
Potencial antimicrobiano de metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. isolados de solo impactado

Antimicrobial potential of secondary metabolites from *Streptomyces* sp. impacted soil isolates

Danyelle Cristina Pereira Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8402-9913>
Universidade Federal do Maranhão, Brasil
E-mail: Danyellesantosbiomed@gmail.com

Suelem dos Santos Amaral Gouveia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0431-101X>
Universidade CEUMA, Brasil
E-mail: suelemfarma@hotmail.com

Sthefany Lima Pires

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-4593-4065>
Universidade CEUMA, Brasil
E-mail: tk.pires03@gmail.com

Geovanna da Silva Pinho Belém

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7963-8454>
Universidade CEUMA, Brasil
E-mail: geovannabelem@gmail.com

Sarah Vieira Guimarães

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0817-1328>
Universidade CEUMA, Brasil
E-mail: sarahvieira230@gmail.com

Sielys dos Santos Amaral

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3135-165X>
Universidade CEUMA, Brasil
E-mail: eng.ambientalsielys@hotmail.com

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

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

RESUMO

Esse trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários de *Streptomyces* isolados do solo de lixão da cidade de Apicum-Açu, estado do Maranhão, Brasil. Para isso, duas cepas de *Streptomyces* sp., denominadas SLA1 e SLA3, foram isolados através da técnica de diluições seriadas e identificadas a nível de gênero pela técnica de microcultivo. Induziu-se as cepas a produzirem metabólitos secundários por fermentação submersa e testou-se atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* ATCC 14053, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35219, por meio de ágar difusão e de microdiluição para Concentração Inibitória Mínima (CIM). Observou-se atividade antimicrobiana do extrato da cepa SLA3 pela formação de halos de inibição de 17 mm e 28 mm contra *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, com CIM de 1.000 ug/mL para ambos. O extrato de SLA1 não apresentou atividade. Os metabólitos secundários do isolado SLA3 de *Streptomyces* sp. do solo impactado apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *S. aureus*, possibilitando mais estudos para ampliar seu espectro de ação e para formular antimicrobianos contra essas espécies.

Palavras-chave: Anti-infecciosos; Actinobacteria; Bioprospecção.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the antimicrobial potential of secondary metabolites of *Streptomyces* isolated from landfill soil in the city of Apicum-Açu, state of Maranhão, Brazil. For this, two strains of *Streptomyces* sp., called SLA1 and SLA3, were isolated using the serial dilution technique and identified to the genus level using the microculture technique. The strains were induced to produce secondary metabolites by submerged fermentation and antimicrobial activity was tested against *Candida albicans* ATCC 14053, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35219, using agar diffusion and microdilution for Inhibitory Concentration Minimum (MIC). Antimicrobial activity was observed only from the SLA3 strain extract due to the formation of inhibition halos of 17 mm and 28 mm against *C. albicans* and *S. aureus*, respectively, with MIC of 1,000 ug/mL for both. The SLA1 extract showed no activity. The secondary metabolites of the SLA3 isolate from *Streptomyces* sp. of the impacted soil showed antimicrobial activity against *C. albicans* and *S. aureus*, enabling further studies to expand its spectrum of action and to formulate antimicrobials against these species.

Keywords: Anti-infective Agents; Actinobacteria; Bioprospecting.

INTRODUÇÃO

Os lixões são definidos como ambientes abertos com livre descargas de resíduos sólidos, sem qualquer critério de proteção ecológica e à saúde pública. O depósito desses resíduos aumenta o risco de dano ambiental e contaminação do solo, o que afeta no equilíbrio ecológicos dos componentes desse solo impactado, como é o caso da microbiota residente. Esses microrganismos, diante de situações adversas, são capazes de promover atividades metabólicas que visam reestabelecer o funcionamento sustentável do ecossistema do solo (Leal *et al.*, 2021).

Muitos microrganismos podem ser encontrados no solo impactados de lixões. Dentre eles, o grupo dos actinomicetos são bactérias Gram-positivas, que possuem alta relação de guanina e citosina em seu genoma. Estando dispersos de forma ubíqua na natureza, em especial no solo, os actinomicetos desempenham diferentes funções para o equilíbrio do ecossistema ao qual estão associados, como a promoção do crescimento de plantas, a fertilização do solo, por serem agentes de controle biológico, entre outros aspectos (Ataíde *et al.*, 2020).

