

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS (PPGCTRA)

**PROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS DE ACTINOMICETOS
ISOLADOS DO TRATO INTESTINAL DE BESOUROS (INSECTA:
COLEOPTERA)**

THAIS KAROLINE DE SOUZA RODRIGUES

ITACOATIARA

2022

THAIS KAROLINE DE SOUZA RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE ANTIMICROBIANOS DE ACTINOMICETOS
ISOLADOS DO TRATO INTESTINAL DE BESOUROS (INSECTA:
COLEOPTERA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos na área de concentração Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Maxwel Adriano Abegg

ITACOATIARA

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696p Rodrigues, Thais Karoline de Souza
Prospecção de antimicrobianos de actinomicetos isolados do trato intestinal de besouros (Insecta: Coleoptera) / Thais Karoline de Souza Rodrigues . 2022
53 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maxwell Adriano Abegg
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Besouros. 2. Passalidae. 3. Actinomicetos. 4. Atividade antimicrobiana. I. Abegg, Maxwell Adriano. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

THAIS KAROLINE DE SOUZA RODRIGUES

**Prospecção de antimicrobianos de actinomicetos isolados do trato
intestinal de besouros (Insecta: Coleoptera)**

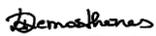
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado(a) em 30.11.22.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Maxwel Adriano Abegg


Prof. Dr. Ramieri Campos


Profa. Dra. Liane Cristine Rebouças Demosthenes

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, minha família, pelo apoio e incentivo para que concluísse essa importante etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte da sabedoria, sem Ele nada seria possível, por guiar meus passos, me conceder vida, e permitir chegar até aqui mesmo diante de tantos desafios.

Ao meu orientador Professor Dr. Maxwell Adriano Abegg, pela orientação concedida durante a pesquisa e pela confiança em mim depositada durante esses anos de trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas- UFAM/ICET, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

À CAPES, pela concessão de bolsa.

Aos meus pais, Sidomar Furtado Reis e Gracy Mery de Souza Reis por me apoiarem na realização dessa pesquisa e torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu esposo Bruno Braga Rodrigues, pelo amor e incentivo na realização dos meus projetos.

Aos meus filhos, Gustavo de Souza Rodrigues e Giovanna de Souza Rodrigues, por serem minha maior fonte de inspiração.

Aos meus irmãos Luiz Paulo e Sidomar Júnior, pelo incentivo e confiança.

Aos meus amigos e familiares que me acompanharam e torceram por mim.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O ambiente Amazônico possui a maior biodiversidade terrestre do planeta, comporta um arsenal inexplorado de plantas, animais e micro-organismos, revelando a necessidade de estudos voltados para a identificação e exploração de novas espécies. A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos e antifúngicos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats. Os besouros da família *Passalidae* vivem e se alimentam de madeira em decomposição e seus intestinos são ricamente colonizados por diferentes micro-organismos. Os actinomicetos representam uma das classes mais importantes de bactérias por sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários. Neste estudo, foram obtidos 103 isolados de actinomicetos. Na seqüência, foram realizados testes de atividade antimicrobiana preliminares com os microrganismos: *Escherichia coli* ATTC25922, *Salmonella sp.* ATTC2890, *Staphylococcus aureus* ATTC9040, *Candida albicans* ATTC6258 e *Candida parapsilosis* ATCC22014 pelo método difusão em disco sendo selecionados os três melhores para testes posteriores. Foram realizadas duas fermentações, uma em meio líquido com caldo de amido caseína e caldo Czapek e uma em meio sólido com ágar batata-dextrose e amido. Ao final dos processos fermentativos, os cultivos foram submetidos a extração com acetato de etila, permitindo a obtenção dos extratos brutos. O material foi filtrado, concentrado e seco, e o rendimento foi calculado. Os extratos foram analisados quanto a atividade antimicrobiana, antifúngica e quanto a Concentração Inibitória Mínima pela técnica de microdiluição. Foi realizada cromatografia em camada delgada CCD na proporção clorofórmio: metanol (70:30). Em seguida, o extrato bruto selecionado da cepa BU16.2.1 seguiu para purificação e isolamento de frações ativas em HPLC preparativa em MS/MS. No momento a identificação e estrutura química se encontra em análise.

Palavras-chave: Besouros, *Passalidae*, Actinomicetos, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The Amazonian environment has the greatest terrestrial biodiversity on the planet, with an unexplored arsenal of plants, animals and microorganisms, revealing the need for studies aimed at identifying and exploring new species. Microbial resistance is a global problem and consequently it is necessary to intensively search for new antimicrobial and antifungal agents from natural sources, through the exploration of new niches and habitats. The beetles of the Passalidae family live and feed on decaying wood and their intestines are richly colonized by different microorganisms. Actinomycetes represent one of the most important classes of bacteria for their ability to produce a wide range of secondary metabolites. In this study, 103 actinomycete isolates were obtained. Subsequently, preliminary antimicrobial activity tests were carried out with the microorganisms: *Escherichia coli* ATTC25922, *Salmonella* sp. ATTC2890, *Staphylococcus aureus* ATTC9040, *Candida albicans* ATTC6258 and *Candida parapsilosis* ATCC22014 by the disc diffusion method, the three best being selected for further testing. Two fermentations were carried out, one in liquid medium with casein starch broth and Czapek broth and one in solid medium with potato-dextrose and starch agar. At the end of the fermentation processes, the cultures were subjected to extraction with ethyl acetate, allowing the obtaining of crude extracts. The material was filtered, concentrated and dried, and the yield was calculated. The extracts were analyzed for antimicrobial and antifungal activity and for the Minimum Inhibitory Concentration using the microdilution technique. CCD thin layer chromatography was performed in the ratio chloroform: methanol (70:30). Then, the selected crude extract of the BU16.2.1 strain was purified and isolated from active fractions in preparative HPLC in MS/MS. At the moment the identification and chemical structure is under analysis.

