



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

RAMILLYS CARVALHO DE SOUZA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR *Streptomyces* sp.
ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Aniba parviflora*.**

SANTARÉM-PA

2024

RAMILLYS CARVALHO DE SOUZA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR *Streptomyces* sp.
ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Aniba parviflora*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, junto ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde.

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

SANTARÉM-PA

2024



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 24

Aos 24 (vinte e quatro) dias do mês de Outubro 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/mko-nkqh-urd>, 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 Ramillys Carvalho de Souza, intitulada "ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR *Streptomyces* sp. ISOLADO DA RIZOSFERA DE ANIBA PARVIFLORA". A Banca Examinadora constituiu-se por: Prof(a). Dra. Isabela Cristhina Gonçalves Costa (IFMA – Avaliador 1); Prof(a). Dr(a). Sandra Layse Ferreira Sarrazin (UFOPA – Avaliador 2) e; Prof(a). Dr(a). Graciene do Socorro Taveira Fernandes (UFOPA – Avaliador 3). Seguindo o regimento interno do curso, o presidente da banca Prof(a). Dr(a). Silvia Katrine Rabelo da Silva (Orientador) 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. 24 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente



ISABELLA CRISTHINA GONCALVES COSTA
Data: 25/10/2024 13:13:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 1

Documento assinado digitalmente



GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNANDES
Data: 28/10/2024 19:48:59-0300
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



SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN

Data: 28/10/2024 09:28:46-0300

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

Avaliador 3

Documento assinado digitalmente



SILVIA KATRINE RABELO DA SILVA

Data: 28/10/2024 18:38:32-0300

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

Presidente (Orientador(a))

Documento assinado digitalmente



RAMILLYS CARVALHO DE SOUZA

Data: 28/10/2024 20:47:15-0300

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

Mestrando(a)

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

S729a Souza, Ramillys Carvalho de
Atividade biológica de substâncias obtidas por *Streptomyces sp.* isolado da rizosfera de *Aniba parviflora*. / Ramillys Carvalho de Souza. – Santarém, 2024.
52 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientadora: Silvia Katrine Rabelo da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade 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. Antibiótico. 2. Anticancerígeno. 3. *Streptomyces*. 4. Rizosfera. 5. Amazônia. I. Silva, Silvia Katrine Rabelo da, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 615.329378

RAMILLYS CARVALHO DE SOUZA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR *Streptomyces* sp.
ISOLADO DA RIZOSFERA DE *Aniba parviflora*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, junto ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde.

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

Data da aprovação: 24 de outubro de 2024.

Banca examinadora:

Prof^ª Dr^ª Isabella Cristhina Gonçalves Costa.

Instituto Federal do Maranhão (IFMA) – Externo

Prof^ª Dr^ª Graciene do Socorro Taveira Fernandes.

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) – Externo ao programa.

Prof^ª Dr^ª Sandra Layse Ferreira Sarrazin.

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) – Interno.

RESUMO

Os metabólitos secundários produzidos por microrganismos são importantes fontes de compostos bioativos, destacando aqueles oriundos do gênero *Streptomyces*. Considerando que a bioprospecção deste grupo em habitats pouco explorados pode resultar na descoberta de novas substâncias bioativas, o objetivo deste estudo foi realizar a análise química de compostos antibacterianos e anticancerígenos produzidos por *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11, isolados do solo rizosférico de *Aniba parviflora* no Bioma Amazônico. A identificação ao nível de gênero foi realizada a partir do sequenciamento do RNAr 16S e a identificação dos genes biossintéticos PKS I, PKS II e NRPS. A investigação do potencial bioativo das cepas MPO1 e MPO11 iniciou com o estudo de atividade antibacteriana por meio do teste de bloco de ágar frente a 10 patógenos de interesse clínico. Foi verificada a ação citotóxica do extrato bruto contendo os metabólitos bioativos por meio de teste de citotoxicidade frente a células de carcinoma colorretal humano (HCT116). O perfil de compostos voláteis presente no extrato bruto foi construído através de análise por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). As cepas foram identificadas como pertencente ao gênero *Streptomyces* e apresentaram a presença dos genes PKS I, PKS II e NRPS, relacionados a rotas biossintéticas para produção de antibióticos. Foi possível observar a atividade antibacteriana das cepas frente a diversos patógenos de interesse clínico. *Streptomyces* sp. MPO1 apresentou o maior halo frente à *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 com 20mm, seguido de *Aeromonas hydrophila* INCQS00318 com 17,66 mm. *Streptomyces* sp MPO11 teve seu maior destaque com o halo de inibição de 18,66mm frente *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228, seguido de *Escherichia coli* ATCC10536 e *Enterococcus faecalis* ATCC10100, ambos com 18mm. O extrato bruto de *Streptomyces* sp MPO11 apresentou 77,26% de inibição do crescimento de células de carcinoma colorretal humano. O estudo cromatográfico do extrato de *Streptomyces* sp MPO1 demonstrou a presença majoritária do Ácido 2-propenoico, éster tridecílico ($C_{16}H_{30}O_2$) e este último citado não apresenta atividade biológica relatada na literatura. No extrato de *Streptomyces* sp MPO11 o éster de Fosfato de tris (2,4-di-terc-butilfenilo) ($C_{42}H_{63}O_4P$) foi o majoritário e apresenta atividades anticancerígena e antioxidante documentadas. Neste estudo foram constatados a variabilidade química e atividade biológica de *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp MPO11 isolado de solo da Amazônia,

indicando que estudos de bioprospecção de actinobactérias nativas da Amazônia resultam na descoberta de potenciais compostos com atividade antibacteriana e anticancerígena.

Palavras-chave: Antibiótico. Anticancerígeno. *Streptomyces*. Rizosfera. Amazônia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características morfológicas do isolado. Aspecto do micélio aéreo das colônias após 7 dias de cultivo à 30°C em meio ISP2, detalhamento das colônias em lupa binocular. Aumento 40x.	25
Figura 2: Características morfológicas do isolado. (A) Aspecto do micélio aéreo das colônias após 7 dias de cultivo a 30°C em meio ISP2; (B) Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a morfologia da cadeia de esporos.....	26
Figura 3: Dados moleculares de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 e <i>Streptomyces</i> sp. MPO11. Revelação do gel em fotodocumentador da amplificação do RNAr 16s. (C= controle; A1= <i>Streptomyces</i> sp MPO1; A11= <i>Streptomyces</i> sp MPO11).	27
Figura 4: Árvore filogenética de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1.	28
Figura 5: Árvore filogenética de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11.	28
Figura 6: Revelação da amplificação da PCR em gel de agarose dos genes biossintéticos identificados no DNA genômico de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 e <i>Streptomyces</i> sp. MPO11. (M= Marcador, A1= <i>Streptomyces</i> sp MPO1; A11= <i>Streptomyces</i> sp MPO11)	29
Figura 7: Perfil dos compostos voláteis presente no extrato bruto de <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 analisado por CG-EM.	34
Figura 8: Estrutura do composto identificado como majoritário, ácido 2-propenoico, éster tridecílico (C ₁₆ H ₃₀ O ₂) do extrato bruto de <i>Streptomyces</i> sp, MPO1.	36
Figura 9: Estrutura do composto Ácido propanoico, 3,3'-tiobis-, éster didodecílico (C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S) do extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp, MPO1.	36
Figura 10: Estrutura do composto Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil) (C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂) do extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp, MPO1. ...	36
Figura 11: Perfil dos compostos voláteis presente no extrato bruto de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 analisado por CG-EM.	38
Figura 12: Estrutura do composto Fosfato de tris (2,4-di-terc-butilfenilo) (C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P) do extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp, MPO11.	40
Figura 13: Estrutura do composto ácido 2-propenoico, éster tridecílico (C ₁₆ H ₃₀ O ₂) do extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp, MPO11.	41
Figura 14: Estrutura do composto 2,4-Di-terc-butilfenol (C ₁₄ H ₂₂ O) do extrato de acetato de etila de <i>Streptomyces</i> sp, MPO11.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de patógenos utilizados no ensaio de atividade antibacteriana.....	22
Tabela 4 - Resultado da média aritmética do teste de antagonismo realizado em triplicata das cepas <i>Streptomyces</i> sp. MPO1 e <i>Streptomyces</i> sp. MPO11 contra patógenos de relevância clínica.	31
Tabela 5 - Relação de compostos encontrados no extrato de acetato de etila da linhagem <i>Streptomyces</i> sp.MPO1.....	34
Tabela 6 - Relação de compostos encontrados no extrato de acetato de etila da linhagem <i>Streptomyces</i> sp.MPO11.....	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1	Busca por novas moléculas com potencial biológico de interesse farmacêutico.....	11
2.2	Resistência bacteriana.....	12
2.3	Câncer.....	13
2.4	Actinobactérias.....	14
2.5	Gênero <i>Streptomyces</i> , metabolismo secundário e genes biossintéticos.....	15
2.6	Solo rizosférico da Amazônia: Um local inexplorado.....	18
3.	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Ativação das cepas.....	20
4.2	Identificação morfológica.....	20
4.3	Identificação molecular.....	21
4.3.1	Identificação dos genes biossintéticos: PKS I, PKS II e NRPS.....	21
4.4	Avaliação da produção de substâncias antibacterianas de interesse clínico.....	22
4.5	Avaliação da atividade citotóxica - ensaio MTT.....	23
4.6	Obtenção dos metabólitos secundários dos extratos brutos de MPO1 e MPO11 e caracterização química.....	23
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	Aspectos morfológicos dos isolados MPO1 e MPO11.....	25
5.2	Sequenciamento do RNAr 16S e identificação molecular.....	27
5.3	Identificação dos genes biossintéticos.....	29
5.4	Atividade antibacteriana dos isolados <i>Streptomyces</i> sp MPO1 e <i>Streptomyces</i> sp. MPO11.....	30
5.5	Atividade citotóxica do extrato de <i>Streptomyces</i> sp. MPO11.....	32
5.6	Análise cromatográfica do extrato bruto do isolado <i>Streptomyces</i> sp MPO1.....	33
5.7	Análise cromatográfica do extrato bruto de acetato de etila do isolado <i>Streptomyces</i> sp MPO11.....	37
6.	CONCLUSÃO.....	42
7.	REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é caracterizada por suas particularidades ambientais, como solo pobre, clima quente e úmido, e uma vasta biodiversidade (EDIU *et al.* 2022). Essas características ambientais únicas da região podem abrigar uma reserva de novas cepas ou novos produtos naturais com potencial biológico de interesse farmacêutico, acarretando a identificação e isolamento de novos compostos derivados de microrganismos (KUMAR *et al.* 2021; BHAT *et al.* 2022).

As actinobactérias são consideradas um dos grupos mais importantes de microrganismos produtores de compostos bioativos, derivados do metabolismo secundário. Dentro deste grupo, destaca-se o gênero *Streptomyces*, que, ao longo de décadas de pesquisa, resultou na descoberta de diversos fármacos com atividade antibacteriana e anticancerígena (TANGERINA *et al.* 2020). O gênero é classificado como Gram positivo, aeróbio, produzindo micélio aéreo, vegetativo, esporulação e pigmentação no substrato (POLPASS *et al.* 2021).

Nesse contexto, os produtos naturais produzidos por *Streptomyces* sp vem despertando grande interesse, demonstrando resultados promissores, especialmente em relação à atividade citotóxica e antibacteriana (VALIPOUR *et al.* 2018; TANGERINA *et al.* 2020), e alguns quimioterápicos e antibióticos já estabelecidos no mercado são produzidos a partir de produtos derivados de *Streptomyces* sp (LIU *et al.* 2019; DONALD *et al.* 2022).

No contexto atual, há uma busca expressiva por novos fármacos para o controle da disseminação de inúmeras enfermidades, como as causadas por microrganismos e as doenças cancerígenas (VALIPOUR *et al.* 2018; POLPASS, 2021). A prospecção de novas linhagens de actinobactérias em habitats inexplorados tem se mostrado uma estratégia promissora para a descoberta de novos compostos antibacterianos e anticancerígenos. Acredita-se que podem ocorrer espécies ainda não identificadas ou novas moléculas de interesse farmacológico (TING LI *et al.* 2023).

É importante destacar que, com o tempo, os microrganismos patogênicos começaram a se adaptar aos medicamentos utilizados. Esse processo ocorre devido às alterações genéticas resultantes das interações estabelecidas com o ambiente, mudanças fenotípicas e a pressão seletiva, o que leva à propagação dos genes mais resistentes, e, conseqüentemente, à formação de populações altamente adaptadas. Além disso, a utilização inadequada de

medicamentos antimicrobianos contribui expressivamente para o surgimento de cepas multirresistentes, uma vez que seleciona as bactérias mais bem adaptadas (AL-SHAIBANI *et al.* 2021; SILVA *et al.* 2020).

Paralelamente a essa problemática, as doenças cancerígenas são um dos maiores desafios de saúde pública mundial e é responsável pela maior taxa de mortalidade do mundo (LUCACIU *et al.* 2022; SIEGEL *et al.* 2022). Embora inúmeras drogas anticancerígenas tenham sido desenvolvidas ao longo dos anos, a maior preocupação é a agressividade dos tratamentos, que geram diversos efeitos colaterais (LUCACIU *et al.* 2022). Portanto, torna-se crucial a identificação de novos compostos que possam apresentar atividade promissora para o combate ao desenvolvimento do câncer e com efeitos colaterais menos agressivos.

