



UNIVERSIDADE CEUMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE



BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA LEGAL

FERNANDA COSTA ROSA

São Luís – MA
2025

FERNANDA COSTA ROSA

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA LEGAL**

Defesa de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Ceuma, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda.

São Luís - MA

2025

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

Costa Rosa, Fernanda.

BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR
MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA
AMAZÔNIA LEGAL / Fernanda Costa Rosa. - 2025.
103 f.

Orientador(a): Rita de Cássia Mendonça de Miranda.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis,
Ma, 2025.

1. Actinobactérias. 2. Atividade antimicrobiana. 3.
C. propinquum. 4. Antibiótico. I. Mendonça de Miranda,
Rita de Cássia.
II. Título.

FERNANDA COSTA ROSA

**BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE
PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA LEGAL**

Defesa de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Ceuma, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 12/03/2025

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA
Data: 03/04/2025 05:19:45-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Mendonça de Miranda
(Orientadora) Universidade Ceuma – UNICEUMA

Documento assinado digitalmente
 CRISTINA DE ANDRADE MONTEIRO
Data: 03/04/2025 09:37:01-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Cristina de Andrade Monteiro
Instituto Federal do Maranhão – IFMA

Documento assinado digitalmente
 AMANDA SILVA DOS SANTOS ALIANÇA
Data: 03/04/2025 10:38:37-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Amanda Silva dos Santos Aliança
Universidade Ceuma – UNICEUMA

Documento assinado digitalmente
 WELLYSON DA CUNHA ARAÚJO FIRMO
Data: 03/04/2025 10:09:09-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Wellyson da Cunha Araújo Firmo
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão - UEMASUL

Prof.^a Dr.^a Andrea de Souza Monteiro
Univerisdade Ceuma - UNICEUMA

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Fernanda Costa Rosa autorizo (X) não autorizo () a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos de plantas medicinais da Amazônia Legal” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís, 12 de março de 2025

(Nome Completo da Discente)

CPF: 011.121.933-75

RG: 104212999-9

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Quero agradecer aos meus pais, Deuza e Flávio, por me aguentarem e por me incentivarem desde o primeiro dia do doutorado, especialmente a minha mãe que foi fundamental nessa trajetória por ser minha parceira na logística do dia a dia; sem a ajuda dela eu não conseguiria me dedicar da forma como me dediquei à pesquisa e aos estudos.

Agradeço ao meu namorado Paulo pela parceria e companheirismo até nas resenhas dos artigos das disciplinas. Aos meus amigos do laboratório de pesquisa do Ceuma, meus parceiros de luta, risos e surtos: Alexya Mota, Bárbara Almeida, Domendes José, Gabryelle Oliveira, Gessiane Santos, Isabelle Alves, Lucielen Brito, Pollyana Cavalcante e Yasmin Costa; sem vocês os surtos seriam maiores, vocês foram a minha base, sem dúvida.

Meu muito obrigada também às minhas companheiras de vida: Camilla Itapary e Marcia Barros, vocês foram essenciais na minha vida acadêmica e são na minha vida pessoal.

Quero agradecer à minha orientadora Rita de Cássia pelos ensinamentos e parceria ao longo desses 4 anos; e à minha orientadora da vida acadêmica Cristina Monteiro, uma pessoa querida que está sempre disponível e disposta a me ajudar, tenho profundo respeito e admiração. Professoras, muito obrigada!

Agradeço também duas pessoas maravilhosas que fizeram tudo que estava e não estava ao alcance deles naquele laboratório: Marinaldo e Hélio, todo o meu respeito e carinho nesse agradecimento.

E por fim, quero agradecer a Universidade Ceuma e a Fapema pelo apoio à pesquisa e pela confiança em nós pesquisadores, que nos dedicamos tanto para encontrar novos caminhos e soluções para os problemas diários da sociedade.

De coração, obrigada a todos(as)!

ROSA, Fernanda Costa. **Bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos de plantas medicinais da Amazônia Legal**. 2025. 103 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Ceuma, São Luís, 2025.

RESUMO

Os perigos de uma era pós-antimicrobianos levaram os formuladores de políticas a reconhecer sua ameaça à saúde humana, exigindo ação urgente para desenvolver novas terapias antimicrobianas, e principalmente diminuir a contribuição dos humanos para o aumento dessa resistência. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a ação antimicrobiana dos metabólitos secundários produzidos por microrganismo endofítico, frente a isolados de interesse clínico. Para definição do material botânico a ser analisado foi realizado um levantamento bibliográfico das plantas medicinais consumidas no Maranhão e coletados de uma residência; a folha foi a parte da planta escolhida para o isolamento dos endofíticos. A indução da produção de metabólitos foi realizada pela técnica de Fermentação Submersa, seguida de extração com acetato de etila. A avaliação da atividade antibacteriana dos metabólitos secundários foi realizada por meio de ensaios de difusão em ágar, microdiluição e análise antibiofilme. O microrganismo endofítico foi isolado a partir da folha de *Aloe vera*; a identificação macro e microscópica desse microrganismo permitiu identificá-lo como uma bactéria pertencente ao gênero *Streptomyces*. Após a obtenção dos metabólitos, os resultados dos testes demonstraram que os esses foram capazes de inibir o crescimento de linhagens de *Corynebacterium propinquum*, com formação de halo de até 27 ± 0 mm e CIM de $32,1 \mu\text{g/mL}$. O teste de interferência do biofilme mostrou que os metabólitos secundários reduziram a formação do biofilme em linhagens de *C. propinquum*, *Candida parapsilosis* e *C. albicans*. O ensaio de toxicidade mostrou que a concentração $31,2 \mu\text{g/mL}$ dos metabólitos secundários é segura para as larvas de *Tenebrio molitor*. A avaliação da sobrevivência das larvas após a infecção por *C. propinquum*, demonstrou que o grupo tratado com os metabólitos teve uma taxa de sobrevivência maior que o grupo sem tratamento. Assim, conclui-se que os metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria apresentaram potencial antibiótico frente a linhagens clínicas de *C. propinquum*, patógeno raro descrito como causador de infecções em pacientes com envolvimento pulmonar, derrame pleural, bacteremia e endocardite e que apresenta uma emergente resistência antibiótica.

Palavras-chave: Actinobactérias; Atividade antimicrobiana; *C. propinquum*; Antibiótico.

ROSA, Fernanda Costa. **Bioprospection of secondary metabolites produced by endophytic microorganisms of medicinal plants from Legal Amazon**. 2025. 103 l. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Ceuma University, São Luís, 2025.

ABSTRACT

The dangers of a post-antimicrobial era have led policymakers to recognize its threat to human health, requiring urgent action to develop new antimicrobial therapies and, most importantly, to reduce human contribution to the increase in resistance. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial action of secondary metabolites produced by an endophytic microorganism against clinical isolates of interest. For the definition of the botanical material to be analyzed, a bibliographic survey of medicinal plants consumed in Maranhão was carried out, and samples were collected from a residence; leaves were chosen as the plant part for the isolation of endophytes. The induction of metabolite production was performed using the Submerged Fermentation technique, followed by extraction with ethyl acetate. The evaluation of the antibacterial activity of the secondary metabolites was conducted through agar diffusion assays, microdilution, and antibiofilm analysis. The endophytic microorganism was isolated from the leaf of *Aloe vera*; the macro- and microscopic identification of this microorganism identified it as a bacterium belonging to the genus *Streptomyces*. After obtaining the metabolites, the test results demonstrated that they were capable of inhibiting the growth of *Corynebacterium propinquum* strains, with the formation of halos up to 27 ± 0 mm and a minimum inhibitory concentration (MIC) of 32.1 µg/mL. The biofilm interference test showed that the extract reduced biofilm formation in *C. propinquum*, *Candida parapsilosis*, and *C. albicans* strains. The toxicity assay revealed that the concentration of 31.2 µg/mL of the extract is safe for the larvae of *Tenebrio molitor*. The evaluation of larval survival after infection with *C. propinquum* demonstrated that the group treated with the metabolites had a higher survival rate than the untreated group. Thus, it is concluded that the extract produced by the actinobacterium exhibited antibiotic potential against clinical strains of *C. propinquum*, a rare pathogen described as causing infections in patients with pulmonary involvement, pleural effusion, bacteremia, and endocarditis, which exhibits emerging antibiotic resistance.

Keywords: Actinobacteria; Antimicrobial activity; *C. propinquum*; Antibiotic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	<i>Aloe vera</i> como fonte de endofíticos	14
3.2	Bactérias endofíticas.....	15
3.3	Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas	16
3.4	Actinobactérias	17
3.4.1	Gênero <i>Streptomyces</i>	19
3.5	Metabólitos Secundários (MS)	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Microrganismos utilizados.....	23
4.2	Aquisição do Material Botânico	23
4.3	Isolamento dos microrganismos endofíticos.....	23
4.4	Identificação clássica	24
4.5	Processo de produção e extração dos metabolitos secundários	24
4.5.1	Fermentação Submersa.....	24
4.5.2	Técnica de separação de misturas líquido-líquido.....	25
4.6	Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos microrganismos endofíticos.....	25
4.6.1	Ensaio de difusão em ágar	25
4.6.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.6.3	Teste Antibiofilme	26
4.6.3.1	<i>Interferência do MS na formação do biofilme</i>	26
4.6.3.2	<i>Interferências do MS em biofilme pré-formado</i>	27
4.7	Bioensaio com larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	27
4.8	Análise Estatística.....	27
5	RESULTADOS	29
5.1	Plantas selecionadas	29
5.2	Isolamento do microrganismo endofítico	29
5.3	Ensaio de ágar difusão	30
5.4	Concentração Inibitória Mínima	32

5.5	Teste de biofilme	32
5.6	Análise Estatística.....	34
5.7	Ensaio de toxicidade e Curva de sobrevivência	35
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
	ANEXO – Artigos publicados	59

1 INTRODUÇÃO

A introdução de antimicrobianos no uso clínico foi incontestavelmente o maior avanço médico do século XX. Além de tratar doenças infecciosas, os antimicrobianos permitiram muitos procedimentos médicos, incluindo o tratamento do câncer, transplante de órgãos e cirurgia de coração aberto (Mühlberg *et al.*, 2019; Almeida; Veiga; Reis, 2022). Entretanto, o uso indevido desses compostos resultou no rápido aumento da resistência bacteriana e fúngica, inclusive casos de infecções intratáveis (Carioca; Maia; Teixeira *et al.*, 2021).

Em alinhamento com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3 (ODS 3) da ONU: Saúde e Bem-Estar, que visa assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, a resistência antimicrobiana representa um sério desafio para a saúde pública global. Essa ameaça coloca em risco os progressos alcançados ao longo das décadas e destaca a necessidade de vigilância contínua e uso prudente de antimicrobianos (ONU, 2025).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um documento (*Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System - GLASS*) que se concentra na vigilância da resistência antimicrobiana (RAM). O relatório revela que altos níveis de resistência (acima de 50%) foram descritos e relatados em bactérias que são causa frequente de sepse em hospitais como *Klebsiella pneumoniae*. Antibióticos de último recurso, como carbapenêmicos, são necessários para tratar essas infecções graves. De acordo com dados relatados, no entanto, 8% das sepses causadas por *Klebsiella pneumoniae* eram resistentes aos carbapenêmicos, aumentando a possibilidade de morte por uma infecção intratável. (Duval; Grare; Demoré, 2019; Mühlberg *et al.*, 2019; Cassini, *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2019; Murray *et al.*, 2022; WHO, 2022).

A resistência microbiana frente a antibióticos ocorre porque os microrganismos se adaptam às mudanças em seu ambiente, ajustando apropriadamente a expressão dos genes e as atividades celulares. Além desses mecanismos de adaptação reversíveis, eles também podem gerar variantes geneticamente alteradas que são mais bem adaptadas a condições adversas, o que é vantajoso quando as mudanças ambientais persistem por períodos mais longos. Tais variantes podem surgir e se expandir dentro de uma população em escalas de tempo relativamente curtas sob pressão seletiva (Silva; Nogueira, 2021).

Os fungos patogênicos também têm extrema relevância nesse cenário de resistência às drogas antimicrobianas, e vem sendo relatada em diversos estudos na última década. Dentre os gêneros com maiores relatos de resistência a antifúngicos como terbinafina, itraconazol e fluconazol, destacam-se *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichophyton* (Morschhäuser, 2016; Santos

et al., 2018; Vena *et al.*, 2018; Hassanmoghadam *et al.*, 2019; Lockhart, 2019; Pristov; Ghannoum, 2019; Saunte *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020).

Os perigos de uma era pós-antimicrobianos levaram os formuladores de políticas a reconhecer sua ameaça à saúde humana, exigindo ação urgente para desenvolver novas terapias antimicrobianas, e principalmente diminuir a contribuição dos humanos para o aumento dessa resistência (WHO, 2019). A relativa falta de sucesso em trazer antimicrobianos sintéticos eficazes para a clínica, fez com que surgisse uma nova geração de medicamentos anti-infecciosos desenvolvidos a partir de produtos naturais microbianos, pois esses compostos são incomparáveis em sua diversidade química e eficácia como antibióticos e antifúngicos (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, e o bioma da Amazônia é um dos mais ricos e mais importantes por causa da diversidade de plantas, que podem abrigar compostos com ação antimicrobiana (Amorim, *et al.*, 2020). O uso de plantas como remédio é uma prática popular adotada há muitos séculos; no entanto, a produção em grande escala de medicamentos é difícil. Assim, o uso de microrganismos que vivem dentro de plantas (endofíticos) pode ser uma alternativa para a produção de compostos biologicamente ativos por meio de técnicas biotecnológicas (Rosa *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024; Azevedo *et al.*, 2024), uma vez que vários estudos já evidenciaram que os endofíticos aumentam a aptidão de suas plantas hospedeiras através da produção direta de metabólitos secundários, que estão envolvidos na proteção do hospedeiro contra herbívoros e microrganismos patogênicos (Ancheeva; Daletos; Proksch, 2020).

Actinobactérias, predominantemente espécies de *Streptomyces*, são responsáveis pela biossíntese de aproximadamente 60% dos produtos antimicrobianos conhecidos e outros 15% são produzidos por outras actinobactérias (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019; Muthukrishnan *et al.*, 2020).

As actinobactérias têm sido o centro das atenções dentro da comunidade científica devido à sua capacidade de produzir vários compostos bioativos com diferentes propriedades comprovadas, como: atividade antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antimalárica, biocontrole e propriedades de promoção do crescimento da planta (Valan Arasu; Ignacimuthu; Agastian, 2012; Baba *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Charousová, *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2018; Vu *et al.*, 2018; Law *et al.*, 2019; Amorim *et al.*, 2020; Eid *et al.*, 2020; Cao, *et al.*, 2020; Muthukrishnan *et al.*, 2020; Zhuang, *et al.*, 2020; Worsley *et al.* 2021; Rosa *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024).

O crescente aumento de infecções fúngicas e bacterianas em consequência do aumento

de pacientes com detrimento em maior ou menor grau do sistema imune, o nível elevado de flexibilidade das espécies associado à alta capacidade de resistência aos antimicrobianos tradicionais, suas características de virulência e a capacidade de formar biofilmes, faz dos microrganismos resistentes um risco sério à saúde humana. Além disso, a ineficácia ou a baixa biodisponibilidade de alguns agentes antimicrobianos e a toxicidade ou efeitos colaterais, fazem da busca por novas classes de fármacos para o tratamento de infecções um objetivo relevante no campo da biotecnologia aplicada à saúde. Dessa maneira, a busca por novos fármacos, principalmente com base nas plantas medicinais da Amazônia é de suma importância e tem sido objeto de estudo de inúmeros grupos de pesquisa o que faz com que muitos trabalhos com esse tema sejam publicados. No entanto, pesquisas com microrganismos endofíticos de plantas medicinais da região amazônica, ainda são escassos e necessitam de investigação.

Visto que já existem trabalhos evidenciando cada vez mais que os endófitos são capazes de biossintetizar metabólitos medicinalmente importantes, que originalmente se acreditava serem produzidos apenas por suas plantas hospedeiras, além da sua, também, comprovada atividade antimicrobiana, pode-se inferir que: os microrganismos isolados produzirão metabólitos secundários bioativos, uma vez que é seu papel aumentar a aptidão de suas plantas hospedeiras através dessa produção; os microrganismos isolados apresentarão atividade antimicrobiana contra os patógenos clínicos; tais microrganismos também serão capazes de interferir nas propriedades de virulência dos patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral dessa pesquisa foi avaliar a ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos, frente a isolados de interesse clínico.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar microrganismos endofíticos provenientes de plantas da Amazônia;
- Identificar os microrganismos isolados;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos endofíticos isolados contra patógenos;
- Determinar e avaliar a CIM e a toxicidade dos metabólitos secundários;
- Verificar a capacidade de interferência dos metabólitos na formação do biofilme e na erradicação do biofilme pré-formado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Aloe vera* como fonte de endofíticos

As pesquisas com plantas têm aumentado, uma vez que a busca não é apenas sobre as aplicações das plantas medicinais, mas também, o interesse em descobrir quais microrganismos vivem nelas de forma mutualística e quais compostos de interesse biotecnológico eles podem produzir (Sharma; Kumar, 2021). Assim, muitas plantas amplamente utilizadas como remédio por muito tempo, como a *Aloe vera*, ainda não possuem as funções bioquímicas sistematicamente investigadas (Dong *et al.*, 2003).

Aloe vera é uma planta que pertence à família Liliaceae e é principalmente suculenta com um verticilo de folhas alongadas e pontiagudas (Saritha; Anilakumar; Khanum, 2010). A planta foi apresentada como constituinte de muitos fitoquímicos, vitaminas, nutrientes e antinutrientes encontrados em alimentos (Sette *et al.*, 2006). As folhas também têm alta capacidade de retenção de água em climas muito quentes e secos e, portanto, essa planta pode sobreviver a circunstâncias muito adversas onde a maioria das outras vegetações desaparecem (Suresh; Arularasan; Sri, 2012).

A folha possui três camadas: a camada interna é o gel, a intermediária é o látex e a espessa camada externa é a cutícula. O gel é formado por tecido mole, mucilaginoso, transparente e lubrificante, com grandes células parenquimatosas, é composto por glucomananos, aminoácidos, lipídios, esteróis e vitaminas, contendo 99% de água (Surjushe *et al.*, 2008). O látex possui uma seiva amarela amarga que contém antraquinonas e glicosídeos (Hamman, 2008). A cutícula forma uma pele protetora, na qual são sintetizados carboidratos e proteínas (Maan *et al.*, 2018). O sistema radicular cresce apenas alguns centímetros abaixo da superfície do solo e absorve água de forma eficiente, mesmo em áreas com baixa precipitação (Cousins; Witkowski, 2012).

Devido a variedade de compostos presentes em cada camada da folha, pesquisas como de Sinha *et al.* (2014), Akinsanya *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2022) têm investigado a diversidade de gêneros bacterianos endofíticos presentes na planta *Aloe vera*. Na pesquisa de Silva *et al.* (2022) quinze espécies de bactérias endofíticas (de 9 gêneros diferentes) foram isoladas a partir de raízes de *A. vera*, com o objetivo de investigar o potencial, dessas, em induzir efeitos positivos nos parâmetros biométricos, bem como no teor de aloína no gel e no látex, em experimento conduzido na vegetação; além de identificar cepas bacterianas com bom potencial para bioinoculação no cultivo de *A. vera*. As espécies isoladas foram: *Pantoea*

cypripedii, *Enterobacter* sp., *Paraburkholderia* sp., *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus megaterium*, *Brevibacillus agri*, *Lysinibacillus xylanilyticus*, *Enterobacter tabaci*, *Microbacterium aerolatum*, *Chryseobacterium taiwanense*, *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter asburiae*, *Pantoea agglomerans*, *Lelliottia nimipressuralis* (Silva et al., 2022).

Em estudo realizado por Akinsanya et al. (2015), vinte e nove bactérias endofíticas foram isoladas de raiz, caule e folha de *Aloe vera*, caracterizadas molecularmente em 13 gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Aeromonas*, *Providencia*, *Cedecea*, *Klebsiella*, *Cronobacter*, *Macrococcus* e *Shigella*. Os gêneros dominantes incluem *Bacillus* (20,7%), *Pseudomonas* (20,7%) e *Enterobacter* (13,8%).

Um gênero de bactéria endofítica, ainda não citado aqui, foi isolado a partir do gel de *A. vera* na pesquisa realizada por Sinha et al. (2014), trata-se da bactéria *Ralstonia* sp.; esse endofítico foi submetido a testes onde foi possível concluir que os compostos bioativos obtidos do isolado podem ser efetivamente utilizados nas indústrias alimentícia e farmacêutica contra vários patógenos bacterianos, aumentando assim as evidências da utilização dessas bactérias em atividades biotecnológicas.

3.2 Bactérias endofíticas

O conceito clássico de endofíticos/endófitos refere-se à microbiota composta principalmente por fungos e bactérias capazes de colonizar os espaços intercelulares, sistema vascular ou o meio intracelular da planta sem causar dano a ela (Zinniel et al., 2002; Botta et al., 2013). Entretanto, alguns endofíticos não são cultiváveis, mas, podem ser identificados devido a possibilidade de sequenciamento do genoma desses microrganismos (Gaiero et al., 2013), por essa razão o conceito de endofítico foi ampliado para um conceito elaborado por Bulgarelli et al. (2012), e considera como endofítico o conjunto de genomas microbianos localizado internamente aos tecidos vegetais.

De modo geral, os endofíticos podem ser divididos em dois grupos com base em sua biologia, modo de propagação, evolução e taxonomia. Endofíticos sistêmicos ou verdadeiros são aqueles que residem nos tecidos vegetais, mantêm interações com o hospedeiro, são assintomáticos e são normalmente encontrados dentro da planta sob todos os tipos de condições; já os não sistêmicos ou transitórios são aqueles que passam uma parte do seu ciclo de vida dentro dos tecidos da planta hospedeira, sem produzir sintomas de infecção (Botella; Diez, 2011; Wani et al., 2015; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020). Grande parte dos

microrganismos presentes na planta origina-se do solo, e penetra na planta durante a germinação através da radícula, raízes secundárias, estômatos ou através de ferimentos nas folhas (Zinniel *et al.*, 2002; Verma; Gange, 2014).

Dessa forma, as plantas contam com a contribuição desses microrganismos já que fornecem condições adequadas para sobreviverem ao estresse do meio ambiente (Petrini, 1991; Ojeda, 2017), além de se acreditar que muitas das propriedades medicinais de algumas plantas podem estar relacionadas às bactérias endofíticas, sugerindo que as propriedades terapêuticas de uma planta podem estar na interação entre ambos (Poli *et al.*, 2012; Specian *et al.*, 2014).

3.3 Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas, pela infinita gama de compostos que podem produzir, são importantes em processos de biorremediação, atividade antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antimalárica, antileishmania, biocontrole, propriedades de promoção do crescimento da planta, apresentam uma alta atividade metabólica e produzem terpenóides, pigmentos e enzimas extracelulares (Valan Arasu; Ignacimuthu; Agastian, 2012; Baba *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Charousová, *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2018; Vu *et al.*, 2018; Law *et al.*, 2019; Amorim *et al.*, 2020; Eid *et al.*, 2020; Cao, *et al.*, 2020; Muthukrishnan *et al.*, 2020; Zhuang, *et al.*, 2020; Worsley *et al.* 2021; Silva; Silva; Silva, 2022; Rosa *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2024; Azevedo *et al.*, 2024).

Dentre as espécies que apresentam melhor desempenho em processos de biorremediação estão: *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus cereus*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, e *Klebsiella pneumoniae* (Shiomi *et al.*, 2006). A eficácia de nove isolados de bactérias endofíticas foi avaliada no biocontrole da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, pela microbiolização das sementes e da parte aérea do milho híbrido AS-1548 (72 e 24 horas antes e no mesmo dia da inoculação do patógeno) em condições de casa de vegetação. Verificou-se que *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp. e *Bacillus agaradhaerens* se destacaram, quando aplicados na parte aérea, com um controle na ordem de 42 a 61%. Quando as bactérias foram aplicadas nas sementes, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces* sp., *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* foram os mais eficientes, com um controle entre 37 e 59% (Shiomi; Melo; Minhoni, 2015).

Uma linha de pesquisa muito procurada no desenvolvimento de novas biotecnologias, uma vez que surgem cada vez mais patógenos resistentes aos antibióticos usados na clínica, é

a de atividade antimicrobiana, pois, diversos estudos têm comprovado a ação de endofíticos contra outros microrganismos (Ojeda, 2017). A bactéria endofítica *Streptomyces* sp., pertencente à classe das actinobactérias, produz compostos conhecidos como xiamicina, indosipeno e sespenina, que apresentaram atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium vaccae* e *Enterococcus faecalis* (Ding *et al.*, 2011).

Outras aplicações biotecnológicas desses microrganismos são a utilização de enzimas, usadas em atividades biotecnológicas como hidrólise de polímeros, síntese de compostos, descontaminação de solos, entre outras (Cherry; Fidantsef, 2003). Entre as várias enzimas de importância industrial destacam-se: amilases (Vigal *et al.*, 1991), esterases, lipases, pectinases, proteases (Rodrigues, 2006) e celulases, produzidas por *Streptomyces* (Yazdil *et al.*, 2000). Esta última permite o uso na clarificação de sucos de frutas, extração de sucos, óleo de sementes, no processamento de ração animal para melhorar a digestibilidade de animais monogástricos, em detergentes com funções de amaciantes, estonação de jeans, no pré-tratamento da biomassa que contém celulose e no pré-tratamento de resíduos industriais (Rodrigues, 2006).

3.4 Actinobactérias

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas, aeróbias de modo geral, mas alguns gêneros são facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Metabolicamente podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy, 1999), com propriedades morfológicas de células fúngicas pela presença de micélio aéreo e vegetativo, porém, com diâmetros bem menores (de 0,5 a 1,0 μm) e se assemelhando fisiologicamente a bactérias (Ayswaria; Vasu; Krishna, 2020). Na sua morfologia existe a formação de hifas que podem se diferenciar em uma cadeia de esporos que, por sua vez, necessitam de condições favoráveis (temperatura, nutrientes e umidade) para formar o tubo germinativo e ocorrer o desenvolvimento das hifas (Procópio *et al.*, 2012). Apresentam colônias lisas, duras, coriáceas ou secas, de diferentes colorações como brancas, rosas, laranjas, verdes, cinzas, entre outras (Ezzyani *et al.*, 2004; Soares, 2011).

