



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

EDSON ALEXANDRE DO NASCIMENTO SILVA

ANÁLISE GENÔMICA E METABOLÔMICA DE UMA LINHAGEM DE
STREPTOMYCES GALBUS ISOLADA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

JOÃO PESSOA

2020

EDSON ALEXANDRE DO NASCIMENTO SILVA

ANÁLISE GENÔMICA E METABOLÔMICA DE UMA LINHAGEM DE
STREPTOMYCES GALBUS ISOLADA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba.

ORIENTADOR: SAMUEL PAULO CIBULSKI

JOÃO PESSOA – PB
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Edson Alexandre do Nascimento.

Análise genômica e metabolômica de uma linhagem de *Streptomyces galbus* isolada do semiárido paraibano. / Edson Alexandre do Nascimento Silva. - João Pessoa, 2020.

150 f. : il.

Orientação: Samuel Paulo Cibulski.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Actinobactéria. 3. Metabólitos secundários. 4. Desrepliação. 5. Mineração de genomas. I. Cibulski, Samuel Paulo. II. Título.

UFPB/BC

EDSON ALEXANDRE DO NASCIMENTO SILVA

ANÁLISE GENÔMICA E METABOLÔMICA DE UMA LINHAGEM DE
STREPTOMYCES GALBUS ISOLADA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba.

JOÃO PESSOA, 31 DE JULHO DE 2020.

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Samuel Paulo Cibulski
Orientador e presidente da banca

Professora Dra. Adna Cristina Barbosa de Souza

Professor Dr. Ulrich Vasconcellos da Rocha Gomes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, amigos e a minha família, em especial meus pais Djalma Vicente da Silva e Maria das Graças do Nascimento Silva.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que mesmo com as minhas contínuas falhas tem me perdoado e continuado ao meu lado. Com tua mão, leve como uma pena quando caí tu me aconchegaste e quando não quis continuar a minha jornada, tu me levantaste. És rocha minha a qual construirei minha morada.

Agradeço aos meus pais pelo amor, apoio e dedicação. À minha mãe que tem me dado carinho e atenção e ao meu pai, agradeço-te por ter me passado tanta sabedoria ao longo do tempo e nas ações que devo tomar em relação a vida e o quanto tenho que aprender.

Aos meus tios, Marcos e Elizabete que na minha pequenez, tem me feito maior do que pude imaginar e tem me ajudado nas horas em que mais preciso. A todos da minha família que me ajudaram a ser quem eu sou e que não me importasse com que os outros digam a meu respeito.

Agradeço aos professores do CBIOTEC pelo conhecimento passado contribuindo na formação do profissional que me tornarei. Em especial: À professora Tatiane que me aceitou em seu estágio e que aconselhou ao meu professor de PIBIC a me acolher na minha área de interesse.

Ao professor Ian e Tatiane Santi Gadelha pelas discussões sobre ciência que me fizeram ter mais ânimo e interesse.

Agradeço aos meus amigos Danilo Tibiriçá, Fernando Moraes, Janderson Mateus, Williams Silva, Wilembergson Alfredo, Maurício Júnior, Gustavo Eraldo e Francielle Maria pela amizade, suporte e atenção dada nos momentos em que precisei.

Ao grupo e companheiros de laboratório do LBCM que me ajudaram a me ambientar e compreender várias técnicas de diversas áreas. Agradeço ao laboratório Multiusuário de análises clínicas pela colaboração.

Agradeço a banca examinadora, que mesmo não recebendo nenhum presente material por minha parte, aceitaram avaliar meu trabalho de conclusão de curso.

Desejo um especial agradecimento a Alex e toda a equipe do site Biorender pela autorização de direitos das imagens para o meu TCC. Desejo a vocês o melhor e sucesso.

Agradeço ao Instituto Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), pelo fomento para a pesquisa, assim como, a UFPB pelo espaço cedido para a pesquisa e o

laboratório LAPOA/CCA do Campus de Areias da UFPB que sequenciou o genoma da bactéria objeto deste estudo.

E por último agradeço aos meus professores de PIBIC, Pink e Cérebro, mais conhecidos como Samuel e Valnês, pela alegria nunca antes vista no laboratório, pela amizade e muita paciência que me confortaram.

Nasci nu, hoje estou vestido.

Djalma Vicente

RESUMO

A resistência antimicrobiana vem alertando entidades governamentais e a Organização Mundial da Saúde (OMS) com uma iminente crise global provocada pelo aumento gradativo da ineficácia de antibióticos frente a patógenos multirresistentes. As actinobactérias têm sido a maior fonte dos antibióticos utilizados clinicamente. Membros desse filo estão presentes em vários ambientes, inclusive, ambientes considerados extremos (como o bioma Caatinga), os quais têm sido o foco de exploração de novos antibióticos. Com isso, modernas abordagens começam a ser adotadas, em adição da exploração desses ambientes inexplorados. Entre eles, o sequenciamento genético juntamente com a aplicação de ferramentas da bioinformática na mineração de genomas tem ajudado a conhecer a diversidade de bactérias e os metabólitos secundários que estas produzem. Como também, métodos analíticos como cromatografia associada a espectrometria de massas para análises de extratos têm surgido como formas de mudar o panorama frente à pesquisa de novas moléculas com potencial antibiótico. Nesse estudo, uma linhagem de actinomiceto isolado na região do Cariri paraibano que apresenta uma excelente atividade antimicrobiana e antitumoral, teve seu genoma sequenciado, anotado e estimado *in silico* quanto à produção de metabólitos secundários de interesse. A partir de análises genômicas, o isolado apresenta tamanho do genoma de 7 548 406 pares de bases e um alto conteúdo de guanina e citosina de 73,16%. Com análises filogenéticas, a linhagem I339 foi classificada como pertencente à espécie *Streptomyces galbus* e mostrou uma relação íntima com a *S. galbus* DSM 40089 e um distanciamento com a *S. longwoodensis* DSM 41677, a qual pôde ser visualizada através de análises de genômica comparativa entre as espécies. A análise de agrupamentos de genes relacionados a síntese de metabólitos mostrou a presença de 47 agrupamentos para *S. galbus* I339, sendo alguns destes, relacionados à produção de moléculas com atividade antimicrobiana e antitumoral. Através de análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e por ionização em eletrospray seguido de espectrometria de massas (ESI-ToF-MS) foram identificados compostos com potencial antimicrobiano e anticancerígeno como as dicetopiperazinas e o grupo das actinomicinas. Além do mais, foram identificadas diversas massas que não puderam ser associados a compostos já descritos, os quais podem estar relacionadas a novas moléculas. As predições *in silico* associadas aos métodos de análise físico-química demonstram uma notável capacidade da linhagem I339 de *S. galbus* para a produção de metabólitos secundários, sendo uma grande candidata a produção de novas moléculas com propriedades antibióticas.

Palavras-chave: Resistência antimicrobiana. Actinobactéria. Metabólitos secundários. Desreplacação. Mineração de genomas.

ABSTRACT

*The antimicrobial resistance has been alarming government entities and World Health Organization to an imminent global health crisis caused by a gradual increase in antibiotics ineffectiveness to multiresistant pathogens. Actinobacteria have been the most source of antibiotics in clinical use. Members of this phylum are present in many environments, including, extreme ones (as Caatinga) that had been the focus of new antibiotics research. Thereby, news approaches were adopted beyond the exploration of these unexplored environments. Among them, the genome sequencing coupled to bioinformatic tools in genome mining has aided the knowledge of the diversity of bacteria and their secondary metabolites. Also, analytical methods as gas chromatography and dereplication for metabolic compound analyses have emerged as a path to change the perspectives in research of new molecules with antibiotic potential. In this research, an actinomycete strain isolated in the region of Cariri from Paraíba State that showed a remarkable antimicrobial and antitumoral activity, had its genome sequenced, annotated and estimatives in silico were made to its production of secondary metabolites of interest. From genomics analyses, the isolated shows a genome length of 7,548,406 bp and a high guanine and cytosine content (73.16%). Phylogenetically, the I339 strain was classified as belong to *Streptomyces galbus* species and showed a closely relationship with *S. galbus* DSM 40089 and distance related with *S. longwoodensis* DSM 41677, that was could be seen through comparative genomic approach between the species. The biosynthetic genes clusters in silico analyses exhibited the presence of 47 clusters to *S. galbus* I339, which some of them are related to secondary metabolites with antimicrobial and anticancer activity. Through gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) and electrospray ionization analyses (ESI-ToF-MS), compounds with antimicrobial and anticancer potential as diketopyperazines and actinomycins group were identified. Moreover, many mass profiles were not associated to any known compound, which could be associated to new molecules. The in silico prediction associated to physical-chemical methods, shows a great capacity of secondary metabolite production of *S. galbus* strain I339 and it's a great candidate to production of new molecules with functional properties.*

Keywords: Antimicrobial resistance. Actinobacteria. Secondary metabolites. Dereplication. Genome Mining.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Linha do tempo da pesquisa dos antibióticos.	25
Figura 2- Principais representantes das classes de antibióticos.....	32
Figura 3- Mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados na atualidade.....	33
Figura 4- Sequenciamento de alto desempenho da Illumina	45
Figura 5- Local da coleta do isolado I339.....	58
Figura 6- Fluxograma do processo do TYGS.....	63
Figura 7- Características fenotípicas do isolado I339.	70
Figura 8- Conteúdo GC das sequências.	71
Figura 9- Índice de qualidade das sequências.	72
Figura 10- Filtragem das sequências da I339.	74
Figura 11- Métricas referentes a montagem do genoma da I339.	76
Figura 12- Árvore filogenética da sequência 16S rRNA da <i>S. galbus</i> I339.....	78
Figura 13- Árvore filogenética do genoma completo da <i>S. galbus</i> I339.....	79
Figura 14- Valores de dDDH entre as espécies correlacionadas pelo GGDC.....	81
Figura 15- Valores de ANI entre os membros do grupo filogenético.....	82
Figura 16- Distribuição de sequências codificantes no <i>S. galbus</i> I339.	83
Figura 17- Subssistemas de proteínas da <i>S. galbus</i> I339.....	83
Figura 18- Número de proteínas funcionais detectadas por diferentes bancos de dados.	84
Figura 19- Moléculas preditas pelo NP.searcher.	90
Figura 20- Comparação genômica entre <i>S. galbus</i> e <i>S. longwoodensis</i>	92
Figura 21- Subssistemas de proteínas dos membros do grupo filogenético.....	94
Figura 22- Subssistemas de genes dos membros do grupo filogenético.....	95
Figura 23- Clusters biossintéticos dos membros do grupo filogenético da I339.	98
Figura 24- Metabólitos secundários produzidos por <i>S. galbus</i> e <i>S. longwoodensis</i>	99
Figura 25- Cromatograma do CG-MS da <i>S. galbus</i> I339	101
Figura 26- Estrutura química dos compostos identificados por CG-MS.....	104
Figura 27- Perfil de massas dos metabólitos secundários da I339 obtido por ESI-MS-ToF.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição do meio de cultivo MMD- glicose (1%).	59
Tabela 2- Índice de pontuação Phred.	62
Tabela 3- Resultado da filtragem das sequências.	75
Tabela 4- Estatísticas da montagem do genoma da I339 com diferentes montadores.	75
Tabela 5. Genes especialistas preditos por banco de dados.	85
Tabela 6- Genes de resistência preditos da <i>S. galbus</i> I339.	86
Tabela 7. Clusters biossintéticos e metabólitos secundários do antiSMASH.	87
Tabela 8- Características dos genomas do membro filogenético.	91
Tabela 9- Genes especiais dos membros do grupo filogenético.	96
Tabela 10 Genes de resistência preditas no grupo filogenético.	97
Tabela 11- Identificação presuntiva dos metabólitos secundários por CG-MS.	102

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Antibióticos: história, classes e mecanismo de ação	19
2.1.1 História dos antibióticos	19
2.1.2 Classes de antibióticos: mecanismo de ação e resistência antimicrobiana.....	26
2.2 Resistência antimicrobiana: estado da arte, futuro e ações de combate	34
2.3. Actinobactérias como fonte de antibióticos.....	37
2.3.1 Actinobacteria: características gerais do filo	37
2.3.2 Abordagens modernas para a bioprospecção de novas moléculas.....	38
2.4 Sequenciamento de alto desempenho (HTS).....	40
2.4.1 A tecnologia do sequenciamento por síntese.....	43
2.5 Clusters biossintéticos e metabólitos secundários	45
2.5.1 Sintases de peptídeos não-ribossomais	46
2.5.2 Sintases de policetídeos	47
2.5.3 Terpenos	49
2.5.4 Sideróforos	50
2.6 O bioma Caatinga como fonte de microrganismos produtores de biomoléculas com potencial antimicrobiano	51
3 JUSTIFICATIVA	54
4 OBJETIVOS	56
4.1 Objetivo geral.....	56
4.2 Objetivos específicos	56
5 MATERIAL E MÉTODOS	57
5.1 Linhagem bacteriana	57
5.2 Crescimento e caracterização fenotípica do isolado I339	58
5.3 Isolamento de DNA.....	59
5.4 Montagem da biblioteca de DNA	60
5.5 Sequenciamento de alto desempenho	61
5.6 Análise da qualidade e filtragem das sequências.....	61

5.7 Montagem do genoma do isolado I339.....	62
5.8 Identificação da espécie bacteriana.....	63
5.9 Anotação do genoma do <i>Streptomyces galbus</i> linhagem I339.....	65
5.10 Análise de clusters biossintéticos (BGCs) do <i>Streptomyces galbus</i> linhagem I339 ...	65
5.10 Comparação entre espécies do grupo filogenético do isolado I339	66
5.11 Análise de metabólitos secundários por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)	66
5.12 Análises de metabólitos secundários por ionização por <i>eletrospray</i> e espectrometria de massas (ESI-ToF-MS)	67
6 RESULTADOS	69
6.1 Caracterização fenotípica do isolado I339.....	69
6.2 Caracterização genômica do isolado I339.....	71
6.2.1 Análise da qualidade e filtragem das sequências	71
6.2.2 Montagem <i>de novo</i> do genoma do isolado I339	75
6.2.3 Identificação da espécie do isolado I339	76
6.2.4 Anotação genômica da <i>S. galbus</i>	82
6.3 Análise <i>in silico</i> dos clusters biossintéticos da <i>S. galbus</i> I339.....	86
6.4 Comparação genômica, clusters biossintéticos e de metabólitos secundários entre bactérias do clado filogenético da <i>S. galbus</i> I339.....	91
6.3.2 Análise de metabólitos secundários por CG-MS.....	99
6.3.3 Análise de metabólitos secundários por ionização em <i>eletrospray</i>	104
7 DISCUSSÃO	106
8 REFERÊNCIAS	110
ANEXO A – Resultado do CG do extrato do isolado I339.....	127

1 INTRODUÇÃO

Antes da descoberta dos antibióticos, as sociedades eram assoladas por diversas doenças infecciosas, pelas quais muitos sucumbiam como cólera, tuberculose, peste negra e febre tifoide. De fato, a teoria da doença microbiana e a descoberta da penicilina com seu uso massivo na Segunda Guerra Mundial marcaram a mudança de percepção das doenças infecciosas e seu enfrentamento: a humanidade encontrou armas para o combate do inimigo “invisível”.

A partir da metade do século XX, iniciou-se uma massiva descoberta, produção e uso de diversos antibióticos. Neste período denominado era de ouro dos antibióticos, a humanidade conseguiu com êxito o controle de doenças infecciosas como tuberculose. Paralelamente a produção e uso destes antibióticos, a resistência – definida como a inatividade de um antibiótico frente a um microrganismo de caráter patogênico já era observada (FLEMING, 1945). Ao longo do tempo, doenças antes controladas ressurgiram devido a hábitos da população em tomar antibióticos em períodos e concentração inapropriados, assim como, a extensão de seu uso para outras áreas como no agronegócio, os quais contribuíram na disseminação e pressão seletiva destes patógenos resistentes (O’NEILL, 2016).

Entre os microrganismos que apresentam alto padrão de resistência aos antimicrobianos utilizados atualmente estão os patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), grupo de patógenos listados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como preocupante ou em situação crítica (OMS, 2019).

Estatísticas estimadas pela OMS relatam que por ano 700 mil pessoas morrem no mundo devido a complicações de infecções causadas por microrganismos resistentes (OMS, 2019). Além do mais, um estudo realizado pelo economista O’Neil (2016) estima que em 2050, a resistência antimicrobiana causará a morte anual de 10 milhões de pessoas ultrapassando o câncer, trazendo consequências como a perda financeira global de 100 trilhões de dólares.

De acordo com as recomendações “Saúde Única” (One Health) do grupo de coordenação interagências para a resistência antimicrobiana (IACG), a mudança deste panorama deve partir de ações conjuntas de todos os membros da sociedade.

As recomendações do IACG são medidas preventivas que devem ser tomadas, tais como, acesso a saneamento básico e água potável, vigilância e leis mais restritivas a antimicrobianos, assim como, a adoção de alternativas ao uso de antibióticos na agropecuária (OMS, 2019). Além dessas medidas preventivas, é de grande urgência a prospecção de novos antibióticos no combate a patógenos resistentes. Infelizmente, na contramão da necessidade, indústrias farmacêuticas têm recuado nas pesquisas de novos antibióticos devido a vários fatores como custo de produção e de manutenção de pesquisas, além das etapas necessárias desde a descoberta a testes da eficácia em humanos que geralmente não saem da fase pré-clínica (GAJDÁCS, 2019).

As bactérias do filo Actinobacteria apresentam uma extraordinária capacidade de produção de metabólitos secundários com atividade biológica (MIAO; DAVIES, 2010). As bactérias desse filo ainda são uma fonte para novos antibióticos e são responsáveis por cerca de 80% da produção dos antibióticos utilizados atualmente na medicina humana e veterinária, sendo que a maioria dessas moléculas provém de bactérias do gênero *Streptomyces* (LO GRASSO; MARTINO; ALDUINA, 2016).

A hipótese de que ambientes poucos explorados podem revelar novas espécies de bactérias com a possibilidade da descoberta de novas classes de antibióticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010) tem levado os cientistas a procurar microrganismos com potencial antimicrobiano adaptados em ambientes considerados extremos em temperatura, pH, umidade e salinidade (SUN et al., 2013; BIBI et al., 2018). No mundo, a exploração de novos microrganismos em ambientes extremos tem gerado grandes resultados, com a identificação de novas moléculas (TERRA et al., 2018).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade da Terra abrigando 20% de espécies da fauna e flora conhecidas no mundo. Possui uma grande diversidade de biomas, que vêm sendo alvo nas pesquisas de bioprospecção de microrganismos produtoras de moléculas bioativas em solos Amazônicos (OLIVEIRA, 2018), Manguezais (CANOVA, 2009) e Caatinga (CORRÊA, 2014). A Caatinga é considerada um bioma extremo com características únicas, a qual tem sido pouco estudada. Acredita-se que os microrganismos da região semiárida possam ser uma grande reserva de novos metabólitos secundários, em especial os *Streptomyces* (CIBULSKI et al., no prelo).

Pesquisas têm se empenhado em diversas metodologias como a adoção de diferentes meios de cultivo e co-culturas, bem como, a aplicação da tecnologia de sequenciamento genético para o estudo de bactérias produtoras de metabólitos secundários (TRAN et al., 2019). Vários estudos salientam que muitos dos conjuntos de genes envolvidos em sua produção estariam silenciados, abrindo possibilidades para uma nova gama de antibióticos a serem descobertos (HOSHINO; ONAKA; ABE, 2019; SENEGES et al., 2018).

A partir da grande quantidade de dados gerados no sequenciamento, ferramentas de bioinformática como o antiSMASH (MEDEMA et al., 2011) e o NP.searcher (LI et al., 2009) têm auxiliado na descrição de genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários. Assim como métodos analíticos como cromatografia associada a espectrometria de massas de alta resolução, os quais têm elucidado quantitativamente e qualitativamente compostos antimicrobianos (MOHIMANI et al., 2018).

Visto as proporções que a resistência pode tomar em um futuro próximo, é de grande urgência o desenvolvimento de novos fármacos no combate a patógenos resistentes. O sucesso da busca por novas moléculas é maximizado pela adoção de novas metodologias físico-químicas relacionadas a separação de compostos e elucidação estrutural, bem como uso de ferramentas da bioinformática para análise genômicas e de seus clusters biossintéticos. Com essa associação, por vezes vista como não-usual, o tempo de isolamento e identificação é significativamente reduzido, aumentando as chances do isolamento de um pró-fármaco.

Neste sentido, o trabalho teve o objetivo de identificar compostos com atividade antimicrobiana a partir de uma bactéria isolada no semiárido paraibano. Para alcançar tal objetivo, o genoma do isolado foi sequenciado, anotado e predito quanto à produção de metabólitos secundários *in silico*. Em adição, foi realizada uma caracterização preliminar dos compostos produzidos pela bactéria por métodos analíticos de cromatográficos e espectrométricos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos: história, classes e mecanismo de ação

2.1.1 História dos antibióticos

As infecções causadas por patógenos bacterianos assolaram a humanidade levando ao extermínio milhões de vidas. Como exemplo, podem ser citadas as três pandemias causadas por *Yersinia enterocolitica*: a praga do Justiniano (541-542 A.D.), a peste negra (1347-1750) e a peste bubônica em 1984 (HAENSCH et al., 2010; HAWGOOD, 2008).

Diferentemente da atualidade, a causa para infecções em humanos era desconhecida. Apesar disso, na era pré-antibióticos é relatada a sobrevivência de povos antigos frente a surtos e epidemias causadas por bactérias. Tal motivo permaneceu um mistério, até que escavações arqueológicas na Núbia (correspondente à região partilhada pelo Sudão e Egito) encontraram traços de tetraciclina em ossos humanos datados de 350 a 550 a.D (BASSETT et al., 1980). Cientistas acreditam que a presença do composto no corpo humano teria como causas a dieta destes povos antigos com o cultivo de grãos no solo contaminado de bactérias como *Streptomyces* (BASSETT et al., 1980), assim como, pelo potencial quelante do antibiótico à hidroxapatita, constituinte mineral dos ossos (AMINOV, 2010). Em outras sociedades como povos antigos da Grécia, Roma e Egito utilizavam mel, ervas e até fezes de animais para tratamento de feridas. Desde 1500 a.C., o uso de bolor do pão, leveduras da cerveja e cogumelos se mostraram eficientes contra as infecções (DUCKETT, 1999).

Na Idade Média, diversas crenças ficaram populares em torno da causa da infecção, tais como: ar ruim, miasmas, relação com constelações clima e estações do ano (BUCHILLET, 2007; MOHR, 2016). A infecção em uma visão religiosa era vista como punição pelos pecados da humanidade e como um sinal da ira divina (BUCHILLET, 2007). As soluções da época se davam de várias maneiras desde dietas com ervas a orações.

O conhecimento tradicional para tratamento de infecções é descrito na China com o uso de ervas medicinais com extratos da planta artemísia (*Artemisia vulgaris*)

para o tratamento de doenças (CUI; SU, 2009). Assim como, a utilização no século 17 por povos indígenas da América do Sul de cascas da planta chinchona (*Chinchona pubescens*) em forma de pó com propriedades curativas para o tratamento da malária e febre (KITUA; MALEBO, 2004; MOHR, 2016). Mais tarde, em 1820, foi descoberto que quinina seria o princípio ativo presente nesta planta (ACHAN et al., 2011).

Com base em observações do tempo passado, o farmacêutico inglês John Parking fez em seu livro intitulado *Theatrum Botanicum* (1640), observações quanto ao uso de bolores para o uso em infecções (GOULD, 2016). Sendo seguido, por vários pesquisadores como Theodor Billroth e John Scott que realizaram experimentos sobre a atividade bioativa de bolores contra linhagens bacterianas, verificando que estas não cresciam na presença daquelas (MOHR et al., 2016).

A história dos antibióticos obteve grande contribuição com as observações do comerciante Antonie van Leeuwenhoek, que por volta dos anos 1670, com seu microscópio percebeu a presença de microrganismos, os quais ele nominou como *animalcules* (pequenos animais) (LANE, 2015). Apesar das observações, uma questão permanecia em pé: qual seria a causa das infecções em humanos? Robert Koch e Louis Pasteur descobriram a relação entre microrganismos e infecções.

Baseado nas pesquisas de Agostino Bassi, Pasteur solucionou uma epidemia causada por fungos da espécie *Nosema bombycis* em larvas bicho-da-seda (*Bombyx mori*). A partir de seus achados, promulgou a teoria microbiana das doenças, a qual defendia que doenças infecciosas eram causadas por microrganismos (BERCHE, 2012).

Em 1876, Robert Koch injetou em um camundongo, sangue de ovelha infectada com estruturas em forma de bastonetes. No dia seguinte foi observado o falecimento do roedor, o qual foi posteriormente analisado. Koch visualizou as mesmas estruturas identificadas previamente em seu microscópio e observou o mesmo padrão para outros camundongos infectados com o sangue do antecessor. O pesquisador propôs que as formas encontradas no sangue eram bactérias e que estas seriam necessárias para o desenvolvimento da doença – conhecida como antraz (BLEVINS; BRONZE, 2010).

As evidências mostradas por Pasteur e Koch permitiram o foco de pesquisadores em achar os verdadeiros causadores de doenças como tuberculose e

cólera, bem como formas para combatê-los (BERCHE, 2012). Assim como, medidas preventivas como as realizadas por Joseph Lister, um cirurgião inglês que fez avanços importantes em métodos antissépticos com a utilização de compostos químicos como fenol com a finalidade de matar microrganismos em equipamentos e materiais de uso clínico (BERCHE, 2012).

No começo da era dos antibióticos, o primeiro antibiótico foi isolado partindo dos esforços do cientista italiano Bartolomeo Gosio, que estudando a pelagra em 1893 (uma doença que causa diarreia e demência), acreditava que sua causa teria como origem a contaminação por fungos na alimentação de pessoas de classe social baixa, que tinha como base o consumo de milho (MOHR, 2016; SYDENSTRICKER, 1958). O pesquisador conseguiu isolar e cultivar o fungo *Penicillium brevicompactum* obtendo uma substância cristalina, a qual observou a sua atividade contra *Bacillus anthracis*, causador do antraz (BENTLEY, 2001). A substância foi caracterizada como ácido micofenólico por Carl Alsberg e Otis Fisher (BENTLEY, 2000). Apesar do antibiótico ser efetivo contra o antraz, acabou sendo deixado de lado pelos seus efeitos tóxicos. Posteriormente, o trabalho de Conrad Elvehjem identificou a verdadeira causa da pelagra: a falta de niacina (vitamina B₃) (BURRIS; BAUMANN, 1990).

Apesar dos avanços, o primeiro antibiótico a ser utilizado clinicamente em hospitais foi a piodianase (em 1899) de um extrato de *P. aeruginosa* retirados de curativos de pacientes. Embora comprovada sua eficácia antimicrobiana, o composto apresentava toxicidade alta após sua administração (EMMERICH; LÖW, 1899). Estudos mais aprofundados verificaram que a substância responsável seria 2-alquil-4 quinolona, envolvida no *quorum sensing* da *P. aeruginosa* (DUBERN; DIGGLE, 2008).

Estudos do tipo triagem começaram a partir dos trabalhos de Paul Erlich com agentes quimioterápicos, a qual observou que algumas bactérias não cresciam na presença de corantes. A partir de seus experimentos, o primeiro antimicrobiano sintético foi apresentado: salvarsan (asfernamina) (ERLICH; BERTHEIM, 1912). Outro antibiótico sintético foi o prontossil, o qual foi sintetizado por Josef Klarer e Fritz Nietzsche, sendo testada sua atividade antibacteriana por Gerhard Domagk, que realizava triagens de vários corantes com grupo funcional azo. O prontossil (nomeado também de sulfonamida) mostrou-se eficaz em testes *in vivo* na proteção de ratos

contra bactérias do gênero *Streptococcus* (DOMAGK, 1935). Anos mais tarde, foi visto que o antibiótico era degradado por enzimas e que daria origem a sulfanilamida, substância que seria o princípio ativo contra a infecção (TRÉFOUËL et al., 1935).

O método de triagem de Alexander Fleming tinha como base a colocação de diluições de solo contendo bactérias na placa de ágar contendo o antibiótico. Com isso, o cientista conseguia inferir a atividade antimicrobiana a partir de zonas de inibição, que se formavam em torno do antibiótico testado. A metodologia contribuiu para a pesquisa em antibióticos por ser um método fácil e de custo reduzido (AMINOV, 2010; FLEMING, 1929). Em 1928, o pesquisador havia descoberto por serendipismo, a inibição do crescimento de colônias de *Staphylococcus* por fungos que haviam sido inicialmente identificados como sendo da espécie *Penicillium rubrum*¹ (FLEMING, 1929).

Outros pesquisadores já haviam visto o potencial antimicrobiano desse fungo (GOULD, 2016), mas diferente de seus antecessores, Fleming persistiu na procura por cientistas que pudessem purificar a substância (MOHR, 2016; AMINOV, 2010). Apesar de sua desistência em 1940, Howard Florey e Ernst Chain no mesmo ano descreveram uma técnica de purificação para o composto (CHAIN et al., 2005). A penicilina foi um sucesso na sua utilização na Segunda Guerra Mundial, sendo produzida em escala industrial, e apresentou segurança e eficácia no tratamento de feridas causadas nas batalhas.

O sucesso avassalador do uso da penicilina na Segunda Guerra Mundial alavancou pesquisas por microrganismos produtores de novos antibióticos. A estratégia adotada foi a bioprospecção em ambientes como o solo, a qual obteve participação de várias indústrias farmacêuticas (DREW, 2000).

Este acontecimento marca o início da era de ouro dos antibióticos (1940-1970), a qual se iniciou com a exploração realizada por Waksman e colaboradores (1940), que por intermédio de triagens bem-sucedidas, extraíram diversas moléculas produzidas por bactérias isoladas do solo (Figura 1). Sendo a actinomicina em 1940, o primeiro antibiótico descoberto a partir de bactérias do filo Actinobacteria (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940), seguida por estreptotricina em 1942 (WAKSMAN;

¹Anos mais tarde, o fungo foi identificado *P. chrysogenum*, mas uma reconstrução de árvore filogenética em 2011 a classificou como pertencente à espécie *P. rubens* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011).

WOODRUFF, 1942) e estreptomicina em 1944 (WOODRUFF, 2014), ambas produzidas por bactérias do gênero de *Streptomyces*.

Em resposta a algumas linhagens de bactérias que se mostraram resistentes à penicilina, Beecham desenvolveu a meticilina (em 1959) que seria resistente a penicilase. Posteriormente na década de 60, outros membros do grupo β -lactâmicos surgiram: a ampicilina e cefalosporina, com o aumento do espectro de ação em comparação à penicilina (MOHR, 2016).

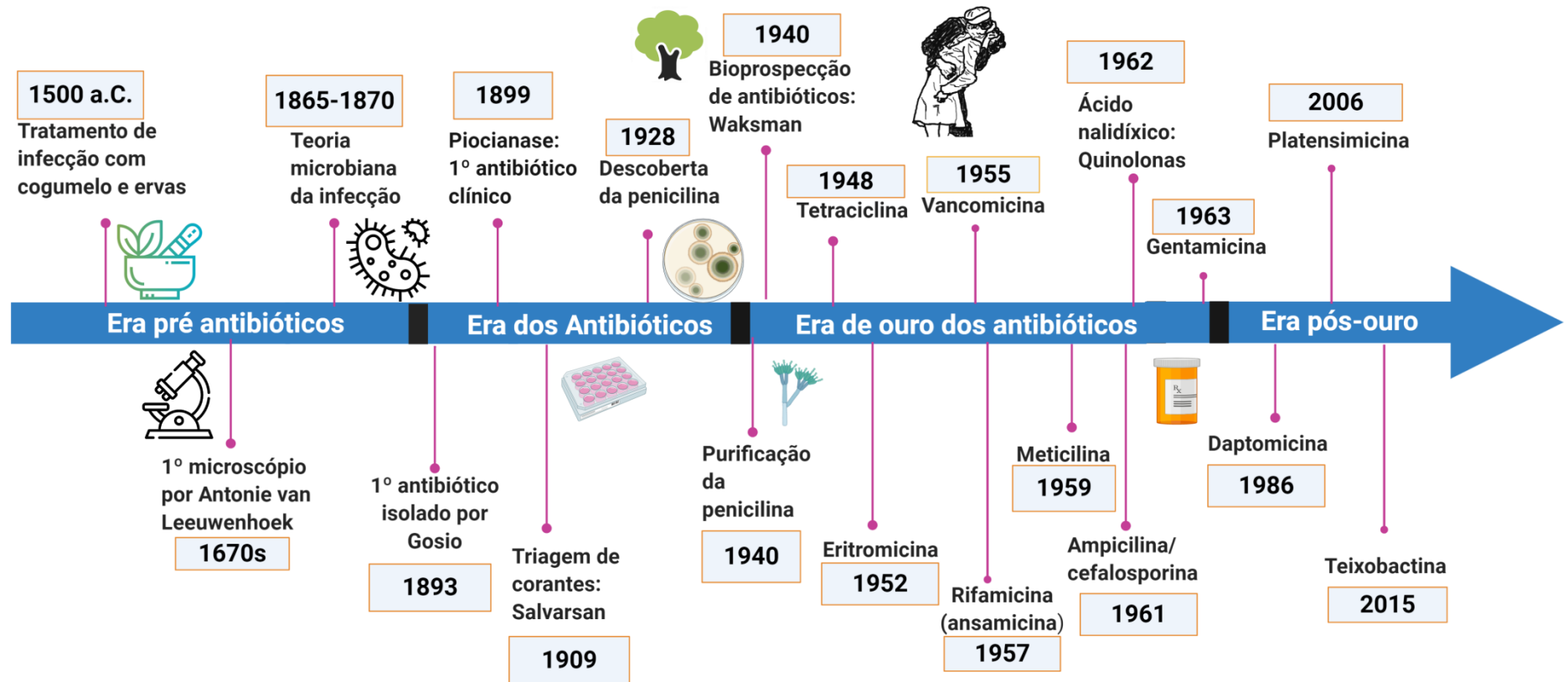
Diversas outras classes de antimicrobianos foram descobertas de origem natural ou sintética: tetraciclina, com o isolamento da clorotetraciclina em 1948 a partir de uma linhagem de *S. aureofaciens* (DUGGAR, 1948); macrolídeos, com a eritromicina em 1952 isolada da *Saccharopolyspora erythraea* (MCGUIRE et al., 1952); glicopeptídeos, em 1955 com a vancomicina isolada em uma linhagem de *S. orientalis* (MCCORMICK et al., 1955); ansamicinas em 1957, com isolados de rifamicina em *Amycolatopsis rifamycinica* (SENSI; GRECO; BALLOTTA, 1959) e quinolonas em 1962 com o ácido nalidíxico.

Após a era de ouro, muitas indústrias da área farmacêutica começaram a focar em outras áreas e aos poucos foram desistindo de pesquisas em bioprospecção de novos antibióticos. Sendo a última classe descoberta no século XX: os lipopeptídeos referente a daptomicina em 1986, mas que obteve a sua aprovação para comercialização em 2003 (EISENSTEIN; OLESON; BALTZ, 2010).

Entretanto pesquisas recentes têm encontrado potenciais novos antibióticos e alguns com novos mecanismos de ação como a platensimicina e a teixobactina. A platensimicina foi isolada em 2006 na África do Sul a partir de um isolado identificado como *S. platensis* (SINGH et al., 2006). O antibiótico apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas (como *S. aureus* resistentes a meticilina) e *Mycobacterium tuberculosis*. O fármaco tem como alvo a enzima FabF que participa da síntese de ácidos graxos. Ademais, o antibiótico não apresenta toxicidade em humanos, porém apresenta problemas na farmacocinética após a sua administração (MARTENS; DEMAIN, 2011). A teixobactina foi descoberta em 2015 e apresentou atividades promissoras frente linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* e bactérias Gram-positivas e tem como alvos lipídeos precursores da parede celular: os lipídeos II e III (LING et al., 2015; ZONG et al., 2019). Estes antibióticos, assim como muitos,

ainda não estão clinicamente disponíveis, estando ainda em fases iniciais ou em desenvolvimento (COATES; HU, 2007; SANDLE, 2015).

Figura 1- Linha do tempo da pesquisa dos antibióticos.



Fonte: Elaborada pelo autor no site Biorender.com. A divisão da linha do tempo dos antibióticos em eras foi baseada nas definições de Mohr (2016).

2.1.2 Classes de antibióticos: mecanismo de ação e resistência antimicrobiana

A palavra antibiótico deriva do termo antibiose descrito por Vuillemin que tem significado oposto a simbiose, ou seja, contra a vida (VUILLEMIN, 1890). O antibiótico foi descrito por Waksman (1947, p.568, tradução nossa) como sendo: “uma substância química produzida por microrganismos, pela qual tem a capacidade de inibir o crescimento ou até destruir bactéria e outros microrganismos”. Conjuntamente aos agentes quimioterápicos de ação antibacteriana, os antibióticos fazem parte dos compostos antimicrobianos que englobam os antivirais, os antifúngicos, entre outros (BURNETT-BOOTHROYD; MCCARTHY; 2011).

Os antibióticos são classificados de acordo com a estrutura molecular, espectro de ação (amplo ou restrito) e quanto ao mecanismo e alvo de atuação. Ainda podem ser divididos quanto à origem na síntese: sintéticos, produzidos a partir de síntese química (também conhecidos como quimioterápicos), compostos naturais obtidos a partir de microrganismos e por fim, os semissintéticos (KEMPER, 2008; CALDERÓN; SABUNDAYO, 2007). Dentre as principais classes de antibióticos utilizados atualmente estão os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, glicopeptídeos, lipopeptídeos, sulfonamidas e quinolonas.

Os **β -lactâmicos** são antibióticos de origem natural e semissintética (oxacilina) que impedem a síntese da parede celular ao inibirem de maneira irreversível a ação da enzima transpeptidase, responsável pelas ligações das cadeias de peptidoglicano. Tem como representantes os fármacos penicilina, cefalosporina e carbanêmicos, os quais compartilham uma estrutura em anel β -lactâmico. Estes antibióticos são amplamente utilizados clinicamente contra bactérias Gram-positivas pela maior facilidade de penetração na célula. Além de um amplo espectro de ação e especificidade, além de serem eficazes e seguros (MACDOUGALL, 2018).

As **penicilinas** além de terem um anel β -lactâmico, possuem um anel de tiazolidina e uma cadeia lateral “R” variável. Logo, possui diversos análogos como penicilina G, penicilina V e meticilina. Ainda há as aminopenicilinas que se diferenciam por grupamentos amino como ampicilina e amoxicilina atuantes como *Haemophilus influenzae* e *Escherichia coli*. Devido à resistência, as penicilinas são

administradas conjuntamente com antibióticos inibidores de β -lactamases como sulbactam e tazobactam (MACDOUGALL, 2018).

As **cefalosporinas** são antibióticos bactericidas que foram isoladas do fungo *Acremonium chrysogenum* e apresentam o mesmo mecanismo de ação visto nas penicilinas. Sua estrutura difere das penicilinas com um anel hexamérico composto pelo ácido 7-aminocefalosporânico adjacente ao anel β -lactâmico com duas cadeias laterais (CALDERÓN; SABUNDAYO, 2007).

Este grupo de antibióticos tem uma divisão não oficial em “gerações” que são classificados de acordo o espectro de ação das cefalosporinas. A primeira geração, com os representantes: cefazolina, cefalexina e cefradoxil que atuam principalmente em bactérias Gram-positivas, enquanto, a segunda até a quinta geração aumentam o espectro de ação em bactérias Gram-negativas (MACDOUGALL, 2018). Ainda há as cefalosporinas anti-MRSA (*S. aureus* resistentes a meticilina) que inativam as PLP (proteínas ligantes a penicilina) alteradas nos MRSA e *S. pneumoniae*. Por último, as cefalosporinas anti-*Pseudomonas* como cefepima e ceftazidina, que são eficazes contra a *P. aeruginosa* (MACDOUGALL, 2018).

Em relação à resistência apresentada por bactérias, o fármaco pode ser impedido de atuar por mecanismo de impedimento da sua chegada ao sítio de ação, alterações na PLP, ação de esterases bacterianas que substituem grupamentos ésteres em álcool, limitando a reação do antibiótico com a transpeptidase, além da hidrólise do anel β -lactâmico (LEVINSON, 2016; MACDOUGALL, 2018).

Os **carbapenêmicos** apresentam uma estrutura em anel de cinco elementos insaturados com a substituição do átomo de enxofre por carbono ligado ao anel β -lactâmico. O grupo é representado pelo fármaco imipem que apresenta o maior espectro de ação entre todos antibióticos da classe. Apresenta efetividade em bactérias Gram-negativas resistentes a β -lactamases, bactérias da família Enterobacteriaceae, linhagens de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (MACDOUGALL, 2018). Contudo a resistência tem aumentado e mecanismos como a degradação do fármaco por carbapenemases têm sido recorrentes, ao ponto de as linhagens antes susceptíveis, serem postas em situação críticas como a *Klebsiella pneumoniae* (LEVINSON, 2016; MACDOUGALL, 2018).

Os **aminoglicosídeos** são antibióticos bactericidas usados contra bactérias Gram-negativas aeróbicas e tem sua estrutura formada por um grupamento

aminobásico ligado a um açúcar. Tem como seu principal representante a estreptomicina, sendo primeiramente usada para combater a tuberculose (WOODRUFF, 2014). Diferente de outros aminoglicosídeos isolados de *Streptomyces* como neomicina, canamicina e a própria estreptomicina, a gentamicina foi isolada a partir da *Micromonospora purpurea* e apresenta um amplo espectro de ação em bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa* (DEMAIN; WEINSTEIN, 2012).

Fármacos desta classe passam pela membrana externa por difusão nos canais de porina, deste modo, permitindo a sua entrada no espaço periplasmático. Para atravessar a membrana interna, o fármaco depende de um gradiente elétrico de elétrons. O mecanismo de ação desta classe está na ligação à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a movimentação do ribossomo ao longo do mRNA (MACDOUGALL, 2018). Consequentemente, o antibiótico impede a síntese normal de proteínas por provocar um erro na leitura com a incorporação errônea de aminoácidos com a terminação precoce da tradução. As proteínas anormais são incorporadas na membrana alterando sua permeabilidade para a entrada de mais aminoglicosídeos (MACDOUGALL, 2018).

As **tetraciclinas** são uma classe de antibióticos policetídeos bacteriostáticos de amplo espectro e possuem uma estrutura de quatro anéis de hidrocarbonetos com radicais (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Fármacos desta classe se ligam reversivelmente a subunidade 30S do ribossomo impedindo a entrada do aminoacil-tRNA no sítio acceptor no complexo mRNA-ribossomo. Após penetrarem a célula por difusão passiva por canais de porina e por transporte ativo no bombeamento na membrana interna, o fármaco consegue acesso ao citoplasma (MACDOUGALL, 2018).

Seus principais representantes utilizados clinicamente são a doxiciclina e a minociclina. A resistência em tetraciclinas ocorre com o efluxo do antibiótico para fora da célula, induzida por proteínas transmembranares. Há também a proteção ribossomal conferida por proteínas do citosol que impedem a ligação da tetraciclina com o ribossomo (ROBERTS, 1996).

Os **macrolídeos** são antibióticos conhecidos por serem usados em infecções respiratórias como pneumonia e sinusite aguda. Contém anéis macrocíclicos de origem policetídica ligadas a um açúcar e um amino-açúcar. É representado pela

eritromicina, composto bioativo isolado de uma estirpe de *Saccharopolyspora erythraea* (antes denominado *Streptomyces erythreus*) em 1952 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Esta classe de bacteriostáticos se liga ao rRNA 23S da subunidade maior (50S) do ribossomo, impedindo a elongação da cadeia polipeptídica nascente por inibir a etapa de sua translocação do sítio A para o sítio P (MACDOUGALL, 2018, p. 1297). A resistência em macrolídeos pode acontecer por quatro mecanismos: efluxo do fármaco para fora da célula, modificação do alvo por enzimas metilases, hidrólise do fármaco por ação de esterases e mutações cromossômicas (NAKAJIMA, 1999).

