; HAI TUAN NGUYEN, 2022).

O Ácido tetradecanóico, 12-metil-, éster metílico, (S)- também apareceu duas vezes durante a análise (21,25min e 25,26min) e sua ação tem atividade antioxidante e antitumoral assim como o Ácido pentadecanóico, 14-metil-, éster metílico (KEMUNG *et al.*, 2020).

Outras substâncias antimicrobianas foram Ciclo(L-prolil-L-valina), Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)-, 4-Octeno, (Z), Ácido 1,4-benzenodicarboxílico, que apresentam potencial antimicrobiano contra bactérias gram-positivas e negativas, algumas inclusive resistentes como *Staphylococcus aureus* resistentes à antimeticilina (MRSA) (ESSAM *et al.*, 2020).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa revelou a capacidade das actinobactérias isoladas de rocha carbonática em produzir substâncias bioativas, de interesse biotecnológico, onde os três isolados PML5, PML11 e PML15 se destacaram como as mais promissoras para obtenção de metabólitos secundários.

O teste citotóxico destacou a PML5 com uma inibição de 96,5% do crescimento celular da linhagem de células de câncer colorretal humano (HCT-116), o que demonstrou ela como o isolado mais promissor. A atividade antioxidante do extrato mostrou alta capacidade na captura por radicais livres ABTS e DPPH e seu CG-MS revelou a presença de 10 compostos voláteis, com o principal composto sendo o Ciclododecano, o que explica a capacidade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante do isolado.

Assim, nota-se o potencial da biodiversidade amazônica presente em rochas carbonáticas da Formação Itaituba.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M. *et al.* Microbial natural products in drug discovery. **Processes**, 8, n. 4, p. 470, 2020.

ABDELAZIZ, R.; TARTOR, Y. H.; BARAKAT, A. B.; EL-DIDAMONY, G. *et al.* Bioactive metabolites of *Streptomyces misakiensis* display broad-spectrum antimicrobial activity against multidrug-resistant bacteria and fungi. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 13, p. 1162721, 2023.

ABREU, D. S. G. Potencial bioquímico e perfil de crescimento de isolados de *Streptomyces* spp. 2020.

ADEYEMO, O. M.; JA'AFARU, M. I.; ADAMS, F. V. Isolation, characterization, antimicrobial and other bioactivity profiles of three *Streptomyces* strains isolated from Lake Gerio, Yola, Adamawa State, Nigeria. **Bulletin of the National Research Centre**, 45, p. 1-13, 2021.

ALAM, K.; HAO, J.; ZHONG, L.; FAN, G. *et al.* Complete genome sequencing and in silico genome mining reveal the promising metabolic potential in *Streptomyces* strain CS-7. **Frontiers in Microbiology**, p. 3751, 2022.

ALAM, K.; MAZUMDER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y.-M. *et al.* *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology**, 13, p. 968053, 2022.

ARABY, E.; NADA, H. G.; ABOU EL-NOUR, S. A.; HAMMAD, A. Detection of tetracycline and streptomycin in beef tissues using Charm II, isolation of relevant resistant bacteria and control their resistance by gamma radiation. **BMC Microbiol**, 20, n. 1, p. 186, Jun 29 2020.

AYUSO-SACIDO, A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microb Ecol**, 49, n. 1, p. 10-24, Jan 2005.

AZEVEDO, M. A. D. S. **Toxicidade pré-clínica do extrato aquoso de *Licania rigida* benth (*Chrysobalanaceae*)**. 2021. -, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

AZUMA, M. V. P. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da Região Entremarés da Ilha do Méi, PR, Brasil. 2012.

BAOZHEN, F.; DANDAN, C.; RUIXUE, J.; ERQIN, L. *et al.* Bioactivities evaluation of an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* JRX-YG39 inhabiting wild grape. *BMC Microbiol* 2022.