Esse filo está amplamente distribuído na natureza e os microrganismos pertencentes a ele são frequentemente isolados de água, plantas, solo, sedimentos, plantas em decomposição, lodo ativado e fezes de animais (Veiga; Esparis; Fabregas, 1983; McCarthy; Williams, 1990), além de estar distribuído em habitats aquáticos e ambientes extremos como áreas congeladas,

solos desérticos e zonas abissais (Pathom-Aree *et al.*, 2006; Okoro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2018). Trinta por cento da população total de microrganismos no solo correspondem as actinobactérias (Kennedy, 1999) e 80% das actinobactérias do solo ocorrem na camada mais superficial (0-10cm), diminuindo progressivamente com a profundidade (Iwai; Takahashi, 1992). Por serem capazes de degradar muitas substâncias complexas cumprem um papel muito importante na química do solo (Sharma *et al.*, 2005).

As actinobactérias apresentam um alto conteúdo de Guanina e Citosina (G+C), a porcentagem de G+C é a mais alta que qualquer bactéria, ou seja, moléculas de DNA com baixo conteúdo GC são menos estáveis do que com conteúdo GC alto; apresentam também um odor típico de solo úmido, em decorrência da produção do composto geosmina (Soares 2011; Álvarez, 2011; Ojeda, 2017; Ayswaria; Vasua; Krishnab, 2020).

O nível que produzem antibióticos é sem dúvida a propriedade mais extraordinária dessas bactérias, sendo comprovada a produção de mais de 500 substâncias antibióticas distintas, as quais têm múltiplas aplicações na medicina e agricultura (Challis; Hopwood, 2003; Álvarez, 2011). Os gêneros predominantes deste grupo são *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora*. (Silva; Silva; Silva, 2022), entretanto, a espécie que chama atenção por ser uma excepcional produtora de antibióticos pertence ao gênero *Streptomyces*, trata-se da *S. griseus*, pois, produz pelo menos 40 antibióticos diferentes (Álvarez, 2011).

Por serem microrganismos complexos e diversificados, as actinobactérias são responsáveis por diversas atividades interessantes, como a decomposição de polímeros complexos como lignocelulose e quitina; o antagonismo com fungos do solo, a partir da fixação simbiótica de nitrogênio (Zaitlin *et al.*, 2004); e desempenham um papel importante na formação de agregados estáveis no solo, construindo uma estrutura de macro poros que permite a penetração de água e ar, evitando a erosão (Fritz *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que apesar de muitas actinobactérias viverem em harmonia com as plantas e não causarem doenças em humanos, algumas podem apresentar patogenicidade em plantas e humanos, como os gêneros *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium* e *Curtobacterium* (Ventura *et al.*, 2007; Goodfellow, 2012; Silva, 2018).

Por essas razões os estudos com actinobactérias aumentam cada vez mais, sendo registrado mais de 10.000 compostos bioativos já produzidos. Destes, 75% são produzidos pelo gênero *Streptomyces* e os 25% restantes foram isolados de actinobactérias raras, ou seja, gêneros isolados em menor frequência (Gos *et al.*, 2017; Silva; Silva; Silva, 2022).

3.4.1 Gênero *Streptomyces*

Streptomyces pertence à família Streptomycetaceae, ordem Actinomycetales, são bactérias aeróbias facultativas que crescem a uma temperatura entre 25-35°C, o pH ótimo de crescimento está entre 6,5 e 8,0 (Pacios-Michelena *et al.*, 2021), porém, outras linhagens deste gênero já foram isoladas em meios com pH 9 ou superior. Além disso, a diversidade do seu metabolismo deu-lhes a capacidade de colonizar diferentes habitats e utilizar fontes variadas de carbono e nitrogênio (Botas Muñoz, 2013).

Esse gênero encontra-se amplamente distribuído na microbiota do solo e altamente capaz de associar-se a diversas espécies de plantas; sua presença no solo é favorecida devido a sua capacidade de formação de esporos, sendo assim uma forma de resistência em ambientes extremos (Sivalingam *et al.*, 2019). Diante dessas circunstâncias, *Streptomyces* produz hifas aéreas e na fase de mudança do micélio para esporulação sintetiza metabólitos secundários análogos aos peptídeos, os quais ajudam na sua sobrevivência (Hwang *et al.*, 2014; Olanrewaju; Babalola, 2019; Quinn *et al.* 2020; Lacey; Rutledge, 2022).

Até maio de 2024 foram registrados 3.579 genomas de *Streptomyces* armazenados na base de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (CNIB). Avanços recentes no sequenciamento do genoma revelou que genomas pertencentes ao gênero de *Streptomyces* spp. possuem uma grande quantidade de grupos de genes biossintéticos (*Biosynthetic Cluster Gene* - BCG) de metabólitos secundários (Lee *et al.*, 2020). Com isso, o gênero *Streptomyces* é reportado como fonte de antibióticos, antifúngicos, antivirais, herbicidas, antileishmania, imunossupressores e agentes antitumorais (Newman; Reynolds, 2005; Olano; Méndez; Salas, 2009; Goodfellow; Fiedler, 2010; Moreno; Roncancio; Riveros, 2023; Azevedo *et al.*, 2024), ou seja, ele contribui com mais de 60% dos compostos antimicrobianos descritos na literatura até o momento (Yulong *et al.*, 2021).

Vários outros estudos com bactérias endofíticas, proporcionaram a descoberta de antibióticos e antifúngicos bem conhecidos na atualidade. A anfotericina B, antifúngico produzido pela bactéria *Streptomyces nodosus* (Souza *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2010); a daptomicina, polipeptídeo isolado de *Streptomyces roseoporus* (Tedesco; Rybak, 2004); a eritromicina produzida por *Streptomyces erythreus*; neomicina sintetizada por *Streptomyces fradiae*, usada com frequência em infecções de pele, ouvidos e olhos; estreptomicina produzido por *Streptomyces griseus* que atua em bactérias Gram negativas aeróbias e certas micobactérias; tetraciclina produzida por *Streptomyces rimosus*; e a gentamicina produzida por *Streptomyces tenebrarius* (Saadaun; Gharaibeh, 2003; Rodrigues, 2006).

A actinobactéria *Streptomyces* também está envolvida na terapêutica do câncer, uma vez que produz o composto actinomycina D. Estima-se que aproximadamente 60% dos agentes antineoplásicos, introduzidos para a terapia do câncer nas últimas décadas, tem origem vegetal e microbiana (Castilho *et al.*, 2002). Dessa forma, os relatos das atividades por *Streptomyces* só aumentam, a exemplo da pesquisa realizada por Silva (2018), onde foi observado que *Streptomyces* sp. CMAA1527 (isolada do continente Antártico) apresentou significativa atividade antiproliferativa *in vitro*, para tumores de mama, pulmão, rim e sistema nervoso central, através da produção de cinerubina B, substância já conhecida e usada em inúmeros fármacos para o tratamento de cânceres. Nesse contexto, substâncias provenientes de microrganismos e plantas estão entre as mais promissoras, representando aproximadamente 60% dos agentes antitumorais aprovados para uso (Silva, 2018).

No início dos anos 2000, essas bactérias, descritas como produtoras de moléculas bioativas de interesse farmacológico, foram alvo de muitas pesquisas. Essas bactérias produziram substâncias com atividade contra o parasita da malária, *Plasmodium falciparum*, são elas munumbicina A, B, C e D (Castilho *et al.*, 2002), kakadumicina A (Castilho *et al.*, 2003) e coronamicina (Ezra *et al.* 2003).

Cada vez mais, *Streptomyces* vem desempenhando papel fundamental nos campos da medicina humana e seus setores de biotecnologia ao longo das últimas décadas; a descoberta da produção de metabólitos secundários por parte dos endofíticos proporcionou isso. Vários autores se dedicam em isolar espécies bacterianas do gênero *Streptomyces* devido ao seu amplo aparato metabólico (Barka *et al.*, 2016; Kim, 2021).

3.5 Metabólitos Secundários (MS)

As plantas conseguem produzir suas próprias defesas (de natureza química), protegendo-as de qualquer predador e até mesmo de outras plantas. Normalmente, essas defesas envolvem substâncias do metabolismo secundário (Croteau; Kutchan; Lewis, 2000; Pinto *et al.*, 2002), compostos de baixa massa molecular, fitoquímicos que desempenham papéis importantes nas interações das plantas com o ambiente não só para defesa, mas também para ajuste e adaptação (Ramakrishna; Ravishanka, 2011; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020). Ele funciona para os microrganismos, inclusive as plantas contam com a contribuição dos microrganismos endofíticos para sobreviverem ao estresse do meio ambiente (Petrini, 1991; Ojeda, 2017).

Metabólitos secundários são compostos produzidos por plantas e microrganismos após

a produção dos componentes primordiais (enzimas, proteínas, carboidratos e etc.) para o funcionamento de suas células, através do metabolismo primário. Com relação as bactérias endofíticas ocorre após a fase exponencial, pois, o esgotamento dos nutrientes e o declínio na velocidade de crescimento geram sinais que produzem uma cascata de eventos regulatórios, conduzindo a diferenciação química (metabolismo secundário) (Graefe; Ward, 1989; Demain, 1999; Álvarez, 2011).

Microrganismos muito específicos conseguem produzir metabólitos secundários e esses possuem duas grandes classes: policetídeo e peptídeos não-ribossômicos (Hwang *et al.*, 2014). As actinobactérias sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários e dentro dessa classe o gênero *Streptomyces* é um grande produtor, como já foi relatado anteriormente, dessa forma, as espécies de *Streptomyces* também são produtoras de metabólitos secundários classificados como policetídeo e peptídeos não-ribossômicos.

As policetidas sintases (PK's) são agrupadas segundo as suas funções e estruturas em 3 grupos: i e ii estão presentes apenas em microrganismos e o iii em microrganismos e plantas (Shimizu; Ogata; Goto, 2017) e possuem ação antimicrobiana (Hwang *et al.*, 2014). Os peptídeos não-ribossômicos (NRPS) são constituídos de enormes proteínas multimodulares e inúmeros medicamentos usados na clínica são biossintetizados por eles (Kries, 2016).

Nesse contexto, pode-se inferir alguns exemplos acerca da atividade biológica dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces*.

As pesquisas com antimicrobianos levaram a descoberta da estreptomicina, a partir da produção de metabólitos secundários por *Streptomyces griseus*; cloranfenicol de *Streptomyces venezuelae*; clortetraciclina de *Streptomyces aureofaciens* (Li *et al.*, 2014); anfotericina B de *Streptomyces nodosus*; neopolioxina C de *Streptomyces tendae*; nistatina de *Streptomyces noursei*; e pentamicina de *Streptomyces pentaticus* (Kennedy; Luna, 2005; Li *et al.*, 2020); evidenciando uma característica marcante do gênero, a capacidade de produzir antibióticos. Esses microrganismos são capazes de realizar a biossíntese de quitinase, uma enzima que degrada a quitina, componente presente na parede celular dos fungos. Essas substâncias com atividade antimicrobiana tanto podem inibir o crescimento microbiano quanto podem matar esses microrganismos (bactérias e fungos) (Alves, 2022).

Já as pesquisas com agentes antitumorais têm revelado estudos como os de Cantillo *et al.* (2018), Ramirez-Rodriguez *et al.* (2018) e Agarwal *et al.* (2023) que reportaram diferentes linhagens de *Streptomyces* isoladas de diferentes lugares. Das linhagens que produziram metabólitos secundários destacam-se as espécies *Streptomyces aburaviensis* a qual apresentou

atividade antitumoral contra a linha de câncer de pulmão (A549); *S. gramineus* apresentou maior atividade citotóxica frente a linha celular de próstata (PC3); e *S. psammoticus*, que apresentou atividade frente a linha celular de câncer de mama (MDA-MB-231). Mas, foi por volta de 1940 que tudo começou, com a descoberta da actinomicina D, substância produzida por *Streptomyces* utilizada no tratamento contra o câncer (Castilho *et al.*, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados nessa pesquisa foram: *Klebsiella pneumoneae* ATCC 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 22019 e *C. parapsilosis* ATCC 22019; e os isolados clínicos *Corynebacterium propinquum* 431024 e 36063 (nasofaringe), *Candida albicans* 341 (secreção oral - SO), *C. albicans* 342 (SO), *C. albicans* 37 (SO), *C. albicans* 40 (SO), *C. glabrata* 105 e 124 (secreção vaginal - SV). Os fungos foram gentilmente cedidos pela professora Dra. Cristina de Andrade Monteiro e pertencem à coleção do Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal do Maranhão (IFMA) CAAE: 36601714.3.0000.5084, nº 813.402; e as bactérias pertencem a coleção do Laboratório de Biotecnologia e Eletroquímica da Universidade Ceuma. Para conservação desses microrganismos são realizados repiques constantes em meio ágar Müller Hinton (para bactérias) e ágar Sabouraud Dextrose (para fungos) e acondicionados em geladeira a 4°C a fim de garantir a viabilidade celular.

4.2 Aquisição do Material Botânico

Para definição do material botânico a ser estudado foi realizado um levantamento bibliográfico das plantas medicinais consumidas no Maranhão (Coutinho; Travassos; Amaral, 2002; Gomes; Firmo; Vilanova, 2014; Cunha *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.* 2018; Alencar *et al.* 2019) e dessa lista verificou-se quais estavam disponíveis em ambiente controlado, livre de interferências de resíduos sólidos. Por essa razão, os materiais botânicos foram coletados de uma residência (2°32'25.8"S 44°12'04.1"W) no município de São Luís, resultando nas seguintes plantas: babosa (*Aloe vera*), vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), boldo (*Peumus boldus*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

4.3 Isolamento dos microrganismos endofíticos

Para o isolamento dos microrganismos foi utilizado o método de desinfecção preconizado por Petrini (1992), no qual se efetuou a limpeza das partes da planta em água corrente e em seguida foram submetidas a desinfecção com: álcool a 70% por 1 minuto,

hipoclorito de sódio por 4 minutos, álcool a 70% por 30 segundos e 3 lavagens seguidas em água destilada estéril; na última lavagem a água também foi colocada no meio para controle de microrganismos epífitos. As bordas das folhas foram retiradas e as folhas foram fragmentadas em pedaços, sendo utilizados um total de 12 fragmentos para cada amostra vegetal. Posteriormente esses fragmentos foram colocados em placas com meio ágar Batata Dextrose (BDA) caseiro com anfotericina B (Cao *et al.*, 2004). O isolamento foi realizado em triplicada, sendo assim em cada placa (contendo 20 mL de meio) foram adicionados 4 fragmentos da planta. As placas foram incubadas em estufa à $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 7-15 dias. Todas as etapas desse processo foram realizadas na câmara de fluxo laminar.

Após o período de incubação foi realizada uma triagem nas placas, para verificação das características macro morfológicas das colônias crescidas, com seleção das colônias que apresentaram as propriedades típicas de actinobactérias descritas por Shirling; Gottlieb (1966). As colônias selecionadas foram purificadas em novas placas e foram armazenadas na geladeira a 4°C para posterior identificação e continuidade dos testes.

4.4 Identificação clássica

Após isolamento, foi realizada uma observação macro e microscópica das características morfológicas do microrganismo. Para isso, foi realizada a técnica de microcultivo, por favorecer o crescimento radial das colônias filamentosas, que consiste na preparação de culturas em lâminas de microscopia para observação direta em microscópio de campo claro, seguido de incubação por 5-7 dias a 28°C (Shirling; Gottlieb, 1966).

Posteriormente, para confecção das lâminas, foi utilizado o corante azul de lactofenol para melhor visualização de estruturas como conidiósporos, hifas, cadeia de esporos e conídios em microscópio óptico (100x). Através da observação das características macroscópicas e microscópicas, foi possível realizar a identificação a nível de gênero conforme os critérios adotados por Shirling; Gottlieb (1966).

4.5 Processo de produção e extração dos metabólitos secundários

4.5.1 Fermentação Submersa

Para induzir a produção de metabólitos secundários pelo microrganismo, foi realizada a técnica de fermentação submersa, descrita por Amorim *et al.* (2020). Para tal, o

microrganismo foi previamente cultivado em placas de Petri com ágar BDA orgânico; em seguida, 5 blocos de meio, contendo colônias do microrganismo, foram retirados com o auxílio de uma ponteira azul ($\cong 6$ mm de diâmetro) e colocados em frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo meio líquido de batata orgânico enriquecido com glicose (50 ml). Então, os frascos foram incubados em incubadora rotativa ($180 \text{ rpm/ } 28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 15 dias. Após este período, a amostra foi filtrada com auxílio de papel filtro e microfiltro ($0,22 \text{ }\mu\text{m}$) para avaliação das atividades biológicas.

4.5.2 Técnica de separação de misturas líquido-líquido

Para realizar a extração dos metabólitos secundários, foi realizada a técnica de separação de misturas líquido-líquido descrita por Trisuwan *et al.* (2008), que consiste na adição de acetato de etila, como solvente, junto a biomassa filtrada na proporção de 1:1. A solução foi homogeneizada vigorosamente em balão volumétrico por 8 minutos, e colocada em funil de decantação, para ocorrer a separação química, por 30 minutos. A fase contendo os metabólitos foi selecionada e colocada em um frasco de vidro previamente pesado. Com o uso de um evaporador rotativo, o solvente orgânico sofreu evaporação, resultando em uma massa seca (rendimento) contendo os metabólitos de interesse. Por fim, esse rendimento foi ressuspenso em DMSO (1%).

4.6 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos microrganismos endofíticos

4.6.1 Ensaio de difusão em ágar

Para testar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários (MS) obtidos, foi realizado o teste de difusão em ágar de acordo com o protocolo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para tal, realizou-se previamente a semeadura das bactérias-teste em placas de Petri contendo meio ágar MH para bactérias e ágar Sabouraud para os fungos. Então, ocorreu a aplicação do MS ($1.000 \text{ }\mu\text{g/mL}$) e dos controles (claritromicina $20\mu\text{g/mL}$, fluconazol e dimetilsulfóxido - DMSO a 1%) em poços de 6 mm de diâmetro feitos no ágar, seguida de incubação à 37°C por 48 horas. A leitura dos resultados foi feita a partir da medição dos halos formados, com auxílio de um paquímetro.

4.6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi realizada a diluição seriada do MS em placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços contendo MH (Zgoda; Porter, 2001; CLSI, 2008). O teste foi realizado em triplicata com as concentrações distribuídas de A-H (1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,2 µg/mL, 15,6 µg/mL e 7,8 µg/mL). Em seguida os microrganismos em salina (0,85%), previamente padronizados pela escala de McFarland a 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram colocados nos poços da microplaca com a ajuda de uma micropipeta. Para fins de comparação, também foram realizados controles de crescimento bacteriano positivo e negativo, além do controle com DMSO. A placa seguiu para incubação à 37°C por 24 horas, com posterior adição de corante resazurina aos poços e novo período de incubação por 24 horas. Por fim, foi realizada a leitura da placa, sendo que a alteração para a cor rosa demonstra o crescimento bacteriano.

4.6.3 Teste Antibiofilme

4.6.3.1 Interferência do MS na formação do biofilme

A formação de biofilme foi determinada em microplacas de 96 poços (Stepanovic *et al.*, 2000) e em seguida foram realizados testes para avaliar a interferência do MS na formação do biofilme. Assim, foram aplicadas 200µL de suspensões bacterianas em MH (DO570 0,2) nos poços com CIM do MS (100µL). Os controles negativos contiveram apenas o MH. Após 48h a 37°C, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 200µl de PBS (pH 7,2). As células bacterianas anexas remanescentes foram fixadas com 200µl de 99% de metanol e coradas com 2% de violeta de cristal. O corante ligado foi então solubilizado com 160µl de ácido acético glacial a 33% e a DO550 da solução foi medida (Gomes *et al.*, 2013, com adaptações).

Para análise da intensidade da formação do biofilme foi utilizado a classificação idealizada por Ferro *et al.* (2012), que se baseia na densidade óptica dos isolados (D.O.i), e tomando como base a do controle negativo (D.O.c), os isolados foram classificados nas seguintes categorias: Não-Produtor: $D.O.i < D.O.c$; Produtor Fraco: $D.O.c < D.O.i \leq (2 \times D.O.c)$; Produtor Moderado: $(2 \times D.O.c) < D.O.i \leq (4 \times D.O.c)$; Produtor Forte: $(4 \times D.O.c) < D.O.i$.

4.6.3.2 Interferências do MS em biofilme pré-formado

A formação de biofilme foi determinada também em microplacas de 96 poços (Stepanovic *et al.*, 2000). Foram aplicadas 200µL de suspensões bacterianas em MH (DO₅₇₀ 0,2) nos poços. Os controles negativos contiveram apenas o MH. Após 24h a 37°C, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 200µL de PBS e em seguida acrescentado 200µL de MH para os controles e 100µL de MH com 100µL da CIM do MS nos poços e depois as microplacas foram incubadas por mais 24h a 37°C. Após esse período, aspirou o conteúdo dos poços e lavou duas vezes com 200µL de PBS e as células bacterianas remanescentes foram fixadas com 200µL de 99% de metanol e coradas com 2% de violeta de cristal. O corante foi então solubilizado com 160µL de ácido acético glacial a 33% e a DO₅₅₀ da solução foi medida (Gomes *et al.*, 2009, com adaptações). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Bioensaio com larvas de *Tenebrio molitor*

Para avaliar a toxicidade do MS, dois grupos (teste e controle) de larvas de *T. molitor* foram distribuídos em placas de Petri, contendo 10 larvas em cada. Através da região caudal das larvas foi injetado 10 µL do MS (concentração da CIM). As larvas permaneceram em temperatura ambiente e a taxa de sobrevivência foi observada em intervalos de 24h, durante 10 dias. Para estabelecer a morte das larvas, verificou-se visualmente a melanização e a resposta aos estímulos físicos. O controle negativo foi DMSO a 1% e PBS. O mesmo ensaio foi realizado para avaliar a sobrevivência das larvas após infecção com os microrganismos testes (que foram inibidos no teste de difusão em ágar) em dois grupos (tratados com o MS e não tratados) (Souza *et al.*, 2015).

4.8 Análise Estatística

As análises de dados foram realizadas com o programa *Graphpad Prism* 6. Os dados dos testes de concentração letal e toxicidade foram expressos como média ± desvio-padrão. Nas análises dos dados obtidos nos testes de sobrevivência de *T. molitor* e atividade antibiofilme, para verificar diferenças entre os grupos, considerou-se como significativo $p < 0,05$. A curva de sobrevivência no ensaio de *T. molitor* foi obtida através da aplicação dos

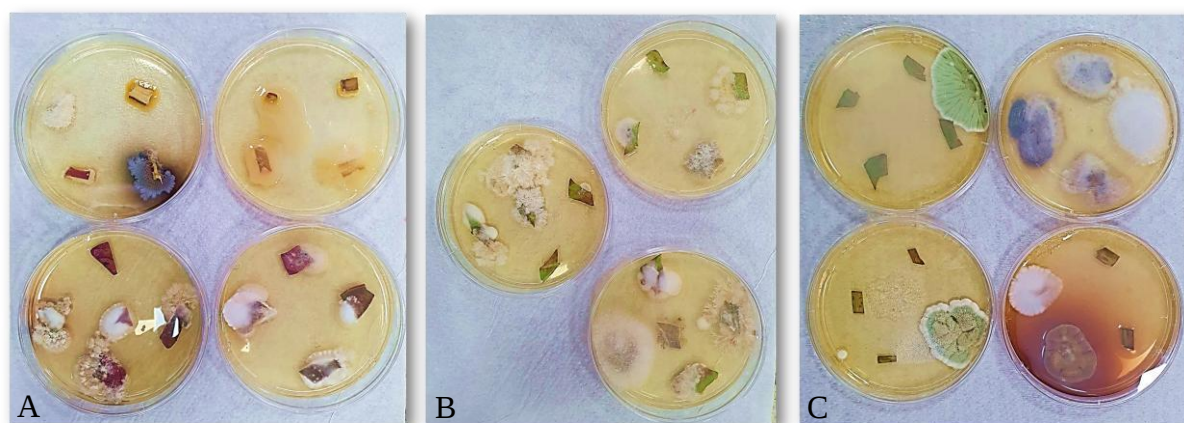
testes de Kaplan-Meier, analisando os resultados com o teste Log-Rank (Mantel-Cox). Para os dados obtidos do teste do biofilme aplicou-se o teste de Tukey.

5 RESULTADOS

5.1 Plantas selecionadas

A parte da planta escolhida para o isolamento de actinobactérias foi a folha, por se tratar de um local com maior prevalência de microrganismos endofíticos (Figura 1).

Figura 1 – Isolamento de microrganismos endofíticos a partir de fragmentos de folhas das plantas *Aloe vera*, *Hibiscus sabdariffa*, *Peumus boldus*, *Anacardium occidentale* e *Cymbopogon citratus*.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.2 Isolamento do microrganismo endofítico

Ao final do período mínimo de incubação (7 dias) foi possível observar o crescimento de pequenas colônias com características macroscópicas de actinobactérias em 3 placas contendo fragmentos de folhas. Por essa razão, as placas continuaram na estufa por mais 7 dias para crescimento, purificação e identificação microscópica das colônias. Ao final de 15 dias o resultado foi positivo para actinobactérias nas placas contendo folha de capim-limão, babosa e vinagreira, entretanto, durante o processo de purificação as actinobactérias isoladas das folhas de capim-limão e vinagreira não cresceram.

A respeito da actinobactéria isolado da folha da babosa, foi possível observar macroscopicamente a presença de micélio aéreo nas colônias de coloração branca acinzentada, com bordas brancas, forma circular e elevação convexa baixa, além do odor do composto orgânico geosmina, produzido por esse gênero (Figura 2). Na identificação microscópica da bactéria foi possível observar, através da objetiva de 100x, micélios aéreos

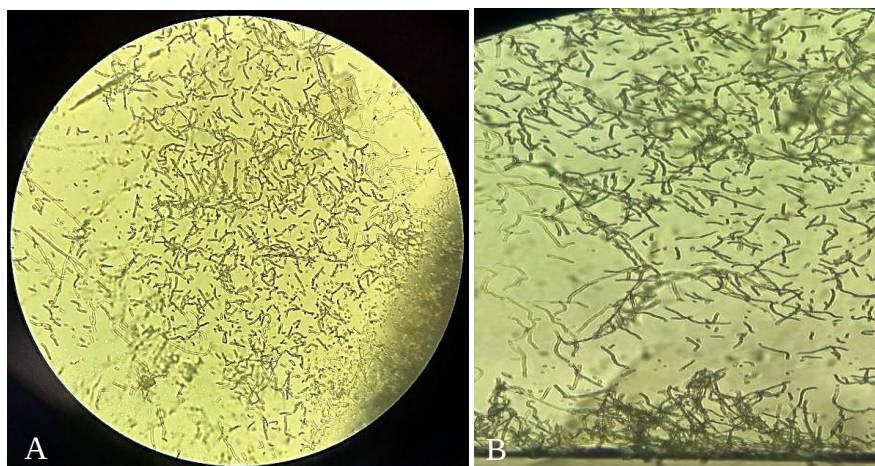
com longas cadeias de esporos retos (Figura 3). Todos estes fatores sugerem que o microrganismo isolado é uma actinobactéria pertencente ao gênero *Streptomyces*.