A classe dos **glicopeptídeos** é representada pela vancomicina, um antibiótico tricíclico produzido por *Streptococcus orientalis*, como também, pela nova geração da classe: os lipoglicopeptídeos (telavancina, dalbavancina e oritavancina) (HENSON et al., 2015). A vancomicina interfere na síntese de peptidoglicano ao se ligar no terminal D-alanil-D alanina (D-ala-D-ala) de unidades precursoras da parede celular, assim como, na inibição da ação da transglicosilase, enzima que também atua na síntese de peptidoglicano. Outro mecanismo referente a este grupo é presenciado nos fármacos telavancina e oritavancina com a ruptura direta da membrana. A classe apresenta ação bactericida contra linhagens de *S. aureus* resistentes à penicilina e *S. epidermalis* e *Enterococcus* spp. A resistência a estes fármacos atua em alterações do cluster do gene *van*, que por consequência modifica o alvo de ação destes antibióticos pela troca do aminoácido alanina por lactato ou serina no terminal D-ala-D-ala (LEVINSON, 2016; MACDOUGALL, 2018).

Os **lipopeptídeos** são representados pela daptomicina, que tem como função a despolarização e desequilíbrio do potencial de membrana, conseqüentemente leva a morte da célula bacteriana. Em resposta a sua atuação, acredita-se que as bactérias têm formado uma resistência na mudança da carga em sua superfície celular impedindo a ligação do antibiótico na membrana. A classe atua em bactérias Gram-positivas aeróbicas, facultativas e anaeróbicas (MACDOUGALL, 2018, p. 1306).

As **sulfonamidas** foram os primeiros quimioterápicos eficazes a serem utilizados em massa contra infecções bacterianas. O fármaco é derivado da para-aminobenzenossulfonamida, mais conhecido como sulfanulamida. O seu mecanismo atua na inibição da enzima di-hidropteroato-sintase o qual atua na integração do

ácido 4-aminobenzoico (PABA) ao ácido-di-hidropépteroico, precursor do ácido fólico. O fármaco e o substrato são compostos similares, logo competem pela ligação da enzima bacteriana.

A administração deste antibiótico geralmente é realizada com drogas que atuam conjuntamente na via da síntese do ácido fólico, como a trimetoprima que atua na reação sequencial à atuação da sulfonamida, com o impedimento da conversão do ácido-di-hidrofólico em ácido tetra- hidrofólico pela inibição da enzima di-hidrofolato redutase (MACDOUGALL, 2018).

Uma propriedade desta classe é a toxicidade seletiva em bactérias, pois células de mamíferos não conseguem sintetizar o ácido fólico, necessitando da ingestão de ácido fólico pré-formado (GRAYSON et al., 2010). A resistência antimicrobiana para a classe de sulfonamidas é alcançada por mutação aleatória e transferência de determinantes de resistência por plasmídeos. Outros mecanismos de resistência levam a redução na afinidade da droga pela enzima e a síntese de folato por vias alternativas (MACDOUGALL, 2018).

As **quinolonas** são compostos antimicrobianos sintéticos bactericidas que são direcionados ao tratamento no trato urinário e em infecções microbianas. A partir da descoberta de que o átomo de flúor ao ser inserido na posição 6 da molécula melhora a atividade do composto, bem como facilita a entrada na célula bacteriana, foram sintetizados diversos análogos, como as fluoroquinolonas (enoxacina, norfloxacina e levofloxacina) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Esta classe atua em dois alvos: a DNA girase em bactérias Gram-negativas e a topoisomerase IV em Gram-positivas.

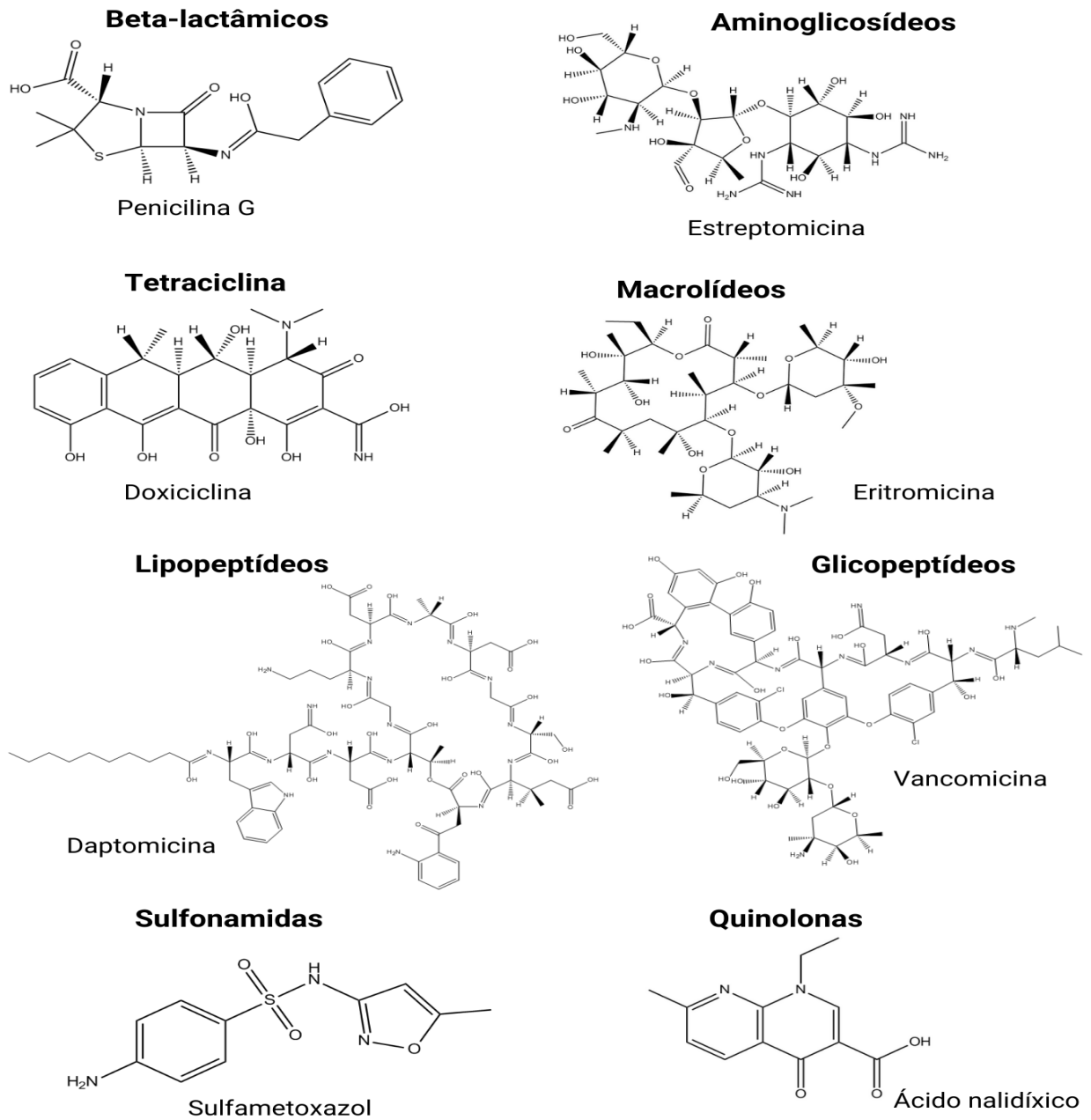
O DNA em seu processo de replicação inicia um processo de superenrolamento positivo, a enzima DNA girase retira esta tensão ao realizar um corte no DNA com as duas subunidades *GyrA* e *GyrB* e introduz um superenrolamento negativo no DNA. Enquanto a topoisomerase IV separa as moléculas de DNA filhas interligadas formadas durante a replicação. A droga se liga nestas enzimas impedindo a síntese de DNA (DRLICA et al., 2008).

A administração do fármaco em humanos é segura por razões como as células eucarióticas não possuem DNA girase e mesmo que a topoisomerase II (presente nas células humanas) seja semelhante à topoisomerase IV bacteriano, o fármaco apresenta maior seletividade para a enzima bacteriana. Além do mais, seria

necessária uma dosagem muito alta da droga (acima do que é aplicado clinicamente) para a inativação da enzima humana (MACDOUGALL, 2018).

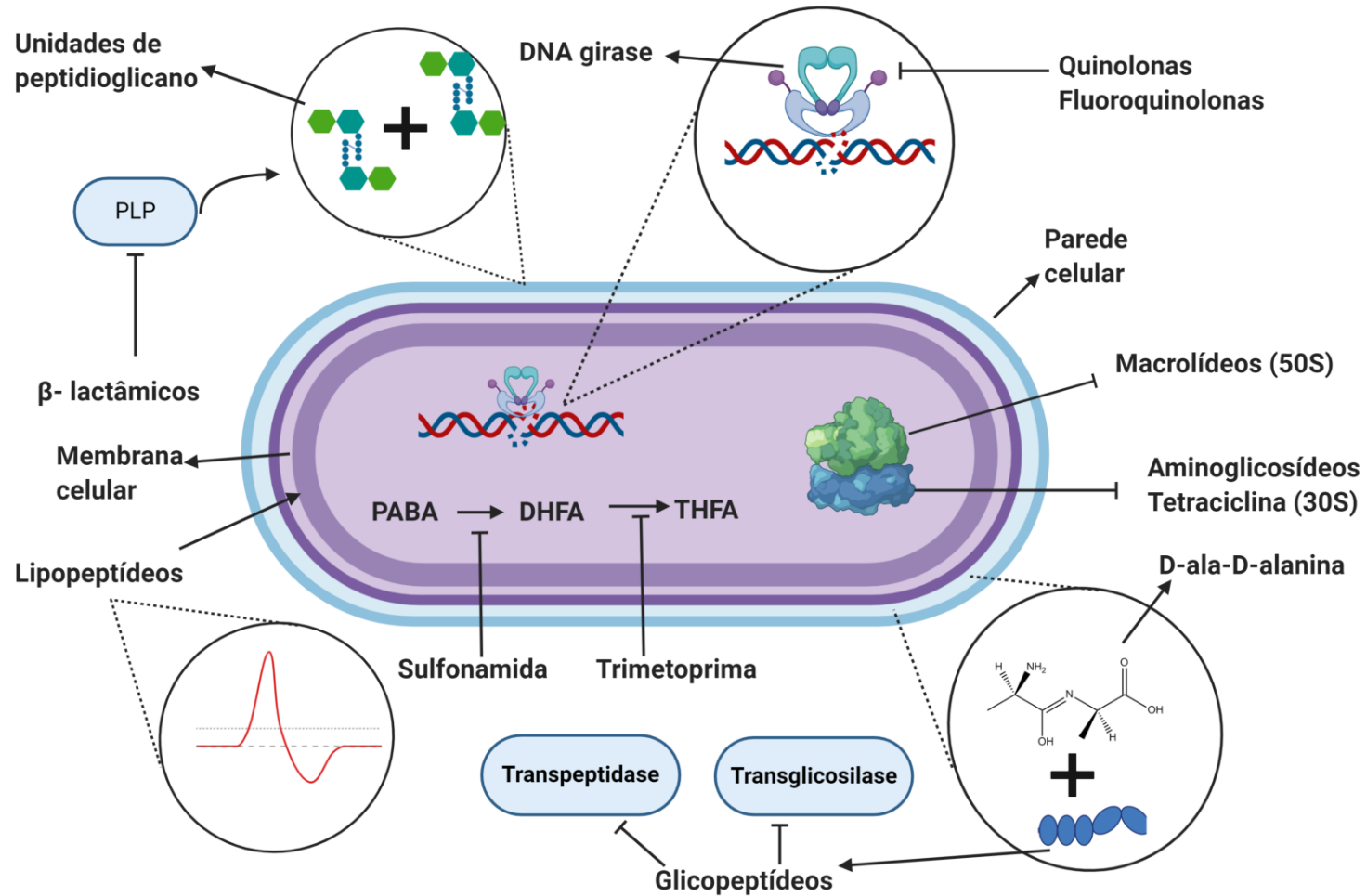
A resistência é provocada por diversos mecanismos: modificação da subunidade A da DNA girase, transporte ativo da droga para fora da célula por bomba de efluxo, alterações na permeabilidade do fármaco em canais de porina (JACOBY, 2005). Além do mais, há a resistência mediada por plasmídeo contendo o gene *qnr*, pela qual sua expressão protege alvos da ciprofloxacina (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; TRAN; JACOBY, 2002). A Figura 2 mostra os antibióticos representantes de cada classe, enquanto a Figura 3 mostra os mecanismos de ação dos principais antibióticos em uso na atualidade.

Figura 2- Principais representantes das classes de antibióticos.



Fonte: Autoral. As moléculas foram geradas pelo ChemDraw Ultra 12.0.

Figura 3- Mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados na atualidade.



Fonte: Elaborada pelo autor no site BioRender.com. PABA: Ácido para-aminobenzóico DHFA: Ácido Dihifólico, THFA: Ácido tetraidrofólico.

2.2 Resistência antimicrobiana: estado da arte, futuro e ações de combate

Com o passar dos anos, a efetividade dos antibióticos e quimioterápicos no controle de infecções foi decaindo com o aumento da resistência dos microrganismos patógenos frente a antimicrobianos (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). A resistência antimicrobiana (RAM) é definida como a “capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antimicrobiano” (ECDC, 2008).

A RAM pode ser “natural” quando o patógeno já é previamente resistente ao fármaco testado/utilizado ou “adquirida” quando determinados organismos da população adquirem espontaneamente o perfil de resistência (HOLLENBECK; RICE, 2012; RICE; BONOMO, 2005).

Comumente, a RAM pode ser adquirida pelos microrganismos por mecanismos de transmissão de genes que conferem resistência por meio da conjugação, transdução e transformação. A conjugação ocorre com a transferência de genes da resistência por contato direto entre duas bactérias por intermédio do *pillus*. A bactéria, no processo de transdução adquire o DNA exógeno através de bacteriófagos, os quais carregam o material genético dentro do seu revestimento proteico proveniente de um hospedeiro anterior. Por último, mas não menos importante, na transformação o microorganismo adquire o DNA capaz de conferir um fenótipo resistente do ambiente (RICE; BONOMO, 2005). Além do mais, as mutações no DNA bacteriano como inserções/deleções (indels) e trocas de bases (mutações) ajudam as bactérias a superar os antibióticos e transmitir os genes de resistência adquiridos para a geração futura (transmissão vertical) (BAPTISTA 2013).

Apesar dos mecanismos de transmissão horizontal e verticais citados anteriormente, algumas ações provocadas pelo homem agravam a situação da resistência microbiana, como o uso extensivo de antibióticos em várias áreas como na veterinária, agricultura e medicina (GRAHAM et al., 2018). As razões para o uso intenso de antibióticos têm diversos fatores, como na pecuária para o tratamento de doenças, promoção de crescimento animal, aumento da eficiência na conversão alimentar e o uso como forma de prevenir doenças (SILBERGELD; GRAHAM; PRICE, 2008). Além disso, o uso inadequado de antibióticos pela população

aumentam as chances do patógeno se tornar resistente a um antibiótico (MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014).

Estimativas apresentadas por Boeckel et al. (2015) apontam o crescimento do consumo de antibióticos em 2030 (incremento de 67%). Ainda o estudo prevê um crescimento no uso de antibióticos nos países em desenvolvimento do bloco BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul). Atualmente a China é o maior produtor e consumidor de antibióticos em animais e humanos, sendo seguido de Estados Unidos e Brasil.

Pesquisas advertem para a possibilidade da permanência de resíduos de antibióticos em órgãos de animais (KIMERA et al., 2015), sendo que muito destas drogas são utilizadas também em humanos (GELBAND et al., 2015). Na cadeia alimentícia, o antibiótico se direciona na mesa do consumidor que alimenta da carne destes animais. Além disso, a contaminação por antibióticos pode chegar a poluir a água e o solo, afetando o ambiente com deposição de estrumes de animais para fertilização do solo, irrigação com águas residuais contaminadas de antibióticos providas de fazendas ou escoamento. O problema da resistência varia de intensidade entre países de acordo com as condições socioeconômicas da população e de pecuaristas, como também políticas regulatórias no uso de antibióticos (BOECKEL et al., 2015).

O investimento em novos fármacos e a produção de alguns antibióticos clássicos como a penicilina têm diminuído consideravelmente e o aumento da resistência antimicrobiana tem feito ressurgir doenças antes controladas (VENTOLA, 2015). A OMS destaca que sem antibióticos com proficiência, cirurgias e tratamentos como no câncer estarão comprometidos (OMS, 2019).

O problema vai além da crise da saúde global, tendo um impacto econômico e social, pois a introdução de novos antibióticos fabricados por empresas de países de primeiro mundo poderiam estar inacessíveis a pessoas de baixa renda ou aquelas que vivem em extrema pobreza, além do que o tratamento para casos extremos como bactérias super-resistentes levaria grande tempo e com isso o custo seria elevado (CASTRO, 2002).

Diante da gravidade futura que o RAM poderá trazer, países membros da OMS se reuniram em 2015 na 68ª Assembleia Mundial da Saúde a fim de traçar

planos globais ao combate a resistência. O Brasil formulou um plano de ação global sob orientações da OMS que objetiva 5 princípios (BRASIL, 2019):

- 1. Ampliar o conhecimento sobre AMR**
- 2. Fortalecer a vigilância epidemiológica**
- 3. Reduzir a incidência de infecções**
- 4. Aliança de países campeões no combate a RAM**
- 5. Assegurar investimentos sustentáveis na luta contra a resistência antimicrobiana.**

A ação busca a aliança entre países e formulação de planos nacionais de cada Estado para o combate da RAM com a ajuda da OMS. O Brasil tem buscado medidas na luta contra a resistência como a criação de um programa de controle de infecções hospitalares que visa reduzir a incidência e a gravidade de infecções nas redes hospitalares, uma rede nacional de monitoramento da resistência microbiana para a sua detecção, prevenção e controle e também o seu plano de ação Nacional (PAN-BR) atendendo pedidos da OMS (ESTRELA, 2018 p. 318-324).

Dada o aumento da preocupação de organizações relacionadas à saúde, especialistas indicam medidas como a criação de leis regulatórias como forma de frear o uso descontrolado destes fármacos, assim como, medidas de vigilância e de higiene em locais de trabalho. Além do mais, o uso de bactérias probióticas na alimentação de animais vem sendo indicado como uma alternativa ao uso de antibióticos (MONDERFINI; DUARTE, 2010).

Políticas públicas para educar as pessoas sobre a importância da prevenção e das consequências da RAM, assim como um maior engajamento por parte da população em tomar medidas profiláticas como lavar as mãos e o uso de máscaras como visto na atual pandemia do coronavírus (OMS, 2020). No mundo acadêmico e industrial, pesquisas exploram novas formas de combate ao RAM; formulação de análogos pela modificação estrutural de antibióticos conhecidos, a combinação de antibióticos associados a algum componente como visto em β -lactâmicos em associação com inibidores da β -lactamase, assim como técnicas de bioinformática como forma de redução de custos para a identificação de fármacos com potencial antimicrobiano (DRAWZ; BONOMO, 2010).

2.3. Actinobactérias como fonte de antibióticos

2.3.1 Actinobacteria: características gerais do filo

O filo Actinobacteria é composto por bactérias Gram-positivas, tendo distribuição cosmopolita em ecossistemas aquático e terrestre (BARKA et al., 2016). São majoritariamente encontradas no solo, onde estariam presentes na ordem de 10^7 a 10^9 UFC (unidades formadoras de colônias) por grama, sendo 95% da ordem dos Actinomycetales (BALTZ, 2007). O filo é um dos maiores do domínio Bacteria (VENTURA et al., 2007), tendo sua etimologia provinda das palavras gregas *aktis* ou *aktin* (raio) e *mukēs* (fungo) devido ao seu crescimento das extensões de sua ponta e ramificação das hifas (BARKA et al., 2016).

Por causa de sua reprodução por esporulação e pela presença de micélios, as actinobactérias foram durante muitos anos consideradas parte do reino Fungi (BARKA et al., 2016). Análises morfofisiológicas mais avançadas, percebeu-se que os actinomicetos possuíam características mais similares com as bactérias: células mais finas e parede celular composta de peptidoglicano, além da organização de seu cromossomo em nucléoide (sem membrana nuclear) (BARKA et al., 2016).

Os membros deste filo apresentam alto conteúdo de guanina e citosina (GC) em seu DNA (MIAO; DAVIES, 2010). A maioria dos actinomicetos são aeróbicas estritos, sendo alguns heterotróficos e quimioautotróficos (BARKA et al., 2016). Apresentam associações ecológicas diversas como patogênica (espécies de *Mycobacterium* e *Corynebacterium*) (BARKA et al., 2016), comensalismo em plantas (*Frankia* spp.) (SELLSTEDT; RICHAU, 2013) e no sistema gastrointestinal humano (*Bifidobacterium* spp.) (BINDA et al., 2018).

Estas bactérias são conhecidas pelo famoso cheiro de terra após a chuva, causada pela liberação de compostos terpenóides como a geosmina (KLAUSEN et al., 2005). Apresentam características morfológicas diversas que auxiliam na diferenciação em gênero e espécie como a presença ou ausência de micélio aéreo ou do substrato. Com cores diversas no micélio e a produção de pigmentos, como melanina, adquirindo pigmentação desde marrom até um aspecto amarelado (HARIR et al., 2018).

As actinobactérias são bactérias mesófilas, apresentando crescimento ótimo em temperaturas que variam entre 25 °C e 30 °C e em pH variando entre 6 até 9 (BARKA et al.,2016). Porém há exceções com a existência de actinobactérias em ambientes termófilos (45-60 °C) (EDWARDS, 1993), assim como, em pH ácido a 3,5 (KIM et al., 2003) e em pH alcalino (ZENOVA; MANUCHAROVA; ZVYAGINTSEV, 2011).

Seu ciclo de vida começa com a germinação do esporo que se transforma em hifa, a qual se ramifica em busca de nutrientes e conquista do território formando o micélio vegetativo. A bactéria passa por uma modificação com o crescimento de micélio aéreo. Neste momento, o micélio vegetativo se quebra e é usado como fonte de nutrientes para a actinobactéria.

Como forma de se proteger de predadores e competidores, a actinobactéria começa a produzir substâncias protetoras que ajudam na adaptação do meio e proteção contra predadores e competidores: os metabólitos secundários. Este processo ocorre na transição do modo vegetativo para o aéreo na fase estacionária. Quando o ambiente começa a parecer desfavorável com a escassez de nutrientes, a bactéria começa a dividir suas hifas com cada segmento contendo um cromossomo para a formação de esporos. Logo em seguida, os esporos se dissipam conquistando novos ambientes (CHATER; CHANDRA, 2006; BARKA et al.,2016; HARIR et al., 2018).

Estas bactérias se mostram especiais não apenas por seu potencial antimicrobiano, mas também por sua relevante produção de compostos anticancerígenos, inseticidas e antifúngicos, além da produção de enzimas de interesse industrial (SAINI et al., 2015; CHAUDHARY et al., 2013). Logo, a filo atrai a atenção de vários setores, tendo aplicações na medicina, biotecnologia, indústria e agricultura (THIRUMURUGAN, 2018).

2.3.2 Abordagens modernas para a bioprospecção de novas moléculas

Na era de ouro dos antibióticos, vários compostos com propriedade antimicrobiana foram isolados a partir de actinobactérias desde o trabalho considerável de Waksman na década de 40 do século XX (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940). Com o passar dos anos, a descoberta de novos

antimicrobianos foi diminuindo com a incidência recorrente de moléculas já descritas sendo encontradas. Por isso, indústrias farmacêuticas foram gradativamente desistindo do campo de pesquisa envolvendo a bioprospecção de novos antimicrobianos. Além disso, fatores como o tempo empreendido no processo e retorno financeiro especulado não conciliava com o investimento financeiro com a pesquisa e com recursos humanos.

Diversos pesquisadores têm buscado a mudança deste panorama. Avanços tecnológicos na área de identificação de compostos e de ferramentas da bioinformática têm sido aliados no alcance deste propósito (MALATHI; RAMAIAH, 2018). A descoberta de que muitos agrupamentos de genes, os chamados clusters biossintéticos que podem estar silenciados em cultivos realizados em condições de laboratório, abriu os olhos de vários cientistas para fatores como variações das condições como pH, temperatura e nutrientes que possam ativar esses agrupamentos de genes (SENGES et al., 2018). Estas pesquisas mostram o grande potencial de microrganismos produtores de antibióticos e que novas classes de antibióticos podem ser descobertas a partir de novas abordagens.

Com o sequenciamento de organismos produtores de produtos naturais, a mineração de genomas a partir de ferramentas da bioinformática como o antiSMASH (BLIN et al., 2019) tem ajudado a identificar agrupamentos gênicos com potencial de produção de novos compostos bioativos. Além disso, a tecnologia de edição CRISPR-Cas9 (agrupamentos de repetições palindrômicas curtas e regularmente interespaçadas) aplicada à engenharia metabólica tem aumentado a produção de compostos com pouco rendimento através da ativação ou promoção de clusters biossintéticos (ZHANG et al., 2017). Ademais, a transferência de clusters biossintéticos para biofábricas em bactérias heterólogas é considerada uma alternativa para um melhor rendimento na produção de antibióticos (BILYK; LUZHETSKYY, 2016).

Ferramentas de desreplicação como análise de extratos de metabólitos em cromatografia gasosa e/ou líquida acoplada a espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) têm ajudado os pesquisadores a desvendar novas moléculas. Além do mais, a comparação de cromatogramas e espectro de massas em bancos de dados têm auxiliado na redução do tempo gasto com moléculas já caracterizadas (GENILLOUD et al., 2011).

2.4 Sequenciamento de alto desempenho (HTS)

Classicamente, as classificações taxonômicas de linhagens bacterianas e diversas outras espécies de microrganismos eram baseadas em similaridades ou disparidades na morfologia, fisiologia e bioquímica (KOMAKI, 2018). Este paradigma foi mudando com a apresentação do sequenciamento genético pelo método de Sanger em 1977, o qual revolucionou a história da genética com as possibilidades de suas diversas aplicações. Contudo, um longo caminho foi percorrido até que se chegasse ao sequenciamento de grandes genomas como o humano.

A história do sequenciamento se inicia com a elucidação do material genético hereditário: o DNA em três dimensões por Watson e Crick através dos trabalhos de Franklin Roosevelt e Maurice Wilkins com a visualização do material genético em raio X (WATSON; CRICK, 1953). Curiosamente, o primeiro sequenciamento não foi a partir de DNA, mas da proteína da insulina (1953), seguida pelo sequenciamento em 1965 do RNA transportador do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (HOLLEY et al., 1965; SANGER, 1958). O sequenciamento se tornou realidade com a aplicação de enzimas catalíticas de RNA: as RNases, assim como, a introdução de eletroforese bidimensional que permitiu a visualização dos fragmentos do material (SANGER; BROWNLEE; BARRELL, 1965). Em 1969, Ray Wu e Dale Kaiser utilizaram nucleotídeos radioativos através da DNA polimerase para deduzir a sequência do bacteriófago lambda, este foi um passo importante para a aplicação de primers (WU; KAISER, 1988).

Neste período, a substituição de eletroforese em duas dimensões por eletroforese em gel de poliacrilamida providenciou um poder maior de resolução. Esta mudança influenciou nos trabalhos dos cientistas Alan Coulson e Sanger com o sequenciamento de terminação de cadeia e ao método químico desenvolvido por Allan Maxam e Walter Gilberts com o sequenciamento por clivagem química.

A técnica de clivagem química se baseava em tratamento químico das bases nucleotídicas de DNA, os dois pesquisadores introduziram compostos químicos para a quebra específica de bases: hidrazina em bases pirimídicas, que acrescentado com altas concentrações salinas, tinha como direção bases de citosina. As purinas eram removidas com ácido, porém com a utilização de dimetil fosfato, apenas a guanina era removida. Enquanto que a quebra da ligação fosfodiéster era realizada

pela piperidina. Com isso vários fragmentos eram gerados, sendo identificados em gel de poliacrilamida (MAXAM; GILBERT, 1977).

O sequenciamento pela técnica de terminação de cadeia ou método do dideoxi se baseia na utilização de dideoxinucleotídeos, os quais por não possuir o grupo hidróxi no carbono 3' não conseguem fazer a ligação com o grupo fosfato do carbono 5' da próxima base, assim encerrando a reação naquele fragmento (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Com o avanço da tecnologia, o sequenciamento passou por melhorias com a reação em cadeia de polimerase por Kary Mullis e a tecnologia do DNA recombinante que colaboraram para a geração de maior quantidade de material genético a ser analisado (MULLIS et al., 1986; JACKSON; SYMONS; BERG, 1972). Além disso, o sequenciamento passou por automatização: a substituição de marcadores radioisótopos por ddNTPs com fluoróforos trouxe muitos benefícios, como maior segurança e melhor análise do sequenciamento, pois cada um das quatro dNTPs eram colocadas em uma reação, conseqüentemente a sequência era quantificada pela intensidade de cada fluoróforo (ANSORGE et al., 1986).

Entretanto, o sequenciamento genético pelo método de Sanger não gera grande volume de dados, pois suas sequências possuem no máximo 1 Kb² e projetos como o genoma humano exigiam muito tempo e esforço de recursos financeiros e humanos para ser finalizado (HEATHER; CHAIN, 2016). Em meio a estes problemas apresentados surgiu a segunda geração de sequenciadores como a Roche 454 com a técnica do pirosequenciamento (RONAGHI et al., 1996), a Illumina/Solexa com o sequenciamento por síntese e o Ion Torrent com sequenciamento por alteração de pH (RUSK, 2010).

Estes sequenciadores se diferenciam do método de Sanger pelo alto rendimento com milhões de sequências pequenas sendo geradas, além da capacidade de processar várias amostras simultaneamente. Ademais, o sequenciamento de alto rendimento permite a utilização de ferramentas da bioinformática que dão suporte ao pesquisador quanto a análise dos dados mais

² 1 kb equivale a 1000 pares de bases.

aprofundada em torno da qualidade e métricas do sequenciamento e da montagem como tamanho do genoma, N50³ e quantidade de sequências geradas.

Em 2001, em comparação ao método de Sanger, o sequenciamento do genoma humano custava 100 milhões de dólares, a qual teve sua queda acentuada a partir da introdução dos sequenciadores de nova geração em 2006 (WHITLEY; TUELLER; WEBER, 2020). Com o passar dos anos, a competitividade entre as empresas de sequenciadores, as quais inovavam a cada ano com novas tecnologias e melhores processamentos (SHENDURE et al., 2017) resultou na queda nos preços no sequenciamento genético, com o custo para sequenciamento de um genoma sendo reduzido a valores próximos de 1000 dólares (WETTERSTRAND, 2019).

Não obstante, o sequenciamento continua evoluindo e novas tecnologias têm sido o holofote no mundo científico, como o sequenciamento *Nanopore* que através de uma membrana com poros pode identificar cada nucleotídeo de um filamento de DNA através da mudança do sinal elétrico. O sequenciamento *Nanopore* da Oxford consegue gerar longas sequências (10⁴ a 10⁶ pares de bases) (FENG et al., 2015) e tem se destacado pela sua portabilidade em tamanho de *pen-drive*, além de sua aplicabilidade na própria área de coleta do material genético (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018).

A importância do sequenciamento de genomas vai além da taxonomia, como o uso na ciência forense com a elucidação de crimes pela maior acurácia na distinção de alelos homólogos, mas de diferentes sequências, a qual a eletroforese capilar não consegue distinguir (ALY; SABRI, 2015), assim como, a sensibilidade da distinção e quantificação de DNA misturados de várias pessoas em uma amostra (YANG; XIE; YAN, 2014).

O sequenciamento de alto desempenho foi um passo importante para a pandemia atual causada pelo SARS-CoV-2, com elucidação do genoma de RNA viral (SAH et al., 2020). Além disso, vem como vem sendo utilizada identificação de espécies produtoras de antibióticos como actinobactérias (CANTILLO et al., 2018), em análises metagenômicas de bactérias biorremediadoras no combate a poluição de ecossistemas (LASA; ROMALDE, 2017) e também na aplicação clínica como no teste pré-natais não invasivos com a coleta de DNA fetal com o propósito

³ Métrica referente à qualidade de montagem do genoma. As sequências (contigs) maiores são ordenadas entre si. O valor de N50 é dado ao comprimento do menor contig entre estes contigs maiores, na qual seu tamanho cobre metade do genoma (MÄKINEN; SALMELA; YLINEN, 2012).

de detectar anomalias genéticas como aneuploidias cromossômicas (CHIU et al., 2008).

2.4.1 A tecnologia do sequenciamento por síntese.

Em meados dos anos 90 na universidade de Cambridge (Reino Unido), dois cientistas observavam o movimento da DNA polimerase na replicação a nível molecular com o uso de nucleotídeos marcados com fluoróforos. Inspirados por seus antecessores como Frederick Sanger, Watson e Crick, os dois cientistas, Shankar Balasubramanian e David Klenerman, discutiam um método inovador no sequenciamento genético. Em 1998 surgia a Solexa com o sequenciamento por síntese (SBS) que se mostrava superior ao método de Sanger ao sequenciar seu primeiro genoma (bacteriófago phiX 174) com a geração de 3 milhões de bases em uma corrida (ILLUMINA, 2020).

Em 2007, a empresa Solexa foi adquirida pela Illumina que desde o primeiro lançamento do primeiro sequenciador (GA, Genome Analyzer), o qual gerava 1 Gb por corrida, a tecnologia de SBS se ramificou levando ao desenvolvimento de diversos equipamentos, como MiSeq e HiSeq (Idem, 2020). O SBS é dividido em etapas, como mostra a Figura 4 (após o isolamento do DNA ou síntese de DNA complementar), como preparação da biblioteca, amplificação da mesma em forma de pontes, sequenciamento e análises após o sequenciamento com o auxílio de ferramentas de bioinformática.

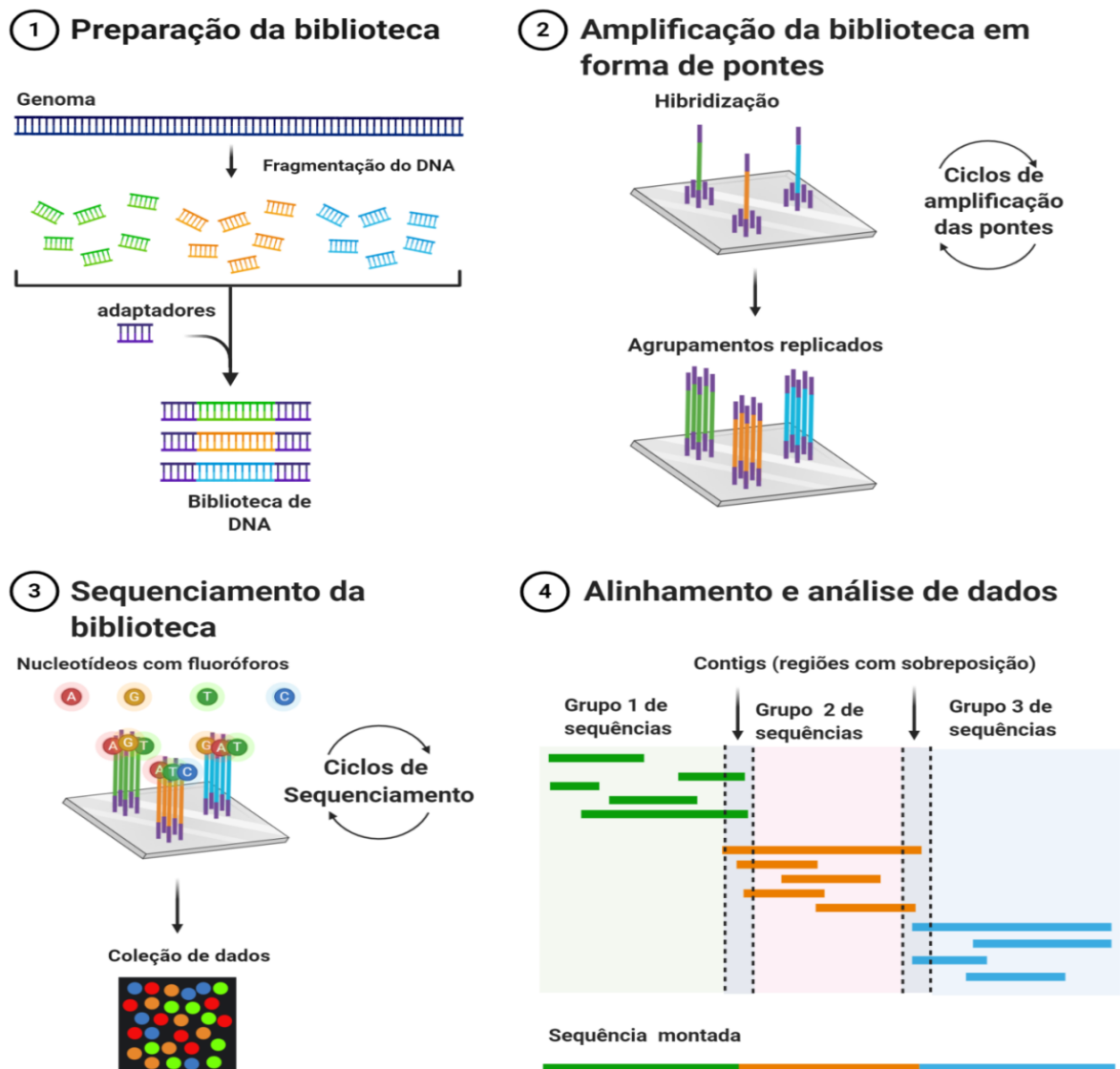
O método se inicia com a introdução das enzimas transposases que fragmentam aleatoriamente o DNA em 500 pb⁴ e adicionam adaptadores que irão se ligar a oligonucleotídeos inseridos na célula de fluxo (*flow cell*). Os adaptadores são constituídos de 3 segmentos: o primeiro são as sequências adaptadoras que irão se hibridizar com os oligonucleotídeos presente na célula sólida. O segundo são os índices para identificação da amostra de DNA (também conhecidos como *barcodes*), e por último, a sequência de bases que se liga aos *primers* (Id., 2020). Posteriormente ocorre a amplificação dos filamentos de DNA realizada pela DNA polimerase por amplificação em forma de ponte, formando agrupamentos de DNA no sentido frente e verso. No final tem se a formação de vários clones do DNA original.

⁴ pb é a abreviação para pares de bases.

O sequenciamento com a formação de vários clones e em sentido frente e verso (*paired-end*) ajudam na análise da qualidade dos dados (sequências) gerados (Id., 2020).

O sequenciamento se inicia com a adição de *primers* e dDNTPs fluorescentes. Uma característica do sequenciamento SBS é a reação por ciclos, isto quer dizer que em cada ciclo é apenas adicionado um nucleotídeo no filamento de DNA, onde é capturada uma imagem pelo detector que identifica cada nucleotídeo adicionado pela emissão de fluorescência específica. Os ciclos vão se repetindo com a lavagem dos nucleotídeos livres não adicionados até o último nucleotídeo ser adicionado pela DNA polimerase (Illumina, 2020). Os dados gerados com os milhões de sequências geradas são alinhadas por montadores e por similares entre aquelas são formados os contigs.

Figura 4- Sequenciamento de alto desempenho da Illumina



Fonte: Imagem elaborada pelo autor no site Bionder.com.

2.5 Clusters biossintéticos e metabólitos secundários

Os metabólitos secundários (MS) são moléculas de baixo peso molecular derivadas do metabolismo primário que diferentemente destes, não são essenciais para o desenvolvimento de bactérias, fungos e plantas, pois não compõem o esqueleto de moléculas básicas necessárias para o desenvolvimento do organismo em rotas metabólicas essenciais (THIRUMURUGAN et al., 2018). As rotas dos metabólitos secundários e primários estão conectadas através de intermediários, além do mais quando em situações de falta de fontes de carbono e nitrogênio, estas

moléculas servem como fonte alternativa de energia para a continuidade dos processos biológicos essenciais para a célula (THIRUMURUGAN et al., 2018).

Os MS têm grande importância em actinobactérias, principalmente na transição do micélio vegetativo para micélio aéreo em seu ciclo de vida, fase esta em que o microrganismo se encontra em condições extremas de recursos. Os MSs provêm substâncias que auxiliam na sobrevivência e adaptação ao ambiente como a produção de metabólitos com função de antibiose e resistência ao estresse (DEMAIN; FANG, 2000).

Os MS têm tido sua relevância desde a era de ouro dos antibióticos com a descoberta em massa destas substâncias com funções antimicrobianas. Atualmente, sua diversidade de utilidade se expandiu sendo utilizado na indústria com a produção de enzimas, na agricultura como biopesticidas e fatores de desenvolvimento de plantas (HARIR et al., 2018), além de outras aplicações na medicina com moléculas imunomodulatórias e antitumorais (THIRUMURUGAN et al., 2018).

Estas moléculas são formadas através de um complexo de genes agrupados, os clusters biossintéticos (BGCs) que conjuntamente são responsáveis na produção de enzimas como as policetídeo sintases, envolvidas na formação dos produtos naturais na rota metabólica. Não apenas são responsáveis pela transcrição de enzimas, como também, genes reguladores que modulam a sua produção (AIGLE; CORRE, 2012). Há ainda clusters não relacionados que colaboram mutuamente em uma rota metabólica do produto natural: os clusters híbridos (DU; SÁNCHEZ; SHEN, 2001).

Há uma grande diversidade de clusters biossintéticos descritos, sendo os principais: as sintases de peptídeos não ribossomais (NRPS), policetídeos sintases (PKS) tipo I, II e III, terpenos e sideróforos. Sendo que os policetídeos e os NRPS possuem em torno de 50% a 75% dos clusters do metabolismo secundário, sendo os maiores grupos de metabólitos das actinobactérias (NETT; IKEDA; MOORE, 2009).

2.5.1 Sintases de peptídeos não-ribossomais

As sintases de peptídeos não ribossomais (NRPS) é um complexo enzimático que forma peptídeos de baixo peso molecular que não passam pela etapa de

transcrição. São organizados em módulos, os quais são subdivididos em domínios. Os domínios são altamente seletivos e são responsáveis pela incorporação de apenas um aminoácido, enquanto que cada domínio é responsável por uma reação, sendo característica da reação em cadeia de aminoácidos, a linearidade da reação (WALSH, 2007). Portanto a ordem e quantidade de módulos existentes determinam o número e ordem de aminoácidos (BLOUOFF; SCHMEING, 2017).

A estrutura básica de um NRPS se baseia nos domínios de adenilação, transporte pela proteína PCP ou tiolação e condensação. Primeiramente o domínio de adenilação ativa o aminoácido em uma reação envolvendo ATP (trifosfato de adenosina) formando o substrato em amino acil-adenilato, uma proteína carregadora (PCP) (homóloga a proteína carregadora de acil responsável na síntese de ácidos graxos) capta o substrato de acil e então é modificada pela pantetenil transferase (PPTase), a qual contém um cofator com tiol que ao se ligar com o aminoácido forma um tio éster (MILLER; GULICK, 2016).

Por fim quatro proteínas PCPs transferem o aminoácido para o domínio de condensação que irá se ligar a um peptídeo em formação. A proteína transportadora permanece ligada ao aminoácido, portanto o domínio tioesterase C-terminal é responsável pela sua retirada e consequente liberação do peptídeo ao meio.

Há uma grande diversidade de peptídeos não ribossomais, e isso são decorridos pela utilização de mais de 500 substratos (BLOUOFF; SCHMEING, 2017), pelas múltiplas variações no processamento de destas moléculas e modificações pós-síntese (WALSH, 2001): vários domínios como epimerases, metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina adicionam novas moléculas ao peptídeo em formação (GULICK, 2017), assim como, variantes do domínio de condensação e redutases que propagam a formação de NRP modificadas (BLOUOFF; SCHMEING, 2017). As NRPS são responsáveis por substâncias de importância clínica como daptomicina e actinomicina D (FELNAGLE et al., 2008).

2.5.2 Sintases de policetídeos

Policetídeos são metabólitos produzidos por enzimas sintases de policetídeos (PKS), os quais se assemelham quanto ao mecanismo da enzima sintase de ácidos graxos (HARIR, 2018). São responsáveis pela produção de várias moléculas

bioativas: tetraciclina com função antibacteriana, doxorubicina com propriedades anticancerígenas, lovastatina e flavonoides com efeitos anticolesterol e anti-inflamatória, respectivamente (RISDIA; MOZEF; WINK, 2019). Estas enzimas têm estrutura básica em módulos: a aciltransferase (AT) realiza a ligação do substrato malonil-CoA ou acetil-CoA com a proteína transportadora de acil (ACP), depois a cetosintase catalisa a condensação do substrato formando o ceto-éster (RISDIA; MOZEF; WINK, 2019).