BELKNAP, K. C.; PARK, C. J.; BARTH, B. M.; ANDAM, C. P. Genome mining of biosynthetic and chemotherapeutic gene clusters in *Streptomyces* bacteria. *Sci Rep*, 10, n. 1, p. 2003, Feb 6 2020.

BHAT, A. M.; HASSAN, Q. P.; HUSSAIN, A. Antimicrobials: Shift from Conventional to Extreme Sources. *In: Actinobacteria-Diversity, Applications and Medical Aspects: IntechOpen*, 2022.

BOBEK, J.; FILIPOVÁ, E.; BERGMAN, N.; ČIHÁK, M. *et al.* Polyenic Antibiotics and Other Antifungal Compounds Produced by Hemolytic. *Int J Mol Sci*, 23, n. 23, Nov 30 2022.

BORODINA, I.; KENNY, L. C.; MCCARTHY, C. M.; PARAMASIVAN, K. *et al.* The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutr Res Rev*, 33, n. 2, p. 190-217, Dec 2020.

BRADY, J. R.; WHITTAKER, C. A.; TAN, M. C.; KRISTENSEN II, D. L. *et al.* Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 117, n. 2, p. 543-555, 2022/03/05 2020.

BRAULT, G.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; LEPINE, F. *et al.* Isolation and characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One*, 7, n. 3, p. e32041, 2012.

BUZON-DURÁN, E.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E.; SÁNCHEZ-BÁSCONES, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. *et al.* Um Revestimento Baseado em Compostos Bioativos de *Streptomyces* spp. e oligômeros de quitosana para controlar *Botrytis cinerea* preserva a qualidade e melhora a vida útil das uvas de mesa. 2023.

CABRAL, B. C. A.; HOFFMANN, L.; BUDOWLE, B.; ÜRMÉNYI, T. P. *et al.* Planktonic microbial profiling in water samples from a Brazilian Amazonian reservoir. *Microbiologyopen*, 7, n. 2, p. e00523, Apr 2018.

CHEN, H.; CUI, J.; WANG, P.; WANG, X. *et al.* Enhancement of bleomycin production in *Streptomyces verticillus* through global metabolic regulation of N-acetylglucosamine and assisted metabolic profiling analysis. *Microb Cell Fact*, 19, n. 1, p. 32, Feb 13 2020.

CHO, E.; KWON, O.-S.; CHUNG, B.; LEE, J. *et al.* Antibacterial activity of chromomycins from a marine-derived *Streptomyces* microflavus. *Marine drugs*, 18, n. 10, p. 522, 2020.

CLARKE, L.; KITNEY, R. Developing synthetic biology for industrial biotechnology applications. **Biochem Soc Trans**, 48, n. 1, p. 113-122, Feb 28 2020.

CRUZ-BAUTISTA, R.; RUÍZ-VILLAFÁN, B.; ROMERO-RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. *et al.* Trends in the two-component system's role in the synthesis of antibiotics by *Streptomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-17, 2023.

DE AZEVEDO, J. H.; CAMPOS, J. E. G. Flow patterns and aquifer recharge controls under Amazon rainforest influence: The case of the Alter do Chão aquifer system. **Journal of South American Earth Sciences**, 112, p. 103596, 2021.

DE KONING, C. B.; NGWIRA, K. J.; ROUSSEAU, A. L. Biosynthesis, synthetic studies, and biological activities of the jadomycin alkaloids and related analogues. **Alkaloids Chem Biol**, 84, p. 125-199, 2020.

DE OLIVEIRA, A. U. **Amazônia revelada: os descaminhos ao longo da BR-163**. CNPq, 2005. 8586821632.

DE OLIVEIRA, J. A. M.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; SARRAGIOTTO, M. H. *et al.* Mycenolide A, new butenolide from a marine sediment-derived bacterium *Streptomyces* sp. 4054. **Nat Prod Res**, p. 1-4, Apr 9 2019.