Dentre os microrganismos que compõem esse grupo, o gênero *Streptomyces* spp. está entre as espécies mais abundantes dos actinomicetos, se caracterizando por formar estrutura filamentosa semelhante a fungos. Seu papel na natureza e o interesse da indústria biotecnológica no gênero derivam da produção metabólitos secundários com bioatividades importantes, tal como controle antimicrobiano, ação antioxidante e catabolização de matéria orgânica do solo (Tyc *et al.*, 2017; Amorim *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2023).

É de conhecimento que dois terços dos antibióticos naturais produzidos no mundo são derivados de actinomicetos, estimando-se que 75% deles são do gênero *Streptomyces*, com mais de 7.600 bioativos conhecidos. No solo, principalmente em situações adversas, *Streptomyces* sp. são capazes de produzir metabólitos que auxiliam no controle de patógenos invasores e oportunistas, influenciando no desenvolvimento de pesquisas que visam encontrar novos compostos a partir do isolamento de espécies pertencentes a esse meio (Kumari *et al.*, 2017; Rosa *et al.*, 2023; de Azevedo *et al.*, 2024).

Sabe-se que a taxa de resistência dos microrganismos aos antimicrobianos vem aumentado em números alarmantes (Serra Valdés, 2017). Dessa forma, é visível a crescente interesse na produção de novos compostos naturais produzidos por espécies

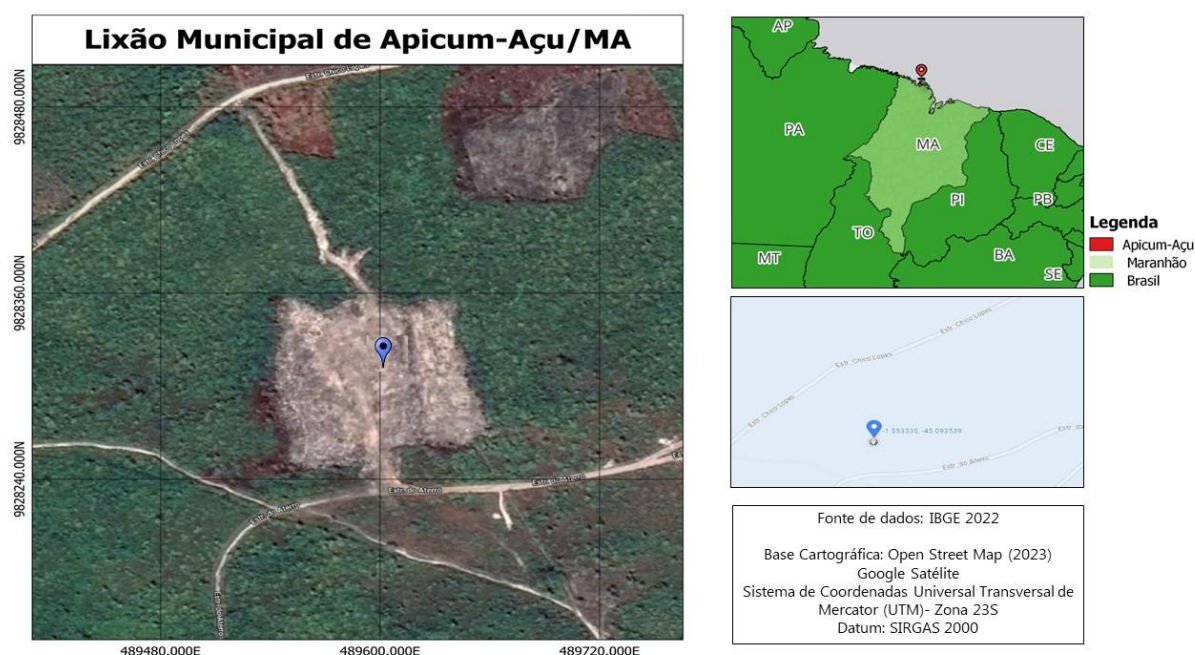
com potencial para contornar a problemática de microrganismos resistentes. Diante disso, esse trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. isolados do solo impactado de um lixão da região do município de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

Coleta de amostra de solo

Para o isolamento de microrganismos, foi utilizado um solo impactado coletado de forma randômica em dez pontos distintos de um lixão localizado no município de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil (Latitude: 1° 34' 37" Sul; Longitude: 45° 4' 46" Oeste) (Figura 1).