Dentre os compostos com atividade antibacteriana reconhecida, podem ser citados a Estreptomicina, Actinomicina D e Cefamicina C, que são derivados do gênero *Streptomyces* (ALAMK *et al.* 2022). Já em relação aos compostos com atividade citotóxica frente a células cancerígenas, Doxorubicina, Bleomicina e mitramicina, são alguns exemplos (LIU *et al.* 2019; ALAMK *et al.* 2022).

Considerando a vasta biodiversidade amazônica, ainda pouco explorada no que se refere à diversidade microbiana, realizar pesquisas voltadas para o isolamento e investigação do potencial biológico pode ser uma alternativa promissora para a descoberta de novos compostos bioativos derivado de *Streptomyces* sp. O bioma apresenta uma biodiversidade endêmica, sendo a maior extensão florestal tropical do mundo, destacando-se por sua rica fauna e flora, com uma ampla diversidade genética. O que induz ser um ambiente propício para a proliferação de espécies bacterianas que podem ser biotecnologicamente interessantes. Vale ressaltar que apesar de ser a maior floresta tropical do mundo, o conhecimento sobre a biodiversidade microbiana ainda é limitado (DE AZEVEDO *et al.* 2021). Portanto, a proposta dessa pesquisa é investigar o potencial biológico de *Streptomyces* sp isolado da rizosfera de *Aniba parviflora* na Amazônia.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Busca por novas moléculas com potencial biológico de interesse farmacêutico.

Atualmente, a resistência bacteriana e de células cancerígenas a medicamentos utilizados para o tratamento de infecções e do câncer, constituem um dos maiores problemas em nível mundial (JAROSZEWICZ *et al.* 2021). E por este motivo, há uma grande demanda por novos bioativos para o desenvolvimento de fármacos que possam apresentar resultados satisfatórios no controle dessas enfermidades (POLPASS, 2021).

Por décadas, a natureza vem sendo uma fonte rica de produtos medicinais, que desempenham um papel fundamental no controle de inúmeras enfermidades (NEWMAN *et al.* 2019). Os produtos naturais possuem uma diversidade estrutural e uma ampla bioatividade, direcionando o interesse para pesquisas que visam buscar novas moléculas com atividades biológicas relevantes (ANAGA *et al.* 2020).

Esses produtos naturais representam uma fonte primordial para o desenvolvimento de novos fármacos, apresentando resultados significativos no tratamento do câncer, que atualmente, o maior desafio é relacionado aos inúmeros efeitos colaterais gerados no tratamento, sendo considerado invasivo. Compostos como fenóis, flavonoides e alcaloides possuem propriedades fundamentais, como anti-inflamatórias, que influenciam a apoptose celular, inibindo a invasão e a metástase. Esses compostos naturais têm demonstrado eficácia contra vários tipos de câncer, como o de pulmão, mama e ovário (KAI *et al.* 2018).

Além da atividade anticancerígena promissora apresentada pelos inúmeros produtos naturais identificados ao longo dos anos, muitos desses compostos naturais também têm demonstrado potencial no combate a infecções bacterianas, onde, o maior desafio consiste na crescente resistência dos microrganismos patogênicos aos tratamentos convencionais (SILVA *et al.* 2020).

Ao longo do tempo, esses microrganismos desenvolveram adaptações aos inúmeros medicamentos já estabelecidos no mercado, ocorrendo principalmente por conta das alterações genéticas que ocorrem a partir das interações ambientais provocadas por mudanças fenotípicas, assim como também a pressão seletiva imposta através da propagação dos genes mais resistentes. Essa adaptação tem gerado populações altamente resistentes, agravando a dificuldade de tratamento. Ademais, o uso inadequado de antibióticos contribui significativamente para o surgimento de cepas multirresistentes, ao selecionar as bactérias mais resistentes (AL-SHAIBANI *et al.* 2021).

2.2 Resistência bacteriana

De acordo com MAITI *et al.* (2020), a cada 10 pacientes, 1 adquire infecção hospitalar causada por patógenos multirresistentes. O primeiro relato de resistência bacteriana ocorreu em 1924, quando Silberstein observou que a bactéria *Treponema pallidum* desenvolveu resistência ao antibiótico Arsfenamina (TING LI. 2023).

Com o decorrer dos anos, houve um aumento expressivo na disseminação dessas cepas, devido, principalmente, ao uso indiscriminado de antibióticos. A resistência desenvolve-se quando os microrganismos sofrem mutações, reduzindo a eficácia dos medicamentos disponíveis, tornando o controle das enfermidades cada vez mais difícil e facilitando a propagação dos genes multirresistentes (ABD EL-ALEAM *et al.* 2021).

No que diz respeito aos mecanismos de aquisição de resistência bacteriana, a resistência inata é a mais comum, podendo ocorrer devido à impermeabilidade da parede celular, ausência de receptores, ou pela produção de enzimas que modificam e inativam os antimicrobianos (MAITI *et al.* 2020). Existem vários mecanismos, sendo os mais comuns o intrínseco e o adquirido. O mecanismo intrínseco, que ocorre naturalmente, é caracterizado pela produção das enzimas β -lactamases, frequentemente encontradas em bactérias gram-negativas. Já o mecanismo adquirido envolve mutações nos genes relacionados às moléculas antimicrobianas, ocorrendo a transferência através de plasmídeos (PFEIFER *et al.* 2022).

Segundo a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) até 2050 cerca de 2,4 milhões de pessoas em todo o mundo morrerão devido a infecções causadas por patógenos multirresistentes, gerando um custo de aproximadamente 3,5 milhões de dólares por ano (HOFER. 2019).

As principais cepas patogênicas resistentes aos antibióticos atualmente são: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp e *Escherichia coli*, sendo a última, responsável por cerca de 28% das mortes relacionadas a infecções por bactérias multirresistentes (NAKAR, 2022).

A persistência dessas cepas frente aos antibióticos comercializados resulta, principalmente, da exposição inadequada aos medicamentos (THORFINNSDOTTIR *et al.* 2023) tornando-se um desafio crescente para a saúde pública global. Isso evidencia a urgente

necessidade de identificar novos compostos, uma vez que os antibióticos atualmente comercializados não têm sido eficazes (LEÓN *et al.* 2020).

2.3 Câncer

Considerado como uma doença grave e de difícil tratamento, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, apresentando a maior taxa de mortalidade do mundo (LUCACIU *et al.* 2022; SIEGEL *et al.* 2022). De acordo com CENICEROS (2023), o primeiro relato sobre o uso de quimioterápicos ocorreu em 1946, quando se testou a mostarda nitrogenada para tratamento de tumores em órgãos constituídos por células sanguíneas.

A doença é causada pelo crescimento celular anormal, com grande capacidade de invadir e se espalhar pelo organismo (HERNÁNDEZ *et al.* 2021). São identificados diversos tipos de câncer, podendo afetar órgãos, tecidos e células, manifestando-se de diferentes formas (Carcinomas, linfomas, sarcomas ou leucemia) o que demanda tratamentos específicos (MARTÍNEZ *et al.* 2020). As opções terapêuticas atualmente disponíveis incluem quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, e em alguns casos, chegando a precisar de cirurgia (SHUMI *et al.* 2022).

Ao longo dos anos, inúmeras drogas anticancerígenas foram desenvolvidas. No entanto, a maior dificuldade reside na agressividade dos tratamentos, que frequentemente causam vários efeitos colaterais, entre os mais comuns a diarreia, vômito, anemia e anorexia (LUCACIU *et al.* 2022). Assim, torna-se crucial a identificação de novos compostos que possam oferecer atividade promissora contra o câncer, com menos efeitos colaterais agressivos.

Nesse contexto, um dos grandes desafios da comunidade científica é a descoberta de novas fontes naturais para o desenvolvimento de compostos farmacológicos, resultando na identificação e isolamento de novas moléculas. Uma possível alternativa está na busca por produtos naturais derivados de microrganismos (KUMAR *et al.* 2021; BHAT *et al.* 2022).

Os produtos naturais produzidos por *Streptomyces* sp têm despertado grande interesse, pois estudos mostram resultados interessantes, especialmente no que diz respeito à atividade citotóxica. (VALIPOUR *et al.* 2018). Além disso, alguns quimioterápicos já estabelecidos no mercado são derivados de *Streptomyces* sp, como doxorubicina, rapamicina e mitramicina (LIU *et al.* 2019).

Além do potencial terapêutico, os efeitos colaterais desses compostos são mínimos quando comparado com os tratamentos convencionais. Espécies como *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces verticillus* e *Streptomyces caespitosus* são responsáveis pela produção de medicamentos como adiamicina D, bleomicina, mitosanos. Os compostos bioativos mais recentes, com atividade anticancerígena e antitumoral, têm sido isolados a partir do gênero, ressaltando a importância farmacêutica desses microrganismos (NGAMCHARUNGCHIT *et al.* 2023).

2.4 Actinobactérias

As Actinobactérias, pertencentes ao domínio das bactérias, são um dos filos mais antigos e desempenham um papel significativo na biotecnologia. Sendo saprófitas de vida livre, com esporos amplamente dispersos no ambiente, ou endofíticas, sua distribuição é cosmopolita, podendo ser encontradas em ecossistemas aquáticos e terrestres, como ambientes marinhos, de água doce, solo, rizosfera e plantas, além de formarem simbioses com diversos organismos, incluindo insetos. Já foram identificadas em ambientes extremos, como o solo da Antártida e do deserto (SILVA *et al.* 2020; KUMAR *et al.* 2021; NGAMCHARUNGCHIT *et al.* 2023).

Essas bactérias são dominantes no solo e responsáveis pelo característico cheiro terroso. Elas desempenham um papel essencial na reciclagem de carbono, assim como na decomposição de compostos saprófitos, como por exemplo o lignocelulose. Além disso, destacam-se por sua ampla distribuição, características morfogênicas e capacidade de codificar genes biossintéticos associados à produção de metabólitos secundários (SINGH; DUBEY. 2018; YONGJAE LEE. 2020; POLPASS. 2021).

Dentro do filo Actinobacteria, existe uma notável diversidade de táxons. Alguns gêneros conhecidos incluem *Actinosporangium*, *Microellobosporia*, *Synnenomyces*, *Streptoplanospora* e *Streptomyces*. No entanto, o gênero *Streptomyces* é o que mais se destaca, sendo responsável pela maior parte da produção de metabólitos secundários com atividade biológica já catalogada (LAW *et al.* 2019).

A diversidade ecológica do filo influencia principalmente em seu potencial metabólico, além do mais, as Actinobactérias são responsáveis por produzir dois terços de todos os antibióticos utilizados em tratamentos atualmente (VAN BERGEIJK *et al.* 2020). Além de antibióticos como eritromicina e gentamicina, elas também produzem compostos com atividade anticâncer, como a bleomicina e a actinomicina D, imunossuppressores como a rapamicina e o tacrolimus, antiparasitários como as avermectinas e espinosinas, além de herbicidas como o

bialafos e glufosinato, e enzimas extracelulares (XIE *et al.* 2021). Diante disso, as Actinobactérias são fontes promissoras para a descoberta de novos compostos terapêuticos (WU *et al.* 2029; VAN BERGEIJK *et al.* 2020).

Essas bactérias são reconhecidas por sua capacidade de produzir, com mais frequência, metabólitos especializados quando comparadas a outros filos bacterianos, como as cianobactérias (SAYED *et al.* 2020). Entre 2015 e 2020, foram identificados cerca de 589 novos compostos com diversas estruturas químicas provenientes de actinobactérias, sendo que mais da metade (52%) apresentou atividade biológica relevante. Esses dados reforçam a importância das Actinobactérias em aplicações biotecnológicas, especialmente no setor da saúde (XIE *et al.* 2021).

2.5 Gênero *Streptomyces*, metabolismo secundário e genes biossintéticos

O gênero *Streptomyces* destaca-se amplamente dentro do filo Actinobactéria e foi descrito pela primeira vez em 1940 por Waksman e Henrici. Essas bactérias são caracterizadas como Gram positivas, aeróbicas, produzindo micélio aéreo, vegetativo, pigmentação no substrato e esporulação (POLPASS. 2021).

Sob condições de determinadas exposições ambientais que resultam estresse, como por exemplo o esgotamento de nutrientes, as cepas do gênero sofrem uma série de alterações morfológicas. Segundo LAW *et al.* (2019), essas mudanças começam com o desenvolvimento de uma rede de filamentos ramificados, conhecida como micélio vegetativo, que posteriormente evolui para micélio aéreo e esporos.

Estima-se que cerca de 80% das actinobactérias reconhecidas na literatura como produtoras de metabólitos com aplicações antibióticas pertencem ao gênero *Streptomyces*. Uma apenas uma cepa é capaz de produzir em média 30 metabólitos, além do que, um total de 279 novos produtos naturais foram catalogados entre os anos de 2015 a 2020 (DONALD *et al.* 2022).

As linhagens possuem uma estrutura genética com redes regulatórias complexas, envolvendo uma vasta variedade de agrupamentos gênicos, estes responsáveis pela codificação de uma série de vias metabólicas que resultam na síntese de metabólitos secundários, possuindo uma infinidade de classes estruturais, como terpeno, peptídeo não ribossomal (NRPS),

policetídeo sintase (PKSI, II e III) e híbrido (PKS/NRPS) (XU *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2020; HOU *et al.*, 2020; LU *et al.* 2022; PLANCKAERT *et al.* 2021; TSUTSUMI *et al.* 2022; LI *et al.* 2023).