A ACP pode se direcionar em caminhos alternativos antes da finalização da molécula pela tioesterase, o módulo pode optar por enzimas que podem modificar a molécula como ações de cetoreduases que reduzem o intermediário como o uso de NADPH⁺, desidratação da molécula por uma desidratase, a qual retira o grupo OH, conseqüentemente há a formação de uma ligação dupla, a qual é retirada por uma redutase (RISDIA; MOZEF; WINK, 2019). Os policetídeos são divididos em três tipos: PKS do tipo I, II e III quanto ao modo de ação e estrutura.

Os policetídeos sintases do tipo I são divididos quanto ao modo de organização dos módulos e síntese dos produtos: iterativos e os não-iterativos. Os iterativos estão mais presentes em fungos, mas alguns estão sendo elucidados em bactérias (WANG et. al, 2020). Nos policetídeos não iterativos, cada módulo é responsável por ciclo no alongamento da cadeia do policetídeo, pela qual o processo não se repete em um mesmo módulo.

Os policetídeos sintases do tipo II são enzimas heterodímeras responsáveis pela produção de policetídeos aromáticos como a tetraciclina. Adicionalmente à sua produção, há a incorporação de enzimas ciclases e aromatasas para a aromatização da cadeia de policetídeos. Este tipo de PKS também se difere da PKS tipo I por ser monofuncional e que seu sistema funciona repetitivamente com o uso dos mesmos módulos para o alongamento da molécula cíclica.

Os policetídeos sintases do tipo III difere das outras, pois não utiliza a proteína ACP como ligante do substrato. Constrói a molécula através de enzimas homodímeras na ativação, extensão e ciclização em modo repetitivo (RISDIA; MOZEF; WINK, 2019).

2.5.3 Terpenos

Terpenos são produtos naturais conhecidos majoritariamente em plantas e fungos, mas também é conhecida sua produção em bactérias (YAMADA et al., 2015). A origem de seu nome vem de terebintina, um líquido obtido da resina de coníferas após a destilação. Podem ser classificados quanto ao grau de ciclização: acíclicos de cadeia aberta, mono ou bi-cíclicos (DEWICK, 2002). Quando oxidados ou após passarem por rearranjos do esqueleto de carbono são transformados em terpenóides, conhecidos também como isoprenóides.

Em bactérias, são conhecidos terpenóides como geosmina e albaflavenóides, lembrados pelo cheiro característico de terra molhada causada por sua volatilidade (YAMADA et al., 2015). Alguns terpenóides são importantes para o transporte de elétrons como a ubiquinona e biossíntese da parede celular (KUZUYAMA; SETO, 2012). A síntese de terpenos segue duas rotas: rota do mevalonato (MEV) e a rota do 2-C-metileritritol 4-fosfato (MEP) que diferem pelo uso de substrato e enzimas, assim como, a presença das vias em espécies, com o uso do MEV em plantas e fungos e das duas vias, como em actinobactérias (HELFRICH et al., 2019; KUZUYAMA; SETO, 2012).

A produção de terpenos pela via do mevalonato se inicia com a condensação de três moléculas de acetil-coenzima A (originada do piruvato da glicólise) em 3-hidróxi-3 metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Uma enzima redutase reduz a HMG-CoA a mevalonato, depois de reações seguidas de fosforilação e descarboxilação, uma enzima isomerase pode dar origem aos isômeros pirofosfato de isopentenilo (IPP) e difosfato de dimetilato (DMAPP) que dão origem a esqualenos, isoprenóides, álcoois e colesterol.

A via alternativa independente de mevalonato (MEP) se inicia com a condensação do piruvato com o gliceraldeído 3-fosfato com a formação de 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) realizada pela sintase de DXP. Uma enzima redutoisomerase catalisa a DXP e transforma no primeiro intermediário da rota metabólica: o MEP. Após consequentes reações, serão formados o IPP e DMAPP (KUZUYAMA; SETO, 2012).

2.5.4 Sideróforos

O ferro é um importante metal para a célula bacteriana, pois está presente em processos essenciais como no transporte de elétrons e produção de ATP (CHALLIS, 2005). Entretanto, a bactéria encontra dificuldades quanto a aderência do ferro do meio em suas rotas metabólicas, como visto em bactérias patogênicas tendo certas dificuldades em captar o ferro livre do organismo humano pela presença de lactoferrina e transferrina que permanecem ligado ao ferro (FINKELSTEIN; SCIORTINO; MCINTOSH, 1983).

Contudo, o patógeno desenvolve mecanismos para adquirir o ferro como a liberação de oxirredutases e permeases (FU et al., 2006), como também, a acidificação do meio. Outro importante mecanismo para bactérias e fungos (patogênicos ou não) é a biossíntese de agentes quelantes de ferro: os sideróforos (RAMAKRISHNAN, 2017).

A bactéria necessita de 10^{-6} mol (M) de ferro para seu crescimento, apesar de estar em uma concentração menor que requisitada para a bactéria (entre 10^{-8} e 10^{-9} M em pH neutro), o ferro fica em estado férrico Fe^{3+} , forma está que a bactéria não possui afinidade pela aderência em sua membrana. A bactéria contorna o problema com a liberação de sideróforos no meio, os quais têm uma grande afinidade por ferro férrico, capturando, por exemplo, em plantas e minerais do solo (HIDER; KONG, 2010).

O sideróforo é transportado por uma proteína transportadora da membrana periplasmática e quando chega ao citoplasma, o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} por uma redutase de ferro, o que faz com que o agente quelante perca a afinidade pelo ferro e este, portanto possa ser utilizado pela célula em suas rotas essenciais (CARROL; MOORE, 2018). Os sideróforos são produzidos por duas rotas metabólicas: a rota metabólica do NRPS (a qual já foi previamente descrita) e a rota independente de NRPS (NIS) (CHALLIS, 2005).

O NIS se inicia através da adenilização do ácido carboxílico como citrato, seguido da captura nucleofílica de grupos diamina ou alcanolamina, os quais são condensados por ligações amida ou éster para a formação de um intermediário citril que depois pode dá origem ao produto final como visto na biossíntese de aerobactina (CHALLIS, 2005).

Alguns produtos produzidos na via NRPS são vibriobactina (KEATING; MARSHALL; WALSH, 2000) e micobactina (QUADRI et al., 1998) e na via NIS além de aerobactina, rizobactina e desferrioxamina E (CHALLIS, 2005). Alguns estudos têm procurado um meio de inibir a produção de sideróforos como forma de impedir a proliferação de patógenos. Tais estratégias se aplicam na procura de compostos com outras atividades biológicas como o antifúngico flucitosina que inibiu a patogenicidade da *P. aeruginosa* ao inibir a síntese do sideróforo pioverdina (IMPERI et al., 2013), análogos de sideróforos (STIRRETT et al., 2008) e inibidores de enzimas responsáveis da biossíntese (LAMB, 2015).

2.6 O bioma Caatinga como fonte de microrganismos produtores de biomoléculas com potencial antimicrobiano

A Caatinga é um bioma brasileiro que ocupa 11% do território nacional, abrangendo dez estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais (região norte), Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (IBGE, 2019; IBGE, 2004). Em sua área em torno de 800 mil km, 46% sofre desmatamento devido a atividades ilegais do corte de árvores para fins industriais. Além dos 27 milhões de brasileiros que residem na região, o bioma abriga uma rica biodiversidade de espécies da fauna como também na flora (MMA, [2010-2020]). Entretanto, pouco é conhecido sobre a diversidade de microrganismos (CORRÊA, 2014)

O nome Caatinga tem origem no tupi-guarani que significa “mata-branca” em referência a cor esbranquiçada adquirida da vegetação devido ao tempo seco em que as plantas abdicam de suas folhas devido à desidratação excessiva (TABARELLI et al., 2018). O clima do bioma é o tropical semiárido (BSh), caracterizado por temperaturas médias em torno de 27 °C, forte insolação, e índices elevados de evaporação (GANEM, 2017).

A distribuição de chuvas da região mostra uma distribuição desigual de períodos secos com chuvas ocorrendo nos meses de novembro a janeiro na região oeste e sudoeste enquanto no norte e nordeste a ocorrência de chuva varia entre fevereiro e abril (PRADO, 2003). O índice de precipitação anual médio da região é inferior a 800 mm, variando em uma média de 1000 mm, nas regiões mais próximas do litoral e abaixo de 500 mm no interior, exceto em regiões montanhosas e serras,

onde se cria um microclima com precipitação de chuva elevada. Com a temperatura elevada integrado com a irregularidade da chuva, a Caatinga apresenta uma taxa anual de evaporação de 1000 mm, podendo chegar a 3.000 mm (PRADO, 2003). As hipóteses para o clima semiárido e sua baixa precipitação de chuva se baseiam no relevo com chuvas orográficas e a influência do oceano (GANEM, 2017).

A hidrografia da região é caracterizada por rios intermitentes, mas há exceções com os rios do São Francisco e Parnaíba, sendo um refúgio para a manutenção de espécies raras e endêmicas da região, assim como, essencial para a população local (GIULIETTI et al. 2004; GANEM, 2017).

A flora apresenta diversas adaptações à deficiência hídrica: plantas caducifólias, herbáceas, suculentas, presença de acúleos e espinhos, como também, predominância de arbustos e árvores de pequeno porte. Logo, a vegetação é dividida em tipos de vegetação que resultam da integração clima-solo: vegetação xerófila, caducifólia e subcaducifólia (GIULIETTI et al. 2004)

A vegetação heterogênea é influenciada por fatores climáticos com irregularidade de períodos alternados de chuva e seca com aparecimento de vegetação verdejante com árvores e com mais folhas no período de chuva e em locais com relevo como planaltos, onde há maior índice pluviométrico e o relevo com os planaltos que impedem as nuvens carregadas de se precipitar na região. Todavia, a região é lembrada pelas árvores tortas com seus troncos esbranquiçados, além do solo pobre devido não apenas ao período de seca, como também, ao processo de desertificação. O solo varia de aspecto pedregoso e pouco espesso com vegetação de cactáceas e pouca capacidade de retenção de água a solo arenoso, como também, solos de alta e baixa fertilidade (GANEM, 2017).

O Cariri paraibano está localizado no centro do Estado da Paraíba ocupando uma área de 12.262,3 km (aproximadamente 21% do território do Estado). Com seus 190.367 habitantes, a região faz parte da mesorregião da Borborema e é dividida geograficamente em duas microrregiões: Ocidental e Oriental com a existência de 31 municípios, entre eles, Cabaceiras e São João do Cariri. A temperatura do Cariri é, em média, acima de 24 °C e a precipitação de chuva na região é 500 mm com um período de seca de até 11 meses, com Cabaceiras, um dos municípios com as menores precipitações atinge um índice de 300 mm ao ano (BRASIL, 2011).

Com o crescimento da resistência microbiana e a falta de novos antibióticos no mercado, os cientistas têm se voltado a bioprospecção de novas bactérias em ambientes extremos. As actinobactérias estão presentes em vários ambientes, mas são predominantes no solo e resistem em regiões extremas de clima seco e baixa pluviosidade como a região semiárida da Caatinga. O gênero *Streptomyces* tem sido uma das maiores fontes de antibióticos e mostra principalmente, assim como, o filo Actinobactéria, uma capacidade de produção de novos metabólitos secundários com atividade bioativa. Assim como as plantas acredita-se que as actinobactérias residentes do semiárido brasileiro têm se adaptado a estas condições extremas e podem mostrar uma grande diversidade e novos mecanismos para a síntese de novos metabólitos (CORRÊA, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas têm mostrado o aumento de linhagens resistentes a antibióticos, gerando preocupação quanto a uma futura crise global da saúde (HARBARTH et al., 2015). A OMS em 2019 alertou em uma lista com três categorias de bactérias totalmente ou multirresistentes que seriam prioritárias ao desenvolvimento de novos fármacos. Entre elas se encontram as bactérias em situação crítica como *P. aeruginosa* resistentes a carbapenema e a família Enterobacteriaceae; em prioridade alta como *S. aureus* resistentes a meticilina e em situação média como bactérias da espécie *Enterococcus faecium* (OMS, 2019). Este crescimento é resultado de vários abusos quanto ao uso de antibióticos de maneira irresponsável na agropecuária, assim como, a falta do papel forte de governos no controle de prescrição de remédios e conscientização da população.

Após a explosão de classes de antibióticos descobertos por triagens e bioprospecção, as pesquisas em novos antibióticos passaram a declinar. Assim, muitas indústrias farmacêuticas antes empenhadas na descoberta de novos agentes antimicrobianos, começaram o processo de evacuação por razões como a alta recorrência de isolamento de moléculas já descritas, assim como, a queda no custo benefício em pesquisas de novos antibióticos de origem natural. Logo, muitas farmacêuticas tem se apoiado no desenvolvimento de análogos de antibióticos existentes. Contudo, devido ao crescimento descontrolado da resistência, os análogos de antibióticos produzidos sinteticamente passaram a ser ineficazes na contenção de infecções, levando a falta de opções no mercado e para o desenvolvimento de novos análogos (COATES; HU, 2007).

Com a descoberta de que apenas 1% da biodiversidade de microrganismos é conhecida (FUHRMAN; CAMPBELL, 1998; WARD; WELLER; BATESON, 1990), cientistas passaram a explorar novos ambientes, com foco em ambientes considerados extremos à vida como ambientes hipersalinos e termófilos. Acrescida ao ressurgimento da bioprospecção, novas abordagens passaram a auxiliar pesquisas de maneira esplendorosa como a identificação de bactérias produtoras de antibióticos através do sequenciamento de genoma e metagenomas em vários ambientes extremos. Como também, ferramentas da bioinformática com foco na mineração de genomas e quanto a métodos de desreplicação têm auxiliado as

pesquisas de maneira exitosa. A mineração de genomas com a descoberta de agrupamentos de genes silenciados ou pouco produzidos em condições laboratoriais mostrou a grande capacidade oculta de microrganismos na produção de metabólitos secundários, além da capacidade que métodos analíticos físico-químicos podem estimar. A desreplicação tem ajudado na redução do tempo desperdiçado quanto a identificação de compostos já elucidados. Assim como abordagens genômicas, estes métodos servem como guia para a identificação de novas moléculas.

Em ambientes considerados extremos, há uma grande possibilidade de identificação de novas espécies produtores de novas moléculas com atividade funcionais. Neste quesito, as actinobactérias, pelo seu histórico, continuam sendo a maior fonte de antibióticos e abrem possibilidades para novos achados a partir da diversidade de seu maquinário enzimático em produzir novos metabólitos. A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e apresenta uma rica diversidade de fauna, flora e microrganismos ainda pouco estudados. As actinobactérias habitantes deste ambiente extremo de altas temperaturas e escassez hídrica podem apresentar novas moléculas, possibilitando a humanidade um novo arsenal para o combate frente a patógenos resistentes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Sequenciar, montar e anotar o genoma da linhagem I339 de *Streptomyces galbus*, uma actinobactéria isolada do semiárido paraibano.

4.2 Objetivos específicos

- I) Cultivar o isolado em diferentes meios de cultura;
- II) Caracterizar morfológicamente o isolado;
- III) Isolar o DNA da linhagem bacteriana;
- IV) Sequenciar o genoma bacteriano e realizar a montagem, anotação e identificação da espécie;
- V) Elucidar os metabólitos secundários produzidos pelo isolado;
- VI) Caracterizar os metabólitos por métodos cromatográficos e espectrofotométricos.

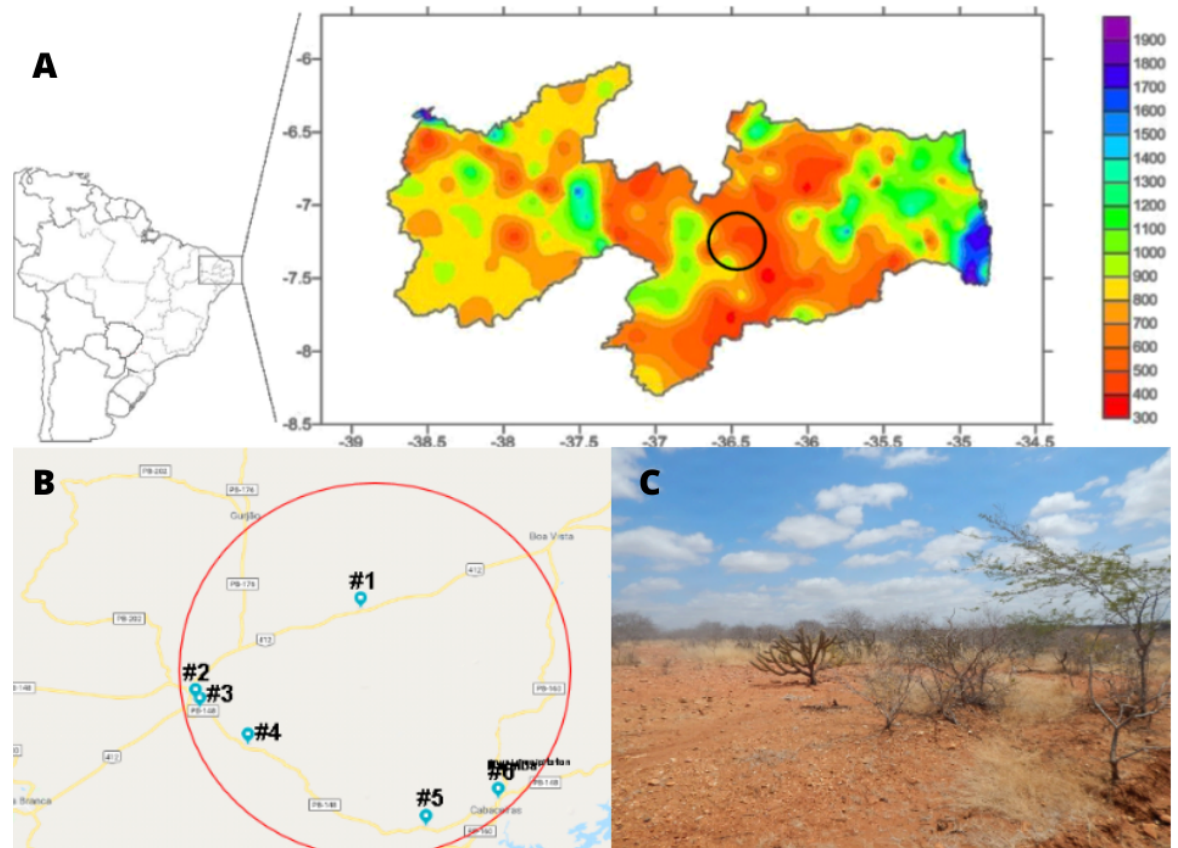
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Linhagem bacteriana

O isolado I339 é um isolado de Actinobacteria do semiárido paraibano (Cariri). O local escolhido pelo grupo de pesquisa para o isolamento da linhagem foi baseado segundo o mapa de precipitação anual de chuva no estado da Paraíba. Na Figura 5, podemos visualizar o local de coleta da amostra (ponto de coleta #5 no município de Cabaceiras). O isolado I339 se encontra no laboratório de microrganismos/Centro de Biotecnologia localizado na Universidade Federal da Paraíba e foi utilizado para a realização dos experimentos. O microorganismo foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código A9E11C6.

O isolado denominado I339 apresentou uma notável atividade antimicrobiana, sendo ativa contra espécies de *Mycolicibacterium smegmatis* (anteriormente *Mycobacterium smegmatis*, uma micobactéria de crescimento rápido) e *Mycobacterium tuberculosis* (bactérias álcool-ácido resistentes, BAAR), bem como, para bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e na bactéria Gram-positiva *S. aureus*. O isolado não apenas apresentou atividade antibacteriana como também mostrou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e atividade antitumoral tanto em células do tipo HeLa (adenocarcinoma cervical humano), nas linhagens celulares MDA, MCF7 (câncer de mama humano), 4T1 (câncer de mama murino) e na linhagem K569 (leucemia mielóide crônica humana) (Cibulski et al. 2020, no prelo).

Figura 5- Local da coleta do isolado I339.



Fonte: Autoral. Imagem A: Mapa de precipitação anual do estado da Paraíba. A região marcada mostra o ponto de coleta da amostra de solo onde foi recuperado o isolado I339. Imagem B: Ponto de coleta do isolado, marcado com “#5” localizado no município de Cabaceiras/PB. Imagem C: fotografia do local de coleta da amostra de solo.

5.2 Crescimento e caracterização fenotípica do isolado I339

Para caracterização fenotípica do isolado foram realizadas as técnicas de coloração de Gram (GRAM, 1884) e com azul de metileno. A linhagem foi cultivada em meio MMD líquido (meio mínimo desbalanceado) acrescido de 1% de glicose em erlenmeyers e em estado semi-sólido em placas de Petri com ágar (1,5%). A bactéria também foi cultivada em ágar-solo. A temperatura de crescimento foi de 30 ou 37 °C. Após seu crescimento nos meios MMD (líquido e sólido) e em ágar-solo, as colônias foram visualizadas por microscopia óptica após coloração.

O meio em ágar-solo foi preparado a partir de 400 g de solo dissolvido em 1L de água da torneira. Posteriormente a mistura foi autoclavado durante 1 hora, decantado, filtrado e autoclavado novamente por 20 minutos. Assim foi obtido um

extrato de solo, onde foram adicionados 15 g de ágar a 1L de extrato. A composição do meio MMD se encontra na Tabela 1.

Tabela 1- Composição do meio de cultivo MMD- glicose (1%).

Composição MMD-glicose	Concentração (g/L)
Na ₂ HPO ₄	3,54
K ₂ HPO ₄	1,50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Citrato Férrico Amoniacal	0,06
Fonte de carbono (glicose)	10
Solução-traço	1 mL

Fonte: Adaptada de (RAMSAY et al.,1990). A solução estoque de elementos-traço é composta por H₃BO₃ (0,30 g/L), CoCl₂· 6H₂O (0,20 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0,10 g/L), MnCl₂·4H₂O (0,03 g/L), NaMoO₄·2H₂O (0,03 g/L), NiCl₂·6H₂O (0,02 g/L), CuSO₄·5H₂O (0,01 g/L) e água destilada autoclavada (1000 mL).

5.3 Isolamento de DNA.

O isolado I339 foi cultivado em meio MMD líquido em tubos cônicos de 15 mL na temperatura constante de 30 °C e agitado (em agitador orbital) a 200 rpm durante 3 dias. Após isso, as bactérias foram recuperadas por centrifugação (5000 x g por 15 min). O pellet contendo a bactéria foi congelado e utilizado para o isolamento do DNA. O DNA do isolado I339 foi extraído utilizando o kit Qiagen-Power soil, de acordo com as orientações do fabricante. O processo é baseado em lise mecânica, onde a amostra é colocada em um microtubo contendo beads (fragmentos de metal e vidro que auxilia na fragmentação das células) e por lise química com adição de solução C1 contendo agentes tensoativos como o dodecil sulfato de sódio (SDS). Para ajudar na homogeneização e lise celular, o tubo foi agitado por 10 minutos em um agitador orbital. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 s a 10,000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi translocado para um novo microtubo, ao qual foi adicionada uma solução (C2) que precipita componentes orgânicos e inorgânicos (exceto ácidos nucleicos) como proteínas e restos celulares. O tubo foi centrifugado por um minuto a 100,00 x g e o sobrenadante transferido a um novo tubo, a qual foi

adicionada uma nova solução (C3) foi adicionada para remoção de restos proteicos. Posteriormente, o DNA foi precipitado (com a adição da solução hipersaturada de sais caotrópicos C4) e a solução foi transferida para um tubo contendo uma membrana de filtragem (MB *spin column*). Dessa forma, o DNA se liga a membrana, enquanto que contaminantes como proteínas passam pelo filtro. Por fim, uma solução de lavagem contendo etanol (solução C5) passa pela membrana para a remoção de sais e contaminantes residuais, permitindo apenas a retenção do DNA. Ademais, o tubo foi centrifugado para retirada da solução C5 restante na membrana. O tubo MB *spin Column* foi conectado a um microtubo e adicionado um tampão de eluição (solução C6 contendo 10mM de Tris-HCl, pH 8.5), o qual eluiu o DNA da membrana e transferiu para um microtubo. Por fim, o DNA foi armazenado em uma temperatura a -80°C até o momento da construção das bibliotecas de DNA.

A análise de pureza do DNA foi verificada por espectrofotometria (Nanodrop). A análise da purificação de DNA é dada pela razão de absorbância A_{260}/A_{280} , na qual o DNA absorve o comprimento de luz a um valor absorbância de 260 nm. Uma razão de acima de 1,8 a 2,0 indica que o DNA está purificado sem contaminantes. Infelizmente o método de absorbância por ultravioleta em 260 nm capta não apenas DNA, como também proteínas e nucleotídeos livres. A quantificação DNA foi verificada por fluorimetria (Qubit). A fluorimetria tem uma maior especificidade e acuraria por utilizar fluoróforos que se ligam apenas à molécula de interesse, neste caso, o DNA, e então emitem uma fluorescência que é captada, a intensidade de fluorescência é relacionada com a quantidade de DNA. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese de gel de agarose a 1%.

5.4 Montagem da biblioteca de DNA

Para a preparação da biblioteca de DNA foi utilizado o kit Nextera XT, de acordo com as instruções do fabricante. O método se baseia na fragmentação do genoma pela adição de transposases que após o corte adicionam marcadores aos fragmentos. Em seguida, se realizou uma PCR com primers que pareiam com as sequências marcadoras adicionadas pelas transposases e adicionou ao genoma, sequências indexadoras 1 (i7) e 2 (i5), os quais funcionam como identificadores no sequenciamento por síntese realizado na plataforma Illumina MiSeq. Depois de realizada a amplificação, os fragmentos foram purificados com o uso de beads

magnéticas recobertas com sílica. Depois da checagem da qualidade por eletroforese capilar e rendimento por fluorimetria, a biblioteca de DNA foi diluída e seguiu para o sequenciamento de alto desempenho.

5.5 Sequenciamento de alto desempenho

O sequenciamento genômico foi realizado na plataforma Illumina, no equipamento Illumina MiSeq System da Universidade Federal da Paraíba no Centro de Ciências Agrárias (Areia/PB). A biblioteca de DNA foi diluída a uma concentração de 4 nM com Tris 10 mM e em seguida, desnaturada com 0,2 N de NaOH em temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Após, os fragmentos de DNA desnaturados foram novamente diluídos em solução desnaturante contendo dimetilformamida e adicionados ao cartucho de sequenciamento. Utilizou-se um cartucho com capacidade de sequenciar fragmentos de 500 nucleotídeos (nt) no sistema *paired-end* (2x250 nt).

5.6 Análise da qualidade e filtragem das sequências

As sequências geradas pelo sequenciamento da amostra do isolado I339 foram aportadas no servidor PATRIC e BaseSpace Illumina para análises dos dados gerados pelo MiSeq. A análise da qualidade das sequências foi feita pelo software FastQ (ANDREWS, 2010), posteriormente elas foram submetidas ao programa FastQ toolkit (disponível em: <https://www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastq-toolkit.html>) para uma filtragem de sequências pequenas que estivessem abaixo da qualidade ($Q < 20$). A análise qualitativa das sequências pelo programa FastQ é baseada pelo índice Phred, um software que auxiliou o sequenciamento automatizado no projeto Genoma Humano na etapa de nomeação de bases (EWING et al., 1998). O programa mede a probabilidade de uma base nucleotídica estar incorreta em uma determinada posição. A fórmula mostrada abaixo é utilizada para o cálculo das bases nomeadas $Q = -10 \cdot \log_{10} p$, onde Q é a pontuação da qualidade da base e p é a probabilidade de tal base nomeada estar incorreta. A Tabela 2 ajuda na interpretação dos resultados.

Tabela 2- Índice de pontuação Phred.

Pontuação de Qualidade (Q)	Probabilidade de base incorreta	Acurácia na nomeação de bases
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%
40	1 em 10.000	99,99%

Fonte: Adaptada de (EWING; GREEN, 1998; ILLUMINA, 2011).

No sequenciamento SBS, uma pontuação de qualidade é atribuída a cada base nomeada presente em um aglomerado de clones amplificados. Dois passos são seguidos para que se chegue até a pontuação. Primeiramente, valores de predição de qualidade são atribuídos a base, tais como, perfil de intensidade e razão sinal/ruído para então seguir-se ao segundo passo: a montagem de um modelo de qualidade ou tabela de qualidade, onde relaciona os valores de predição com a pontuação de qualidade.

5.7 Montagem do genoma do isolado I339

A partir das sequências filtradas pelo FastQ toolkit, seguiu-se para a montagem do genoma. A montagem das sequências em contigs foi realizada no servidor PATRIC com a utilização de 5 montadores: SPAdes (modo fullSPAdes) (BANKEVICH et al., 2012), Kiki (UCHICAGO, acesso em: 20/07/2020), Megahit (LI D. et al., 2015) Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008) e plasmidSPAdes (modo default, com o objetivo de identificar sequências de DNA plasmidial) (BANKEVICH et al., 2012).

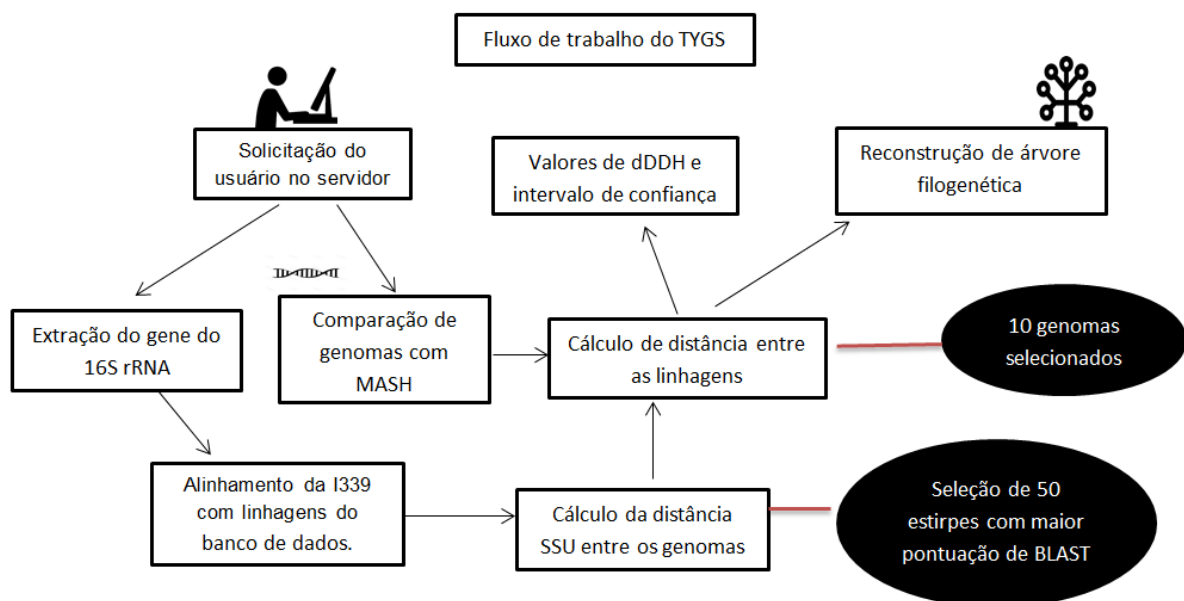
Como resultado, as sequências foram transformadas em contigs, fragmentos utilizados para a montagem final do genoma do isolado. A finalização da montagem do genoma foi realizada no software Geneious Prime versão 2020.5, onde foram gerados contigs com sobreposição para a posterior edição manual de nucleotídeos. A correção foi baseada nos seguintes parâmetros: qualidade do sequenciamento da base nucleotídica, posição do nucleotídeo na sequência (bases nas extremidades remetem a baixa qualidade de sequenciamento) e cobertura de sequenciamento.

Após a finalização do genoma, as sequências (*reads*) foram mapeadas contra os contigs montados para o cálculo de cobertura verificação de possíveis erros de montagem (*misassemblies*).

5.8 Identificação da espécie bacteriana

A identificação do isolado I339 foi realizada no servidor TYGS (Type Genome Server) (MEIER-KOLTHOFF e GÖKER, 2019). O genoma foi submetido ao servidor, onde foi armazenado em sua base de dados. Após isso, o servidor seguiu um fluxograma de programas independentes que classificou a espécie e montou um árvore filogenética relacionando o isolado I339 com seus parentes próximos.

Figura 6- Fluxograma do processo do TYGS



Fonte: Elaborada pelo autor. dDDH: predição in silico de hibridização DNA:DNA digital, SSU: pequena subunidade ribossomal.

Na etapa seguinte, envolve dois passos: o primeiro está relacionado a captura de genomas de espécies relacionadas com o genoma do usuário através do algoritmo MASH (ONDOV et al., 2016), onde é calculado a distância entre as espécies, aquelas com as menores distâncias foram escolhidas. O segundo passo envolveu o serviço rDNA extractor que extrai a sequência 16S rRNA do genoma do usuário através do programa RNAmmer (LAGESEN et al., 2007).

Em seguida, o serviço Pairwise SSU BLASter realizou o alinhamento da sequência 16S rRNA do usuário com as sequências do banco de dados através da corrida do NCBI BLAST⁺ (CAMACHO et al., 2009). As 50 espécies com as maiores pontuações do BLAST foram selecionadas para o cálculo da distância do GBDP (Genome Blast Distance Phylogeny).

O serviço SSU distance calculator calcula a distância GBDP entre as sequências selecionadas da lista. Neste processo, o GBDP utilizou a fórmula d5 (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013) para seleção das 10 estirpes com as menores distâncias entre a sequência do genoma do usuário e os genomas do banco de dados, validando seus resultados com 100 *bootstraps*. Esta lista com as 10 estirpes foi utilizada para o cálculo de dDDH com o serviço dDDH calculator através do programa Genome Distance calculator.

Caso o genoma da linhagem do usuário comparado com um genoma do banco de dados obtivesse um limiar igual ou acima de 70%, estes seriam considerados como espécies relacionadas, em contrapartida, aquelas abaixo do limiar seriam consideradas distintas, quanto a subespécie este limiar seria de 79%. Com o *bootstrap* realizado pelo GBDP, onde os resultados são replicados 100 vezes, pode-se inferir um intervalo de confiança para os resultados de dDDH.

Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o serviço Tree builder, onde foi inferido a filogenia pelo método evolução mínima com o programa FastME versão 2.1.4 (LEFORT; DESPER; GASCUEL, 2015), onde disponibiliza a árvore do genoma completo e da sequência 16S com o cálculo de valores σ para a relação entre semelhança de uma matriz de distância, além de um suporte para os ramos. Quanto menor o valor σ , maior a semelhança entre as espécies relacionadas (HOLLAND et al., 2002).

Posteriormente as espécies correlacionadas foram comparadas com o cálculo de ANI (média de identidade de nucleotídeos) utilizando o OrthoANlu (média da identidade de nucleotídeos ortólogos), no site da EzBioCloud (YOON et al., 2017). O OrthoANlu (LEE et al., 2015) fragmenta os dois genomas submetidos em sequências de 1020 pb e descarta aquelas com fragmentos abaixo do corte.

Em seguida, o algoritmo busca com a comparação entre os fragmentos, as sequências homólogas com o uso do USEARCH (EDGAR et al., 2010) um programa para alinhamento de sequências com a procura de sequências com homologias.

Então a média é calculada, sendo que um valor de 95% se admite que os dois genomas pertençam a mesma espécie (GORIS et al,2007). O OrthoANIu difere dos seus antecessores pela correção nas discrepâncias nos valores de ANI, que se mostravam diferente de acordo com a sequência de entrada escolhida, assim como, o algoritmo em relação a maioria dos antecessores apresenta um menor tempo de processamento para a entrega do resultado (YOON et al.,2017).

5.9 Anotação do genoma do *Streptomyces galbus* linhagem I339

A anotação foi realizada no servidor do Centro integrado de pesquisas de patossistemas (PATRIC) (disponível em <http://www.patricbrc.org>, acesso em 15/07/2020) com o auxílio da ferramenta de análise RASTtk (BRETTIN et al., 2015).

5.10 Análise de clusters biossintéticos (BGCs) do *Streptomyces galbus* linhagem I339

A análise de metabólitos secundários com função biológica foi realizada no programa antiSMASH versão 5.0 (BLIN et al., 2019) (*relaxed mode*), o qual detecta clusters bem definidos com todas as regiões funcionais e característicos e clusters parciais, os quais possuem um ou mais regiões funcionais em falta. Além deste, o NP.searcher (LI et al., 2009) também foi utilizado (*default mode*).

O programa antiSMASH se baseia na procura de sequências de enzimas conservadas pelo método dos modelos ocultos de Markov (HMM) em um banco de dados. Quando encontrado uma sequência no genoma que codifica um domínio, por exemplo, de uma proteína é um indicativo para um candidato a protocuster. O programa utiliza regras pré-definidas para definir protocusters na região como, por exemplo, a procura por sequências que codifiquem domínios AT e KS de sintase de policetídeos do tipo I, caso encontrado a sequência é indicada a ser cluster biossintético para T1PKS. A análise se aprofunda com a análise na vizinhança (montante e jusante) daquela região codificadora, pela procura de promotores e sequências de terminação. Depois são analisadas sobreposições e realizados cortes.

Uma observação a ser feita é que pode haver mais de um tipo de cluster predito em uma região, assim como, para a síntese em sequência de uma rota biossintética de um produto pode envolver mais de um cluster. Logo o antiSMASH

notaria a presença final de dois protoclusters. O programa classifica os protocluster em 4 tipos de candidatos: I) híbrido químico, II) intercalado, III) vizinhança e IV) único.

O híbrido químico são protoclusters identificados na região que compartilham genes ou seus produtos e sequências codificadoras. O intercalado são protoclusters que não compartilham sequências codificadoras, mas se situam na mesma posição quanto aos seus núcleos. A vizinhança é a forma mais fraca dos híbridos, pois leva em conta a vizinhança do protocluster (núcleo), podendo um candidato pertencer a outro tipo. O candidato tipo único (*single*) é indicado apenas quando um tipo de protocluster é encontrado na região. Os cluster resultantes da predição são comparados com clusters no banco de dados MIBiG (MEDEMA et al., 2015).

5.10 Comparação entre espécies do grupo filogenético do isolado I339

A relação entre as *S. galbus* I339 e *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* DSM 41677 foi realizada por comparações entre os genomas pelo programa BRIG (ALIKHAN et al., 2011), o qual comparou os genomas das linhagens com o genoma referência (*S. galbus* I339) com o alinhamento através do BLAST versão 2.2.31(MCGINNIS; MADDEN, 2004).

Quanto a verificação de clusters biossintéticos e metabólitos secundários mútuos entre as linhagens foi realizado com o auxílio do antiSMASH versão 5.0 (*relaxed mode*). Ademais, os genomas das linhagens foram enviados ao servidor PATRIC para anotação pelo RASTk que mostrou as características do genoma como tamanho dos genomas, conteúdo GC, predição e anotação de genes, assim como, a comparação de genes de resistência a antimicrobianos.

5.11 Análise de metabólitos secundários por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

O isolado I339 foi cultivado em meio MMD líquido a 1% de glicose em erlenmeyers no agitador orbital. Decorridos sete dias, o meio de cultura contendo metabólitos foi separado da massa celular através de centrifugação (3000 x g) por 20 minutos. Após a separação, o sobrenadante contendo os metabólitos foi colocado

em um funil separador de 2 L. Com o auxílio de uma proveta, foram adicionados 250 mL de acetato de etila ao funil, posteriormente foi agitado por 1 minuto. Após 10 minutos, a fração orgânica foi retirada e colocado em um frasco. O processo de extração líquido-líquido se repetiu novamente contabilizando um total de 3 ciclos. Após a extração, a fase orgânica (acetato de etila) foi evaporada sob baixa pressão (rotaevaporador). O pellet resultante foi ressuscitado em um volume de 5 mL de acetato de etila e novamente evaporado (a temperatura ambiente) e armazenado em frasco âmbar. Posteriormente, parte do extrato foi pesado, solubilizado em acetato de etila e injetado no cromatógrafo (a uma concentração de 2 mg/mL).

A análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada em parceria com o laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba. A detecção foi feita em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas da marca Shimadzu com uma coluna da marca RTX-5MS capilar (contendo 5% difenil e 95% de dimetil polissiloxano). Os perfis de clivagem dos compostos da cromatografia foram comparados três bancos de dados: NIST2008 (PRZYBOCKI et al., 2010) NIST2008+Shimadzu e FFNSC 1.3, os quais reportaram as moléculas com maiores similaridades.

A técnica de cromatografia gasosa se baseia na volatilização das moléculas de baixo peso molecular contidas na amostra, as quais são carregadas por um gás de arraste (fase móvel) em uma coluna (fase estacionária). As moléculas com menor afinidade pela fase estacionária terão um tempo de retenção menor passando mais rapidamente pela coluna e sendo inseridas diretamente ao espectrômetro de massas que ioniza os compostos, posteriormente separando pela sua razão carga/massa através de um campo magnético. Então a molécula pode ser detectada pelo detector de íons e gerar um cromatograma para análise de compostos novos ou já conhecidos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009).

5.12 Análises de metabólitos secundários por ionização por *electrospray* e espectrometria de massas (ESI-ToF-MS)

O extrato (como descrito no item 5.11) foi ressuscitado em metanol (concentração de 200 ng/mL) e injetado no sistema de ESI-ToF-MS (YAMASHITA;

FENN, 1984), onde o analito, ao passar por um capilar metálico foi ionizado por uma voltagem em modo positivo. Consequentemente, o analito sai em forma de partículas de gota junto ao solvente, um gás de dessolvatação (N_2) que retira o solvente do íon, de modo que haja uma repulsa entre as cargas positivas e quebra da coesão entre as moléculas solubilizadas. Neste momento, íons positivos saem da gota e partem para analisador de massas, neste caso, o analisador utilizado foi o do tipo tempo de voo (ToF) (WOLFF; STEPHENS, 1953), onde os íons foram acelerados por um potencial repulsivo chegando ao detector. O tempo de voo se baseia na separação dos íons de acordo com sua razão carga/massa (m/z) de maneira que íons mais pesados demoram mais tempo para chegar ao detector.

Adicionalmente, é introduzido um reflectron que por meio de potencial elétrico consegue corrigir distorções dos íons (devido a energia cinética, dispersão e posição dos íons na corrida), de maneira que íons com a mesma m/z que se encontravam dispersos, cheguem ao mesmo tempo no detector obtendo-se uma melhor resolução na análise. Este tipo de cromatografia é utilizado para detecção de moléculas de maior peso molecular (1.000 Daltons ou mais), em moléculas polares e consegue detectar analitos em baixa concentração (LANÇAS, 2009). A análise de ESI-ToF-MS foi realizada em parceria com o laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba.

