



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
AMAZONAS
CAMPUS MANAUS ZONA LESTE
DEPARTAMENTO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LUIS FELYPE GARCIA DE SOUSA CALDAS

**MINERAÇÃO GENÔMICA DE *Streptomyces Mad 24* ISOLADO DE SEDIMENTOS
DE RIOS AMAZÔNICOS PARA BIOCOMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA ANTE MICRORGANISMOS VETERINÁRIOS**

**MANAUS-AM
2022**

LUIS FELYPE GARCIA DE SOUSA CALDAS

**MINERAÇÃO GENÔMICA DE *Streptomyces Mad 24* ISOLADO DE SEDIMENTOS
DE RIOS AMAZÔNICOS PARA BIOCOMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA ANTE MICRORGANISMOS VETERINÁRIOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária do Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia do
Amazonas (IFAM), como requisito parcial
para obtenção do Grau Bacharelado em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Edson Francisco do
Espírito Santo

**MANAUS - AM
2022**



A Catalogação na Publicação (CIP) segue a Descrição Bibliográfica Internacional Normalizada (ISBD)

C145m

Caldas, Luis Felype Garcia de Sousa

Mineração Genômica *Streptomyces* Mad 24 isolado de sedimentos de rios Amazônicos para biocompostos com atividade antimicrobiana antimicroorganismos veterinários/ Luis Felype Garcia de Sousa Caldas. 2022

36 f.:il.; 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC - Graduação – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2022.

Orientadora: Prof. (a) Edson Francisco do Espírito Santo.

1. Metabólicos secundários 2. Mineração de genomas 3. Resistência antimicrobiana I. Espírito Santo, Edson Francisco do. II. Título.

CDD – 636.1089

LUIS FELYPE GARCIA DE SOUSA CALDAS

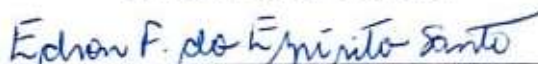
**MINERAÇÃO GENÔMICA DE *Streptomyces* Mad 24 ISOLADO DE SEDIMENTOS
DE RIOS AMAZÔNICOS PARA BIOCOMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA ANTE MICRORGANISMOS VETERINÁRIOS**

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado e aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas.

Orientador: Prof. Dr. Edson Francisco do Espírito Santo

Aprovado em 17 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA



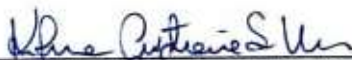
Prof. Dr. EDSON FRANCISCO DO ESPÍRITO SANTO

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)



DRA. CLAUDIA AFRAS DE QUEIROZ

Universidade Federal do Amazonas (UFAM)



PROF. DRA. KILMA CRISTIANE SILVA NEVES

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

MANAUS - AM
2022

Aos meus pais e minha irmã, pelo incentivo, sacrifício e apoio até aqui. Por acreditar nos meus sonhos, não importa quão malucos e inalcançáveis eles pareçam, me permitindo alcançar as estrelas.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Dalvanira Garcia de Sousa Caldas, minha primeira professora, que sempre me ensinou sobre os limites aos quais o conhecimento pode me levar. Ao meu pai, Antônio José Moreira Caldas, que sempre batalhou para me dar as melhores oportunidades na vida; à minha irmã, Lyvia dos Aflitos Garcia de Sousa Caldas, que apesar de todas as diferenças, atravessaria tudo por mim. A vocês agradeço a cada dia, não há distância que nos separa, saudades.

À minha tia, Maria Linda Caldas Rocha, por ser uma mãe. À minha prima, Waldileya Caldas Rocha, por tudo que fez e todo o apoio ao longo dos anos. À minha amiga Erika Poliana Valério Dantas, são muitos anos de amizade e companheirismo apesar de me colocar em muitas enrascadas. À Aydra Laini de Souza Ciríaco pela amizade ao longo destes cinco anos da graduação, foram altos e baixos até aqui, de apoio, amizade e companheirismo nesta aventura que foi o curso de Medicina Veterinária, sei que não chegaria aqui sem ti, te amo peste, saiba que você vale o mundo.

Agradeço à professora Waldireny Rocha Gomes, por tudo, principalmente por ser minha inspiração no mundo acadêmico e por sempre estar acessível quando precisei de ajuda, sendo paciente, amorosa e incrível. Ao professor Gilvan Ferreira da Silva, por estar disposto a abrir o laboratório de biologia molecular e me ensinar com paciência e disposição, um pouco do seu vasto conhecimento da área. Aos companheiros do laboratório de biologia molecular por terem me recebido como um dos seus.

Agradeço ainda aos professores Paulo Cesar de Azevedo Filho e Jomel Francisco dos Santos por terem me iniciado no mundo da pesquisa científica. E ao professor Edson Francisco do Espírito Santo, por ter aceitado a difícil missão de me orientar nesta etapa significativa da minha formação. Agradeço a todos de coração por tudo e os levo com carinho, nas etapas da vida que vierem.

“Eu não ligo para nada do que os outros exaltam ou condenam. Eu simplesmente sigo meus próprios sentimentos.”

Wolfgang Amadeus Mozart

RESUMO:

A resistência bacteriana é um problema que acomete não só a clínica veterinária, mas toda a cadeia de saúde pública, embora ela em conjunto com as demais áreas zootécnicas, tenha uma participação de grande importância nesta problemática. Atualmente, novas abordagens estão sendo realizadas para a obtenção de moléculas com ação antibiótica, que possam combater linhagens multirresistentes, entre elas a mineração genômica. Esta atua por meio de ferramentas de bioinformática e apresenta resultados *in silico* de um microrganismo ou um grupo de microrganismos. Na clínica veterinária, um dos grandes problemas é a otite bacteriana externa em cães, por isso isolados a partir desta enfermidade são um dos ótimos candidatos para a investigação de novos antibióticos, ainda mais quando pensamos que estes são comensais da pele do animal. Por isso, buscou-se avaliar o potencial biotecnológico com base na identificação de BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) do isolado de *Streptomyces* Mad 24 visando a produção de compostos antimicrobianos, por meio de ferramentas de bioinformática (*in silico*) e de Screening, Cross-Streak modificado, frente a patógenos isolados de cultura microbiológica de cão com otite externa em meio BHI (Brain Heart Infusion). Ao avaliar o genoma de uma linhagem de *Streptomyces* foi observada a presença de 14 clusters associados à produção de antimicrobianos, com similaridade entre 2% e 89%. E ao Screening antibacteriano da linhagem Mad24 contra os três isolados, observou uma taxa de inibição de 76,66%, 52,49% e 19,14%, o que demonstra um grande potencial de ação antimicrobiana da *Streptomyces* Mad 24. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a purificação e caracterização de compostos para identificação completa destas moléculas, tendo em vista que o Cross-Streak modificado é um teste de triagem para avaliar se há potencial antibiótico na linhagem bacteriana frente aos isolados.