Com aproximadamente 826 espécies catalogadas, o gênero *Streptomyces* é amplamente estudado devido à sua capacidade notável de produzir metabólitos secundários. Estima-se que cerca de 7.600 metabólitos produzidos por actinobactérias derivam desse gênero, o que direciona muitas pesquisas para suas cepas, em busca de novas opções terapêuticas a partir dos metabólitos (AHMED *et al.* 2024).

Diferentemente do metabolismo primário, o secundário não possui funcionalidade essencialmente ligada à sobrevivência – desenvolvimento celular natural - direta do organismo (LIMA JUNIOR. 2020), porém, proporciona vantagens como aquisição de nutrientes, associações simbióticas com outros seres vivos (AL-SHAIBANI; RADIN MOHAMED; SIDIK; ENSHASY *et al.* 2021) eficácia na competição com outros seres vivos, produção de sideróforos, (auxiliam no sequestro de metais como por exemplo o ferro) resistência a luz ultravioleta, que acontece principalmente através da produção de pigmentação, resistência para o desenvolvimento em ambientes com condições extremas e proteção, com a produção de antibióticos (QUINN *et al.* 2020).

Inúmeros metabólitos secundários são produzidos por microrganismos e não dependem exclusivamente de agentes externos para serem ativos. Essa diversidade metabólica proporciona um importante fundamental, como a autodefesa e a possibilidade de interação com outros organismos, através da simbiose. Além disso, grande parte desses compostos possuem uma atividade biológica que desperta o interesse visando possíveis soluções terapêuticas para a saúde da humanidade. Acredita-se que muitas das funções e benefícios desses compostos ainda não são conhecidos, e por esse motivo as pesquisas são direcionadas para a identificação e entendimento dessas moléculas (TING LI *et al.* 2023).

Os genes biossintéticos do gênero *Streptomyces* são fontes inesgotáveis de metabólitos, produzindo em média 100.000 compostos bioativos naturais, com diversas aplicações, incluindo farmacológicas e agroquímicas (BUBICI. 2018; HARIR *et al.* 2018; ABDEL *et al.* 2020). Esses produtos apresentam atividades antimicrobiana, antitumoral, antiviral, antioxidante, imunossupressora, inseticidas e herbicidas (NGUYEN *et al.* 2020; SALWAN. 2020; PHAM *et al.* 2021; SHARMA *et al.* 2021).

Entre os genes biossintéticos, os PKS (poliketídios sintase) e NRPS (peptídeos não-ribossomais) se destacam pela sua relevância farmacológica e podem ser ativos em condições laboratoriais através do cultivo. Suas vias biossintéticas envolvem enzimas que são codificadas por genes co-regulados organizados em clusters. Em bactérias, três tipos de PKS são descritos, I, II e III. As linhagens desse gênero são as principais produtoras de PKS e NRPS, se destacando especialmente pela capacidade do seu genoma conter em média de 25 a 70 agrupamentos de clusters de genes biossintéticos (CBGs) (JIANG YE *et al.* 2019).

Com destaque para a atividade antibacteriana, *Streptomyces* é responsável por aproximadamente 80% dos antibióticos comercializados atualmente, desde a descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico desse grupo. Desde então, inúmeros compostos com ação antibacteriana têm sido identificados (AZMAN *et al.* 2017; ALAM K *et al.* 2022).

Além dos diversos compostos com ação antibacteriana, esses microrganismos produzem uma série de substâncias descritas na literatura com potencial promissor para o controle de células cancerígenas. Os principais compostos derivados desse gênero foram identificados como doxorrubicina e bleomicina. AZMAN *et al.* (2017) isolaram compostos fenólicos e pirrolopirazina de *Streptomyces* sp pertencentes a manguezais na Malásia com atividade anticancerígena.

Nos últimos anos, prospecção de microrganismos avançou significativamente com o desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento genômico. As primeiras espécies que tiveram seu genoma sequenciado foram *Streptomyces celicolor* e *Streptomyces avermitilis*. As sequências foram responsáveis por revelar a grandiosidade do potencial para o desenvolvimento de produtos naturais a partir desse gênero (MATARRITA *et al.* 2021).

Dada a vasta produção de compostos bioativos por linhagens de *Streptomyces*, a mineração genômica tornou-se uma ferramenta crucial na busca por novos metabólitos. Essa técnica permite identificar vias biossintéticas, genes silenciosos ou crípticos, frequentemente associados a NRPS e PKS, facilitando a obtenção de informações genéticas e assim como auxilia sobre as atividades biológicas associadas para que sejam identificadas as estruturas químicas. O uso dessas técnicas pode revolucionar a descoberta de novos compostos bioativos (FRANÇA., *et al.* 2023; NGAMCHARUNGCHIT *et al.* 2023).

O interesse por novas alternativas para o controle de doenças resistentes aos medicamentos atuais torna o gênero *Streptomyces* um dos mais promissores na indústria farmacêutica, devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários com alta

bioatividade (UEMURA *et al.* 2023), Caracterizando-se como um dos microrganismos com maior excelência na capacidade da produção já identificada de metabólitos secundários de interesse farmacêutico (TANGERINA *et al.* 2020).

2.6 Solo rizosférico da Amazônia: Um local inexplorado

Desempenhando um papel importante na colonização rizosférica, linhagens de *Streptomyces* sp estabelecem uma interação intraespecífica simbiótica com as plantas, penetrando em seus tecidos e colonizando suas raízes. Este ambiente é considerado um dos mais favoráveis para o isolamento de actinobactérias (ASSAD *et al.* 2021).

Segundo MAITI *et al.* (2020) o solo contém cerca de aproximadamente 90% do total de actinobactérias catalogadas na literatura. No início da década de 1940, a triagem sistemática de linhagens de *Streptomyces* que colonizam o solo, realizada por Selman Waksman, resultou na descoberta de inúmeras moléculas antibióticas, como a estreptomicina (DURAND *et al.* 2019).

Além disso, as espécies do solo desempenham um papel essencial nos ciclos biogeoquímicos, principalmente devido à produção da enzima hidrogenase, que atua ativamente no ciclo do hidrogênio. Essas bactérias também influenciam diretamente nas comunidades microbianas do solo e estão envolvidas na formação de matéria orgânica e decomposição da serapilheira. O solo rizosférico, em particular, apresenta condições favoráveis para a identificação de novas linhagens, espécies importantes na produção de metabólitos, como *Streptomyces triticiradicis* e *Streptomyces inhibens* são exemplos de isolados desse ambiente (DONALD *et al.* 2022).

A *Aniba parviflora* (Meiss.) é uma planta amplamente distribuída na região Norte do Brasil. Conhecida popularmente como macacaporanga, pertencente à família *Lauraceae*, pode atingir entre 15 e 30 metros de altura e possui um tronco cilíndrico de diâmetro entre 0,3 e 1,0 metro, além de uma casca marrom-amarelada. Destaca-se por suas características aromáticas, que despertam o interesse da indústria. Comumente encontrada nas margens de igarapés, essa espécie também apresenta uma rica composição de metabólitos bioativos, como fenólicos, flavonoides e taninos, com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, relatadas em pesquisas com o óleo essencial e extratos orgânicos derivados de espécies do gênero *Aniba* (REVILLA. 2002; MATTOSO. 2005; DEWICK. 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a composição química e verificar a ação antibacteriana e anticancerígena dos extratos brutos de *Streptomyces* spp, isoladas da rizosfera *Aniba parviflora* Syn (Macacaporanga) do Bioma Amazônico.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar isolados nativo da rizosfera de *Aniba parviflora* a partir de taxonomia polifásica clássica e molecular;
- Investigar se os isolados promovem a expressão de genes biossintéticos envolvidos na produção de compostos bioativos PKS I, PKS II e NRPS;
- Verificar a produção de compostos microbianos com atividade antibacteriana;
- Extrair os compostos bioativos durante o cultivo bacteriano para obtenção do extrato bruto;
- Analisar a atividade citotóxica do extrato bruto contra a linhagem de células de carcinoma colorretal humano (HCT116);
- Investigar o perfil químico de compostos voláteis presente no extrato bruto através de análise por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ativação das cepas

As cepas utilizadas neste estudo pertencem ao Biobanco de Actinobactérias da Amazônia – BIOACTA, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Oeste do Pará. Estas estão armazenadas sob refrigeração em glicerol 20% e com o meio de cultura *International Streptomyces Project-2* (ISP-2).

As linhagens utilizadas são identificadas como grupo MPO, uma sigla que se refere à vegetação Macacaporanga (*Aniba parviflora*) onde, especificamente da rizosfera foram coletadas, em Santarém-PA, resultando em 11 isolados.

Para a seleção dos isolados, foi realizada uma triagem inicial, seguida pela ativação das cepas, avaliação das características morfológicas similares ao gênero *Streptomyces* sp e análise preliminar da atividade antagônica contra patógenos de relevância clínica. Com base nesses critérios, foram selecionadas duas cepas: MPO1 e MPO11.

A ativação foi realizada removendo-se o material com uma alça estéril descartável e empregando a técnica de semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo o meio de cultura ISP-2 (Extrato de Levedura 4 g, Extrato de Malte 10 g, Glicose 4 g, Ágar 15 g e Água destilada 1 L, pH= 7,2) (PRIDHAM, HESSELTINE e BENEDICT, 1958). Após a semeadura, as placas foram armazenadas em estufa à 37°C e monitoradas por 20 dias.

4.2 Identificação morfológica

Seguindo as recomendações do *International Streptomyces Project* (ISP) (SHIRILLING; GOTTLIEB, 1966). Durante o cultivo em meio ISP-2 a 30°C, por um período de 7 e 10 dias, a caracterização macromorfológica dos aspectos culturais das linhagens foi realizada por meio da análise visual com lupa binocular e contador de colônias. (PARTE, 2012). Foram observadas a formação do micélio vegetativo, aéreo, aspecto das colônias e produção de pigmentos.

A caracterização micromorfológica, baseada na técnica de microcultivo, foi conduzida após o cultivo das cepas em meio ISP-2 (30°C durante 7 dias). Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO 5410LV) em 10 kV, para detalhamento da cadeia de esporos.

4.3 Identificação molecular

O DNA genômico bacteriano foi extraído segundo a recomendação do protocolo de extração do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA, USA), utilizando uma biomassa resultante do cultivo em 50 mL de meio líquido YEME (Extrato de levedura 3 g.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.

A amplificação do RNAr 16S foi realizada em termociclador *Bioneer MyGenie 96 Thermal block (Global Genomics Partner)* utilizando o par de *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'), sob as 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 (50 µL) continha 1 µL de DNA 100 ng, 1 µL de cada *primer* 10µM, 10µL de 5x Trans start Fast Pfu buffer, 4µL de DNTP's (2,5 mM), 1 µL de Trans Start Fast Pfu polymerase, 5µL de PCR stimulant (5x), 2 µL de MgSO₄ (50 mM) e 25 µL de água livre de nuclease. Os *amplicons* positivos foram avaliados pelo tamanho em gel de agarose (1,2%), sendo utilizado como padrão o marcador Ladder 1kb. A PCR foi purificada utilizando o Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, MADISON, WI, USA) seguindo as recomendações do protocolo.

O sequenciamento SANGER ocorreu em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems/Hitashi. Para o sequenciamento utilizou-se o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (código 4337456), e as corridas foram realizadas em capilares de 36cm utilizando o polímero POP7. Os *contigs* gerados foram analisados pelo software *Sequencing Analysis 7.0* utilizando o *KB BaseCaller* e as sequências adquiridas foram alinhadas manualmente no banco de dados *GenBank* com BLAST por alinhamento múltiplo CLUSTAL X. A árvore filogenética foi construída usando os métodos de *neighbor-joining* e máxima parcimônia no software molecular *Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA versão 11.0.13) com base em valores de *bootstrap* de 1.000 replicações.

4.3.1 Identificação dos genes biossintéticos: PKS I, PKS II e NRPS

Nessa etapa, foram utilizados *primers* para detectar os genes responsáveis pela biossíntese de moléculas de interesse farmacêutico descritas como Policetídio sintase (PKS-I, PKS-II), e Peptídeos não ribossomais (NRPS): PKS I: K1F (5'-TSA AGT CSAACA TCG GBC A-3') e M6R (5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3') (AYUSO-SACIDO e GENILLOUD 2005); PKS II: 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) é constituída de DNA genômico 100 ng (1µL), 5x Trans start Fast Pfu buffer (10 µL), primer 10 µM (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 ocorreu a partir das condições: 98°C por 4'; 30 ciclos de 94°C (1'), 57,5°C (30''), 72° C (1' / kb); extensão de 72°C (10'). O produto da PCR foi amplificado em eletroforese com gel de agarose (1,2 g de agarose para 100ml de TAE) e bandas entre 1.200-1.400, 600, 1.400 e 700-800 pb foram classificadas como produtos dos genes PKS I, PKS II e NRPS.