Keywords: Beetles, Passalidae, Actinomycetes, Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micélio aéreo de <i>Streptomyces</i> sp.....	14
Figura 2. Coleta de besouros em madeira em decomposição.....	20
Figura 3. Processo de isolamento dos actinomicetos.....	21
Figura 4. Colônias isoladas do trato intestinal do besouro no meio ZSSE.....	26
Figura 5. Colônias purificadas após o isolamento.....	26
Figura 6. Total de inibição dos microrganismos testados no método de difusão em ágar. Classificados quanto a intensidade de inibição, leve, moderada e intensa.....	26
Figura 7. Amostras selecionadas A-BU26.3.2, B- BA16.3.1 e C-BU11.3.1 para fermentação e atividade antimicrobiana e antifúngica.....	28
Figura 8. Perfil cromatográfico em CCD. A- sem revelação, B- com revelação em UV.....	29
Figura 9. Extração do caldo com acetato de etila; C- Filtração do caldo para concentração de massa.....	30
Figura 10. Demonstração do processo de microdiluição seriada para avaliação da Concentração Inibitória Mínima em placa de cultura de 96 poços revelados com resazurina, para avaliação da atividade contra bactérias e o fungo nas seguintes concentrações, 5mg, 15mg, 25mg, 50mg, 100mg, 150mg, 250mg e 500mg.....	30
Figura 11. Espectros de massas da amostra BA16.2.1 analisados em APCI nos modos negativo e positivo.....	31
Figura 12. Fração 1- 265: (242) (211 – M+H-MeOH) (243 – M+H) (265 – M+Na).....	32
Figura 13- Fração 2- 266: (183 – M+H-MeOH) (215 – M+H) (237 – M+Na).....	32
Figura 14- A- Extrato bruto com inibição de 6mm contra <i>E. coli</i> ; B- Fração (1) + Fração (2) juntas com pequena inibição contra <i>E. coli</i> , C- Fração(1) separada sem inibição, Fração (2) com pequena inibição contra <i>E. coli</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces</i> spp.....	15
Tabela 2. Descrição dos micro-organismos teste utilizados nos ensaios microbiológicos.....	22
Tabela 3. Identificação das espécies de besouros coletados.....	25
Tabela 4. Atividade antimicrobiana zonas de inibição: +++++ > 25 mm / +++> 20-24 mm/++ >10-19mm/ + > 5-9mm / -sem zona de inibição.....	27

Tabela 5. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido.....	28
Tabela 6. Atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos obtidos.....	28
Tabela 7. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido e líquido.....	29
Tabela 8- Tamanho das zonas de inibição na atividade antimicrobiana do extrato bruto ativo em função dos meios de cultivo.....	29

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

L	Litros
mL	Mililitros
µL	Microlitros
g	Gramas
mg	Miligramas
mm	Milímetros
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CZAPEK	Czapek-Dox Broth usado para cultivar fungos e bactérias
BDA	Batata Dextrose Ágar
DMSO	Dimetilsulfóxido
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
LB	Luria Bertani
HPLC	do inglês, High Performance Liquid Chromatography
NPs	Produtos naturais
MHA	Mueller Hinton Ágar
MIC	Minimum inhibitory concentrations
Rpm	Rotação por minuto
ZSSE	Amido solúvel, KNO ₃ , extrato de solo, e ágar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Biodiversidade Amazônica.....	13
2.2 Actinomicetos: Características gerais.....	13
2.3 Associação entre actinomicetos e besouros.....	16
2.4 Antimicrobianos.....	16
2.5 Pigmentos.....	16
2.6 Estudos com actinomicetos na Amazônia.....	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivo Específico.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Coleta de besouros.....	20
4.2 Isolamento, purificação e conservação.....	20
4.3 Atividade antimicrobiana preliminar.....	21
4.4 Fermentação.....	22
4.4.1 Seleção dos isolados de actinomicetos em meio sólido.....	22
4.4.2 Seleção dos isolados de actinomicetos em meio líquido.....	22
4.5 Teste de atividade antimicrobiana de extratos brutos.....	23
4.6 Cromatografia em camada delgada CCD.....	24
4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	24
4.8 Isolamento e fracionamento por HPLC/ MS/MS de substâncias bioativas.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas resistentes as drogas são uma preocupação mundial, fato que exige pesquisar e descobrir novos produtos contra microrganismos patogênicos (KUMAR; JADEJA, 2016).

A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats (ARORA *et al.*, 2018).

Os actinomicetos são importantes bactérias produtoras de compostos bioativos que se destacam por apresentarem diferentes atividades biológicas como, antifúngica e antitumoral. Mais de 60% dos fármacos aprovados são derivados de compostos naturais, sendo 50% derivados de actinomicetos, sendo assim um grupo econômico e biologicamente importante (MORAIS *et al.*, 2014; RAVIKUMAR; FREDIMOSSES; GNANADESIGAN, 2012).

Entre os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos estão os compostos com atividade antimicrobiana que podem atuar no tratamento de doenças infecciosas. O uso indiscriminado e excessivo desses antimicrobianos leva ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, tornando-se uma ameaça à saúde pública, o que contribuem para efetivação de estudos que direcionem à descoberta de novos antimicrobianos (ALVAN; EDLUND; HEDDINI, 2011).

Na Amazônia brasileira há poucos estudos com actinomicetos isolados de plantas e de solo, podendo citar o trabalho realizado por SILVA *et al.* (2012) e SILVA *et al.*(2016), não encontrando nenhum trabalho relacionado ao isolamento de actinomicetos do intestino de besouros, demonstrando a importância de estudo com esses microrganismos amazônicos.

Pretende-se explorar particularmente essas bactérias associadas com conteúdo intestinal de besouros passalídeos (Coleoptera) que se alimentam principalmente do apodrecimento de madeira e passam a maioria de suas vidas dentro de troncos podres (REYES-CASTILLO, 1970; BOUCHER, 2005). A prospecção de micro-organismos a partir de diferentes nichos biológicos pode favorecer o isolamento de novas cepas e que, eventualmente, possam ser produtoras de antibióticos ainda não descritos.

A busca por novos antibióticos através de actinomicetos é promissora, o trabalho realizado por WATVE *et al.*(2001) estimou que o número de antimicrobianos isolados a partir do gênero *Streptomyces* chega à 100.000, ou seja, uma pequena fração foi descoberta. Como proposta este

trabalho tem em investigar novos grupos de actinomicetos isolados a partir de habitats inexplorados, como fontes de novos metabólitos secundários bioativos candidatos a fármacos.