DING, Y.; YANG, Y.; REN, Y.; XIA, J. *et al.* Extracellular Production, Characterization, and Engineering of a Polyextremotolerant Subtilisin-Like Protease From Feather-Degrading *Thermoactinomyces vulgaris* Strain CDF. **Front Microbiol**, 11, p. 605771, 2020.

ESSAM, S.; P., M.; NEVEEN, A.-R.; X., N. *et al.* Antimicrobial and antinematocidal metabolites from *Streptomyces cuspidosporus* strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode. **Saudi J Biol Sci** 2020.

GAUDÊNCIO, S. P.; BAYRAM, E.; LUKIĆ BILELA, L.; CUETO, M. *et al.* Advanced Methods for Natural Products Discovery: Bioactivity Screening, Dereplication, Metabolomics Profiling, Genomic Sequencing, Databases and Informatic Tools, and Structure Elucidation. **Marine Drugs**, 21, n. 5, p. 308, 2023.

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

GUSMAO, K.; SANTOS, D.; SANTOS, V.; CORTÉS, M. *et al.* Ocellatin peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus labyrinthicus* (Leptodactylidae):

Characterization, antimicrobial activities and membrane interactions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 23, 2017.

HAI TUAN NGUYEN, D. N. C.; HAI TUAN NGUYEN, D. N. C. Antimicrobial compounds of one *Streptomyces celluloflavus* strain isolated from Can Gio mangrove soil, Vietnam. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, 19, n. 3, p. 120-126, 2022 2022. Text.

HAMEEDAT, F.; HAWAMDEH, S.; ALNABULSI, S.; ZAYED., A. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Fluorescence Detection for Quantification of Steroids in Clinical, Pharmaceutical, and Environmental Samples: A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 27, n. 6, 03/10/2022 2022.

HE, T.; ZHANG, M.; DING, C.; WU, Q. *et al.* New insight into the nitrogen removal capacity and mechanism of *Streptomyces mediolani* EM-B2. **Bioresource technology**, 348, 2022 Mar 2022.

HUANG, Z.; TANG, W.; JIANG, T.; XU, X. *et al.* Structural characterization, derivatization and antibacterial activity of secondary metabolites produced by termite-associated *Streptomyces showdoensis* BYF17. **Pest Management Science**, 79, n. 5, p. 1800-1808, 2023.

IBRAHIM, W. M.; OLAMA, Z. A.; ABOU-ELELA, G. M.; RAMADAN, H. S. *et al.* Exploring the antimicrobial, antiviral, antioxidant, and antitumor potentials of marine *Streptomyces tunisiensis* W4MT573222 pigment isolated from Abu-Qir sediments, Egypt. **Microb Cell Fact**, 22, n. 1, p. 94, May 05 2023.

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

JAROSZEWICZ, W.; BIELAŃSKA, P.; LUBOMSKA, D.; KOSZNIK-KWAŚNICKA, K. *et al.* Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activities of Compounds Produced by Newly Isolated *Streptomyces* Strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland). **Antibiotics**, 10, n. 10, p. 1212, 2021-10-05 2021. Article.

KAARI, M.; JOSEPH, J.; MANIKKAM, R.; KALYANASUNDARAM, R. *et al.* A Novel Finding: 2,4-Di-tert-butylphenol from *Streptomyces bacillaris* ANS2 Effective Against *Mycobacterium tuberculosis* and Cancer Cell Lines. **Applied biochemistry and biotechnology**, 195, n. 11, 2023 Nov 2023.

KEMUNG, H. M.; TAN, L. T.-H.; CHAN, K.-G.; SER, H.-L. *et al.* Antioxidant Activities of *Streptomyces* sp. strain MUSC 14 from Mangrove Forest Soil in Malaysia. **BioMed Research International**, 2020.

KUPIECKI, F. P.; COON, M. J. The enzymatic synthesis of beta-aminoisobutyrate, a product of valine metabolism, and of beta-alanine, a product of beta-hydroxypropionate metabolism. **J Biol Chem**, 229, n. 2, p. 743-754, Dec 1957.