Palavras-chave: Actinobactéria. Metabólitos secundários. Mineração de genomas. Otite Externa em Cães. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT:

Bacterial resistance is a problem that affects not only the veterinary clinic, but the entire public health chain, although it, together with other zootechnical areas, plays a very important role in this problem. Currently, new approaches are being carried out to obtain molecules with antibiotic action that can combat multidrug-resistant strains, including genomic mining. It works through bioinformatics tools and presents in silico results of a microorganism or a group of microorganisms. In the veterinary clinic, one of the major problems is bacterial otitis externa in dogs, so isolates from this disease are one of the great candidates for the investigation of new antibiotics, especially when we think that these are commensals of the animal's skin. Therefore, we sought to evaluate the biotechnological potential based on the identification of BGCs (Biosynthetic Gene Clusters) of the *Streptomyces* Mad 24 isolate aiming at the production of antimicrobial compounds, using bioinformatics tools (in silico) and Screening, Cross- Modified Streak against pathogens isolated from microbiological culture of dogs with otitis externa in BHI (Brain Heart Infusion) medium. When evaluating the genome of a strain of *Streptomyces*, the presence of 14 clusters associated with the production of antimicrobials was observed, with similarity between 2% and 89%. And the antibacterial screening of the Mad 24 strain against the three isolates, observed an inhibition rate of 76.66%, 52.49% and 19.14%, which demonstrates a great potential of antimicrobial action of *Streptomyces* Mad 24. However, they are Further studies on the purification and characterization of compounds are necessary for the complete identification of these molecules, considering that the modified Cross-Streak is a screening test to assess whether there is antibiotic potential in the bacterial strain against the isolates.

Keywords: Actinobacteria. Secondary Metabolites. Genome Mining. Otitis External in Dogs. Antimicrobial Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processamento amostras de cão com otite externa em meio BHI.....	24
Figura 2. Árvore filogenética da <i>Streptomyces griseofuscus</i> Mad 24 com base no genoma completo.....	27
Figura 3. Screening das margens de inibição dos isolados com a linhagem Mad 24.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Clusters biossintéticos e moléculas antibióticas do antiSMASH.....	28
Tabela 2. Avaliação de antibiose da Mad 24 frente aos isolados veterinários de um cão com otite externa.....	30

LISTA DE ABREVIações

antiSMASH	– Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell
BGC	– Biosynthetic gene cluster
BHI	– Brain Heart Infusion
BLAST	– Basic Local Alignment Search Tool
Cluster	– Agrupamento
Embrapa	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IFAM-CMZL	– Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas Campus Manaus Zona Leste
ISP2	– Yeast Malt Agar (International Streptomyces Project-2 Medium (ISP-2)
MIBiG	– Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster
NRPS	– Nonribosomal peptide-synthetase
PAAE	– Porcentagem de Atividade Antibiótica Específica da Área
PCR	– Polymerase Chain Reaction
PKS	– Polyketide synthase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 PRODUTOS NATURAIS	18
4.2 ACTINOBACTÉRIAS	18
4.2.1 <i>Streptomyces</i>	19
4.2.1.1 Metabólitos secundários	19
4.2.1.2 <i>Streptomyces</i> como fonte de antibióticos	20
4.2.2 Mineração Genômica	21
4.2.3 Softwares de Bioprospecção <i>in silico</i>	22
4.3 OTITE BACTERIANA EM CÃES	22
5 MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 REATIVAÇÃO DA LINHAGEM Mad 24	24
5.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO DE AMOSTRA ORIUNDA DE CÃO COM OTITE	24
5.3 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA <i>Streptomyces</i> Mad 24	24
5.4 MINERAÇÃO GENÔMICA DO ISOLADO <i>Streptomyces</i> Mad 24 PARA MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA ANTE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO	25
5.5 ANÁLISES DE ANTIBIOSE DOS ISOLADOS FRENTE AOS MICRORGANISMOS VETERINÁRIOS	25
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO DE AMOSTRA ORIUNDA DE CÃO COM OTITE	27
6.2 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA <i>Streptomyces</i> Mad 24	27
6.3 MINERAÇÃO GENÔMICA DO ISOLADO <i>Streptomyces</i> Mad 24 PARA MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO	27

6.4 ANÁLISES DE ANTIBIOSE DOS ISOLADO FRENTE AOS MICRORGANISMOS VETERINÁRIO	29
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos revolucionou a medicina humana e veterinária, e muitas enfermidades que assolavam a humanidade e os animais tornaram-se um problema menor devido ao fato dessas patologias se encontrarem controladas. Ou seja, a descoberta da penicilina em conjunto com a teoria da doença microbiana e o uso massivo na Segunda Guerra Mundial, colocaram a percepção das doenças infecciosas e seu enfrentamento em um novo patamar (SILVA, 2020).

A somatória de todos os fatores que ocorreram na metade do século XX, levou a explosão de descobertas de uma vasta gama de antibióticos. Este período de ouro permitiu o controle de inúmeras doenças infecciosas. Entretanto, a produção e uso destes em larga escala, trouxeram consigo uma problemática que aos poucos foi aparecendo, a resistência antimicrobiana, a qual se refere à baixa efetividade ou até mesmo inatividade de um antibiótico a um microrganismo patogênico (VENTOLA, 2015).

As áreas veterinárias e zootécnicas tiveram grande participação na problemática da resistência aos antibióticos, seja pelo uso no agronegócio, ou pelo tratamento médico veterinário ineficiente, devido ao emprego indiscriminado de antibióticos com apenas um diagnóstico presuntivo, com destaque para a baixa adesão de exames complementares que auxiliam no diagnóstico. Além do uso terapêutico, há ainda as utilizações nas formas metafilática, profilática, e como promotora de crescimento, as quais contribuíram na disseminação e pressão seletiva destes patógenos resistentes. Cabe ainda o descarte inadequado de medicamentos vencidos, associado aos antibióticos de uso veterinário serem os mesmos empregados na medicina humana, situação que se apresenta como problema em termos de saúde pública (O'NEILL, 2016; GOTTARDO et al., 2021).

Devido à facilidade dos microrganismos se adaptarem a diversos ambientes, permitiu-se assim: o transporte para laboratório e o cultivo fácil e rápido em escala industrial; a grande variedade de reações permitidas, bem como da sua manipulação genética e capacidade de biossíntese ímpar e específica, todas sendo características que justificam sua grande aplicação biotecnológica (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

A química de produtos naturais a partir de microrganismos é uma das principais estratégias na obtenção e desenvolvimento de moléculas novas que apresentem

potencial antimicrobiano, com inúmeros trabalhos que abordam o alto potencial do emprego destes na obtenção de compostos de interesse farmacológico. Dentre estes microrganismos, o gênero *Streptomyces*, é uma das principais fontes de produção da ampla gama de bioprodutos com atividade biológica industrial, médica e veterinária, bem como todo o seu filo, o das Actinobacterias (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; MIAO; DAVIES, 2010). Os microrganismos presentes neste filo ainda são uma fonte para novos antibióticos, com uma produção de cerca de 80% dos antibióticos utilizados atualmente, destacando-se novamente o gênero *Streptomyces* (LO GRASSO; MARTINO; ALDUINA, 2016).