A região amazônica contribui com vários desses medicamentos naturais ou de base natural. Fenólicos, alcaloides, óleos essenciais, terpenos, resinoides, peptídeos e inúmeras outras substâncias bioativas isoladas da biodiversidade vegetal e animal da Amazônia foram descritos por cientistas sul-americanos e estrangeiros (SILVA *et al.*, 2022).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiversidade Amazônica

A biodiversidade da Amazônia está distribuída em diferentes ambientes representados por floresta de terras altas, savana, floresta de igapó e várzeas, tornando o Brasil um dos países com maior biodiversidade do planeta. Nesses ecossistemas, a riqueza da biodiversidade se reflete em sua exuberante flora e fauna, abrangendo 21.000 espécies de fanerógamas (ARPA, 2004).

O ambiente amazônico contém a maior biodiversidade terrestre, representando cerca de 10 a 15% do total. A biodiversidade é um repositório de recursos químicos, biológicos e genéticos que podem servir de base para a aplicação da ciência e tecnologia em diferentes áreas do conhecimento. Estima-se que 40% da atividade econômica mundial seja composta por produtos relacionados à biodiversidade (PIMENTEL, 2015).

A biotecnologia está aliada à bioprospecção, podendo, através da tecnologia, produzir produtos biotecnológicos e ser autossustentável. A ampla biodiversidade nos garante a importância do Estado do Amazonas em promover seu crescimento econômico através da biotecnologia (MATIAS E., PIMENTEL N; 2005).

Apesar do enorme patrimônio genético, muito pouco se sabe sobre a diversidade microbiana da Amazônia e suas relações ecológicas. Essa rica microbiota requer pesquisas acadêmicas voltadas ao isolamento, identificação de novas espécies para fins científicos, aplicação no desenvolvimento de processos biotecnológicos, produção de substâncias bioativas de interesse para a saúde, indústria de alimentos e desenvolvimento de produtos biológicos tecnologicamente produzidos pela agroindústria (PEREIRA *et al.* 2017).

2.2 Actinomicetos: Características gerais

O filo Actinobacteria é uma das maiores unidades taxonômicas entre as principais linhagens atualmente reconhecidas no grupo das bactérias (LUDWIG *et al.*, 2012).

Os actinomicetos são microrganismos aeróbicos, formadores de esporos, bactérias filamentosas e Gram positivas com alta conteúdo G + C como mostra a (figura 1). São excelentes

produtores de novos agentes antimicrobianos, eles estão distribuídos de forma onipresente nos ecossistemas aquáticos e terrestres (RAJAN & KANNABIRAN, 2014).

O trabalho de IBNOUF *et al.*(2022) coletou amostras de solo de diferentes regiões, obteve onze isolados que apresentaram alta atividade antimicrobiana contra patógenos gram-negativos e/ou gram-positivos.

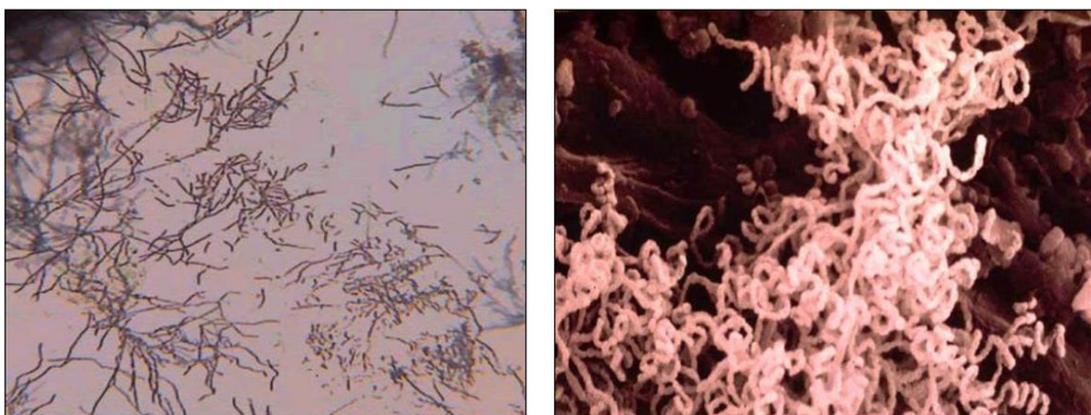


Figura 1. Micélio aéreo de *Streptomyces* sp. Fonte: SELIM, MSM, *et al.*, 2021

A identificação das actinobactérias pode ser realizada por meio de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares. As características morfológicas usadas na identificação das actinobactérias são: ramificação do micélio sobre o substrato, formação de micélio aéreo, coloração e sua fragmentação ou produção de esporos em tipo, número e arranjo da cadeia LECHEVALIER, (1989). Com o auxílio do microscópio eletrônico é possível obter informações adicionais sobre a superfície dos esporos (BULL, 2004; OLIVEIRA, 2003).

De fato, os actinomicetos representam uma das classes mais importantes de bactérias por sua capacidade de produzir uma ampla gama ativa de metabólitos secundários, os quais são eficazes contra os patógenos. Mais de 80% de todos os antibióticos conhecidos foram isolados de actinomicetos sendo utilizados na medicina e agricultura (ARASU, *et al.*,2008), (IKEDA, *et al.*2003).

As actinobactérias possuem um extenso metabolismo secundário e produzem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo antivirais, antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, anti-helmínticos, imunossupressores e antioxidantes (BARKA *et al.*, 2016; SER *et al.*, 2017).

Esses microrganismos provaram ser uma excelente fonte de metabólitos secundários por mais de meio século, exibindo várias bioatividades; fornecem valiosos medicamentos aprovados para uso clínico. A maioria dos microrganismos ainda não foi explorada em termos de capacidade de produção de metabólitos secundários, uma vez que apenas uma pequena fração pode ser cultivada em laboratório. (HUG *et al.*, 2018).