4.4 Avaliação da produção de substâncias antibacterianas de interesse clínico.

As cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar ISP-2, utilizando a técnica de semeadura *Spread plate*. Após a esporulação, blocos de ágar (6 mm de diâmetro) foram recortados com ponteira descartáveis para a realização do teste de antagonismo, através do método de bloco de gelose (ICHIKAWA; DATE; ISHIKURA; OZAKI, 1971). Os testes foram realizados com 10 patógenos de interesse clínico, e a intensidade da atividade inibitória foi determinada com base no diâmetro do halo de inibição, segundo ŞAHİN; UĞUR (2003), obtendo como resultado a média aritmética do teste realizado em triplicata.

Tabela 1 - Lista de patógenos utilizados no ensaio de atividade antibacteriana.

Patógeno	Referência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	INCQS00318
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC10100
<i>Escherichia coli</i>	ATCC10536
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC4352
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC7468
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC13315
<i>Salmonella enteritidis</i>	INCQS00268
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC14458
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Avaliação da atividade citotóxica - ensaio MTT

A linhagem celular de tumor sólido HCT-116 (carcinoma de cólon humano) foi utilizada no experimento de avaliação da atividade citotóxica. As células foram cultivadas em garrafas de cultura utilizando o meio de cultura RPMI e foi manuseada em câmara de fluxo laminar e mantida em incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ de 5% e umidade de 95%. O acompanhamento foi realizado com auxílio de microscópio óptico invertido. Para desprendimento da célula foi utilizado solução de tripsina-EDTA a 0,5%. O extrato foi diluído conforme o cálculo para o DMSO (dimetilsulfóxido), em fluxo laminar, e-solubilizado e, armazenado posteriormente para ser utilizado após 24 horas (MOSMANN, 1983).

O teste do MTT foi utilizado para avaliação da atividade citotóxica que consiste na análise colorimétrica que quantifica indiretamente a célula viável, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, em formazan, um composto solúvel de coloração púrpura, ocorrendo pela atividade de enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983).

A linhagem celular de tumor sólido (HCT 116) foi plaqueada 2 x 10³ células por poço, em placas de 96 poços (1 x 10⁴ células /ml em 200 µL de meio). Após 24 horas, as substâncias foram adicionadas em concentrações de 100 µM a 0,0064 µM, cada concentração em duplicata, e incubadas por 69 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (Concentrações de 0,0032 a 50 µM) 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). Após três horas, o sobrenadante foi removido, e posterior a secagem da placa, o precipitado contendo formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL 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.

4.6 Obtenção dos metabólitos secundários dos extratos brutos de MPO1 e MPO11 e caracterização química

A extração dos metabólitos secundários ocorreu com o solvente acetato de etila (CH₃COOCH₂CH₃). O cultivo das cepas foi realizado em placas de Petri (Duas placas de 90mm) contendo meio ISP2 utilizando a técnica de semeadura *Spread plate*, e em seguida foram

armazenadas em estufa bacteriológica a 30°C durante 7 dias. Após a formação completa da esporulação em placa, foram realizados recortes com bisturi estéril e a cultura foi adicionada a tubos falcon onde posteriormente foi depositado 10ml de acetato de etila. O material passou por agitação manual durante 20 minutos e permaneceu *overnight*. Em seguida, foi realizada a concentração a vácuo em *SpeedVac*, (40min a 45°C) para obtenção do extrato.

Após a obtenção do extrato bruto, este foi submetido a análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) para identificação de compostos orgânicos e voláteis presentes no extrato bruto.

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos morfológicos dos isolados MPO1 e MPO11.

Passaram pela triagem inicial 11 isolados, sendo selecionados 2, estes desenvolveram micélio aéreo e vegetativo, com formação em até 15 dias em meio ISP-2. O micélio aéreo, formado a partir da superfície do meio de cultura, foi identificado na cor branca. O micélio vegetativo, que é formado na parte inferior, apresentou a cor amarelo. Estas características foram observadas em ambos os isolados, que igualmente, não produziram pigmentos. Na figura a seguir, podem-se observar as estruturas morfológicas apresentadas por MPO1 e MPO11, que, com base na literatura, são características do gênero *Streptomyces*.

A figura 1 apresenta as características do isolado MPO1, com a formação do micélio aéreo liso e pulverulento, colônias velutinas, sem viscosidade e coloração branca.

Figura 1: Características morfológicas do isolado. Aspecto do micélio aéreo das colônias após 7 dias de cultivo à 30°C em meio ISP2, detalhamento das colônias em lupa binocular. Aumento 40x.



A figura 2 apresenta as características do isolado MPO11, que são similares com os apresentados anteriormente. Além da análise macromorfológica, foi possível realizar a análise microscópica deste isolado, e após a observação das características da cadeia de esporos, confirmou-se a presença predominante de uma cadeia de esporos simples bem definida, com a ornamentação da superfície dos esporos no formato oval com padrão característico do gênero *Streptomyces* no formato *Retinaculum apertum*. Sendo característica relevante para a identificação do isolado MO11 (ERWIN *et al.*, 2020).

Figura 2: Características morfológicas do isolado. (A) Aspecto do micélio aéreo das colônias após 7 dias de cultivo a 30°C em meio ISP2; (B) Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a morfologia da cadeia de esporos.



De acordo com pesquisas focadas na identificação do gênero, características morfológicas como o desenvolvimento de micélio aéreo, aspecto pulverulento, enrugado e seco, são consideradas seletivas para diferenciar *Streptomyces* sp de outros gêneros bacterianos (AMARESAN *et al.* 2020). As estruturas morfológicas foram analisadas conforme descrito no *Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology* (2012), que aponta a similaridade dos isolados MPO1 e MPO11 com o gênero.

5.2 Sequenciamento do RNAr 16S e identificação molecular

A partir dos dados obtidos através da amplificação do RNAr 16S e após a análise e sequenciamento no banco de dados GenBank, foi confirmado que os isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*, corroborando os resultados sugeridos após a análise morfológica. As árvores filogenéticas construídas (Figura 4), apresentam similaridade com clados constituídos por espécies do gênero. Os isolados foram nomeados como *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11. A seguir podem ser observadas as árvores filogenéticas (figura 4 e 5) juntamente com a imagem da amplificação do RNAr 16s (figura 3).

Figura 3: Dados moleculares de *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11. Revelação do gel em fotodocumentador da amplificação do RNAr 16s. (C= controle; A1= *Streptomyces* sp MPO1; A11= *Streptomyces* sp MPO11).

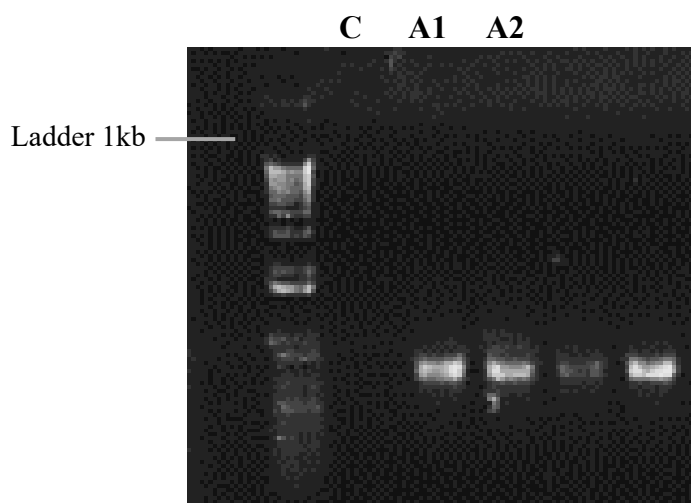


Figura 4: Árvore filogenética de *Streptomyces* sp. MPO1.

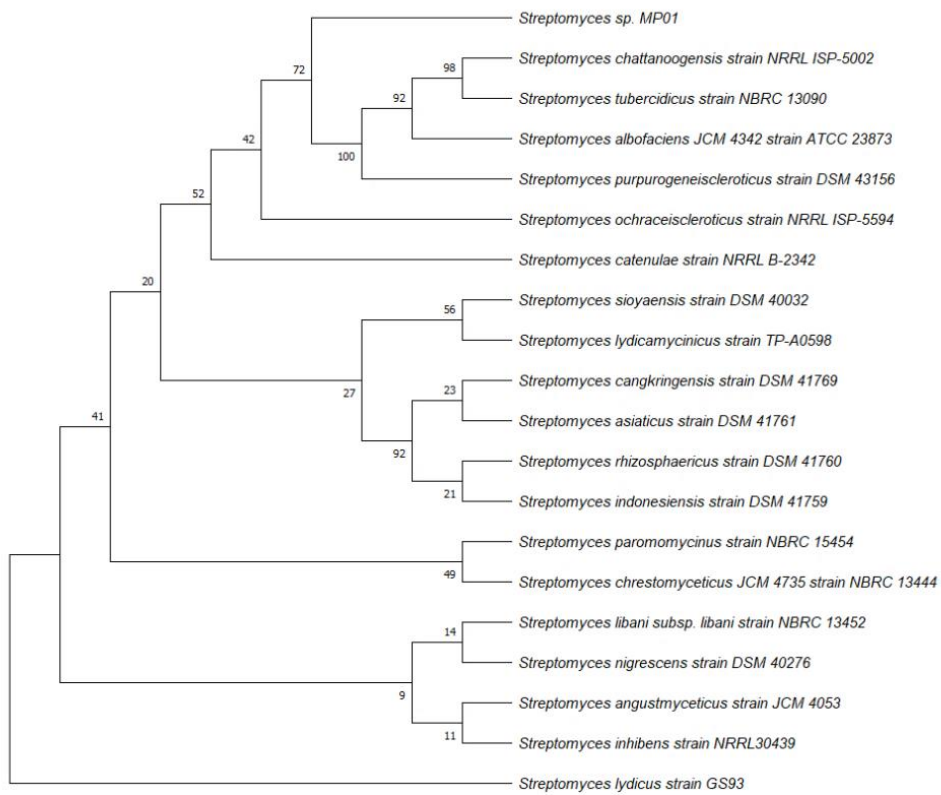
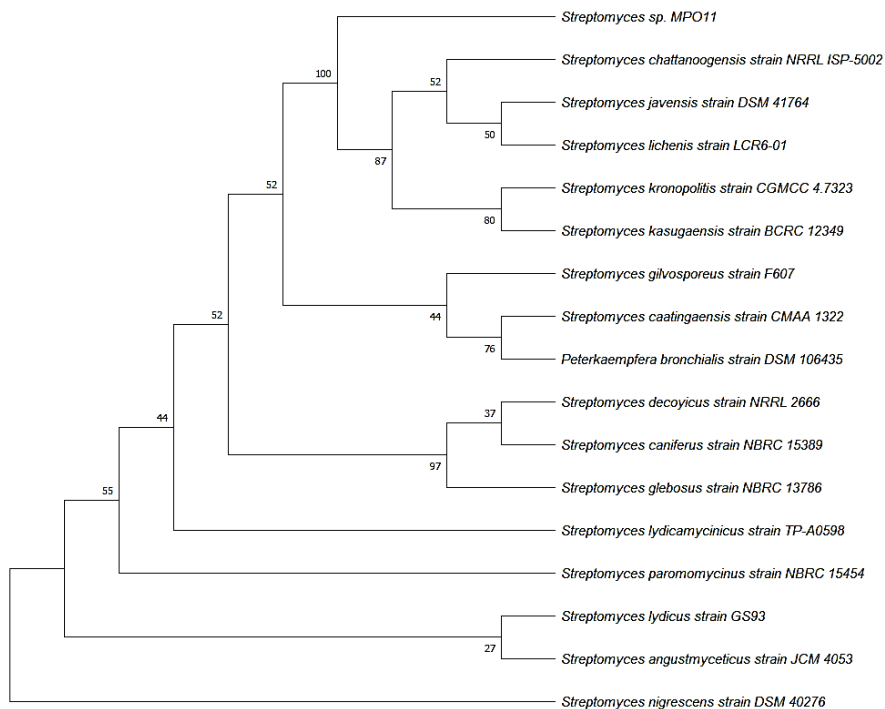


Figura 5: Árvore filogenética de *Streptomyces* sp. MPO11.



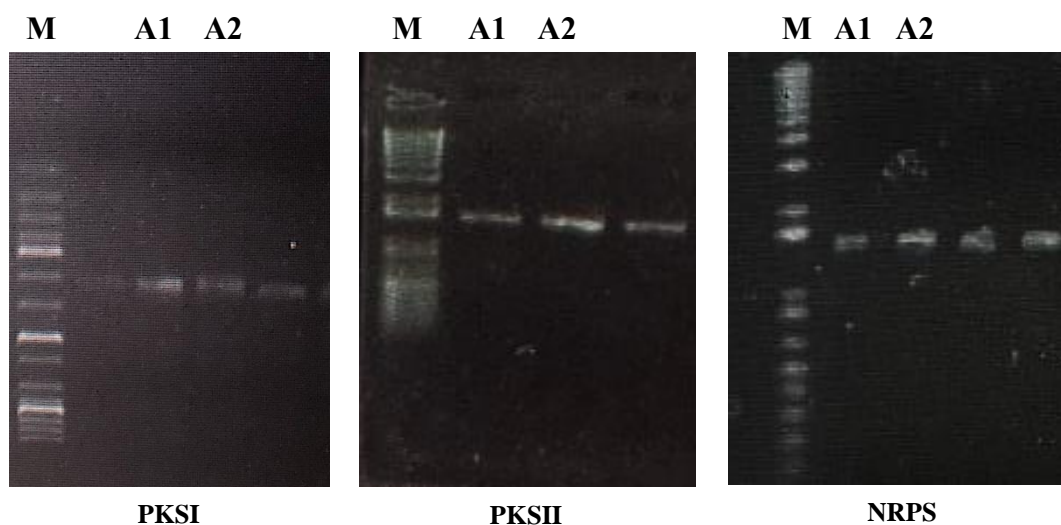
A região do DNA bacteriano sequenciada, RNAr 16S, é predominantemente utilizada para a identificação, sendo considerado um método eficaz, sensível e seguro (KURNIJASANTI *et al.* 2022). Os primers utilizados para amplificação por PCR são específicos para a identificação do gênero *Streptomyces*, e a confirmação foi realizada através dos resultados obtidos após a construção das árvores filogenéticas.