O Brasil é tido como um dos maiores países com biodiversidade do planeta, abrigando 20% de espécies da fauna e flora conhecidas pela humanidade. Possui uma enorme diversidade de biomas, os quais são alvos de pesquisas com interesse de bioprospecção de microrganismos produtores de moléculas bioativas em solos Amazônicos devido à grande diversidade de plantas e ecótonos com sua complexidade ainda pouco compreendida. Tal situação eleva as chances de se encontrar novos fármacos, como os antimicrobianos (OLIVEIRA, 2018).

Diversas metodologias têm sido adotadas como meios de cultivo e co-culturas, bem como a aplicação das novas tecnologias, como o sequenciamento genético no estudo da obtenção de metabólitos secundários a partir de microrganismos (TRAN et al., 2019). Vários estudos apontam a existência de genes envolvidos na produção destes metabólitos, no qual por muitas vezes se encontram silenciados, o que permite uma nova gama de antibióticos que podem ser descobertos com o uso destas novas tecnologias (SENGES et al., 2018; HOSHINO; ONAKA; ABE, 2019). O uso da ferramenta de bioinformática antiSMASH na grande quantidade de dados oriundos do sequenciamento genético (MEDEMA et al., 2011) auxiliou na descrição dos clusters gênicos biossintéticos (BGC's) envolvidos na síntese de metabólitos secundários. Adicionalmente, o emprego de métodos analíticos como cromatografia (quando esta é associada à espectrometria de massas de alta resolução), permite elucidar quantitativamente e qualitativamente os produtos naturais obtidos destes clusters, em especial os antimicrobianos (MOHIMANI et al., 2014).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de compostos com atividade antimicrobiana, por meio da anotação e predição quanto à produção de metabólitos secundários *in silico*, a partir de duas linhagens isoladas nos sedimentos dos rios amazônicos.

2 JUSTIFICATIVA

Com a grande problemática da resistência antimicrobiana, a qual pode ter impactos diretos na saúde pública, se faz necessária a utilização de novas tecnologias para a obtenção de produtos com ação antimicrobiana e que possam ser empregados na medicina veterinária e humana. Dessa forma, a adoção de tecnologias genômicas e metagenômicas são uma nova arma a serem empregadas nas vastas áreas de interesse médico veterinário, de forma a baratear os fármacos de uso veterinário, bem como aumentar a gama de medicamentos que tenham uso na agropecuária.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico com base na identificação de agrupamentos de genes biossintéticos (Byosintetic Gene Cluster – BGC's) do isolado de *Streptomyces* Mad 24 visando a produção de compostos antimicrobianos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar microrganismos a partir de amostra de cão com otite;
- Identificar filogeneticamente a *Streptomyces* Mad 24;
- Realizar Mineração genômica do isolado *Streptomyces* Mad 24 para moléculas com ação antimicrobiana;
- Realizar análises de antibiose da *Streptomyces* Mad 24 frente aos microrganismos veterinários.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. PRODUTOS NATURAIS

As aplicações de produtos naturais são as mais diversificadas, datadas aos primórdios da medicina, e atualmente estes são utilizados como fontes para o desenvolvimento de novos fármacos (LOURENZON, 2021). A capacidade de produzir bioativos de interesse econômico e farmacêutico tem sido muito estudada, seja esta produção de forma direta ou pela interação simbiote entre microrganismos e hospedeiro (NEWMAN; CRAGG, 2020; LOURENZON, 2021).

Os bioativos são substâncias químicas que podem ter efeitos terapêuticos ou tóxicos, formados por razões fisiológicas interligadas ao ambiente em que o microrganismo está inserido (tipo de solo, ação do ar, disponibilidade de água, entre outros). Em função destas circunstâncias, os microrganismos são forçados a desenvolver estratégias de sobrevivência e adaptação (CONTI et al., 2012).

Em razão da interação desses microrganismos a um hospedeiro, desenvolve-se uma relação simbiote na qual seus compostos bioativos (metabólitos secundários) têm função benéfica ao hospedeiro, enquanto este fornece um ambiente propício para sua sobrevivência. São essas interações que servem de fontes promissoras para bioprospecção de novas moléculas de interesse (CONTI et al., 2012; LOURENZON, 2021).

4.2. ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias, também conhecidas como actinomicetos, são bactérias gram-positivas que possuem um crescimento filamentoso similar aos fungos, e que graças a isso, foram por muito tempo classificadas como intermediárias pertencentes ao reino Fungi. São reconhecidas como um dos filos mais importantes dentro da biotecnologia, por sua capacidade de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários com inúmeras aplicações clínicas e agrárias (CONTI et al., 2012; SILVA, 2016; SILVA, 2020; LOURENZON, 2021).

Os actinomicetos são em sua maioria aeróbios estritos e que apresentam elevado conteúdo de citosina e guanina em seu material genético. Grande parte destes microrganismos são mesófilos, apresentando crescimento em temperaturas de

25 °C e 30 °C, e em pH entre 6 até 9. Essas bactérias têm seu potencial estimulado como forma de se adaptar ao meio contra predação e competição. Dentro do filo dos actinomicetos pode-se destacar a produção de metabólitos secundários pelo gênero *Streptomyces* spp., que representa cerca de 75% de bioativos de interesse dentre as actinobactérias (SILVA, 2016; SILVA, 2020; LOURENZON, 2021).

4.2.1. *Streptomyces* spp.

O gênero *Streptomyces* possui o maior número de espécies descritas na família e tem sido o mais estudado. Apresenta as características gerais aos actinomicetos, e possuem crescimento lento com uma grande diversidade em morfologia, ecologia e patogenicidade. São encontradas principalmente no solo realizando atividade saprófita (SILVA, 2016; LOURENZON, 2021).

Devido ao extenso estudo realizado ao longo das décadas nas linhagens isoladas de solo, ocorreu uma diminuição de achados de novos bioativos, fazendo-se a necessidade de se explorar outros ambientes em busca de novas espécies que poderiam produzir novos tipos de metabólitos secundários. Essas novas linhagens apresentam maior atividade contra patógenos resistentes a antibacterianos conhecidos, quando comparadas a linhagens isoladas do solo ou em associação a plantas (SILVA, 2016; LOURENZON, 2021).

Os principais metabólitos encontrados dentro desse gênero têm aplicação antibiótica, antifúngica, imunossupressora e antitumoral, possuindo uso clínico e agrônômico. Além destes, pigmentos são produzidos, estando diretamente relacionado ao ciclo celular, que é influenciado por ações intrínsecas e extrínsecas ao microrganismo (SILVA, 2016; LOURENZON, 2021).