Os actinomicetos de vida livre são onipresentes em ambientes de solo, bem como em ecossistemas marinhos e de água doce. Além disso, têm um importante papel ecológico na rotatividade da matéria orgânica. Muitos actinomicetos evoluíram para viver em simbiose com plantas, fungos, insetos e animais. A maioria dessas interações actinomicetos-hospedeiro são benéficas, por meio das quais os actinomicetos produzem NPs que permitem que seu hospedeiro se proteja contra patógenos ou pragas, ou enzimas para degradar polímeros naturais resilientes como a lignocelulose (VAN DER MEIJ, *et al.*, 2017).

O gênero mais bem caracterizado de Actinomycetaceae é o *Streptomyces*, um gênero surpreendentemente diverso com cerca de 600 espécies e responsável pela produção de metade de todos os antibióticos conhecidos (LABEDA *et al.*, 2012) como demonstra a tabela 1 abaixo.

Tabela 1- Antibióticos produzidos por *Streptomyces* spp.

Classe química	Antibiótico	Micro-organismo	Ação
Aminoglicosídeos	Estreptomina Espectinomicina Neomicina	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces ssp.</i> <i>Streptomyces fradiae</i>	- Maioria de Bacteria Gram-negativas - Mycobacterium tuberculosis, Neisseria gonorrhoeae, produtos de penicilinase - Amplo espectro, geralmente utilizado topicamente devido à sua toxicidade
Tetraciclínas	Tetraciclina Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i>	- Amplo espectro, Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, riquétsias e clamídias, <i>Mycoplasma</i>
Macrolídeos	Eritromicina Clindamicina	<i>Streptomyces erythreus</i> <i>Streptomyces lincolnensis</i>	- Bacterias gram-positivas, frequentemente utilizado em substituição à penicilina, <i>Legionella</i> . -Eficaz contra anaeróbios obrigatórios, especialmente <i>Bacteroides fragilis</i>

Polienos	Nistatina Anfotericina B	<i>Streptomyces noursei</i> <i>Streptomyces nodosus</i>	-Fungos, especialmente em infecções por <i>Candida</i> . -Fungos
-----------------	-----------------------------	--	---

Fonte: MADIGAN *et al.*, 2004.

2.3 Associação entre actinomicetos e besouros

O trato digestivo de insetos contém comunidades microbianas simbióticas e transitórias que fornecem novos produtos microbianos bioativos (BREZNAK, JA.,2004). Os besouros compreendem cerca de 25% (350.000-400.000) de todas as espécies descritas (cerca de 1,5 milhão), tornando-os a ordem mais rica em espécies conhecida na Terra (EVANS *et al.*,1975).

A classe Insecta é a maior entre os invertebrados, e as espécies conseguem se alimentar de diferentes fontes de alimento através de tratos digestivos especializados. Os besouros (*Coleoptera*) se destacam por possuir aproximadamente 400.000 espécies, sendo a maior ordem (BOUCHARD, *et al.*, 2011).

Microrganismos que adotaram estilos de vida endossimbióticos não apenas evoluíram para viver em habitats especializados dentro de organismos vivos, mas os habitats vivos também evoluíram para acomodá-los. (NARDI, *et al.*,2006). Os insetos possuem associações simbióticas com microrganismos diversos e complexos, incluindo bactérias residentes e transitórias, fungos, actinomicetos e archaea (HOOPER, & GORDON, 2001).

Estudos mostram que mais de 10 novos produtos naturais com atividade antimicrobiana foram identificados a partir da caracterização química de aproximadamente 100 cepas de *Streptomyces* de insetos (SCOTT, J. J. *et al.*, 2008; BLODGETT, J. A. V. *et al.*,2010; OH, D. C. *et al.*, 2011; CARR, G. *et al.*, 2012).

Habitats pouco conhecidos representam um repositório amplamente inexplorado de compostos com estruturas químicas únicas. No geral, novos isolados de actinomicetos frequentemente exibem atividade forte contra bactérias Gram-positivas e fungos e compostos ativos contra bactérias Gram-negativas permanecem um achado escasso na maioria dos habitats (HUG *et al.*, 2018).

2.4 Antimicrobianos

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento, ou causar a morte de fungos, ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas ou fungicidas,

quando causam a morte do micro-organismo em questão, ou bacteriostáticos e fungistáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003). Cerca de 66%, de todas as novas moléculas aprovadas como fármacos antimicrobianos humanos, são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (HASANI *et al.*, 2014).

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morte no mundo, com 13,3 milhões, representando 25% de todas as mortes (MAHAJAN; ALACHANDRAN, 2012). A propagação da resistência microbiana é uma ameaça à saúde humana porque diminui a eficácia de muitos antimicrobianos (MONCIARDINI *et al.*, 2014), problema que estimula a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos, para combater os patógenos resistentes (HUANG *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, estimou-se que cercados 22.500 compostos ativos biológicos produzidos por microrganismos conhecidos (incluindo herbicidas e inseticidas), 45% são produzidos por actinomicetos, 38% por fungos e 17% por bactérias unicelulares (BERDY, 2005; RUSMANA, *et al.*, 2015).

Os produtos naturais microbianos derivados do metabolismo secundário representa uma importante via para a descoberta de novos produtos com aplicações clínicas, principalmente antibióticos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

2.5 Pigmentos

Actinomicetos são caracterizados pela produção de vários pigmentos em meios naturais ou sintéticos. Esses pigmentos são geralmente descritos em termos de vários tons de azul, violeta, vermelho, rosa, amarelo, verde, marrom e preto. Os pigmentos podem ser dissolvidos no meio ou pode ser retido no micélio. Actinomicetos são conhecidos por serem produtores de vários tipos de antibióticos e, além disso, esses antibióticos incluem muitos pigmentos (WAWRIK, *et al.*, 2007).

A capacidade desses organismos de produzir pigmentos não é uma propriedade permanente, mas pode ser grandemente aumentada ou completamente perdida sob diferentes condições de nutrição e cultivo. Portanto, é muito essencial desenvolver uma correta combinação de várias condições de cultura para aumentar o crescimento e produção de pigmento (USHA, *et al.*, 2018).

O trabalho de (ZAREENKOUSAR *et al.*, 2022) estudou a produção de pigmentos potenciais usando a fonte bacteriana por ser uma importante área de pesquisa para revelar seu possível valor em diversas aplicações industriais, extraiu um pigmento bioativo de *Rhodococcus* sp.