Figura 2 – Aspecto morfológico do isolado da folha da babosa (*Aloe vera*) com características sugestivas de *Streptomyces* sp.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Figura 3 – Microscopia óptica, do isolado da folha da babosa (*Aloe vera*), evidenciando longas cadeias de esporos retos.



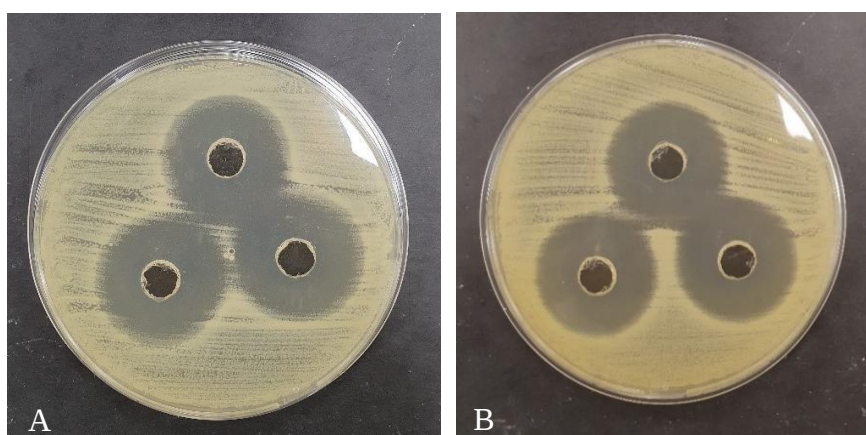
Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.3 Ensaio de ágar difusão

Os resultados do ensaio de ágar difusão demonstraram que os metabólitos secundários obtiveram ação antibacteriana contra os isolados de *Corynebacterium propinquum*, evidenciada através da formação de halos de inibição de 27 ± 0 mm frente *C. propinquum* 431024, e halo de 25 ± 0 mm frente *C. propinquum* 36063 (Figura 4). Enquanto o controle

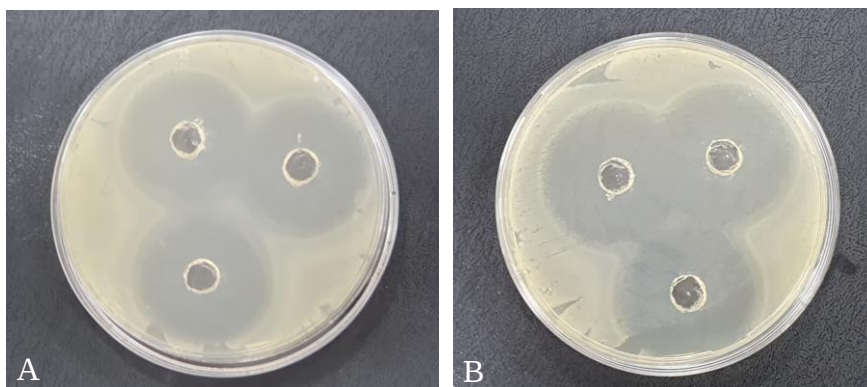
(claritromicina 20 µg/mL) formou halo de inibição de $29 \pm 0,5$ frente a *C. propinquum* 43102 28 ± 0 frente a *C. propinquum* 36063 (Figura 5). O controle negativo DMSO a 1% não formou halo de inibição, conforme o esperado (Figura 6). Os metabólitos secundários não apresentaram atividade contra os demais microrganismos testados (*Klebsiella pneumoneae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*). Testes realizados em triplicata.

Figura 4 – Teste de ágar difusão dos metabólitos secundários, com formação de halos frente a *C. Propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B).



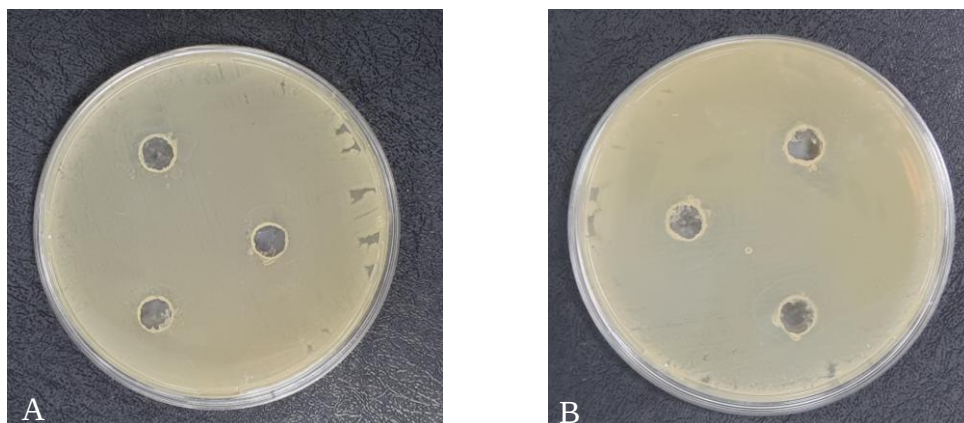
Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Figura 5 – Teste de ágar difusão dos metabólitos secundários, com o antibiótico claritromicina (controle) com formação de halos frente a *C. propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B).



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Figura 6 – Teste de ágar difusão com DMSO (controle) com formação de halos frente a *C. propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B).



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.4 Concentração Inibitória Mínima

O teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi realizado apenas com as linhagens que tiveram resultados positivos no teste de ágar difusão. Dessa forma, os microrganismos avaliados foram *C. propinquum* 431024 e *C. propinquum* 36063, onde foi possível observar alteração discreta na coloração da resazurina, nas concentrações 15,6 e 7,8 µg/mL, fazendo com que a concentração 31,2 µg/mL fosse considerada a menor que inibiu o crescimento dos microrganismos de forma satisfatória.

5.5 Teste de biofilme

Foi realizado o teste de biofilme para analisar se os microrganismos utilizados nos teste são produtores de biofilme, sendo esses classificados da seguinte forma: *C. propinquum* 421024, *Escherichia coli* 589, *E. coli* 042, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *E. coli* F5,

C. albicans ATCC 90028, *C. glabrata* 124 (S.V.) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram classificados como fracos produtores de biofilme; enquanto *C. propinquum* 36063, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *C. glabrata* 105 (S.V.), *C. albicans* 37 (S.O.), *C. albicans* ATCC 14033, *C. albicans* 341 (S.O.) e *Candida albicans* 40 (S.O.) foram produtores moderados; e *Candida krusei* ATCC 6238 e *C. albicans* 342 (S.O.) foram classificados como fortes produtores de biofilme.

Em seguida foi realizado o teste antibiofilme para observar a ação dos metabólitos secundários frente a essas linhagens, os resultados estão dispostos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Teste de biofilme para avaliar a interferência dos metabólitos secundários na formação do biofilme.

MICRORGANISMOS	INTERFERÊNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NA FORMAÇÃO DO BIOFILME		
	Intensidade da produção de biofilme	Redução da formação do biofilme (%)	Aumento da formação do biofilme (%)
<i>Corynebacterium propinquum</i> 421024	Produtor fraco	22%	-
<i>Corynebacterium propinquum</i> 36063	Produtor moderado	48%	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Produtor moderado	-	24%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 0026	Produtor fraco	-	22%
<i>Candida krusei</i> ATCC 6238	Produtor forte	-	48%
<i>Candida albicans</i> 40 (S.O.)	Produtor moderado	-	56%
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Produtor fraco	-	26%
<i>C. glabrata</i> 124 (S.V.)	Produtor fraco	-	34%
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Produtor fraco	6%	-
<i>C. glabrata</i> 105 (S.V.)	Produtor moderado	-	77%
<i>C. albicans</i> 37 (S.O.)	Produtor moderado	-	76%
<i>C. albicans</i> ATCC 14033	Produtor moderado	2%	-
<i>C. albicans</i> 341 (S.O.)	Produtor moderado	27%	-
<i>C. albicans</i> 342 (S.O.)	Produtor forte	-	2%

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Com as linhagens de *Corynebacterium propinquum* a avaliação do teste antibiofilme foi realizada com a CIM 31,2 µg/mL, alcançada no teste anterior. Dessa forma, os resultados mostraram que em comparação com o controle houve uma redução na formação do biofilme de 22% para *C. propinquum* 421024, bem como redução no biofilme pré-formado de 27%. Com relação a *C. propinquum* 36063 houve redução de 48% na formação do biofilme e de 42% no biofilme pré-formado (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de biofilme para avaliar a interferência dos metabólitos secundários (CIM 31,2 µg/mL) na formação do biofilme e em biofilme pré-formado.

MICRORGANISMOS	INTERFERÊNCIA DOS METABÓLITOS
----------------	-------------------------------

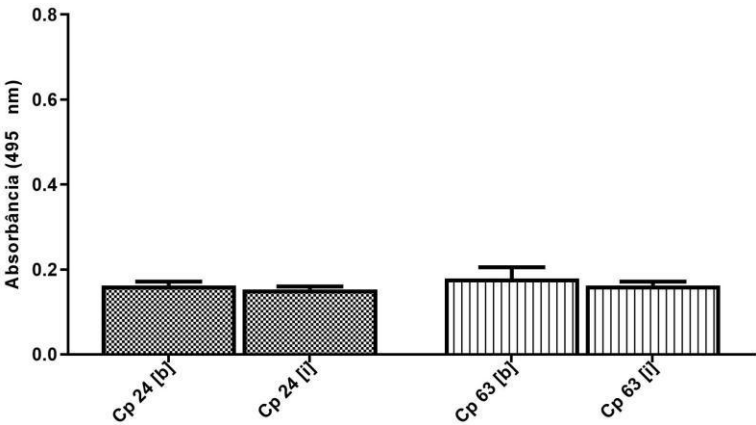
	CIM 31,2 µg/mL		
	Intensidade da produção de biofilme	Redução da formação do biofilme em %	Redução do biofilme pré-formado em %
<i>Corynebacterium propinquum</i> 421024	Produtor fraco	22%	27%
<i>Corynebacterium propinquum</i> 36063	Produtor moderado	48%	42%

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.6 Análise Estatística

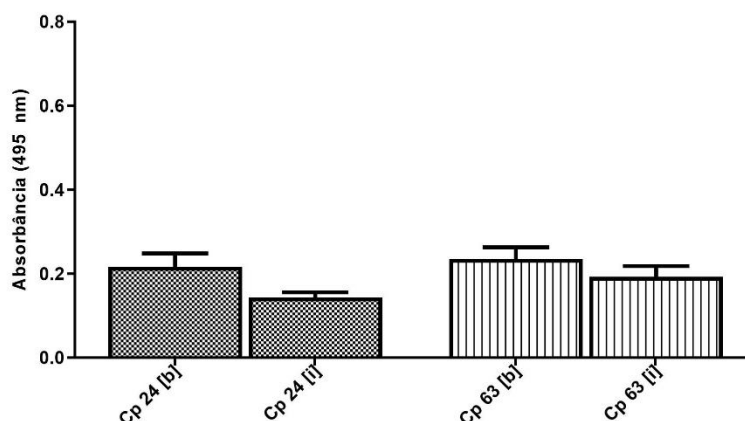
A análise estatística do teste de biofilme mostrou que não houve diferença significativa da interferência dos metabólitos secundários, como pode ser observado nas figuras 8 e 9.

Figura 7 – Análise estatística da interferência do MS na formação do biofilme (por *C. propinquum*) quando comparado com a produção do biofilme em meio de cultura puro.



Legenda: b= formação do biofilme sem MS; i= formação do biofilme com a influência do MS; Cp= *Corynebacterium propinquum*; Cp 24: p= 0,59; Cp 63 p=1,05.
Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 8 – Análise estatística da interferência do MS no biofilme pré-formado (por *C. propinquum*) quando comparado com a pré-formação em meio de cultura puro.

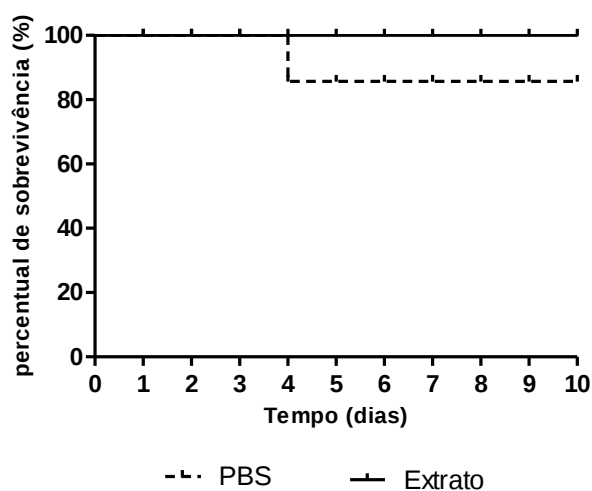


Legenda: b= formação de biofilme sem MS; i= formação do biofilme com a influência do MS; Cp= *Corynebacterium propinquum*; Cp 24: p=2,83; Cp 63 p= 1,65.
 Fonte: Dados da pesquisa (2024).

5.7 Ensaio de toxicidade e Curva de sobrevivência

O ensaio de toxicidade mostrou que a concentração 31,2 µg/mL dos metabólitos secundários, produzidos por *Streptomyces* sp. isolado da *Aloe vera*, é segura para as larvas de *Tenebrio molitor*, uma vez que durante a comparação entre PBS e metabólitos, injetados nas larvas, observou-se, ao longo de 10 dias, que nenhuma larva morreu com os metabólitos, porém, no teste realizado com PBS 01 larva morreu no 4º dia do ensaio, conforme mostra o gráfico 1.

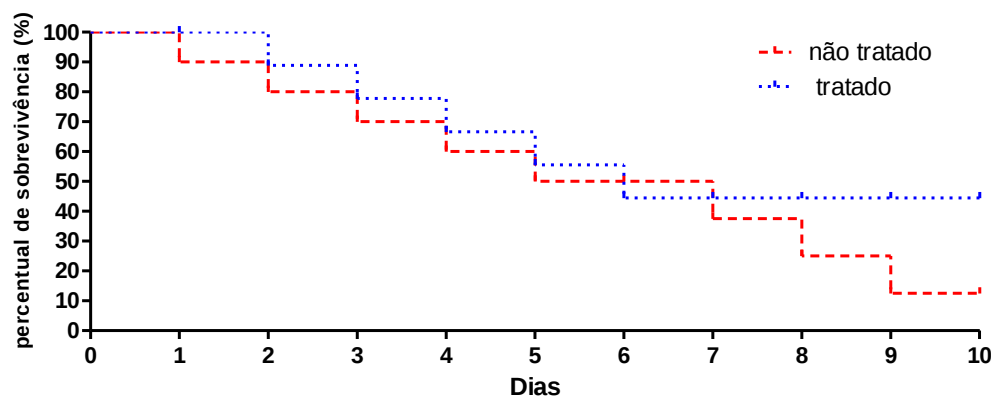
Figura 9 – Teste em *Tenebrio molitor* para avaliar a toxicidade da CIM (31,2 µg/mL) dos metabólitos secundários frente a isolados clínicos de *C. propinquum*.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

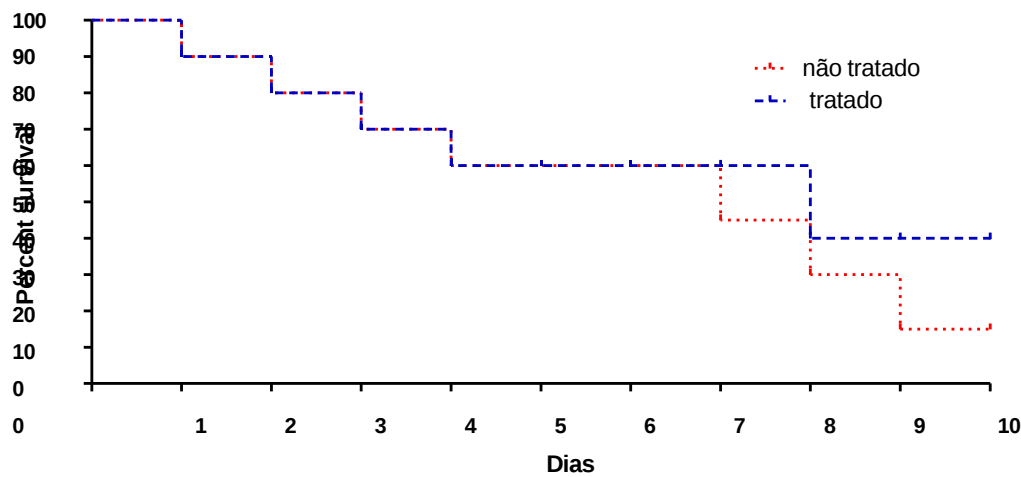
A avaliação da sobrevivência das larvas após a infecção por *C. propinquum*, demonstrou, ao final de 10 dias, que o grupo tratado com os metabólitos secundários (concentração 31.2µg/mL) teve uma taxa de sobrevivência maior (08 mortos) que o grupo sem tratamento (05 mortos) (Gráficos 2 e 3), esse teste foi realizado 3x e o resultado foi similar em todos.

Figura 10 - Curva de sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com *C. propinquum* 421024, tratado (concentração 31,2µg/mL) e não tratado.



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Figura 11 - Curva de sobrevivência de *Tenebrio molitor* infectados com *C. propinquum* 36063, tratado (concentração 31,2µg/mL) e não tratado.



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo plantas medicinais foram analisadas quanto a presença de microrganismos endofíticos, sendo a babosa (*Aloe vera*) evidenciada como hospedeira de um endofítico com características morfológicas de actinobactéria, sugestivo para o gênero *Streptomyces*, apresentando colônias com coloração cinza e branco, cadeias de esporos espiraladas (Lambert; Loria's, 1989) e odor característico da geosmina, um álcool terciário bicíclico que apresenta odor de terra, produzido na fase estacionária de *Streptomyces* (Dickschat et al., 2005; Jüttner; Watson, 2007 Guttman; Rijn, 2008; Souza; Mathies; Fioravanzo, 2012).

O isolamento da actinobactéria proveniente da *Aloe vera* evidencia o que as pesquisas têm demonstrado nos últimos 10 anos, que a babosa é uma planta medicinal que fornece uma gama de bactérias endofíticas, tornando-se um fator motivador para explorar seus compostos bioativos para diferentes aplicações industriais e medicinais (Aly et al., 2008; Nisa et al., 2015; Nakaew; Sunghong, 2018; Chandrakar; Gupta, 2019; Silva et al., 20 Ameen et al., 2021; Silva et al. 2022; Krynitskaya et al., 2024).

Assim, o potencial biotecnológico da actinobactéria isolada foi testado frente a diversas linhagens de patógenos, dentre elas a *Corynebacterium propinquum*, bactéria Gram-positiva pleomórfica, aeróbica, comensal e oriunda de nasofaringe (Xu et al., 2021), foram as únicas sensíveis ao MS no teste de sensibilidade antimicrobiana.

Os demais microrganismos testados (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia*, *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) não foram suscetíveis ao MS. Muitos trabalhos relatam maior atividade antimicrobiana (de *Streptomyces*) frente a bactérias Gram-positivas (Chaudhary et al., 2013; Atta, 2015; Shrivastava et al., 2015; Dalitz et al., 2017), provavelmente, pela presença da membrana externa das Gram-negativas representar uma barreira importante à penetração de vários agentes antimicrobianos (Guimarães; Monesso; Pupo, 2010). No trabalho de Nogueira (2022), foi isolado *Streptomyces* sp. proveniente do solo, também se obteve resultado semelhante ao presente estudo, uma vez que o MS produzido por essa actinobactéria não inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

O biofilme, comunidade microbiana complexa e estruturada que tende a aderir a superfícies inertes e vivas na presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também foi analisado quanto a produção pelos microrganismos patogênicos, onde foi constatado que todas as linhagens são produtoras de biofilme. Nesse contexto, os metabólitos

secundários demonstraram ação contra o biofilme de alguns microrganismos, interferindo na produção e reduzindo o biofilme pré-formado, demonstrando ser um potencial agente sanitizante contra microrganismos patogênicos em fômites de poliestireno e ainda podendo ser testado em outros materiais como dispositivos hospitalares. Em contrapartida, na maioria dos microrganismos analisados houve aumento na produção do biofilme, ou seja, o MS pode ter sido agregado à composição da matriz extracelular das células bacterianas, que é composta principalmente por proteínas, polissacarídeos e DNA extracelular, sendo importante posterior análise das concentrações ideais para erradicação do biofilme.

Com relação as linhagens de *C. propinquum* (42102 e 36063) foi interessante observar a interferência dos metabólitos (na concentração 31,2µg/mL) durante a formação do biofilme, reduzindo em até 48% sua produção, mostrando que o composto ativo é capaz de interferir durante o processo de estruturação de células bacterianas com substâncias poliméricas extracelulares. Ainda foi observada a interferência dos metabólitos no biofilme pré-formado, obtendo redução de até 42%.

As bactérias dentro do biofilme tornam-se mais resistentes a tratamento antimicrobiano em comparação às células planctônicas, porque a comunidade bacteriana no biofilme difere da sua contraparte planctônica nos padrões de expressão de genes e proteínas, isso normalmente resulta em perfis distintos de resistência metabólica e antimicrobiana (Giaouris *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Yaacob *et al.* (2021) relatou a composição bioquímica e a morfologia do biofilme de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, trazendo informações relevantes para este estudo por se tratar do mesmo gênero bacteriano aqui analisado. Uma ampliação de 5000x mostra a morfologia do biofilme de *C. pseudotuberculosis*, células em forma de bastonete foram claramente observadas, havendo apenas uma camada de biofilme no biofilme de 24 horas; essas células foram encapsuladas em uma matriz extracelular fibrosa.

O estudo também mostrou grupos de proteínas importantes para todas as fases da formação do biofilme, pois desempenham papéis cruciais na ligação inicial à superfície, estabilização da matriz do biofilme através de interações com componentes de exopolissacarídeo e ácido nucleico. Várias linhas de evidências mostraram que os lipídios estão presentes na matriz extracelular, que são importantes para a estabilidade arquitetônica do complexo microbiano. Na maioria dos casos, as células planctônicas e de biofilme apresentam perfis diferentes de esterol e esfingolípido (Yaacob *et al.* 2021).

O ensaio de toxicidade mostrou que a concentração 31,2 µg/mL dos metabólitos secundários, produzidos por *Streptomyces* sp. isolado da *Aloe vera*, é segura para as larvas de *Tenebrio molitor*.

A avaliação da sobrevivência das larvas de *T. molitor* após a infecção por *C. propinquum*, demonstrou que o grupo tratado teve uma taxa de sobrevivência maior que o grupo sem tratamento.

A curva de infecção e sobrevivência em modelo alternativo foram analisadas no estudo de Amorim *et al.* (2020), onde o metabólito produzido pela cepa de *Streptomyces ansochromogene* em uma concentração de 1 mg/L mostrou a capacidade de aumentar a expectativa de vida de *Tenebrio molitor* infectado com o patógeno *P. aeruginosa*. As larvas infectadas com solução padrão de $0,3 \times 10^8$ de *P. aeruginosa* morreram todas no oitavo dia, mas os infectados com a bactéria e inoculados com o metabólito sobreviveram até o oitavo dia; duas larvas morreram no nono e décimo dia, comportamento semelhante ao das larvas infectadas com *P. aeruginosa* e tratado com cloranfenicol.

Diversos estudos relatam que os compostos bioativos sintetizados pelas plantas medicinais hospedeiras também são produzidos pela microbiota endofítica (Abdou *et al.*, 2010; Danagoudar *et al.*, 2018; Gupta; Bhatt; Chaturvedi, 2018; Tan *et al.*, 2018; Kaaniche *et al.*, 2019), e há evidências de que os caminhos da síntese metabólica e transferência horizontal de gene evoluíram independentemente em plantas e microrganismos (Richards *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2011; Hamayun *et al.*, 2017). Outros metabólitos que não são produzidos pela planta medicinal, podem ser produzidos pela microbiota endofítica, contribuindo para a heterogeneidade do perfil fitoquímico e das biofunções das plantas (Aly *et al.*, 2008; Nisa *et al.*, 2015; Nakaew; Sungthong, 2018).

Estudos como de Swati *et al.* (2022) mostraram que ao realizarem o isolamento da folha de *Aloe vera*, purificaram 17 isolados diferentes de bactérias endofíticas; todos os endofíticos bacterianos isolados são de natureza gram-positiva e em forma de bastonete. Assim como o trabalho de Krynitskaya *et al.* (2024), onde caracterizaram quatro isolados da microflora endofítica da planta *Aloe vera*; todos eles foram classificados como actinobactérias, identificadas como *Arthrobacter* spp. ou *Micrococcus* spp. Semelhante ao resultado de VegaGálvez *et al.* (2012) que também observou crescimento bacteriano no gel de *Aloe vera*.

Neste estudo foi demonstrada a atividade antibacteriana, de metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* sp., frente a isolados clínicos de *Corynebacterium propinquum*, nos testes de difusão em ágar, CIM e antibiofilme. Por essa razão, é importante ressaltar que

apesar de *C. propinquum* ser um componente natural da pele e de membranas de mucosas, dificilmente sendo associada a processos patológicos em pessoas imunocompetentes, esta bactéria já foi isolada de pacientes em diversas situações clínicas, incluindo derrame pleural, endocardite valvar, bacteremia, rinossinusites, lesões cutâneas e abscessos (Bernard *et al.*, 2013).