4.2.1.1. Metabólitos secundários

Entre a humanidade e os produtos naturais existe uma relação milenar que atravessa as culturas e o tempo. Há grande diversidade de produtos biologicamente ativos e dentre eles os medicamentos que são oriundos a partir de animais, plantas e microrganismos. Até os medicamentos ditos como sintéticos tem em sua base, produtos de origem biológica, tornando assim a natureza uma fonte inesgotável para a obtenção destes e de novos produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A bioprospecção pode ser definida como a exploração dos recursos naturais com a finalidade de se obter novos compostos que apresentem atividades de interesse biotecnológico. Um dos principais locais do emprego da bioprospecção são nas indústrias farmacêutica e cosmética, bem como na agricultura. Por isso, abordagens que se encontrem correlacionadas às áreas da bioprospecção como a aquicultura, biorremediação, engenharias biossintéticas e miméticas, nanotecnologia e biomineração de genomas recebem um enfoque maior para o avanço tecnológico (BEATTIE et al., 2011).

A bioprospecção revelou alguns organismos como fontes importantes de biocompostos, genes e vias metabólicas para a indústria e economia global. Tais produtos consistem em um grupo de moléculas das mais variadas classes químicas produzidas sem que se encontre ligado ao metabolismo primário, sendo este essencial para a sobrevivência do organismo. Por outro lado, os metabólitos secundários possuem funções únicas, relacionadas com a sinalização intra e interespecies, muitas das quais interligadas aos mecanismos de defesa, como a produção de compostos antimicrobianos (BEATTIE et al., 2011; JENSEN, 2016; THIRUMURUGAN et al., 2018).

As metodologias *in vitro* trouxeram uma ampla gama de produtos naturais, mas ainda assim apresentam desvantagens na prospecção dos metabólitos bioativos de interesse. Muitas vezes as concentrações são baixas e frequentemente os microrganismos param a produção destas moléculas devido às diversas condições laboratoriais, fatos que tornam muitas vezes tais metodologias exaustivas e de custo elevado (WRIGHT, 2014; JENSEN, 2016; ZHOU et al., 2020).

4.2.1.2. *Streptomyces* como fonte de antibióticos

O gênero *Streptomyces* foi amplamente utilizado na indústria farmacêutica graças a sua capacidade de produzir novos agentes antimicrobianos. Atualmente, a descoberta de novas linhagens expandiu a produção de enzimas, biopesticidas e fatores de crescimento na agroindústria, além dos seus usos clínicos (SILVA, 2016; SILVA, 2020; LOURENZON, 2021).

Entre os antibióticos de importância na medicina veterinária que são produzidos pelas *Streptomyces* estão a anfoteracina B, produzida por *Streptomyces nodosus*, a estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, a tetraciclina produzida por

Streptomyces rimosus e a gentamicina, produzida por *Streptomyces tenebrarius* (SILVA, 2016).

4.2.2. Mineração Genômica

Os BGC's são agrupamentos de genes que podem apresentar produção de bioativos de interesse. As moléculas formadas através desses BGC's são classificadas por classe, sendo as principais descritas: as sintases de peptídeos não ribossomais (NRPS), policetídeos sintases (PKS) tipo I, II e III, terpenos e sideróforos (SILVA, 2016; SILVA, 2020; ZHOU et al., 2020).

A NRPS é um agrupamento enzimático que forma peptídeos, sendo responsável por elaborar substâncias como a daptomicina e actinomicina D. As PKS são metabólitos produzidos por polipeptídios sintases, as quais produzem uma vasta gama de bioativos com funções antimicrobianas (como tetraciclina), antitumoral (como doxorubicina) e anti-inflamatórias (como flavonoides). Os terpenos são bioativos produzidos por cadeias e classificadas quanto o seu grau de ciclização, sendo que os mais conhecidos terpenóides são a geosmina (que remete ao odor de terra molhada) e albaflavenóides (que remete ao odor de cânfora). Sideróforos são substâncias produzidas com a capacidade de realizar o sequestro de ferro, já que muitas vezes esse mineral é escasso no meio e os microrganismos desenvolveram formas para obtê-la (SILVA, 2020).

Ao se realizar análises em genomas microbiológicos, uma grande gama de metabólitos secundários se tem apresentado, bem como todo o maquinário biossintético responsável pela transcrição e tradução dos genes presentes no cromossomo, de forma codificada, os famosos conjuntos ou agrupamentos gênicos biossintéticos (CHAVALI; RHEE, 2018; LEE et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

Aplicações de mineração genética se encontram cada dia mais presentes, seja por meio da utilização da mineração para o melhoramento de algumas espécies, seja através melhoramento de gramíneas forrageiras utilizadas na alimentação animal (LOBATO, 2022). A utilização da mineração genômica no melhoramento das pastagens demonstra uma aproximação para o emprego desta tecnologia no melhoramento genético animal propriamente dito, onde logo haverá sua utilização em larga escala.

4.2.3. Softwares de Bioprospecção *in silico*

O avanço nas tecnologias genômicas, com enfoque para o sequenciamento do material genético de inúmeras espécies de microrganismos e o depósito em bancos de dados de fácil acesso, levou a uma nova abordagem na obtenção dos clusters gênicos e a mineração de genomas *in silico*. Uma das mais famosas ferramentas utilizadas na obtenção de metabólitos secundários, o antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*), permitiu aos pesquisadores encontrarem novos metabólitos secundários oriundos de diversos organismos. A mineração de genomas microbianos e de plantas, se faz por meio da segmentação de instruções (*pipeline*), utilizando o modelo oculto de Markov, para identificar 45 tipos de vias metabólicas já descritas na literatura relacionadas aos metabólitos secundários (MEDEMA et al., 2011; BLIN et al., 2019).

O modelo oculto de Markov é um modelo estatístico de probabilidade de eventos finitos, os quais acontecem com base em dados pré-fornecidos. Ele permite a utilização de diversas plataformas e ferramentas de bioinformática com as mais diversas finalidades. Destacam-se as que realizam o alinhamento de sequências de análises de homologia, desenho de mapas gênicos com base nos diferentes *loci* e as distâncias entre eles e filogenia por meio de sequências biológicas (GOLLERY, 2008). Diversos estudos já foram realizados com a plataforma, de forma a evidenciar o potencial da mineração genômica na busca de produtos naturais (CHAVALI; RHEE, 2018; LEE et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

4.3. OTITE BACTERIANA EM CÃES

A otite é uma afecção que afeta o canal auditivo, a qual representa de 8 a 15% dos casos presentes na clínica médica de animais de pequeno porte. Esta patologia se caracteriza por ser um processo inflamatório agudo ou crônico do epitélio do meato auditivo, com origem etiológica multifatorial (PENNA et al., 2009; MALAYERI et al., 2010). Dentre os sinais clínicos, o animal pode apresentar dor, secreção otológica, meneios cefálicos, odor fétido e sinais de desconforto como o prurido, a agitação e o nervosismo (OLIVEIRA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; BAPTISTA et al., 2010). Quanto aos tipos de otites, a externa é a mais corriqueira em se tratando das enfermidades comuns da clínica veterinária, e estima-se que ela tenha

uma casuística entre 5% e 20% dos cães (PENNA et al., 2009; MALAYERI et al., 2010).