(NCIM5126) produzido em meio líquido com atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Escherichia coli*) que também mostraram a propriedade antioxidante.

2.6 Estudos com actinomicetos na Amazônia

Os micro-organismos apresentam uma grande vantagem para a produção de compostos de interesse comercial por poderem ser cultivados em grandes escalas e seus compostos facilmente purificados. Embora na literatura já se tenha conhecido resultados realmente admiráveis envolvendo os actinomicetos, estes relatos não esgotam nem de longe frente aos benefícios científicos que estão por ser descobertos. É evidente que, no Brasil, um número maior de pesquisadores deve ser formado, não só para estudar as espécies já conhecidas, como também toda a biodiversidade ainda inexplorada, principalmente nas regiões de clima tropical como a Amazônia (MARTINS, *et al.*, 2021).

Um grupo de pesquisadores liderados por SMITH *et al.* (2008) identificaram actinomicetos de várias espécies de plantas na Amazônia ocidental. Dos 88 isolados avaliados, 65 apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos patogênicos. Isto ressalta a importância da necessidade de que mais estudos sejam realizados por pesquisadores brasileiros, pois além de promover a conservação da biodiversidade existente na região amazônica, existe a chance de se encontrar novos microrganismos com vasto potencial biotecnológico.

Estudo de SOUZA *et al.* (2009) investigaram o potencial de substâncias produzidas por actinomicetos isolados da Região Amazônica. Foram isolados 41 actinomicetos, destes 3 isolados produziram substâncias antifúngicas contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente.

Em um trabalho de MARTINS, *et al.* (2021) investigaram a ação antimicrobiana induzida por isolados de actinomicetos obtidos da rizosfera de guaranazeiro e verificaram que esses actinomicetos têm o potencial de atuar como possíveis fontes de novos compostos antibacteriano contra micro-organismos patogênicos humanos. No entanto, destacou serem necessários mais estudos para que futuramente possam se formar uma entrada importante na indústria farmacêutica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Bioprospecção de extratos de actinomicetos isolados do trato intestinal de besouros *Coleoptera*

3.2 Específicos

- I. Isolar actinomicetos do trato intestinal de besouros;
- II. Avaliar o potencial antimicrobiano de metabólitos secundários produzidos por actinomicetos frente à bactérias e fungos de interesse clínico;
- III. Analisar a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos e frações parcialmente purificadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de besouros (*Passalidae*)

A coleta foi realizada em fevereiro de 2019 em três pontos da floresta amazônica: no Campus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no km 260 da rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464'), no ramal da comunidade Sol nascente (S03°01.045' W058°28.830' e no aeroporto (S3° 7' 35" W 58° 28' 54") ambos no município de Itacoatiara – AM (Figura 2).

Os besouros foram coletados individualmente com uma pinça estéril, identificados e armazenados em uma placa de Petri. As amostras foram levadas ao laboratório de diversidade e motilidade microbiana do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET da Universidade Federal do Amazonas – UFAM onde ocorreu o todo processamento inicial.



Figura 2. Coleta de besouros em madeira em decomposição. Fonte: (Souza *et al.*, 2017)

4.2 Isolamento e conservação de actinomicetos

Os besouros foram mantidos em placas de Petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, depois congelados e submetidos a dissecação. Segundo SUH & BLACKWELL,(2004) manter as espécies sem alimento auxilia na eliminação de alguns organismos contaminantes que possam ser eventualmente isolados do intestino. Em seguida, foi feita uma desinfecção superficial dos insetos por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária (5 min) e água esterelizada (10 min) antes da remoção do intestino. Uma alíquota de água estéril (100 µL) foi semeada em meio ZSSE: 5g de amido solúvel, 1g KNO₃, 1000mL de extrato de solo, 10g de ágar, acrescido de bifenil (50 mg/mL) como controle negativo.

Os intestinos foram removidos assepticamente com auxílio de estereomicroscópio em cabine de segurança biológica. Após a dissecação, o intestino grosso dos insetos foi cortado em três segmentos com bisturi estéril e esmagados com auxílio de uma pinça em microtubos de 2 mL

estéreis contendo 100 µL de solução salina 0,9% e este macerado foi espalhado em meio ágar ZSSE segundo ZHANG *et al.*(2011). As culturas foram incubadas a 30 °C de 7 a 14 dias.

Em seguida as colônias foram purificadas pelo método de estrias por esgotamento em placas contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar – BDA com amido, sendo um ótimo meio de padrão de crescimento e conservação destes microrganismos como demonstra a figura 4 abaixo:



Figura 3: Processo de isolamento dos actinomicetos

Para a preservação foram processados s em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA com amido em temperatura ambiente em seguida armazenados e congelados a -20 ° C em microtubos de 2 mL suplementados com glicerol a 20% (SILVA *et al.*, 2012) adaptado.

4.3 Atividade antimicrobiana preliminar

Foi realizado o teste de difusão em ágar CLSI, (2003) para verificação da atividade antibacteriana e antifúngica dos isolados de actinomicetos. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Müeller-Hinton (AMH) a 37°C, e os fungos em YPD por 24 horas. As cepas testes foram fornecidas pela Laboratório de Diversidade e motilidade- ICET/UFAM. Inicialmente o cultivo do microrganismo isolado em meio de cultura BDA com amido. Após dez dias de incubação a 28° C, foram recortados blocos de ágar circulares de 6 mm de diâmetro transferidos para as placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton AMH e YPD, previamente inoculadas com os microrganismos teste. Foi utilizada uma suspensão de células padronizadas dos microrganismos-

teste como mostra a (Tabela 1) para bactérias e fungos, respectivamente. O teste foi realizado em duplicata para todas as linhagens isoladas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foram medidos em mm.

Tabela -2. Descrição dos micro-organismos teste utilizados nos ensaios microbiológicos.