L, P.-A.; I, P.-V.; MG, M.; I, M. *et al.* Colibrimycins, Novel Halogenated Hybrid Polyketide Synthase-Nonribosomal Peptide Synthetase (PKS-NRPS) Compounds Produced by *Streptomyces* sp. Strain CS147. **Applied and environmental microbiology**, 88, n. 1, 01/11/2022 2022.

LACEY, H. J.; RUTLEDGE, P. J. Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. **Molecules**, 27, n. 3, Jan 28 2022.

LAW, J. W.-F.; LAW, L. N.-S.; LETCHUMANAN, V.; TAN, L. T.-H. *et al.* Anticancer drug discovery from microbial sources: The unique mangrove streptomycetes. **Molecules**, 25, n. 22, p. 5365, 2020.

LOUGHRAN, R. M.; MITCHELL, E. A.; VINING, O. B.; GALLEGOS, D. A. *et al.* Draft Genome Sequence of *Streptomyces* sp. Strain ventii, Isolated from a Microbial Mat near Hydrothermal Vents within the Axial Seamount in the Pacific Ocean, and Resequencing of the Type Strains *Streptomyces lonarensis* NCL 716 and *Streptomyces bohaiensis* 11A07. **Microbiol Resour Announc**, 9, n. 32, Aug 6 2020.

LU, S.; HU, J.; XIE, X.; ZHOU, R. *et al.* Secondary Metabolites with Cytotoxic Activities from *Streptomyces* sp. BM-8 Isolated from the Feces of *Equus quagga*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, 26, n. 24, 12/13/2021 2021.

MABROUK, M. I.; SALEH, N. M. Molecular identification and characterization of antimicrobial active actinomycetes strains from some Egyptian soils. *American Eurasian Journal Agriculture & Environment Science* 2014.

MARIANO, R.; MICHEREFF, S.; SILVEIRA, E.; ASSIS, S. *et al.* Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. **Manual de práticas em Fitobacteriologia. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco**, p. 115-119, 2000.

MATOS NETO, J. M. D. Bioprospecção de enzimas de interesse biotecnológico a partir de actinobactérias isoladas do semiárido nordestino. 2022.

MOFID, S. G. Z. E. M. T. M. Optimization of Degenerate PCR Conditions for Reducing Error Rates in Detection of PKS and NRPS Gene groups in Actinomycetes. **Avicenna journal of medical biotechnology**, 15, n. 1, 2023 Jan-Mar 2023.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOURA, P. A. D.; LIMA, T. D. A.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. *et al.* A relevância das actinobactérias como fontes de compostos antioxidantes: Avaliação de isolados de *Streptomyces* da rizosfera coletados na Caatinga Brasileira. *Microbial and Natural* 2021.

NIELSEN, J. B.; GREN, T.; MOHITE, O. S.; JØRGENSEN, T. S. *et al.* Identification of the Biosynthetic Gene Cluster for Pyracrimycin A, an Antibiotic Produced by. **ACS Chem Biol**, 17, n. 9, p. 2411-2417, Sep 16 2022.

NOËL, A.; VAN SOEN, G.; ROUAUD, I.; HITTI, E. *et al.* Optimization of cytotoxic activity of *Nocardia* sp culture broths using a design of experiments. **PLoS One**, 15, n. 1, p. e0227816, 2020.

ORTEGA, C.; HERNANDEZ, I.; CLARK, J.; LIU, M. *et al.* Complete Genome Sequence of *Streptomyces* Phage Shady. **Microbiol Resour Announc**, 10, n. 1, Jan 7 2021.

PENG, F.; ZHANG, M.-Y.; HOU, S.-Y.; CHEN, J. *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**, 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

RAMMALI, S.; HILALI, L.; DARI, K.; BENCHARKI, B. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of *Streptomyces* species from soils of three different cold sites in the Fez-Meknes region Morocco. **Scientific Reports**, 12, n. 1, p. 17233, 2022.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, 26, n. 9-10, 1999 May 1999.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G.; CAMERA, F. *et al.* PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ENZIMAS: UMA REVISÃO/MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMES: A REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, 7, p. 9232-9254, 2021.