Essa doença ocorre como uma complicação secundária de fatores que desencadeiam a inflamação da orelha tais como dermatopatias alérgicas, reações adversas alimentares, corpos estranhos, ectoparasitas, doenças metabólicas, anomalias de queratinização e doenças autoimunes (SILVEIRA et al., 2008; PENNA et al., 2009). Por outro lado, a conformação das orelhas, morfologia do conduto auditivo, maceração do epitélio, limpeza excessiva das orelhas, doenças sistêmicas, alterações climáticas e febre, são consideradas como fatores perpetuantes para infecção (OLIVEIRA et al., 2008).

Na sua multifatorialidade etiológica está incluso o gênero *Staphylococcus*, com destaque para as espécies *S. pseudointermedius*, *S. intermedius* e *Malassezia pachydermatis* como principais agentes, ainda que bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus* spp. possam contribuir de maneira significativa para a patogênese da otite (OLIVEIRA et al., 2008; PENNA et al., 2009; BAPTISTA et al., 2010; MALAUERI et al., 2010). Destes últimos, a *E. coli* e a *Pseudomonas* spp. são os agentes mais encontrados nos casos de otite (OLIVEIRA et al., 2005; MALAYERI et al., 2010).

O diagnóstico clínico da otite tem em sua base a anamnese e aos achados presentes no exame físico completo do animal. Ainda assim, a bacterioscopia, cultura e teste de sensibilidade aos antimicrobianos são de extrema valia quanto à definição do tratamento da doença, de forma a utilizar um agente antimicrobiano com maior precisão, e assim evitar o uso de terapia empírica que contribua para a pressão de resistência destes microrganismos, e que muitas vezes são comensais das mucosas dos animais (SILVEIRA et al., 2008). Algo que corrobora a necessidade destes exames complementares para o tratamento, é a presença de um alto índice de casos refratários, devido à complexidade etiológica da enfermidade, e muitas vezes da resistência destes microrganismos aos fármacos de ação antimicrobianas já conhecidos e difundidos na medicina veterinária (OLIVEIRA et al., 2008). Há ainda outros fatores que auxiliam na perpetuação deste quadro de recidivas, como cicatrizações crônicas ou infecções subclínicas (SILVEIRA et al., 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REATIVAÇÃO DA LINHAGEM Mad 24

A linhagem de actinobactéria *Streptomyces* sp. Mad 24, foi oriunda de sedimentos do rio Madeira pelo projeto PROCAD-AmazonMicro, que tinha como objetivo Prospecção de moléculas e desenvolvimento de produtos e/ou processos biotecnológicos com base na microbiota amazônica. Ela então foi armazenada em freezer a temperatura de -80 °C em meio ISP2 líquido com glicerol, do qual se retirou a amostra, e posteriormente se deixou retornar a temperatura ambiente. A reativação da linhagem ocorreu através da pipetagem de 50 µL do tubo eppendorf contendo o criopreservado e o depositando em placa contendo meio ISP2 sólido com cultivo a 28 °C por 7 dias. Em seguida foi repicada por estriamento em uma nova placa contendo o mesmo meio de cultura.

5.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO DE AMOSTRA ORIUNDA DE CÃO COM OTITE

A amostra biológica foi cedida por médico veterinário de campo, de caso atendido, elas foram então processadas no laboratório de biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas Campus Manaus Zona Leste (IFAM-CMZL), através do estriamento em placa de meio BHI, por meio de swabs estéreis de uma amostra de cão com otite, sendo incubados em laboratório por 36 horas.



Figura 1: Processamento da amostra de cão com otite externa em meio BHI.
Fonte: Arquivo Pessoal.

5.3 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA *streptomyces* Mad 24

O Type (Strain) Genome Server (TYGS) inicialmente foi introduzido como um grande banco de dados de genomas de espécies tipo, mas aos poucos se tornou uma ferramenta de curadoria combinada com metadados para análises taxonômicas

baseadas em genoma, onde são realizados cálculos das distâncias entre genomas, que são apresentados por meio dos valores de hibridização digital DNA-DNA (MEIER-KOLTHOFF, 2019). Por meio da fórmula dDDH 4, esta fórmula é considerada a mais adequada para rascunhos de genoma e genomas incompletos, sendo utilizado como critério de corte para novas espécies dDDH abaixo de 70%.

5.4 MINERAÇÃO GENÔMICA DO ISOLADO *Streptomyces* Mad 24 PARA MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA ANTE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO

A análise dos metabólitos secundários com ação antimicrobiana foi efetuada por meio do programa antiSMASH versão 6.1.0 (BLIN et al., 2019) (relaxed mode), pois ele detecta clusters bem definidos e todas as suas regiões funcionais, bem como clusters parciais, os quais apresentam um ou mais regiões funcionais ainda desconhecidas.

O programa antiSMASH se baseia no método dos modelos ocultos de Markov (HMM), para a busca de sequências enzimáticas conservadas em um banco de dados maleável que aumenta a partir da descoberta de novas vias de biossíntese para moléculas já estabelecidas ou novas. Ele procura por sequência no genoma, por meio de regras pré-estabelecidas para definir protoclusters.

5.5 ANÁLISES DE ANTIBIOSE DOS ISOLADOS FRENTE AOS MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO

Para a avaliação de antibiose se utilizou a metodologia Cross-Streak modificada. Esta consiste em se inocular o microrganismo capaz de produzir moléculas com ação antibiótica em um traço na placa de petri e os microrganismos alvos em traços perpendiculares ao primeiro (VELHO-PEREIRA; KAMAT, 2011).

As culturas da linhagem Mad 24 foram inoculadas em uma única estria na placa de petri e em seguida incubadas a 28 °C por 7 dias. Neste período a linhagem de *Streptomyces* alcança a fase estacionária de crescimento e em seguida a síntese de metabólitos naturais, entre eles moléculas de ação antibiótica, os quais difundir-se-ão no ágar ISP2. Após o período de incubação, foi realizado o estriamento em duas linhas transversais ao patógeno com distância de 1 cm da estria da linhagem Mad 24. As marcas foram desenhadas em um modelo e fixados sob as placas para padronização e, posteriormente quantificação dos resultados da Porcentagem de Atividade

Antibiótica Específica da Área (PAAE).

$$PAAE (\%) = \frac{(\text{Área sem crescimento}) \times 100}{\text{Área Total de Crescimento do Patógeno}}$$

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO DE AMOSTRA ORIUNDA DE CÃO COM OTITE

A amostra processada apresentou três isolados microbiológicos que apresentaram variação de banda após realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

6.2 IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA *streptomyces* Mad 24

A identificação da linhagem Mad 24 foi feita com o auxílio da plataforma TYGS (Type Genome Server), permitindo a identificação da linhagem em nível de espécie e determinar as linhagens filogeneticamente mais próximas (MEIER-KOLTHOFF, 2019). Resuntando na identificação da linhagem Mad 24 como *Streptomyces griseofuscus*, com 73.7% na fórmula dDDH 4. A qual é considerada a mais adequada para rascunhos de genoma e genomas incompletos, por possuir dDDH acima de 70% a linhagem Mad 24 é considerada pertencente a mesma espécie, conforme figura 2.