Figura 1: Mapa dos pontos de coleta de solo do lixão localizado no município de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Fonte: Autores (2023)

Isolamento de microrganismos do solo

Para o isolamento de *Streptomyces* sp., foi realizada a técnica de diluição seriada decimal, segundo Clark (1985). Preparou-se uma suspensão composta por 10 g de amostra de solo impactado diluída em 90 ml de solução salina (0,9%), sendo

homogeneizado por 5 minutos. Uma alíquota de 1 ml da suspensão foi retirada para diluição seriada em tubos com 9 ml de salina (0,9%), seguindo fatores de diluição decimal até 10^{-5} . Semeou-se, em duplicata, 100 μ l das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) contendo Anfotericina B, para impedir o crescimento de isolados fúngicos. As amostras foram incubadas em estufa por 28°C por 7 dias. Após esse período, colônias sugestivas de gênero *Streptomyces* sp. foram semeadas em meio BDA e incubadas por mais 7 dias a 28°C.

Microcultivo e identificação de *Streptomyces* sp.

Para a identificação clássica dos isolados de *Streptomyces* sp., foi realizado a técnica de microcultivo, na qual os microrganismos isolados e purificados foram inoculados em meio BDA, para favorecer o crescimento radial. Uma lamínula foi parcialmente inserida no meio de cultura, em ângulo de 45°, de forma a facilitar o crescimento de hifas em sua superfície. Os isolados foram incubados em estufa a 28°C durante 7 dias (Shiling; Gottlieb, 1966). Após esse período, as lamínulas foram dispostas em lâminas contendo o corante azul de algodão, para observação das estruturas bacterianas filamentosas, como conidiósporos, hifas, cadeias de esporos e conídios. A técnica permite confirmar, a nível de gênero, as características macroscópicas e estruturas morfológicas microscópicas de *Streptomyces* sp., adotando os critérios de descrição morfológica do gênero de Rapper e Fennel (1965), Shiling e Gottlieb (1966), e Madigan *et al.* (2016).

Fermentação submersa e extração de metabólitos secundários

Para obtenção do metabólito ativo produzido pelos microrganismos isolados, a fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de volume útil de meio Batata Dextrose (BD) suplementado com glicose (2%), juntamente com 5 blocos de meio BDA semeado com *Streptomyces* sp. Os frascos foram incubados em uma incubadora rotativa a 30°C por 20 dias.

Para obtenção dos metabólitos de interesse, a extração líquido-líquido foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Trisuwan *et al.* (2008). Após o período de incubação, o meio fermentado foi filtrado com auxílio de papel filtro. Para

extrair os compostos, alíquotas de meio filtrado e acetato de etila foram adicionados em um funil de separação, em proporção 1:1, sendo agitados vigorosamente por 10 minutos e colocados em repouso por 30 minutos. Ao fim da decantação, a fase orgânica contendo os metabólitos foi coletada e o solvente foi evaporado em um rotaevaporador, determinando-se o peso seco para verificar o rendimento do produto. Para a avaliação das atividades biológicas, os metabólitos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido 1% (DMSO), para atingir uma concentração conhecida de 10.000 µg/ml. Os metabólitos foram centrifugados (10 minutos a 2500 rpm) e filtrados em microfiltro (22 µm), garantindo a remoção de qualquer resquício de células microbianas.

Isolados para o teste de potencial antimicrobiano

Para os testes de potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários dos isolados de *Streptomyces* sp., foram utilizados os seguintes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 14053, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35219, disponíveis no banco de cultura da Universidade CEUMA.