6 RESULTADOS

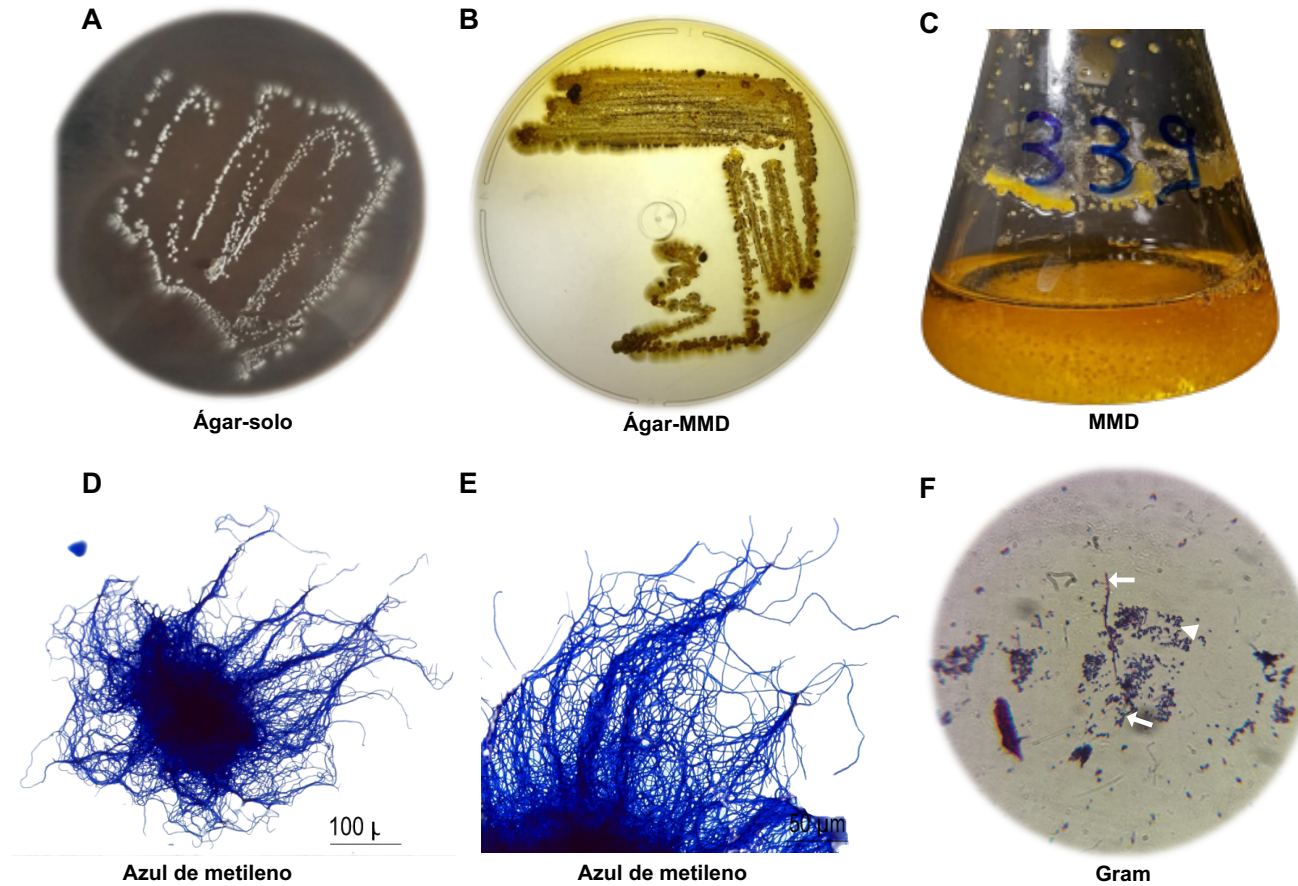
6.1 Caracterização fenotípica do isolado I339

A bactéria linhagem I339 apresentou um crescimento exuberante em ágar-solo em temperatura de 37 °C bem como a 30 °C (Figura 1A). Após 24 horas da inoculação foi notado um crescimento lento com a presença de algumas colônias isoladas. Depois de cinco dias as colônias de bactérias iniciaram o processo de esporulação gerando esporos altamente hidrofóbicos e de aspecto pulverulento.

No ágar-MMD, o crescimento da bactéria foi mais lento (quando comparado com o crescimento em ágar-solo), com o aparecimento de colônias 48 horas após a inoculação, as quais adquiram pigmentação amarelo-acastanhada, com a difusão de pigmentos de cor amarelada no meio (Figura 7B). Em relação ao crescimento em MMD-líquido, o isolado apresentou um crescimento inexpressivo nos primeiros dois dias. Depois de dois dias era possível analisar a presença de micélios e a presença tímida de pigmentação no líquido. No quarto dia foi verificado o aumento da presença de pigmentos solúveis que tomou todo o líquido do meio (antes incolor) que se transformou em um líquido amarelo com tonalidade forte (Figura 7C).

Na Figura 7D e 7E pode-se ver o micélio do isolado (corado com azul de metileno) em forma ramificada, com a presença de longas hifas dispersas e com aspecto flexível, com algumas formando um emaranhado. A identificação inicial pelo método de Gram, o isolado pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas (Figura 7F), característica comum de actinobactérias.

Figura 7- Características fenotípicas do isolado I339.



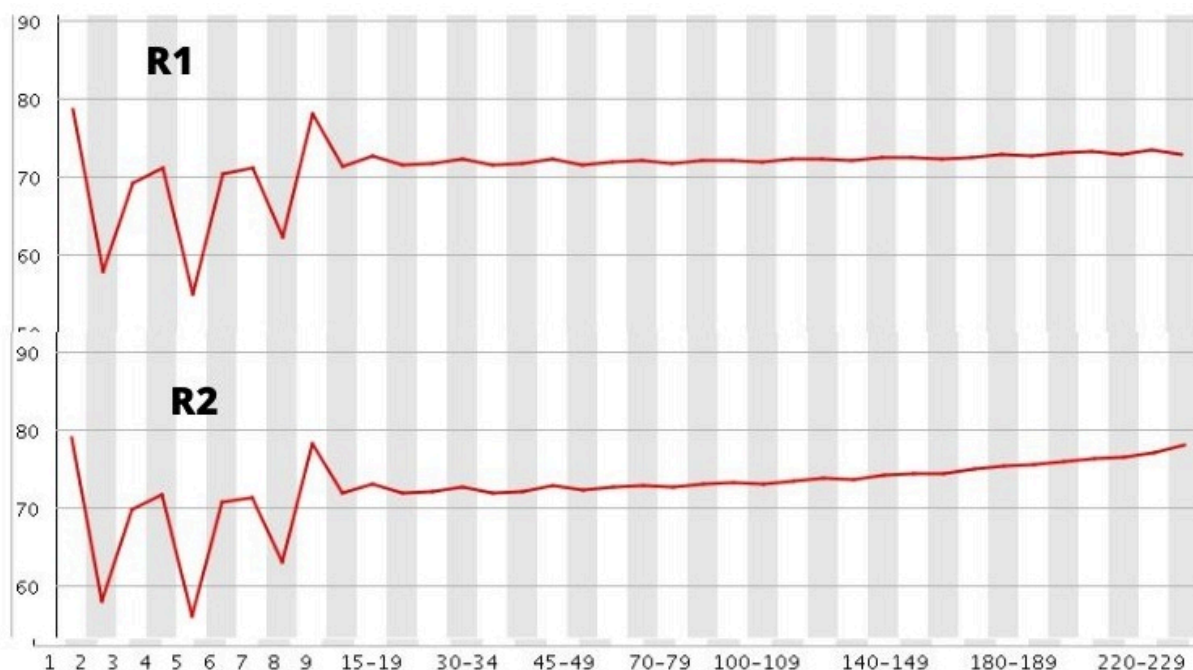
Fonte: Autoral. (A) Crescimento do isolado em meio ágar solo. (B) Crescimento do isolado em ágar-MMD. (C) Crescimento do isolado MMD líquido. (D) (E) Morfologia do isolado em meio líquido (coloração de azul de metileno). (F) Caracterização do isolado pelo método de Gram; a seta em branco aponta para uma hifa do isolado enquanto a cabeça de seta mostra os esporos.

6.2 Caracterização genômica do isolado I339

6.2.1 Análise da qualidade e filtragem das sequências

Ao todo foram geradas 1 460 104 sequências no HTS/SBS realizado na plataforma Illumina, sendo 730.052 sequências geradas em cada sentido, verso e reverso (R1 e R2, respectivamente). A média de GC% foi de 72% para a R1 e 73% para a R2, tendo para ambas no início uma variação de cristas e vales (Figura 8). Quanto à quantidade de Ns (base não nomeada) não houve variação perceptiva em porcentagem, permanecendo em 0% ao longo das bases para ambos os sentidos.

Figura 8- Conteúdo GC das sequências.



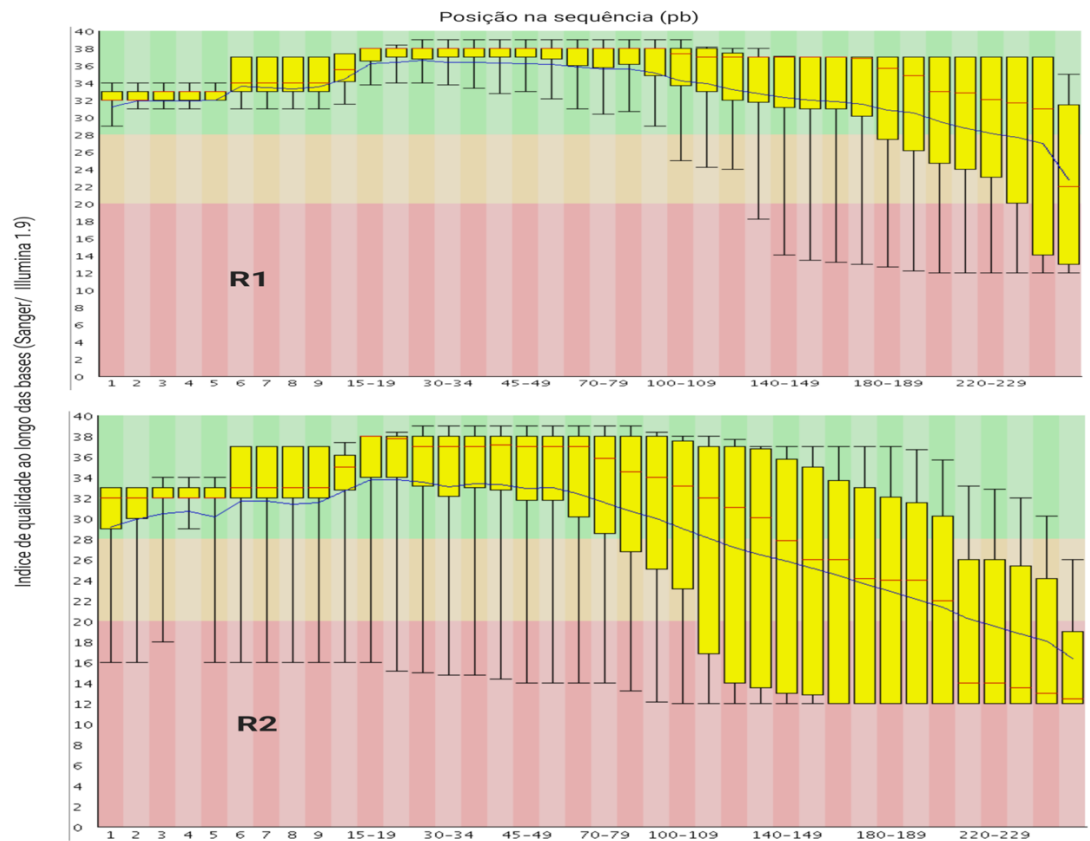
Fonte: Autoral.

O sequenciamento de alto desempenho gerou fragmentos de sequências com tamanhos de 35 a 251 nucleotídeos. Como visto na Figura 9, na linha abscissa (posição na sequência em pb), a análise se inicia em cada base nucleotídica e ao decorrer do eixo X, a avaliação passa a ser em conjuntos de bases nucleotídicas na sequência.

A média de qualidade das bases nucleotídicas na sequência mostraram alta qualidade de sequenciamento, estando em sua maioria acima de um Q=30,

decaindo no final nos nucleotídeos das extremidades da sequência. No sentido reverso R2 (Figura 9), nota-se um decaimento acentuado na qualidade presente no final da sequência.

Figura 9- Índice de qualidade das sequências.

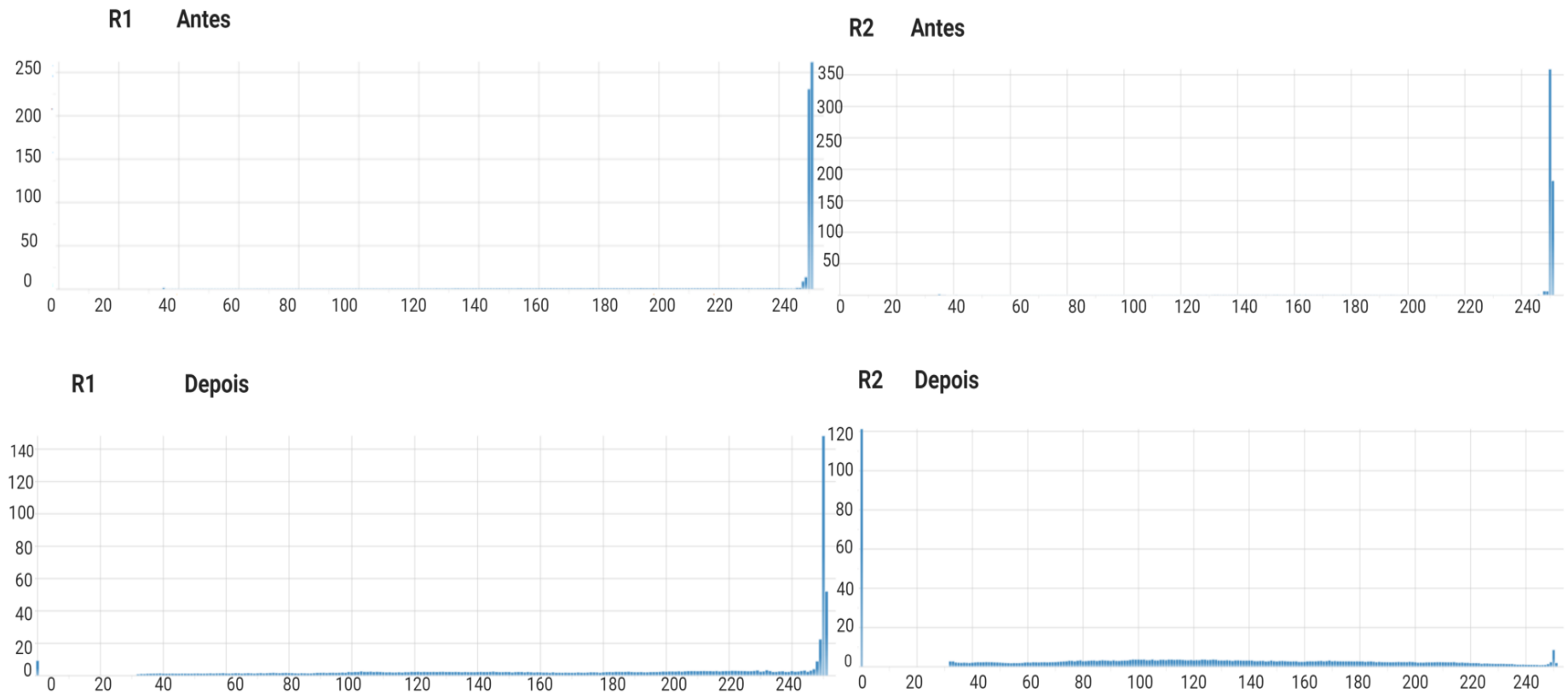


Fonte: Autoral.

As 730 052 sequências (*reads*) no sentido R1 foram filtradas e após o corte de sequências com qualidade baixa, percebeu-se uma diminuição da quantidade de sequências concentradas em tamanhos de 250 pb, decaindo em 3,13% em relação ao total de sequências após a filtragem. Em R2, vê-se uma concentração muito grande do número de sequências em tamanho de sequência a 251, porém após a filtragem vê-se uma distribuição maior do restante (585 277 sequências) entre tamanhos de 30 a 250 pb (Figura 10).

Como mostrado na Tabela 3, ambas as sequências e bases do R2 obtiveram um corte mais aprofundado em relação aos do R1, com o número de bases de R2 decaindo para mais da metade e com a retirada de 18,46% das suas sequências.

Isto é esperado como visto na Figura 9, pela queda na qualidade final em sequências de tamanho médio de 250 pb.

Figura 10- Filtragem das seqüências da I339.

Fonte: Autoral. As seqüências (em mil pares de bases), em sentido vertical (ordenada), enquanto a abscissa representa o comprimento da seqüência (pb).

Tabela 3- Resultado da filtragem das sequências.

	Antes da filtragem	Depois da filtragem
Número de sequências (R1)	730.052	707.219 (96.87%)
Número de sequências (R2)	730.052	595.277 (81.54%)
Número de bases (R1)	162.639.805	130.599.279 (80.30%)
Número de bases (R2)	164.348.842	80.695.253 (49.10%)

Fonte: Autoral.

6.2.2 Montagem *de novo* do genoma do isolado I339

Ao todo foram utilizados 5 softwares para montagem do genoma, na qual o programa SPAdes (modo fullSPAdes) apresentou o melhor resultado quanto ao número de contigs (1.068) e maior N50 (13.804). Apesar de o montador plasmidSPAdes detectar um número de contigs de 26, não mostrou a presença de DNA plasmidial. As estatísticas básicas da montagem do genoma da I339 são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4- Estatísticas da montagem do genoma da I339 com diferentes montadores.

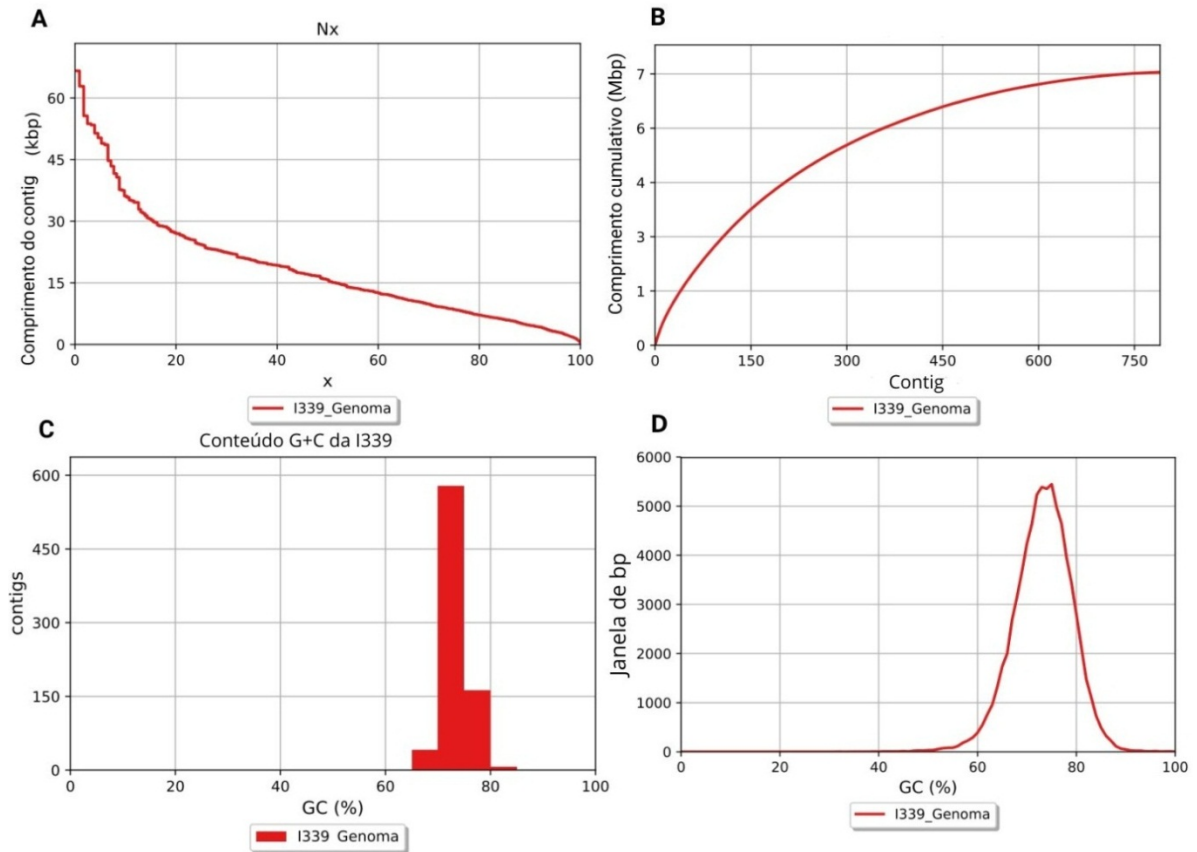
Montador	Número de contigs	N50	L50	GC (%)
Kiki	1.448	8.030	279	73.21
Megahit	6.137	3.553	657	73.19
SPAdes	1068	13.804	170	73.14
Velvet	3.122	4.821	438	72.97
plasmidSPAdes	25	20.533	5	71.17

Fonte: Autoral.

Após a montagem automática, os contigs foram manualmente editados no software Geneious Prime. Após a edição final, o genoma, finalizado com um total de 790 contigs foi submetido ao Genbank sob número de acesso JAAXMD000000000.

O genoma finalizado foi finalizado com uma cobertura de 45 vezes e possui um tamanho de 7 548 406 pb, um conteúdo de GC de 73,17%, N50 de 15,829 e um valor de L50 de 151 contigs. As estatísticas geradas pelo software QUAST (GUREVICH et al., 2013) são mostradas na Figura 11.

Figura 11- Métricas referentes a montagem do genoma da I339.



Fonte: Autoral. A) métrica Nx (onde x varia entre 0 a 100) que relaciona a quantidade de contigs maior ou igual ao contig de maior comprimento que contabiliza x% das bases da montagem. Na métrica pode-se ver que em um comprimento próximo de 15 kbp chega-se a metade das pares de bases da montagem como evidenciado por N50. B) Número de bases nos primeiros contigs, a qual vai acumulando com número de contigs. C) A concentração do conteúdo GC (%) nos contigs (y) estando concentrada entre 60-80%. D) Relação de conteúdo GC (%) por pares de bases (y).

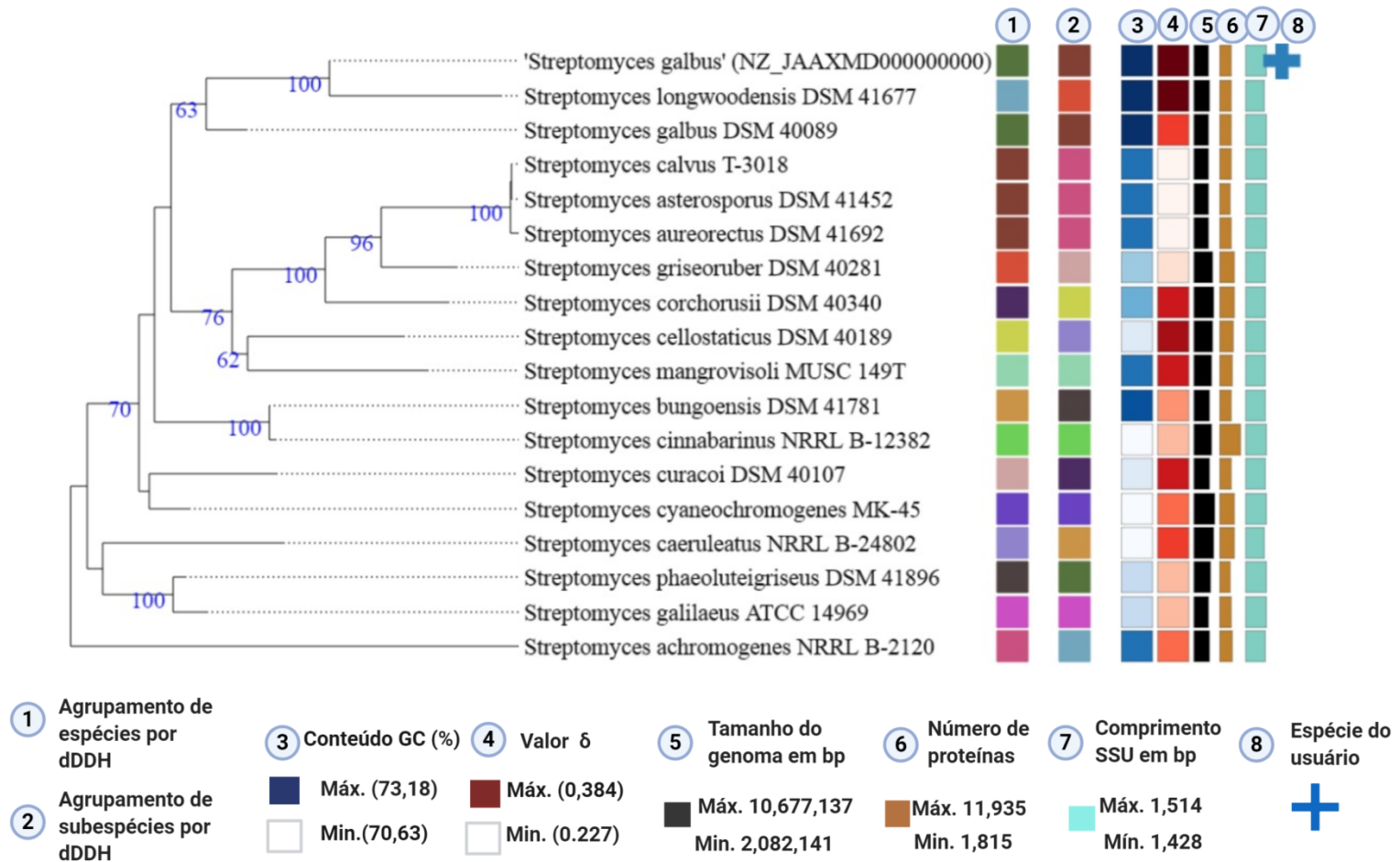
6.2.3 Identificação da espécie do isolado I339

A reconstrução da árvore filogenética baseada nas sequências de 16S rRNA (Figura 12) com as 18 linhagens de espécies mostrou uma média de valores δ de 0,337 variando em 0,251 a 0,434. A variação do tamanho de genoma, número de proteínas e conteúdo GC se baseiam nos cálculos inferidos no genoma completo. A árvore do 16S mostra uma baixa fidelidade dos resultados, uma vez que observa-se uma variação acentuada nos valores de *bootstrap* ao ponto do nó anterior ao das espécies correlacionadas estar no valor de 63, assim como, a média do suporte de ramos para a árvore de 70,9. O resultado da árvore descreve um parentesco maior

da linhagem I339 com a *S. longwoodensis* DSM 41677, formando um clado-irmão com com a *S. galbus* DSM 40089.

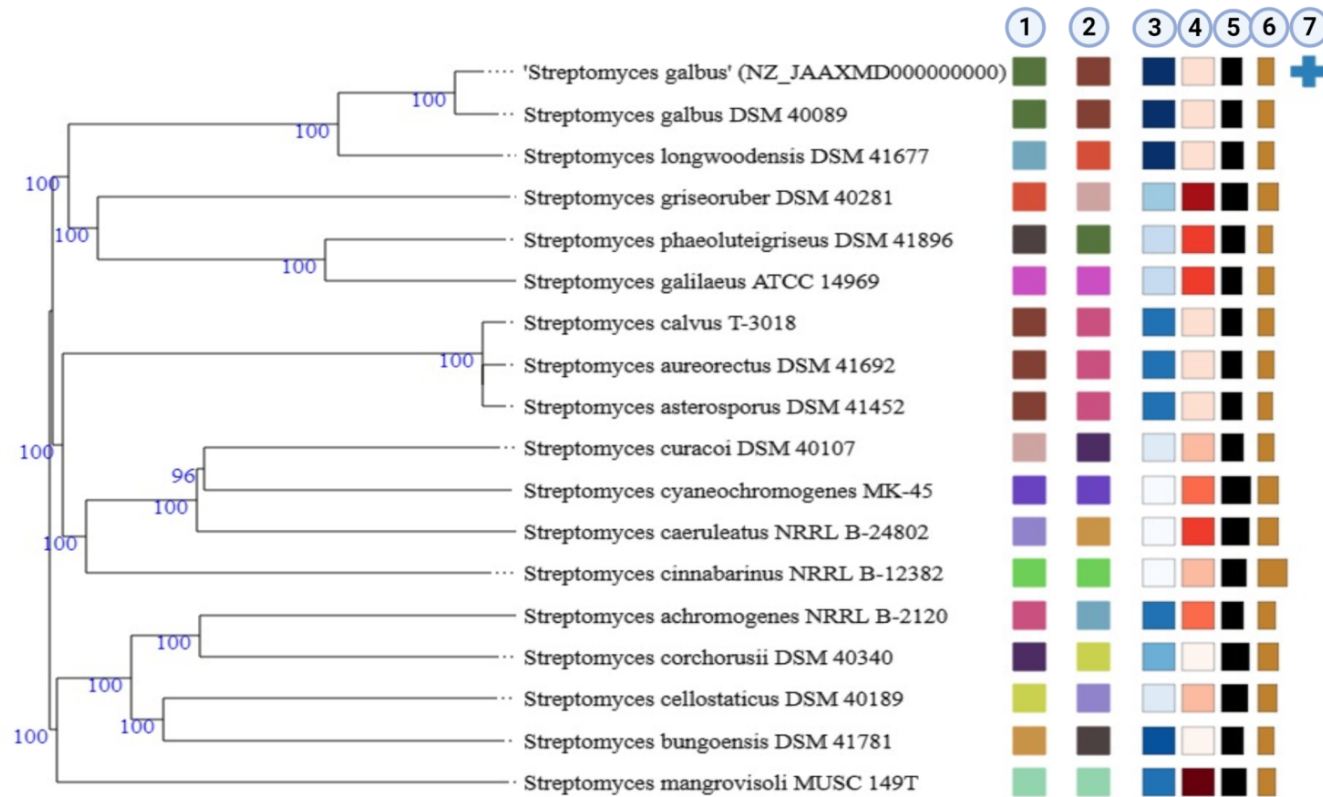
Os resultados da árvore filogenética baseada no genoma completo (Figura 13) entre as 18 espécies escolhidas mostram quanto aos valores de *bootstrap*, uma uniformidade muito próxima de 100% com uma média de suporte de ramos de 94,7%. A árvore mostra uma maior proximidade da *S. galbus* linhagem I339 com *S. galbus* linhagem DSM 40089, tendo, juntamente com a *S. longwoodensis* DSM 41677, um ancestral comum. A variância entre valores δ variam de 0,159 e 0,231 com média de 0,185, a porcentagem de conteúdo GC varia de 70,63-73,18, enquanto o tamanho dos genomas varia de 7.543.244 a 10.677.137 pb e com números de proteínas dos genomas entre 6.312 e 11.935.

Figura 12- Árvore filogenética da sequência 16S rRNA da *S. galbus* I339



Fonte: Autoral. A tonalidade das cores refere-se às características similares compartilhadas entre as linhagens. Deste modo, as linhagens de bactérias podem ser agrupadas entre elas de acordo ao nível de espécie (1), subespécie (2), quanto ao conteúdo GC (3), valor δ (4), tamanho do genoma (5), Número de proteínas (6), Comprimento SSU (7). O símbolo da cruz em (8) indica a posição da *S. galbus* I339.

Figura 13- Árvore filogenética do genoma completo da *S. galbus* I339



1 Agrupamento de espécies por dDDH

2 Agrupamento de subespécies por dDDH

3 Conteúdo GC (%)

Máx. (73,18)
Min.(70,63)

4 Valor δ

Máx. (0,384)
Min. (0,227)

5 Tamanho do genoma em bp

Máx. 10,677,137
Min. 2,082,141

6 Número de proteínas

Máx. 11,935
Min. 1,815

7 Espécie do usuário

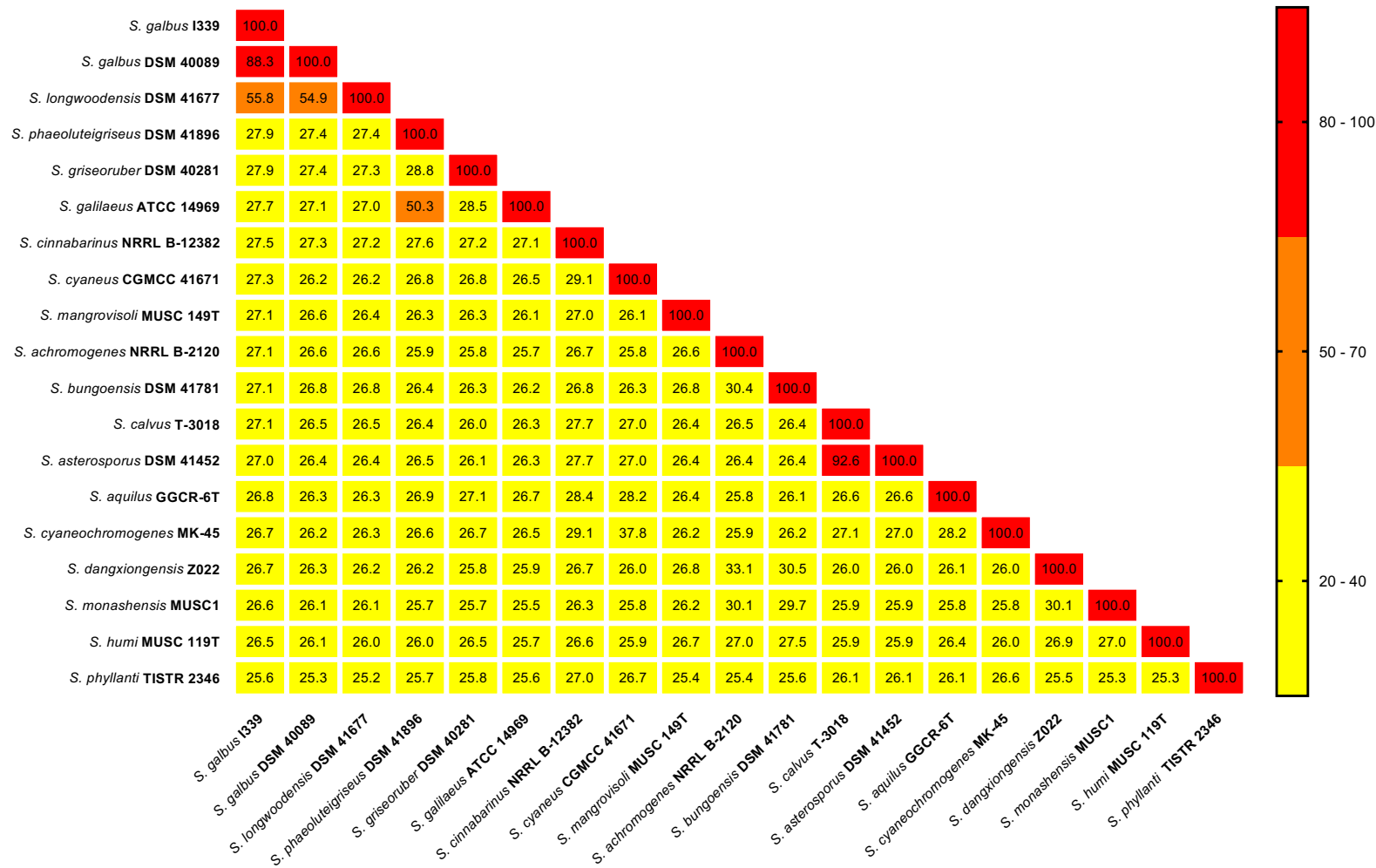


Fonte: Autoral.

Resultados complementares inferidos pelo GGDC (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013) da *S. galbus* I339 com a linhagem DSM 40089 mostraram valores de dDDH de 88,3% com variação de confiança entre 85,8%-90,4%, além da diferença de conteúdo GC entre os genomas ser de 0,09%. Enquanto que em comparação com a *S. longwoodensis* o limiar chega a 55,8% com intervalo de confiança de 53 a 58,5% com a diferença de conteúdo G+C de 0,12%. A Figura 14 mostra os resultados de dDDH entre as espécies relacionadas.

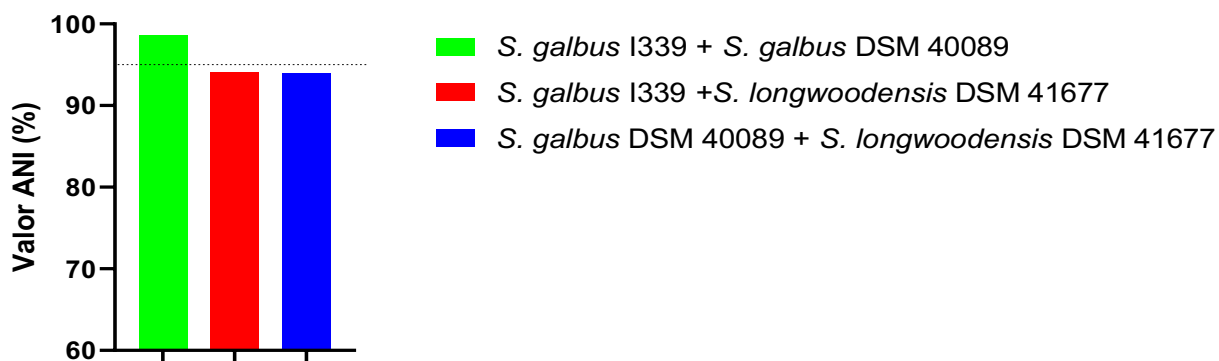
O cálculo de ANI foi realizado entre as três espécies do grupo filogenético do siolado I339 (Figura 15): *S. galbus* I339, *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* 41677. O valor de ANI entre a linhagem I339 e DSM 40089 reportado foi de 98,63%, enquanto que o valor entre a I339 e DSM 41677 foi de 94,16% e 94% entre *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* DSM 41677.

Figura 14- Valores de dDDH entre as espécies correlacionadas pelo GGDC.



Fonte: Elaborada pelo autor no GraphPad Prism 8.4.3. Valores de dDDH das 19 espécies relacionadas na árvore filogenética computados no GGDC com valores de dDDH₄ baseado na fórmula 2 (recomendado) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

Figura 15- Valores de ANI entre os membros do grupo filogenético.



Fonte: Autoral. Imagem gerada pelo GraphPad Prism 8.4.3. A linha tracejada representa a delimitação do valor ANI (95%) entre as espécies.

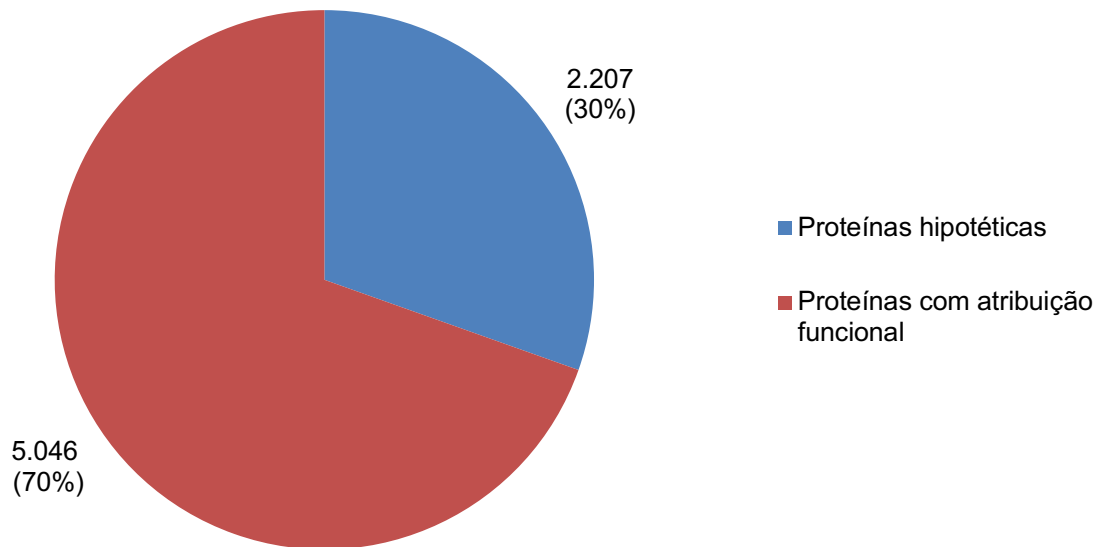
Portanto os valores de ANI, dDDH, diferença de conteúdo GC *in silico*, assim como, a acurácia e validação dos resultados suportados pelo média de valores δ , suporte de ramos, o isolado I339 foi classificado como sendo da espécie *Streptomyces galbus*.

6.2.4 Anotação genômica da *S. galbus*.

A anotação do genoma realizada pela ferramenta RASTk não presenciou sequências de regiões repetidas, misc-RNA (outros rRNAs como rRNA de interferência: rRNAi) e sequências codificantes de proteínas (CDS) em sua parcialidade. Todavia, o anotador mostrou a presença de 65 tRNAs, 8 rRNAs e 7,253 CDS completas.

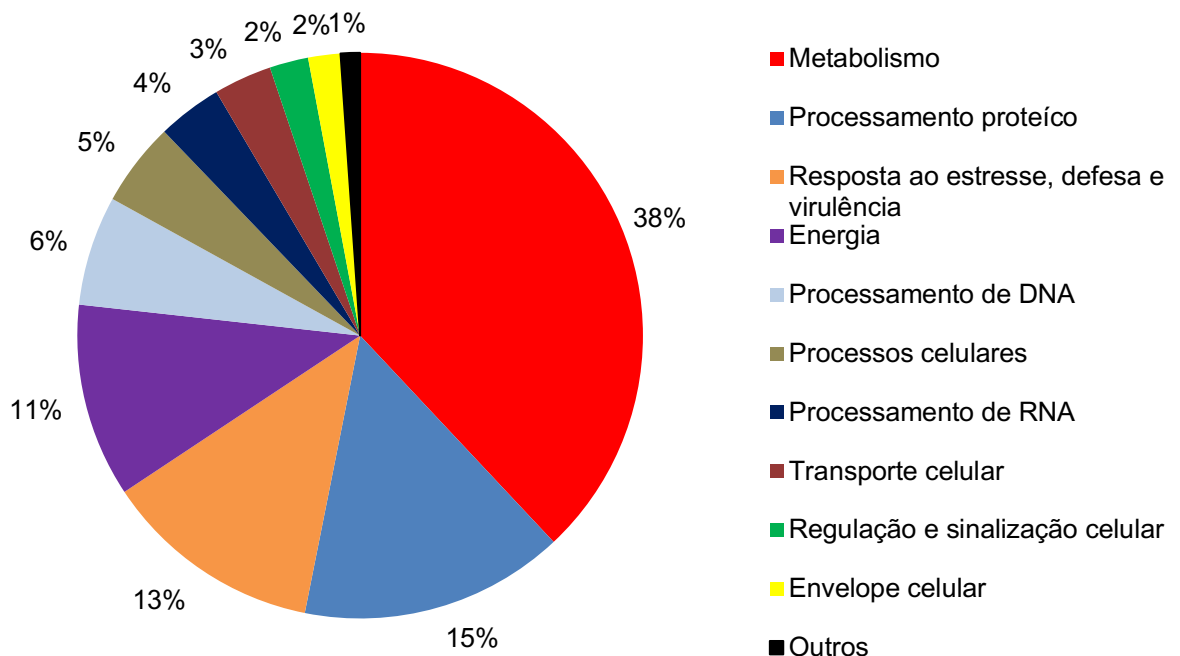
Dos genes codificantes de proteínas, 2,207 foram ligadas a proteínas classificadas como hipotéticas (proteínas que foram preditas, mas que ainda não foram caracterizadas experimentalmente); 5,046 a proteínas preditas com alguma atribuição funcional (Figura 16). Tais proteínas funcionais estariam ordenadas a um conjunto chamado de subsistemas (OVERBEEK, 2005) envolvidas com funções biológicas, tais como: metabolismo (103), processamento de proteínas (41) e resposta ao estresse, defesa e virulência (34) (Figura 17).

Figura 16- Distribuição de sequências codificantes no *S. galbus* I339.



Fonte: Autoral.

Figura 17- Subssistemas de proteínas da *S. galbus* I339.