É importante ressaltar que o gênero apresenta predominância no solo, ambiente em que as linhagens foram isoladas. O gênero *Streptomyces* compõe cerca de 30% da microbiota (POLPASS *et al.* 2021), e parte dessas espécies colonizam a rizosfera de plantas ou os tecidos vegetais sem gerar danos (AL-SHAIBANI *et al.* 2021). Este é o primeiro relato do isolamento do gênero na rizosfera de *Aniba parviflora* na Amazônia.

5.3 Identificação dos genes biossintéticos

A partir da revelação do gel em fotodocumentador, foi confirmando a presença dos genes NRPS, PKS I e PKS II no genoma de *Streptomyces* sp MPO1 e *Streptomyces* sp MPO11. A figura 6 apresenta o resultado da amplificação dos genes.

Figura 6: Revelação da amplificação da PCR em gel de agarose dos genes biossintéticos identificados no DNA genômico de *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11. (M= Marcador, A1= *Streptomyces* sp MPO1; A11= *Streptomyces* sp MPO11



Os metabólitos secundários são biossintetizados por meio de reações bioquímicas catalisadas por enzimas, as quais são codificadas por genes localizados no mesmo locus genômico, formando um cluster de genes biossintéticos (OTANI *et al.* 2022). A identificação desses genes pode indicar a produção de compostos que apresentam atividade biológica de interesse farmacêutico.

O policetídeo sintases (PKS) e peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS) são considerados enzimas de produtos naturais de suma importância, com inúmeras atividades descritas na literatura, que variam entre atividades antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, entre outras, sendo comumente identificados em espécies do gênero *Streptomyces* (NAMIL *et al.* 2020).

Segundo RISDIAN *et al.* (2019), alguns exemplos de policetídeos produzidos pelo gênero *Streptomyces* incluem tetraciclina (atividade antibacteriana), anfotericina B (atividade antifúngica) e doxorrubicina (atividade anticancerígena). Já SIVALINGAM *et al.* (2019) retratam em seus resultados a produção de metabólitos com atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (MTCC1687) e *Klebsiella pneumoniae* (MTCC3384), sintetizados por peptídeos sintetases não ribossomais (NRPS).

A identificação dos genes biossintéticos é considerada uma etapa crucial para o entendimento e caracterização dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces*. Para uma compreensão mais detalhada, é necessário realizar o sequenciamento genético, mas a etapa de amplificação é fundamental para o sucesso dos passos subsequentes.

5.4 Atividade antibacteriana dos isolados *Streptomyces* sp MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11.

A linhagem *Streptomyces* sp. MPO1 apresentou resultados promissores para todos os 10 patógenos de relevância clínica testados, com destaque para o patógeno *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 com halo de 20mm, *Aeromonas hydrophila* INCQS00318 com 17,66 e *Enterococcus faecalis* ATCC10100 com 17,33mm. O isolado *Streptomyces* sp MPO11 também apresentou halos promissores para todos os patógenos testados. Seu maior destaque foi contra o patógeno *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228 com halo de 18,66mm, seguido de *Escherichia coli* ATCC10536 e *Enterococcus faecalis* ATCC10100 ambos com 18mm. Na tabela 4 apresentam-se os resultados os isolados para todos os patógenos.

Tabela 2 - Resultado da média aritmética do teste de antagonismo realizado em triplicata das cepas *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11 contra patógenos de relevância clínica.

Patógeno	Registro	Halo de inibição (mm)	
		MPO1	MPO11
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606	20	15
<i>Aeromonas hydrophila</i>	INCQS00318	17.66	16.33
<i>Escherichia coli</i>	ATCC10536	17	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC10100	17.33	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC4352	17	16.66
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC7468	17	16
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC13315	14.66	16.66
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC14458	15.33	15.33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228	17	18.66
<i>Salmonella enteritidis</i>	INCQS00268	11	12.66

Fonte: Elaborado pela autora.

Há uma infinidade de estudos focados na avaliação da produção de substâncias com potencial antibacteriano pelo gênero *Streptomyces*, que, como mencionado ao longo deste trabalho, é considerado promissor na produção de uma vasta diversidade de produtos naturais.

O gênero *Streptomyces* é reconhecido como uma fonte importante de metabólitos secundários, tendo sido identificados diversos fármacos com diferentes finalidades, principalmente na produção de antibióticos, como a estreptomicina, descoberta a partir de isolados do solo (WAKSMAN. 1953), além da daptomicina (WATERS *et al.* 2021), e tetraciclina (ALAM K *et al.* 2022).

Vale ressaltar que cerca de 80% dos antibióticos comercializados são derivados do gênero (ALAM K *et al.* 2022), incluindo espécies como *Streptomyces parvulus* (RAHMAN *et al.* 2011) e *Streptomyces werraensis* MI S.24 3 (MOHAMED *et al.* 2021). Estudos recentes sobre a bioprospecção do gênero, especialmente daqueles que

habitam rizosferas de plantas, têm apresentado atividades antibacterianas promissoras, como relatado por SRIRAGAVI *et al.* (2023), assim como os isolados desta pesquisa.

Corroborando os resultados apresentados, KHADAYAT *et al.* (2020) descrevem uma linhagem do gênero produzindo substâncias contra o patógeno *Escherichia coli*, que apresenta similaridade aos resultados obtidos nos testes com *Streptomyces* sp. MPO1 (17mm) e *Streptomyces* sp. MPO11 (18mm). Diversas outras pesquisas relatam a produção de metabólitos bioativos produzidas contra bactérias Gram-negativas, estas que são mais resistentes aos compostos antibacterianos devidos à sua barreira de membrana dupla e os mecanismos de efluxo transmembrana (SAPKOTA *et al.* 2020).

Nesse sentido, cabe destacar o potencial promissor de *Streptomyces* sp. MPO1 para o controle de bactérias Gram-negativas, com inibição significativa dos patógenos *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 e *Aeromonas hydrophila* INCQS00318, além de resultados relevantes para *Klebsiella pneumoniae* ATCC4352 e *Escherichia coli* ATCC10536.

Ao analisar o perfil antibacteriano dos isolados e com base nos resultados de pesquisas realizadas com espécies do gênero, é possível enfatizar que *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11 possuem potencial promissor para a produção de compostos bioativos derivados de metabólitos secundários para o controle de patógenos de relevância clínica. Sendo necessário a realização de outros testes para o isolamento dessas substâncias e confirmação da atividade biológica.

5.5 Atividade citotóxica do extrato de *Streptomyces* sp. MPO11.

O extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO11 apresentou 77,26% de inibição do crescimento celular da linhagem de células de carcinoma colorretal humano (HCT116).

SHARMA *et al.* 2021 destacam que o gênero *Streptomyces* produz uma variedade de compostos anticancerígenos já estabelecidos em tratamentos, podendo ser citada a adriamicina, capaz de inibir a replicação do DNA e identificada a partir de *Streptomyces peucetius*. Inúmeras outras espécies, como *Streptomyces verticillus* e *Streptomyces peucetius*, são responsáveis pela produção de Actinomicina D, Bleomicina, Daunorrubicina e Mitomicina C.

Estudos que avaliam a atividade citotóxica de espécies do gênero frente a células cancerígenas mostram resultados promissores, reforçando os achados desta pesquisa. ALHAWSAWI *et al.* (2023) apresentam resultados sobre a atividade da linhagem *Streptomyces* sp. (A16), isolada do solo, frente a células de carcinoma hepatocelular (HCC).

Especificamente quanto à ação contra células HCT116, HONG *et al.* (2009) relataram que 20% das bactérias isoladas do solo de mangue eram ativas, com o gênero *Streptomyces* apresentando a maior atividade. Em consonância com essa afirmação, KOUROSHNIA *et al.* (2022) descreveram o efeito inibitório de compostos bioativos produzidos por *Streptomyces* sp. 801, isolado do solo, contra a mesma linhagem de células cancerígenas.

Esses resultados reforçam a hipótese de que os metabólitos secundários produzidos por bactérias do gênero, como *Streptomyces* sp. MPO11, podem se tornar uma opção terapêutica eficaz para a inibição de células HCT116. No entanto, são necessárias mais pesquisas para compreender plenamente os efeitos, bem como determinar a eficácia e segurança dessas substâncias para o uso clínico.

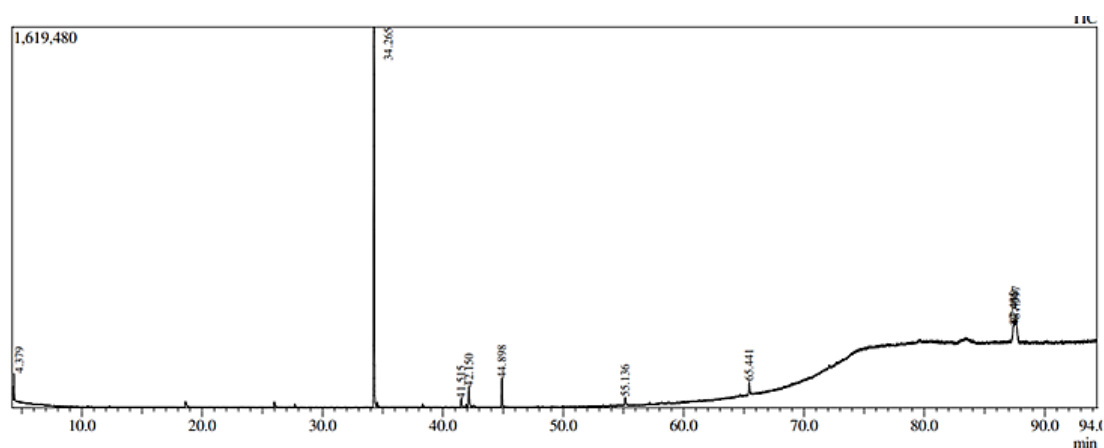
5.6 Análise cromatográfica do extrato bruto do isolado *Streptomyces* sp MPO1.

Os compostos presentes na amostra pertencem a classe como ésteres fosfato, lactamas e outras. Dentre os compostos identificados, 4 foram confirmados com atividades biológicas catalogadas, segundo a bibliografia consultada, incluindo atividades anticancerígenas e antioxidante (LALITHA *et al.* 2016; ZAHARA *et al.* 2022).

O composto identificado com maior pico foi o Ácido 2-propenoico, éster tridecílico e este não apresenta atividade biológica relatada na literatura. Além dele, outros compostos se destacaram, como o Ácido propanoico, 3,3'-tiobis-, éster didodecílico e Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil).

A figura 7 apresenta o perfil cromatográfico do extrato, destacando os picos de retenção, intensidade e tempo.

Figura 7: Perfil dos compostos voláteis presente no extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO1 analisado por CG-EM.



Na tabela 5, estão listados os compostos identificados, juntamente com suas respectivas atividades biológicas reportadas.

Tabela 3 - Relação de compostos encontrados no extrato de acetato de etila da linhagem *Streptomyces* sp.MPO1.

Tempo de retenção (min)	Area (%)	Fórmula molecular	Composto	Atividade reportada
4.379	1,98	C ₆ H ₁₀ O ₄	1,1-Etanodiol, diacetato	Não reportado
34.265	66.22	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido 2-propenoico, éster tridecílico	Não reportado
41.515	1.78	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)	Atividade Anticâncer (LALITHA <i>et al</i> 2016)
42.150	3.86	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)	Atividade Anticâncer (LALITHA <i>et al</i> 2016)

44.898	5.24	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ S	Ácido propanoico, 3-mercaptop-, éster dodecílico	Não reportado
55.136	1.57	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro- 3-(fenilmetil)-	Atividade Antifúngica (ABDELLA <i>et al.</i> , 2023)
65.441	2.49	C ₁₈ H ₃₅ NO	9-Octadecenamida, (Z)-	Não reportado
87.405	3.21	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	4-metiloctano-1,8-dioato de dimetilo	Não reportado
87.450	4.06	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	Fosfato de tris(2,4-di-terc-butilfenilo)	Atividade Anticâncer, Atividade Antioxidante (ZAHARA <i>et al.</i> , 2022; SACHIN <i>et al.</i> , 2021)
7.597	9.57	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S	Ácido propanoico, 3,3'-tiobis-, éster didodecílico	Atividade Anti-inflamatória (EKLUND <i>et al.</i> , 1990)

Fonte: Elaborado pela autora.