Figura 2: Árvore filogenética da *Streptomyces griseofuscus* Mad 24 com base no genoma completo

Fonte: plataforma TYGS.

6.3 MINERAÇÃO GENÔMICA DO ISOLADO *Streptomyces* Mad 24 PARA MOLÉCULAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO

A mineração da *Streptomyces griseofuscus* linhagem Mad 24 foi realizada com auxílio da ferramenta antiSMASH versão 6.1.0 em relaxed mode, método que relevou

que o isolado Mad 24 apresentou 66 BGC's envolvidos no metabolismo secundário da bactéria (Tabela 1). Destes, 20 foram associados para NRPS, 18 clusters para PKS (tipo I com 15 clusters, tipo II com 1, tipo III com 1 clusters e tipo hglE-KS com 1 clusters). Além disso, foram identificados 3 clusters associados a síntese de terpenos. Ainda se apresentou cluster para sideróforos (2), ectoína (2), melanina (1), butirolactona (1), lantipeptídeo (1) e “outros clusters” (1) (cluster que não pertence a nenhum dos clusters caracterizados pelo antiSMASH). O programa identificou doze clusters candidatos do tipo misto. Os cinco clusters restantes foram classificados como outros tipos de clusters: RiPP (Ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide), RRE-containing, LAP (Linear azol(in)e-containing peptides) e lassopeptídeo.

Tabela 1 - Clusters biossintéticos e moléculas antibióticas do antiSMASH

Região do Contig	Cluster biossintético	Bioativo	Similaridade (%)
3.1	NRPS	Diisonitrile	66
6.1	NRPS/siderofofo	Friulimicin	18
9.1	Terpeno	Kirromycin	3
15.1	NRPS	Acyldepsipeptide	15
22.1	NRPS/Other	Actinomycin D	89
23.2	Ectoine	Showdomycin	23
27.1	Terpeno	Kirromycin	13
45.1	PKS T1	Cyphomycin	2
46.1	NRPS	Meridamycin	15
65.1	Other/PKS	Tetronasin	3
69.1	PKS T1	Pentamycin	53
128.1	Terpeno	Kirromycin	3
183.1	PKS T1	Mediomycin	28
226.1	PKS T1	Kinamycin	11
Total			14

Fonte: Autoria própria. NRPS: Sintetase de peptídeos não ribossomais, PKS: sintetase de policetídeos tipo 1 (T1PKS).

Clusters de terpenos estariam envolvidos na produção de Kirromycin (molécula envolvida na inibição da síntese proteica e com ação antimicrobiana), sendo que o programa antiSMASH resultou na apresentação de três clusters associados à produção deste composto, os três clusters são encontrados nas regiões 9.1, 27.1 e 128.1, respectivamente nas similaridades de 3%, 13% e 3% (ZHAO et al., 2008).

Foram identificados clusters do tipo NRPS para a provável síntese de antimicrobianos como Diisonitrile, Acyldepsipeptide e Actinomycin D, com similaridade de 66%, 15% e 89%. A Actinomycin D, além de ser um *cluster* do tipo NRPS, parte dele possui genes da classe dos terpenos (TANG, 2019).

Clusters de sintases de poliketídeos do tipo 1 (T1PKS) apresentaram suposta síntese de Cyphomycin, Pentamycin, Mediomycin e Kinamycin, todos estes com ação antibacteriana (DING et al., 2011). O Cyphomycin e o Mediomycin possuem propriedades bactericida e antifúngica; já o Pentamycin possui propriedade antibiótica, antiparasitária em protozoários e antifúngica. Em relação ao Kinamycin, este apresenta propriedade funcional antifúngica e antitumoral (ZHANG et al., 2013; TROMBINI, 2020). O Tetronasin, um PKS associado a uma outra classe desconhecida, é uma molécula com ação antibiótica, sendo utilizado como suplemento na nutrição de ruminantes.

A Showdomycin é uma molécula com ação antibiótica, principalmente para *Escherichia coli*, sendo pertencente a classe das ectoínas, possuindo ação citotóxica e imunossupressora. Algumas linhagens de *E. coli* apresentam resistência a Showdomycin, sendo que a via biossintética da *Streptomyces Mad 24* pode apresentar uma molécula antibiótica com base em Showdomycin capaz de inibir as de *E. coli* que apresentam genes de resistência (PALMU et al., 2017). Tal situação pode ser identificada nos resultados de Silva et al. (2020), que ao avaliarem Actinobactérias da Antártida para ação anticâncer, descobriram um alto potencial de vias de biossíntese de moléculas antibióticas.

6.4 ANÁLISES DE ANTIBIOSE DOS ISOLADO FRENTE AOS MICRORGANISMOS DE INTERESSE VETERINÁRIO

A análise do cálculo de porcentagem de atividade antibiótica específica da área dos isolados revelou que a linhagem de *Streptomyces griseofuscus* Mad 24 possui atividade ante patógenos veterinários, conforme Tabela 2. Dentro da avaliação do isolado C-01 obteve-se uma média de 76,66% de atividade antimicrobiana, índices positivos e que podem revelar a importância de se buscar compostos que possam trabalhar no controle de enfermidades. Estes dados corroboram com o estudo realizado por Siqueira e seus colaboradores (2021), bem como por Kuzikova e Medvedeva (2022) que demonstraram alta efetividade contra patógenos comensais da pele da *Streptomyces flavogriseus* MK17.

Tabela 2 – Avaliação de antibiose da Mad 24 frente aos isolados veterinários de um cão com otite externa.

Isolado	Ctrl (%)	P1L1 (%)	P1L2 (%)	P2L1 (%)	P2L2 (%)	Média (%)
C-01	0	93,33	86,66	33,33	93,33	76,62
C-02	0	66,66	76,66	33,33	33,33	52,49
C-03	0	33,33	26,66	0	16,66	19,14

Fonte: Autoria própria. Ctrl = controle; P1L1 = Placa 1 Linha 1; P1L2 = Placa 1 Linha 2; P2L1 Placa 2 Linha 1; e P2L2 = Placa 2 Linha2.