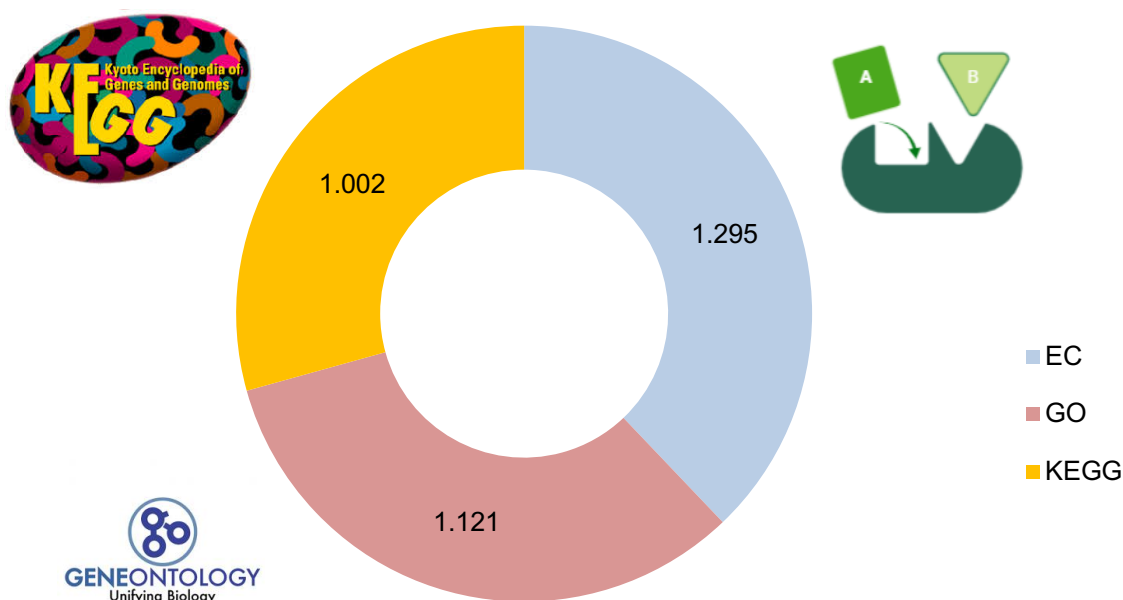


Fonte: Autoral.

Quanto à predição de função de proteínas, as proteínas com atribuição funcional foram distribuídas de acordo com atribuição enzimática com número EC

(classificação enzimática) através do banco de dados BRENDA (SCHOMBURG et al., 2004), funções atribuídas pelo gene ontology (GO) (ASHBURNER et al., 2000) e o envolvimento em rotas metabólicas preditas pelo KEGG (KANEHISA et al., 2016) (Figura 18). A anotação pelo RASTk distribuiu as proteínas (hipotéticas ou com funcionalidade atribuída) em famílias, das quais 6.444 proteínas foram incluídas em famílias específicas do gênero (PLFAM) e 6.495 na família de proteínas de gêneros cruzados (PGFams) (DAVIS et al., 2016).

Figura 18- Número de proteínas funcionais detectadas por diferentes bancos de dados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados no KEGG mostraram a biossíntese de antimicrobianos em rotas metabólicas para vancomicina (ID: 01055), ansamicina (ID: 01051), penicilina e cefalosporina (ID: 00311), carbapenêmicos (ID: 00521), neomicina, canamicina e gentamicina (ID: 00524) e novobiocina (ID: 00401) um antibiótico alternativo a *S. aureus* resistente a penicilina. Também foram encontradas rotas metabólicas para composto antitumoral: enediyne (ID: 00401) (LANEN; SHEN, 2008).

Genes especializados são genes que têm importância para pesquisas contra doenças infecciosas. A partir de diferentes bancos de dados foram encontrados

genes relacionados a fatores de virulência, transporte, alvo de drogas e genes com função de resistência a antibióticos (Tabela 5).

Tabela 5. Genes especialistas preditos por banco de dados.

	Fonte	Referência	Genes
Resistência a antibióticos	CARD	ALCOCK et al., 2020	5
	NDARO	*	2
	PATRIC	WATTAM et al., 2017	47
Alvo de drogas	DrugBank	WISHART et al., 2018	10
Transportador	TCDB	JR; TRAN; BARABOTE,2006	62
Fator de virulência	PATRIC_VF	(MAO et al., 2015	4
	VFDB	ALTSCHUL et al., 1997	1
	Victors	SAYERS et al., 2019	2

Fonte: Autoral. *NCBI, acesso em: 23/07/2020.

A anotação pelo PATRIC utilizou o método de k-mer (MANEKAR; SATHE, 2018) para detectar genes de resistência no genoma da I339 com base os genes de resistência em seu banco de dados e com isso atribuindo a estes genes funções, mecanismo de ação ou a classe de antibióticos alvos dos genes (WATTAM et al., 2017). Entre eles se encontra o gene da KatG, uma enzima peroxidase-catalase presente em *M. tuberculosis*, a qual ativa a pró-droga isoniazida, antibiótico que interfere na síntese da parede celular. Entretanto mutações na KatG tem levado a ineficácia do fármaco (SUAREZ; RANGUELOVA; MAGLIOZZO,2009). A Tabela 6 mostra outros genes envolvidos na resistência a antibióticos encontrados no genoma da *S. galbus* I339.

Tabela 6- Genes de resistência preditos da *S. galbus* I339.

Mecanismo de resistência RAM	Genes
Enzima de ativação de Antibióticos	katG
Enzima de inativação de Antibiótico	AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X
Antibiótico alvo em espécies susceptíveis	Alr, Ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p e S12p
Proteína substituinte de Antibiótico	FabG e HtdX
Bomba de efluxo	Otr(C)
Resistência de gene por ausência	gidB
Alteração da carga elétrica da parede celular por proteína	GdpD, MprF, PgsA
Regulação de expressão de genes RAM	LpqB, MtrA, MtrB, OxyR, VanO-type

Fonte: Autoral.

6.3 Análise *in silico* dos clusters biossintéticos da *S. galbus* I339

O programa antiSMASH 5.0 revelou 47 BGCs envolvidos no metabolismo secundário da bactéria (Tabela 7). Destes, 15 foram associados para NRPS, 7 clusters para PKS (tipo I com 4 clusters, tipo II com 1 e tipo III com 2 clusters). Além disso, foram identificados 3 clusters associados a síntese de terpenos. Foram identificados clusters para sideróforos (3), enquanto para bacteriocina, butirolactona, melanina e “outros clusters” (cluster que não pertence a nenhum dos clusters caracterizados pelo antiSMASH) foram preditos 2 clusters para cada. Clusters de hglE-ks, ectoína, indol e lantipeptídeo foram preditos com apenas um cluster cada. O programa identificou dois clusters candidatos do tipo híbridos: NRPS/T1PKS em duas regiões (regiões 218 e 280). Os demais cinco clusters restantes foram classificados como outros tipos de clusters candidatos (sobreposição ou vizinhança), os quais possuem mais de um cluster na região predita: outro/Terpeno (região 32), T1PKS/hglE-KS (região 64), NRPS/outro (região 133), outro/T3PKS/terpeno (região 278) e terpeno/butirolactona (região 315).

Tabela 7. Clusters biossintéticos e metabólitos secundários do antiSMASH.

Região do Contig	Cluster biossintético	Produto	Similaridade
1	Terpeno	Albaflavenona	100%
5	NRPS	Actinomicina D	21%
7	T2PKS	Pigmento de esporo	66%
10	Terpeno	Hopeno	61%
19	NRPS-like	(-)	
32	Outro/Terpeno	Actinomicina D	64%
34	T3PKS	Dicloro- meroclorina B Descloro- meroclorina (A/B) Isocloro- meroclorina B Meroclorina (A/B/C/D)	21%
50	Sideróforo	Desferrioxamina B/E	83%
64	T1PKS/ hglE-KS	A33853	8%
71	T3PKS	Conglobatina	15%
72	NRPS	Lisocina	14%
77	Terpeno	Isorenieratano	54%
100	NRPS	(-)	
110	Indol	5-isoprenil indol-3-carboxilato β -D-glicosil éster	23%
133	NRPS/Outro	Polioxipeptina	33%
136	T1PKS	Polioxipeptina	35%
152	NRPS	Actinomicina D	10%
174	Bacteriocina	(-)	
182	Ectoína	Ectoína	100%
211	Melanina	Melanina	71%
218	NRPS/T1PKS	Polioxipeptina	10%
224	T1PKS	Divergolida (A/B/C/D)	20%
228	NRPS	(-)	
236	T1PKS	Bafilomicina B1	22%
249	NRPS	Polioxipeptina	8%
260	Butirolactona	RP-1776 (skyllamicina A/B)	4%
269	Outro	Napiradiomicina	30%
278	Outro/T3PKS/Terpeno	Napiradiomicina	23%
280	NRPS/T1PKS	Antimicina	12%
293	NRPS	Antimicina	18%
298	Outro	Himastatina	8%
315	Terpeno/ Butirolactona	γ -butirolactona	100%
330	Butirolactona	Lactonamicina	3%
340	T1PKS	Coelimicina P1	8%
350	Sideróforo	(-)	
353	NRPS	Cisteoamida	27%
358	NRPS	(-)	

Região do Contig	Cluster biossintético	Produto	Similaridade
364	hgIE-KS	(-)	
372	NRPS	(-)	
427	NRPS-like	(-)	
469	Lantipeptídeo	(-)	
499	Melanina	Melanina	60%
505	Bacteriocina	(-)	
586	Sideróforo	Ficelomicina	3%
654	NRPS	(-)	
668	NRPS	Rizomida (A/B/C)	100%
701	NRPS-like	Rizomida (A/B/C)	100%

Fonte: Autoral. NRPS: Sintetase de peptídeos não ribossomais, NRPS-like: Fragmentos de clusters do NRPS, PKS: sintetase de policetídeos tipo 1, 2 e 3 (T1PKS, T2PKS e T3PKS, respectivamente), hgIE-KS: sintase de glicolipídeos do heterocisto similar a PKS. Marcação em (-) significa que o programa não conseguiu predir a molécula pertencente àquela região.

Clusters de terpenos estariam envolvidos na produção de albaflavenona (região 1 com similaridade de 100%), composto com função antimicrobiana (ZHAO et al., 2008). Foram identificados clusters do tipo NRPS para a provável síntese de antimicrobianos como lisocina (PANTHEE et al., 2016) e de derivados de rizomida do tipo A, B e C. O programa também identificou a presença do cluster para a produção de actinomicina D em clusters para NRPS (região 5 e 152) e terpeno (região 32).

Clusters de sintases de policetídeos do tipo 1 (T1PKS) apresentaram suposta síntese de divergolida e seus derivados (A-D) com ação antibacteriana (DING et al., 2011), assim como, a Bafilomicina B1 com propriedade funcional antifúngica e antitumoral (ZHANG et al., 2013). Outros tipos de sintases de policetídeos do tipo 2 (T2PKS) e tipo 3 (T3PKS) foram também identificados. T3PKS com a produção de compostos antibacterianos, como a meroclorina (A-D) (KAYSSER et al., 2012) e conglobatina com atividade antitumoral (ZHOU et al., 2015), enquanto que o T2PKS houve a presença de apenas um cluster para um pigmento de esporo (região 7 com similaridade de 66%). Foram identificados clusters para a produção dos sideróforos desferrioxamina B e E (região 50) e ficelomicina (região 586). Na região 350 não foi possível a predição de um possível produto. Em algumas regiões, o antiSMASH não conseguiu estimar a molécula, a qual pode ser um indicativo de novas moléculas.

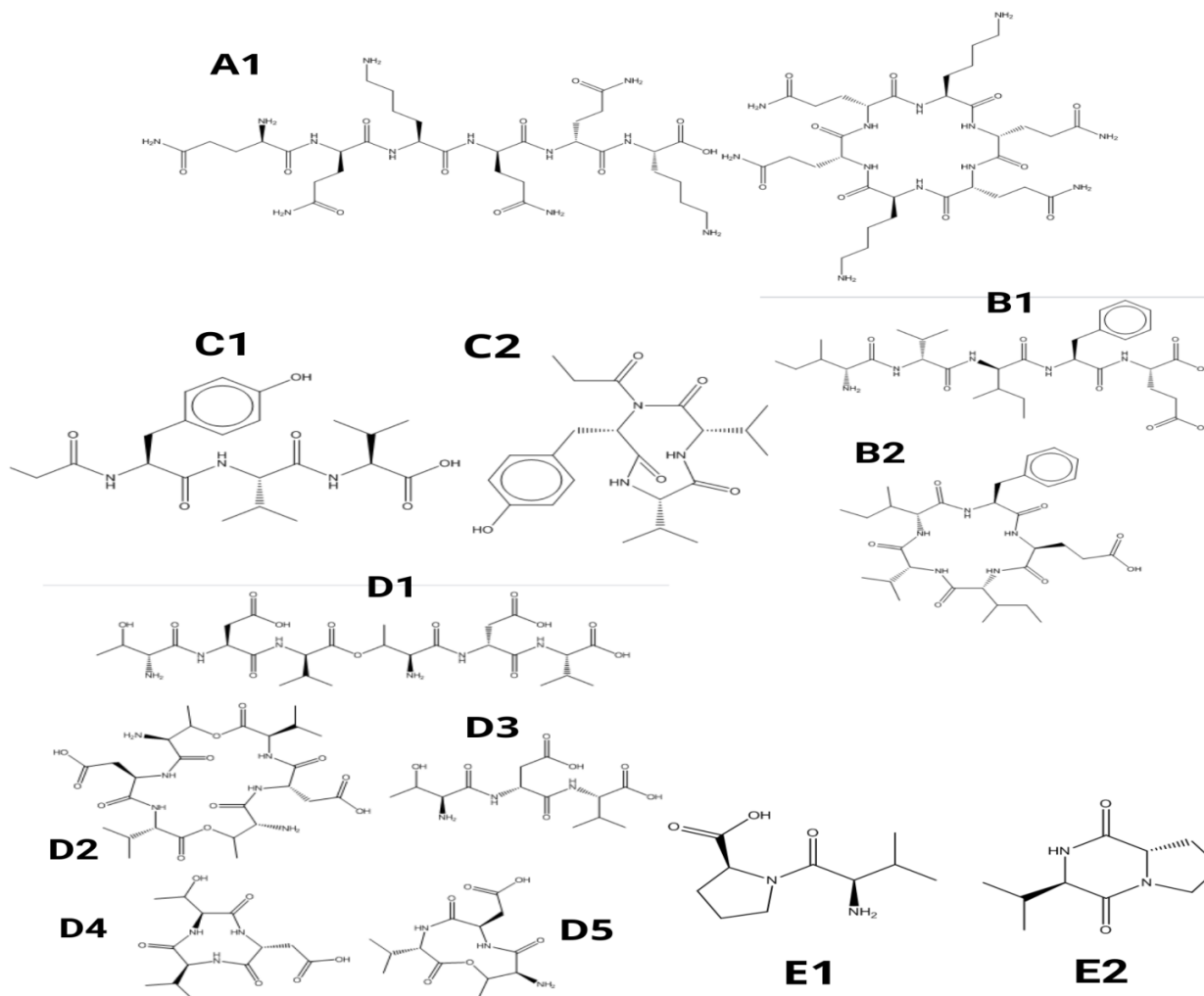
Em relação ao NP.searcher, foram apontadas a presença de quatro clusters de NRPSs e um cluster híbrido de NRPS e PKS. Ainda foi captada a presença do

domínio AT em configuração *trans* de um PKSs. Ademais foram encontrados genes envolvidos na produção de terpenóides: um cluster com genes envolvendo a rota metabólica do mevalonato e outro grupo de genes envolvidos na rota metileritritol fosfato (MEP) que envolve a produção de isoprenóides (TANG, 2019).

Os prováveis produtos para os clusters identificados pelo programa se encontram na Figura 19. O programa NP.searcher tem a limitação de não gerar moléculas de clusters para terpenóides e para o domínio AT para policetídeos. Logo as moléculas abaixo são referentes aos clusters para NRPS e cluster híbrido de NRPS e PKS.

As moléculas A1 (contig 72), B1, B2 (contig 100 e 101 parcial) e o grupo de moléculas D (contig 228 e 229 parcial) foram preditas para a presença de cluster do tipo NRPS, enquanto que o grupo de moléculas C (C1 e C2) (preditos nos contigs 218 e 219 parcial) para o cluster híbrido de NRPS/T1PKS. Em relação as moléculas E (E1 e E2) não foi mostrado o contig relacionado, contudo com base nos resultados do NP.searcher, a molécula pertence ao cluster para NRPS.

Figura 19- Moléculas previstas pelo NP.searcher.



Fonte: Autoral. O NP.searcher mostrou as possíveis moléculas em cada sequência. A divisão em um sistema de letras e números partiu do autor para uma melhor compreensão.

6.4 Comparação genômica, clusters biossintéticos e de metabólitos secundários entre bactérias do clado filogenético da *S. galbus* I339

Em relação às características do genoma dos membros da filogenia (Tabela 8), o tamanho do genoma entre as linhagens de *S. galbus* se aproximam, enquanto que *S. longwoodensis* se distancia, já que possui um genoma maior (diferença de 527.187 e 815.277 pares de bases para *S. galbus* DSM40089 e *S. galbus* I339, respectivamente). Quanto ao conteúdo de GC, todas possuem uma porcentagem acima de 70%, característico do gênero *Streptomyces* (CHATER; CHANDRA, 2006). As três linhagens possuem uma pequena diferença de CDS entre elas. Em comparação aos tipos de RNA, foram preditas mais cópias de genes para ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) nas duas linhagens de *S. galbus* em comparação a *S. longwoodensis*, enquanto que em relação a genes de RNA transportadores (tRNA), a I339 se iguala com *S. longwoodensis*, enquanto que a *S. galbus* DSM 40089 possui 2 tRNA a mais.

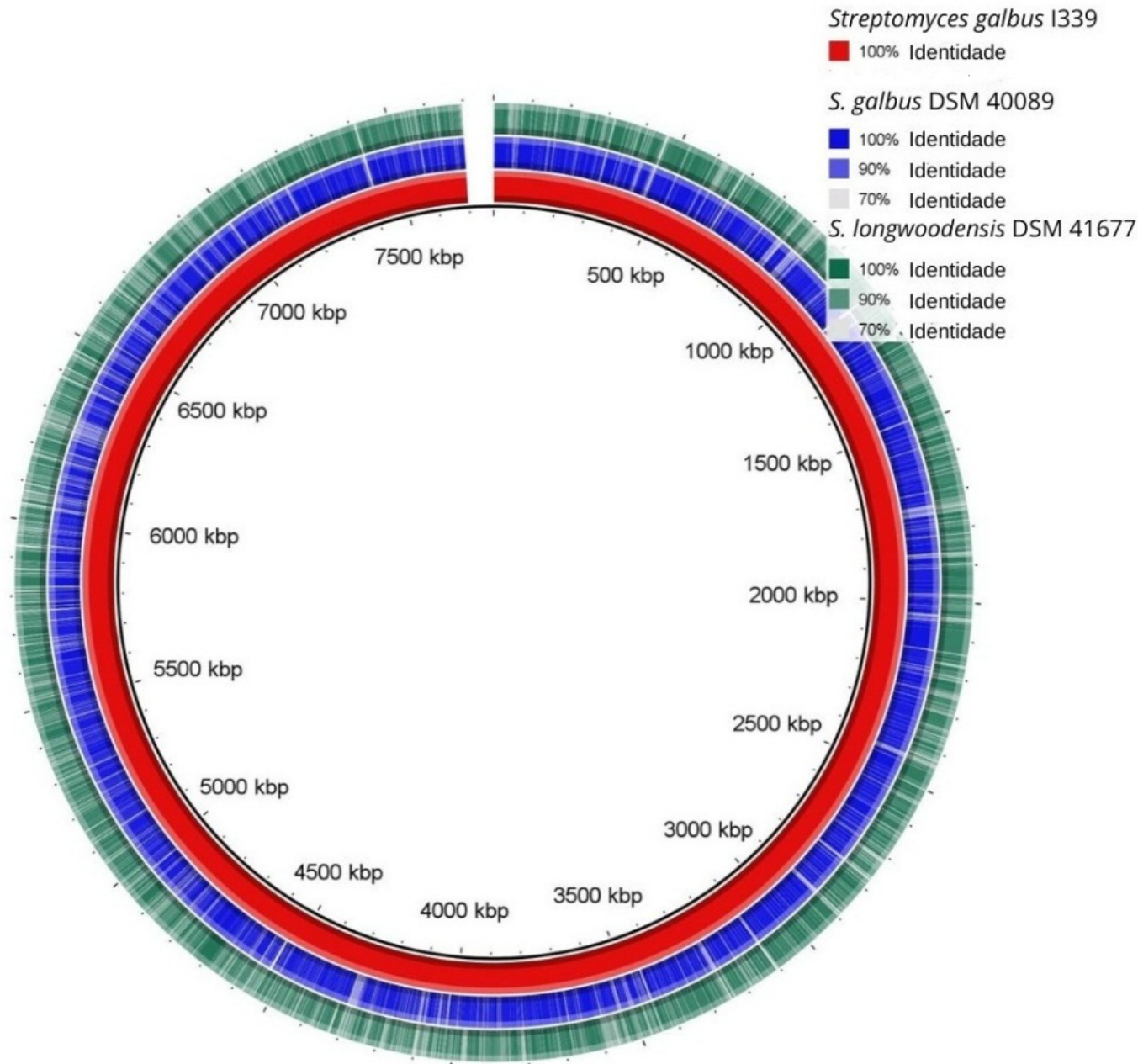
Tabela 8- Características dos genomas do membro filogenético.

Características	<i>S. galbus</i> I339	<i>S. galbus</i> DSM 40089	<i>S. longwoodensis</i> DSM 41677
Tamanho do genoma	7 548 406 pb	7 836 436 pb	8 363 623 pb
Conteúdo GC (%)	73,17	73,06	73,06
Presença de plasmídeo	Não	Não	Não
CDS	7.253	7.316	7.630
tRNA	65	67	65
rRNA	8	6	3

Fonte: Elaborada pelo autor.

As linhagens *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* foram comparadas à *S. galbus* I339 (genoma referência) quanto às similaridades e distinções de seus genomas (Figura 20). A imagem mostra diferenças nas mesmas regiões das duas bactérias, sendo estas disparidades mais acentuadas na *S. longwoodensis* com regiões similares com identidade mínima de 70%. Enquanto que a *S. galbus* DSM 40089 apresenta regiões com coloração azul mais intensa, o que testifica a identidade de suas regiões estarem $\geq 90\%$ em comparação com o genoma referência.

Figura 20- Comparação genômica entre *S. galbus* e *S. longwoodensis*.

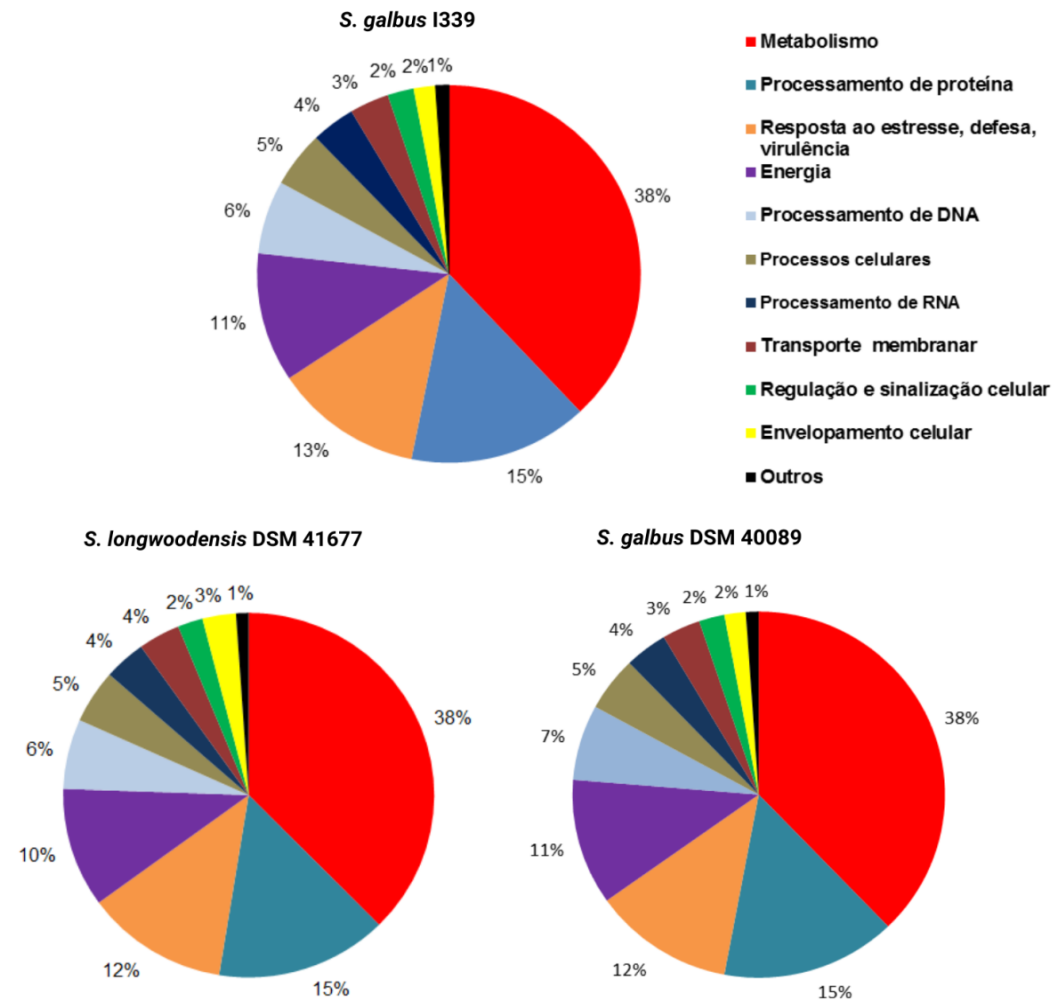


Fonte: Imagem gerada pelo programa BRIG. Os genomas estão apresentados em forma circular (em ordem do interior para o exterior): em vermelho, o genoma da I339 como genoma referência comparado a *S. galbus* DSM 40089 em azul e *S. longwoodensis* DSM 41677 em cor verde. A tonalidade de cores varia de acordo com a similaridade das sequências: tonalidade mais forte (100% de identidade), intermediária (a partir de 90% de identidade) e baixa (a partir do limite de 70%).

Em relação aos subsistemas de proteínas (Figura 21), as três linhagens se assemelham quanto à distribuição de proteínas para uma determinada função. A

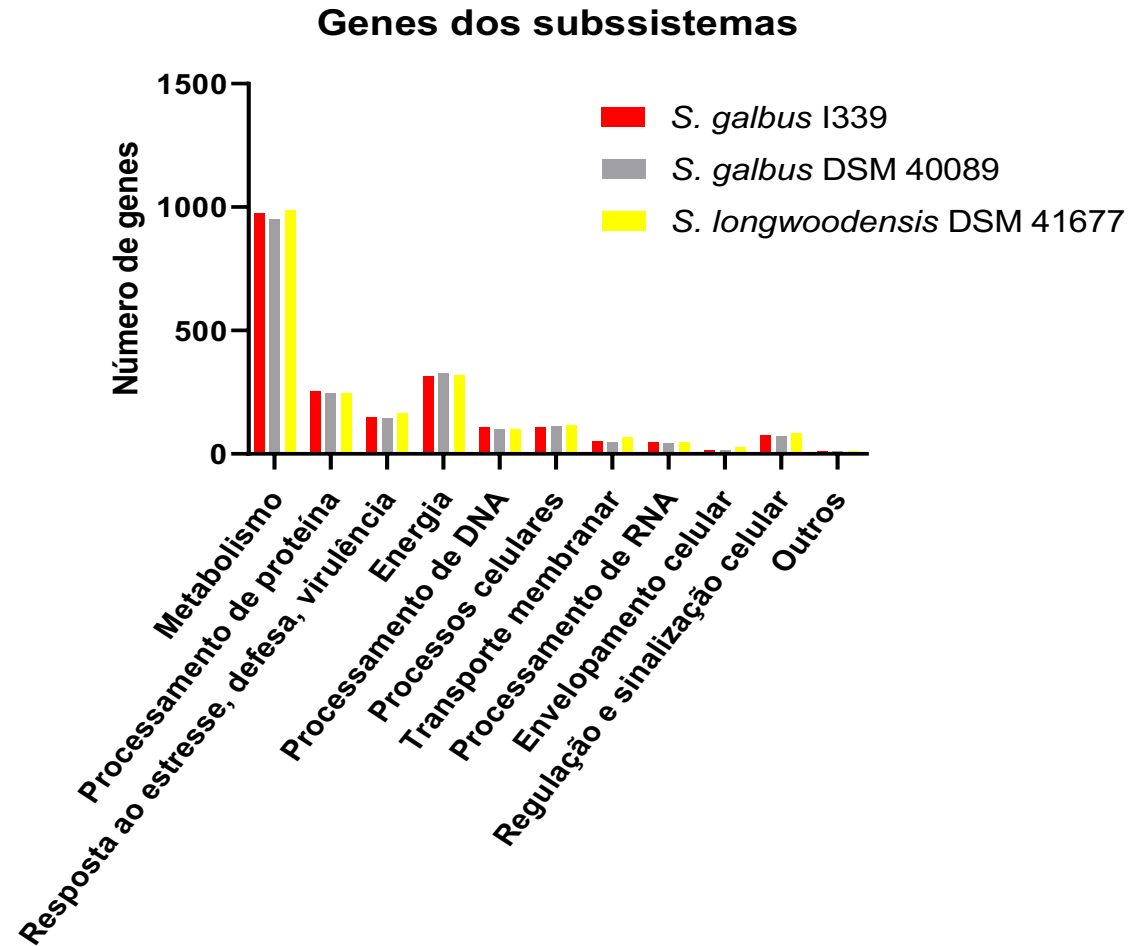
maioria está ligada a processos metabólicos (38%), processamento de proteína (15%) e resposta ao estresse, defesa e virulência (12-13%). O resultado é diferente para a distribuição de genes, sendo a maior parte relacionada ao metabolismo, energia e processamento de proteína (Figura 22).

Figura 21- Subssistemas de proteínas dos membros do grupo filogenético.



Fonte: Autoral.

Figura 22- Subssistemas de genes dos membros do grupo filogenético.



Fonte: Autoral. A imagem foi gerada pelo GraphPad Prism versão 8.4.3.

Em relação aos genes de resistência a antimicrobianos identificados em bancos de dados, nota-se uma uniformidade na quantidade de genes encontrados entre as espécies (Tabela 9), com exceção para os bancos de dados VFDB (*Virulence Factors Database*) que foi o único que encontrou um gene para *S. galbus* I339 e o TTD (*Therapeutic Target Database*) (CHEN; JI; CHEN, 2002) que apenas detectou genes de resistência em *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* DSM 41677. O gene de resistência predito pelo VFDB (pontuação de 50) é responsável pela codificação da enzima acetiltransferase presente em *Burkholderia pseudomallei* K96243.

Tabela 9- Genes especiais dos membros do grupo filogenético.

	Banco de dados	<i>S. galbus</i> I339	<i>S. galbus</i> DSM 40089	<i>S. longwoodensis</i> DSM 41677
Resistência a antibiótico	CARD	5	5	5
	NDARO	2	2	2
	PATRIC	47	44	46
Alvo de drogas	DrugBank	10	9	9
	TTD	0	1	1
Transporte	TCDB	62	58	59
Fator de virulência	PATRIC_VF	4	3	2
	VFDB	1	0	0
	Victors	2	1	1

Fonte: Autoral.

Em relação a predição de genes de resistência (Tabela 10), foram encontrados uma maior quantidade de genes de resistência relacionados a alvos de antibióticos, mecanismos de inibição com a superfamília de aminoglicosídeo aciltransferase (AAC) e regulação da resistência. Curiosamente foram encontrados os mesmos genes de resistência para os membros do grupo filogenético. Isto mostra uma relação de conservação de genes de resistência entre as espécies do grupo.

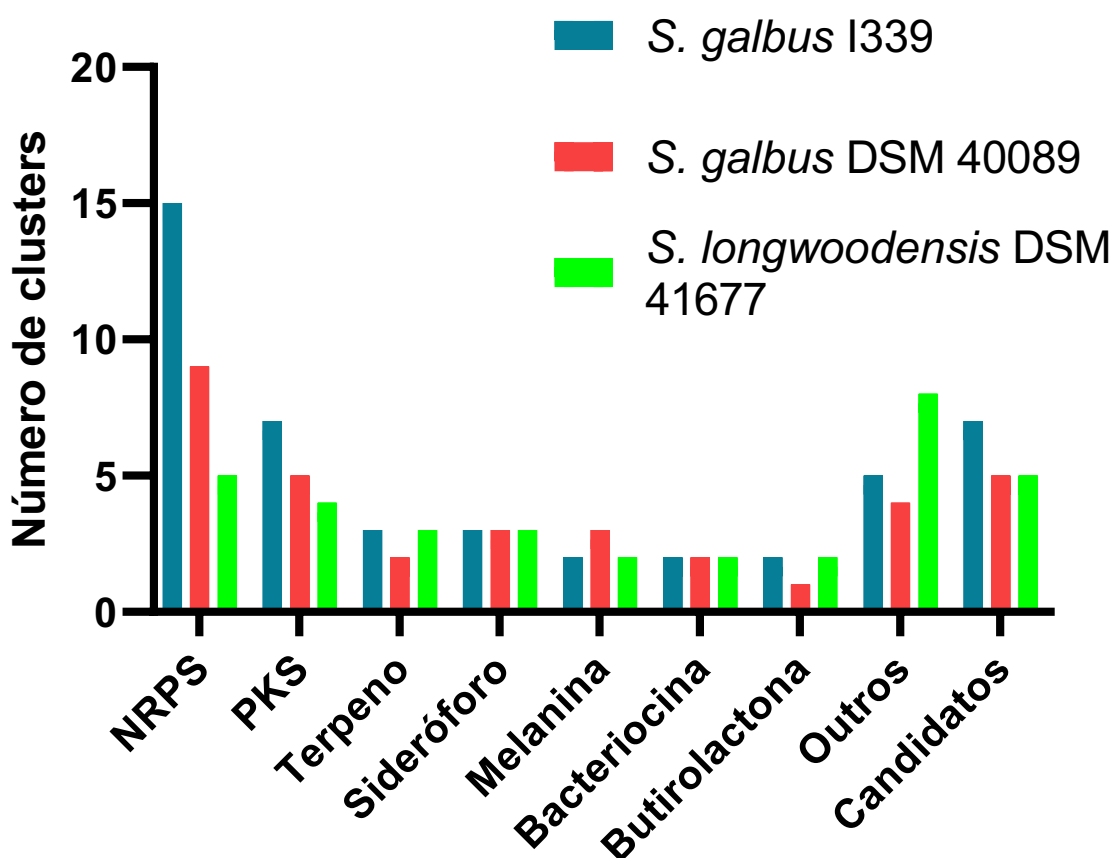
Tabela 10 Genes de resistência preditas no grupo filogenético.

Mecanismos RAM	Genes da <i>S. galbus</i> I339	Genes da <i>S. galbus</i> DSM40089	Genes da <i>S. longwoodensis</i>
Enzima ativadora de antibiótico	KatG	KatG	KatG
Enzima inibidora de antibiótico	AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X	AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X	AAC(3)-II,III,IV,VI,VIII,IX,X
Alvo de antibióticos em espécies susceptíveis	Alr, Ddl, <i>dxr</i> , EF-G, EF-Tu, <i>folA</i> , Dfr, <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , Iso-tRNA, <i>kasA</i> , MurA, <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , S10p e S12p	Alr, Ddl, <i>dxr</i> , EF-G, EF-Tu, <i>folA</i> , Dfr, <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , Iso-tRNA, <i>kasA</i> , MurA, <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , S10p, S12p	Alr, Ddl, <i>dxr</i> , EF-G, EF-Tu, <i>folA</i> , Dfr, <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , Iso-tRNA, <i>kasA</i> , MurA, <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , S10p, S12p
Proteína substituinte de alvo	FabG e HtdX	FabG, HtdX	FabG, HtdX
Bomba de efluxo	Otr(C)	Otr(C)	Otr(C)
Resistência por gene ausente	<i>gidB</i>	<i>gidB</i>	<i>gidB</i>
Alteração da carga elétrica da parede celular por proteína	GdpD, MprF, PgsA	GdpD, MprF, PgsA	GdpD, MprF, PgsA
Modulação da expressão de genes de resistência por reguladores	LpqB, MtrA, MtrB, OxyR, VanO-type	LpqB, MtrA, MtrB, OxyR, VanO-type	LpqB, MtrA, MtrB, OxyR, VanO-type

Fonte: Autoral.

Em relação à predição de clusters biossintéticos (Figura 23), o *S. galbus* I339 apresentou um maior número de clusters para NRPS (15) e PKS (7). Tendo a presença igualitária com *S. longwoodensis* para clusters de terpenos (3) e melanina, além de bacteriocina e sideróforos juntamente com a *S. galbus* DSM 40089. Em comparação a quantidade de clusters biossintéticos, a *S. galbus* lidera com 47 clusters biossintéticos, seguido de *S. galbus* DSM 40089 com 28 e *S. longwoodensis* com 25 clusters.

Figura 23- Clusters biossintéticos dos membros do grupo filogenético da I339.

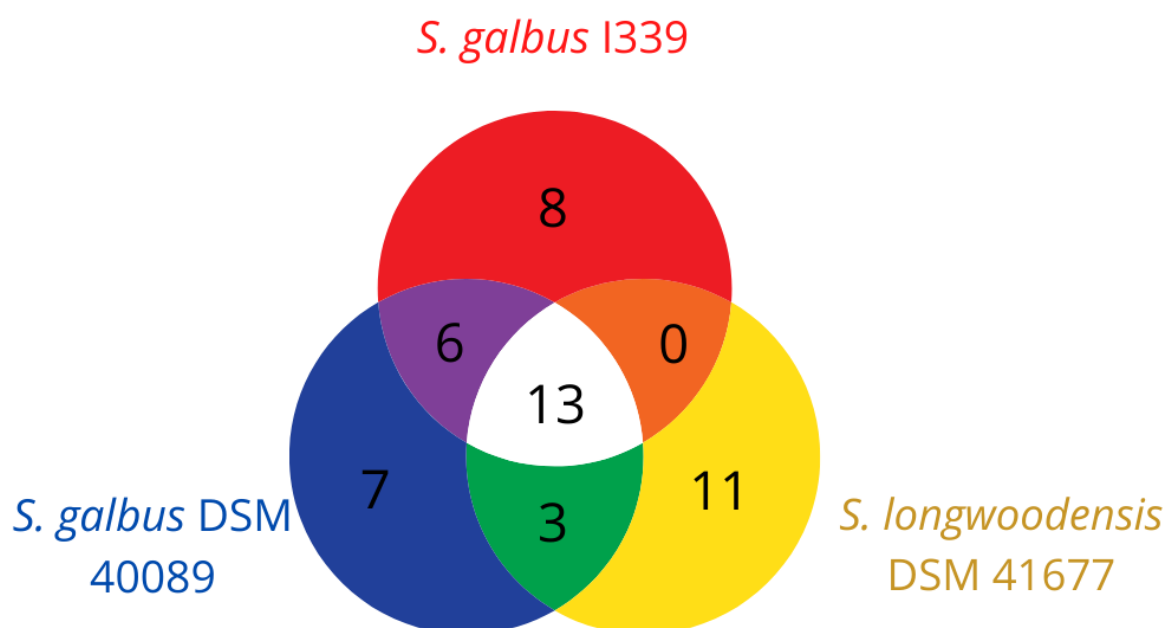


Fonte: Elaborada pelo autor no GraphPad Prisma versão 8.4.3. Número de clusters identificados para *S. galbus* I339, *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* (em ordem): NRPS (15, 9 e 5), PKS (7, 4 e 3), Terpeno (3, 2 e 3), Sideróforo (3, 3 e 3), Melanina (2, 3 e 2), Bacteriocina (2, 2 e 2), Butirolactona (2, 1 e 2), Outros (5, 4 e 8) e Candidatos (7, 5 e 5). Regiões de clusters detectadas com diferentes tipos de PKS na região foram incluídas como PKS e não como híbridos. Isto inclui uma região para clusters T3PKS/T1PKS para ambas linhagens *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* DSM 41677. Ademais, regiões que detectaram mais de um tipo de cluster foram contabilizadas como candidatos.

Com relação ao compartilhamento de genes relacionados a MS ou exclusivos entre as três linhagens (Figura 24): as três bactérias possivelmente produzem treze metabólitos mútuos, entre eles, metabólitos que seriam comuns a bactérias como os sideróforos hopeno, desferrioxamina (B/E) e ficelomicina, assim como, a predição de ectoína e pigmento de esporo. Porém foi encontrado nas três linhagens, um cluster para a possível produção do antibiótico antimicina. A bactéria *S. galbus* I339, de acordo com a predição produz seis metabólitos secundários, tais como, como actinomicina D e divergolida (A-D) que são compartilhados com a *S. galbus* DSM 40089, enquanto que nenhum metabólito foi predito entre a *S. longwoodensis* e *S. galbus* I339. Ademais entre a *S. galbus* DSM 40089 e *S. longwoodensis* foram

preditos 3 metabólitos exclusivos: paulomicina, antibiótico com atividades antibacteriana contra Gram-positivas (ARGOUDELIS et al., 1988) informatipeptina, um lantipeptídeo descoberto em 2014 através de mineração genômica (MOHIMANI et al., 2014) e o indol terpeno, teleocidina B1 (AWAKAWA; ABE, 2018).

Figura 24- Metabólitos secundários produzidos por *S. galbus* e *S. longwoodensis*.

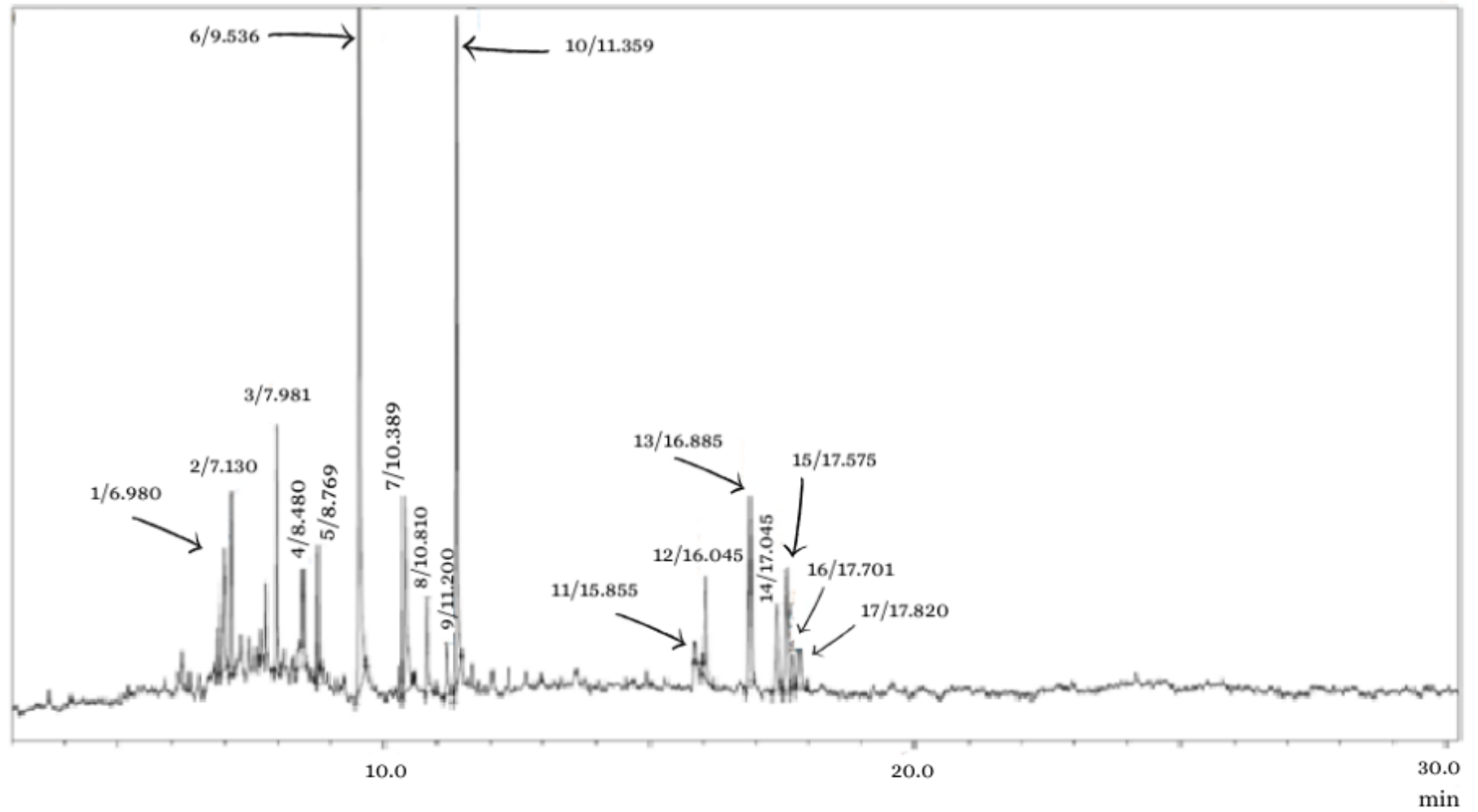


Fonte: Elaborada pelo autor.