Ensaio de ágar difusão

O ensaio de ágar difusão em poços foi realizado de acordo com a técnica preconizada por Bauer *et al.* (1966). Os metabólitos secundários dos isolados de *Streptomyces* sp. foram diluídos em DMSO (1%) para uma concentração de trabalho de 1.000 µg/ml. Os microrganismos patogênicos foram padronizados seguindo a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Posteriormente, foram semeados nos meios Mueller-Hinton (MH) ágar, para as espécies bacterianas, e Sabouraud (SAB) ágar, para a espécie fúngica. Os meios de culturas foram perfurados em poços de 5 mm, sendo preenchidos com 100 µl de metabólitos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. O teste foi realizado em triplicata. Para o controle positivo, foram utilizados cloranfenicol (30 µg) para bactérias e fluconazol (1.000 µg/ml) para fungo. A avaliação da atividade antimicrobiana foi determinada pela observação da formação de halos de inibição, sendo medidos os diâmetros dos halos e comparados com a escala padrão segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por meio do ensaio de microdiluição (1:2) em microplaca de 96 poços (Zgoda; Porter, 2001). Foi realizado uma diluição seriada (1:2) de 100 µl dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. em 100 µl de meio líquido de MH e SAB, para o teste em espécies bacterianas e espécie fúngica, respectivamente, com concentração inicial de 1.000 µg/ml. Para o ensaio com as cepas bacterianas, os inóculos foram padronizados seguindo a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UCF/mL), sendo semeado uma alíquota de 10 µl nos poços do ensaio. A espécie fúngica foi padronizada também seguindo a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UCF/mL), com posterior diluição de 1:50 e 1:20 em meio SAB ($1,5 \times 10^3$ UFC/ml), adicionando-se 100 µl do inóculo nos poços. O controle positivo consistiu em cloranfenicol (30 µg) para bactérias e fluconazol (1.000 µg/ml) para fungo. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata para cada extrato. As leituras para determinar a CIM dos extratos foi realizada por método visual da menor concentração inibitória para os isolados do teste, além da classificação de inibição de 100, 80 ou 50% para a espécie fúngica. Para confirmação da CIM, 30 µl de resazurina (0,1%) foram adicionados nos poços, com posterior incubação por mais 24 horas a 37°C, sendo a alteração da coloração roxa para rosa indicativo de crescimento microbiano.

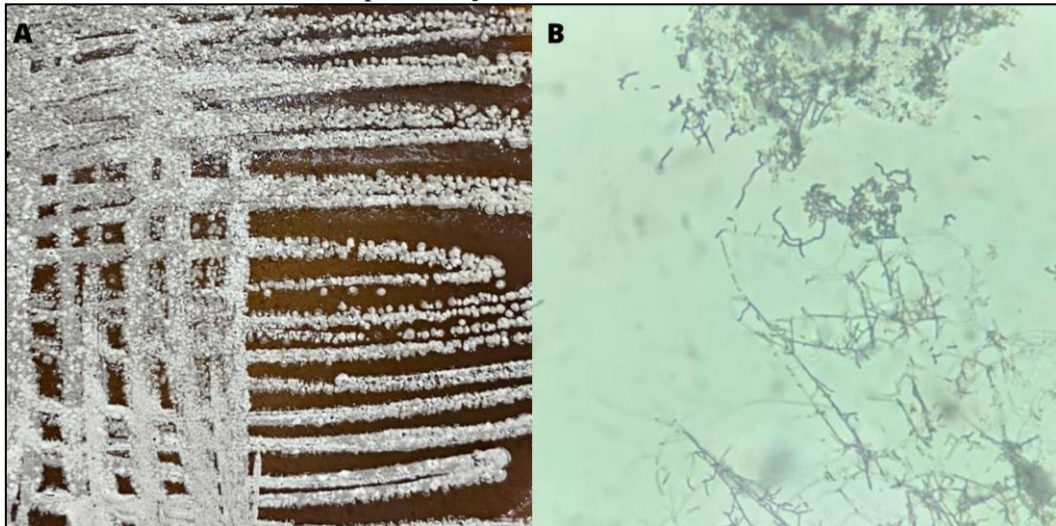
RESULTADO E DISCUSSÃO

A composição do solo abrange uma microbiota diversificada, que atua de forma dinâmica para manter o equilíbrio ecossistêmico, sustentabilidade biológica e disponibilidade de nutrientes aos vegetais. Dentre estes microrganismos, há um predomínio da ordem *Actinomycetales*, principalmente do gênero *Streptomyces*, presentes em variados tipos de solo, principalmente impactados/contaminados. Esses microrganismos são induzidos a se adaptarem pela da produção de substâncias e formação de estruturas importantes para a sobrevivência nesses ambientes (Ataíde *et al.*, 2020).