Embora o éster, ácido 2-propenoico, éster tridecílico (C₁₆H₃₀O₂), tenha sido identificado como o composto majoritário no extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO1, representando 66,22% da área, não é possível afirmar que a atividade promissora apresentada pelo isolado se deva exclusivamente a esse composto, uma vez que para essa confirmação é necessário testá-lo de forma isolada. Além disso, não há relatos na literatura sobre seu potencial biológico, nem confirmações científicas que assegurem a identificação de sua produção a partir do gênero *Streptomyces*.

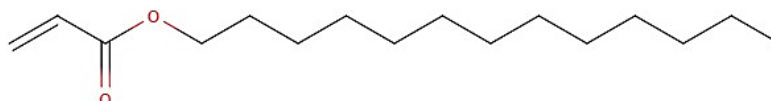
Apesar da ausência de estudos que comprovem a atividade desse composto de forma isolada, através da bibliografia consultada, foi possível encontrar relatos como de RAJAN *et al.* (2021) que identificaram o composto no extrato metanólico da planta *Artemisia annua* L., sendo também o composto majoritário do extrato (Assim como no extrato de *Streptomyces* sp. MPO1), apresentando atividade antimicrobiana.

Além disso, SUDHARSHINI *et al.* (2024) também detectaram o composto em extratos de microverdes de feno-grego. No extrato metanólico, foi confirmada a atividade antioxidante, enquanto o extrato de acetato de etila apresentou atividade antibacteriana contra patógenos como *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*, além de atividade antibiofilme. Estas pesquisas, assim como os resultados obtidos nesse

trabalho, reforçam a necessidade de estudos detalhados, com o isolamento do composto, para avaliar seu potencial.

A figura 8 apresenta a estrutura do composto químico segundo o *National Institutes of Health* (NIH).

Figura 8: Estrutura do composto identificado como majoritário, ácido 2-propenoico, éster tridecílico ($C_{16}H_{30}O_2$) do extrato bruto de *Streptomyces* sp, MPO1.



Fonte: Elaborado pela autora.

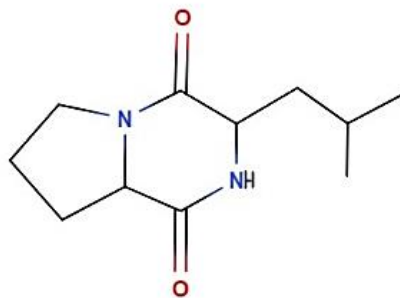
Outros dois compostos foram identificados com destaque, sendo o segundo com maior pico o Ácido propanoico, 3,3'-tiobis-, éster didodecílico ($C_{30}H_{58}O_4S$), pertencente a classe dos ésteres de ácido tiodipropiônico, e o terceiro composto, Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil) ($C_{11}H_{18}N_2O_2$), que é identificado como da classe dos lactamas. Ambos já foram testados de forma isolada e apresentam atividades biológicas documentadas, anti-inflamatória e anticancerígena, respectivamente (EKLUND *et al.* 1990; LALITHA *et al.* 2016). Porém, com base na busca bibliográfica realiza, também não foi identificado a produção destes compostos por bactérias do gênero *Streptomyces*. As figuras 9 e 10 apresentam as estruturas de ambos os compostos.

Figura 9: Estrutura do composto Ácido propanoico, 3,3'-tiobis-, éster didodecílico ($C_{30}H_{58}O_4S$) do extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp, MPO1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10: Estrutura do composto Pirrolo[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil) ($C_{11}H_{18}N_2O_2$) do extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp, MPO1.



Fonte: Elaborado pela autora.

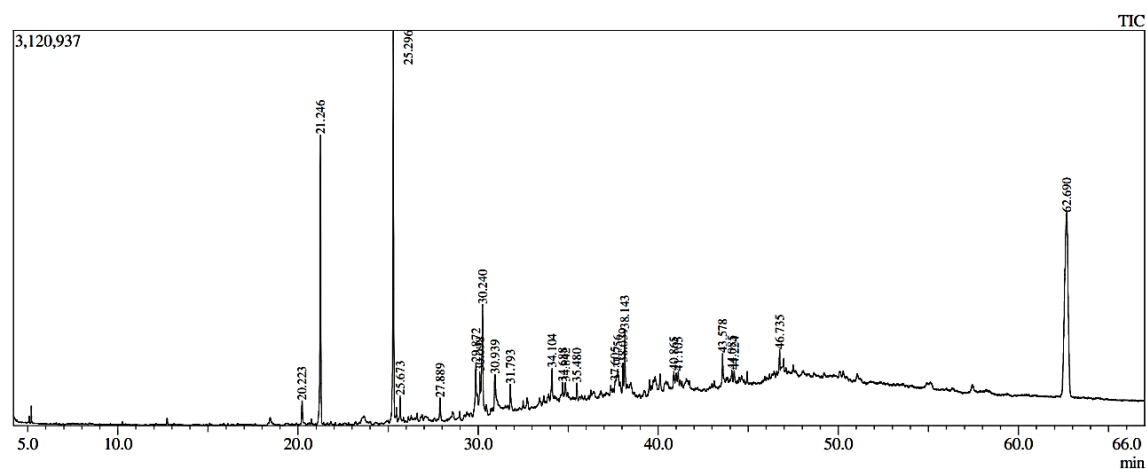
A análise cromatográfica permitiu a identificação dos compostos produzidos por *Streptomyces* sp. MPO1, relatando a presença de substâncias que ainda não possuem atividades descritas na literatura, o que ressalta a necessidade de serem realizados testes de isolamento e caracterização para a melhor compreensão. Além disso, é igualmente essencial realizar estudos mais aprofundados com os compostos que já possuem atividades reportadas.

5.7 Análise cromatográfica do extrato bruto de acetato de etila do isolado *Streptomyces* sp MPO11.

Dentre os compostos identificados, 7 foram encontrados com atividade biológica reportada na literatura, sendo estas, atividade antibacteriana, antitumoral e antioxidante. (KITTISAK *et al.* 2015; ZAHARA *et al.* 2022; BALACHANDRAN *et al.* 2023).

Os compostos que apresentaram os principais picos foram, Fosfato de tris(2,4-di-terc-butilfenilo) ($C_{42}H_{63}O_4P$), que pertence a classe éster de fosfato. 2,4-Di-terc-butilfenol ($C_{14}H_{22}O$) sendo um alquilbenzeno indicado como pertencente a classe de fenóis. Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)- ($C_{11}H_{18}N_2O_2$), identificado como da classe dos lactamas. E por fim, o éster, Ácido 2-propenoico, éster tridecílico ($C_{16}H_{30}O_2$) sendo este o único que não foi identificado com atividade biológica descrita na literatura. A figura 11 apresenta o perfil cromatográfico do extrato.

Figura 11: Perfil dos compostos voláteis presente no extrato bruto de *Streptomyces* sp. MPO11 analisado por CG-EM.



A tabela 6 apresenta a lista de compostos identificados com as respectivas atividades.

Tabela 4 - Relação de compostos encontrados no extrato de acetato de etila da linhagem *Streptomyces* sp.MPO11.

Tempo de retenção (min)	Area (%)	Fórmula Molecular	Nome do composto	Atividade reportada
20.223	1.19	C ₁₂ H ₂₆ O	1-Dodecanol	Atividade Antidiabética (Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2022)
21.246	15.17	C ₁₄ H ₂₂ O	2,4-Di-terc-butilfenol	Atividade Antibacteriana (Kittisak <i>et al.</i> , 2015) Atividade Antituberculose e Antitumoral (Kaari <i>et al.</i> , 2023)
25.296	18.47	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido 2-propenoico, éster tridecílico	Não reportado
25.673	1.03	C ₂₀ H ₄₂	Eicosano	Atividade Antioxidante (Balachandran <i>et al.</i> , 2023)
27.889	1.16	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade Anticancer (Lalitha <i>et al.</i> , 2016)
29.872	2.54	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade Anticancer

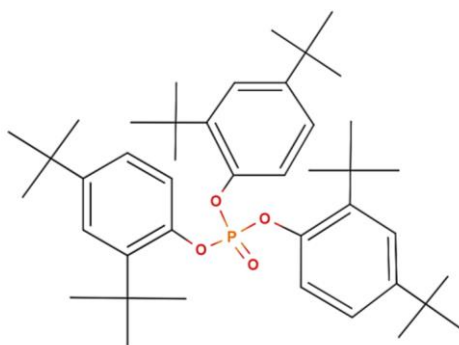
				(Lalitha <i>et al.</i> , 2016)
30.098	1.86	C ₁₆ H ₃₃ I	Hexadecano, 1-iodo-	Não reportado
30.240	6.20	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)-	Atividade Anticancer (Lalitha <i>et al.</i> , 2016)
30.939	2.10	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido n-hexadecanóico	Atividade Antiflamatória (Aparna <i>et al.</i> , 2012)
31.793	0.99	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ S	Ácido propanoico, 3-mercapto-, éster dodecílico	Não reportado
34.104	1.58	C ₂₆ H ₅₃ I	Hexacosano, 1-iodo-	Não reportado
34.688	0.63	C ₂₄ H ₄₆ O ₃	Ácido carbónico, éster eicosyl prop-1-en-2-il	Não reportado
34.842	0.65	C ₁₆ H ₃₃ I	Hexadecano, 1-iodo-	Não reportado
35.480	0.72	C ₈ H ₁₉ ClSi	Cloreto de dimetiltexilsililo	Não reportado
37.605	1.38	C ₁₆ H ₂₆ OSi	1-Ciclo-hexildimetilsililoxi-3,5-dimetilbenzeno	Não reportado
37.756	1.16	C ₃₂ H ₆₆	Dotriacontano	Não reportado
38.039	1.24	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	[1,1'-Bifenil]-2,3'-diol, 3,4',5,6'-tetraquis(1,1-dimetiletil)-	Não reportado
38.143	3.07	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂	Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(fenilmetil)-	Atividade Antifúngica (Abdella <i>et al.</i> , 2023)
40.865	0.66	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ftalato de di-n-octilo	Não reportado
41.105	0.53	C ₅₄ H ₁₁₀	Tetrapentacontano	Não reportado
43.578	1.26	C ₂₈ H ₄₀ O ₂	2,5-Ciclohexadien-1-ona, 4-[3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ilideno]-2,6-bis(1,1-dimetiletil)-	Não reportado
44.085	0.56	C ₅₄ H ₁₁₀	Tetrapentacontano	Não reportado
44.224	0.57	C ₂₄ H ₄₆ O ₃	Ácido carbónico, éster eicosil prop-1-en-2-il	Não reportado
46.735	0.98	C ₅ H ₁₂	Neopentano	Não reportado
62.690	34.33	C ₄₂ H ₆₃ O ₄ P	Fosfato de tris(2,4-di-terc-butilfenilo)	Atividade Anticâncer, Atividade Antioxidante

Fonte: Elaborado pela autora.

O GC-EM do extrato bruto de acetato de etila de *Streptomyces* sp. MPO11 identificou compostos que já possuem atividades antibacteriana e antitumoral reportadas na literatura (KITTISAK *et al.* 2015; KAARI *et al.* 2023).

O composto majoritário identificado no extrato, Fosfato de tris (2,4-di-terc-butilfenilo) ($C_{42}H_{63}O_4P$), possui atividades anticancerígena e antioxidante documentadas (SACHIN *et al.* 2021 e ZAHARA *et al.*, 2022), o que pode ter contribuído para os resultados promissores com o isolado *Streptomyces* sp MPO11, porém, é necessário o isolamento do composto para melhor compreensão e confirmação da influência na atividade desenvolvida pelo isolado. Apesar da atividade já relatada, não há registros que evidenciem a identificação do composto sendo produzido por espécies do gênero *Streptomyces*. Na figura 12, tem-se a representação da estrutura do composto.

Figura 12: Estrutura do composto Fosfato de tris (2,4-di-terc-butilfenilo) ($C_{42}H_{63}O_4P$) do extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp, MPO11.

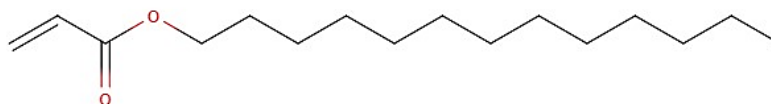


Fonte: Elaborado pela autora.

Assim como no extrato do isolado *Streptomyces* sp. MPO1, o composto Ácido 2-propenoico, éster tridecílico ($C_{16}H_{30}O_2$) também foi identificado no extrato do isolado *Streptomyces* sp. MPO11, sendo o segundo com maior pico observado, apresentado 18,47% da área. E como pontuado anteriormente, ainda não possui

confirmação da atividade biológica na literatura, embora tenha sido identificado em alguns extratos bioativos. Na figura a seguir, apresenta-se sua estrutura.

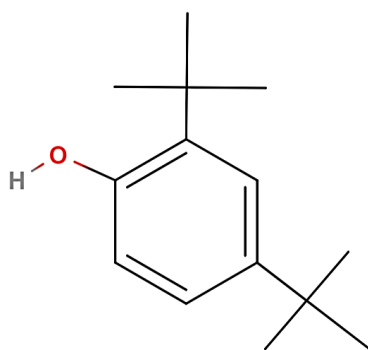
Figura 13: Estrutura do composto ácido 2-propenoico, éster tridecílico ($C_{16}H_{30}O_2$) do extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp, MPO11.



Fonte: Elaborado pela autora.