6.3.2 Análise de metabólitos secundários por CG-MS

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em um intervalo de 6 a 18 minutos detectou a presença de 17 picos relacionados ao extrato metabólico volatizado da *S. galbus* I339 (Figura 25) com os picos 6 e 10 com as maiores áreas, 24,96% e 19,13%, respectivamente. Analisando os perfis de clivagem da molécula separada no pico 6 e 10, os bancos de dados identificaram compostos do grupo das dicetopiperazinas, compostos com ação antibiótica e antitumoral (CHETAN et al., 2010; MÁSSON et al., 2008). Ao pico 11 e 12, não foi possível inferir a identidade dos compostos, podendo se tratar de compostos inéditos. A Tabela 11 mostra descreve em detalhes os resultados da CG-MS.

As moléculas identificadas por CG são ilustradas na Figura 26. A molécula do pico 9-10 identificada por CG foi predita pelo NP.searcher a molécula E2 (Figura 19) com uma relação de estereoisomeria. Além disso, nos picos 11 e 12, os bancos de dados não conseguiram identificar os compostos, os quais podem indicar a presença de novas moléculas produzidas pela *S. galbus* I339.

Figura 25- Cromatograma do CG-MS da *S. galbus* I339

Fonte: Autoral.

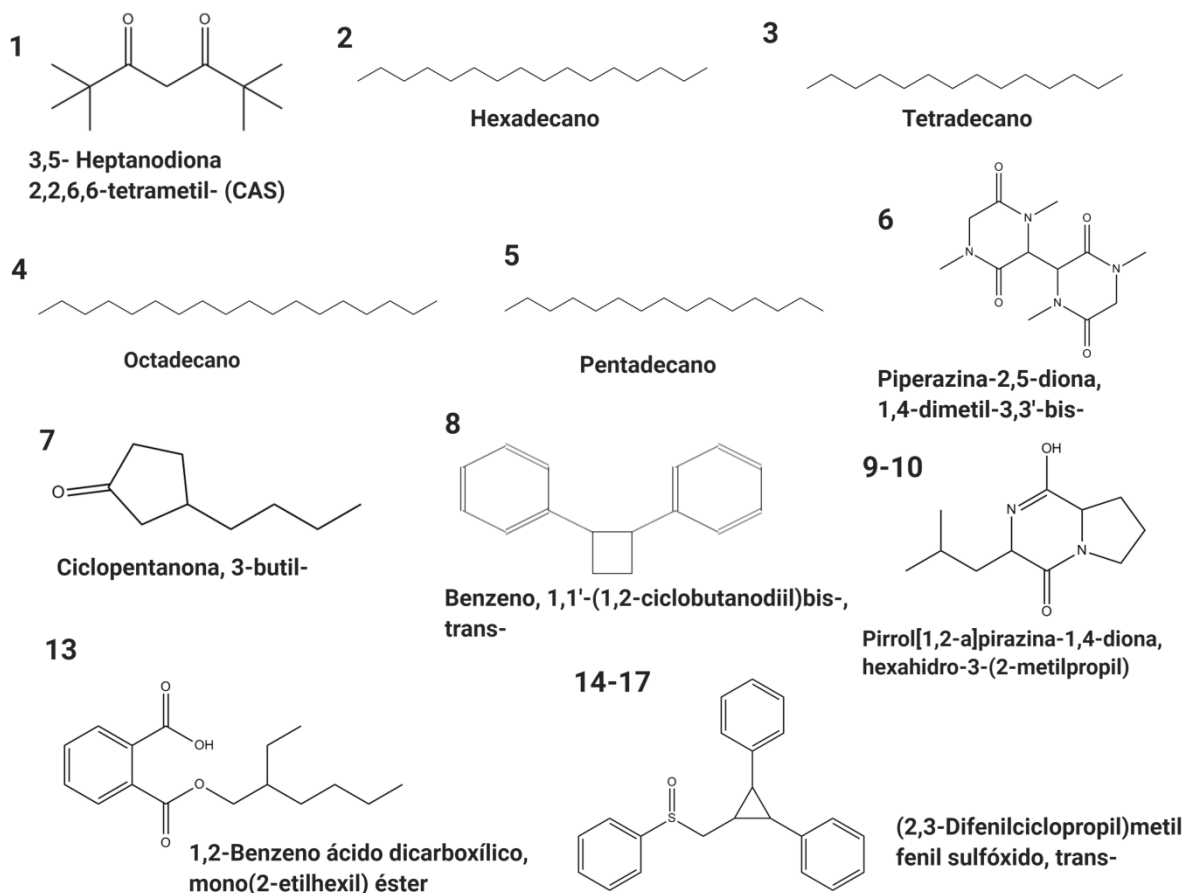
Tabela 11- Identificação presuntiva dos metabólitos secundários por CG-MS.

Pico	Tempo de corrida	Área	Área (%)	Relação m/z	Composto identificado
1	6.980	320117	4.87	127.15	3,5- Heptanodiona 2,2,6,6-tetrametil- (CAS)
2	7.130	229585	3.49	57.10	Hexadecano (CAS)
3	7.981	351052	5.34	57.10	Tetradecano (CAS)
4	8.480	210448	3.20	57.10	Octadecano (CAS)
5	8.769	173118	2.63	57.10	Pentadecano (CAS)
6	9.536	1640015	24.96	113.15	Piperazina-2,5-diona, 1,4-dimetil-3,3'-bis-
7	10.389	538242	8.19	83.10	Ciclopentanona, 3-butil-
8	10.810	170993	2.60	104.10	Benzeno, 1,1'-(1,2-ciclobutanodiil)bis-, trans-(CAS)
9	11.200	128349	1.95	70.10	Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)
10	11.359	1256921	19.13	70.10	Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)
11	15.855	4999	0.08	221.20	
12	16.045	250831	3.82	91.10	
13	16.885	464737	7.07	149.10	1,2-Benzeno ácido dicarboxílico, mono(2-etilhexil) éster
14	17.405	259943	3.96	91.10	(2,3-Difenilciclopropil)metil fenil sulfóxido, trans-
15	17.575	373950	5.69	91.10	(2,3-Difenilciclopropil)metil fenil sulfóxido, trans-
16	17.701	78896	1.20	91.10	(2,3-Difenilciclopropil)metil fenil sulfóxido, trans-

17	17.820	118702	1.81	91.10	(2,3-Difenilciclopropil)metil fenil sulfóxido, trans-
Total		6570898	100.00		

Fonte: Autoral.

Figura 26- Estrutura química dos compostos identificados por CG-MS.

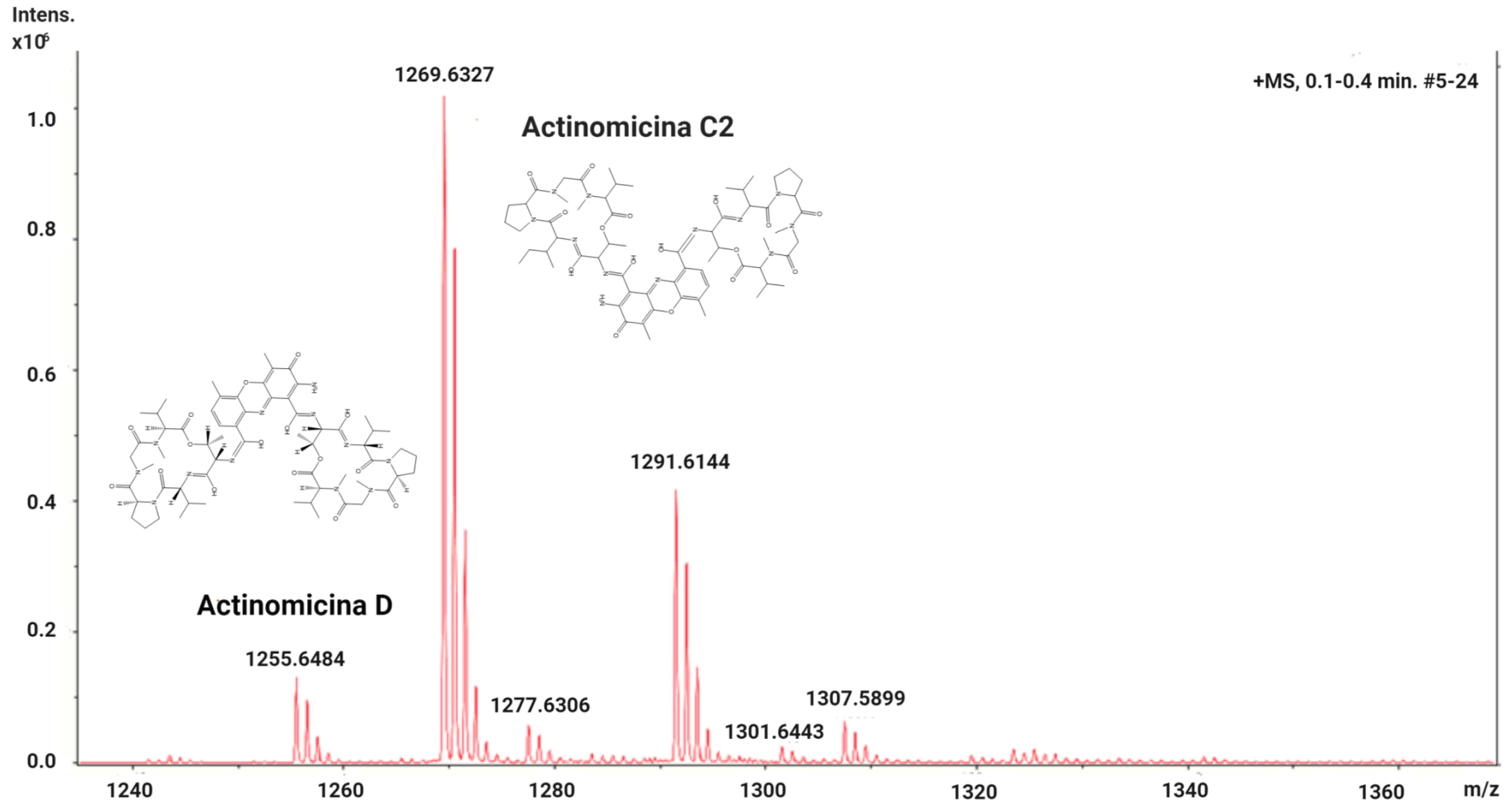


Fonte: Moléculas geradas pelo ChemDraw Ultra 12.0. A molécula 9-10 representa a mesma molécula para os picos 9 e 10, assim como a molécula entre os picos 14 e 17 (14-17).

6.3.3 Análise de metabólitos secundários por ionização em *eletrospray*

A partir da injeção direta do extrato do isolado I339 no espectro de massas (ESI-MS-ToF) foi possível verificar a presença de diversas massas (compostos). O espectro de ESI-ToF-MS do extrato da I339 é mostrado na Figura 27. A partir das massas exatas e com ajuda da predição de clusters biossintéticos pelo antiSMASH, foi identificar dois compostos: actinomicina D e actinomicina C2, com massas moleculares de 1255.6484 e 1269.6327, respectivamente. Em relação aos outros picos detectados, análises posteriores como espectrometria MS/MS e desrepliação devem ser realizadas para a identificação dos compostos.

Figura 27- Perfil de massas dos metabólitos secundários da I339 obtido por ESI-MS-ToF.



Fonte: Autoral.

7 DISCUSSÃO

Apesar dos alarmes de cientistas e da Organização Mundial da Saúde, casos envolvendo a resistência antimicrobiana têm aumentado ao longo dos anos, sendo uma grande preocupação para as gerações futuras. Com a falta de alternativas de antibióticos no mercado e a decaída de novos análogos, o mundo vê-se diante de uma nova crise de saúde global. Nesta monografia, em consonância com o contemporâneo problema da RAM, foi realizada uma abordagem inovadora na análise de uma actinobactéria produtora de compostos com propriedades antimicrobianas (metabólitos secundários), que dão um ar novo à bioprospecção de novas moléculas.

As actinobactérias (em especial o gênero *Streptomyces*) são conhecidas pela produção de metabólitos secundários com função antimicrobiana (KHAN et al., 2013). Bactérias desse gênero produzem importantes moléculas que constituem grande parte do arsenal de fármacos utilizados atualmente no tratamento de diversas infecções bacterianas (PROCÓPIO et al., 2012). Entre estes estão a estreptomicina (aminoglicosídeo, produzido pelo *S. griseus*), daptomicina (lipopeptídeo, produzido pelo *S. roseosporus*) e eritromicina (macrolídeo produzido pela *Saccharopolyspora erythraea*).

Como mostrado na Figura 1, a grande maioria dos antibióticos foram descobertos no período da era de ouro dos antibióticos entre as décadas de 40 a 70 do século passado. Passado este período, o ritmo de descoberta de novos antibióticos foi decaindo com o tempo. Com essa aparente diminuição de novas moléculas no mercado, diversos pesquisadores e empresas que realizavam intensa bioprospecção abandonaram ou reduziram os incentivos nesse campo.

Nesse ínterim, o mundo viu a ascensão de microrganismos altamente resistentes a diversas classes de antibióticos, ou até mesmo a todas as classes de drogas conhecidas. Em meio a necessidade de novos fármacos, o interesse de pesquisas na bioprospecção de moléculas foi retomado. Desta vez, habitats pouco ou inexplorados como ambientes marinhos, hipersalinos, hipertermófilos, desérticos, entre outros, ganharam maior atenção. Apesar de o Brasil ser detentor da maior biodiversidade do planeta Terra, pouco se conhece sobre a diversidade de

microrganismos dos seus solos, em especial, microrganismos que habitam a região da Caatinga.

O bioma Caatinga é caracterizado por um clima semiárido, com características únicas como temperaturas altas, baixa amplitude térmica, baixa precipitação e evaporação alta. Em contrapartida, o bioma apresenta uma fauna e flora diversificada, contudo poucos trabalhos têm se voltado a desvendar a biodiversidade de microrganismos nesta região. Em um trabalho anterior, realizado pelo nosso laboratório, a Caatinga se mostrou um *hotspot* para o isolamento de actinobactérias produtoras de substâncias com potencial antimicrobiano (CIBULSKI et al., no prelo). Um desses isolados (I339) apresentou uma notável atividade antimicrobiana, sendo ativa contra espécies de *Mycolicibacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis* (BAAR), bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O isolado não apenas apresentou atividade antibacteriana como também mostrou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e atividade antitumoral contra diversas células cancerígenas.

Nesse trabalho, o isolado I339 foi caracterizado como uma bactéria Gram-positiva, filamentosa e produtora de esporos, característicos de isolados do filo actinobactéria. Aplicando o sequenciamento de alto desempenho, o genoma da I339 foi decifrado. Após a montagem e anotação do genoma, seguido de análises genômicas e filogenéticas, o isolado I339 foi inequivocavelmente classificado como uma espécie de *Streptomyces galbus*. A classificação também teve suporte pelos valores de ANI, medidas de GGDP, dDDH e diferença de conteúdo GC *in silico*, assim como, a acurácia e validação dos resultados suportados pelo média de valores δ e suporte dos ramos (*bootstrap*) nas filogenias.

Com o aumento do número de genomas sequenciados, métodos como DDH e quantificação de conteúdo GC em laboratório tendem a se tornarem obsoletos por serem propensos ao erro e trabalhosos (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013). A identificação *in silico* realizada pelo servidor TYGS (MEIER-KOLTHOFF; GÖKER, 2019) se sobressai aos métodos tradicionais pela acurácia na inferência de filogenia entre espécies e pela velocidade de análise com o GBDP, um método baseado na inferência no genoma completo, diferente de métodos baseados em apenas uma sequência como método 16S que não conseguem distinguir bem entre espécies.

A espécie *S. galbus* linhagem I339 apresenta um genoma de tamanho de 7 Mbp e um alto conteúdo de GC (73,16 %), característico de espécies do gênero *Streptomyces*. Em relação à espécie *S. galbus*, a espécie tem sua etimologia baseada em sua coloração amarelada ao ser cultivada (OKAMI et al. 1959; PARTE, 2020). Sua primeira descrição partiu dos trabalhos cooperativos de Murase et al. (1959) e Okami et al. (1959) com as linhagens 1616-Z3 e A61-Z5, ambas isoladas no Japão, relatando a produção da estreptomicina. Posteriormente foi relatada a produção de actinomicinas (UMEZAWA et al., 1967), além de enzimas como xilanase e mananase (KANSOH; NAGIEB, 2004) e compostos antifúngicos como galbonólídeos A e B (KARKI et al., 2010). Esse é o primeiro relato da espécie das Américas. Além disso, é o segundo isolado de *S. galbus* a ter seu genoma sequenciado.

Estudos com clusters biossintéticos silenciados e a diversidade das modificações no maquinário enzimático durante e pós-síntese de metabólitos secundários ergueu a possibilidade de encontrar novas classes de antibióticos ou novas moléculas de classes já existentes, com destaque para microrganismos em ambientes extremos pouco explorados. O antiSMASH mostrou a presença de uma grande quantidade de clusters biossintéticos para a produção de metabólitos secundários com funções antimicrobiana e antitumoral como evidenciado pelo KEGG. Em comparação de clusters preditos, a diferença entre as espécies correlacionadas com a *S. galbus* I339 chega próximo de 20 clusters, sendo que majoritariamente foram encontrados clusters para NRPS e PKS, mostrando o potencial de produção de metabólitos secundários desse isolado.

As análises do extrato metabólico da I339 por GC-MS mostraram a presença de dicetopiperazinas com função antimicrobiana e antitumoral já reportadas (CHETAN et al., 2010; MÁSSON et al., 2008). O perfil de massas elucidado por ESI-MS-ToF mostrou a presença de actinomicina D e actinomicina C2, ambas com atividade antitumoral e antibiótica (SINGH; GENILLOUD; PELÁEZ, 2010). A actinomicina D, conhecida popularmente como dactinomicina, além da atividade antitumoral em doenças como tumor de Wilms e tumor trofoblástico (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2008). O composto é conhecido pela sua atividade antibiótica com o mecanismo de inibição da transcrição do RNA ao impedir a atuação do complexo de iniciação da transcrição (HOLLSTEIN, 1974). A actinomicina C2 inibe a replicação de

DNA e, assim como a dactomicina, está envolvida na inibição da proliferação de células cancerígenas (NAM et al., 1998). Antes das análises espectrométricas, resultados *in silico* (gerados pelo antiSMASH) preditaram a presença de clusters para a produção de actinomicina D, mostrando o potencial dessa ferramenta nessas análises. Muitas das moléculas preditas pelo antiSMASH não puderam ser detectadas nas análises espectrométricas, mostrando que esses clusters podem estar silenciados. Avaliando as previsões realizadas pelo NP.searcher, não foi possível a identificação das moléculas de alto peso molecular preditas. Entretanto, viu-se uma relação de estereoisomeria entre a molécula E2 do NP.searcher com a molécula do pico 10 identificada no GC-MS.

Os resultados de mineração de genoma mostram o potencial do isolado I339 na produção de moléculas com atividade biológica. Metodologias tradicionais analíticas não conseguem verdadeiramente inferir esse potencial. Portanto, outras análises com maior acurácia de detecção devem ser realizadas, a fim de elucidar todas as moléculas que estão sendo produzidas nessas condições, assim como, a adoção de diferentes meios de cultivo para a ativação de genes silenciados para a produção destas moléculas.

Apesar das diretrizes da OMS em vigilância e prevenção, além dos planos apresentados pelos países em prol do combate ao aceleramento da resistência, os resultados mostram o inverso, principalmente em países subdesenvolvidos que tem como base a produção primária agrícola (MANYI-LOH et al., 2018). Mesmo que as expectativas de sucesso da bioprospecção de novos ambientes tragam frutos com novos antimicrobianos ao mercado, de nada adiantará se os velhos hábitos permanecerem. Como já apresentado, é necessário a colaboração de todos os membros de toda sociedade no combate a RAM, desde o controle de fármacos antimicrobianos prescritos, a educação da população, a substituição de antibióticos na produção agrícola por caminhos alternativos como a adoção de probióticos e maiores investimentos na prevenção.

8 REFERÊNCIAS

ACHAN, Jane *et al.* **Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world**: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, [S. l.], v. 10, n. 144, p. 1-12, 24 maio 2011.

AIGLE, Bertrand; CORRE, Christophe. **Waking up *Streptomyces* secondary metabolism by constitutive expression of activators or genetic disruption of repressors**. In: HOPWOOD, David A. (ed.). *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants: Part C*. [S. l.]: Methods in Enzymology, 2012. v. 517, cap. 17, p. 343-66.

ALCOCK, Brian P *et al.* CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 48, p. 517-525, 8 jan. 2020. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/48/D1/D517/5608993>. Acesso em: 20 jul. 2020.

ALIKHAN, Nabil-Fareed *et al.* **BLAST Ring Image Generator (BRIG)**: simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, [S. l.], v. 12, n. 402, p. 1-10, 8 ago. 2011. DOI <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>. Disponível em: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-402>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ALTSCHUL, S F *et al.* **Gapped BLAST and PSI-BLAST**: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, [S. l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997. DOI [10.1093/nar/25.17.3389](https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146917/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

ALY, S M; SABRI, D M. **Next Generation Sequencing (NGS)**: A Golden Tool in Forensic Toolkit. *Arch. Med. Sadowej Kryminol.*, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 260-271, abril 2015. DOI [10.5114/amsik.2015.61029](https://doi.org/10.5114/amsik.2015.61029). Disponível em: <https://www.termedia.pl/Next-generation-sequencing-NGS-a-golden-tool-in-forensic-r-ntoolkit,82,27913,1,1.html>. Acesso em: 24 jun. 2020.

AMINOV, Rustam I. **A Brief History of the Antibiotic Era**: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, [S. l.], v. 1, n. 134, p. 1-7, 8 dez. 2010.

ANDREWS, Simon. **FastQC**: A quality control tool for high throughput sequence data. 0.11.9. [S. l.], 26 abr. 2010. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ANSORGE, W. *et al.* **A non-radioactive automated method for DNA sequence determination**. *Journal of Biochemical and Biophysical Method*, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 315-23, dez. 1986. DOI: [10.1016/0165-022x\(86\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0165-022x(86)90038-2). Disponível em: [10.1016/0165-022x\(86\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0165-022x(86)90038-2). Acesso em: 13 jul. 2020.

ARGOUEDELIS, A D *et al.* **Paulomycin-related antibiotics**: paldimycins and antibiotics 273a2. Isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)*, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 408-18, 1 abr. 1987.

ASHBURNER, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 25-29, maio 2000.

AVENDAÑO, Carmen; MENÉNDEZ, J. Carlos. **Anticancer Drugs Acting via Radical Species, Photosensitizers and Photodynamic Therapy of Cancer**. In: *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. [S. l.: s. n.], 2008. cap. 4, p. 93-138.

AWAKAWA, T.; ABE, I. **Biosynthesis of the teleocidin-type terpenoid indole alkaloids**. *Org. Biomol. Chem.*, [S. l.], v. 16, p. 4746-4752, 14 maio 2018.

BALTZ, Richard H. **Antimicrobials from Actinomycetes**: Back to the Future: Actinomycetes are the source of most clinically relevant antibiotics in use today and may continue to be so. *Microbe*, [S. l.], v.2, n.3, p.125-131, 1 mar. 2003.

BANKEVICH, A. *et al.* **SPAdes**: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BAPTISTA, Maria Galvão de Figueiredo Mendes. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. Orientador: Prof. Doutora Maria João Simões. 2013. 51 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Mestrando, Lisboa, 2013.

BASSETT, E.J. **Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350)**. *Science*, [S. l.], v. 209, p. 1532-1534, 26 set. 1980.

BENTLEY, Ronald. **Bartolomeo Gosio, 1863-1944**: An Appreciation. *Advances in Applied Microbiology*, [S. l.], v. 48, p. 229-250, 2 mar. 2001.

_____. **Mycophenolic Acid**: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. *Chem. Rev.*, [S. l.], v. 100, p. 3801-3825, 27 abr. 2000.

BERCHE, P. **Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination**. *Clin. Microbiol. Infect.*, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 1-6, 1 jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03945.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-0691.2012.03945.x>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BIBI, Fehmida *et al.* **Microbial Flora Associated with the Halophyte–*Salsola imbricate* and Its Biotechnical Potential**. *Front. Microbiol.*, [S. l.], v. 9, n. 65, p. 1-12, 31 jan. 2018.

BLEVINS, Steve M.; BRONZE, Michael S. **Robert Koch and the ‘golden age’ of bacteriology**. *International Journal of Infectious Diseases*, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 744-751, Set. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971210023143>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BILYK, Oksana; LUZHETSKYY, Andriy. **Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria**. *Current opinion in Biotechnology*, [S. l.], v. 42, p. 98-107, 12 dez. 2016.

BLIN, Kai *et al.* **AntiSMASH 5.0**: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 47, n.1, p. 81-87, 29 abr. 2019.

BLOUDOF, Kristjan; SCHMEING, T. Martin. **Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily**: discovery, dissection and diversity. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, [S. l.], v. 1865, n. 11 Pt B, p. 1587-1604, nov. 2017.

BOECKEL, Thomas P. Van *et al.* **Global trends in antimicrobial use in food animals**. *Proc Natl Acad. Sci. U S A*, [S. l.], v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 5 maio 2015.

BOURGAUD, Frederic *et al.* **Production of plant secondary metabolites**: A historical perspective. *Plant Science*, [S. l.], v. 161, n. 5, p. 839-851, 15 jul. 2020.

(BRASIL) Ministério do Desenvolvimento Agrário; (SDT) Secretaria de Desenvolvimento Territorial. **Forum de Desenvolvimento Sustentável do Território do Cariri**: Plano Territorial de Desenvolvimento Rural Sustentável- VERSÃO PRELIMINAR. [S. l.: s. n.], 2011. 61 p. v. [S.l.]. Disponível em: http://sit.mda.gov.br/download/ptdrs/ptdrs_territorio159.pdf. Acesso em: 23/07/2020.

(BRASIL) Ministério da saúde. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Saúde Única**: 2018-2022 (PAN-BR). 1. ed. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/bvsmis/resource/pt/mis-40062>. Acesso em: 21 jul. 2020.

BRETTIN, Thomas *et al.* **RASTtk**: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.*, [S. l.], v. 5, n. 8365, p. 1-6, 10 fev. 2015.

BUCHILLET, D. **Epidemic Diseases in the Past: History, Philosophy, and Religious Thought.** In: TIBAYRENC, M. *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies.* 1. ed. [S. l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2007. cap. 31, p. 517-524. ISBN 978-0471657323.

BURNETT-BOOTHROYD, S.C.; MCCARTHY, B.J. **Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications:** An industrial perspective. *Textiles for hygiene and infection control*, [S. l.], v. [S.l.], p. 196-209, jun. 2011.

BURRIS, R.H.; BAUMANN, C. A.; POTTER, Van R. **Conrad Arnold Elvehjem: 1901—1962.** National Academy of Sciences, Washington-D.C., v. 59, p. 135-167, 1990.

CALDERÓN, Cassandra B.; SABUNDAYO, Beulah Perdue. **Antimicrobial Classifications: Drugs for Bugs.** In: SCHWALBE, Richard; STEELE-MOORE, Lynn; GOODWIN, Avery C. (ed.). **Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols.** [S. l.]: CRC Press -Taylor & Francis Group, 2007. cap. 2, p. 7-52. ISBN 978-0-8247-4100-6.

CAMACHO, Christiam *et al.* **BLAST+:** architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, [S. l.], v. 10, n. 421, p. 1-9, 15 dez. 2009. DOI <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-10-421>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CANOVA, Sarah Pigato. **Diversidade e bioprospecção de Actinobactérias isoladas de manguezais.** Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo. 2009. 66 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Mestrado, São Paulo, 2009. DOI 10.11606/D.87.2009.tde-08052009-092624. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-08052009-092624/pt-br.php>. Acesso em: 11 jul. 2020.

CANTILLO, Angela *et al.* **Genome Sequences of Actinobacteria from Extreme Environments in Colombia.** *Microbiol Resour Announc.*, [S. l.], v. 7, n. 22, p. 1384-1418, 6 dez. 2018. DOI 10.1128/MRA.01384-18. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6284094/>. Acesso em: 11 jul. 2020.

CARROLL, C. S; MOORE, Margo M. **Ironing Out Siderophore Biosynthesis:** A Review of Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS)-independent Siderophore Synthetases. *Crit. Ver. Biochem. Mol. Biol.*, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 356-381, 4 jul. 2018. DOI 10.1080/10409238.2018.1476449. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10409238.2018.1476449>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CASTRO, Mauro Silveira de *et al.* **Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário.** *Rev. de Saúde Pública*, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 553-558, 1 ago. 2002. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102002000600003>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-89102002000600003&lng=en&nrm=iso&lng=pt. Acesso em: 20 jul. 2020.

CHAIN, E. *et al.* **THE CLASSIC:** Penicillin as a Chemotherapeutic Agent. 1940. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, [S. l.], v. 439, p. 23-26, out.2005.

CHALLIS, Gregory L. **A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases.** *ChemBioChem*, [S. l.], v. 6, p. 601 – 611, 2005.

CHATER, Keith F.; CHANDRA, Govind. **The evolution of development in Streptomyces analysed by genome comparisons.** *FEMS Microbiology Reviews*, [S. l.], v. 30, n. 5, p. 651-672, 22 jun. 2006. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x>. Acesso em: 16 jul. 2020.

CHAUDHARY, Hotam Singh *et al.* **Diversity and Versatility of Actinomycetes and its Role in Antibiotic Production.** *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, [S. l.], v. 3, n. 8, p. S83-S94, set. 2013.

CHEN, X; JI, Z L; CHEN, Y Z. **TTD: Therapeutic Target Database**. Nucleic Acids Research, [S. I.], v. 30, n. 1, p. 412-5, 1 jan. 2002.

CHETAN, B. *et al.* **Design, synthesis and anticancer activity of piperazine hydroxamates and their histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity**. Bioorg. Med. Chem. Lett., [S. I.], v. 20, n. 13, p. 3906-10, 1 jul. 2010.

CHIARADIA, Mariza C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. **O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos**. Química Nova, [S. I.], v. 31, n. 3, p. 623-636, 1 jun. 2008.

(UCHICAGO) University of Chicago. **GeneAssembly/Kiki**. Estados Unidos: Universidade de Chicago, 2011. Disponível em: <https://github.com/GeneAssembly/kiki>. Acesso em: 20 jul. 2020.

CHIU, Rossa W. K. *et al.* **Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma**. PNAS, [S. I.], v. 105, n. 51, p.20458-20463, 23 dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810641105>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/105/51/20458>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CHOPRA, I; ROBERTS, M. **Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance**. Microbiol Mol Biol Rev., [S. I.], v. 65, n. 2, p. 232-60, 1 jun. 2001. DOI 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99026/>. Acesso em: 19 jul. 2020.

COATES, A R M; HU, Y. **Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections**. British Journal of Pharmacology, [S. I.], v. 152, n. 8, p. 1147–1154, 20 ago. 2007. DOI 10.1038/sj.bjp.0707432. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189988/>. Acesso em: 29 jun. 2020.

CORRÊA, Graciely Gomes. **Potencial biotecnológico de actinobactérias da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. do bioma Caatinga**. Orientador: Janete Magali de Araújo. 2014. 76 p. Dissertação (Mestre - Biotecnologia Industrial) - Mestrado, Recife, 2014.

CUI, Liwang. **Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin**. Expert. Rev. Anti. Infect. Ther., [S. I.], v. 7, n. 8, p. 999–1013, 1 out. 2009.

DAVIS, James J *et al.* **PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database**. Front. Microbiol., [S. I.], v. 7, n. 118, p. 1-12, 8 fev. 2016.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., [S. I.], v. 69, p.1-39, 2000.

DEMAIN, Arnold L; WEINSTEIN, Richard N. **Remembering Marvin Weinstein (1916–2011)**. The Journal of Antibiotics, [S. I.], v. 65, p. 381–382, 27 jul. 2012. DOI <https://doi.org/10.1038/ja.2012.36>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ja201236>. Acesso em: 16 jul. 2020.

DEWICK, Paul M. **The Biosynthesis of C5-C25 Terpenoid Compounds**. Nat. Prod. Rep., [S. I.], v. 19, n. 2, p. 181-222, 22 jan,2002. DOI 10.1039/b002685. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2002/NP/b002685i#!divAbstract>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DING, Ling *et al.* **Divergolides A–D from a Mangrove Endophyte Reveal an Unparalleled Plasticity in ansa-Macrolide Biosynthesis**. Angew. Chem., [S. I.], v. 50, p. 1630 –1634, 6 ago. 2011.

DOMAGK, Gerhard. **Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen**. Deutsche Medizinische Wochenschrift, [S. I.], v. 61, n. 7, p. 250-253, 15 fev. 1935.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. **Three Decades of β -Lactamase Inhibitors**. *Clinical Microbiology Reviews*, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 160–201, jan. 2010.

DREWS, Jürgen. **Drug Discovery: A Historical Perspective**. *Science*, [S. l.], v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 17 mar. 2000.

DRLICA, Karl *et al.* **Quinolone-mediated bacterial death**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 385-92, fev. 2008.

DU, L; SÁNCHEZ, C; SHEN, B. **Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules**. *Metab Eng*, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 78-95, jan. 2001.

DUBERN, Jean-Frédéric; DIGGLE, Stephen P. **Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species**. *Molecular Biosystems*, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 873–956, Ago.2008.

DUCKETT, Serge. **Ernest Duchesne and the concept of fungal antibiotic therapy**. *The Lancet*, [S. l.], v. 354, n. 9.195, p. 2068-2071, 11 dez. 1999.

DUGGAR, B M. **Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics**. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 177-81, 30 nov. 1948.

EHRlich, P.; BERTHEIM, A. **Über das salzsaure 3.3'-Diamino-4.4'-dioxy-arsenobenzol und seine nächsten Verwandten**. *Wiley-VCH*, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 756-766, 6 mar. 1912.

EDGAR, Robert C. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST**. *Bioinformatics*, [S. l.], v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 1 out. 2010.

EDWARDS, Clive. **Isolation Properties and Potential Applications of Thermophilic Actinomycetes**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [S. l.], v. 42, p. 161–179, 1 ago. 1993.

EISENSTEIN, Barry I.; OLESON, Frederick B. Jr.; BALTZ, Richard H. **Daptomycin: From the Mountain to the Clinic, with Essential Help from Francis Tally, MD**. *Clinical Infectious Diseases*, [S. l.], v. 50, p. 10-15. 2010.

EMMERICH, Rudolf; LÖW, Oscar. **Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben**. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, [S. l.], v. 31, p. 1-65, Dez.1889.

European Centre for Disease Prevention and Control. **Factsheet for experts - Antimicrobial resistance**. [S. l.]: ESDC, 18 nov. 2008. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/facts/factsheets/experts>. Acesso em: 29 jun. 2020.

ESTRELA, Tatiana Silva. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. In: SAÚDE, Ministério Da. **Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018)**. 1. ed. Brasília: Ministério Da Saúde, 2018. cap. 18, p. 307-327. ISBN 8533426399.

EWING, Brent *et al.* **Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred: I. Accuracy Assessment**. *Genome Research*, [S. l.], v. 8, p.175-185, 3 fev. 1998.

EWING, Brent; GREEN, Phil. **Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred: II. Error Probabilities**. *Genome Research*, [S. l.], v. 8, p.186–194, 1998.

FELNAGLE, Elizabeth A. **Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products**. *Mol. Pharm.*, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 191-211, Mar-Abr. 2008.

FLEMING, Alexander. **On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae***. *Br. J. Exp. Pathol.*, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 226–236, jun.1929.

FENG, Yanxiao *et al.* **Nanopore-based Fourth-generation DNA Sequencing Technology.** Genomics Proteomics Bioinformatics, [S. I.], v. 13, n. 1, p. 4-16, 1 fev. 2015.

FU, Yue *et al.* **Cloning and functional characterization of the *Rhizopus oryzae* high affinity iron permease (rFTR1) gene.** FEMS Microbiology Letters, [S. I.], v. 235, n. 1, p. 169-176, 9 jan. 2006.

FUHRMAN, J. A.; CAMPBELL, L. **Microbial microdiversity.** Nature, [S. I.], v. 393, p. 410–411, fev. 1998.

GAJDÁCS, Márió. **The Concept of an Ideal Antibiotic:** Implications for Drug Design. Molecules, [S. I.], v. 24, n. 892, p. 1-16, 3 mar. 2019.

GANEM, R.S. **CAATINGA:** Estratégias de conservação. Brasília. Câmara legislativa, 2017.

GELATTI, Luciane Cristina *et al.* **Staphylococcus aureus resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade.** An. Bras. Dermatol., Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, p. 501-506, set-out. 2009.

GELBAND, Hellen *et al.* **The state of the world's antibiotics 2015.** [S. I.]: CENTER FOR DISEASE DYNAMICS, ECONOMICS & POLICY, 2015. 84 p. Washington, DC.

GENILLOUD, Olga *et al.* **Current Approaches to Exploit Actinomycetes as a Source of Novel Natural Products.** J. Ind. Microbiol. Biotechnol., [S. I.], v. 38, n. 3, p. 375-389, mar. 2011.

GIULIETTI, A. M. *et al.* **Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga.** In: J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins (orgs.). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. pp. 48-90. Ministério do Meio Ambiente, Brasília: 2004.

GORIS, Johan *et al.* **DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities.** Int. J. Syst. Evol Microbiol., [S. I.], v. 57, n. 01, p. 81-91, 1 jan. 2007.

GOULD, Kate. **Antibiotics:** from prehistory to the present day. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, [S. I.], v. 71, n. 3, p. 572–575, 5 fev. 2016. DOI <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/71/3/572/2364412>. Acesso em: 8 jul. 2020.

GRAHAM, Jay *et al.* **Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources:** Potential Public Health Implications. Molecules, [S. I.], v. 23, n. 4, p. 1-48, 30 mar. 2018.

GRAM, Christian. **The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations.** Fortschitte der Medicin, v. 2, n. 6, p. 185-189, 1884.

GRAYSON, M. Lindsay *et al.* Anti-Folate Agents and Other Synthetic Antibacterials. In: _____. **Kucers' the use of antibiotics:** A clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic, and antiviral drugs. 6. ed. [S. I.]: CRC Press, 2010. v. 1, cap. 9, p. 1037-1205.

GUIMARAES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. **Antibióticos:** importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quím. Nova, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000300035&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 08 jul. 2020. DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

GULICK, Andrew M. **Nonribosomal Peptide Synthetase Biosynthetic Clusters of ESKAPE Pathogens.** Nat. Prod. Rep., [S. I.], v. 34, n. 8, p. 981–1009, 2 ago. 2017.

GUREVICH, Alexey *et al.* **QUAST:** quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics, [S. I.], v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013.

HARBARTH, S *et al.* **Antibiotic research and development:** business as usual? *J. Antimicrob. Chemother.*, [S. I.], v. 70, n. 6, p. 1604-7, 1 fev. 2015.

HAENSCH, Stephanie *et al.* **Distinct Clones of *Yersinia pestis* Caused the Black Death.** *Plos Pathogens*, [S. I.], v. 6, n. 10, p. 1-9, 7 out. 2010. DOI 10.1371/journal.ppat.1001134. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1001134>. Acesso em: 16 jul. 2020.

HAWGOOD, Barbara J. **Alexandre Yersin (1863–1943):** discoverer of the plague bacillus, explorer and agronomist. *Journal of Medical Biography*, [S. I.], v. 16, p. 167-172, 1 ago. 2008. DOI <https://doi.org/10.1258/jmb.2007.007017>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/jmb.2007.007017>. Acesso em: 16 jul. 2020.

HARIR, Mohammed *et al.* ***Streptomyces* Secondary Metabolites:** A historical perspective. *In: BASIC Biology and Applications of Actinobacteria*. [S. I.]: Shymaa Enany, 2018. cap. 6, p. 108-122. ISBN 978-1-78984-615-7.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. **The sequence of sequencers:** The history of sequencing DNA. *Genomics*, [S. I.], v. 107, n. 1, p. 1-8, 1 jan. 2016. DOI 10.1016/j.ygeno.2015.11.003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4727787/#:~:text=2-,First%2Dgeneration%20DNA%20sequencing,encoding%20proteins%20in%20nucleic%20acids>. Acesso em: 13 jul. 2020.

HELFRICH, Eric J N *et al.* **Bacterial Terpene Biosynthesis:** Challenges and Opportunities for Pathway Engineering. *Beilstein J. Org. Chem.*, [S. I.], v. 15, p. 2889–2906, 29 nov. 2019. DOI 10.3762/bjoc.15.283. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6902898/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

HENSON, Karl Evans R *et al.* **Glycopeptide antibiotics:** evolving resistance, pharmacology and adverse event profile. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, [S. I.], v. 13, n. 10, p. 1265-1278, 12 jul. 2015. DOI <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1068118>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14787210.2015.1068118>. Acesso em: 13 jul. 2020.

HIDER, Robert C; KONG, Xiaole. **Chemistry and Biology of Siderophores.** *Nat. Prod. Rep.*, [S. I.], v. 27, n. 5, p. 637-657, 7 mar. 2010. DOI 10.1039/b906679a. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/NP/b906679a#!divAbstract>. Acesso em: 10 jul. 2020.

HOLLAND, B. R. *et al.* **δ Plots:** A Tool for Analyzing Phylogenetic Distance Data. *Molecular Biology and Evolution*, [S. I.], v. 19, n. 12, p. 2051–2059, 1 dez. 2002.

HOLLENBECK, Brian L.; RICE, Louis B. **Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus.** *Landes Bioscience*, [S. I.], v. 3, n. 5, p. 421-433, 15 ago. 2012.

HOLLEY, R W *et al.* **Structure of a ribonucleic acid.** *Science*, [S. I.], v. 147, n. 3664, p. 1462-1465, 19 mar. 1965. DOI 10.1126/science.147.3664.1462. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/147/3664/1462.long>. Acesso em: 11 jul. 2020.

HOLLSTEIN, Ulrich. **Actinomycin:** Chemistry and Mechanism of Action. *Chem. Rev.*, [S. I.], v. 74, n. 6, p. 625-652, 1 dez. 1974. DOI <https://doi.org/10.1021/cr60292a002>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr60292a002>. Acesso em: 16 jul. 2020.

HOSHINO, Shotaro; ONAKA, Hiroyasu; ABE, Ikuro. **Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria.** *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, [S. I.], v. 46, n. (3-4), p. 363-374, 1 mar. 2019.

HOUBRAKEN, Jos; FRISVAD, Jens C.; SAMSON, Robert A. **Fleming's Penicillin Producing Strain Is Not *Penicillium Chrysogenum* but *P. Rubens*.** *IMA Fungus*, [S. I.], v. 2, n. 1, p. 87-95, jun.2011.

(IBGE) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019 Biomas e Sistema Costeiro-Marinho do Brasil. [S. l.: s. n.], 2019. Mapa. Escala 1:250 000. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/15842-biomas.html?edicao=25799&t=acesso-ao-produto>. Acesso em: 21 jul. 2020.

_____. IBGE lança o Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil, em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade. [S. l.], 2004. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/12789-asi-ibge-lanca-o-mapa-de-biomas-do-brasil-e-o-mapa-de-vegetacao-do-brasil-em-comemoracao-ao-dia-mundial-da-biodiversidade>. Acesso em: 21 jul. 2020.

ILLUMINA. **History of Illumina Sequencing**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/illumina-sequencing-history.html>. Acesso em: 21 jul. 2020.

_____. **Illumina Sequencing Technology**: Highest data accuracy, simple workflow, and a broad range of applications. San Diego-US: Illumina, Inc., 2020. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf. Acesso em: 15/07/2020.

_____. **Understanding the NGS workflow**. San Diego-US: Illumina, Inc., 2020. Disponível em: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>. Acesso em: 23/07/2020.

_____. **Quality Scores for Next-Generation Sequencing**: Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. San Diego-US: Illumina, Inc., 31 out. 2011. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf. Acesso em: 11 jul. 2020.