No isolado C-02 houve uma média de 52,49%, o que representou uma queda quando comparado com a atividade contra o primeiro isolado, apesar disto ainda é um potencial farmacológico útil dentro da clínica veterinária. Estes achados corroboram com resultados encontrados por Rejón-Martínez et al. (2022), que ao avaliarem o potencial de uma linhagem de *Streptomyces* contra fitopatógenos fúngicos que acometem plantas e frutas, identificaram que uma linhagem apresentou bom antagonismo frente a uma diversidade fúngica fitopatogênica, demonstrando ser uma alternativa natural ao uso de fungicidas químicos para controlar doenças vegetais. O resultado identificado no presente trabalho também vai ao encontro com a pesquisa realizada por Núñez-Montero et al. (2021), que ao avaliarem o potencial antibiótico de um isolado oriundo da Antártida, *Streptomyces fildesensis* So13.3, identificaram alta ação de inibição contra bactérias gram-positivas de 16 BGC's em variados graus de semelhança com genes biossintéticos de antibióticos conhecidos. Estes achados demonstram o alto potencial da obtenção de moléculas com ação antibiótica e sua possibilidade de uso na clínica veterinária. Um comparativo entre os controles e isolados veterinário pode ser visto na Figura 03.

A ação ante o isolado C-03 teve uma média de apenas 19,14% de inibição, exemplificado que dado a vasta gama de bactérias comensais da pele, nem todas são susceptíveis às atividades antimicrobianas específicas. Tal situação diverge de Núñez-Montero (2021), ao avaliar o potencial antibiótico de um dos oito isolados oriundos da Antártida, e de Kuzikova e Medvedeva (2022) que demonstraram alta efetividade contra microrganismos comensais com potencial patogênico encontrado na pele humana e de animais, bem como fitopatógenos.

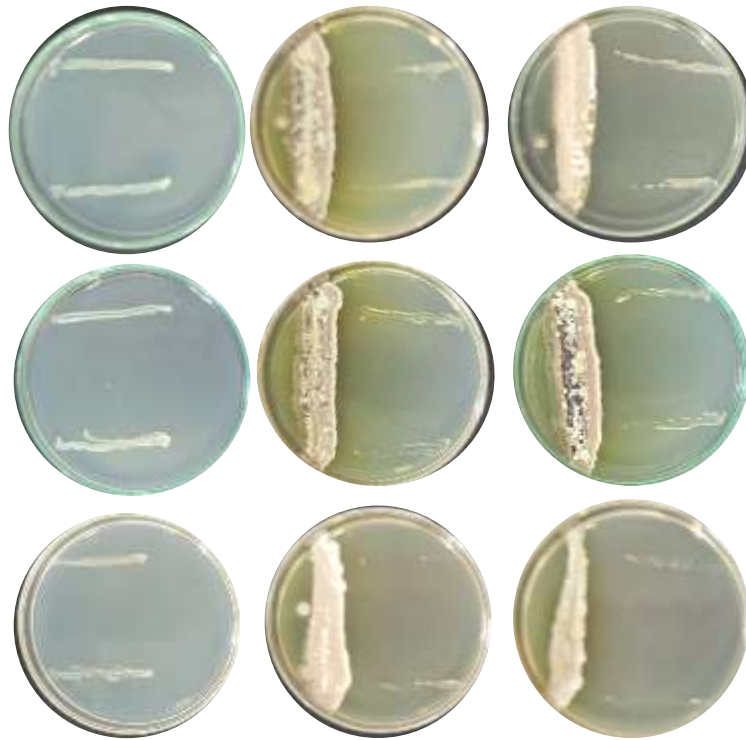


Figura 3: Screening das margens de inibição dos isolados com a *Streptomyces griseofuscus* Mad 24. A esquerda se encontra a coluna do controle negativo apenas com os patógenos, a primeira linha se apresenta o teste com o isolado C-01, a linha central o isolado C-02 e a linha inferior à do isolado C-03

Fonte: Autoria própria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mineração genética apresenta um alto potencial na obtenção de metabólitos secundários de interesse veterinário, entre eles os de ação antibiótica. A *Streptomyces griseofuscus* Mad 24 isolada do rio Madeira apresenta biomoléculas que possuem alto potencial antifúngico, citotóxico e antibiótica, com alta taxa de inibição frente aos microrganismos de interesse médico veterinário oriundos a partir de um caso de otite em um cão. Entretanto, são necessários mais estudos sobre a purificação e caracterização de compostos para identificação completa destas moléculas, tendo em vista que o Cross-Streak modificado é um teste de triagem para avaliar se há potencial antibiótico na linhagem bacteriana frente aos isolados.

REFERÊNCIAS

- BAPTISTA T. C. C.; REIS C. R.; TEIXEIRA D. R.; MOURA M. 2010. Diagnóstico de *Malassezia sp* em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 9, n. 9, p. 48-55, 2010.
- BEATTIE, A. J.; HAY, M.; MAGNUSSON, B.; NYS, R.; SMEATHERS, J.; VINCENT, J. F. V. Ecology and bioprospecting. **Austral Ecology**, v. 36, n. 3, p. 341-356, 2011.
- BLIN, K.; ANDREU, V. P.; SANTOS, E. L. C. L.; CARRATORE, F.; LEE, S. Y.; MEDEMA, M. H.; WEBER, T. The antiSMASH database version 2: A comprehensive resource on secondary metabolite biosynthetic gene clusters. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 625-630, 2019.
- CHAVALI, A. K.; RHEE, S. Y. Bioinformatics tools for the identification of gene clusters that biosynthesize specialized metabolites. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 5, p. 1022-1034, 2018.
- CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: Microrganismos simbioses como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.
- DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.
- GOLLERY, M. Handbook of Hidden Markov models in bioinformatics. **Handbook of Hidden Markov Models in Bioinformatics**, p. 1-157, 2008.
- GOTTARDO, A.; TEICHMANN, C. E.; ALMEIDA, R. S.; RIBEIRO, L. F. Uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária e o risco para saúde pública. **Revista GeTec**, v. 10, n. 26, p. 110-118, 2021.
- HOSHINO, S.; ONAKA, H.; ABE, I. Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic

acid- containing bacteria. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [S. l.], v. 46, n. 3-4, p. 363-374, 2019.

JENSEN, P. R. Natural Products and the Gene Cluster Revolution. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 12, p. 968-977, 2016.

KUZIKOVA, I. L.; MEDVEDEVA, N. G. Biocontrol and plant growth promotion potential of new antibiotic-producing *Streptomyces flavogriseus* MK17. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 979, n. 1, 2022.

LEE, N.; HWANG, S.; KIM, J.; CHO, S.; PALSSON, B.; CHO, B-K. Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 1548-155, 2020.

LO GRASSO, L.; MARTINO, D. C.; ALDUINA, R. Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. In: DHANASEKARAN, Dharumadurai (ed.). **Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications**. [S. l.]: IntechOpen, n. 7, p. 177-198, 2016.