7 CONCLUSÃO

- Os metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria apresentaram potencial antibiótico frente a linhagens clínicas (nasofaringe) de *Corynebacterium propinquum*;
- A actinobactéria isolada a partir da folha da babosa (*Aloe vera*) pertence ao gênero *Streptomyces*, porém sem identificação molecular até o momento;
- Os metabólitos secundários interferiram no processo de formação do biofilme de *Corynebacterium* sp., além de diminuir o biofilme pré-formado em até 42%;
- A atividade antimicrobiana foi satisfatória, uma vez que os metabólitos presentes no MS inibiram linhagens bacterianas na concentração 31,2µg/mL;
- Os metabólitos secundários são seguros para as larvas de *Tenebrio molitor*, tendo eficácia no tratamento contra a infecção por *Corynebacterium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, R.; SCHERLACH, K.; DAHSE, H.M.; SATTLER, I.; HERTWECK, C. Botryorhodines AD, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 110–116, 2010.
- AGARWAL, H. *et al.* Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechno-logy and Pharmacological Applications. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 614, 2023.
- AKINSANYA, A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in *Aloe vera*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 23, 2015.
- ALENCAR, E. M. *et al.* Estudo etnobotânico do conhecimento e uso das plantas medicinais no município de Buriticupu, Maranhão, Brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 6, p. 328-338, 2019.
- ALMEIDA, M. A. F.; VEIGA, N. B. S.; REIS, K. M. C. Tratamento com antimicrobianos na última semana de vida de pacientes com câncer avançado sob Cuidados Paliativos. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 12466-12482, 2022.
- ÁLVAREZ, A. M. Metabólitos secundários de actinomicetos. In: FIERRO, F. F.; ONOFRE, M. V. (Orgs). **Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones**. Cidade do México: Casa abierta al tiempo/UAM, p. 27-37, 2011.
- ALVES, Matheus Silva. **Atividade antimicrobiana de metabolitos secundários de *Streptomyces* spp. isolados de cultura de soja do sul do Estado do Maranhão**. 2021. 77 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.
- ALY, A. H. *et al.* Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716–1725, 2008.

AMORIM, E. A. F. *et al.* Antimicrobial potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) isolated from a plant native to the Amazon against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers Microbiology**, 2020.

ANCHEEVA, E.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. **Journal Name: Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 1, 2020.

AYSWARIA, R. A.; VASU, V.; KRISHNA, R. Several endophytic species of *Streptomyces* with dynamic metabolites and their meritorious applications: a critical review. **Critical Reviews in Microbiology**, 2020.

AZEVEDO, V. L. S. *et al.* An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3). **Microorganisms**, v. 12, n. 476, 2024.

BABA, M. S. *et al.* *In vivo* antimalarial activity of the endophytic actinobacteria, *Streptomyces* SUK 10. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 847–855, 2015.

BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of. **American Society for Microbiology**, n. 80, p. 1–43, 2016.

BERNARD, K. *et al.* Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2146–2154, 2013.

BOTAS MUÑOZ, A. M. Regulación del metabolismo en *Streptomyces*: Control por ArgR. Tese (Doutorado em) - Universidad de León, 2013.

BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, n. 47, p. 9–18, 2011.

BOTTA, A. L. *et al.* *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013.

BULGARELLI, D. *et al.* Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91–95, 2012.

CANTILLO A. *et al.* Genome Sequences of Actin-obacteria from Extreme Environments in Colombia. **Microbiology Resources Announc**, v. 7, n. 22, p. e01384-18, 2018.

CAO, L. *et al.* Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett. App. **Microbiology**, v. 39, p. 425-430, 2004.

CAO, P. *et al.* Community structures and antifungal activity of root-associated endophytic actinobacteria in healthy and diseased cucumber plants and *Streptomyces* sp. HAAG3-15 as a promising biocontrol agente. **Microorganisms**, v. 8, n. 236, 2020.

CARIOCA, M. S.; MAIA, K. N. L.; TEIXEIRA, A. B. Uso indevido de antibióticos x aumento da resistência bacteriana: uma relação perigosa. **Revista Multidisciplinar Em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 34, 2021.

CASSINI, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis **Lancet Infectious Disease**, v. 19, p. 56–66, 2019.

CASTILHO, U. F. *et al.* Kakadumycis, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, na endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 224, p. 183-190, 2003.

CASTILHO, U. F. *et al.* Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL 30562) endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS**, v. 100, n. 14555–14561, 2003.

CHAROUSOVÁ, I. *et al.* *Streptomyces globosus* DK15 and *Streptomyces ederensis* ST13 as new producers of factumycin and tetrangomycin antibiotics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 9, 2018.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed Evolution of industrial enzymes: na update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard. Document M27-AL3, CLSI, Pennsylvania, 19087-1898. Vol 28. 2008.

COUSINS, S. R.; WITKOWSKI, E. T. F. African aloe ecology: A review. **Journal Arid Environmental**, v. 85, p. 1-17, 2012.

COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; AMARAL, F. M. M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão–Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2002.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). *In*: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.

CUNHA, M. M. C. *et al.* Perfil etnobotânico de plantas medicinais comercializadas em São Luís, Maranhão, Brasil. **Scientia Plena**, v. 11, n. 12, 2015.

DANAGOUDAR, A.; JOSHI, C. G.; RAVI, S. K.; KUMAR, H. G. R.; RAMESH, B. N. Antioxidant and cytotoxic potential of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Tragia involucrate* L. **Pharmacognosy Research**, v. 10, 188–194, 2018.

DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiol and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.

DICKSCHAT, J. S.; BODE, H. B.; MAHMUD, T.; MÜLLER, R.; SCHULZ, S. A novel type

of geosmin biosynthesis in myxobacteria. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 5174-5182, 2005.

DING, L. *et al.* A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 9, n. 11, p. 4029-4031, 2011.

DONG, Y. *et al.* Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1783-90, 2003.

DU, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020.

DUVAL, R. E.; GRARE, M.; DEMORÉ, B. Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right bacteria. **Molecules**. v. 24, n. 3152, 2019.

EID, A. M. *et al.* Endophytic *Streptomyces laurentii* mediated green synthesis of ag-nps with antibacterial and anticancer properties for developing functional textile fabric properties. **Antibiotics**, 2020.

EZRA, D. *et al.* Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, 2004;(150):785-793, 2004.

EZZYANI, M. *et al.* Evaluación del biocontrol *Phytophthora capsici* en Pimiento (*Capsicum annun* L.) por tratamiento com *Burkholderia cepacia*. **Anales de Biología**, v. 26, p. 61-68, 2004.

FIRMO, W. C. A.; GOMES, P. R. M.; VILANOVA, C. M. Estudo etnobotânico de plantas medicinais hipoglicemiantes no bairro Maracanã no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Scientia Plena**, v. 10, n. 9, 2014.

FRITZ, O. *et al.* Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2816-2824, 2003.

GAIERO, J. R. *et al.* Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1738–1750, set. 2013.

GONÇALVES, M. M. M. *et al.* Estudo etnobotânico do conhecimento e uso de plantas medicinais em Santa Luzia, Maranhão, Brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 5, p. 12-21, 2018.

GOODFELLOW, M. Bergey's manual of systematics of Archaea and bactéria. In: WHITMAN, W. *et al.* (Eds.) Classe Actinobacteria. 5. ed. New York: Springer, 2012.

GOODFELLOW, M. FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antoine Van Leeuwenhoek*, v. 98, n. 2, p. 119-142, 2010.

GOS, F. M. W. R. *et al.* Antibacterial activity of endophytic Actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). **Frontiers of Microbiology**, v. 6, p. 1-17, 2017.

GRAEFE, G.; WARD, K. Dynamic Query Evaluation Plans. **ACM Digital Library**, p. 358-366, 1989.

GUPTA, S.; BHATT, P.; CHATURVEDI, P. Determination and quantification of asiaticoside in endophytic fungus from *Centella asiatica* (L.) urban. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 111, 2018.

GUTTMAN, L.; RIJN, J. V. Identification of conditions underlying production of geosmina and 2-methylisoborneol in a recirculating system. **Aquaculture, Amsterdam**, v. 279, n. 3, p. 85-91, 2008.

HAMMAN, J. H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. **Molecules**, v. 13, p. 1599–1616, 2008.

HAMAYUN, M. *et al.* Gibberellins producing endophytic fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 rescues growth of salt affected soybean. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 68,

2017.

HASSANMOGHADAM, F. *et al.* High prevalence of itraconazole resistance among *Candida parapsilosis* isolated from Iran. **Current Medical Mycology**, v. 5, n. 3, p. 43-46, 2019.

HUTCHINGS; M. I.; TRUMAN, A. W. WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019.

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

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. *In*: OMURA S. (Ed.). **The search bioactive compounds from microorganisms**. New York: Springer-Verlag, p. 281-302, 1992.

JENSEN, N. B. *et al.* Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. **Nature Communications**, v. 2, n. 273, 2011.

KAANICHE, F. *et al.* Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia* sp. isolated from *Rauwolfia macrophylla*. **Plos One**, v. 14, n. 6, p. e0217627, 2019.

KENNEDY, A. C.; LUNA, L. Z. **Rhizosphere**. Encyclopedia of Soils in the Environment. p. 399– 406, 2005.

KIM, E. S. Avanços recentes de Actinomycetes. **Biomoléculas**, v. 11, n. 134, 2021.

KRIES, H. Biosynthetic engineering of non-ribosomal peptide synthetases. **Journal of Peptide Science**, v. 22, n. 9, p. 564-570, 2016.

KRYNITSKAYA, A. *et al.* Endophytic microorganisms of *Aloe vera*. *In*: E3S Web of Conferences. **EDP Sciences**, p. 07007, 2024.

LACEY, H. J.; RUTLEDGE, P. J. Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 887, 2022.

LAMBERT, D. H.; LORIA, R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 387-392, 1989.

LAW, J. W. F. *et al.* Diversity of *Streptomyces* spp. from mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. **Scientific Reports**, v. 9, n.15262, 2019.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. **National Review Microbiology**, London, v. 2, n. 7, p. 581-592, 2004.

LEE, N. *et al.* Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Science Data**, v. 7, n. 1, p. 55, 2020.

LI, J. G.; REN, G. D.; JIA, Z. J.; DONG, Y. H. Composition and activity of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased greenhouse tomatoes. **Plant and Soil**, v. 380, p. 337-347, 2014.

LI, Y.L. *et al.* Biocontrol of root diseases and growth promotion of the tuberous plant *Aconitum carmichaelii* induced by Actinomycetes are related to shifts in the rhizosphere microbiota. **Microbial Ecology**, v. 79, p. 1-14, 2020.

LOCKHART, S. R. *Candida auris* and multidrug resistance: defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, 2019.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Actinomycetes as agentes of biodegradation in environment – A review. **Gene**, v. 115, p. 189-192, 1990.

MACHADO, Ana Beatriz Souza. **Avaliação da atividade antibiótica do extrato etanólico da folha de Mama-cadela *Brosimum gaudichaudii* Trécul.** 2023. Trabalho de Iniciação

Científica (Graduação em Medicina) - Universidade Evangélica de Goiás, Anápolis, 2023.

MAAN, A. A. The therapeutic properties and applications of *Aloe vera*: A review. **Journal Herb Med**, v. 12, p. 1–10, 2018.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUITTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetic and Molecular Biology**, v. 29, p. 148-158, 2006.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A Reação de Feulgen. **Ciência Cult**, v. 30, 1978.

MORENO, N. B.; RONCANCIO, N. A. R.; RIVEROS, W. A. R. Péptidos bioactivos de *Streptomyces*: una revisión actualizada de su potencial terapéutico. **Hechos Microbiológicos**, v. 14, n. 2, 2023.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans*—an example of microevolution of a fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 192–201, 2016.

MÜHLBERG, E. Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria. **Canada Journal of Microbiology**, v. 66, p. 11–16, 2020.

MURPHY, B. *et al.* Isolation and characterisation of amphotericin B analogues and truncated polyketide intermediates produced by genetic engineering of *Streptomyces nodosus*. **Journal Organic & Biomolecular Chemistry**, n. 16, 2010.

MURRAY, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, p. 629-55, 2022.

MUTHUKRISHNAN, P. *et al.* Antimicrobial efficacy of *Nocardiosis* sp. MK_MSt033 against selected multidrug resistant clinical microbial pathogens. **Journal of Infection and Public Health**. v. 13, n.10, p. 1522-1532, 2020.

NAKAEW, N.; SUNGTHONG, R. Seed phytochemicals shape the community structures of cultivable actinobacteria-inhabiting plant interiors of thai pigmented rice. **Microbiologyopen**, v. 7, p. e591, 2018.

NEEMUCHWALA, A. *et al.* *In vitro* antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, 2018.

NEWMAN, L. A.; REYNOLDS, C. M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 6–8, 2005.

NISA, H.; KAMILI, A.N.; NAWCHOO, I.A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S.N. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50–59, 2015.

OGBE, A. A.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of endophytes in the accumulation of secondary metabolites in medicinal plants under abiotic stress. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 126-134, 2020.

OJEDA, Cinthya Paola Ortiz. **Potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos isolados do jambú (*Acmella ciliata* (Kunth) Cass.) para controle de microrganismos patógenos**. 2017. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado da Amazônia, Manaus, 2017.

OKORO, C. K. *et al.* Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 95, n. 2, p. 121-133, 2009.

OLANO, C., MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes. **Marine Drugs**, v. 7, p. 210 – 248, 2009.

OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1179–88, 2019.

ONU. Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento sustentável**. Site. Brasília, 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 20 jan 2025.

PACIOS-MICHELENA, S. *et al.* Application of *Streptomyces* Antimicrobial Compounds for the Control of Phytopathogens. **Front Sustain Food Syst**, v. 5, 2021.

PANG, Z. *et al.* Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019.

PATHOM-AREE, W. *et al.* Diversity of actinomycetes isolated from Challenger deep sediment (10,898m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, v. 10, n. 3, p. 181-189, 2006.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer-Verlag, p. 179-197, 1991.

PINTO, Â. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

POLI, A. *et al.* Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.82-89, 2012.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019.

PROCÓPIO, R. E. L. *et al.* Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012.

QUINN, G. A.; BANAT, A. M.; ABDELHAMEED, A. M.; BANAT, I. M. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. **Journal of Medicine of Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 1040–8, 2020.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKA, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.

RAMIREZ-RODRIGUEZ, L.; STEPANIAN-MARTINEZ, B.; MORALES-GONZALEZ, M.; DIAZ, L. Optimization of the Cytotoxic Activity of Three *Streptomyces* Strains Isolated from Guaviare River Sediments (Colombia, South America). **Biomed Res Int**, 2018.

RICHARDS, T. A.; SOANES, D. M.; FOSTER, P. G.; LEONARD, G.; THORNTON, C. R.;

TALBOT, N. J. Phylogenomic analysis demonstrates a pattern of rare and ancient horizontal gene transfer between plants and fungi. **Plant Cell**, v. 21, p. 1897–1911, 2009.

RODRIGUES, Katiane. **Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de Actinomicetos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSA, F. C. *et al.* Bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por actinomiceto endofítico isolado da *Aloe vera*. **Concilium**, v. 23, n. 22, p. 227-239, 2023.

SAADAUN, I.; GHARAIBEH, R. The *Streptomyces* flora of region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **Journal of Arid Environments**, v. 53, p. 365-371, 2003.

SANTOS, D. C. P. *et al.* Potencial antimicrobiano de metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. isolados de solo impactado. **Peer Review**, v. 6, n. 5, p. 233-245, 2024.

SANTOS, H. L. *et al.* Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**. v. 56, p. 378–381, 2018.

SARITHA, V.; ANILAKUMAR, K.R.; KHANUM, F. Antioxidant and antibacterial activity of *Aloe vera* gel extracts. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive**, v. 1, n. 4, p. 376-84, 2010.

SAUNTE, M. L. *et al.* Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: clinical

characteristics, squalene epoxidase gene mutations, and a reliable eucast method for detection ditte. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, p. e01126-19, 2019.

SETTE, L. D. *et al.* Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1185-95, 2006.

SHAN, W. *et al.* Research article endophytic Actinomycetes from tea plants (*Camellia sinensis*): isolation, abundance, antimicrobial, and plant-growth-promoting activities. **BioMed Research International**. 2018.

SHARMA, K. L. *et al.* Longterm soil management effects on crop yields and soil quality in a dryland Alfisol. **Soil & Tillage Research**, v.83, p.246-259, 2005.

SHARMA, P.; KUMAR, S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: recent advances. **Bioresource Technology**, v. 339, 2021.

SHIMIZU, Y.; OGATA, H.; GOTO, S. Type III polyketide synthesis functional classification and phylogenomics. **ChemBioChem**, v. 18, n. 1, p. 50-65, 2017.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **Plant Pathology/Scientific Article**, v.82, 1-4, 2015.

SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Science Agriculture**, v.63, n.1, p.32-39, 2006.

SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313-340, 1966.

SILVA, C. F. *et al.* Endophytic bacteria promote growth and increase the aloin content of *Aloe vera*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 20, n. 5, p. 607-619, 2022.

SILVA, L. J. **Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) –Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.

SILVA, L. O. P; NOGUEIRA, J. M. R. Uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia: o aumento da resistência bacteriana pós-COVID-19. **RBACRevista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, p. 2, 2021.

SILVA, M. R. C.; SILVA, D. F.; SILVA, F. B. (Orgs.). Indicadores de qualidade ambiental: uma perspectiva a partir da zona de transição Amazônia-Cerrado. *In*: MOTA, A. G. *et al.* **Bioprospecção de Actinomicetos de interesse biotecnológico**. São Luís: Editora Pascal, v. 1, p. 38-50, 2022.

SINHA, A. *et al.* Impact of endophytic ralstonia sp. from *Aloe vera* gel and its antimicrobial activity. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 1, 259-262, 2015.

SIVALINGAM, P.; HONG, K.; POTE, J.; PRABAKAR, K. Extreme Environment *Streptomyces*: Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? **Intertational Journal of Microbiology**, p. 1–20, 2019.

SOARES, Erika Cristina de Lima. 2011. **Isolamento de endofíticos *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e avaliação da bioatividade**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

SOUZA, A. Q. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185 – 195, 2004.

SOUZA, P.C. *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiology and Methods**, v. 118, p. 182-6, 2015.

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos Secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

SURESH, M.; ARULARASAN, S.; SRI, K.N. Screening on antimicrobial activity of marine gastropods *Babylonia Zeylanica* (Bruguère, 1789) and *Harpa Conoidalis* (Lamarck, 1822) from Mudasalodai, Southeast coast of India. **International Journal of Pharmaceutics - ScienceDirect**, v. 4, n. 4, p. 552-6, 2012.

SURJUSHE, A.; VASANI, R.; SAPLE, D. G. 2008. *Aloe vera*: a short review. **Indian Journal Dermatol**, v. 53, p. 163-166.

SWATI, C.; AKANKSHA, G.; PRIYANKA, S. N. Bacterial endophytes of aloe vera and their potential applications. **Heritage and Sustainable Development**, v. 4, n. 1, p.32-41, 2022.

TAN, X. *et al.* Diversity and bioactive potential of culturable fungal endophytes of *Dysosma versipellis*, a rare medicinal plant endemic to China. **Scientific Reports**, v. 8, n. 5929, 2018.

TEDESCO, K. L.; RYBAK, M. J. Daptomycin. **Pharmacotherapy**, v. 24, n. 1, p. 41-57, 2004.

TRISUWAN, K. *et al.* Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1323-1326, 2008.

VALAN ARASU M.; IGNACIMUTHU S.; AGASTIAN P. Actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu with its antimicrobial properties. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2012.

VEIGA, M.; ESPARIS, A.; FABREGAS, J. Isolation of cellulolytic actinomycetes from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 286-287, 1983.

VENA, A. *et al.* Fluconazole resistance is not a predictor of poor outcome in patients with

cryptococcosis. **Mycoses**. v. 6, p. 441–449, 2019.

VENTURA, M. *et al.* Genomic of actinobacteria: tracing the evolutionary history of ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007.

VERMA, V. C.; GANGE, A. C. **Advances in Endophytic Research**. New Delhi: Springer India, 2014.

VIGAL, T. *et al.* Cloning characterization and expression of na alpha amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. **Molecular General Genetic**, n. 225, p. 278-288, 1991.

VU, H. N. T. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic properties of bioactive metabolites produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 isolated from *Cinnamomum cassia* prels in Yen Bai province of Vietnam. **Current Microbiology**, 2018.

WANG, L. *et al.* Comparative analysis of chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activities of ethylacetate extracts of *Polygonum cuspidatum* and its endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. A0916. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 14, n. 2, p.117–123, 2016.

WHO. World Health Organization. **Ten threats to global health in 2019**. Geneva: World Health Organization; 2019

WHO. World Health Organization. **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022**. Geneva: World Health Organization; 2022.

WORSLEY, S. F. *et al.* *Streptomyces* endophytes promote host health and enhance growth across plant species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 86, n.16 e01053-20, 2020.

XU, S. *et al.* Direct detection of *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium propinquum*, and *Corynebacterium simulans* in sputum samples by high-resolution melt curve analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2021

YANG, C. S. Y. H. *et al.* New secondary metabolites from an engineering mutant of endophytic *Streptomyces* sp. **Fitoterapia**, v. 130, p. 17–25, 2018.

YULONG, L. *et al.* Compositional and functional comparison on the rhizosphere microbial community between healthy and *Sclerotium rolfsii*-infected monkshood (*Aconitum carmichaelii*) revealed the biocontrol potential of healthy monkshood rhizosphere microorganisms. **Biological Control**, v. 104790, 2021.

YAZDIL, M. T. *et al.* Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterization cellulolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 120–123, 2000.

ZAITLIN, B. K. *et al.* Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycetes communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. **Applied Soil Ecology**, v. 26, p. 53–62, 2004.

ZHUANG, X. *et al.* Characterization of a novel endophytic actinomycete, *Streptomyces physcomitrii* sp. nov., and its biocontrol potential against *Ralstonia solanacearum* on tomato. **Microorganisms**, 2020.

ZINNIEL, D. K. *et al.* Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198–2208, 2002.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 221–225, 2001.

ANEXO – Artigos publicados

Importância dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias

Importance of secondary metabolites produced by actinobacteria

Fernanda Costa Rosa¹ ; Alexya Gonçalves Mota² ; Barbara Lima de Almeida² ; Gessiane dos Santos de Souza³ ; Maria Carvalho Araújo⁴ ; Maycon Henrique Franzoi Melo² ; Amanda Silva dos Santos Aliança^{4,5} ; Rita de Cássia Miranda de Mendonça^{1,2,4}

¹Pós-Graduação Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, UFMA, São Luís, MA, Brasil.

²Pós Graduação em Meio Ambiente, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brasil.

³Graduação em Farmácia, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brasil.

⁴Pós Graduação em Biologia Microbiana, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brasil.

⁵Pós Graduação em Gestão de Programas em Serviço de Saúde, Universidade Ceuma, São Luís-MA, Brasil.

Resumo

Este artigo consiste em uma revisão de literatura sobre os aspectos mais relevantes das actinobactérias e seus bioprodutos. As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com propriedades morfológicas de células fúngicas (micélio aéreo e vegetativo) e bacteriana. São amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente isoladas de solo, água, sedimentos, plantas, plantas em decomposição, nódulos de raízes, lodo ativado, fezes de animais e produtos alimentícios; além de estarem distribuídas em habitats aquáticos e ambientes extremos como áreas congeladas, solos desérticos e zonas abissais, lugares considerados ideais para que os microrganismos produzam metabólitos secundários. Cerca de mais de 23.000 metabólitos microbianos são conhecidos, dos quais 32% são produzidos por actinomicetos. Os metabólitos secundários podem ser utilizados como modelo para síntese e semi-síntese de moléculas bioativas de amplo espectro e baixa toxicidade. Portanto, são diversas as aplicações esperadas para as actinobactérias, e cada vez mais a utilização de compostos bioativos, de origem natural, para o tratamento de diversas doenças, são incorporados na indústria farmacêutica. Entretanto, as actinobactérias ainda são pouco estudadas, principalmente as endofíticas, necessitando de mais pesquisas na área, pois a literatura ainda carece de estudos aprofundados dentro desse tema.

Palavras-chave: Streptomyces; Metabólitos secundários; Endofíticos.

Autor correspondente:

Rita de Cássia Miranda de Mendonça
E-mail: rita.miranda@ceuma.br

Fonte de financiamento:

Não se aplica

Parecer CEP

Não se aplica

Procedência:

Não encomendado

Avaliação por pares:

Externa

Recebido em: 14/06/2023

Aprovado em: 31/07/2023

Como citar: Rosa FC, Mota AG, Almeida BL, Souza GS, Mendonça RCM. Importância dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias. RCS Revista Ciências da Saúde - CEUMA, 2023;1(1):72-87.

Abstract

This article consists of a literature review on the most relevant aspects of actinobacteria and their bioproducts. Actinobacteria are Gram-positive bacteria with morphological properties of fungal (aerial and vegetative mycelium) and bacterial cells. They are widely distributed in nature, being commonly isolated from soil, water, sediments, plants, decaying plants, root nodules, activated sludge, animal feces and food products; in addition to being distributed in aquatic habitats and extreme environments such as frozen areas, desert soils and abyssal zones, places considered ideal for microorganisms to produce secondary metabolites. About more than 23,000 microbial metabolites are known, of which 32% are produced by actinomycetes. Secondary metabolites can be used as a model for the synthesis and semi-synthesis of bioactive molecules with a broad spectrum and low toxicity. Therefore, there are several expected applications for actinobacteria, and increasingly the use of bioactive compounds, of natural origin, for the treatment of various diseases, are incorporated in the pharmaceutical industry. However, actinobacteria are still little studied, especially the endophytic ones, requiring more research in the area, as the literature still lacks in-depth studies on this theme.

Keywords: Streptomyces; Secondary metabolites; Endophytes.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é uma das práticas mais antigas de países como China, Grécia, Egito e Índia (Ávila *et al.*, 2020). Por essa razão, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que 80% da população de alguns países asiáticos e africanos fazem uso de medicamentos oriundos de plantas para tratamento de alguma doença (WHO, 2002; Chen *et al.*, 2016).

No Brasil, existe uma forte influência das culturas africanas e indígenas no que diz respeito à utilização de plantas medicinais e seus princípios ativos, a exemplo da população ribeirinha, que traz herança indígena sobre o conhecimento da flora e fauna regional, utilizando as ervas locais a partir desse conhecimento transmitido de geração em geração. Já a influência africana se deu por meio da importação de plantas trazidas de sua terra natal, utilizadas em rituais religiosos (Linhares; Rodrigues, 2015; Monteiro; Brandelli, 2017).

Esses fatores culturais podem estar diretamente relacionados ao baixo acesso dessa população (ribeirinha) aos medicamentos convencionais (Araújo, 2016), diferente da população que vive em grandes cidades, que fazem uso das plantas como forma complementar aos fármacos industriais (Oliveira, 2010). Para os pesquisadores existem outros fatores importantes que levaram ao aumento repentino das demandas da população, como a toxicidade e os efeitos adversos dos medicamentos convencionais; esses também são fatores que levaram ao aumento no número de fabricantes de medicamentos fitoterápicos e na redução do uso de drogas químicas (Parada; Marguet; Vallejo, 2017).

Dentro desse contexto, no Brasil 80% das pessoas utilizam produtos oriundos de plantas medicinais, resultado desse conhecimento popular sobre as espécies nativas, principalmente da Amazônia que apresenta grande potencial biotecnológico, por deter uma grande variedade de ambientes e um enorme potencial de recursos naturais (Phen *et al.*, 2016; Pádua, 2018). Esse

potencial encontra-se nas mais diversas espécies das famílias botânicas encontradas na região e são de grande importância (Monteiro; Brandelli, 2017; Dardengo *et al.*, 2021).