IMPERI, Francesco *et al.* **Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity**. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, [S. l.], v. 110, n. 18, p. 7458–7463, 30 abr. 2013.

JACKSON, D A; SYMONS, R H; BERG, P. **Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40**: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, [S. l.], v. 69, n. 10, p. 2904-9, 1 set. 1972. DOI 10.1073/pnas.69.10.2904. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389671/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

JACOBY, George A. **Mechanisms of Resistance to Quinolones**. Clin. Infect. Dis., [S. l.], v. 41, p. 20-26, 15 ago. 2005. DOI 10.1086/428052. Disponível em: https://academic.oup.com/cid/article/41/Supplement_2/S120/307501. Acesso em: 12 jul. 2020.

JR, Milton H. Saier; TRAN, Can V.; BARABOTE, Ravi D. **TCDB: The Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information**. Nucleic Acids Res, [S. l.], v. 34, p. 181-186, 1 jan. 2006.

KANEHISA, Minoru *et al.* **KEGG as a reference resource for gene and protein annotation**. Nucleic Acids Research, [S. l.], v. 44, p. 457-462, 4 jan. 2016.

KANSOH, A. L.; NAGIEB, Z. A. **Xylanase and Mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp**. Antonie van Leeuwenhoek, [S. l.], v. 85, p. 103-114, 1 fev. 2004.

KAYSSER, Leonard *et al.* **Merochlorins A–D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases**. J. Am. Chem. Soc., [S. l.], v. 134, n. 29, p. 11988-11991, 25 jul. 2012.

KEATING, Thomas A.; MARSHALL, C. Gary; WALSH, Christopher T. **Reconstitution and Characterization of the *Vibrio cholerae* Vibriobactin Synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH†**. *Biochemistry*, [S. l.], v. 39, n. 50, p. 15522-15530, 22 nov. 2000.

KEMPER, Nicole. **Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment**. *Ecological Indicators*, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1-13, 1 jan. 2008. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1470160X07000647>. Acesso em: 19 jul. 2020.

KHAN, S. T. *et al.* ***Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.: biosynthetic genes for secondary metabolites and products**. *Environmental Microbiol.*, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 391-403, 1 fev. 2013.

KIM, Seung Bum *et al.* ***Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici (1943)AL) emend. Rainey et al. 1997**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, [S. l.], v. 83, p. 107-116, mar. 2003.

KIMERA, Zuhura I *et al.* **Determination of Oxytetracycline Residues in Cattle Meat Marketed in the Kilosa District, Tanzania**. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 1-5, 27 nov. 2015.

KITUA, Andrew Y.; MALEBO, Hamisi M. Chincona. *In*: WILLCOX, Merlin *et al.* **Traditional herbs medicines for modern times: Traditional medicinal of plants and malária**. 1. ed. [S. l.]: CRC Press, 2004. cap. 2, p. 22-47. ISBN 0415301122.

KLAUSEN, Cecilie *et al.* **Abundance of actinobacteria and production of geosmin and 2-methylisoborneol in Danish streams and fish ponds**. *Microbiology ecology*, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 265-278, 1 abr. 2005.

KOMAKI, Hisayuki *et al.* **Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains**. *Scientific Reports*, [S. l.], v. 8, n. 6888, p. 1-11, 2 maio 2018.

KUZUYAMA, Tomohisa; SETO, Haruo. **Two distinct pathways for essential metabolic precursors for isoprenoid biosynthesis**. *Proceedings of the Japan Academy Ser B Physical and Biological Sciences*, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 41-52, 9 mar. 2012. DOI 10.2183/pjab.88.41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365244/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LAGESEN, Karin *et al.* **RNAmmr: Consistent and Rapid Annotation of Ribosomal RNA Genes**. *Nucleic Acids Res*, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 3100-3108, 22 abr. 2007. DOI 10.1093/nar/gkm160. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888812/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LAMB, Audrey L. **Breaking a pathogen's iron will: inhibiting siderophore production as an antimicrobial strategy**. *Biochim. Biophys. Acta.*, [S. l.], v. 1854, n. 8, p. 1054-1070, 10 maio 2015. DOI 10.1016/j.bbapap.2015.05.001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457648/#R22>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LANE, Nick. **The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'**. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, [S. l.], v. 370, n. 1666, p. 1-10, 19 abr. 2015.

LANÇAS, Fernando M. **A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"?**. *Scientia Chromatographica*, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009. Disponível em: <http://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a4.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2020.

LASA, Aide; ROMALDE, Jesús L. **Genome Sequence of Three *Psychrobacter* Sp. Strains With Potential Applications in Bioremediation**. *Genom. Data.*, [S. l.], v. 12, p. 7-10, 14 fev. 2017. DOI 10.1016/j.gdata.2017.01.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213596016302161?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jul. 2020.

LEE, Imchang *et al.* **OrthoANI**: An Improved Algorithm and Software for Calculating Average Nucleotide Identity. *Int J Syst Evol Microbiol.*, [S. I.], v. 66, n. 2, p. 1100-1103, 1 fev. 2016.

LEFORT, Vincent; DESPER, Richard; GASCUEL, Olivier. **FastME 2.0**: A Comprehensive, Accurate, and Fast Distance-Based Phylogeny Inference Program. *Molecular Biology and Evolution*, [S. I.], v. 32, n.10, p.2798–2800, 30 jun. 2015.

LEVINSON, Warren. **Fármacos Antimicrobianos: Mecanismos de Ação**. *In: _____*. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. ISBN 9788580555561.

LI, Dinghua *et al.* **MEGAHIT**: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, [S. I.], v. 31, n. 10, p. 1674–1676, 20 jan. 2015.

LING, Losee L. *et al.* **A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance**. *Nature*, [S. I.], v. 517, p. 455–459, 7 jan. 2015.

LO GRASSO, Letizia; MARTINO, Delia Chillura; ALDUINA, Rosa. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. *In: DHANASEKARAN, Dharumadurai (ed.)*. **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**. [S. I.]: IntechOpen, 2016. cap. 7, p. 177-198. ISBN 978-953-51-2248-7.

MÄKINEN, Veli; SALMELA, Leena; YLINEN, Johannes. **Normalized N50 assembly metric using gap-restricted co-linear chaining**. *BMC Bioinformatics*, [S. I.], v. 13, n. 255, p. 1-5, 3 out. 2012.

MALATHI, Kullappan; RAMAIAH, Sudha. **Bioinformatics approaches for new drug discovery: a review**. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, [S. I.], p. 243-260, 31 jul. 2018.

MANEKAR, S. C.; SATHE, S.R. **A benchmark study of k-mer counting methods for high-throughput sequencing**. *GigaScience*, [S. I.], v. 7, n. 12, p. 1-58, 1 dez. 2018.

MANYI-LOH, Christy *et al.* **Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications**. *Molecules*, [S. I.], v. 23, n. 795, p. 1-48, 1 abr. 2018.

MARTENS, Evan; DEMAIN, Arnold L. **Platensimycin and platencin**: promising antibiotics for future application in human medicine. *The Journal of Antibiotics* volume, [S. I.], v. 64, p. 705-710, 14 set. 2011.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A; JACOBY, G A. **Quinolone resistance from a transferable plasmid**. *Lancet*, [S. I.], n. 9105, p. 797-9, 14 mar. 1998. DOI 10.1016/S0140-6736(97)07322-4. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(97\)07322-4/fulltext#articleInformation](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(97)07322-4/fulltext#articleInformation). Acesso em: 13 jul. 2020.

MÁSSON, M. *et al.* **Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan**. *Carbohydrate Polymers*, [S. I.], v. 74, n. 3, p. 566-571, 1 out. 2008.

MAXAM, A M; GILBERT, W. **A new method for sequencing DNA**. *PNAS*, [S. I.], v. 74, n. 2, p. 560-564, 1 fev. 1977.

MCCORMICK, M H *et al.* **Vancomycin, a new antibiotic**: I. Chemical and biologic properties. *Antibiot Annu.*, [S. I.], v. 3, p. 606-611, 1955-1956.

MCDUGALL, Conan. Aminoglicosídeos. *In: BRUNTON, Laurence L. et al.* **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. [S. I.]: Artmed, 2018. cap. 58. ISBN 8580556147.

_____. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. *In: _____*. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. [S. I.]: Artmed, 2018. cap. 59. ISBN 8580556147.

_____. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos. *In*: _____. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. [S. l.]: Artmed, 2018. cap. 57. ISBN 8580556147.

_____. Sulfonamidas, sulfametoxazol-trimetoprima, quinolonas e agentes para infecções do trato urinário. *In*: _____. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 13. ed. [S. l.]: Artmed, 2018. cap. 56. ISBN 8580556147.

MCGINNIS, Scott; MADDEN, Thomas L. **BLAST**: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 32, p. 20-25, 1 jul. 2004.

MCGUIRE, J M *et al.* **Ilotycin, a new antibiotic**. *Schweiz Med. Wochenschr.*, [S. l.], v. 82, n. 41, p. 1064-1065, 11 out. 1952.

MEDEMA, Marnix H. *et al.* **AntiSMASH**: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 39, p. 339-346, 14 jun. 2011.

MEDEMA, Marnix H *et al.* **Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster**. *Nat. Chem. Biol.*, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 625-631, 1 set. 2015.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. **TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy**. *Nature Communications*, [S. l.], v. 10, n. 2182, p. 1-10, 16 maio 2019.

MEIER-KOLTHOFF, Jan P *et al.* **Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions**. *BMC Bioinformatics*, [S. l.], v. 14, n. 60, p. 1-14, 21 mar. 2013.

MIAO, Vivian; DAVIES, Julian. **Actinobacteria: The Good, the Bad, and the Ugly**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 143-150, 1 ago. 2010.

MICHAEL, Carolyn Anne; DOMINEY-HOWES, Dale; LABBATE, Maurizio. **The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management**. *Front Public Health.*, [S. l.], v. 2, n. 145, p. 1-8, 16 set. 2014.

MILLER, Bradley R; GULICK, Andrew M. **Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases**. *Methods Mol. Biol.*, [S. l.], v. 1401, p. 3-29, 1 maio 2016.

(MMA) Ministério do Meio Ambiente. **Caatinga**. [S. l.], [2010-2020]. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>. Acesso em: 21 jul. 2020.

MONFERDINI, Renato *et al.* **Uso de probióticos na produção animal**. *Pubvet, Londrina*, v. 4, n. 35, p. 1-11, 2010.

MOHIMANI, Hosein *et al.* **Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra**. *Nature Communications*, [S. l.], v. 9, n. 4035, p. 1-12, 2 out. 2018.

MOHIMANI, Hosein *et al.* **Automated Genome Mining of Ribosomal Peptide Natural Products**. *ACS Chem Biol.*, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 1545-51, 18 jul. 2014.

MULLIS, K. *et al.* **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro**: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 263-73, 1986. DOI 10.1101/sqb.1986.051.01.032. Disponível em: <http://symposium.cshlp.org/content/51/263.long>. Acesso em: 13 jul. 2020.

MURASE, Masao *et al.* **Identification of an Antibiotic Produced by *S. galbus*, N. sp. with Streptomycin**. *J. Antibiot. (Tokyo)*, [S. l.], v. 12, p. 126-132, 1 jul. 1959.

NAKAJIMA, Yoshinori. **Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics**. Journal of Infection and Chemotherapy, [S. l.], v. 5, p. 61–74, jun. 1999.

NAM, JY *et al.* **Actinomycin D, C2 and VII, inhibitors of Grb2-SHC interaction produced by Streptomyces**. Bioorg. Med. Chem. Lett., [S. l.], v. 8, n. 15, p. 2001-2002, 4 ago. 1998. DOI 10.1016/s0960-894x(98)00345-x. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X9800345X?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jul. 2020.

(NCBI) National Center for Biotechnology Information. National Database of Antibiotic Resistant Organisms (NDARO). [S.l.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>. Acesso em: 23/07/2020.

NETT, Markus; IKEDA, Haruo; MOORE, Bradley S. **Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes**. Nat. Prod. Rep., [S. l.], v. 26, n. 11, p. 1362–1384, 1 set. 2009. DOI 10.1039/b817069j. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063060/>. Acesso em: 21 jul. 2020.

OGASAWARA, Yasushi *et al.* **Identification of actinomycin D as a specific inhibitor of the alternative pathway of peptidoglycan biosynthesis**. The Journal of Antibiotics, [S. l.], v. 73, p. 125-127, fev. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0252-2>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41429-019-0252-2>. Acesso em: 16 jul. 2020.

OKAMI, Y. *et al.* **Streptomyces galbus nov. sp. and some remarks on Streptomyces producing streptomycin-group antibiotics**. J. Antibiot. (Tokyo), [S. l.], v.12, p.257-62, 1 set. 1959.

OLIVEIRA, Raimundo Carmo de. **Potencial antimicrobiano de Actinomicetos de solos amazônicos**. Orientador: Dra. Clarice Maia Carvalho. 2018. 63 p. Dissertação (Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica) - Mestrado, Rio Branco- AC, 2018.

ONDOV, Brian D. *et al.* **Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash**. Genome Biology, [S. l.], v.17, n. 132, p.1-14, 20 jun. 2016.

O'NEILL J. **Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations**. Londres, Reino Unido, 2016.

OMS. Organização Pan Americana de Saúde. **Folha informativa – COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus)**. [S. l.], 2020. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875. Acesso em: 10 jul. 2020.

(OMS) Organização Mundial da Saúde. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. 2019.

_____. **No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections**. Genebra, Suíça: OMS; Abril, 2019.

_____. **The fight against Antimicrobial Resistance is significant for cancer prevention and treatment**. [S. l.], 1 jul. 2019. Disponível em: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/419040/06_Factsheet_Cancer_EN_WHO_PRO2.pdf?ua=1. Acesso em: 21 jul. 2020.

PANTHEE, Suresh *et al.* **In silico identification of lysocin biosynthetic gene cluster from Lyso bacter sp. RH2180-5**. The Journal of Antibiotics, [S. l.], v. 70, p. 204–207, 24 ago. 2016. DOI 10.1038/ja.2016.102. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27553855/>. Acesso em: 20 jul. 2020.

PARTE, A.C. **LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net)**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, [S. l.], v. 68, p. 1825-1829, 2018.

PRADO, D. E. *et al.* As Caatingas da América do Sul. *In*: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, José Maria Cardoso da (ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 822. ed. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. cap. 1.

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima *et al.* **Antibiotics produced by Streptomyces**. *Braz. J. Infect. Dis.*, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 466-471, 1 set. 2012.

PRZYBOCKI, Mark *et al.* **The NIST 2008 Metrics for Machine Translation Challenge: Overview, Methodology, Metrics, and Results**. NIST, [S. l.], 10 mar. 2010.

QUADRI, L E *et al.* **Identification of a Mycobacterium Tuberculosis Gene Cluster Encoding the Biosynthetic Enzymes for Assembly of the Virulence-Confering Siderophore Mycobactin**. *Chem. Biol.*, [S. l.], v. 5, n. 11, p. 631-645, 16 out. 1998. DOI 10.1016/s1074-5521(98)90291-5. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(98\)90291-5.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552198902915%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(98)90291-5.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074552198902915%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 10 jul. 2020.

RAMAKRISHNAN, Girija. **Iron and Virulence in *Francisella tularensis***. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, [S. l.], v. 7, n. 107, p. 1-7, 4 abr. 2017.

RAMSAY, Bruce A. *et al.* **Production of Poly-(P-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acids**. *Applied and Environmental Microbiology*, [S. l.], v. 56, n. 7, p. 2093-2098, 1 jul. 1990.

REES, Douglas C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. **ABC transporters: the power to change**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S. l.], v. 10, p. 218-227, 1 mar. 2009. DOI <https://doi.org/10.1038/nrm2646>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm2646#citeas>. Acesso em: 15 jul. 2020.

RICE, Louis B.; BONOMO, Robert A. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. *In*: LORIAN, Victor (ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. Nova Iorque: [s. n.], 2005. cap. 10, p. 441-476.

RISDIAN, Chandra; MOZEF, Tjandrawati; WINK, Joachim. **Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces***. *Microorganisms*, [S. l.], v.7, n.124, p.1-18, 9 maio 2019.

ROBERTS, Marilyn C. **Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution**. *FEMS Microbiology Reviews*, [S. l.], v. 19, p. 1-24, 1996.

RONAGHI, M. *et al.* **Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release**. *Anal Biochem.*, [S. l.], v. 242, n. 1, p. 84-89, 1 nov. 1996. DOI 10.1006/abio.1996.0432. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269796904327?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2020.

RUSK, Nicole. **Torrents of sequence**. *Nature Methods*, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 44, 20 dez. 2010. DOI 10.1006/abio.1996.0432. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269796904327?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2020.

SAH, Ranjit *et al.* **Complete Genome Sequence of a 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Strain Isolated in Nepal**. *Microbiology Resource Announcements*, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 169-20, mar. 2020. DOI 10.1128/MRA.00169-20. Disponível em: <https://mra.asm.org/content/9/11/e00169-20/>. Acesso em: 11 jul. 2020.

SAINI, Anita *et al.* **Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes**. *Hindawi*, [S. l.], v. 2015, n. 279381, p. 1-15, 17 dez. 2015.

SANDLE, Tim. **Teixobactin: A New Class of Antibiotic**. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1-2, 12 fev. 2015.

SANGER, Frederick. The chemistry of insulin. *In*: AB, Nobel Media. **Frederick Sanger- Nobel Lecture**. [S. l.]: The Nobel Prize, 11 dez. 1958. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/sanger/lecture/>. Acesso em: 9 jul. 2020;

SANGER, F; BROWNLEE, G G; BARRELL, B G. **A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides**. *Journal of Molecular Biology*, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 373-398, 1 set. 1965. DOI 10.1016/s0022-2836(65)80104-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283665801048?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jul. 2020.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors**. *PNAS*, [S. l.], v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1 dez. 1977.

SAYERS, Samantha *et al.* **Victors**: a web-based knowledge base of virulence factors in human and animal pathogens. *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 693-700, 8 jan. 2019. DOI <https://doi.org/10.1093/nar/gky999>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D693/5144967>. Acesso em: 13 jul. 2020.

SCHOMBURG, Ida *et al.* **BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments**. *Nucleic Acids Res*, [S. l.], v. 32, p. 431-433, 1 jan. 2004.

SENGES, Christoph H. R. *et al.* **The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry**. *PNAS*, [S. l.], v. 115, n. 10, p. 2490-2495, 20 fev. 2018.

SENSI, P; GRECO, A M; BALLOTTA, R. Rifomycin: I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. *Antibiot Annu.*, [S. l.], v.7, p.262-270, 1959-1960.

SELLSTEDT, Anita; RICHAU, Kerstin H. **Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia***. *FEMS Microbiology Letters*, [S. l.], v. 342, n. 2, p. 179-186, 5 mar. 2013.

SHENDURE, Jay *et al.* **DNA sequencing at 40**: past, present and future. *Nature*, [S. l.], v.550, p.345-353, 19 out. 2017.

SILBERGELD, Ellen K.; GRAHAM, Jay; PRICE, Lance B. **Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health**. *Annu. Rev. Public Health*, [S. l.], v.29, n.1, p.151-169, Abril. 2008.

SINGH, Sheo B. *et al.* **Isolation, Structure, and Absolute Stereochemistry of Platensimycin**: A Broad Spectrum Antibiotic Discovered Using an Antisense Differential Sensitivity Strategy. *J. Am. Chem. Soc.*, [S. l.], v. 128, n. 36, p. 11916–11920, 19 ago. 2006. DOI <https://doi.org/10.1021/ja062232p>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja062232p>. Acesso em: 20 jul. 2020.

SINGH, Sheo B.; GENILLOUD, Olga; PELÁEZ, Fernando. **Terrestrial Microorganisms – Filamentous Bacteria**. *In*: MANDER, Lewis; LIU, Hung-Wen (ed.). *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. 1. ed. [S. l.]: Elsevier, 2010. v.2, cap. 2.05, p. 109-140. ISBN 0080453813.

SINGH, Sheo B; YOUNG, Katherine; SILVER, Lynn L. **What Is an "Ideal" Antibiotic?: Discovery Challenges and Path Forward**. *Biochem Pharmacol.*, [S. l.], v. 133, p. 63-73, 1 jun. 2017. DOI 10.1016/j.bcp.2017.01.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295217300187?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jul. 2020.

SLATKO, Barton E.; GARDNER, Andrew F.; AUSUBEL, Frederick M. **Overview of Next Generation Sequencing Technologies**. *Curr Protoc Mol Biol.*, [S. l.], v. 122, n. 1, p. 59-74, 1 ago. 2018. DOI 10.1002/cpmb.59. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6020069/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

STIRRETT, Karen L. *et al.* **Small-molecules with structural similarities to siderophores as novel antimicrobials against *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*.** *Bioorg Med Chem Lett.*, [S. I.], v. 18, n. 8, p. 2662–2668., 18 mar. 2008. DOI 10.1016/j.bmcl.2008.03.025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2430880/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SUAREZ, Javier; RANGUELOVA, Kalina; MAGLIOZZO, Richard S. **Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Peroxidase intermediate bypass causes poor isoniazid activation by the S315G mutant of *M. tuberculosis* catalase-proxidase.** *Journal of Biological Chemistry*, [S. I.], v. 228, n. 24, p. 16.146-16.155, 12 jun. 2009.

SUN, Ye *et al.* **Diversity of Bacteria and the Characteristics of Actinobacteria Community Structure in Badain Jaran Desert and Tengger Desert of China.** *Front. Microbiol.*, [S. I.], v. 9, n. 1068, p. 1-14, 23 maio 2013.

SYDENSTRICKER, V P. **The History of Pellagra, Its Recognition as a Disorder of Nutrition and Its Conquest.** *Am J Clin Nutr.*, [S. I.], v. 6, n. 4, p. 409-414, Jul-Ago. 1958.

TABARELLI, Marcelo *et al.* **Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade.** *Ciência e Cultura*, [S. I.], v. 70, n. 4, p. [S.I.], out. 2018.

TATUSOVA, Tatiana *et al.* **NCBI prokaryotic genome annotation pipeline.** *Nucleic Acids Research*, [S. I.], v. 44, n. 14, p. 6614–6624, 19 ago. 2016.

TERRA, Luciana *et al.* **A Novel Alkaliphilic *Streptomyces* Inhibits ESKAPE Pathogens.** *Front. Microbiol.*, [S. I.], v. 9, n. 2458, p. 1-13, 16 out. 2018.

THIRUMURUGAN, Durairaj *et al.* An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. *In: Secondary Metabolites - Sources and Applications.* [S. I.]: Ramasamy Vijayakumar e Suresh S.S. Raja, 2018. cap. 1, p. 1-22.

TRAN, John H.; JACOBY, George A. **Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance.** *PNAS*, [S. I.], v. 99, n. 8, p. 5638–5642, 16 abr. 2002. DOI 10.1073/pnas.082092899. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC122823/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

TRAN, Phuong Nguyen *et al.* **Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [S. I.], v. 103, n. 8, p. 3277–3287, 12 mar. 2019. DOI 10.1007/s00253-019-09708-z. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6449301/>. Acesso em: 22 jul. 2020.

TRÉFOUËL, J. *et al.* **Activité du p-aminophénylsulfamide sur l'infection streptococcique expérimentale de la souris et du lapin.** *C. R. Soc. Biol.*, [S. I.], v. 120, n. 756, p. [S.I.], 23 nov. 1935.

VENTOLA, C. Lee. **The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats.** *PT*, [S. I.], v. 40, n. 4, p. 277–283, 1 abr. 2015.

UMEZAWA, H. *et al.* (ed.). **Index of Antibiotics From Actinomycetes (Volume I).** [S. I.]: University of Tokyo Press, 1967. 940 p. v.1.

VENTURA, Marco *et al.* **Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum.** *Microbiol Mol Biol Rev.*, [S. I.], v. 71, n. 3, p. 495–548, set. 2007.

VUILLEMIN, P. **Antibiose et symbiose.** *Association Française pour L'avancement des Sciences*, [S. I.], v. 18, n. 2, p. 525-43, 1890.

WALSH, Christopher T. **The Chemical Versatility of Natural-Product Assembly Lines.** *Acc. Chem. Res.*, [S. I.], v. 41, n. 1, p. 4-10, 17 maio 2007.

WALSH, C T *et al.* **Tailoring Enzymes That Modify Nonribosomal Peptides During and After Chain Elongation on NRPS Assembly Lines.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, [S. I.], v. 5, n. 5, p. 525-534, nov. 2001.

WAKSMAN, Selman A. **What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?** *Mycologia*, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 565-569, 9 set. 1947.

WAKSMAN, Selman A.; WOODRUFF, H. Boyd. **Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 609-614, 1 nov. 1940.

_____. **Streptothricin, a New Selective Bacteriostatic and Bactericidal Agent, Particularly Active Against Gram-Negative Bacteria.** *The New Jersey Agricultural Experiment Station, Nova Jérsei*, v. 49, n. 2, p. 207-210, 1 fev. 1942.

WANG, B. *et al.* **Unraveling the iterative type I polyketide synthases hidden in *Streptomyces*.** *PNAS*, [S. l.], v. 117, n. 15, p. 8449-8454, 14 mar. 2020.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. **16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community.** *Nature*, [S. l.], v. 345, n. 6270, p. 63-5, 3 maio 1990.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. **Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.** *Scientific Reports*, [S. l.], v. 171, p. 737-738, 25 abr. 1953.

WATTAM, Alice R. *et al.* **Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center.** *Nucleic Acids Res*, [S. l.], v. 45, p. 535-542, 4 jan. 2017.

WETTERSTRAND, Kris A. **The Cost of Sequencing a Human Genome.** [S. l.]: National Human Genome Research Institute, 30 out. 2019. Disponível em: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost#:~:text=Based%20on%20the%20data%20collected,sequence%20was%20generally%20below%20%241%2C000>. Acesso em: 11 jul. 2020.

WHITLEY, Kiara V.; TUELLER, Josie A.; WEBER, K. Scott. **Genomics Education in the Era of Personal Genomics: Academic, Professional, and Public Considerations.** *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 21, n. 768, p. 1-19, 24 jan. 2020. DOI 10.3390/ijms21030768. Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/ijms>. Acesso em: 11 jul. 2020.

WISHART, David S *et al.* **DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018.** *Nucleic Acids Research*, [S. l.], v. 46, p. 1074-1082, 4 jan. 2018.

WOODRUFF, H. Boyd. **Selman A. Waksman, Winner of the 1952 Nobel Prize for Physiology or Medicine.** *Appl. Environ. Microbiol.*, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 2-8, jan. 2014. doi: 10.3389/fmicb.2010.00134. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911012/>. Acesso em: 8 jul. 2020.

WOLFF, M. M.; STEPHENS, W. E. **A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion.** *The Review of Scientific Instruments*, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 616-617, 8 maio 1953.

WU, Ray; KAISER, A.D. **Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA.** *Journal of Molecular Biology*, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 523-537, 1988.

YAMADA, Yuuki *et al.* **Terpene synthases are widely distributed in bacteria.** *PNAS*, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 857-862, 20 jan. 2015.

YAMASHITA, Masamichi; FENN, John B. **Negative ion production with the electrospray ion source.** *J. Phys. Chem.*, [S. l.], v. 88, n. 20, p. 4671-4675, 1 set. 1984.

YANG, Yaran; XIE, Bingbing; YAN, Jiangwei. **Application of Next-Generation Sequencing Technology in Forensic Science.** *Genomics Proteomics Bioinformatics*, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 190-197, 14 out. 2014. DOI <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.gpb.2014.09.001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411420/>. Acesso em: 11 jul. 2020.

YOON, Seok-Hwan *et al.* **Introducing EzBioCloud**: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 5 maio 2017.

_____. **A Large-Scale Evaluation of Algorithms to Calculate Average Nucleotide Identity**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, [S. l.], v. 110, n. 10, p. 1281-1286, 15 fev. 2017.

YOU, Yaqi; SILBERGELD, Ellen K. **Learning From Agriculture**: Understanding Low-Dose Antimicrobials as Drivers of Resistome Expansion. *Front Microbiol.*, [S. l.], v. 5, n. 284, p. 132-142, 10 jun. 2014. DOI 10.3389/fmicb.2014.00284. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00284/full>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZENOVA, G. M.; MANUCHAROVA, N. A.; ZVYAGINTSEV, D. G. **Extremophilic and Extremotolerant Actinomycetes in Different Soil Types**. *Pochvovedenie*, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 417-436. 2011.

ZERBINO, Daniel R; BIRNEY, Ewan. **Velvet**: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 821-829, 18 maio 2008.

ZHAO, Bin *et al.* **Biosynthesis of the Sesquiterpene Antibiotic Albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2)**. *J. Biol. Chem.*, [S. l.], v. 283, n. 13, p. 8183-8189, 28 mar. 2008.

ZHANG, Wei *et al.* **Characterization of the Bafilomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces lohii***. *ChemBiochem.*, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 301-306, 11 fev. 2013.

ZHANG, Mingzi M *et al.* **CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters**. *Nature Chemical Biology*, [S. l.], p. 1-5, 10 abr. 2017. DOI 10.1038/nchembio.2341. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nchembio.2341>. Acesso em: 20 jul. 2020.

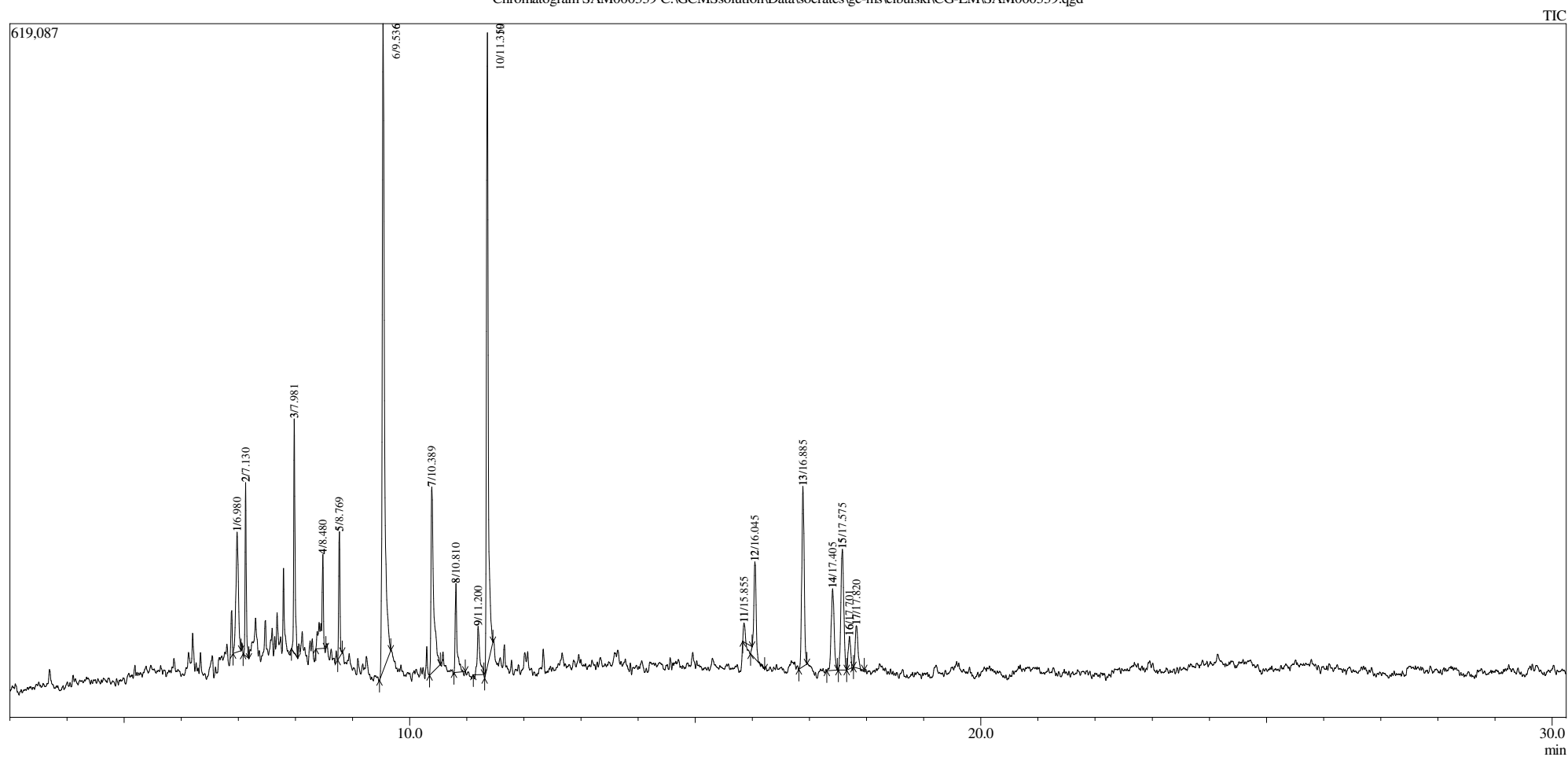
ZHOU, Yongjun *et al.* **Iterative Mechanism of Macrodiolide Formation in the Anticancer Compound Conglobatin**. *Chem. Biol.*, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 745-754, 18 jun. 2015.

ANEXO A – Resultado do CG do extrato do isolado I339

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise / LMCA | www.ufpb.br/lmca | lmca@ltf.ufpb.br | 08.2019
Arquivo: SAM000339.qgd | Descrição: | Data: 12/08/2019

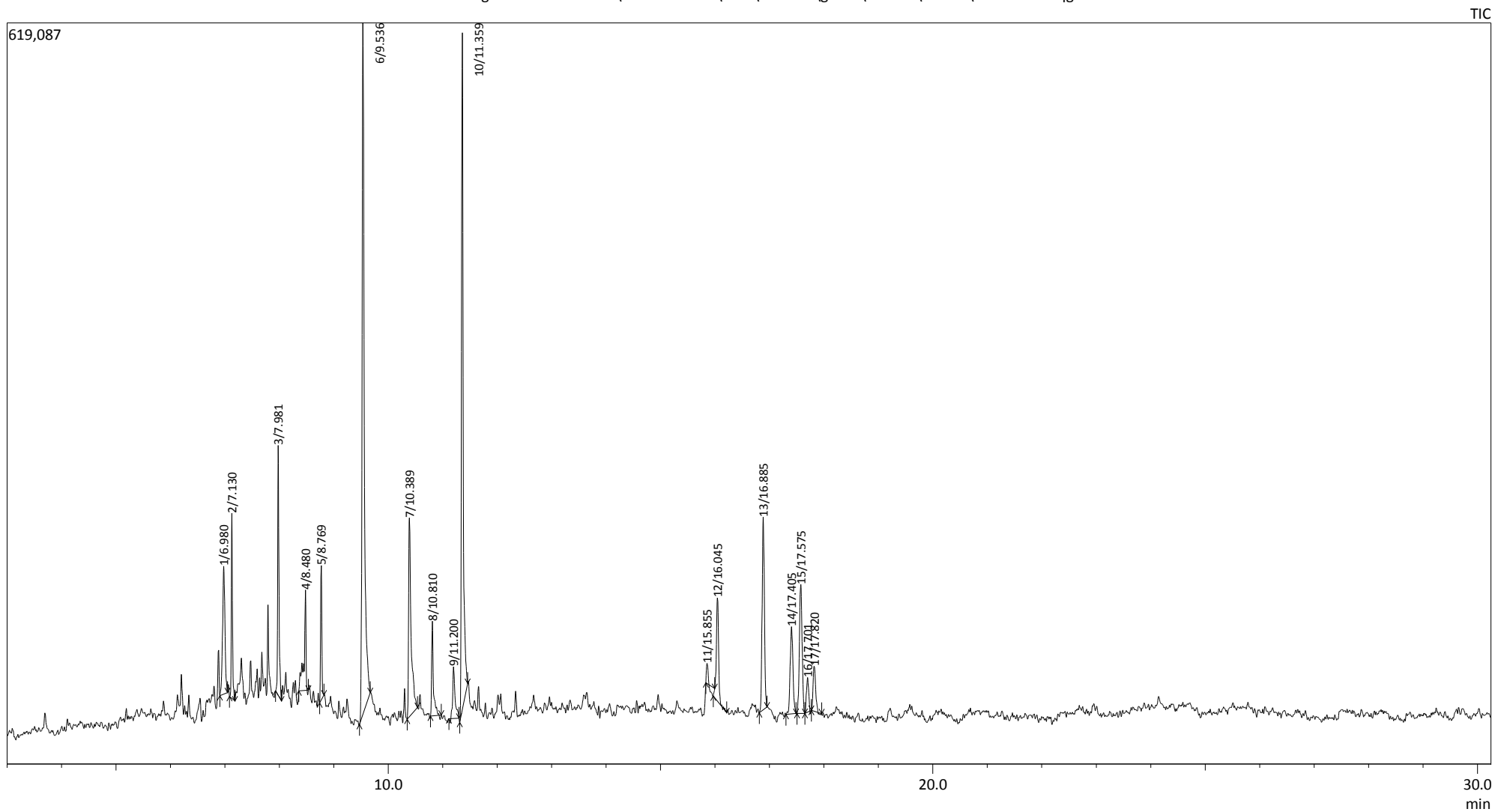
Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas: Modelo: GCMS-QP2010 Ultra | Marca: Shimadzu
Coluna: marca: RTX-5MS capilar (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane) Tamanho: 30 m (comprimento) / 0.25 mm de Diâmetro Interno / 0.25 um df

Chromatogram SAM000339 C:\GCMSsolution\Data\socrates\gc-ms\cibulski\CG-EMSAM000339.qgd



Cromatograma

Chromatogram SAM000339 C:\GCMSsolution\Data\socrates\gc-ms\cibulski\CG-EM\SAM000339.qgd





Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise / LMCA | www.ufpb.br/lmca | lmca@ltf.ufpb.br | 08.2019
 Arquivo: SAM000339.qgd | Descrição: | Data: 12/08/2019

Resultado: moléculas com maior índice de similaridade com os nossos Bancos de Dados
 Bancos de Dados: NIST2008 | NIST2008+Shimadzu | FFNSC 1.3

Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name	Base m/z
1	6.980	320117	4.87	3,5-Heptanedione, 2,2,6,6-tetramethyl- (CAS)	127.15
2	7.130	229585	3.49	Hexadecane (CAS)	57.10
3	7.981	351052	5.34	Tetradecane (CAS)	57.10
4	8.480	210448	3.20	Octadecane (CAS)	57.10
5	8.769	173118	2.63	Pentadecane (CAS)	57.10
6	9.536	1640015	24.96	Piperazine-2,5-dione, 1,4-dimethyl-3,3'-bis-	113.15
7	10.389	538242	8.19	Cyclopentanone, 3-butyl-	83.10
8	10.810	170993	2.60	Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-, trans- (104.10
9	11.200	128349	1.95	1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]non	70.10
10	11.359	1256921	19.13	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-	70.10
11	15.855	4999	0.08		221.20
12	16.045	250831	3.82		91.10
13	16.885	464737	7.07	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhex	149.10
14	17.405	259943	3.96	(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxid	91.10
15	17.575	373950	5.69	(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxid	91.10
16	17.701	78896	1.20	(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxid	91.10
17	17.820	118702	1.81	(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxid	91.10
		6570898	100.00		

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise / LMCA | www.ufpb.br/lmca | lmca@ltf.ufpb.br | 08.2019
 Arquivo: SAM000339.qgd | Descrição: | Data: 12/08/2019

Descrição do Método Utilizado

Method

[Comment]

===== Analytical Line 1 =====

[AOC-20i]

# of Rinses with Presolvent	:3
# of Rinses with Solvent(post)	:3
# of Rinses with Sample	:3
Plunger Speed(Suction)	:High
Viscosity Comp. Time	:0.2 sec
Plunger Speed(Injection)	:High
Syringe Insertion Speed	:High
Injection Mode	:Normal
Pumping Times	:5
Inj. Port Dwell Time	:0.3 sec
Terminal Air Gap	:No
Plunger Washing Speed	:High
Washing Volume	:8uL
Syringe Suction Position	:0.0 mm
Syringe Injection Position	:0.0 mm
Use 3 Solvent Vial	:1 vial

[GC-2010]

Column Oven Temp.	:80.0 °C
Injection Temp.	:285.00 °C
Injection Mode	:Split
Flow Control Mode	:Pressure
Pressure	:74.0 kPa
Total Flow	:37.3 mL/min
Column Flow	:1.11 mL/min
Linear Velocity	:38.8 cm/sec
Purge Flow	:3.0 mL/min
Split Ratio	:30.0
High Pressure Injection	:OFF
Carrier Gas Saver	:OFF
Splitter Hold	:OFF

Oven Temp. Program	Temperature(°C)	Hold Time(min)
Rate		
-	80.0	2.00
18.00	260.0	6.00
4.00	285.0	6.00

< Ready Check Heat Unit >

Column Oven	: Yes
SPL1	: Yes
MS	: Yes

< Ready Check Detector(FTD) >

< Ready Check Baseline Drift >

< Ready Check Injection Flow >

SPL1 Carrier	: Yes
SPL1 Purge	: Yes

< Ready Check APC Flow >

< Ready Check Detector APC Flow >

External Wait	:No
Equilibrium Time	:3.0 min

[GC Program]

[GCMS-QP2010 Ultra]

IonSourceTemp	:200.00 °C
Interface Temp.	:300.00 °C
Solvent Cut Time	:2.50 min
Detector Gain Mode	:Relative
Detector Gain	:0.79 kV +0.00 kV
Threshold	:0

[MS Table]

--Group 1 - Event 1--

Start Time	:3.00min
End Time	:30.25min
ACQ Mode	:Scan
Event Time	:0.30sec
Scan Speed	:3333
Start m/z	:40.00
End m/z	:1000.00

Sample Inlet Unit	:GC
-------------------	-----

[MS Program]

Use MS Program	:OFF
----------------	------

[Qualitative Parameters : Peak Integration]

Integration Mode	:Detail
# of Peaks	:
Slope	:300 /min
Width	:5 sec
Drift	:500 /min
T.DBL	:3000 min
Min. Area/Height	:90000

Base	:Height
Process Each Chromatogram Group Separately	:Yes
Smoothing Method	:Standard
# of Smoothing Times	:2
Smooth Width	:1 sec

[Similarity Search Parameters]

File1(Min.SI:80)	:C:\GCMSsolution\Library\NIST08.LIB
File2(Min.SI:80)	:C:\GCMSsolution\Library\Wiley9.lib
Search Depth	:2
Max Hit#	:25
Delete the same Compounds	:ON
Reverse Search	:OFF
--- Post-search ---	
Option (Match Case)	:OFF

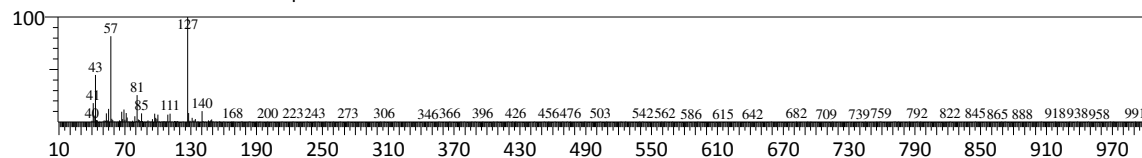
Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
 Laboratório Multusuário de Caracterização e Análise / LMCA | www.ufpb.br/lmca | lmca@ltf.ufpb.br | 08.2019
 Arquivo: SAM000339.qgd | Descrição: | Data: 12/08/2019

Resultado da Busca nos Bancos de Dados - Porcentagem de Similaridade

Library

<< Target >>

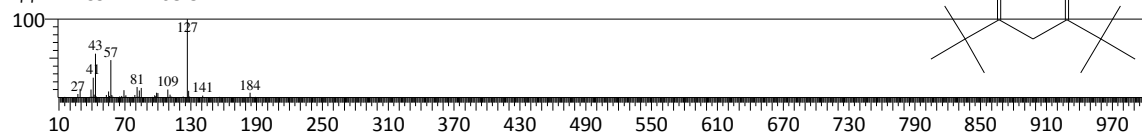
Line#:1 R.Time:6.980(Scan#:797) MolWeight:332 MassPeaks:509
 RawMode:Averaged 6.975-6.985(796-798) BasePeak:127.15(22617)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:109929 Library:Wiley9.lib