Identificado com um composto da classe de fenóis, 2,4-Di-terc-butilfenol ($C_{14}H_{22}O$) possui atividade antibacteriana e foi já identificado em extrato de *Streptomyces* sp, segundo relatado por KITTISAK *et al.* (2015). O que corrobora com os achados promissores apresentados nos testes com o isolado *Streptomyces* sp. MPO11, já que possui um perfil antibacteriano interessante. Além disso, KAARI *et al.* (2023) relataram a atividade antituberculose e antitumoral do composto, que com base na bibliografia consultada, pode ser um importante metabólito para fins farmacêuticos. A figura 14 apresenta sua estrutura.

Figura 14: Estrutura do composto 2,4-Di-terc-butilfenol ($C_{14}H_{22}O$) do extrato de acetato de etila de *Streptomyces* sp, MPO11.



Fonte: Elaborado pela autora.

O quarto composto com maior pico também foi identificado no extrato de *Streptomyces* sp. MPO1, sendo o Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)- ($C_{11}H_{18}N_2O_2$) que, como descrito, segundo LALITHA *et al.* 2016 apresenta atividade anticâncer. Além desses, outros compostos foram identificados com atividades biológicas relatadas. O isolado *Streptomyces* sp MPO11 mostrou-se promissor nos testes realizados e com os resultados do GC-EM. Estes achados sugerem a necessidade de novas pesquisas, principalmente com a investigação isolada dos compostos, para ocorrer o detalhamento e confirmação da atividade biológica, especialmente para aqueles compostos que ainda não possuem relatos de atividades na literatura, segundo a consulta realizada.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, ressaltamos a importância de estudos em habitats inexplorados como a Amazônia, na busca por novos isolados e substâncias com potencial biotecnológico. Além disso, esse é o primeiro relato da ocorrência de *Streptomyces* spp. na rizosfera de *Aniba parviflora* na Amazônia paraense, destacando um novo habitat potencial para a descoberta de compostos bioativos com propriedades antimicrobianas e anticancerígenas.

Os isolados MPO1 e MPO11 apresentaram características fenotípicas e moleculares semelhantes ao gênero *Streptomyces* e genes biossintéticos, PKS I, PKS II e NRPS, envolvidos na rota metabólica. Estes registros da mineração genômica corroboram os resultados de atividades antibacteriana e citotóxica de *Streptomyces* sp. MPO11.

A análise química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas do extrato bruno permitiu a identificação compostos voláteis com diversas atividades de interesse farmacológico. Foram também citados compostos ainda sem atividade reportada. Esses resultados reforçam a relevância de pesquisas com o gênero *Streptomyces* para a descoberta de compostos com fins terapêuticos, sugerindo que *Streptomyces* sp. MPO1 e *Streptomyces* sp. MPO11 podem ser valiosas fontes dessas substâncias com potencial bioativo. No entanto, estudos futuros são necessários para o isolamento e caracterização desses compostos, visando uma melhor compreensão de suas atividades.

7. REFERÊNCIAS

ALHAWSAWI SM, MOHANY M, BAABBAD AA, ALMOUTIRI ND, MAODAA SN, AL-SHAEBI EM, YASEEN KN, WADAAN MAM, HOZZEIN WN. Streptomyces Bioactive Metabolites Prevent Liver Cancer through Apoptosis, Inhibiting Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Carcinoma. *Biomedicines*. 2023.

ASSAD, BEATRIZ M, et al, Endophytic actinobacteria of *Hymenachne amplexicaulis* from the Brazilian Pantanal wetland produce compounds with antibacterial and antitumor activities, *Microbiological Research*, Volume 248, 2021.

AL-SHAIBANI, M. M.; RADIN MOHAMED, R. M. S.; SIDIK, N. M.; ENSHASY, H. A. E. et al. Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and Its Therapeutic Applications. *Molecules*, 26, n. 15, p. 4504, 2021.

ABDELLA, B., ABDELLA, M., ELSHARIF, H.A. et al. Identification of potent anti-*Candida* metabolites produced by the soft coral associated *Streptomyces* sp. HC14 using chemoinformatics. *Sci Rep* 13, 12564 2023.

ABDEL-ALEAM RH, GEORGE RF, GEORGEY HH, ABDEL-RAHMAN HM. Bacterial virulence factors: a target for heterocyclic compounds to combat bacterial resistance. *RSC Adv*. Nov 19;11(58):36459-36482. 2021.

ABDEL-RAZEK, AS, EL-NAGGAR, ME, ALLAM, A., MORSY, OM E OTHMAN, SI Produtos naturais microbianos na descoberta de medicamentos. *Processos* 8:470. 2020.

AMARESAN, N.; KUMAR, M. S.; ANNAPURNA, K.; KUMAR, K. et al. Beneficial microbes in agro-ecology: bacteria and fungi. Academic Press, 2020.

ALAM K, MAZUMDER A, SIKDAR S, ZHAO Y-M, HAO J, SONG C, WANG Y, SARKAR R, ISLAM S, ZHANG Y and LI A. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Front. Microbiol.* 2022.

APARNA, V., DILEEP, K.V., MANDAL, P.K., KARTHE, P., SADASIVAN, C. AND HARIDAS, M. Anti-Inflammatory Property of n-Hexadecanoic Acid: Structural Evidence and Kinetic Assessment. *Chemical Biology & Drug Design*. 2012.

AHMED GHAREEB, AMR FOUDA, RANIA M. KISHK, WALEED M. EL KAZZAZ, Unlocking the therapeutic potential of bioactive exopolysaccharide produced by marine actinobacterium *Streptomyces vinaceusdrappus* AMG31: A novel approach to drug development, *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024.

ANAGA N, ABRAHAM B et al. Advanced glycation end-products (AGE) trapping agents: design and synthesis of nature inspired indeno[2,1-c]pyridinones. *Bioorg Chem* 105:104375. 2020.

AZMAN, A.-S., OTHMAN, I., FANG, C.-M., CHAN, K.-G., GOH, B.-H., AND LEE, L.-H. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare actinobacteria from mangrove forest soils. *Indian J. Microbiol.* 57, 177–187. 2017.

BALACHANDRAN, A.; CHOI, S.B.; BEATA, M.-M.; MAŁGORZATA, J.; FROEMMING, G.R.A.; LAVILLA, C.A., JR.; BILLACURA, M.P.; SIYUMBWA, S.N.; OKECHUKWU, P.N. Antioxidant, Wound Healing Potential and In Silico Assessment of Naringin, Eicosane and Octacosane. *Molecules* 2023.

BUBICI, G. *Streptomyces spp.* como agentes de biocontrole contra espécies de Fusarium. CAB Rev. 13:50. 2018

BHAT, M.P., NAYAKA, S. E KUMAR, R.S. A swamp forest *Streptomyces* sp. strain KF15 with broad spectrum antifungal activity against chilli pathogens exhibits anticancer activity on HeLa cells Microbiol 204, 2022.

CENICEROS A, CAÑEDO L, MÉNDEZ C, OLANO C, SCHLEISSNER C, CUEVAS C, CALLE F, SALAS JA. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster of New Piperazic Acid-Containing Lipopeptides with Cytotoxic Activity in the Genome of Marine *Streptomyces*. Metabolites. Oct 18;13(10):1091. 2023.

DE FRANÇA, P., COSTA, J.H., FILL, T.P. et al. Genome mining reveals secondary metabolites of Antarctic bacterium *Streptomyces albidoflavus* related to antimicrobial and antiproliferative activities. Arch Microbiol 205, 354. 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.

DONALD, L.; PIPITE, A.; SUBRAMANI, R.; OWEN, J.; KEYZERS, R.A.; TAUFA, T. *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. Microbiol.Res.13. 2022.

DURAND GA, RAOULT D, DUBOURG G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. Int J Antimicrob Agents 53:371–382. 2019.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Product - A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 546 pp. 2009. ISBN: 978-0-470-74168-9.

EDIU C. S. J, LÚCIA H. O. W, KÁTIA E. S, ROBERVAL M. B. L, KARINE D. B, MARCELINO C. G, RAIMUNDO C. O, ANDRÉ R. R, GUILHERME L, MARTIN R. B, SCOTT D. Y, LUIZ R. G. G. Geochemistry of selenium, barium, and iodine in representative soils of the Brazilian Amazon rainforest, Science of The Total Environment, Volume 828, 2022.

ERWIN, GARY S *et al.* “*Streptomyces lasalocidi* sp. nov. (formerly '*Streptomyces lasaliensis*'), an actinomycete isolated from soil which produces the polyether antibiotic lasalocid.” *International journal of systematic and evolutionary microbiology* vol. 70,5 2020.

EKLUND, E A, AND T G GABIG. “Purification and characterization of a lipid thiobis ester from human neutrophil cytosol that reversibly deactivates the O₂- -generating NADPH oxidase.” *The Journal of biological chemistry* vol. 265,15 1990.

HARIR, M., BENDIF, H., BELLAHCENE, M., FORTAS, Z. E POGNI, R. Metabólitos secundários de *Streptomyces* . Biol Básico. Apl. Actinobactérias 6, 99–122. 2018.

HERNÁNDEZ-ROMERO D., ROSETE-LUNA S., LOPEZ-MONTEON A., CHÁVEZ-PIÑA A., PÉREZ-HERNÁNDEZ N., MARROQUÍN-FLORES J., CRUZ-NAVARRO A., PESADOGOMEZ G., MORALES-MORALES D., COLORADO-PERALTA R. First-row transition metal compounds containing benzimidazole ligands: An overview of their anticancer and antitumor activity. 2021.

HOFER U. The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*. doi: 10.1038/s41579-018-0125-x 2019.

HOU S, ZHANG M, WANG H, ZHANG Y. Biosynthesis gene cluster and oxazole ring formation enzyme for inthomycins in *Streptomyces* sp. strain SYP-A7193. *Appl Environ Microb* 86(20):e1388–e1420. 2020.

HONG K, GAO A-H, XIE Q-Y, GAO HG, ZHUANG L, LIN H-P, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*. 2009.

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

JAROSZEWICZ W, BIELAŃSKA P, LUBOMSKA D, KOSZNIK-KWAŚNICKA K, GOLEC P, GRABOWSKI Ł, WIECZERZAK E, DRÓŹDŹ W, GAFFKE L, PIERZYNOWSKA K, WĘGRZYN G, WĘGRZYN A. Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activities of Compounds Produced by Newly Isolated *Streptomyces* Strains from the Szczelina Chochołowska Cave (Tatra Mountains, Poland). *Antibiotics (Basel)*. 2021.

JIANG YE, YUNXIA ZHU, BINGBING HOU, HAIZHEN WU, HUIZHAN ZHANG, Characterization of the bagremycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. Tū 4128, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 83, Issue 3, 4 March 2019.

KAI CAO, STEPHEN W.G. TAIT, Chapter Five - Apoptosis and Cancer: Force Awakens, Phantom Menace, or Both?, *International Review of Cell and Molecular Biology*, Academic Press, Volume 337, 2018.

KUMAR S., SOLANKI DS, PARIHAR K., TAK A., GEHLOT P., PATHAK R., SINGH SK Actinomycetes isolates of arid zone of Indian Thar Desert and efficacy of their bioactive compounds against human pathogenic bacteria. *Biol Futur*. Dec;72(4):431-440. doi: 10.1007/s42977-021-00073-5. 2021.

KAARI, M., JOSEPH, J., MANIKKAM, R. et al. A Novel Finding: 2,4-Di-tert-butylphenol from *Streptomyces bacillaris* ANS2 Effective Against *Mycobacterium tuberculosis* and Cancer Cell Lines. *Appl Biochem Biotechnol* 195, 6572–6585 2023.

KITTISAK CHAWAWISIT, PHUANGTHIP BHOOPONG, WORRAPONG PHUPONG AND MONTHON LERTCANAWANICHAKUL. 2, 4-Di-tert-butylphenol, the bioactive compound produced by *Streptomyces* sp. KB1. *J App Pharm Sci*, 2015.

KHADAYAT K, SHERPA DD, MALLA KP, SHRESTHA S, RANA N, MARASINI BP, KHANAL S, RAYAMAJHEE B, BHATTARAI BR, PARAJULI N. Molecular Identification and Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Species from Nepalese Soil. *Int J Microbiol*. 2020.

KURNIJASANTI, R, AND S A SUDJARWO. “Identification of *Streptomyces* spp. from garbage dump soils in Surabaya, Indonesia.” *Veterinary world* vol. 15,3 2022.