Algumas famílias de plantas da região amazônica podem ser citadas: Malvaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Arecaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Amaranthaceae, Passifloraceae, Phyllanthaceae, Sapotaceae e Myrtaceae (Trevisan *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2011; Ávila *et al.*, 2020), as quais são ricas fontes de compostos que podem ser usados para desenvolver a síntese de drogas (Parada; Marguet; Vallejo, 2017) dessa forma, são utilizadas várias partes das plantas, como semente, raiz, folha, fruto, casca, flor ou mesmo a planta toda, produzindo ações sinérgicas. Nessas diferentes partes das plantas, certos materiais são produzidos e armazenados, sendo referidos como compostos ativos (substâncias), que têm efeitos fisiológicos sobre os organismos vivos. Entretanto, as plantas são vulneráveis a fatores de estresse abiótico, fazendo com que seu crescimento e a produção dessas substâncias sejam afetados de forma negativa (Lora; Homaza; Herrero, 2016; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020).

Os fatores abióticos são fundamentais para a produção de compostos, crescimento e desenvolvimento das plantas, e diferentes espécies de plantas requerem condições ambientais ótimas de sobrevivência (Bhatla; Tripathi, 2014). Assim, a exposição à estresses ambientais e abióticos como, estresse salino, alta e baixa temperatura, seca, alta e baixa intensidade de luz, falta de nutrientes, ozônio e radiação UV (Wani *et al.*, 2008; Gosal *et al.*, 2009; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020), induz várias mudanças fisiológicas e altera a composição química da planta (Wang; Frei, 2011).

Para combater esses estresses, as plantas utilizam algumas estratégias, como produzir compostos de baixa massa molecular chamados metabólitos secundários, exemplo: quinonas, antocianinas, fenólicos, flavonoides, alcaloides, lignanas, esteroides, terpenoides, glucosinolatos, ácido betulínico, rutina, ácido clorogênico e trigonelina. Esses fitoquímicos desempenham papéis importantes nas interações das plantas com o ambiente, para ajuste, adaptação e defesa (Ramakrishna; Ravishanka, 2011; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020).

Além das funções citadas, os metabólitos secundários também contribuem para os odores, sabores e cores específicos das plantas (Qiu *et al.*, 2015) são fontes únicas de aditivos alimentares e produtos farmacêuticos industrialmente importantes (Ramakrishna; Ravishanka, 2011; Tungmunthum *et al.*, 2018). Dessa forma, vale ressaltar que as plantas também contam com a contribuição de microrganismos que fornecem condições adequadas para sobreviverem ao estresse do meio ambiente (Ojeda, 2017; Petrini, 1991).

Esses microrganismos que habitam o interior das plantas, são chamados de endofíticos. São fungos e bactérias que se diferem dos epífitos (que vivem na superfície dos vegetais), e dos

fitopatógenos (que causam doenças), devido ao fato de colonizarem tecidos saudáveis de partes da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos, além de serem responsáveis por transformações no solo relacionadas com a nutrição e saúde das plantas (Kennedy, 1999; Passari *et al.*, 2015; Ojeda, 2017; Pasrija *et al.*, 2022).

Quase todas as espécies vegetais investigadas em pesquisas apresentam microrganismos endofíticos e, portanto, acredita-se que muitas das propriedades medicinais de algumas plantas podem estar relacionadas a eles, sugerindo que as propriedades terapêuticas de uma planta podem estar na interação entre ambos (Poli *et al.*, 2012; Specian *et al.*, 2014).

Este artigo consiste em uma revisão de literatura sobre os aspectos mais relevantes das actinobactérias endofíticas.

MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Com base em mais de uma década de pesquisa, pode-se afirmar que bilhões de espécies de plantas em ecossistemas naturais são hospedeiras de milhares de microrganismos endofíticos, fazendo desse grupo um dos recursos naturais inexplorados mais significativos para a bioprospecção de metabólitos secundários (Rashmi; Kushveer; Sarma, 2019; Manganyi; Ateba, 2020; Theodoro, 2022).

Os endofíticos podem ser divididos em dois grupos distintos (sistêmicos ou não sistêmicos) com base em sua biologia, modo de propagação, evolução e taxonomia. Endofíticos sistêmicos ou verdadeiros são aqueles que residem nos tecidos vegetais, mantêm interações com o hospedeiro, são assintomáticos e são normalmente encontrados dentro da planta sob todos os tipos de condições; já os não sistêmicos ou transitórios são aqueles que passam uma parte do seu ciclo de vida dentro dos tecidos da planta hospedeira, sem produzir sintomas de infecção (Botella; Diez, 2011; Wani *et al.*, 2015; Ogbe; Finnie; Van Staden, 2020). Nesses casos os endofíticos podem ser fungos ou bactérias, e ambos têm disso bastante estudados nos últimos anos (Soares, 2011).

Os fungos endofíticos têm recebido mais atenção por se tratarem de fontes primárias para materiais como borracha natural, corantes, aromas, suplementos naturais e fármacos (Nomura; Ogita; Kato, 2018), além de apresentarem grande importância no que diz respeito à adaptação das plantas em condições extremas, como já comentado anteriormente (Canuto *et al.*, 2012). Entretanto, os endofíticos procarióticos também possuem reconhecimento por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico (Pádua, 2018) com diversas atividades comprovadas, como antifitopatogênica (Mello *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2013), antimicrobiana

(Jalgaonwala; Mohite; Mahajan, 2011; Selim *et al.*, 2011; Zanardi *et al.*, 2012; Banhos *et al.*, 2014; Mapperson *et al.*, 2014), antibacteriana (Ding *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2018), antitumoral (Silva 2018) e antidiabetes (Qiu *et al.*, 2015).

Os artigos científicos também têm relatado de que forma o crescimento dos microrganismos endofíticos, em suas plantas hospedeiras, é favorecido; sendo enfatizado o papel dos fatores ambientais incluindo temperatura, natureza do solo, umidade, tipo de planta, etc. (Strobel; Daisy, 2003; Ayswaria; Vasu; Krishna, 2020).

O clima influencia na diversidade microbiana, sendo mais propício o aparecimento de microrganismos endofíticos em regiões tropicais e temperadas, produzindo um maior número de metabólitos, consequência da exposição do hospedeiro à uma maior biodiversidade (Strobel; Daisy, 2003; Rodrigues; Duarte-Almeida. Pires, 2010; Fernandes, 2019); outra influência é o local e o tipo de espécie vegetal, um exemplo são as plantas lenhosas, as quais a maioria das cepas de endofíticos são isoladas (Kaewkla; Franco, 2013; Proença *et al.*, 2017).

De modo geral, as pesquisas com endofíticos têm aumentado não só a nível de conhecimento sobre a relação mutualística com a planta, mas principalmente com relação aos avanços biotecnológicos, resultando em pesquisas voltadas para a produção de novos compostos com atividade antimicrobiana e utilizados na biorremediação, a partir dos seus metabólitos secundários (Sharma; Kumar, 2021). Paralelamente à produção desses compostos bioativos, muitos endofíticos apresentam uma habilidade natural e de grande importância: degradar xenobióticos; ou seja, compostos estranhos a um organismo ou sistema biológico (pesticidas) (Villas Boas *et al.*, 2020). Essa habilidade, resistência a metais tóxicos e degradação de compostos orgânicos, se deve à exposição a diversos compostos no nicho planta-solo, e tem sido investigada para fins de fitorremediação (Ryan *et al.*, 2008).

As pesquisas sobre biorremediação sugerem que os endofíticos procariontes, evoluíram com sucesso para o ambiente contaminado por metais pesados e desenvolveram respostas imunes como biomagnificação (magnificação trófica - acúmulo progressivo de substâncias de um nível trófico para outro). Na presença de metais inorgânicos (como Fe, As, Pb, Cu, Mn, Cd e Mg) os endofíticos usam uma série de mecanismos, como biotransformação, extrusão, uso de enzimas, produção de exopolissacarídeos (EPS) e síntese de metalotioneína para resistir à toxicidade do metal (Singh *et al.*, 2017; Sharma; Kumar, 2021). Assim, a tolerância ao estresse mediada por bactérias endofíticas é considerada a técnica mais bem sucedida para biorremediação, porque é aceitável e viável tanto ambientalmente quanto economicamente, podendo diminuir o acúmulo dos metais pesados, em diferentes ecossistemas (Tiwari; Lata, 2018; Rogowska *et al.*, 2020).

Portanto, são diversas as aplicações esperadas para os microrganismos endofíticos, desde a utilização como agentes no controle biológico de pragas e de ervas daninhas até a obtenção de metabólitos secundários com potencial terapêutico (Pearce, 1997; Maciel *et al.*, 2002; Peng, *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017; Theodoro, 2022).

Metabólitos Secundários

Os microrganismos produzem metabólitos secundários em uma fase tardia de seu ciclo de crescimento. Acredita-se que o esgotamento dos nutrientes e o declínio na velocidade de crescimento geram sinais que produzem uma cascata de eventos regulatórios, conduzindo a diferenciação química (metabolismo secundário). O sinal é uma pequena molécula indutora de baixo peso molecular que se une a uma proteína reguladora que impede o metabolismo secundário durante o crescimento. Estes sinais ativam provavelmente um “gene maestro” que atua a nível de tradução, o qual codifica para um tRNA raro e para um fator de transcrição positivo. Ou seja, enquanto houver crescimento exponencial e excesso de nutrientes, essa regulação impede o metabolismo secundário (Graefe, 1989; Demain, 1999; Álvarez, 2011).

Sendo assim, é importante enfatizar que os metabólitos secundários não são necessários para o crescimento do microrganismo que os produz, porém em estado natural suas funções se encontram ligadas a sobrevivência da espécie e tem demonstrado grande potencial para a saúde humana e animal (Ruiz *et al.*, 2010). Cada metabólito secundário é produzido por um grupo muito reduzido de microrganismos; geralmente são produzidos como misturas de produtos relacionados quimicamente entre si, e a produção pode se perder facilmente por mutação espontânea (Demain; Fang, 2001; Álvarez, 2011). Entre os microrganismos produtores desses compostos mencionados, as bactérias e os fungos produzem uma gama diversificada de pequenas moléculas bioativas, produzidas principalmente pela ativação de clusters de genes crípticos que não são ativos em condições normais e, assim, a expressão desses clusters seria útil na exploração da diversidade química de microrganismos (O'brien; Wright, 2011; Pettit, 2011).

Esta grande variedade de compostos produzidos na natureza se vê refletida em cerca de mais de 23.000 metabólitos microbianos conhecidos, dos quais 42% são produzidos por fungos, 32% por actinomicetos (bactérias com características morfológicas de células fúngicas) e o restante produzidos por outros grupos de bactérias (Lazzarini *et al.*, 2000). Os metabólitos secundários podem também ser utilizados como modelo para síntese e semi-síntese de moléculas bioativas de amplo espectro e baixa toxicidade (Demain, 2006; Gullo *et al.*, 2006; Chagas, 2013).

Dentro dos metabólitos secundários de importância farmacológica e biotecnológica, os antibióticos são os mais visados, sendo 75% deles produzidos por actinomicetos. Os outros metabólitos secundários são toxinas, vitaminas, intermediários metabólicos, feromônios, inibidores enzimáticos, agentes imunomoduladores, antagonistas e agonistas de receptores, alcaloides, pesticidas, agentes antitumorais, giberelinas e pigmentos (Demain; Fang, 2001; Challis; Hopwood 2003; Álvarez, 2011). Por essa razão inúmeras pesquisas já relataram várias atividades atribuídas aos microrganismos endofíticos produtores de metabólitos secundários.

A descoberta da produção de metabólitos secundários por parte dos endofíticos se estabeleceu principalmente com o filo Actinomicetos, um grupo de bactérias gram-positivas, como o gênero *Streptomyces*, que desempenham papel fundamental nos campos da medicina humana e seus setores de biotecnologia ao longo das últimas décadas (Barka *et al.*, 2016; Kim, 2021). Algumas espécies como *Streptomyces* griseus, são excepcionais produtoras de antibióticos, sendo relatada a produção de pelo menos 40 antibióticos diferentes (Ávarez, 2011).

Actinobactérias

As actinobactérias são bactérias Gram-positivas com propriedades morfológicas de células fúngicas (micélio aéreo e vegetativo) e bacteriana (Ayswaria; Vasu; Krishna, 2020). A diferenciação morfológica desse grupo envolve a formação de uma camada de hifas que podem se diferenciar em uma cadeia de esporos, quando um esporo encontra condições favoráveis de temperatura, nutrientes e umidade, o tubo germinativo é formado e as hifas se desenvolvem (Procópio *et al.*, 2012).

Actinobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo comumente isoladas de solo, água, sedimentos, plantas, plantas em decomposição, nódulos de raízes, lodo ativado, fezes de animais e produtos alimentícios, formam uma população estável e persistente em vários ecossistemas, principalmente em solos alcalinos secos (Veiga; Esparis; Fabregas, 1983; McCarthy; Williams, 1990). Kennedy (1999) em seus estudos, afirmou que 30% da população total de microrganismos no solo correspondem aos actinomicetos, e Iwai; Takahashi (1992) relataram que 80% dos actinomicetos do solo ocorrem na camada mais superficial (0-10cm), diminuindo progressivamente com a profundidade. Além de estarem distribuídas em habitats aquáticos e ambientes extremos como áreas congeladas, solos desérticos e zonas abissais (Pathom-Aree *et al.*, 2006; Okoro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2018).

Entre suas características particulares estão o alto conteúdo de Guanina e Citosina (G+C), a porcentagem de G+C é a mais alta que qualquer bactéria; apresentam ainda um odor típico de

solo úmido, em decorrência da produção de geosmina (Soares, 2011; Álvarez, 2011; Ojeda, 2017; Ayswaria; Vasua; Krishnab, 2020); são capazes de degradar muitas substâncias complexas e consequentemente cumprem um papel muito importante na química do solo; apresentam uma alta atividade metabólica; e produzem terpenóides, pigmentos e enzimas extracelulares (Sharma *et al.*, 2005; Silva; Silva; Silva, 2022).

São microrganismos aeróbios de modo geral, mas alguns gêneros são facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Metabolicamente podem ser autotróficos, heterotróficos, quimiotróficos ou fototróficos (Kennedy, 1999). Apresentam colônias lisas, duras, coriáceas ou secas, de diferentes colorações como brancas, rosas, laranjas, verdes, cinzas, entre outras (Ezzyani *et al.*, 2004; Soares, 2011).

A propriedade mais notável é o grau em que produzem antibióticos. Está comprovado que mais de 500 substâncias antibióticas distintas são produzidas por elas, as quais têm múltiplas aplicações em medicina, veterinária e agricultura (Challis; Hopwood, 2003; Álvarez, 2011). Algumas espécies são excepcionais produtoras de antibióticos, como por exemplo *Streptomyces griseus*, que produz pelo menos 40 antibióticos diferentes (Álvarez, 2011); e os gêneros predominantes deste grupo são *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora*. (Silva; Silva; Silva, 2022).

Os actinomicetos são responsáveis especificamente pela decomposição de polímeros complexos como lignocelulose e quitina; do antagonismo com fungos do solo, a partir da fixação simbiótica de nitrogênio (Zaitlin *et al.*, 2004); e pela produção de antibióticos e substâncias biologicamente ativas (Takefumi *et al.*, 2005). Eles desempenham um papel importante na formação de agregados estáveis no solo, construindo uma estrutura de macro poros que permite a penetração de água e ar, evitando a erosão (Fritz *et al.*, 2003). Além disso, são importantes na formação e manutenção da diversidade de plantas e na estrutura das comunidades vegetais (Xin *et al.*, 2005; Cardona; Arcos; Murcia, 2005). Apesar de muitas actinobactérias viverem em harmonia com as plantas, algumas podem apresentar patogenicidade em plantas e humanos como os gêneros *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Clavibacter* e *Curtobacterium* (Ventura *et al.*, 2007; Goodfellow, 2012; Silva, 2018).

Os estudos com actinobactérias aumentam cada vez mais devido ao registro de mais de 10.000 compostos bioativos já produzidos. Destes, 75% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*, sendo reportado como fonte de antibióticos antifúngicos, antivirais, herbicidas, imunossuppressores e agentes antitumorais (Newman; Reynolds, 2005; Olano *et al.*, 2009; Goodfellow; Fiedler, 2010). Os 25% restantes de compostos bioativos foram isolados de actinomicetos raros, ou seja, gêneros isolados em menor frequência (Gos *et al.*, 2017; Silva; Silva; Silva, 2022).

Potencial biotecnológico de actinobactérias

Quando se fala em aplicações biotecnológicas, os actinomicetos são potencialmente úteis na agricultura, na indústria alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (Fahey, 1988; Murray *et al.*, 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (Volksch *et al.*, 1992; Hallmann; Sikora, 1996) e como fontes de metabólitos secundários de interesse clínico.

Utilização de enzimas

Outras aplicações biotecnológicas dos actinomicetos são a utilização de enzimas e a busca por novos agentes antimicrobianos. O papel das enzimas em muitos processos vem desde a Grécia antiga, onde se utilizava as enzimas de microrganismos na produção de álcool, em bebidas e na produção de queijos (Demirijan *et al.*, 2001). Atualmente os microrganismos e suas enzimas são usados em atividades biotecnológicas como hidrólise de polímeros, síntese de compostos, descontaminação de solos, entre outras (Cherry; Fidantsef, 2003). Entre as várias enzimas de importância industrial destacam-se: amilases (*Nocardia* e *Streptomyces*) (Vigal *et al.*, 1991), esterases, lipases, pectinases, proteases (*Streptomyces*) (Rodrigues, 2006) e celulases (*Microbispora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*) (Yazdii *et al.*, 2000; Tuncer *et al.*, 2004). Esta última, onde os Actinomicetos são um dos grupos mais investigados para sua produção, permite o uso na clarificação de sucos de frutas, extração de sucos, óleo de sementes, no processamento de ração animal para melhorar a digestibilidade de animais monogástricos, em detergentes com funções de amaciantes, estonação de jeans, no pré tratamento da biomassa que contém celulose e no pré-tratamento de resíduos industriais (Rodrigues, 2006).

Atividade antimicrobiana

A busca por novos agentes antimicrobianos é uma linha de pesquisa muito procurada no desenvolvimento de novas biotecnologias, uma vez que surgem cada vez mais patógenos resistentes aos antibióticos usados na clínica (Ojeda, 2017). Assim, diversos estudos têm comprovado a ação de endofíticos contra outros microrganismos.

Ding *et al.* (2011) isolaram a bactéria endofítica *Streptomyces* sp. (HKI0595), presente na árvore *Kandelia candel* (situada no continente asiático), a qual produziu compostos conhecidos como xiamicina, indosispino e sespenina, que apresentaram atividade antibacteriana contra

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium vaccae* e *Enterococcus faecalis*.

Em outro trabalho realizado por Jalgaonwala; Mohite; Mahajan (2011) foi comprovada a presença de microrganismos endófitos no interior de várias espécies de plantas medicinais nativas da Índia, estes microrganismos apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Aspergillus niger*, *A. avamori*, *Trycoderma konningi*, *Fusarium oxysporium* e *Penicillium fumicalisuri*.

Da mesma forma, vários outros estudos com bactérias endofíticas, no passado, proporcionaram a descoberta de antibióticos e antifúngicos bem conhecidos na atualidade. A anfotericina B, antifúngico produzido pela actinobactéria *Streptomyces nodosus* (Souza *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2010); assim como a daptomicina, polipeptídeo (isolado de *Streptomyces roseoporus*), tem como microrganismo alvo bactérias Gram-positivas (Tedesco; Rybak, 2004); eritromicina (produzida por *Streptomyces erythreus*), eficiente contra bactérias Gram positivas, atuando na síntese proteica; neomicina (sintetizada por *Streptomyces fradiae*), usada com frequência em infecções de pele, ouvidos e olhos; estreptomicina (produzido por *Streptomyces griseus*) que atua em bactérias Gram negativas aeróbias e certas micobactérias; tetraciclina (produzida por *Streptomyces rimosus*); e a gentamicina (produzida por *Streptomyces tenebrarius*) (Saadaum; Gharaibeh, 2003; Rodrigues, 2006).

Atividade antitumoral e antimalárica

Assim como muitos antimicrobianos, a terapêutica do câncer foi iniciada com um composto obtido a partir de culturas de *Streptomyces*, a actinomicina D. Estima-se que aproximadamente 60% dos agentes antineoplásicos, introduzidos para a terapia do câncer nas últimas décadas, tem origem vegetal e microbiana (Castilho *et al.*, 2002). Dessa forma, os relatos das atividades por *Streptomyces* só aumentam, a exemplo da pesquisa realizada por Silva (2018), onde foi observado que *Streptomyces* sp. CMAA1527 (isolada do continente Antártico) apresentou pronunciada atividade antiproliferativa in vitro, para tumores de mama, pulmão, rim e sistema nervoso central, através da produção de cinerubina B, substância já conhecida e usada em inúmeros fármacos para o tratamento de cânceres. Nesse contexto, substâncias provenientes de microrganismos e plantas estão entre as mais promissoras, representando aproximadamente 60% dos agentes antitumorais aprovados para uso (Silva, 2018).

No início dos anos 2000, essas bactérias, descritas como produtoras de moléculas bioativas de interesse farmacológico, foram alvo de muitas pesquisas. Tratava-se de *Streptomyces*

NRRL 30562 isolada da planta trepadeira pássaro negro (*Kennedia nigriscans*); *Streptomyces* sp. NRRL 30566, isolada da folha da samambaia (*Grevillea pteridifolia*), ambas encontradas no Norte da Austrália; e *Streptomyces* sp. MSU-2110 isolada de uma videira (*Monstera* sp.) encontrada na região de Manu na Amazônia peruana. Essas bactérias produziram substâncias com impressionante atividade contra o parasita da malária, *Plasmodium falciparum*, são elas munumbicina A, B, C e D (Castilho *et al.*, 2002); kakadumicina A (Castilho *et al.*, 2003); e coronamicina (Ezra *et al.* 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas com microrganismos avançam, e cada vez mais a utilização de compostos bioativos, de origem natural, para o tratamento de diversas doenças, são incorporados na indústria farmacêutica. Entretanto, as actinobactérias ainda são pouco estudadas, principalmente as endofíticas, necessitando de mais pesquisas na área, pois a literatura ainda carece de estudos aprofundados dentro desse tema.

REFERÊNCIAS

- Álvarez AM. Metabólitos secundários de actinomicetos. In: Fierro FF.; Onofre, MV. (Orgs). Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones. Cidade do México: Casa abierta al tiempo/UAM. 2011:27-37.
- Araujo CSF. Potencial antifúngico in vitro e in vivo de metabólitos bioativos de plantas medicinais do Nordeste. 2016. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016.
- Ávila SHO *et al.* Avaliação do conhecimento dos acadêmicos sobre plantas medicinais e fitoterápicos em município da Amazônia Legal. Revista Eletrônica Interdisciplinar, Barra do Garças. 2020;12(2).
- Ayswaria RA, Vasu V, Krishna R. Several endophytic species of *Streptomyces* with dynamic metabolites and their meritorious applications: a critical review. Critical Reviews in Microbiology. 2020. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828816>
- Banhos, EF *et al.* Fungos endofíticos de *Myrcia guianensis* na Amazônia brasileira: distribuição e bioatividade. Revista Brasileira de Microbiologia. 2014;(45):153-161.
- Barka EA *et al.* Taxonomy, physiology, and natural products of. American Society for Microbiology. 2016;(80):1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bezerra JD *et al.* Fungos endofíticos da planta medicinal *Bauhinia forficata*: diversidade e potencial biotecnológico. Revista Brasileira de Microbiologia. (46):49-57.
- Bhatla R, Tripathi A. O estudo da variabilidade da precipitação e da temperatura em Varanasi. International Journal Earth Atmospheric Science. 2014;(1):90-94.
- Botella L, Díez JJ. Diversidade filogenética de endófitos fúngicos em povoamentos espanhóis de *Pinus halepensis*. Mergulhadores Fúngicos. 2011; (47):9-18. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0061-1>
- Cafêu MC *et al.* Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marogravii* (Rubiaceae). Química Nova. 2005; 28(6):991-995. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600011>

- Canuto KM. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2012.
- Cardona GI, Arcos AL, Murcia UG. Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. *Agronomía Colombiana*. 2005;23(2):317-326.
- Castilho UF *et al.* Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* (NRRL 30562) endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*. 2002;(148):2675-2685. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-9-2675>
- Castillo UF *et al.* Kakadumycis, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003;(224):183-190. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00426-9)
- Chagas, MBO. Fungos endofíticos de *Hancornia speciosa* Gomes: identificação e atividade antimicrobiana. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2013.
- Challis GL, Hopwood DA. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS*. 2003;(100):14555-14561. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100>
- Chen SL *et al.* Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese Medicine*. 2016;11(37). <https://doi.org/10.1186/s13020-016-0108-7>
- Cherry JR, Fidantsef AL. Directed Evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003;14:438-443. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)
- Dardengo JFE *et al.* Estrutura e diversidade genética de *Theobroma speciosum* (Malvaceae) e implicações para a conservação da Amazônia brasileira. *Revista do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 2021;(72).
- Demain AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiol and Biotechnology*, 1999;(52):455-463. <https://doi.org/10.1007/s002530051546>
- Demain AL, Fang A. The natural functions of secondary metabolites. *History of Modern Biotechnology*. 2001;(69):1-39. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
- Demirjian D, Moris-Vara F, Cassidy C. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001;(5):144-151. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00183-6)
- Ding L *et al.* Família de indolosesquiterpenos multicíclicos de um endófito bacteriano. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2011;(9):4029-4031.
- Ezra D *et al.* Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp.. *Microbiology*. 2004;(150):785-793. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26645-0>
- Ezzyani M *et al.* Evaluación del biocontrol *Phytophthora capsici* en Pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 2004;(26):61-68.
- Fahey JW. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: Cutler HO. (Ed.) biologically active natural products. potential use in agriculture. American Chemical Society Symposium Series. 1988:120-128. <https://doi.org/10.1021/bk-1988-0380.ch009>
- Fernandes AI. Avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan. 2019. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. 2019.
- Fritz O *et al.* Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(5):2816-2824. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003>
- Goodfellow M. Bergey's manual of systematics of Archaea and bacteria. In: Whitman W *et al.* (Eds.) *Classe Actinobacteria*. 5. ed. New York: Springer. 2012.
- Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2010;98(2):119-142. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9460-2>
- Gos FMWR *et al.* Antibacterial activity of endophytic Actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). *Frontiers of Microbiology*. 2017;(6):1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01642>
- Gosal SS, Wani SH, Kang MS. Biotecnologia e tolerância à seca. *Journal of Crop Improvement*. 2009;(23):19-54. <https://doi.org/10.1080/15427520802418251>