SI:85 Formula:C11H20O2 CAS:1118-71-4 MolWeight:184 BasePeak:127.00 RetIndex:0

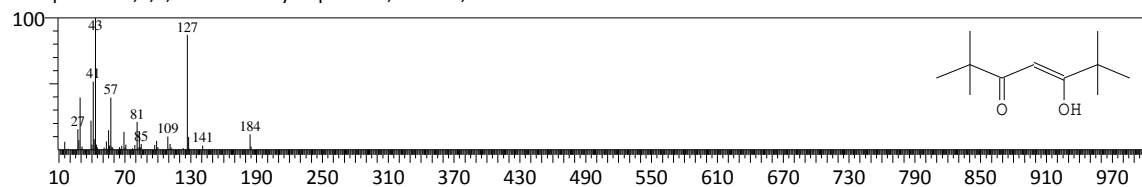
CompName:3,5-Heptanedione, 2,2,6,6-tetramethyl- (CAS) \$\$ Dipivaloylmethane \$\$ 2,2,6,6-Tetramethyl-3,5-heptanedione \$\$ (C H3)3CCOCH2COC(CH3)3 \$\$ 2,2,6,6-Tetramethylheptane-3,5-dione \$\$ 2,2,6,6-Tetramethyl heptanedione \$\$ Dipivaroylmethane \$\$ EINECS 214-268-3



Hit#:2 Entry:33292 Library:NIST08.LIB

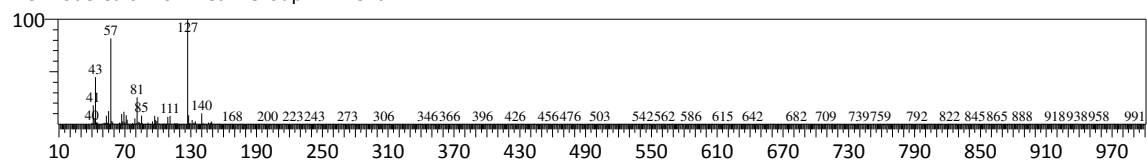
SI:81 Formula:C11H20O2 CAS:0-00-0 MolWeight:184 BasePeak:43.00 RetIndex:1206

CompName:2,2,6,6-Tetramethylheptane-3,5-dione, enol form



<< Target >>

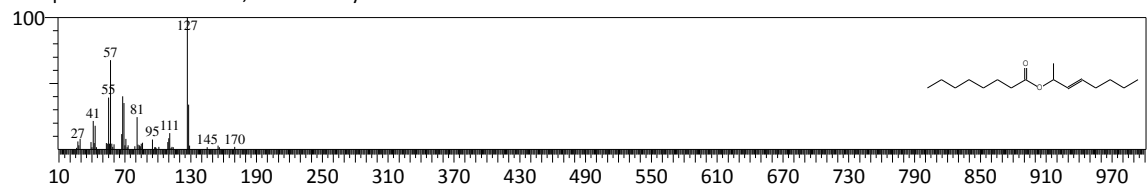
Line#:1 R.Time:6.980(Scan#:797) MolWeight:184 MassPeaks:509
RawMode:Averaged 6.975-6.985(796-798) BasePeak:127.15(22617)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:3 Entry:79219 Library:NIST08.LIB

SI:81 Formula:C16H30O2 CAS:0-00-0 MolWeight:254 BasePeak:127.00 RetIndex:1723

CompName:Octanoic acid, oct-3-en-2-yl ester

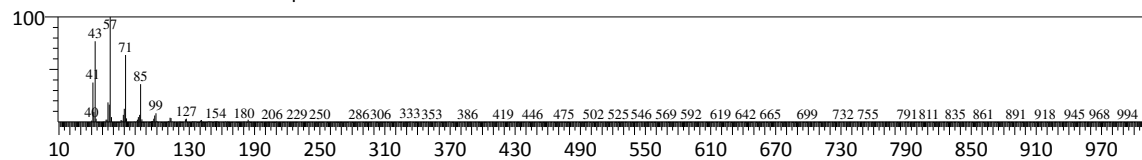


<< Target >>

Line#:2 R.Time:7.130(Scan#:827) MolWeight:254 MassPeaks:478

RawMode:Averaged 7.125-7.135(826-828) BasePeak:57.10(33932)

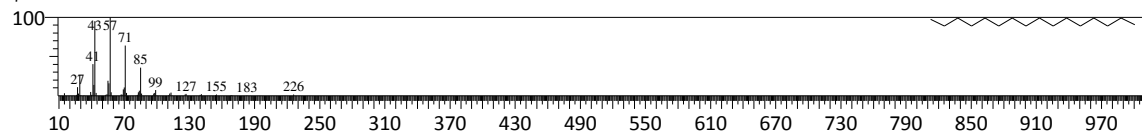
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:204464 Library:Wiley9.lib

SI:97 Formula:C16H34 CAS:544-76-3 MolWeight:226 BasePeak:57.00 RetIndex:0

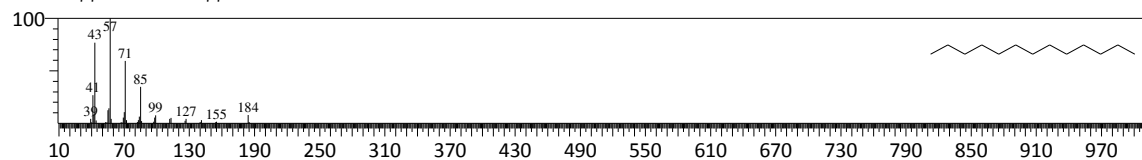
CompName:Hexadecane (CAS) \$\$ n-Hexadecane \$\$ Cetane \$\$ n-Cetane \$\$ Isohexadecane \$\$ HEXADECAN \$\$ n - hexadecane \$
 \$.n - hexadecanecetane \$\$ n - hexa - decane \$\$ AI3-06522 \$\$ BRN 1736592 \$\$ CCRIS 5833 \$\$ EINECS 208-878-9 \$\$ HSDB 6854 \$
 \$ NSC 7334



Hit#:2 Entry:110902 Library:Wiley9.lib

SI:97 Formula:C13H28 CAS:629-50-5 MolWeight:184 BasePeak:57.00 RetIndex:0

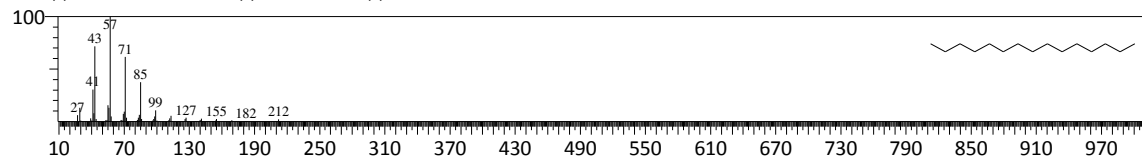
CompName:Tridecane (CAS) \$\$ n-Tridecane \$\$ Tridecane, n- \$\$ n - tri - decanene \$\$ n - tri - decane \$\$ EINECS 211-093-4 \$\$ HSD
 B 5727 \$\$ NSC 66205 \$\$ TRIDECAN



Hit#:3 Entry:171130 Library:Wiley9.lib

SI:96 Formula:C15H32 CAS:629-62-9 MolWeight:212 BasePeak:57.00 RetIndex:0

CompName:Pentadecane (CAS) \$\$ n-Pentadecane \$\$ CH3(CH2)13CH3 \$\$.n - penta - decane \$\$ n - penta - decane \$\$ BRN 1698
 194 \$\$ EINECS 211-098-1 \$\$ HSDB 5729 \$\$ NSC 172781

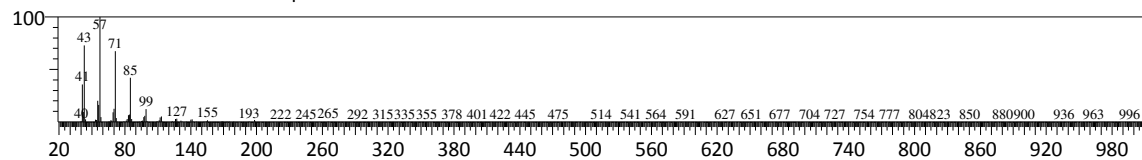


<< Target >>

Line#:3 R.Time:7.980(Scan#:997) MolWeight:212 MassPeaks:465

RawMode:Averaged 7.975-7.985(996-998) BasePeak:57.10(43742)

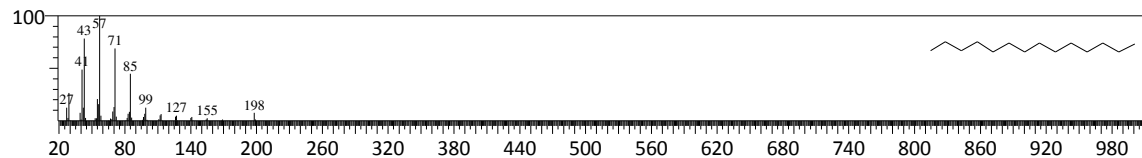
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:139659 Library:Wiley9.lib

SI:97 Formula:C14H30 CAS:629-59-4 MolWeight:198 BasePeak:57.00 RetIndex:0

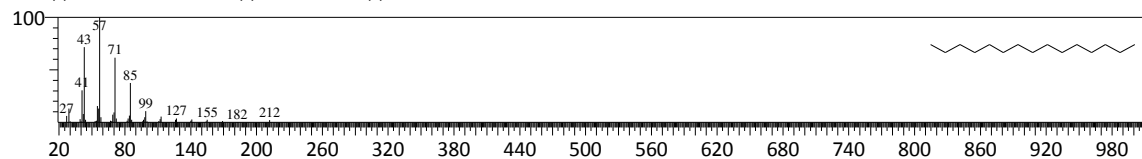
CompName:Tetradecane (CAS) \$\$ n-Tetradecane \$\$ Isotetradecane \$\$ n - tetra - decane \$\$ AI3-04240 \$\$ BRN 1733859 \$\$ CCR IS 715 \$\$ EINECS 211-096-0 \$\$ HSDB 5728 \$\$ NSC 72440



Hit#:2 Entry:171130 Library:Wiley9.lib

SI:96 Formula:C15H32 CAS:629-62-9 MolWeight:212 BasePeak:57.00 RetIndex:0

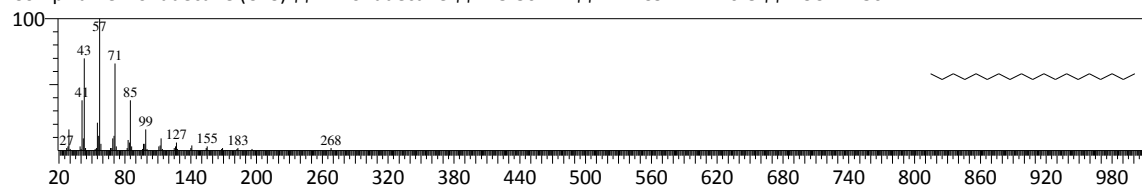
CompName:Pentadecane (CAS) \$\$ n-Pentadecane \$\$ CH3(CH2)13CH3 \$\$.n - penta - decane \$\$ n - penta - decane \$\$ BRN 1698 194 \$\$ EINECS 211-098-1 \$\$ HSDB 5729 \$\$ NSC 172781



Hit#:3 Entry:303194 Library:Wiley9.lib

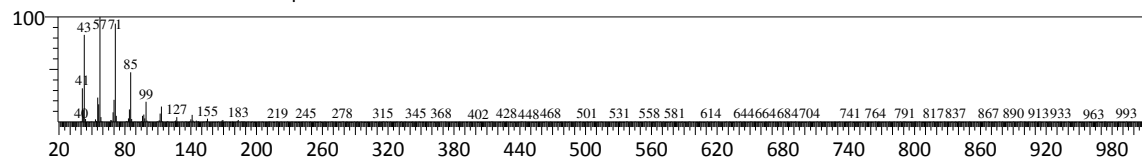
SI:96 Formula:C19H40 CAS:629-92-5 MolWeight:268 BasePeak:57.00 RetIndex:0

CompName:Nonadecane (CAS) \$\$ n-Nonadecane \$\$ AI3-36122 \$\$ EINECS 211-116-8 \$\$ NSC 77136



<< Target >>

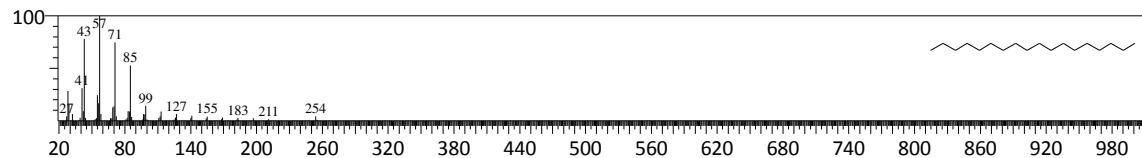
Line#:4 R.Time:8.480(Scan#:1097) MolWeight:268 MassPeaks:486
 RawMode:Averaged 8.475-8.485(1096-1098) BasePeak:57.10(15122)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:270362 Library:Wiley9.lib

SI:94 Formula:C18H38 CAS:593-45-3 MolWeight:254 BasePeak:57.00 RetIndex:0

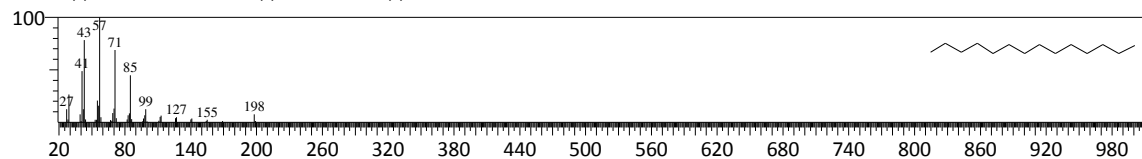
CompName:Octadecane (CAS) \$\$ n-Octadecane \$\$ Octadecan \$\$ n - octadecane \$\$ AI3-06523 \$\$ CCRIS 681 \$\$ EINECS 209-790-3 \$\$ NSC 4201



Hit#:2 Entry:139659 Library:Wiley9.lib

SI:93 Formula:C14H30 CAS:629-59-4 MolWeight:198 BasePeak:57.00 RetIndex:0

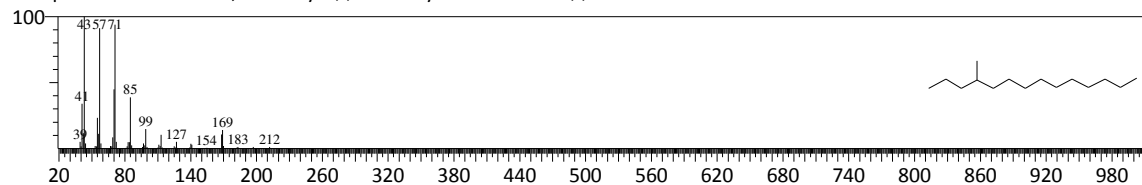
CompName:Tetradecane (CAS) \$\$ n-Tetradecane \$\$ Isotetradecane \$\$ n - tetra - decane \$\$ AI3-04240 \$\$ BRN 1733859 \$\$ CCRIS 715 \$\$ EINECS 211-096-0 \$\$ HSDB 5728 \$\$ NSC 72440



Hit#:3 Entry:50971 Library:NIST08.LIB

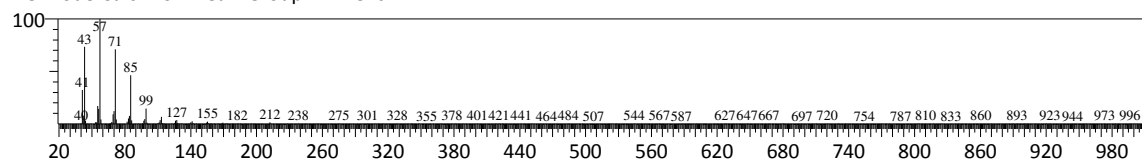
SI:93 Formula:C15H32 CAS:25117-24-2 MolWeight:212 BasePeak:43.00 RetIndex:1448

CompName:Tetradecane, 4-methyl- \$\$ 4-Methyltetradecane # \$\$



<< Target >>

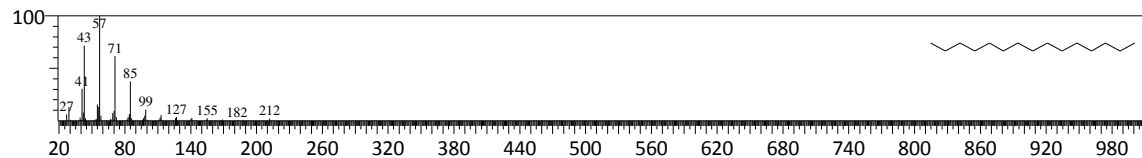
Line#:5 R.Time:8.770(Scan#:1155) MolWeight:212 MassPeaks:513
 RawMode:Averaged 8.765-8.775(1154-1156) BasePeak:57.10(23106)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:171130 Library:Wiley9.lib

SI:97 Formula:C15H32 CAS:629-62-9 MolWeight:212 BasePeak:57.00 RetIndex:0

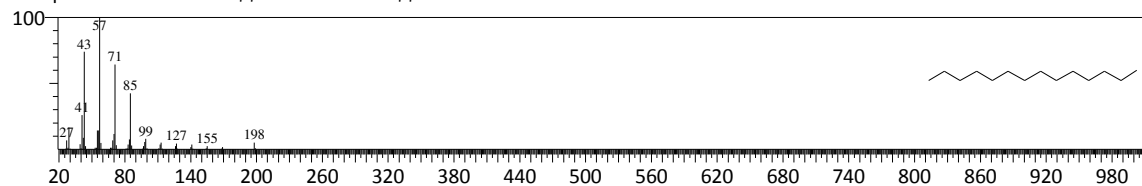
CompName:Pentadecane (CAS) \$\$ n-Pentadecane \$\$ CH3(CH2)13CH3 \$\$.n - penta - decane \$\$ n - penta - decane \$\$ BRN 1698
 194 \$\$ EINECS 211-098-1 \$\$ HSDB 5729 \$\$ NSC 172781



Hit#:2 Entry:41941 Library:NIST08.LIB

SI:96 Formula:C14H30 CAS:629-59-4 MolWeight:198 BasePeak:57.00 RetIndex:1413

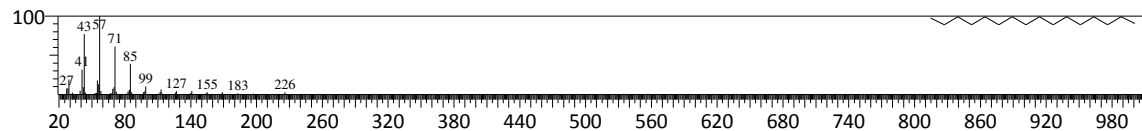
CompName:Tetradecane \$\$ n-Tetradecane \$\$



Hit#:3 Entry:204470 Library:Wiley9.lib

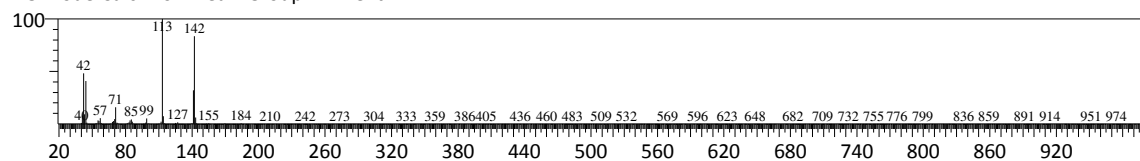
SI:96 Formula:C16H34 CAS:544-76-3 MolWeight:226 BasePeak:57.00 RetIndex:0

CompName:Hexadecane (CAS) \$\$ n-Hexadecane \$\$ Cetane \$\$ n-Cetane \$\$ Isohexadecane \$\$ HEXADECAN \$\$ n - hexadecane \$
 \$.n - hexadecanecetane \$\$ n - hexa - decane \$\$ AI3-06522 \$\$ BRN 1736592 \$\$ CCRIS 5833 \$\$ EINECS 208-878-9 \$\$ HSDB 6854 \$
 \$ NSC 7334



<< Target >>

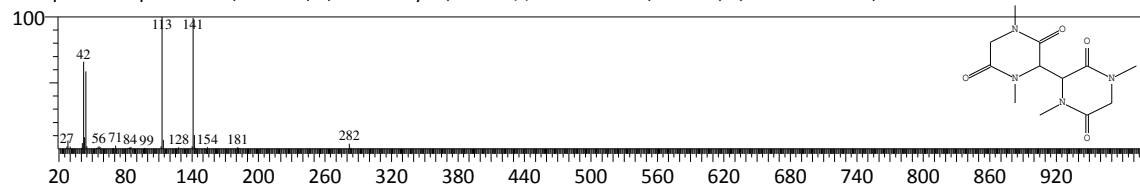
Line#:6 R.Time:9.535(Scan#:1308) MolWeight:226 MassPeaks:449
 RawMode:Averaged 9.530-9.540(1307-1309) BasePeak:113.15(142140)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:332889 Library:Wiley9.lib

SI:83 Formula:C12H18N4O4 CAS:0-00-0 MolWeight:282 BasePeak:113.00 RetIndex:0

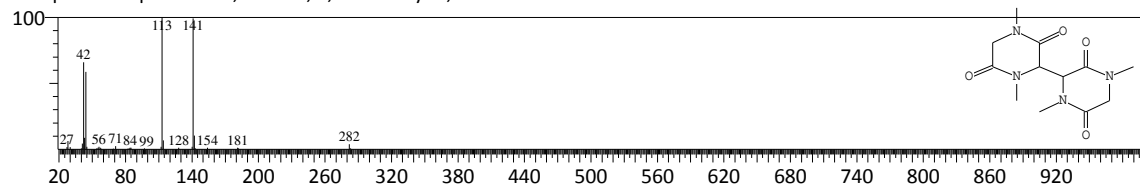
CompName:Piperazine-2,5-dione, 1,4-dimethyl-3,3'-bis- \$\$ PIPERAZIN-2,5-DION, 1,4-DIMETHYL-3,3'-BIS-



Hit#:2 Entry:98588 Library:NIST08.LIB

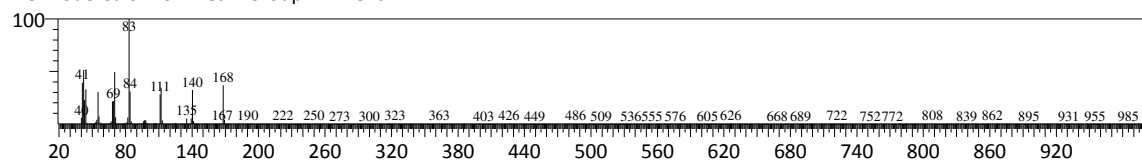
SI:83 Formula:C12H18N4O4 CAS:0-00-0 MolWeight:282 BasePeak:113.00 RetIndex:2624

CompName:Piperazine-2,5-dione, 1,4-dimethyl-3,3'-bis-



<< Target >>

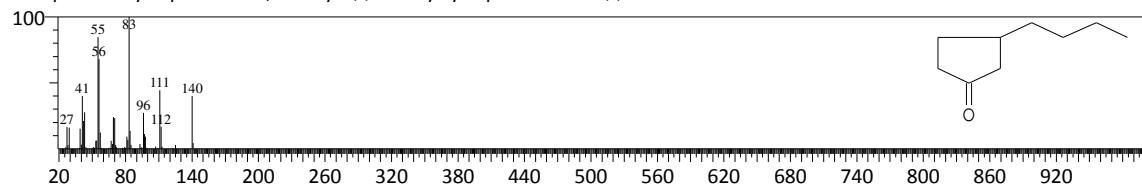
Line#:7 R.Time:10.390(Scan#:1479) MolWeight:282 MassPeaks:460
 RawMode:Averaged 10.385-10.395(1478-1480) BasePeak:83.10(27322)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:11270 Library:NIST08.LIB

SI:80 Formula:C₉H₁₆O CAS:57283-81-5 MolWeight:140 BasePeak:83.00 RetIndex:1130

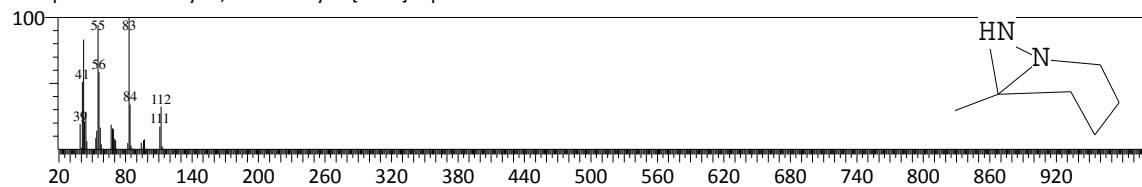
CompName:Cyclopentanone, 3-butyl- \$\$ 3-Butylcyclopentanone # \$\$



Hit#:2 Entry:3498 Library:NIST08.LIB

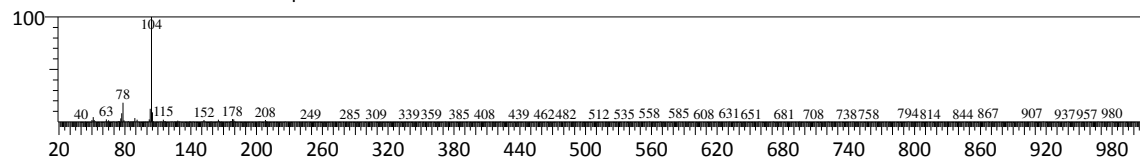
SI:80 Formula:C₆H₁₂N₂ CAS:108602-71-7 MolWeight:112 BasePeak:83.00 RetIndex:1013

CompName:6-Methyl-1,7-diazabicyclo[4.1.0]heptane



<< Target >>

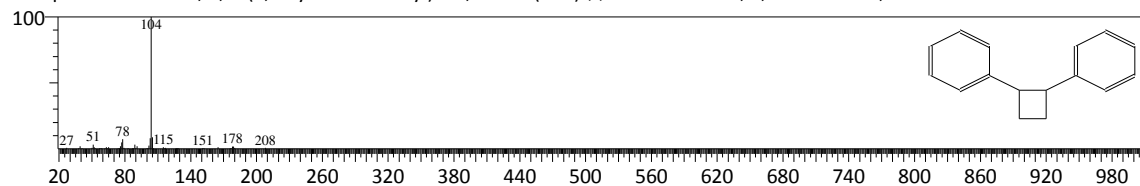
Line#:8 R.Time:10.810(Scan#:1563) MolWeight:112 MassPeaks:505
 RawMode:Averaged 10.805-10.815(1562-1564) BasePeak:104.10(37964)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:162148 Library:Wiley9.lib

SI:94 Formula:C16H16 CAS:20071-09-4 MolWeight:208 BasePeak:104.00 RetIndex:0

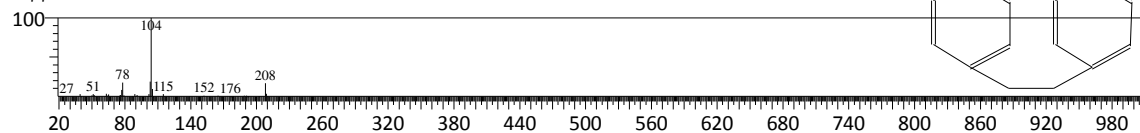
CompName:Benzene, 1,1'-(1,2-cyclobutenediyl)bis-, trans- (CAS) \$\$ CYCLOBUTANE, 1,2-DIPHENYL-, TRANS



Hit#:2 Entry:162179 Library:Wiley9.lib

SI:92 Formula:C16H16 CAS:1633-22-3 MolWeight:208 BasePeak:104.00 RetIndex:0

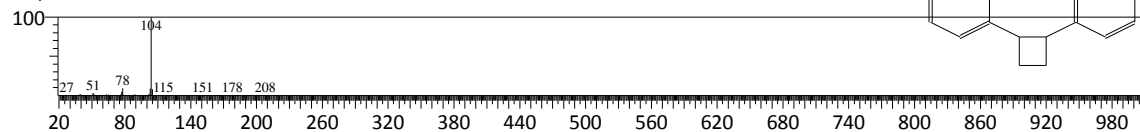
CompName:[2,2]PARACYCLOPHAN \$\$ Tricyclo[8.2.2.2(4,7)]hexadeca-4,6,10,12,13,15-hexaene (CAS) \$\$ [2,2]Paracyclophane \$\$
 Cyclobis(benzene-1,4-dimethylene) \$\$ Di-p-xylylene \$\$ Di-1,4-xylylene \$\$ Tricyclo[8.2.2.2(4,7)]hexadeca-4,6,10,12,13,15-hexaen
 e \$\$ NSC 91575



Hit#:3 Entry:162146 Library:Wiley9.lib

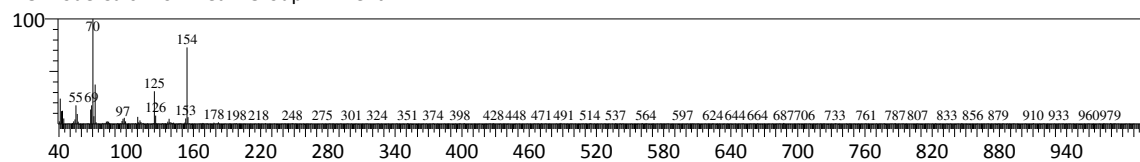
SI:92 Formula:C16H16 CAS:7694-30-6 MolWeight:208 BasePeak:104.00 RetIndex:0

CompName:BENZENE, 1,1'-(1,2-CYCLOBUTANEDIYL)BIS-, CIS- \$\$ (2-PHENYLCYCLOBUTYL)BENZENE \$\$ (2-PHENYLCYCLOBUTYL)BE
 NZENE # \$\$ 1,1'-(1,2-CYCLOBUTANEDIYL)BISBENZENE CIS- \$\$ CYCLOBUTANE, 1,2-DIPHENYL-, CIS-
 YL-, CIS-



<< Target >>

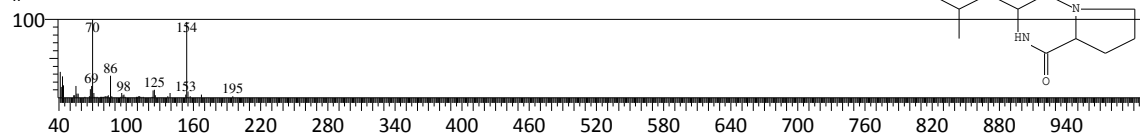
Line#:9 R.Time:11.200(Scan#:1641) MolWeight:208 MassPeaks:515
 RawMode:Averaged 11.195-11.205(1640-1642) BasePeak:70.10(9179)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:164739 Library:Wiley9.lib

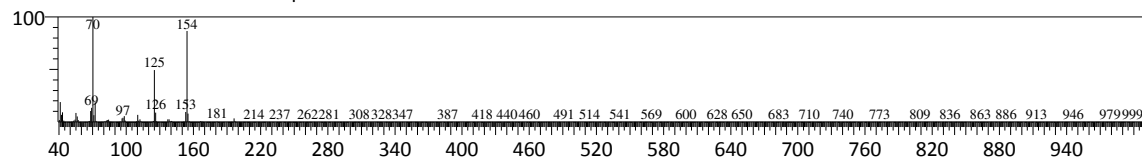
SI:83 Formula:C11H18N2O2 CAS:5654-86-4 MolWeight:210 BasePeak:70.00 RetIndex:0

CompName:1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane \$\$ Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-
 \$\$\$ 3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione \$\$\$ 3-ISOBUTYLHEXAHYDROPYRROLO[1,2-A]PYRAZINE-1,4-DIONE
 #



<< Target >>

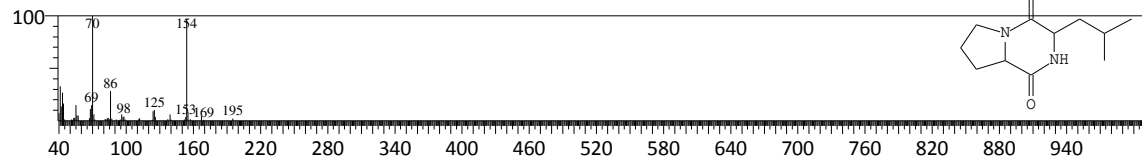
Line#:10 R.Time:11.360(Scan#:1673) MolWeight:210 MassPeaks:496
RawMode:Averaged 11.355-11.365(1672-1674) BasePeak:70.10(135604)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:49181 Library:NIST08.LIB

SI:83 Formula:C₁₁H₁₈N₂O₂ CAS:5654-86-4 MolWeight:210 BasePeak:70.00 RetIndex:1699

CompName:Pyrrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- \$3-Isobutylhexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione # \$\$

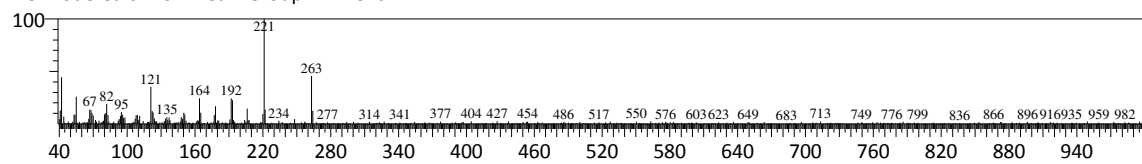


<< Target >>

Line#:11 R.Time:15.855(Scan#:2572) MolWeight:210 MassPeaks:516

RawMode:Averaged 15.850-15.860(2571-2573) BasePeak:221.20(2651)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



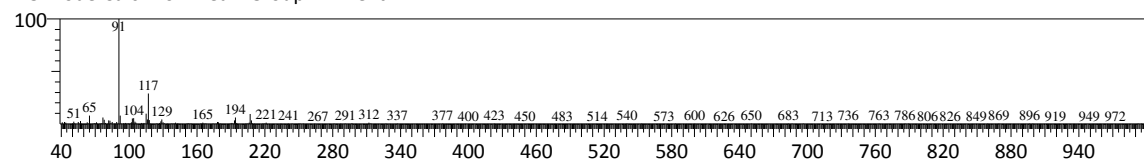
No hit compound

<< Target >>

Line#:12 R.Time:16.045(Scan#:2610) MolWeight:210 MassPeaks:544

RawMode:Averaged 16.040-16.050(2609-2611) BasePeak:91.10(30344)

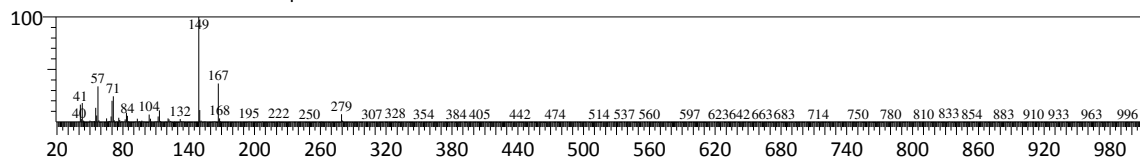
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



No hit compound

<< Target >>

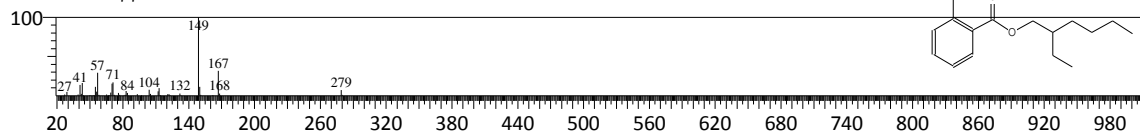
Line#:13 R.Time:16.885(Scan#:2778) MolWeight:210 MassPeaks:572
 RawMode:Averaged 16.880-16.890(2777-2779) BasePeak:149.10(40176)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:96163 Library:NIST08.LIB

SI:97 Formula:C16H22O4 CAS:4376-20-9 MolWeight:278 BasePeak:149.00 RetIndex:2162

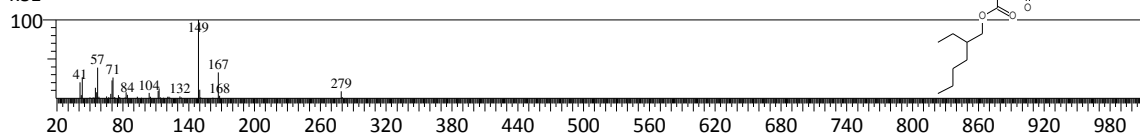
CompName:1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester \$\$ Mono(2-ethylhexyl) phthalate \$\$ Phthalic acid, mono-(2-ethylhexyl) ester \$\$ Mehp \$\$ Monoethylhexyl phthalate \$\$ Mono-2-ethylhexyl phthalate \$\$ 2-([(2-Ethylhexyl)oxy]carbonyl)benzoic acid # \$\$



Hit#:2 Entry:530920 Library:Wiley9.lib

SI:96 Formula:C24H38O4 CAS:117-81-7 MolWeight:390 BasePeak:149.00 RetIndex:0

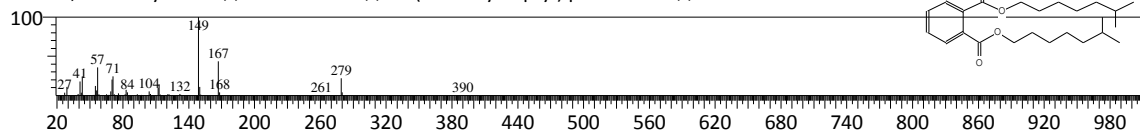
CompName:1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester (CAS) \$\$ Bis(2-ethylhexyl) phthalate \$\$ DOP \$\$ DEHP \$\$ DOF \$\$ DNOP \$\$ Octoil \$\$ Fleximel \$\$ Sicol 150 \$\$ Eviplast 81 \$\$ Staflex DOP \$\$ Eviplast 80 \$\$ VestinolAH \$\$ Truflex DOP \$\$ Bisoflex x81



Hit#:3 Entry:164412 Library:NIST08.LIB

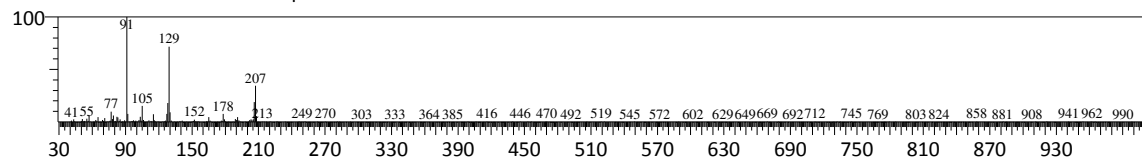
SI:95 Formula:C24H38O4 CAS:27554-26-3 MolWeight:390 BasePeak:149.00 RetIndex:2704

CompName:1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester \$\$ Diisooctyl phthalate \$\$ Hexaplas M/O \$\$ Isooctyl phthalate \$\$ Corflex 880 \$\$ DIOP \$\$ Flexol plasticizer diop \$\$ Morflex 100 \$\$ Palatinal D10 \$\$ Phthalic acid, bis(6-methylheptyl) ester \$\$ Phthalic acid, diisooctyl ester \$\$ Witcizer 313 \$\$ Bis(6-methylheptyl) phthalate # \$\$



<< Target >>

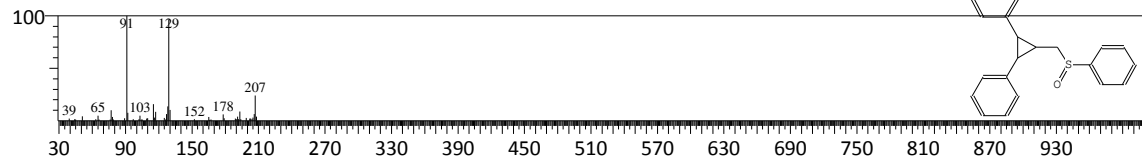
Line#:14 R.Time:17.405(Scan#:2882) MolWeight:390 MassPeaks:490
RawMode:Averaged 17.400-17.410(2881-2883) BasePeak:91.10(16380)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:134262 Library:NIST08.LIB

SI:86 Formula:C22H20OS CAS:131758-71-9 MolWeight:332 BasePeak:91.00 RetIndex:2835

CompName:(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide, trans-
ne # \$\$

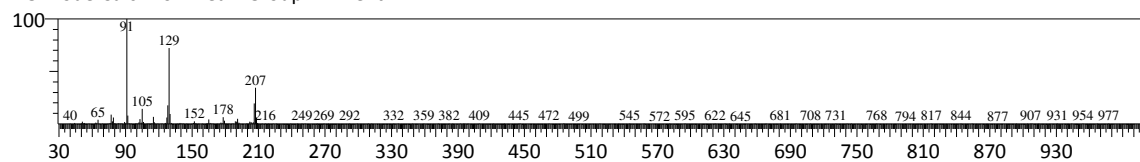


<< Target >>

Line#:15 R.Time:17.575(Scan#:2916) MolWeight:332 MassPeaks:530

RawMode:Averaged 17.570-17.580(2915-2917) BasePeak:91.10(26586)

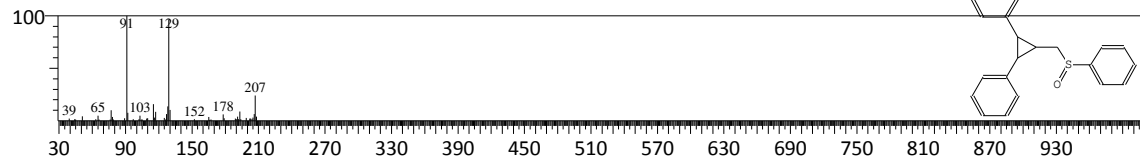
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:134262 Library:NIST08.LIB

SI:88 Formula:C22H20OS CAS:131758-71-9 MolWeight:332 BasePeak:91.00 RetIndex:2835

CompName:(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide, trans- \$\$ (2-Phenyl-3-[(phenylsulfinyl)methyl]cyclopropyl)benzene # \$\$

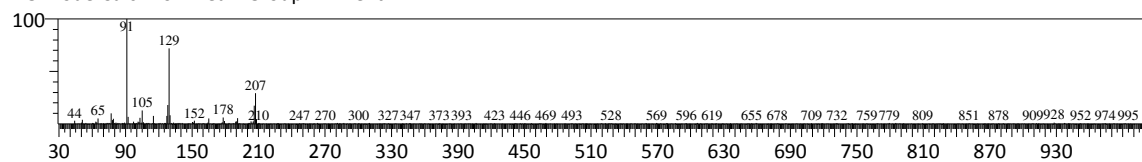


<< Target >>

Line#:16 R.Time:17.700(Scan#:2941) MolWeight:332 MassPeaks:545

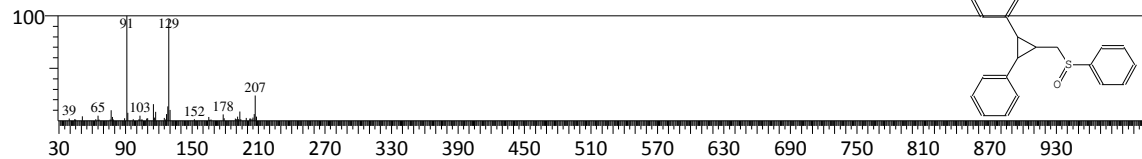
RawMode:Averaged 17.695-17.705(2940-2942) BasePeak:91.10(6270)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:134262 Library:NIST08.LIB

SI:87 Formula:C22H20OS CAS:131758-71-9 MolWeight:332 BasePeak:91.00 RetIndex:2835

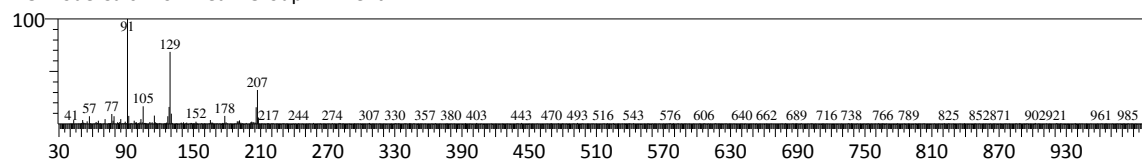
CompName:(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide, trans-
ne # \$\$

<< Target >>

Line#:17 R.Time:17.820(Scan#:2965) MolWeight:332 MassPeaks:519

RawMode:Averaged 17.815-17.825(2964-2966) BasePeak:91.10(8215)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:134262 Library:NIST08.LIB

SI:85 Formula:C22H20OS CAS:131758-71-9 MolWeight:332 BasePeak:91.00 RetIndex:2835

CompName:(2,3-Diphenylcyclopropyl)methyl phenyl sulfoxide, trans-
ne # \$\$