Com a técnica de isolamento, foram obtidas duas cepas provenientes da amostra do solo impactado, crescidas nas diluições 10^{-3} e 10^{-4} , sendo denominadas de SLA1 e

SLA3. Para identificação a nível de gênero, foram observadas as características macro e micromorfológicas dos isolados. O isolado SLA1, identificado como *Streptomyces* sp., apresentou colônias esbranquiçadas, com presença de micélio aéreo e produção de pigmento escuro (melanina) secretado no meio (Figura 1A), com crescimento filamentososo e organização das cadeias de esporos em forma de espirais (Figura 1B).

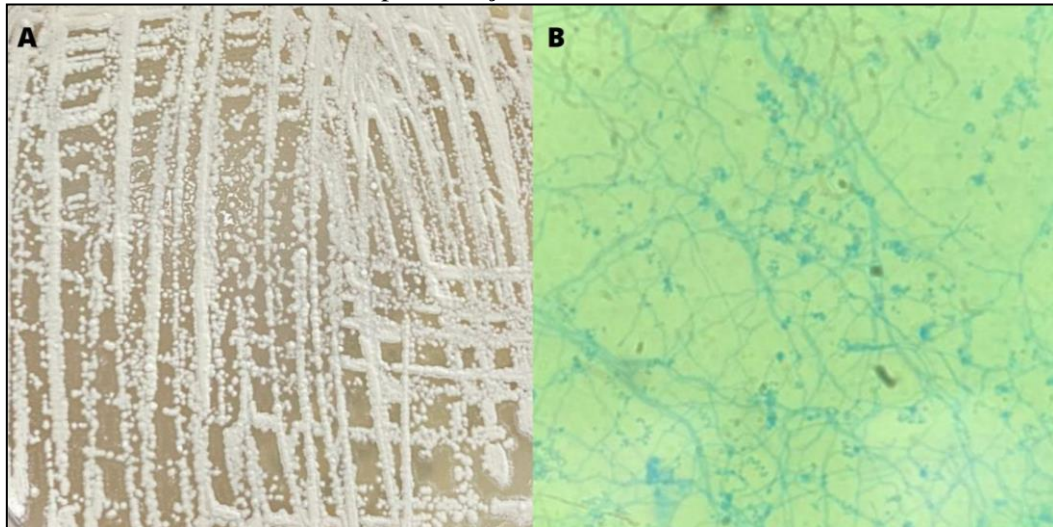
Figura 2: Análise macro e microscópica de SLA1 (*Streptomyces* sp.) isolado solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Fonte: Autores (2023)

A cepa SLA3, também identificado como pertencentes ao gênero *Streptomyces*, apresentou crescimento de colônias esbranquiçadas, com presença de micélio aéreo, sem liberação de pigmento no meio (Figura 2A), apresentando emaranhado de hifas e esporos em cadeias (Figura 2B).

Figura 3: Análise macro e microscópica do SLA3 (*Streptomyces* sp.) isolados do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil.



Fonte: Autores (2023)

As diferentes morfologias encontradas nesse estudo corroborado com Madigan *et al.* (2016), os quais relatam que o gênero *Streptomyces* apresenta-se em diferentes formas, arranjos de filamentos, esporos e pigmentação de conídios, auxiliando, assim, em uma diferenciação presuntiva das espécies isoladas e permitindo melhor compreensão das bioatividades divergentes para cada extrato produzido.