Microrganismo teste	Nomenclatura científica	Identificação da cepa	OD_{600nm} Suspensão
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	ATTC25922	0,02
Gram negativas	<i>Salmonella</i> sp.	ATCC2890	0,02
Bactérias	<i>Staphylococcus</i>	ATCC9040	0,05
Gram positivas	<i>aureus</i>		
Leveduras	<i>Candida albicans</i>	ATCC 6258	0,02
	<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22014	0,02

* OD: Densidade óptica da suspensão dos micro-organismos produzida em espectrofotômetro de massas da marca Bioespectro – SP 22 com densidade de absorvância de 600 nm. Fonte: autora

4.4 Fermentação

4.4.1 Seleção dos isolados de actinomicetos em meio sólido

Com base na triagem primária foi realizada a fermentação em meio sólido para a detecção de atividade antimicrobiana. As cepas selecionadas ativas foram fermentadas em placa no meio de cultivo amido caseína (SCA) e incubado a 28 ° C por 15–20 dias. Após o período de incubação o meio foi cortado e filtrado em papel de filtro com um volume igual de acetato 1: 1 (w / v) foi misturado e agitado vigorosamente em 2 h para extração completa. A camada orgânica coletada foi incubada para a evaporação. Em seguida foi o extrato bruto foi pesado, para demonstrar a concentração de massa final e seguir para investigação de atividade antimicrobiana em DMSO 2% (INIYAN, *et al.*, 2017 adaptado).

4.4.2 Seleção dos isolados de actinomicetos em meio líquido

Para avaliação de compostos antimicrobianos, os isolados de actinomicetos selecionados foram inoculados separadamente em dois meios de cultura distintos, caldo amido caseína e caldo CZAPEC. Inicialmente, os actinomicetos selecionados foram pré-inoculados em: erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos respectivos meios. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 180 rpm, a 28 ° C por 48 horas. Após esse período, uma alíquota de 2 mL de suspensão de cada

isolado selecionado foi transferida para erlenmeyers de 500mL contendo 250 mL dos meios líquidos. A fermentação foi mantida em agitação constante de 180 rpm por 24, 48, 72, 96 e 120 horas a 28 °C. A cada 24 horas de cultivo, foi observado o crescimento, após o término na agitação, os meios fermentados foram centrifugados a 4.000 rpm durante 15 minutos para separação da massa celular. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e mantido em freezer a - 20°C. A partir deste sobrenadante foram selecionados, através do método de difusão de disco (BAUER *et al.*, 1966), os tempos e respectivos meios líquidos que apresentaram formação de zonas de inibição indicativas de antibiose. Para isso, discos de papel de 6 mm de diâmetro foram umedecidos com 20 µL do sobrenadante e transferidos para placas cobertas com microrganismos teste, incubado a 37 °C por 24 horas. Passado o período de incubação, foi avaliado a produção ou não de zonas de inibição, considerado zona de inibição qualquer halo produzido, indiferente do seu diâmetro.

4.5 Teste de atividade antimicrobiana de extratos brutos

Os extratos brutos foram testados para atividade antimicrobiana diante do teste de susceptibilidade em discos, seguindo protocolo de (SILVEIRA *et al.*,2009). Inicialmente, foram preparadas placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller Hinton (MHA) e (YPD). Após solidificação dos meios foram produzidas suspensões do micro-organismo teste as quais foram adicionadas sobre o meio de cultivo de maneira uniforme, visando a formação de um tapete de células. A suspensão foi realizada diante da determinação da densidade óptica (OD) a ser padronizada por meio do Espectrofotômetro com densidade óptica de 600nm.

As suspensões produzidas foram inoculadas nas placas de MHA e YPD de maneira uniforme, formando um tapete dos micro-organismos no meio de cultivo. Após inóculo da suspensão, foram adicionados 3 discos de 7 mm de diâmetro, contidos de 10 µL (na concentração de 200 mg/ml) dos extratos brutos. As placas foram submetidas a estufa bacteriológica durante 24 horas a 37 °C. Após tempo decorrido, os testes foram interpretados com base na formação de halo de inibição dos extratos brutos sobre as suspensões dos microrganismos testes.

4.6 Cromatografia em Camada Delgada CCD

As frações obtidas foram analisadas através da cromatografia em camada delgada preparativa (CCD) com placas cromatográficas padrão (Merck®) recobertas com Sílica gel 60, com indicador fluorescente F 254 (Merck, Germany, Cat # 1.05554.0007), segundo a metodologia descrita por (HOLKAR *et al.*, 2013). Inicialmente, foi pesado 1 mg das frações de interesse, as quais foram solubilizadas em 1 mL de metanol. A amostra solubilizada foi adicionada à 1 cm da base inferior das placas e o inóculo foi adicionado por meio de um tubo capilar com extremidade inferior seccionada. Após aplicação das frações, as placas foram alocadas em câmaras cromatográficas de vidro e eluídas em sistema clorofórmio: metanol na proporção de 70:30.

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima CIM)

A concentração inibitória mínima (MIC) das moléculas sintéticas foi realizada usando a técnica de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços estéreis. Para a atividade antibacteriana e antifúngica, foi distribuído 100µL da solução teste nas concentrações individuais descritas na Figura 5, no poço 1 e nos poços subsequentes, por meio de diluição seriada. O processo de diluição seriada seguiu por 7 (sete) vezes, sendo homogeneizado e transferido 100 µL para o próximo poço, assim sucessivamente; resultando nas concentrações mínimas em fatores de diluição 1/128. A droga controle cloranfenicol 2mg/mL, foi aplicada a todos os poços de controle positivo de bactérias, assim como metanol PA para controle positivo de fungos. O controle negativo tinha solução de DMSO 2%. As microplacas foram encubadas por 24 horas a 35 °C e, após esse período, foi adicionado em cada poço 20µL de reagente resazurina (0,15mg/mL), que indica crescimento microbiano quando muda a coloração de azul para rosa (RISS *et al.*, 2021, Oliveira *et al.*, 2013;). Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.8 Isolamento e fracionamento por HPLC/ MS/MS de substâncias bioativas

As análises em HPLC semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário). Como o objetivo de otimizar o isolamento das substâncias bioativas, cerca de 60 mg do extrato bruto foi dissolvido em 200 µL de DMSO e submetida a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo com método utilizado 30:80 (metanol/água acidificada) por 20 minutos com fluxo de 3,5 por minuto. Nesta etapa utilizou-se uma coluna semipreparativa C18 (Luna) (5µm, 250 x 10,00 mm) da Phenomenex.