LOBATO, B. **Sequenciamento do genoma de *Urochloa ruziziensis* potencializa melhoramento genético de espécies forrageiras**. Embrapa Cerrados. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/69355525/sequenciamento-do-genoma-de-urochloa-ruziziensis-potencializa-melhoramento-genetico-de-especies-forrageiras>>. Acesso em: 2 maio 2022.

LOURENZON, V. B. **Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em *Streptomyces* sp. ICBG311**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2021.

MALAYERI H. Z.; JAMSHIDI S.; SALEHI T. Z. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bactéria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Commum**, v. 34, n. 1, p. 435-44, 2010.

MEDEMA, M. H.; BLIN, K.; CIMERMANCIC, P.; JAGER, V.; ZAKRZEWSKI, P.; FISCHBACH, M. A.; WEBER, T.; TAKANO, E.; BREITLING, R. AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 2, p. 339-346, 2011.

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

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NÚÑEZ-MONTERO, K.; LAMILLA, C.; ABANTO, M.; MARUYAMA, F.; JOQUERA, M. A.; SANTOS, A.; MARTINEZ-URTAZA, J.; BARRIENTOS, L. Antarctic *Streptomyces fildesensis* So13.3 strain as a promising source for antimicrobials Discovery. **Scientific Reports**, v. 9, n. 7488, p. 1-10, 2019.

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

OLIVEIRA L. C.; LEITE C. A. L.; BRILHANTE R. S. N.; CARVALHO C. B. M. 2008. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p.785-788, 2008.

OLIVEIRA L. C.; MEDEIROS C. M. O.; SILVA I. N. G.; MONTEIRO A. J.; LEITE C. A. L.; CARVALHO C. B. M. 2005. Antimicrobial sensitivity of bacteria from otitis externa in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 405-408, 2005.

OLIVEIRA, R. C. de. **Potencial antimicrobiano de Actinomicetos de solos amazônicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Inovação Tecnológica) - Mestrado, Rio Branco, 2018.

PALMU, K.; ROSENQVIST, P.; THAPA, K.; ILINA, Y.; SIITONEN, V.; BARAL, B.; MÄKINEN, J.; BELOGUROV, G.; VIRTA, P.; NIEMI, J.; METSÄ-KETELÄ, M. Discovery of the Showdomycin Gene Cluster from *Streptomyces showdoensis* ATCC 15227 Yields Insight into the Biosynthetic Logic of C-Nucleoside Antibiotics. **ACS Chemical Biology**. v. 12, n. 6, p. 1472–1477, 2017.

PENNA B.; VARGES R.; MEDEIROS L.; MARTINS G. M.; MARTINS R. R.; LILENBAUM W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *staphylococci* isolated from canine otitis externa. **Veterinay Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 292-296, 2010.

REJÓN-MARTÍNEZ, G. A.; RÍOS-MUÑIZ, D. E.; CONTRERAS-LEAL, E. A.; EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z. Antagonist activity of *Streptomyces* sp. y20 against fungi causing diseases in plants and fruits. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 25, n. 2, p. 1-7, 2022.

SENGES, C. H. R.; AL-DILAIMI, A.; MARCHBANK, D. H.; WIBBERG, D.; WINKLER, A.; HALTLI, B.; NOWROUSIAN, M.; KALINOWSKI, J.; KERR, R. G.; BANDOW, J. E. The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry. **PNAS**, [S. I.], v. 115, n. 10, p. 2490-2495, 2018.

SILVA, A. N. **Análise Genômica e Metabolômica de uma Linhagem de *Streptomyces galbus* Isolada do Semiárido Paraibano**. Monografia (Graduação em biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2020.

SILVA, I. R. **Caracterização de Compostos de Antimicrobianos Produzidos por *Streptomyces* sp.** Dissertação (Doutorado em biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2016.

SILVA, L. J.; CREVELIN, E. J.; SOUZA, D. T.; LACERDA-JÚNIOR, G. V.; OLIVEIRA, V. M.; RUIZ, A. L. T. G.; ROSA, L. H.; MORAES, L. A. B.; MELO, I. S. Actinobacteria from Antarctica as a source for anticancer Discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 13870, p. 1-15, 2020.

SILVEIRA A. C. P.; ROLDÃO C. D. R.; RIBEIRO S. C. A.; FREITAS P. F. A. Aerobic bacterial flora of the canine otitis. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 103, n.1, p. 567-568, 2008.

SIQUEIRA, K. A.; LIOTTI, R. G.; SOUSA, J. R.; VENDRUSCULLO, S. J.; SOUZA, G. B.; VASCONCELOS, L. G.; JANUÁRIO, A. H.; MENDES, T. A. O.; SOARES, M. A. *Streptomyces griseocarneus* R132 expresses antimicrobial genes and produces metabolites that modulate *Galleria mellonella* immune system. **3 Biotech**, n. 11, v. 396, p. 1-6, 2021.

SOUSA, P. F. R. **Prospecção Genômica de Metabólitos Bioativos Provenientes de Microalgas Extremófilas: Aplicações na Área da Saúde**. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2021.

TANG, J.; SCHURGERS, G.; RINNAN, R. Process Understanding of Soil BVOC Fluxes in Natural Ecosystems: A Review. **Reviews of Geophysics**. v. 57, n. 3, p. 966–986, 2019.

TRAN, P. N.; YEN, M. R.; CHIANG, C. Y.; LIN, H. C.; CHEN, P. Y. Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**., [S. l.], v. 103, n. 8, p. 3277–3287, 2019.

THIRUMURUGAN, D.; CHOLARAJAN, A.; RAJA, S. S. S.; VIJAYAKUMAR, R. An introductory chapter: secondary metabolites. **Secondary metabolite sources Application**, v. 1 n.1 p. 1-21, 2018.

TROMBINI, C. B. **Bioprospecção de composto citotóxico derivado de extratosfúngicos do gênero *Aspergillus***. Dissertação (Pós-graduação em

Biociências) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2020.

VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. **Indian journal of pharmaceutical sciences**. v. 73, n.2, p, 223-228, 2011.

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

WRIGHT, G. D. Something old, something new: Revisiting natural products in Antibiotic drugdiscovery. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 147-154, 2014.

ZHANG, W.; FORTMAN, J. L.; CARLSON, J. C.; YAN, J.; LIU, Y.; BAI, F.; GUAN, W.; JIA, J.; MATAINAHU, T.; SHERMAN, D. H.; LI, S. Characterization of the Bafilomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces lohii*. **ChemBioChem: a European journal of chemical biology**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 301–306, 2013.

ZHAO, B.; LIN, X.; LEI, L.; LAMB, D. C.; KELLY, S. L.; WATERMAN, M. R.; CANE, D. E. Biosynthesis of the Sesquiterpene Antibiotic Albaflavenone in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 13, p. 8183–8189, 28 mar. 2008.

ZHOU, Q.; NING, S.; LUO, Y. Coordinated regulation for nature products discovery and overproduction in *Streptomyces*. **Synthetic and Systems Biotechnology**. v. 5, n. 2, p. 49-58, 2020.