- Graefe G, Ward K. Dynamic Query Evaluation Plans. ACM Digital Library. 1989:358-366. <https://doi.org/10.1145/66926.66960>
- Gullo VP *et al.* Drug discovery from natural product. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology. 2006;33:523–531. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0107-2>
- Hallmann J, Sikora RA. Toxicity of Fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil borne plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology. 1996;(102):155-162. <https://doi.org/10.1007/BF01877102>
- Iwai Y, Takahashi Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: Omura S. (Ed.). The search bioactive compounds from microorganisms. New York: Springer-Verlag. 1992:281-302. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4412-7_15
- Jalgaonwala RE, Mohite BV, Mahajan RT. Uma revisão: produtos naturais de fungos endofíticos associados a plantas. Journal Microbiology Biotechnology Research, 2011;1(2):21–32.
- Kaewkla O, Franco CM. Abordagens racionais para melhorar o isolamento de actinobactérias endofíticas de árvores nativas australianas. Microbio Eco. 2013;65(2):384–393. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0113-z>
- Kennedy AC. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 1999;74:65-76. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00030-4)
- Kim ES. Avanços recentes de Actinomycetes. Biomoléculas. 2021;11(134). <https://doi.org/10.3390/biom11020134>
- Lazzarini A *et al.* Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000;78:399-405. <https://doi.org/10.1023/A:1010287600557>
- Linhares JFP, Rodrigues MIA. levantamento etnobiológico de um trecho do Rio Mearim e Mata ciliar correspondente - Barra do Corda-MA, Brasil. 2015.
- Lora J, Homaza JI, Herrero, M. The diversity of the pollen tube pathway in plants: toward an increasing control by the sporophyte. Frontiers in Plant Science. 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00107>
- Maciel MAM *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, Química Nova. 2002;25(3):429-438. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>
- Manganyi MC, Ateba CN. Potenciais inexplorados de fungos endofíticos: uma revisão de novos compostos bioativos com aplicações biológicas. Microorganismos.2020;8(12):1934.
- Mapperson RR *et al.* The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from australian dry rainforest. Current Microbiology. 2014;68(1):30-37. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0415-5>
- Mccarthy AJ, Williams ST. Actinomycetes as agentes of biodegradation in environment – a review. Gene. 1990;115: 189-192. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90558-7)
- Mello VK *et al.* Antagonismo in vitro e obtenção dos extratos brutos de microrganismos endofíticos isolados do milho crioulo frente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* sp. I 51-2. Congresso de Iniciação Científica de Pós-Graduação, 1. Florianópolis. 2010.
- Monteiro SC, Brandelli CLC. Farmacobotânica: aspectos Teóricos e Aplicação. Porto Alegre: Artmed. 2017.
- Murphy B *et al.* Isolation and characterisation of amphotericin B analogues and truncated polyketide intermediates produced by genetic engineering of *Streptomyces nodosus*. Journal Organic & Biomolecular Chemistry.2010;16. <https://doi.org/10.1039/b922074g>
- Murray FR, Latch GCM, Scott DB. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. Molecular General Genetics, 1992;(233):1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00587554>
- Newman LA, Reynolds CM. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. Trends in Biotechnology. 2005;23:6–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.010>
- Nomura T, Ogita S, Kato Y. Rational metabolic-flow switching for the production of exogenous secondary metabolites in bamboo suspension cells. Scientific Reports.2018;8:13203. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31566-4>
- O'brien JE, Wright GD. Uma perspectiva ecológica do metabolismo secundário microbiano. Biotecnologia. 2011;22: 552-558.
- Ogbe AA, Finnie JF, Van StadenJ. The role of endophytes in the accumulation of secondary metabolites in medicinal plants under abiotic stress. South African Journal of Botany. 2020;134:126-134. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.023>

- Ojeda CPO. Potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos isolados do jambú (*Acemella ciliata* (Kunth) Cass.) para controle de microrganismos patógenos. 2017. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado da Amazônia, Manaus. 2017.
- Okoro CK *et al.* Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009;95(2):121-133. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9295-2>
- Olano C, Méndez C, Salas JA. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Marine Drugs*. 2009;7:210 – 248. <https://doi.org/10.3390/md7020210>
- Oliveira, RL. Isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de *Piper hispidum*. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus – AM. 2010.
- Pádua, APSL. Diversidade e potencial para produção de L-asparaginase de fungos endofíticos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira do sertão). 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2018.
- Parada RB, Marguet ER, Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2017;19(2):15-23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.64098>
- Pasrija P *et al.* Endophytes: an untapped treasure to fight multidrug resistance. *Phytomedicine Plus*. 2022;2. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100249>
- Passari AK *et al.* Isolamento, abundância e afiliação filogenética de actinomicetos endofíticos associados a plantas medicinais e triagem de seu potencial biossintético antimicrobiano in vitro. *Frontiers in microbiology*. 2015;6(273).
- Pathom-Aree W *et al.* Diversity of actinomycetes isolated from Challenger deep sediment (10,898m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*. 2006;10(3):181-189. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0482-z>
- Pearce C. Biologically active fungal metabolites. *Advances in Applied Microbiology*. 1997;44:1-80. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70459-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70459-3)
- Peng A *et al.* Diversity and distribution of 16S rRNA and phenol monooxygenase genes in the rhizosphere and endophytic bacteria isolated from PAH-contaminated sites. *Scientific Reports*. 2015;5(12173). <https://doi.org/10.1038/srep12173>
- Petit RK. Elicitação de pequenas moléculas de metabólitos secundários microbiano. *Microbial Biotechnology*. 2011;4: 471-478.
- Petrini O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J, Hirano SS. (Eds.) *Microbial ecology of leaves*. New York: String-Verlag. 1991:179-197. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3168-4_9
- Poli A *et al.* Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *SaBios: Revista Saúde e Biologia*. 2012;7(2):82-89.
- Procópio REL *et al.* Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2012;16(5):466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Proença DN *et al.* Diversidade e função da comunidade microbiana endofítica de plantas com potencial econômico. In: Azevedo J, Quecine M. (Ed.). *Diversidade e benefícios dos microrganismos dos trópicos*. Cham: Springer. 2017:209-243.
- Qiu P *et al.* Diversity, bioactivities and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants traditional in Sichuan, China. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2015;13(12). [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30102-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30102-3)
- Ramakrishna A, Ravishanka GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(11):1720-1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Rashmi M, Kushveer JS, Sarma VV. Uma lista mundial de fungos endofíticos com notas sobre ecologia e diversidade. *Micosfera*. 2019;10(1):798-1079.
- Rodrigues E, Duarte-Almeida JM, Pires JM. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20(6):981-991. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000008>

- Rodrigues, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de Actinomicetos. 2006. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.
- Rodrigues RA *et al.* Atividade antibacteriana de fungos endofíticos da planta medicinal *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Revista de Pesquisa de Plantas Medicinais*. 2018;12(15):179-185.
- Rogowska J *et al.* Micropollutants in treated wastewater. *Ambio*. 2020;49:487–503. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01219-5>
- Ruiz B *et al.* Produção de metabólitos secundários microbianos: regulação pela fonte de carbono. *Revista de Microbiologia*. 2010;36:146-167.
- Ryan RP *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. , v. 2008;278:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Saadaun I, Gharaibeh R. The *Streptomyces* flora of region of Jordan and its potential as a source of antibiotics active Against antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Arid Environments*. 2003;53:365-371. <https://doi.org/10.1006/jare.2002.1043>
- Selim KA *et al.* Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere*. 2011;2(6):669-67. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/2/6/7>
- Sharma KL *et al.* Longterm soil management effects on crop yields and soil quality in a dryland Alfisol. *Soil & Tillage Research*. 2005;83:246-259. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.08.002>
- Sharma P, Kumar S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: recent advances. *Bioresource Technology*. 2021;339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125589>
- Silva LJ. Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2018.
- Silva MRC, Silva DF, Silva FB. (Orgs.). Indicadores de qualidade ambiental: uma perspectiva a partir da zona de transição Amazônia-Cerrado. In: Mota AG *et al.* Bioprospecção de Actinomicetos de interesse biotecnológico. São Luís: Editora Pascal. 2022;1:38-50. <https://doi.org/10.29327/561366>
- Singh M *et al.* Bactérias endofíticas: uma nova fonte de compostos bioativos. *Biociência*. 2017;7(5):315.
- Soares ECL. Isolamento de endofíticos *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e avaliação da bioatividade. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2011.
- Sousa K A *et al.* Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. *Agroecossistemas*. 2013;5(1):50-55. <https://doi.org/10.18542/ragros.v5i1.1411>
- Souza AQL *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazônica*. 2004;34(2):185 – 195. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>
- Specian V *et al.* Metabólitos Secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014;16(4):345-351.
- Stierle A *et al.* Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science*. 1993;260:214–216. <https://doi.org/10.1126/science.8097061>
- Strobel GA, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Research*. 2003;67:491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Takefumi H *et al.* Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal Bioscience Bioengineer*. 2005;99(5):485-492. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.485>
- Tedesco KL, Rybak MJ. Daptomycin. *Pharmacotherapy*. 2004;24(1):41-57. <https://doi.org/10.1592/phco.24.1.41.34802>
- Theodoro PIL. Análise da produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos da *Aloe vera*. 2022. Monografia (Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba. 2022.
- Tiwari S, Lata C. Estresse de metais pesados, sinalização e tolerância devido a micróbios associados a plantas: uma visão geral. *Fronteiras na Ciência das Plantas*. 2018;9(452).
- Trevisan M, Seibert CS, Santos MG. O emprego da medicina tradicional no sus e nos acidentes ofídicos em uma cidade da Amazônia Legal. *Revista Desafios*. 2021;8(2). <https://doi.org/10.20873/ufv8-10371>

- Tungmunnithum D *et al.* Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines*. 2018;5(93). <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Veiga M, Esparis A, Fabregas J. Isolation of cellulolytic actinomycetes from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983;46(1):286-287. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.286-287.1983>
- Ventura M *et al.* Genomic of actinobacteria: tracing the evolutionary history of ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007;71(3):495-548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>
- Viana CAS *et al.* Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral. Rios, MNS.; Pastore Junior F. (Orgs.). Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central. 2011.
- Vigal T *et al.* Cloning characterization and expression of na alpha amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Molecular General Genetic*. 1991;225:278-288. <https://doi.org/10.1007/BF00269860>
- Volksch B, Ullrich M, Fritsche W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial Ecology*. 1992;24:305-311. <https://doi.org/10.1007/BF00167788>
- Wang Y, Frei M. Alimentos estressados O impacto dos estresses ambientais abióticos na qualidade da colheita. *Agrícola, Ecossistema e Ambiente*. 2011;141:271-286.
- Wani SH, Sandhu JS, Gosal SS. Engenharia genética de plantas cultivadas para tolerância ao estresse abiótico. *In: Malik CP, Kaur B, Wadhvani C. (Eds.). Tópicos Avançados em Biotecnologia Vegetal e Biologia Vegetal*. 2008:149-183.
- Wani ZA *et al.* Simbiose planta-endófito, uma perspectiva ecológica. *Aplicações em Microbiologia e Biotecnologia*. 2015;99:2955-2965. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3>
- WHO. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants, v. 2. 2002.
- Xin CT *et al.* Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology*. 2005;28:259-269. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.07.009>
- Yazdil MT *et al.* Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterization cellulolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;12:120-123. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90084-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90084-4)
- Zaitlin BK *et al.* Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycetes communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. *Applied Soil Ecology*. 2004;26:53-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.10.004>
- Zanardi L *et al.* Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endófito *Phomopsis cassia* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. *Química Nova*. 2012;35(11):2233-2236. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100026>



Article

An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3)

Virlanna Larissa Santos de Azevedo ¹, Fernanda Costa Rosa ², Leo Ruben Lopes Dias ^{1,3}, Lucas Abrantes Batista ⁴, Mariana Costa Melo ⁵, Luis Alfredo Torres Sales ⁶, Abia de Jesus Martins Branco ⁵, Thalison Rômulo Rocha Araújo ⁵, Rita de Cássia Mendonça de Miranda ^{1,2,3,*} and Amanda Silva dos Santos Aliança ¹

- ¹ Postgraduate Department, Postgraduate Program in Bioscience Applied to Health, Ceuma University, São Luis 65075-120, MA, Brazil; virlanna100159@ceuma.com.br (V.L.S.d.A.); leorubendias@gmail.com (L.R.L.D.); amanda.alianca@ceuma.br (A.S.d.S.A.)
- ² Postgraduate Department Postgraduate Program in Bionorte, Ceuma University, São Luis 65075-120, MA, Brazil; nandacosttarosa@gmail.com
- ³ Postgraduate Department, Postgraduate Program in Environment, Ceuma University, São Luis 65075-120, MA, Brazil
- ⁴ Postgraduate Program in Parasitic Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 59078-900, RN, Brazil; lucasabrantestatista@hotmail.com
- ⁵ Graduate Department, Ceuma University, São Luis 65075-120, MA, Brazil; marianacmelo@outlook.com.br (M.C.M.); abia.martins4@gmail.com (A.d.J.M.B.); romulorraraújo@hotmail.com (T.R.R.A.)
- ⁶ Department of Microbiology, PhD in Biological Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, SP, Brazil; luiz79039@ceuma.com.br
- * Correspondence: rita.miranda@ceuma.br; Tel.: +55-989-9213-5500



Citation: de Azevedo, V.L.S.; Rosa, F.C.; Dias, L.R.L.; Batista, L.A.; Melo, M.C.; Sales, L.A.T.; Branco, A.d.J.M.; Araújo, T.R.R.; de Miranda, R.d.C.M.; Aliança, A.S.d.S. An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3). *Microorganisms* **2024**, *12*, 476. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030476>

Academic Editors: Alexander I. Netrusov and Maria L. Danzetta

Received: 4 January 2024

Revised: 4 February 2024

Accepted: 13 February 2024

Published: 27 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study aimed to evaluate the antibacterial, leishmanicidal, and cytotoxic potential of metabolites produced by bacteria isolated from rhizosphere soil samples. The bacterium was identified by genome sequencing as *Streptomyces kronopolitis*. A preliminary screening was carried out for the antimicrobial activity of *S. kronopolitis*, demonstrating activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Corynebacterium diphtheriae* ATCC 27010, *C. diphtheriae* ATCC 27012, and *Mycobacterium abscessus*, with inhibition halos of sizes 25, 36, 29, and 33 mm, respectively. To obtain secondary metabolites, the bacteria were subjected to submerged fermentation, and the metabolites were extracted using the liquid–liquid method with ethyl acetate. There was a similar MIC for *M. abscessus* and the two strains of *C. diphtherium*, reaching a concentration of 12.5 µg/mL, while that of *S. aureus* was 0.048 µg/mL. Assays for leishmanicidal activity and cytotoxicity against HEP-2 cells and red blood cells were performed. The metabolite showed an IC₅₀ of 9.0 ± 0.9 µg/mL and CC₅₀ of 221.2 ± 7.0 µg/mL. This metabolite does not have hemolytic activity and is more selective for parasites than for mammalian cells, with a selectivity index of 24.6. Thus, the studied metabolite may be a strong candidate for the development of less toxic drugs to treat diseases caused by pathogens.

Keywords: biotechnology; actinomycetes; antimicrobials; leishmanicidal; cytotoxicity

1. Introduction

The activity of microorganisms is important for the broad functioning of soil with regard to the ecosystem services it provides [1,2]. Knowledge of the diversity and function of the microbiome, identification of properties, and assessment of toxic effects resulting from the possible activities of these microorganisms are important [3]. Microorganisms isolated from soil have aroused interest as sources of bioproducts targeted by pharmaceutical industries for the production of new drugs that have minimal effects over time [4].

Among the microorganisms that produce bioactive compounds, those of the Actinomycetales family stand out, especially species of the genus *Streptomyces*, which are

known for their ability to produce substances with diverse antimicrobial, leishmanicidal, antimalarial, and antitumor activities [5–8]. Several authors have focused on isolating bacterial species of the genus *Streptomyces* because of their broad metabolic apparatus. Amorim et al. [9] reported the activity of *S. ansochromogenes* (PB3) against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. More recently, Costa Rosa et al. [10] isolated a *Streptomyces* sp. *Aloe vera* leaf endophyte with activity against *Corynebacterium propinquum* ATCC and a clinical isolate. The antiprotozoal activity of a metabolite produced by the bacteria *Streptomyces* spp. has also been reported. Pagmadulam et al. [11] reported the antiprotozoal activity of four species of *Streptomyces* spp. isolated from soil in Mongolia. Although there are reports of metabolite activity from *Streptomyces* spp., no reports of metabolites produced by the bacterium *Streptomyces kronopolitis* have been published. The advancement of the dissemination of multidrug-resistant bacterial strains has become a worldwide reality and is considered a serious public health problem as it affects not only the hospital community but also the community environment [12]. Reports of multidrug-resistant bacteria have been associated with contaminated environments such as urban rivers [13] and the use of antibiotics in agricultural practices [14]. In addition, within the context of a public health problem, leishmaniasis is neglected, occurring in underdeveloped countries with more vulnerable populations, thereby restricting access to quality health services [15]. Anthroponosis is a disease that affects approximately 88 countries and is endemic to Brazil [16]. It has been pointed out in the literature that the use of drugs administered against *Leishmania* species is questionable in view of their high cost, forms of application, high toxicity, and side effects [17,18].

The main objective of this study was to evaluate the action of antibiotics and leishmanicidal and the cytotoxic activities of microbial metabolites extracted from *Streptomyces* sp.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Collection, Isolation, and Classical Identification of the Microorganism

Rhizospheric soil samples (10 cm deep) were randomly collected at ten different points in a medicinal garden located at a university in the urban area of São Luís, MA, according to the geographical coordinates 3°31'59.6" S 43°55'55.7" W.

The ten samples were homogenized to form a composite sample, and the isolation of microorganisms from the rhizosphere was performed according to Clark's method [19] using Sabouraud agar (BSA) and malt extract agar (EMA) culture media. The experiments were performed in triplicates. The plates were incubated at 30 °C for a maximum of 10 days. Subsequently, each plate was screened, and the macromorphological characteristics of the colonies were observed for purification and transferred to test tubes. Colonies were stored in a refrigerator at 4 °C until further analysis.

The microculture technique was used for classic identification of the isolate. Previously isolated and purified microorganisms were inoculated into Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium. A coverslip was partially inserted into the medium to facilitate hyphal growth. The plate was incubated in an incubator at 28 °C for 5 days [20]. Structures such as conidiospores, hyphae, spore chains, and conidia were stained with cotton blue and observed under an optical microscope at 400× magnification. Identification at the genus level was possible by observing macroscopic characteristics and microscopic morphological structures. Criteria recommended by Rapper and Fennell [21], Pitt [22], Samson and Pitt [23], and Klich and Pitt [24] were adopted.

2.2. Molecular Identification of the Active Isolate

Molecular identification of the isolated bacteria was performed by DNA amplification and genomic sequencing of the 16S region of bacterial ribosomal DNA (rDNA). DNA extraction was performed using a direct extraction kit (FastDNA® SPIN Kit for Soil) from BIO-101 (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). The purity of the obtained DNA was evaluated by 1% agarose gel electrophoresis (*w/v*). DNA samples (5 µL) were mixed with 5 µL of electrophoresis dye and applied to the gels. The gels were subjected to an electric current

of 90 V in 0.5× Tris-borate EDTA (TBE) buffer for 1.5 h, stained with ethidium bromide, and photographed under UV light by an image capture system (IMAGO, B&L Systems, Maarssen, The Netherlands).

2.2.1. Genome Sequencing

The genome was sequenced in Botucatu, São Paulo, by Biotecnologia Pesquisa e Inovação (BPI). For the genome sequencing, the Nextera XT Sample Preparation Library Preparation Kit was used, and the genome was analyzed using Illumina NextSeq500 equipment (Illumina, San Diego, CA, USA). The gene sequence of the soil isolate was analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) platform to identify similar species. Using the BLAST platform, five species with gene sequences that most resembled the soil isolate were selected. The sequence was submitted to GENBANK/NCBI and deposited under code GCA_014646275.1.

2.2.2. Phylogenetic Tree

For the phylogenetic tree, the species verified by BLAST were compared with species of the genus belonging to the phylum Actinomycetota to determine the degree of ancestry. The sequences were obtained from GenBank, and the genera chosen were *Nocardia* (*Nocardia asteroides*), *Corynebacterium* (*Corynebacterium diphtheriae*), *Mycobacterium* (*Mycobacterium tuberculosis*), and the main antibiotic-producing species of *Streptomyces* (*S. aureofaciens*, *S. celicolicolor*, *S. rapamycinicus*, *S. voiceus*, *S. avermitilis*, *S. griseus*, *S. rimosus*, and *S. albus*).

A phylogenetic tree was constructed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA × 10.1). The ClustalW alignment method was used, and neighbor-joining tree method with 1000 bootstrap replicates was used for phylogeny analysis. In addition, the 2-parameter Kimura method was used. The data of the nucleotide sequences encoding proteins were analyzed using the methods above.

2.3. Submerged Fermentation

To obtain the active metabolites produced by the isolate, submerged fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of useful volume of potato dextrose broth (BD). The flasks were incubated with agitation (180 rpm) at 30 °C for five days. Subsequently, the sample was filtered to evaluate its biological activity [6].

Liquid–Liquid Extraction

To obtain the metabolites of interest, liquid–liquid extraction was performed using 25 mL of ethyl acetate and 25 mL of cell-free extract in a separation funnel, shaking vigorously for 15 min and waiting for it to decant for another 15 min [25]. The microbial cells were separated. The fermented medium was subjected to centrifugation and filtered again through a 22 µm filter, ensuring that the extract did not contain microbial cells.

The extraction of the compounds of interest, called *Streptomyces* metabolites (MS), was performed using 25 mL of the filtrate, and 25 mL of ethyl acetate was added to a separating funnel, vigorously stirred for 10 min, and left to rest for 30 min. Subsequently, the organic phases containing the analytes of interest were collected. The solvent was evaporated using a rotary evaporator, and the product yield was determined.

To evaluate the biological activities, the MS extract was resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a known concentration of 1000 µg/mL.

2.4. Screening of Antibacterial Tests

2.4.1. Microorganisms Used

For the evaluation of the antimicrobial potential of bacterial isolates, the following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus*—ATCC 6538; *C. diphtheriae*—ATCC27010; *C. diphtheriae*—ATCC 27012; and *Mycobacterium abscesses* (IC). The bacteria used were selected for their ability to cause serious diseases such as endocarditis and tuberculosis in immunocompromised patients, in addition to having multiresistant strains. The bacterial strains

belong to the culture collection of the Biotechnology and Electrochemistry Laboratory at Ceuma University.

To evaluate leishmanicidal potential, promastigotes of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/76/MA-76) were used. Promastigotes were maintained at 26 °C in Schneider's medium (Sigma, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum, with replications every three days. Parasites in the exponential growth phase were used for experiments. *Leishmania* strains belong to the culture collection of the Cellular and Molecular Biology Laboratory, Parasitology Department, FIOCRUZ/PE.

2.4.2. Test in Solid Medium

The antimicrobial activity test was carried out in a solid Mueller–Hinton (MH) medium (Sigma, Darmstadt, Germany) through diffusion of the bioactive compound in agar, using the method described by Uchida et al. [26]. After ten days of incubation at 28 °C, the circular agar blocks of 6 mm in diameter were removed from the plates with colonies cultivated by plugging and transferring to the plates containing Mueller–Hinton medium, previously seeded with the standard microorganisms in 5×10^5 colony-forming unit (CFU)/mL. This test was performed in triplicate. After culturing for 24 h at a temperature of 37 °C, the diameters (mm) of the inhibition halos of each block were measured by measuring the greatest distance between 2 straight points that crossed the glucose block in the middle. The Matsuura scale [27] was used to classify the results and obtain the arithmetic mean and standard deviation. The results were expressed as mean zones of inhibition diameter (IDZ) in millimeters (mm). Means were compared by Tukey's statistical test using Prism3.0 software; they were considered statistically significant when $p < 0.05$.

2.4.3. Agar Diffusion Assay

The liquid medium assay was performed using the plate diffusion test [28] to determine whether the strain ARH (A3) secreted metabolites into the external environment. The plaque diffusion test was established as a standard by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [29]. Fermented must of the previous assay (10 µL) was applied to wells of 6 mm in diameter made in Petri dishes with 20 mL of Mueller–Hinton agar medium; they were seeded with the pathogenic microorganisms and incubated at 37 °C for up to 72 h. Subsequently, the IDZs were measured using tweezers. In the 6 mm wells, 10 µL of DMSO and 10 µL of chloramphenicol (30 µg) were used as the negative and positive controls, respectively. The test was performed in triplicates to calculate the mean and standard deviation. Means were compared by Tukey's statistical test using Prism3.0 software; they were considered statistically significant when $p < 0.05$.

2.4.4. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

To determine the minimum concentration capable of inhibiting bacterial growth, a microdilution test was performed using a 96 mm multi-well plate, and MS was diluted in DMSO. The calculation used to determine the concentration followed the CLSI protocol [18], which recommends 1000 µg/mL.

The technique described by Zogda and Porter [30] was used in this study. Mueller–Hinton broth (190 µL) and MS (10 µL) diluted in DMSO at an initial concentration of 1000 µg/mL were dispensed into the first row of wells. In the other wells, 100 µL of Mueller–Hinton broth medium was added. Then, serial dilutions were performed in nine consecutive wells, removing 100 µL.

The highest concentration well resulted in dilutions from 100 µg/mL to 0.0625 µg/mL. The inoculum and extract were not added to the penultimate well as a negative control. In the last well, the medium and inoculum were added as positive controls. Microbial growth was determined based on the growth of bacterial colonies. The concentration of the bacterial suspension was determined to be 5×10^5 CFU/mL according to the McFarland scale. The plate was incubated at 37 °C for 24–48 h. Bacterial viability was evaluated by adding 30 µL of resazurin after 24 h of incubation. Wells in which resazurin remained blue were read

as inhibiting microbial growth, and in those where resazurin changed to pink color, the extract did not inhibit the growth of the microorganism.

2.5. In Vitro leishmanicidal Activity

To determine the leishmanicidal activity, promastigotes of *Leishmania amazonensis* were incubated in the presence of increasing concentrations of the MS metabolite (6.25 to 100 µg/mL). The parasites were diluted to a concentration of 1×10^6 parasites/mL. Promastigotes incubated only with Schneider's medium were used as controls. After 72 h of incubation, surviving parasites were counted in a Neubauer chamber (iNCYTO CChip DHC-N01; Cheonan-Si, Republic of Korea). The IC_{50} value (concentration that inhibits parasite growth by 50%) was determined by linear regression analysis using SPSS software (version 8.0; IBM Co., New York, NY, USA) for Windows. Each experiment was performed in duplicate and technical triplicate [31].