As análises para isolamento e caracterização das substâncias bioativas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - Central Analítica.

As fragmentações das frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas (ESI-MS) em modo positivo e negativo, visando confirmar a m/z das substâncias isoladas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta de besouros

Foram coletadas 35 espécies de besouros, considerando as diferenças na morfologia, como cor, formato da cabeça, aparelhos orais. Eles foram identificados no Laboratório de Entomologia do INPA e todos são pertencentes à família *Passalidae* como mostra a tabela 3.

Tabela 3 -Identificação das espécies de besouros coletados.

Família	Gênero	Espécie	Número de espécimes
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>magdalenae</i>	6
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>sinuosus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>cephalotes</i>	1
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>paraenses</i>	1
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>latifrons</i>	12
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>coniferus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>variiphyllus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>abortivus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>amazonicus</i>	1
<i>Passalidae</i>	Popilius	<i>marginatus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Spasalus	<i>aquina</i>	2

5.2 Isolamento de actinomicetos

Um total de 103 colônias de actinomicetos foram isoladas do intestino de besouros coletados. Devido à dificuldade de acesso ao método molecular sabendo que é mais rápido e prático, a identificação dos microrganismos pela metodologia somente será realizado com as cepas promissoras. As colônias isoladas mostraram as características macroscópicas pelo aspecto de tamanho, consistência, micélio aéreo, micélio submerso, cor e pigmentos difusíveis típicos de actinomicetos.



Figura 4- Colônias isoladas do trato intestinal do besouro no meio ZSSE. Fonte: autora



Figura 5- Colônias purificadas após o isolamento. Fonte: autora

5.3 Atividade antimicrobiana preliminar

O teste de difusão em ágar foi realizado para detectar a inibição das bactérias e fungos em todas as 103 colônias isoladas. Os resultados positivos foram medidos os halos de inibição e classificados quanto ao nível de intensidade, leve, moderado e intenso. Leve (+): diâmetro do halo de inibição entre 5 a 12 mm; moderada (++) : diâmetro do halo de inibição entre 13 a 19 mm; intenso (+++) : diâmetro do halo de inibição superior a 20 mm e negativo (-): ausência de halo. Todos os microrganismos testados obtiveram resultados satisfatórios, se destacando *Staphylococcus aureus* e *C. parapsilosis* que tiveram 27 linhagens com inibição intensa como mostra a Figura 6 abaixo.

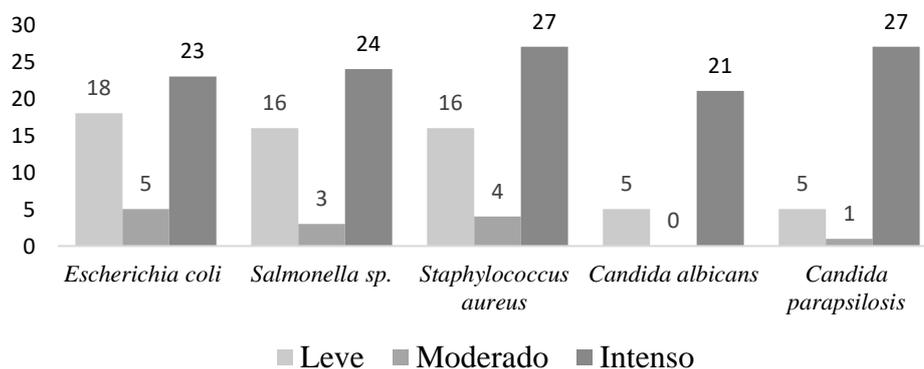


Figura 6- Total de inibição dos microrganismos testados no método de difusão em ágar. Classificados quanto a intensidade de inibição, leve, moderada e intensa.

No entanto, apenas as cinco cepas demonstraram atividade antimicrobiana superior sendo selecionados para os testes posteriores, como se pode observar na tabela 4.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana zonas de inibição: +++> 20mm / ++ >13-19mm/ + > 5-12mm / -sem zona de inibição.

Linhagem de Actinomicetos	Atividade antibacteriana	Atividade antifúngica
BA16.2.1	++++	+++
BU11.3.1	++	-
BU33.2.1	++	++
BU6.1.5	+++	-
BU6.2.3	++	-

Esses achados corroboram com trabalhos de outros autores, tal como no trabalho de (SANTAMARÍA, 2020) os autores isolaram actinomicetos do intestino e fezes de besouros *C. welensii* larvas. O isolamento de vários actinomicetos permitiu estudar sua capacidade de produzir enzimas como: celulasas, hemicelulasas, amilases e proteases em condições de laboratório, além de produção de antibióticos e antifúngicos que também foi examinada, e os resultados mostraram que cerca de 58% das cepas conseguiam produzir diferentes moléculas ativas contra bactérias Gram-positivas, contribuindo de forma significativa para este trabalho, mostrando a potencialidade desse micro-organismo isolado de uma fonte pouco explorada.

Outro importante trabalho foi de (CHEVRETTE *et.al.*,2019) que afirma que o trato gastrointestinal dos insetos permanece um habitat amplamente inexplorado, em seus ensaios de bioatividade destaca que cepas de *Streptomyces* associadas a insetos tiveram atividade antifúngica significativamente maior comparado a cepas de *Streptomyces* de solo e cepas associadas a plantas. E a partir de uma fração positiva em seu estudo com camundongos, descreveu um novo composto antifúngico, a cifomicina, de um *Streptomyces* brasileiro (ISID311) isolado do microbiota da formiga *Cyphomyrmex sp.*

5.4 Fermentação em meio sólido

Foi selecionado 3 linhagens devido aos bons resultados que obtiveram na produção de pigmentos e seguiram para fermentação em meio sólido. Sendo elas BU26.3.2 (vermelho), BA16.2.1 (amarelo) e BU11.3.1 (amarelo). As amostras foram concentradas e testadas as atividades antibacteriana e antifúngica. Figura 7.



Figura 7- Amostras selecionadas A-BU26.3.2, B- BA16.3.1 e C-BU11.3.1 para fermentação e atividade antimicrobiana e antifúngica. Fonte: autora

Os rendimentos dos extratos obtidos está descrito na tabela 5 e a atividade antimicrobiana e antifúngica está descrito na tabela 6.