- KOUROSHNIA A, ZEINALI S, IRANI S, SADEGHI A. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in colorectal cancer cells by novel anticancer metabolites of *Streptomyces* sp. 801. *Cancer Cell Int.* 2022.
- LALITHA, P., VEENA, V., VIDHYAPRIYA, P. et al. Anticancer potential of pyrrole (1, 2, a) pyrazine 1, 4, dione, hexahydro 3-(2-methyl propyl) (PPDHMP) extracted from a new marine bacterium, *Staphylococcus* sp. strain MB30. *Apoptosis* 21, 566–577 2016.
- LAW J. W., PUSPARAJAH P., MUTALIB N. A., WONG S., GOH B., LEE L. A review on mangrove actinobacterial diversity: the roles of *Streptomyces* and novel species discovery. 2019.
- LAW JW, SER HL, AB MUTALIB NS, SAOKAEW S, DUANGJAI A, KHAN TM, CHAN KG, GOH BH, LEE LH. *Streptomyces monashensis* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential. *Sci Rep.* 2019 Feb 28;9(1):3056. Erratum in: *Sci Rep.* 2020.
- LEÓN-BUITIMEA A., GARZA-CÁRDENAS C.R., GARZA-CERVANTES J.A., LERMAESCALERA J.A., MORONES-RAMÍREZ J.R. The demand for new antibiotics: Antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design. *Front. Microbiol.* 2020.
- LUCACIU RL, HANGAN AC, SEVASTRE B, OPREAN LS. Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Molecules.* 2022.
- LI, XIA et al. “New Analogues of Amides and Quinolinones Produced by *Streptomyces* sp. YIM S01983.” *Chemistry & biodiversity* vol. 21,5 2024.
- LIMA JUNIOR, A. A. D. Potencial biotecnológico de actinobactéria isolada da rizosfera de *Aniba parviflora* Syn *Fragans* (Macacaporanga) da Amazônia. 2020.
- LI, LAN-FANG & WU, QING-XUAN & WU, HAO & LI, YAO & PENG, QIAN & HAN, REN-HAO & ZHANG, DA-HU & YU, WEI-DONG & XU, RUI & WANG, JUAN & FAN, ZHAOBIN & HOU, SHAO-YANG. Complete Genome Sequence of *Streptomyces* sp. HPA2021, a Promising Bacterium for Natural Product Discovery. *Biochemical Genetics.* 2023.
- LIU L, ZHU H, WU W, SHEN Y, LIN X, WU Y, LIU L, TANG J, ZHOU Y, SUN F AND LIN H-W. Neoantimycin F, a *Streptomyces*-Derived Natural Product Induces Mitochondria-Related Apoptotic Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* 2019.
- LU S, XIE X, HU J, LIN H, LI F, ZHOU R, GUO J, WU S, HE J. New anti-influenza A viral norsesquiterpenoids isolated from feces-residing *Streptomyces* sp. *Fitoterapia* 157(1):1– 8. 2022.
- MATARRITA-CARRANZA, B., MURILLO-CRUZ, C., AVENDAÑO, R. et al. *Streptomyces* sp. M54: an actinobacteria associated with a neotropical social wasp with high potential for antibiotic production. *Antonie Van Leeuwenhoek.* Apr;114(4):379- 398. 2021.

MARTÍNEZ-JIMÉNEZ F., MUIÑOS F., SENTÍS I., DEU-PONS J., REYES-SALAZAR I., ARNEDO-PAC C., MULARONI L., PINCH O., BONET J., KRANAS H. A compendium of mutational cancer driver genes. *Nat Rev Cancer* 20, 555–572 . 2020

MAITI, P.K., DAS, S., SAHOO, P. et al. *Streptomyces* sp SM01 isolated from Indian soil produces a novel antibiotic picolinamycin effective against multi drug resistant bacterial strains. *Sci Rep* 10, 10092. 2020.

MATTOSO, E. Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia. Dissertação de Mestrado, Unicampi, Campinas, Brasil, 2005.

MOHAMED, H., HASSANE, A., RAWWAY, M., EL-SAYED, M., GOMAA, A. E.-R., ABDUL-RAOUF, U., et al. Antibacterial and cytotoxic potency of thermophilic *Streptomyces werraensis* MI-S. 24-3 isolated from an Egyptian extreme environment. *Arch. Microbiol.* 203, 4961–4972. 2021.

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

NAKAR A, PISTIKI A, RYABCHYKOV O, BOCKLITZ T, RÖSCH P, POPP J. Detection of multi-resistant clinical strains of *E. coli* with Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem.* Feb;414(4):1481-1492. 2022.

NGAMCHARUNGCHIT C, CHAIMUSIK N, PANBANGRED W, EUANORASETR J, INTRA B. Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. *Molecules.* Aug 6;28(15):5915. 2023.

NAMIL LEE, SOONKYU HWANG, JIHUN KIM, SUHYUNG CHO, BERNHARD PALSSON, BYUNG-KWAN CHO, Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, Volume 18, 2020.

NEWMAN DJ; Cragg GM Produtos naturais como fontes de novos medicamentos ao longo de quase quatro décadas de 01/1981 a 09/2019 . *J. Nat. Prod* 2020, 83 (3), 770–803. 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Otani, H., Udvary, D.W. & Mouncey, N.J. Comparative and pangenomic analysis of the genus *Streptomyces*. *Sci Rep* 12, 18909. 2022.

NGUYEN, H.T., POKHREL, A.R., NGUYEN, C.T. et al. *Streptomyces* sp. VN1, a producer of diverse metabolites including non-natural furan-type anticancer compound. *Sci Rep* 10, 1756. 2020.

PHAM, VAN & NGUYEN, CHUNG & DHAKAL, DIPESH & HUE, NGUYEN & KIM, TAE-SU & SOHNG, JAE KYUNG. Recent Advances in the Heterologous Biosynthesis of Natural Products from *Streptomyces*. *Applied Sciences.* 2021.

PLANCKAERT S, DEFLANDRE B, DE VRIES A, AMEYE M, MARTINS JC, AUDENAERT K, RIGALI S, DEVREESE B. Identification of novel rothibin analogues in *Streptomyces scabies*, including discovery of its biosynthetic gene cluster. *Microbiol Spectr* 9(1):e00571-e621. 2021.

PENG F, ZHANG M, HOU S, CHEN J, WU Y, ZHANG Y. 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 Microbiol* 20(1):1–143. 2020.

POLPASS ARUL JOSE AND ANJISHA MAHARSHI AND BHAVANATH, J. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, 246, p. 126708, 2021.

PFEIFER E, BONNIN RA, ROCHA EPC. Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. *Oct 26;13(5):e0185122*. Epub. Sep 26. 2022.

PRIDHAM, T.; HESSELTINE, C.; BENEDICT, R. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied microbiology*, 1958.

QUINN, G. A.; BANAT, A. M.; ABDELHAMEED, A. M.; BANAT, I. M. Streptomyces from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *J Med Microbiol*, 69. 2020.

RAHMAN, M., ISLAM, M. Z., ISLAM, M., AND UL, A. (2011). Antibacterial activities of Actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnol. Res. Int.* 2011.

RISDIAN C, MOZEF T, WINK J. Biossíntese de policetídeos em *Streptomyces*. *Microorganismos*. 2019.

RAJAN ROLTA, ANSHIKA SHARMA, ANURADHA SOURIRAJAN, P. KUMAR MALLIKARJUNAN, KAMAL DEV, Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytochemicals of *Artemisia annua* L: A strategy to control drug resistance pathogens, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 266, 2021.

REVILLA, J. Plantas úteis da Bacia Amazônica. SEBRAE-AM/INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), Manaus – AM, 444 p. 2002.

SALWAN R, SHARMA V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiol.* 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.

SACHIN TYAGI, RAHUL KUNWAR SINGH, SHREE PRAKASH TIWARI, Anti-enterococcal and anti-oxidative potential of a thermophilic cyanobacterium, *Leptolyngbya* sp. HNBGU 003, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 28, Issue 7, 2021.

SHARMA P, DUTTA J, THAKUR D. Future Prospects of Actinobacteria in Health and Industry. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 2018.

SAYGIN H., AY H., GUVEN K., CETIN D., SAHIN N. *Micromonospora deserti* sp. nov., isolated from the Karakum Desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020,

- SHARMA V, KAUR R, SALWAN R. Streptomyces: host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites. *3 Biotech*. Jul;11(7):340. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34221811; PMCID: PMC8209132. 2021.
- SAPKOTA A., THAPA A., BUDHATHOKI A., SAINJU M., SHRESTHA P., ARYAL S. Isolation, characterization, and screening of antimicrobial-producing actinomycetes from soil samples. *International Journal of Microbiology*. 2020.
- SRIRAGAVI G, SANGEETHA M, SANTHAKUMAR M, LOKESH E, NITHYALAKSHMI M, SALEEL CA, BALAGURUNATHAN R. Exploring Antibacterial Properties of Bioactive Compounds Isolated from *Streptomyces* sp. in Bamboo Rhizosphere Soil. *ACS Omega*. 2023.
- SIVALINGAM P, MUTHUSELVAM M, POTE J, PRABAKAR K. Phylogenetic insight of Nonribosomal peptide synthetases (NRPS) Adenylate domain in Antibacterial potential Streptomyces BDUSMP 02 isolated from Pitchavaram Mangrove. *Bioinformatics*. 2019.
- SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, JEMAL A. Estatísticas de câncer, CA Câncer J Clin 72:7–33. 2022.
- SINGH, R.; DUBEY, A. K. Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. *Front Microbiol*, 9, p. 1767, 2018.
- SILVA LJ, CREVELIN EJ, SOUZA DT, LACERDA-JÚNIOR GV, DE OLIVEIRA VM, RUIZ ALTG, ROSA LH, MORAES LAB, MELO IS. Actinobactérias da Antártica como fonte para descoberta de anticancerígenos. *Ciência. Rep*. 2020.
- SUDHARSHINI JAYARAMAN, THIRUMURUGAN RAMASAMY, Metabolomics and bioactive attributes of fenugreek microgreens: Insights into antioxidant, antibacterial and antibiofilm potential, *Food Bioscience*, Volume 60, 2024.
- SHUMI G., DESALEGN T., DEMISSIE TB, RAMACHANFRAN VP, ESWARAMOORTHY R. Complexos metálicos na terapia anticâncer específica para alvo: Tendências e desafios recentes. *J. Química*; 2 :9261683. 2022.
- SHIRILLING, E.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Intl. J. Syst. Bact*, 16, p. 313-340, 1966.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. New York: John Wiley & Sons, Inc. p. 722-723, 1997.
- TANGERINA, M. MP, FURTADO, L.C, LEITE, V.MB, BAUEMEISTER, A, ALZARE, K.V, JIMÉNEZ, P.C, GARRIDO, L.M, PADILLA, G, et al. Metabolomic study of marine Streptomyces sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244385>. 2020.
- TSUTSUMI H, KATSUYAMA Y, TEZUKA T, MIYANO R, INAHASHI Y, TAKAHASHI Y, NAKASHIMA T, OHNISHI Y. Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the indolizidine alkaloid iminimycin in *Streptomyces griseus*. *ChemBioChem* 23(3):1–14. 2022.
- TING LI, ZHENLONG WANG, JIANHUA GUO, CESAR DE LA FUENTE-NUNEZ, JINQUAN WANG, BING HAN, HUI TAO, JIE LIU, XIUMIN WANG, Bacterial

resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health, *Science of The Total Environment*, Volume 860, 2023.

THORFINNSDOTTIR LB, BØ GH, BOOTH JA, BRUHEIM P. Survival of *Escherichia coli* after high-antibiotic stress is dependent on both the pregrown physiological state and incubation conditions. *Front Microbiol.* 2023.

UNNIKRISHNAN, P.S.; ANIMISH, A.; MADHUMITHA, G.; SUTHINDHIRAN, K.; JAYASRI, M.A. Bioactivity Guided Study for the Isolation and Identification of Antidiabetic Compounds from Edible Seaweed—*Ulva reticulata*. *Molecules* 2022.

UEMURA, M., KOBAYASHI, K., SATO, N. et al. Haneumycin, a new 22-membered macrolide lactam antibiotic, produced by marine-derived *Streptomyces* sp. KM77-8. *J Antibiot.* 2023.

VAN BERGEIJK, D.A., TERLOUW, B.R., MEDEMA, M.H. et al. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nat Rev Microbiol* **18**, 546–558. 2020.

VALIPOUR, B., MOHAMMADI, S. M., ABEDELAHI, A., FARAMARZIAN AZIMI MARAGHEH, B., NADERALI, E., DEHNAD, A., et al. Culture filtrate ether extracted metabolites from *Streptomyces levis* ABRINW111 increased apoptosis and reduced proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Biomed. Pharmacother.* 2018

WATERS, M., AND TADI, P. *Streptomycin*. Treasure Island, FL: StatPearls. 2021,

WAKSMAN, S. A. Streptomycin: Background, isolation, properties, and utilization. *Science* 118, 259–266. 1953.

WU, C. et al. Lugdunomycin, an angucycline-derived molecule with unprecedented chemical architecture. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 58, 2809–2814. 2019.

XIE F, PATHOM-AREE W. Actinobacteria From Desert: Diversity and Biotechnological Applications. *Front Microbiol.* 2021.

XU, ZI FEI & BO, SHENG & WANG, MEI & SHI, JING & JIAO, RUI & SUN, YANG & XU, QIANG & TAN, REN & GE, HUI. Discovery and biosynthesis of bosamycin from *Streptomyces* sp. 120454. *Chemical Science.* 2020.

YONGJAE LEE, Namil Lee, Soonkyu Hwang, Kangsan Kim, Woori Kim, Jihun Kim, Suhyung Cho, Bernhard O Palsson, Byung-Kwan Cho, System-level understanding of gene expression and regulation for engineering secondary metabolite production in *Streptomyces*. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnologia.* 2020.

ZAHARA, K.; BIBI, Y.; MASOOD, S.; NISA, S.; SHER, A.; ALI, N.; KUMAR, S.; QAYYUM, A.; AHMED, W.; SAMI, R.; et al. Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *Bidens* spp. Using HPLC-DAD and GC-MS Analysis and Their Biological Activity as Anticancer Molecules. *Molecules* 2022.