2.6. Cytotoxic Action of Metabolites in Mammalian Cells

Cytotoxicity analyses were performed using the MTT technique (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide); 100 µL HEP-2 cell suspension at a concentration of 1×10^4 cells/mL was used. The cells were arranged in 96-well plates under five MS metabolite concentrations (12.5 to 200 µg/mL), except for controls that were filled with culture medium and incubated in an oven at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. After incubation, MTT was added to the plate wells and incubated again for 3 h in an incubator at 37 °C and 5% CO₂ in the dark. DMSO was added before the reading to solubilize the formazan crystals that were solidified by MTT reduction. The plates were analyzed by spectrophotometry at 540 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader [32].

Finally, the percentage of viable cells was calculated; from this result, it was possible to calculate the percentage of non-viable cells. The concentration capable of causing a cytotoxic effect in 50% of the cells (CC₅₀) was estimated through logarithmic regression analysis of the data obtained using SPSS 8.0 software for Windows. The selectivity index (SI) was determined using the ratio of CC₅₀ and IC₅₀ values. Each experiment was performed in two separate experiments in duplicates.

2.7. Evaluation of the Hemolysis Index

The hemolysis index of the metabolites was determined according to the method described by Wang et al. [33]. A 1% commercial sheep blood solution was prepared using 2% phosphate-buffered saline (PBS) and a working solution of the compounds. After preparing the solutions, tests were set up in a 96-well plate with 5 MS concentrations (6.25 to 100 µg/mL), a positive control with oxygen peroxide (H₂O₂), and a negative control with saline. Each well was composed of 100 µL of red blood cell solution plus 100 µL of working solution, except for controls, and incubated for 3 h under agitation at 37 °C. Finally, the absorbance was measured spectrophotometrically (540 nm), and the hemolytic activity values were calculated using the following formula:

$$\text{Hemolysis}(\%) = \frac{(\text{Treated Abs.} - \text{Negative control Abs.}) \times 100}{(\text{Positive control Abs.} - \text{Negative control Abs.})} \quad (1)$$

3. Results

3.1. Isolation and Classical Identification of Microorganisms

The strain ARH (A3) is visualized in Figure 1A, where the growth of a typical colony of actinomycetes is observed; it is round, with limited borders and the presence of grayish aerial mycelia, forming an inhibition zone around the colony that already produces and secretes a bioactive compound as indicated by the arrow.

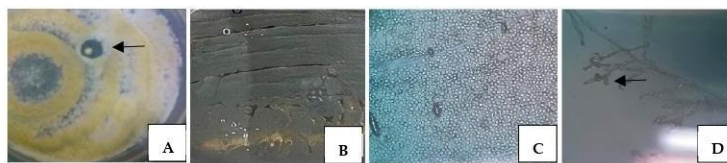


Figure 1. Colony isolation with macromorphological appearance of actinomycetes with formation of an inhibition zone showing production of bioactive compound as indicated by the arrow (A), macromorphological characteristics of the colony with aerial mycelium showing grayish pigmentation (B), and micromorphological forms of the same colony showing isolated spores (C) (400 $\times$) and arranged in chain as indicated by the arrow (D) (400 $\times$).

Macro- and micromorphological observations of colonies in a Petri dish and under a microscope, respectively, predict the classic identification of a microorganism. In this way, some macromorphological characteristics were considered by analyzing the culture in a Petri dish, such as the presentation of a colony that starts with the appearance of white mycelium and ends with a grayish color containing aerial mycelium releasing a darkened pigment, as shown in Figure 1B. The micromorphological analysis, however, showed structures such as gray chains of spores, as shown in Figure 1C, and micellar ramifications resembling hyphae of filamentous fungi, where such characteristics are compatible with actinobacteria belonging to the genus *Streptomyces* as indicated by the arrow, as shown in Figure 1D.

3.2. Molecular Identification

3.2.1. Genome and 16S rRNA Gene

As per genome sequencing analysis, the lineage of the the strain ARH (A3) belongs to the phylum. Actinomycetoma, family Streptomycetaceae, genus *Streptomyces*, and species *Streptomyces* sp. The genome contains 9,022,973 bp of linear DNA with 79 RNA sequences, 8540 protein-coding genes (PEGs), and high G + C content, with a 16S rRNA gene of 1531 bp. The BLAST platform analysis showed five sequences that most resembled ARH isolate (A3), which were *S. kronopolitis*, *S. chattanoogaensis*, *S. lydicus*, *S. nigrescens*, and *S. chrestomyceticus*. The closest species was *S. kronopolitis* strain NEAU-ML8, with 99.77% identity and a maximum score of 2750 (see Table 1).

Table 1. BLAST of the species most similar to the soil isolate strain ARH (A3). Description: the name of the species; max score: the highest alignment score; identity percentage: number that describes the similarity of the query sequence with the target sequence; membership: sequence access at NCBI.

Description	Max Score	Percent Identity	Accession
<i>Streptomyces kronopolitis</i> strain NEAU-ML8. ^T	2750	99.77%	NR_153682.1
<i>Streptomyces nigrescens</i> strain DSM 40276	2734	99.20%	NR_117748.1
<i>Streptomyces lydicus</i> strain ATCC 25470	2715	99.60%	NR_026444.1
<i>Streptomyces chattanoogaensis</i> strain DSM 40002	2712	99.28%	NR_114918.1
<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> JCM 4735 strain DSM 40545	2706	99.14%	NR_025621.1

3.2.2. Phylogenetic Tree

The phylogenetic tree shows the degree of relatedness between *Streptomyces* sp. ARH(A3) gene sequences with those of the five closest species in GenBank and species from the phylum Actinomycetoma. The percentage of data coverage for the internal nodes is shown in Figure 2. The optimal tree with the sum of the verified branch lengths was 0.34456757.

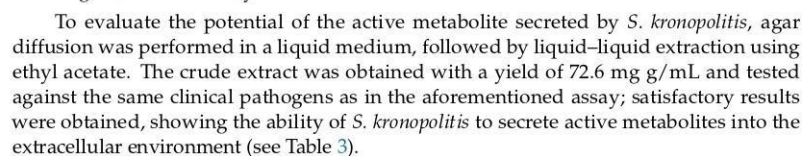


Table 3. Diameters (mean and SD) of inhibition halos in mm formed by strain ARH (A3) against the clinical pathogens tested in the agar diffusion assay. Negative control with DMSO did not show a zone of inhibition. Positive control with chloramphenicol for inhibition zones > 30 mm.

Clinical Pathogens	Inhibition Halos (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	20.3 ^b ± 1.5
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (27012)	20.6 ^b ± 1.1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (27010)	28.6 ^a ± 0.57
<i>Mycobacterium abscessus</i>	30.6 ^a ± 3

^{a,b}—same letter—does not present statistical significance; different letters—presents statistical significance.

3.3.3. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

After the production and extraction of secondary metabolites from the strain ARH (A3), the MICs were evaluated according to the CLSI protocol [18]. Calculations were performed using the initial concentration of the extract at 100 µg/mL for the MIC test. The MIC end point was the lowest concentration of each extract in which there was no color change; it was observed that the MS of *M. abscessus* and the two strains of *C. diphtherium* were similar, reaching a concentration of 12.5 µg/mL; in *S. aureus*, the minimum concentration was 0.048 µg/mL as shown in Table 4.

Table 4. MS Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against previously selected pathogens.

Metabolites	Clinical Pathogens			
	<i>M. abscessus</i> (IC)	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>C. diphtherium</i> ATCC 27010	<i>C. diphtherium</i> ATCC 27012
<i>Streptomyces</i> sp. ARH (A3)	12.5 µg/mL	0.048 µg/mL	12.5 µg/mL	12.5 µg/mL

3.3.4. In Vitro leishmanicidal Activity

The data shown in Figure 3 demonstrate that the metabolite tested against promastigote forms of *L. amazonensis* was able to inhibit growth from the lowest concentration of the metabolite (6.25 µg/mL). As shown in Figure 3, 100% inhibition of parasite growth was observed at the three highest concentrations tested. The IC₅₀/72 h value was calculated for MS and showed a value of 9.0 ± 0.9 µg/mL.

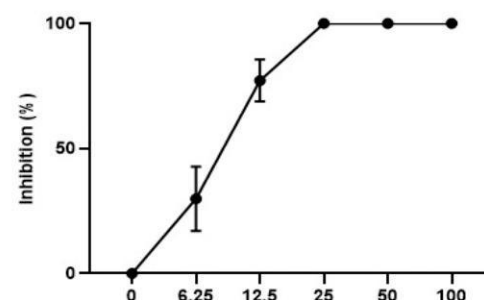


Figure 3. Growth inhibition curve of *Leishmania amazonensis* promastigotes treated with metabolite of *Streptomyces* sp. ARH (A3).

3.4. Cytotoxic Action of the Metabolite in Mammalian Cells

Figure 4 shows that the MS presented toxicity at the highest concentration (200 µg/mL) tested for this metabolite. It is also possible to note that in the other concentrations, cell viability was greater than 85%, which indicates low toxicity to mammalian cells.

Concentrations that resulted in cell viability greater than 70% were considered non-toxic, as reported by Tunes [34].

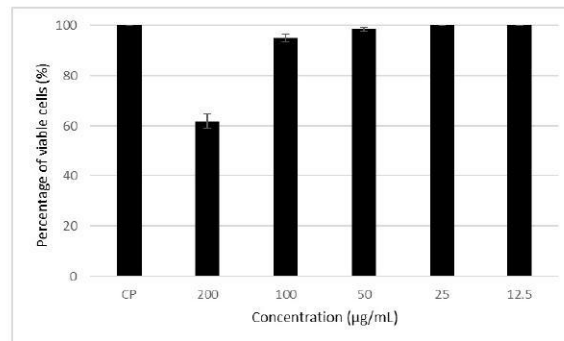


Figure 4. Cytotoxic action of the metabolite (MS) of *Streptomyces* sp. ARH (A3) in mammalian cells (HEp-2 cells).

The CC_{50} values of the metabolites were calculated to be 221.2 ± 7.0 µg/mL. The selectivity index (SI) (CC_{50}/IC_{50}), which indicates the selectivity of the compound for the parasite in relation to mammalian cells, was calculated. This metabolite had a selectivity index (SI) of 24.6.

3.5. Evaluation of the Hemolysis Index

The toxic effect on erythrocytes is due to the interaction of substances with the cell membrane, mainly through sterols such as cholesterol, which leads to a deformity in the erythrocyte membrane, resulting in extravasation [16,35].

The DM hemolysis index was determined, as shown in Figure 5. At all extract concentrations, the values were very close to those of the control red blood cells immersed in PBS (negative control), with no statistical discrepancy. Therefore, the metabolites did not exhibit hemolytic activity at the tested concentrations.

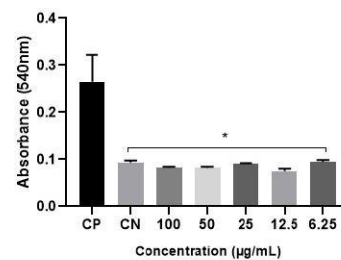


Figure 5. Evaluation of the SM hemolysis index. Columns marked with an asterisk (*) represent the statistically significant difference ($* = p \leq 0.01$) in relation to the positive control group (PC) by the ANOVA test ($p < 0.05$) and post-Dunnett's test.

4. Discussion

Soil is an abundant and diverse system of microorganisms and, therefore, is an excellent source for microbial prospecting. In this study, a bacterium with a characteristic actinomycete colony was isolated from the soil. Several authors have published papers on prospecting for this bacterial group in the soil [2,9,36]. Micromorphological identification revealed the presence of spiral spores and arthrospores, typical for *Streptomyces* bacteria.

The same characteristics were observed by Al Dhabhi et al. [2], Amorim et al. [6], Costa Rosa et al. [10], Ensign [37], and Sholkamy et al. [38], who isolated bacteria of the genus *Streptomyces* from environmental samples.

Identification of promising species is essential for understanding and cataloging the potential of this microbial group. Bacteria of the genus *Streptomyces* have been widely reported as important producers of metabolites of biotechnological interest, and the search for new species is of paramount importance for the biotechnology industry. The molecular identification analysis determined that it was a bacterium from the actinomycetes group with the closest degree of similarity to the species *S. kronopolitis*. Other authors have identified environmental isolates through similar molecular techniques. Saraswathi et al. [36] isolated species of actinomycetes from rhizosphere soil and, after screening bacteria with biotechnological potential, used molecular techniques to identify *S. cangkrigensis*. Pagmadulan et al. [9] isolated four species, *S. canus*, *S. s. cirratus*, *S. s. bacillaris*, and *S. peucetius*, from the soil in Mongolia and identified them using the ribosomal 16S technique.

Bacteria of the genus *Streptomyces* sp. are known for their ability to produce compounds of biotechnological interest, such as enzymes and antibiotics [2,9]. In this study, the bacterium *Streptomyces* sp. ARH (A3) showed activity against different bacteria of clinical interest in tests in solid medium and submerged fermentation, demonstrating its ability to produce and secrete active compounds into the external environment. Abba et al. [39] pointed out that its compounds, after submerged fermentation, have antimicrobial action against Gram-positive bacteria with 20 mm inhibition halos for *Bacillus subtilis*. The secreted compound showed activity against *S. aureus* (ATCC 6538), *C. diphtheriae* (27012), *C. diphtheriae* (27010), and *M. abscesses*, with inhibition halos larger than 20 mm. The isolation of bacteria with activity against isolates of clinical interest is of paramount importance because of the increasingly frequent appearance of multidrug-resistant strains [12].

The MIC of the tested metabolites was established for the sensitive bacteria, with *S. aureus* having the lowest MIC. Amorim et al. [6] reported that the MIC for *P. aeruginosa* was 0.5 mg/mL using metabolites from the same microorganism (*Streptomyces* spp.), even though the pathogen was Gram-negative. However, Huang et al. [40] tested purified metabolites from microorganisms against Gram-positive bacteria and obtained an MIC₅₀ of 12.5 µg/mL. Potentially, because MS is not yet purified, it requires a higher concentration to reach lethality; therefore, it shows promise for complementary future tests in its purified form.

The MS has a significant inhibitory effect on *L. amazonensis*. Although bacteria of the genus *Streptomyces* are recognized as important sources of secondary metabolites with diverse biological activities [6–8,25,26,41], there are no reports on the biological action of *S. kronopolitis* against the genus *Leishmania*. The leishmanicidal activity of *Streptomyces* sp. has been reported in several studies, such as that by Sreedharan and Rao [42] and Aliança et al. [43], who analyzed the effect of a potential biological compound inhibitor against *Leishmania donovani*. This study also corroborates the work of Amorin et al. [6], who evaluated the bactericidal and leishmanicidal potential of *S. ansochromogenes*.

In this study, the low toxicity of the studied metabolite was also demonstrated, which corroborates the results of studies by Aliança [31], where macroalgal extracts were more selective to parasites than to mammalian cells (IS > 1), and those of the studies by Trombini [44], which stated that metabolites can be cytotoxic and capable of affecting both cell proliferation and the immune system. In the hemolysis assay, low hemolytic activity was observed, demonstrating the low toxicity of the metabolite. Szabo [45] conducted hemolysis tests with secondary metabolites of herbal medicines and concluded that there was no risk of hemolysis at concentrations where the index was equal to or lower than that of the negative control.

In this study, the antimicrobial potential of an extract resulting from the secondary metabolism of *Streptomyces* sp. was demonstrated. Secondary metabolites are a mixture of compounds produced at the end of the exponential phase of microorganisms and are essentially associated with their survival in the environment, which makes these

compounds interesting for pharmaceutical industries. Of the several chemical classes that make up crude extracts, reports in the literature show that terpenes, flavonoids, and alkaloids are the majority when it comes to metabolites isolated from actinobacteria [46].

Actinobacteria have a great potential to produce secondary metabolites. Between the years 2017 and 2021, 589 manuscripts were published describing new compounds from different chemical classes isolated from actinobacteria, of which 52% demonstrate one or more biological activities. The most predominant classes were macrolides, quinolones, and small peptides with antimicrobial and cytotoxic potential. It is important to say that of the 589 new compounds, 69% were produced by *Streptomyces*, demonstrating the biotechnological importance of the genus [47].

The mechanisms of action of some of these compounds are reported in the literature. Antimicrobials generally act on the microorganism's cell wall, disorganizing the peptidoglycan chain (vancomycin); on the plasma membrane, depolarizing the membrane (daptomycin); on protein synthesis, blocking peptide transferase (chloramphenicol); and on RNA synthesis, inhibiting DNA—dependent RNA polymerase (rifamycin) [47].

5. Conclusions

The filamentous bacterium *Streptomyces* sp. ARH (A3) is potentially promising because it contains active metabolites that can be extracted from bacterial cells, with antibacterial biological activity against Gram-positive bacteria and antiparasitic action against *L. amazonensis* in the promastigote form. Furthermore, the extracted MS showed good viability after the MIC results, also presenting a non-toxic action on cells when tested at low concentrations; thus, it is a strong candidate for the search for new bioactive compounds.

Studies are being carried out to isolate and identify the target molecule, considering that the crude extract was promising for different organisms, suggesting that yet another molecule is active.

Author Contributions: Conceptualization, A.S.d.S.A. and R.d.C.M.d.M.; methodology, V.L.S.d.A., L.R.L.D., L.A.B., M.C.M., A.d.J.M.B., L.A.T.S. and T.R.R.A.; formal analysis, A.S.d.S.A.; investigation V.L.S.d.A. and L.R.L.D.; data curation, A.S.d.S.A. and R.d.C.M.d.M.; writing—original draft preparation, L.R.L.D. and F.C.R.; writing—review and editing, A.S.d.S.A.; supervision, R.d.C.M.d.M.; project administration, R.d.C.M.d.M.; funding acquisition, R.d.C.M.d.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão. (FAPEMA ACT-01787/21).

Data Availability Statement: The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request. The datasets generated and/or analyzed during the genome sequencing are available in the NCBI repository; for datasets, download genome accession <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/1612435/>, accessed on 20 October 2023 RefSeq assembly GCF_014646275.1 GCF_014646275.1—include gff3, rna, cds, protein, genome, seq-report—filename GCF_014646275.1.zip and Submitted GenBank assembly GCA_014646275.1.

Acknowledgments: The authors thank Ceuma University for providing infrastructure and logistical support. FAPEMA for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Parker, S.S. Buried treasure: Soil biodiversity and conservation. *Biodivers. Conserv.* **2010**, *19*, 3743–3756. [CrossRef]
2. Al-Dhabi, N.A.; Esmail, G.A.; Ghilan, A.K.M.; Arasu, M.V. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 474–479. [CrossRef]
3. Carmin, A.A.; Santiago, P.A.L.; Santiago, S.R.S.S.; Gomes, A.M.S.; Pereira, K.D.E.S. Evaluation of the antimicrobial potential of fungi isolated from the soil of the Municipality of Iranduba. *Res. Soc. Dev.* **2021**. [CrossRef]
4. Thiele-Bruhn, S.; Schlöter, M.; Wilke, B.M.; Beaudette, L.A.; Martin-Laurent, F.; Cheviron, N.; Mougín, C.; Römcke, J. Identification of new microbial functional standards for soil quality assessment. *Soil* **2020**, *6*, 17–34. [CrossRef]

5. Supong, K.; Thawai, C.; Choowong, W.; Kittiwongwattana, C.; Thanaboripat, D.; Laosinwattana, C.; Koohakan, P.; Parinthawong, N.; Pittayakhajonwut, P. Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Res. Microb.* **2016**, *167*, 290–298. [\[CrossRef\]](#)
6. Amorim, E.A.d.F.; Castro, E.J.M.; da Souza, S.V.; Alves, M.S.; Dias, L.R.L.; Melo, M.H.F.; da Silva, I.M.A.; Villis, P.C.M.; Bonfim, M.R.Q.; Falcai, A.; et al. Antimicrobial Potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) isolated from a plant native to the Amazon against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microb.* **2020**, *11*, 574693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Elkhayat, E.S.; Goda, A.M. Antifungal and cytotoxic constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. *Bullet. Fac. Pharm.* **2017**, *55*, 85–89. [\[CrossRef\]](#)
8. Bunbamrung, N.; Intaraudom, C.; Dramaee, A. Antibacterial, antitubercular, antimalarial and cytotoxic substances from the endophytic *Streptomyces* sp. TBRC7642. *Phytochemistry* **2020**, *172*, 112275. [\[CrossRef\]](#)
9. Pagmadulam, B.; Tserendulam, D.; Rentsenkhand, T.; Igarashi, M.; Sawa, R.; Nihei, C.-I.; Nishikawa, Y. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. *Parasitol. Int.* **2020**, *74*, 101961. [\[CrossRef\]](#)
10. Rosa, F.C.; de Almeida, I.A.; Mota, A.G.; de Miranda, R.D.C.M. Bioprospecting of secondary metabolites produced by endophytic actinomycete isolated from *Aloe vera*. *Concillium* **2023**, *23*, 227–239. [\[CrossRef\]](#)
11. Encalada Álvarez, R.C.; Arteaga Sarmiento, S.D. Vigilância epidemiológica do *Acinetobacter baumannii* multirresistente em nível hospitalar. *Vive Rev. Salud* **2021**, *4*, 66–86.
12. Böger, B.; Surek, M.; Vilhena, O.R.; Fachi, M.M.; Junkert, A.M.; Santos, J.M.; Domingos, E.L.; Cobre, A.d.F.; Momade, D.R.; Pontarolo, R. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *402*, a123448. [\[CrossRef\]](#)
13. Wang, Q.; Mao, C.; Lei, L.; Yan, B.; Yuan, J.; Guo, Y.; Li, T.; Xiong, X.; Cao, X.; Huang, J.; et al. Antibiotic resistance genes and their links with bacteria and environmental factors in three predominant freshwater aquaculture modes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2022**, *241*, a113832. [\[CrossRef\]](#)
14. Lopes, R.K.; Carvalho, C.E.G.; Marques, D.D.; Ferreira, A.B.; Almeida, R.M.; Aguiar, M.G. Evaluation of the leishmanicidal activity of *Symphonia globulifera* latex. *Braz. J. Dev.* **2020**, *6*, a16705–a16730. [\[CrossRef\]](#)
15. Pereira, B.A.S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Participação de Fatores do Hospedeiro e do Parasito no Curso da Infecção Experimental em Camundongos. Ph.D. Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2017.
16. Oddone, R.; Schweynoch, C.; Schönan, G. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (Viannia) species. *J. Clin. Microb.* **2017**, *47*, 2818–2825. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Pan American Health Organization; World Health Organization. *Manual of Procedures for Leishmaniasis Surveillance and Control in the Americas*; Pan American Health Organization: Washington, DC, USA, 2019.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Quality Control Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Limits for Broth Dilution and MIC Interpretative Breakpoints (M27-S2)*; Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne: Wayne, PA, USA, 2006.
19. Clark, F.E. Agar-plate method for total microbial count. In *Methods of Soil Analysis, Part Chemical and Microbiological Properties*; Blanc, C.A., Evans, D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E., Dinauer, R.C., Eds.; Madson Inc.: New York, NY, USA, 1965; pp. 1460–1466.
20. Shirling, E.B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1966**, *16*, 313–340. [\[CrossRef\]](#)
21. Rapper, K.B.; Fennell, D.I. *The Genus Aspergillus*; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1965.
22. Pitt, J.I. *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*; Academic Press: London, UK, 1979.
23. Samson, R.A.; Pitt, J.I. *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1990.
24. Klich, M.A.; Pitt, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1988**, *91*, 99–108. [\[CrossRef\]](#)
25. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Preedanon, S.; Phongpaichit, S.; Rungtindamai, N.; Sakayaroj, J. Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1323–1326. [\[CrossRef\]](#)
26. Uchida, K.; Ichikawa, T.; Shimauchi, Y.; Ishikura, T.; Ozaki, A. Hikizimycin, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **1971**, *14*, 259–262. [\[CrossRef\]](#)
27. Matsuura, T. Caracterização Taxonômica de Actinomicetos Endofíticos Produtores de Antibióticos Isolados de Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Ph.D. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil, 2004.
28. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherrys, J.C.; Turk, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [\[CrossRef\]](#)
29. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S25; Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne: Wayne, PA, USA, 2015.
30. Zgoda, J.R.; Porter, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm. Biol.* **2001**, *39*, 221–225. [\[CrossRef\]](#)
31. Aliança, A.S.S.; Oliveira, A.R.; Feitosa, A.P.S. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *105*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
32. El-Sayed, E.R.; Ahmed, A.S.; Al-Hagar, O.E.A. Agro-industrial wastes for production of paclitaxel by irradiated *Aspergillus fumigatus* under solid-state fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1427–1439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Wang, J.J.; Liu, K.S.; Sung, K.C.; Tsai, C.Y.; Fang, J.Y. Lipid nanoparticles with different oil/ fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *38*, 138–146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Tunes, L.G. Investigação da Atividade e Mecanismos de Ação Leishmanicida e/ou Tripanocida de Produtos Naturais e um Derivado. Master's Thesis, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2015.
35. Cruz, E.F. Modelos Markovianos para Canais Iônicos em Membranas Celulares. Master's Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2006.
36. Saraswathi, K.; Mahalakshmi, S.; Khusro, A.; Arumugam, P.; Mohammed, A.K.; Alkufeydy, R.M. In vitro biological properties of *Streptomyces cangkringensis* isolated from the floral rhizosphere regions. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 3249–3257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ensign, J.C. Formation, properties, and germinations of Actinomycete spores. *Ann. Rev. Microb.* **1978**, *32*, 185–219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Sholkamy, E.N.; Muthukrishnan, P.; Abdel-Raouf, N.; Nandhini, X.; Ibraheem, I.B.; Mostafa, A.A. Antimicrobial and antinematocidal metabolites from *Streptomyces cuspidosporus* strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 3208–3220. [\[CrossRef\]](#)
39. Abba, C.; Nwachukwu, C.; Okoye, F.; Eboka, C.; Eze, P.; Abonyi, D.; Proksch, P. Phenolic compounds from endophytic *Pseudofusicoccum* sp. isolated from *Annona muricata*. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* **2018**, *3*, 332. [\[CrossRef\]](#)
40. Huang, X.; Ren, J.; Li, P.; Feng, S.; Dong, P.; Ren, M. Potential of microbial endophytes to enhance the resistance to postharvest diseases of fruit and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 1744–1757. [\[CrossRef\]](#)
41. Liu, C.; Ye, L.; Li, Y.; Jiang, S.; Liu, H.; Yan, K.; Xiang, W.; Wang, X. *Streptomyces kronopolitis* sp. nov., an actinomycete that produces phoslactomycins isolated from a millipede (*Kronopolites svenhedini* Verhoeff). *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **2016**, *66*, 5352–5357. [\[CrossRef\]](#)
42. Sreedharan, V.; Rao, K.V.B. Efficacy of protease inhibitor from marine *Streptomyces* sp. VITBVK2 against *Leishmania donovani*—An in vitro study. *Exp. Parasitol.* **2017**, *174*, 45–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Aliança, A.S.D.S.; dos Anjos, K.F.L.; Reis, T.N.D.V.; Higino, T.M.M.; Brelaz-de-Castro, M.C.A.; Bianco, É.M.; De Figueiredo, R.C.B.Q. The in vitro biological activity of the brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* **2014**, *19*, 14052–14065. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Dasgupta, A.; Acharaya, K. Mushrooms: An emerging resource for therapeutic terpenoids. *3 Biotech* **2019**, *9*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
45. Szabo, G. Gut–liver axis in alcoholic liver disease. *Rev. Arq. Gastroenterol.* **2015**, *148*, 30–36. [\[CrossRef\]](#)
46. Rosa, F.C.; Mota, A.G.; de Almeida, B.L.; de Souza, G.D.S.; Araújo, M.C.; Melo, M.H.F.; dos Santos Aliança, A.S.; de Mendonça, R.d.C.M. Importance of secondary metabolites produced by actinobacteria. *Rev. Ciências Saúde CEUMA* **2023**, *1*, 72–87.
47. Jose, P.A.; Maharshi, A.; Jha, B. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiol. Res.* **2021**, *246*, 126708. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