ROMERO-RODRÍGUEZ, A. M.-C., NIDIA RUIZ-VILLAFÁN, BEATRIZ KOIRALA, NIRANJAN ROCHA, DIANA SÁNCHEZ, SERGIO. **Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces***. 2018.

SANGEETHA, M.; SIVARAJAN, A.; RADHAKRISHNAN, M.; SIDDHARTHAN, N. *et al.* Biosequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase from novel *Streptomyces kunmingensis*. **Archives of microbiology**, 204, n. 5, 04/20/2022 2022.

SANTOS, T. T. D.; PES, A. M. O.; MORAIS, P. B. A diverse and partially cellulolytic fungal community contributes to the diet of three species of the aquatic insect *Phylloicus* (Trichoptera: Calamoceratidae) in Amazonian streams. **An Acad Bras Cienc**, 93, n. suppl 4, p. e20210598, 2021.

SER, H.-L.; PALANISAMY, U. D.; YIN, W.-F.; MALEK, S. N. A. *et al.* Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. 2015.

SHARMA, N.; KOUL, M.; JOSHI, N.; DUFOSSÉ, L. *et al.* Fungal-Bacterial Combinations in Plant Health under Stress: Physiological and Biochemical Characteristics of the Filamentous Fungus *Serendipita indica* and the Actinobacterium *Zhihengliuella* sp. ISTPL4 under In Vitro Arsenic Stress. **Microorganisms**, 12, n. 2, 02/17/2024 2024.

SHIRLING, E. T.; GOTTLIEB, D., 1966, **Method for characterization of Streptomyces species**. Citeseer.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA, I. J. S. D.; SILVA, G. F. D.; PROCÓPIO, R. E. D. L.; HANADA, R. E. **POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DOS SEDIMENTOS DO RIO PURUS PARA APLICAÇÃO AGRÍCOLA**. Congresso Nacional e Semana Acadêmica de Biotecnologia da Universidade do Estado Amazonas - UEA 2019.

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

TSAI, W. H.; CHOU, C. H.; CHIANG, Y. J.; LIN, C. G. *et al.* Regulatory effects of. **Int J Med Sci**, 18, n. 5, p. 1114-1120, 2021.

W. BRAND-WILLIAMS, M. E. C. A. C. B. **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity**. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, 1995.

WESLATI, I.; SIMÕES, L.; TEIXEIRA, A.; PARPOT, P. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of *Streptomyces* sp. strain FR7 isolated from forest soil. **Letters in applied microbiology**, 76, n. 4, 04/03/2023 2023.

WU, H. C.; RÉROLLE, D.; BERTHIER, C.; HLEIHEL, R. *et al.* Actinomycin D Targets NPM1c-Primed Mitochondria to Restore PML-Driven Senescence in AML Therapy. **Cancer Discov**, 11, n. 12, p. 3198-3213, Dec 01 2021.

YANG, Z.; XIE, J.; FANG, J.; LV, M. *et al.* Nigericin exerts anticancer effects through inhibition of the SRC/STAT3/BCL-2 in osteosarcoma. **Biochem Pharmacol**, 198, p. 114938, Apr 2022.

YUN, T.; JING, T.; ZANG, X.; ZHOU, D. *et al.* Antimicrobial mechanisms and secondary metabolite profiles of *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* 5–4 against banana fusarium wilt disease using metabolomics. **Frontiers in Microbiology**, 14, p. 1159534, 2023.

ZHU, Y.; ZHANG, P.; ZHANG, J.; WANG, J. *et al.* Impact on multiple antibiotic pathways reveals MtrA as a master regulator of antibiotic production in *Streptomyces* spp. and potentially in other actinobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 86, n. 20, p. e01201-01220, 2020.

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