As espécies de *Streptomyces* spp., pertencentes a família *Streptomycetaceae*, são um gênero bastante estudado por apresentarem uma capacidade metabólica variada, como produção de sistemas enzimáticos e a síntese de substâncias com potencial de antagonizar o crescimento de outros microrganismos. O metabolismo do gênero pode ser classificado em primário e secundário, sendo este último não associado diretamente a reprodução, desenvolvimento ou crescimento do microrganismo, podendo, contudo, conferir vantagens para a sobrevivência ambiental (Tyc *et al.*, 2017).

Essas características são responsáveis pela produção de aproximadamente 80% dos antibióticos naturais produzidos na atualidade, a exemplo os aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, beta lactâmicos, entre outros. No entanto, novos estudos apontam que novas substâncias e compostos derivados do metabolismo secundário de *Streptomyces* sp. ainda podem ser isolados para atividades farmacológicas, como a antimicrobiana (Kumari *et al.*, 2017).

As espécies do gênero *Streptomyces* sp. apresentam cerca de 7.600 metabólitos produzidos por actinomicetos, sendo os representantes mais conhecidos deste gênero: *Streptomyces griseus* (estreptomicina), *Streptomyces aureofaciens* (tetraciclina), *Streptomyces noursei* (nistatina), *Streptomyces avermitilis* (ivermectina), *Streptomyces*

clavuligerus (ácido clavulânico), *Streptomyces peucetius* (antraciclina) e *Streptomyces nodosus* (anfotericina B) (Silva, 2014; Kumari *et al.*, 2017).

Diante disso, observa-se a importância da verificação das atividades antimicrobianas dos metabólitos secundários de *Streptomyces* spp. isolados nesse estudo. Foram realizados os testes de ágar difusão e microdiluição em poços, os quais apresentaram resultados divergentes para os extratos de SLA1 e SLA3.

No teste de ágar difusão, observou-se que a cepa SLA1 de *Streptomyces* sp. não apresentou zonas de inibição contra as ATCCs dos patógenos analisados, sendo a falta de atividade antimicrobiana confirmada pelo teste de microdiluição. No entanto, a cepa SLA3 apresentou halos de inibição de, em média, 17 mm e 28 mm contra *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, com CIM de 1.000 µg/mL para ambos (Tabela 1).

Tabela 1: Avaliação antimicrobiana de extratos de metabólitos secundários de isolados de *Streptomyces* spp. provenientes do solo do lixão de Apicum-Açu, Maranhão, Brasil

Microrganismos avaliados	Extratos de metabólitos secundários			
	SLA1		SLA3	
	Ágar Difusão	Microdiluição	Ágar Difusão	Microdiluição
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	ND	ND	17 mm	1.000 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	ND	ND	28 mm	1.000 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	ND	ND	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35219	ND	ND	ND	ND

ND – Não definido

Fonte: Autores (2023)

Diversos fungos, como *C. albicans*, podem ser causadores de infecções oportunistas, além de estarem associados a formação de biofilme, o que potencializa as infecções, tornando-se um grande problema de saúde pública, uma vez que este fungo representa cerca de 75% da microbiota humana, principalmente das cavidades oral e vaginal (Abdella *et al.*, 2023). Da mesma forma, estudos relatam a resistência de *S. aureus* a diversos antibióticos, como os aminoglicosídeos, glicopeptídeos e algumas quinolonas, se tornando preocupante o aumento da resistência desse patógeno, principalmente por estar associado a diversos quadros infecciosos (Ragbetlia *et al.*, 2016).

Esses fatos impulsionaram a busca por novos compostos antimicrobianos contra esses patógenos. Diversos estudos apontam a atividade antimicrobiana de metabólitos de *Streptomyces* spp. contra *C. albicans* e *S. aureus*. Em pesquisa realizada por Lin *et al.*, (2021), os dados demonstraram potencial de inibição da actinomicina D isolada de *Streptomyces parvulus* contra *S. aureus*, apresentando uma CIM de 2 mg/mL, e tendo um efeito significativo. Elabbasy *et al.*, (2021) realizou isolamento de *Streptomyces canescens* a partir de amostras de mangue no Egito, no qual detectou-se atividade

antifúngica contra *C. albicans*, podendo esta ação estar relacionada também a produção de enzimas extracelulares. Além disso, Tuntiwachwuttikul (2008) realizou uma pesquisa, na qual obteve quatro novos compostos a partir de *Streptomyces* sp., *lansai A-D*, identificando-as estruturalmente, apresentando o potencial das atividades antifúngicas e anticancerígenas, e relatando esse gênero como promissor e com alta capacidade de produzir actinomicinas biologicamente ativas.