DOI: 10.53660/CLM-2464-23T02

Bioprospecção de metabólitos secundários produzidos por actinomiceto endofítico isolado da *Aloe vera*

Bioprospecting of secondary metabolites produced by endophytic actinomycete isolated from *Aloe vera*

Received: 2023-11-08 | Accepted: 2023-12-10 | Published: 2023-12-14

Fernanda Costa Rosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2138-0869>
Universidade Ceuma, BrasilE-mail: nandacosttarosa@gmail.com

Isabelle Alves de Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5719-4772>
Universidade Ceuma, BrasilE-mail: isabellealmeida8@hotmail.com

Alexya Gonçalves Mota

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1031-6437>
Universidade Ceuma, BrasilE-mail: alexaygm@gmail.com

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2116-1797>
Universidade Ceuma, BrasilE-mail: rita.miranda@ceuma.br

ABSTRACT

The aim of this work to evaluate the antibacterial action of secondary metabolites produced by endophytic actinomycetes, against isolates of medical interest. For such, the bacteria were isolated from the botanical sample and classical morphological identification was performed. The induction of metabolites production was carried out using the Submerged Fermentation technique, followed by purification of the extract. The evaluation of antibacterial activity was accomplished by using agar diffusion and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays. Macro and microscopic analysis of the grown microorganism allowed it to be identified as belonging to the genus *Streptomyces*. Test results demonstrated that the extract was able to inhibit the growth of *C. propinquum* 431024, with an inhibition zone of 27 ± 0 mm and of *C. propinquum* 36063, with an inhibition zone of 24 ± 0 mm and MIC of $32.1 \mu\text{g/mL}$ for boths. The evaluation of biofilm formation resulted in: *C. propinquum* 421024 as a weak producer and *C. propinquum* 36063 as a moderate producer. The biofilm interference test showed that compared to the control there was a reduction in biofilm formation of 22% for *C. propinquum* 421024, as well as a reduction in pre-formed biofilm of 27%. There was a 48% reduction in the formation and 42% in the pre-formed biofilm of *C. propinquum* 36063. Lastly, it was concluded that the secondary metabolites produced by the endophytic actinomycetes demonstrated an antibiotic potential against clinical strains (nasopharynx) of *Corynebacterium propinquum*, a rare pathogen described for causing infections in patients with pulmonary involvement, pleural effusion, bacteremia and endocarditis and which presents an emerging antibiotic resistance.

Keywords: Secondary metabolites; Endophytic actinomycetes; *Corynebacterium propinquum*; Bioprospecting.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por actinomiceto endofítico, frente a isolados de interesse clínico. Foi realizado o isolamento da bactéria a partir de amostra botânica e identificação morfológica clássica. A indução da produção de metabólitos foi realizada pela técnica de Fermentação Submersa, seguida de purificação do extrato. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio de ensaios de difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e teste antibiofilme. A análise macro e microscópica do microrganismo crescido permitiu identificá-lo como pertencente ao gênero *Streptomyces*. Os resultados dos testes demonstraram que o extrato foi capaz de inibir o crescimento de *Corynebacterium propinquum* 431024, com formação de halo de 27 ± 0 mm e de *Corynebacterium propinquum* 36063, com halo de 24 ± 0 mm e CIM de $32,1 \mu\text{g/mL}$ para ambos. A avaliação da formação do biofilme resultou em: *C. propinquum* 421024 como produtora fraca e *C. propinquum* 36063 como produtora moderada. O teste de interferência no biofilme mostrou que em comparação ao controle houve redução na formação do biofilme de 22% para *C. propinquum* 421024, bem como redução no biofilme pré-formado de 27%. Houve redução de 48% na formação e 42% no biofilme pré-formado de *C. propinquum* 36063. Conclui-se que os metabólitos secundários (extrato) produzidos pelo actinomiceto endofítico apresentou potencial antibiótico frente a linhagens clínicas (nasofaringe) de *Corynebacterium propinquum*, patógeno raro descrito como causador de infecções em pacientes com envolvimento pulmonar, derrame pleural, bacteremia e endocardite e que apresenta uma emergente resistência antibiótica.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; Actinomiceto endofítico; *Corynebacterium propinquum*; Bioprospecção.

INTRODUÇÃO

Os actinomicetos representam bactérias Gram-positivas, filamentosas, formadoras de esporos e produtoras de metabólitos secundários. Estes metabólitos são notavelmente conhecidos pela sua importante ação antimicrobiana, possuindo grande utilidade no âmbito farmacêutico, químico e industrial (Sivalingam *et al.*, 2019). Compostos antimicrobianos como cloranfenicol, vancomicina (antibióticos), nistatina, anfotericina B (antifúngicos) e ivermectina (antiparasitário) são exemplos de produtos resultantes do metabolismo de actinomicetos (Ayswaria; Vasu; Krishna, 2020).

Estes microrganismos são componentes importantes da rizosfera, pois estabelecem relações ecológicas de endofitismo graças à sua capacidade de colonizar os tecidos vegetais, incluindo raízes, caule e folhas, sem atribuir prejuízos à planta. Os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos endofíticos atuam como fatores de crescimento para as plantas, auxiliando na absorção de nutrientes ou estimulando os mecanismos de defesa contra patógenos (Bhatti; Haq; Bhat, 2017).

O período conhecido como “a era dourada dos antibióticos”, que compreende as décadas de 1940 a 1970, foi marcado pela incessante e intensa descoberta de novos produtos antimicrobianos clinicamente relevantes. No entanto, este ritmo de descoberta

decaiu de forma radical durante as décadas seguintes, ao mesmo tempo que os microrganismos resistentes aos antibióticos se consolidaram como patógenos de preocupação (Scheffler *et al.*, 2013; Mendes, 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é um fenômeno natural que ocorre como parte do processo de adaptação dos microrganismos. Porém, este processo sofreu uma exacerbada aceleração devido ao uso indiscriminado de antibióticos pela população mundial, levando ao aparecimento de linhagens cada vez mais resistentes à terapia medicamentosa disponível (Mancuso *et al.*, 2021).

Os componentes do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.) são exemplos de microrganismos que desenvolveram resistência a inúmeras classes de antibióticos. Por este motivo, representam uma grande ameaça à saúde pública mundial, sendo considerados pela OMS como patógenos de prioridade alta ou crítica (Oliveira *et al.*, 2020).

Tendo em vista o crescente aparecimento de microrganismos resistentes, produtos bioativos naturais têm sido progressivamente mais explorados com o intuito de descobrir compostos microbicidas alternativos aos fármacos convencionais. Sendo assim, este trabalho buscou avaliar a ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por actinomiceto endofítico, frente a isolados de interesse médico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos utilizados

As linhagens de microrganismos utilizadas nos testes foram: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0023, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0026, *Corynebacterium propinquum* 431024 e *C. propinquum* 36063 (isolados clínicos de nasofaringe). A manutenção dos microrganismos foi realizada em meio ágar Mueller-Hinton (MH) e acondicionados em geladeira a 4°C a fim de garantir a viabilidade celular.

características macroscópicas e microscópicas, foi possível realizar a identificação a nível de gênero conforme os critérios adotados por Shirling; Gottlieb (1966).

Obtenção do extrato

Fermentação Submersa

Para induzir a produção de metabólitos secundários pelo microrganismo, foi realizada a técnica de fermentação submersa, descrita por Amorim *et al.* (2020). Para tal, o microrganismo foi previamente cultivado em placas de Petri com ágar BDA orgânico; em seguida, 5 blocos de meio, contendo colônias do microrganismo, foram retirados com o auxílio de uma ponteira azul ($\cong 6$ mm de diâmetro) e colocados em frascos Erlenmeyer (250 ml) contendo meio líquido de batata orgânico enriquecido com glicose (50 ml). Então, os frascos foram incubados em incubadora rotativa (180 rpm/ $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 15 dias. Após este período, a amostra foi filtrada com auxílio de papel filtro e microfiltro (0,22 μm) para avaliação das atividades biológicas.

Extração e purificação dos metabólitos secundários

Para realizar a extração dos metabólitos secundários, foi realizada a técnica de separação de misturas líquido-líquido descrita por Trisuwan *et al.* (2008), que consiste na adição de acetato de etila, como solvente, junto ao extrato filtrado na proporção de 1:1. A solução foi homogeneizada vigorosamente em balão volumétrico por 8 minutos, e colocada em funil de decantação, para ocorrer a separação química, por 30 minutos. A fase contendo os metabólitos foi selecionada e colocada em um frasco de vidro previamente pesado. Com o uso de um evaporador rotativo, o solvente orgânico sofreu evaporação, resultando em um extrato seco contendo os metabólitos de interesse. Por fim, o extrato foi solubilizado em DMSO (1%) na concentração final de 1.000 $\mu\text{g/ml}$.

Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato

Ensaio de difusão em ágar

Para testar a atividade bactericida do extrato obtido, foi realizado o teste de difusão em ágar de acordo com o protocolo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para tal, realizou-se previamente a semeadura das bactérias-teste em placas de Petri contendo meio ágar MH. Então, ocorreu a aplicação do extrato (1.000 µg/mL) e dos controles (antibiótico claritromicina 20µg/mL e DMSO a 1%) em poços de 6 mm de diâmetro feitos no ágar, seguida de incubação à 37°C por 48 horas. A leitura dos resultados foi feita a partir da medição dos halos formados, com auxílio de um paquímetro.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi realizada a diluição seriada do extrato em placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços contendo MH (Zogda; Porter, 2001). O teste foi realizado em triplicata com as concentrações distribuídas de A-H (1.000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,2 µg/mL, 15,6 µg/mL e 7,8 µg/mL). Em seguida os microrganismos em salina (0,85%), previamente padronizados pela escala de McFarland a 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), foram colocados nos poços da microplaca com a ajuda de uma micropipeta. Para fins de comparação, também foram realizados controles de crescimento bacteriano positivo e negativo. A placa seguiu para incubação à 37°C por 24 horas, com posterior adição de corante resazurina aos poços e novo período de incubação por 24 horas. Por fim, foi realizada a leitura da placa, sendo que a alteração para a cor rosa demonstra o crescimento bacteriano.

Formação e interferência na formação do biofilme

A formação de biofilme foi determinada em microplacas de 96 poços (Stepanovic *et al.*, 2000) e em seguida foram realizados testes para avaliar a interferência do extrato na formação do biofilme. Assim, foram aplicadas 200µl de suspensões bacterianas em MH (DO₅₇₀ 0,2) nos poços com CIM do extrato (100µl). Os controles negativos

contiveram apenas o MH. Após 48h a 37°C, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 200µl de PBS (pH 7,2). As células bacterianas anexas remanescentes foram fixadas com 200µl de 99% de metanol e coradas com 2% de violeta de cristal. O corante ligado foi então solubilizado com 160µl de ácido acético glacial a 33% e a DO da solução foi medida (Gomes *et al.*, 2013).

Para análise da intensidade da formação do biofilme foi utilizado a classificação idealizada por Ferro *et al.* (2012), que se baseia na densidade óptica dos isolados (D.O.i), e tomando como base a do controle negativo (D.O.c), os isolados foram classificados nas seguintes categorias: Não-Produtor: $D.O.i < D.O.c$; Produtor Fraco: $D.O.c < D.O.i \leq (2X D.O.c)$; Produtor Moderado: $(2X D.O.c) < D.O.i \leq (4X D.O.c)$; Produtor Forte: $(4X D.O.c) < D.O.i$.

Interferência em biofilme pré-formado

A formação de biofilme foi determinada também em microplacas de 96 poços (Stepanovic *et al.*, 2000). Foram aplicadas 200µl de suspensões bacterianas em MH (DO570 0,2) nos poços. Os controles negativos contiveram apenas o MH. Após 24h a 37°C, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 200µl de PBS e em seguida acrescentado 200µl de MH para os controles e 100µl de MH com 100µl da CIM do extrato nos poços e depois as microplacas foram incubadas por mais 24h a 37°C. Após esse período, aspirou o conteúdo dos poços e lavou duas vezes com 200µl de PBS e as células bacterianas remanescentes foram fixadas com 200µl de 99% de metanol e coradas com 2% de violeta de cristal. O corante foi então solubilizado com 160µl de ácido acético glacial a 33% e a DO550 da solução foi medida (Gomes *et al.*, 2009). Cada ensaio foi realizado em triplicata.

RESULTADOS

Ao final do período de incubação foi possível observar o crescimento de pequenas colônias brancas, bem aderidas ao meio (micélio vegetativo), sugerindo pertencer a classe dos actinomicetos. Entretanto, as placas continuaram na estufa por mais 7 dias para crescimento e diferenciação de suas colônias.

Após esse período, as colônias se apresentaram com formação de micélio aéreo em coloração branca acinzentada com bordas brancas, formato circular, elevação convexa

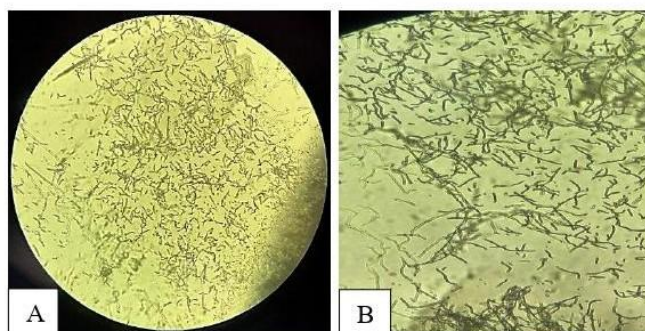
e margem filamentosa (Figura 1). Além disso, foi constatado que as colônias exalavam o odor característico do gênero *Streptomyces*, devido a produção do composto orgânico geosmina. Por fim, a observação microscópica revelou micélios aéreos com longas cadeias de esporos retos (Figura 2). Todos estes fatores sugerem que o microrganismo isolado é um actinomiceto pertencente ao gênero *Streptomyces*.

Figura 1 – Aspecto morfológico do isolado da folha da babosa (*Aloe vera*), após 20 dias de incubação a 28°C, com características sugestivas de *Streptomyces* sp



Fonte: Própria autora (2023)

Figura 2 – (A e B) Microscopia óptica, do isolado da folha da babosa (*Aloe vera*), evidenciando longas cadeias de esporos retos.

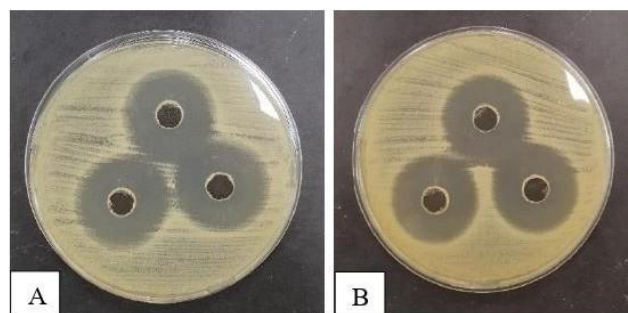


Fonte: Própria autora (2023)

Os resultados do ensaio de ágar difusão demonstraram que o extrato obteve ação antibacteriana contra *Corynebacterium propinquum* 431024 e *C. propinquum* 36063, evidenciada através da formação de halos de inibição de 27 ± 0 mm frente *C. propinquum* 431024, e halo de 25 ± 0 mm frente *C. propinquum* 36063 (Figura 3). Enquanto o controle (claritromicina 20 $\mu\text{g/mL}$) formou halo de inibição de $29 \pm 0,5$ frente a *C. propinquum* 431024 e 28 ± 0 frente a *C. propinquum* 36063 (Figura 4). O controle negativo DMSO a 1% não formou halo de inibição, conforme o esperado (Figura 5). O extrato não

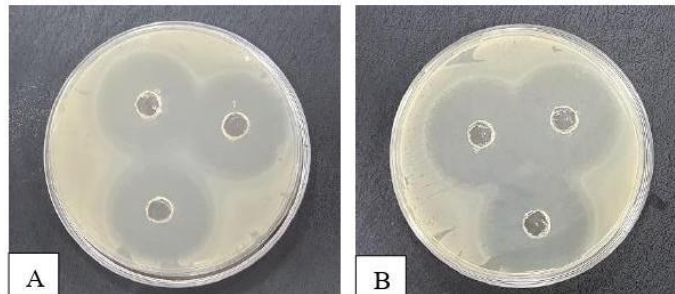
apresentou atividade contra os demais microrganismos testados (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*).

Figura 3 – Teste de ágar difusão do extrato, utilizando meio MH, com formação de halos frente a *C. propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B) - teste em triplicata.



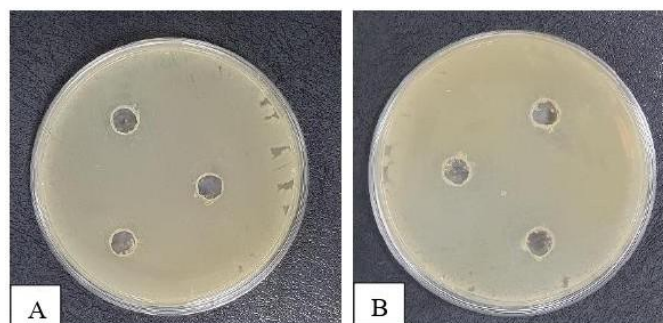
Fonte: Própria autora (2023).

Figura 4 – Teste de ágar difusão com o antibiótico claritromicina (controle), utilizando meio MH, com formação de halos frente a *C. propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B) - teste em triplicate.



Fonte: Própria autora (2023).

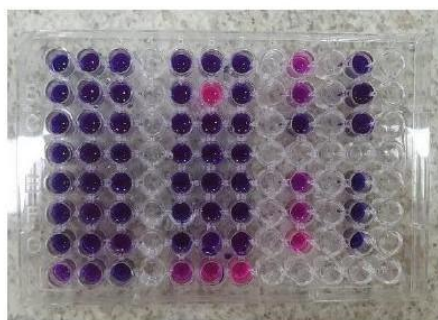
Figura 5 – Teste de ágar difusão com DMSO (controle), utilizando meio MH, com formação de halos frente a *C. propinquum* 431024 (A) e *C. propinquum* 36063 (B) - teste em triplicata.



Fonte: Própria autora (2023).

O teste de Concentração Inibitória Mínima, foi realizado apenas com as linhagens que tiveram resultados positivos no teste de ágar difusão. Dessa forma, os microrganismos avaliados foram *C. propinquum* 431024 e *C. propinquum* 36063, onde foi possível observar alteração discreta na coloração da resazurina, nas concentrações 15,6 e 7,8 µg/mL, fazendo com que a concentração 31,2 µg/mL fosse considerada a menor que inibiu o crescimento dos microrganismos de forma satisfatória (Figura 6).

Figura 6 – Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato frente a isolados clínicos de *C. propinquum*.



Fonte: Própria autora (2023).

A avaliação da formação do biofilme por *Corynebacterium* resultou em: *C. propinquum* 421024 como produtora fraca e *C. propinquum* 36063 como produtora moderada. O teste de interferência no biofilme foi realizado apenas com a Concentração Inibitória Mínima (31,2 µg/mL) alcançada no teste anterior. Dessa forma, os resultados mostraram que em comparação com o controle houve uma redução na formação do biofilme de 22% para *C. propinquum* 421024, bem como redução no biofilme pré-formado de 27%. Com relação a *C. propinquum* 36063 houve redução de 48% na formação e 42% no biofilme pré-formado (Tabela 1).

Tabela 1 – Teste de biofilme, realizado em caldo MH, para avaliar a interferência do extrato na formação do biofilme e em biofilme pré-formado.

MICROORGANISMOS	INTERFERÊNCIA DO EXTRATO		
	CIM 31,2 µg/mL		
	Intensidade da produção de biofilme	Reduziu a formação do biofilme em %	Redução do biofilme pré-formado em %
<i>Corynebacterium propinquum</i> 421024	Produtor fraco	22%	27%
<i>Corynebacterium propinquum</i> 36063	Produtor moderado	48%	42%

Fonte: Própria autora (2023).

DISCUSSÃO

O gênero *Corynebacterium* compreende bacilos Gram positivos pleomórficos e aeróbicos. *C. diphtheriae* é a espécie mais bem relatada pela sua patogenicidade, sendo responsável por estabelecer a infecção conhecida por difteria, que acomete principalmente o trato respiratório superior, amígdalas e mucosas (Xu *et al.*, 2021). Entretanto, de acordo com o Ministério da Saúde, a introdução da vacina tríplice bacteriana (DTP) na década de 1930 reduziu expressivamente a prevalência da difteria no Brasil, sendo que a ocorrência de casos é rara quando a cobertura vacinal atinge o patamar de 80% (Peres *et al.*, 2021).

As demais espécies de *Corynebacterium*, por sua vez, são essencialmente microrganismos comensais. *C. propinquum* é um componente natural da pele e de membranas mucosas, dificilmente sendo associada a processos patológicos em pessoas imunocompetentes. No entanto, esta bactéria já foi isolada de pacientes em diversas situações clínicas, incluindo derrame pleural, endocardite valvar, bacteremia, rinossinusites, lesões cutâneas e abscessos (Bernard *et al.*, 2013).

Nesse contexto, estudos foram realizados para analisar a susceptibilidade de isolados de *Corynebacterium* não-diftéricas frente diversos antibióticos. A partir disso, foi constatado que a terapia medicamentosa contra estes microrganismos é limitada à vancomicina e à linezolida, demonstrando ainda que as espécies apresentaram susceptibilidade reduzida à penicilina, eritromicina e clindamicina, além de parte dos isolados terem apresentado resistência à daptomicina (Neemuchwala *et al.*, 2018). No entanto, nos casos de tratamento de abscessos mamários e mastites granulomatosa, causadas por *Corynebacterium* não-diftéricas, os antibióticos de primeira escolha são

doxiciclina, trimetoprima sulfametoxazol, claritromicina e rifampicina (Amalfa *et al.*, 2021).

Relatos recentes também demonstraram a rápida disseminação de linhagens de *C. striatum* e *C. jeikeium* resistentes a múltiplos antibióticos, sendo isoladas de sítios estéreis, dispositivos para cateterismo, pacientes com comprometimento imunológico ou que foram submetidos a procedimentos invasivos. Ademais, a hospitalização prolongada e o uso estendido de antibióticos de amplo espectro representam fatores risco para infecções por estes microrganismos (Milosavljevic *et al.*, 2021).

A resistência antimicrobiana é definida como a persistência ou progressão da infecção apesar da tentativa de tratamento medicamentoso, resultando frequentemente na falha da terapia. Diante deste cenário, a busca por novos produtos bioativos naturais com ação antibiótica demonstra-se importante como uma alternativa para o tratamento de infecções por *C. propinquum* resistentes, auxiliando a contornar as consequências da resistência bacteriana.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os metabólitos secundários (extrato) produzidos pelo actinomiceto endofítico apresentou potencial antibiótico frente a linhagens clínicas (nasofaringe) de *Corynebacterium propinquum*, patógeno raro descrito como causador de infecções em pacientes com envolvimento pulmonar, derrame pleural, bacteremia e endocardite e que apresenta uma emergente resistência antibiótica.

REFERÊNCIAS

AMALFA, F. *et al.* *Corynebacterium kroppenstedtii* y patología mamaria. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 55, n. 3, p. 357-60, 2021.

AMORIM, E. A. F. *et al.* Antimicrobial potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) isolated from a plant native to the Amazon against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers Microbiology**, 2020.

AYSWARIA, R. A.; VASU, V.; KRISHNA, R. Several endophytic species of *Streptomyces* with dynamic metabolites and their meritorious applications: a critical review. **Critical Reviews in Microbiology**, 2020.

BERNARD, K. *et al.* Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2146-2154, 2013.

BERNILLA, Mayra Soriano. Degradación de pesticidas por Actinomicetos. **UCV-SCIENTIA**, v. 2, n. 1, p. 34-37, 2010.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, 2017.

MANCUSO, G. *et al.* Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

MENDES, Luís Paulo Teixeira Moreira. **Avaliação da atividade antimicrobiana de antibióticos encapsulados em estruturas zeolíticas**. 2020. Dissertação. (Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química) – Universidade do Minho, Portugal, 2020.

MILOSAVLJEVIC, M. N. *et al.* Antimicrobial treatment of *Corynebacterium striatum* invasive infections: a systematic review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, p. e49, 2021.

NEEMUCHWALA, A. *et al.* In vitro antibiotic susceptibility pattern of non-diphtheriae *Corynebacterium* isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, 2018.

OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 2020.

PERES, K. C. *et al.* Vacinas no Brasil: análise histórica do registro sanitário e a disponibilização no Sistema de Saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 26, n. 11, 2021.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. *In*: Andrews, J. & Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**, 179-197, 1991.

QUINN, G. A. *et al.* *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of medical microbiology*, v. 69, n. 8, p. 1040, 2020.

SCHEFFLER, R. J. *et al.* Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 969-978, 2013.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SIVALINGAM, P. *et al.* Extreme environment *Streptomyces*: potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? **International Journal of Microbiology**, v. 2019, 2019.

TRISUWAN, K. *et al.* Epoxydons and a pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1323-1326, 2008.