Embora os extratos trabalhados nesta pesquisa não tenham apresentado resultados contra todos os patógenos testados, a bioatividade do extrato de SLA3 contra *C. albicans* e *S. aureus* abre o leque de possibilidade para estudos mais aprofundados sobre a atividade contra essas espécies, podendo direcionar a novas alternativas de controle contra cepas resistentes.

CONCLUSÃO

O extrato dos metabólitos secundários do isolado SLA3 de *Streptomyces* sp. do solo impactado do lixão de Apicum-Açu (MA) apresentou atividade antimicrobiana contra os isolados de *C. albicans* e *S. aureus*. Diante desses resultados, é demonstrado a viabilidade de estudos mais aprofundados com o objetivo de melhor caracterizar a atividade antimicrobiana desses extratos, identificar os compostos com bioatividade e ampliar seu espectro de ação, para a formulação de antimicrobianos contra essas espécies.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade CEUMA, a Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) por oferecerem o apoio necessário para a realização desse projeto.

REFERÊNCIAS

- ABDELLA, B. et al. Identification of potent anti-*Candida* metabolites produced by the soft coral associated *Streptomyces* sp. HC14 using chemoinformatics. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 12564, 2023.
- AMORIM, E.A.d.F.; et al. Antimicrobial Potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) isolated from a plant native to the Amazon against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microb.* 2020, 11, 574693
- ATAÍDE, C. B. et al. Atividade e população microbiana do solo em função do sistema de cultivo. **Caderno de Agroecologia**, v. 15, n. 2, 2020.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2413-2415, 1966.
- CLARK, E. H. II. The off-site costs of soil erosion. **J Soil Water Conserv**, v. 40, p. 19-22, 1985.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 29^a ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- ELABBASY, E. G. et al. Antifungal activity of *Streptomyces canescens* MH7 isolated from mangrove sediment Against some dermatophytes. **Journal of Scientific Research in Science**, v. 38, n. part 2 (Biological Sciences), p. 36-59, 2021.
- KUMARI, K. S. et al. Isolation of antibiotic producing actinomycetes from untapped soils of Yarada hills and assessment of their antimicrobial activities. **IJSRET**, v. 3, n. 2, p. 290-293, 2017.
- LEAL, M. L. A. et al. Efeito dos sistemas de manejo e do uso do solo na população de microrganismos do solo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e21910917966-e21910917966, 2021.
- LIN, Y. et al. Multi-Omics Analysis Reveals Anti-*Staphylococcus aureus* Activity of Actinomycin D Originating from *Streptomyces parvulus*. **Inr J Mol Sci**, v. 22, n. 22, p. 12231, 2021.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.
- RAGBETLI, C. et al. Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by Years. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2016, 2016.
- RAPPER, K. B.; FENNELL, I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965.
- ROSA, F.C. et al.; Bioprospecting of secondary metabolites produced by endophytic actinomycete isolated from *Aloe vera*. *Concilium* 2023, 23, 227–239.

ROSA, F.C. et al.; Importance of secondary metabolites produced by actinobacteria. *Rev. Ciências Saúde CEUMA* 2023, 1, 72–87.

SERRA VALDÉS, M. A. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**, v. 16, n. 3, p. 402-419, 2017.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species1. **Int. J. Sys. Evol. Microbiol.** v. 16, p. 313–340, 1966.

SILVA, A. L. S. Otimização do processo fermentativo para produção do antibiótico nigericina por *Streptomyces*. 2014. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP**. Ribeirão Preto, 2014.

TRISUWAN, K. et al. Epoxydanes and pyrone from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1323-126, 2008.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P. et al. Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. **Tetrahedron**, v. 64, n. 32, p. 7583–7586. 2008.

TYC, O. et al. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in microbiology**, v. 25, n. 4, p. 280-292, 2017.

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