Tabela 5. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido.

Código da amostra	Peso seco (mg)
BA16.2.1 (amarelo)	5,7mg
BU26.3.2 (vermelho)	4mg
BU11.3.1 (amarelo)	1,3mg

Tabela 6. Atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos obtidos.

Código da amostra	Atividade antimicrobiana (diâmetro de inibição)	Atividade antifúngica (diâmetro de inibição)
BA16.2.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 9mm <i>E.coli</i> - 8mm <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> -7mm <i>C. parapsilosis</i> - 7mm
BU26.3.2 (vermelho)	<i>Staphylococcus aureus</i> negativo <i>E.coli</i> - negativo <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> - negativo <i>C. parapsilosis</i> - negativo
BU11.3.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 6mm <i>E.coli</i> - 6mm <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> - negativo <i>C. parapsilosis</i> - negativo

5.5 Cromatografia em camada delgada CCD

Com a finalidade de estimar a composição química dos extratos, as amostras selecionadas BA16.2.1 (amarelo), BU11.3.1 (amarelo) e BU26.3.2 (vermelho) foram alocadas para câmaras cromatográficas e eluídas em sistema clorofórmio: metanol na proporção de 70:30, porem como é possível observar na figura 8, ocorreu um arraste na amostra A, não obtendo uma boa separação para avaliar a pureza das substâncias isoladas.

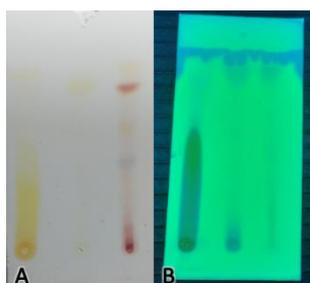


Figura 8- Perfil cromatográfico em CCD. **A-** sem revelação, **B-** com revelação em UV.
Fonte: autora

5.6 Avaliação da atividade biológica em função dos meios de cultivo

A cepa selecionada para a avaliação de atividade biológica em função dos meios foi a BU16.2.1. Foi cultivada em três meios para avaliar a atividade inibitória, sendo eles: caldo CZAPEK, caldo amido caseína e placas em meio BDA amido. Foi extraída com solvente metanol e a biomassa foi suspensa em 2% de DMSO para teste de atividade inibitória. A cepa se destacou na fermentação em placas de BDA com amido, seus pigmentos foram produzidos e bactérias patogênicas e fungos foram inibidos. Os parâmetros para a fermentação tais como tempo de crescimento, agitação e temperatura foram os mesmos, porém o comportamento do microrganismo difere em cada meio de cultivo devido à fonte de nutrientes de cada um, não apresentou produção de pigmentos nos caldos selecionados.

Tabela 7. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido e líquido.

Meios de cultivo	Peso seco (mg)
Caldo CZAPEK	36,4mg
Caldo amido caseína	74mg
Placas em BDA amido	11516,6mg

Tabela 8-Tamanho das zonas de inibição na atividade antimicrobiana do extrato bruto ativo em função dos meios de cultivo.

Meios de cultivo	Zonas de inibição
Caldo CZAPEK	Negativo
Caldo amido caseína	Negativo

Placas em BDA amido	<i>S.aureus</i> -6mm intensa inibição/ <i>E.coli</i> - 5mm intensa inibição/ <i>Salmonella</i> - 7mm intensa inibição/ <i>Candida albicans</i> - 6mm moderado/ <i>Candida parapsilosis</i> - negativo
---------------------	--

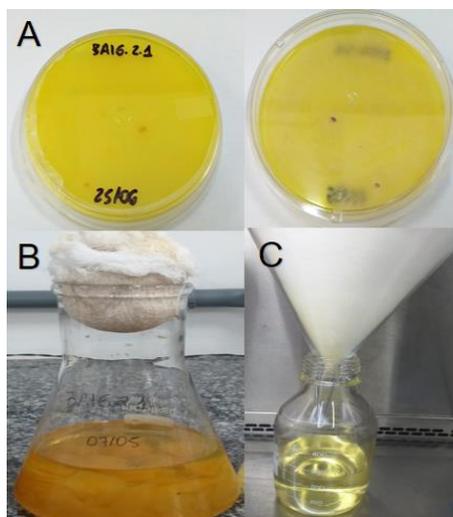


Figura 9- A- cepa B16.2.1 para fermentação em placa com meio de cultivo BDA com amido; B- Extração do caldo com acetato de etila; C- Filtração do caldo para concentração de massa. Fonte: autora

5.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em duplicata com o extrato bruto da cepa BU16.2.1 em DMSO 2%, que variou de 5mg à 500mg. Houve resposta inibitória somente para o fungo *candida albicans* em todas as concentrações testadas, e sem inibição dos patógenos para as bactérias selecionadas, como mostra a figura 10.

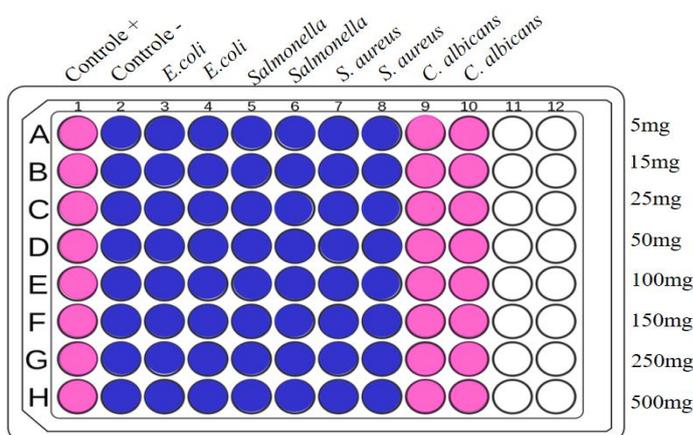


Figura 10- Demonstração do processo de microdiluição seriada em placa de cultura de 96 poços revelados com resazurina, para avaliação da atividade contra bactérias e o fungo nas seguintes concentrações, 5mg, 15mg, 25mg, 50mg, 100mg, 150mg, 250mg e 500mg.

A CIM demonstra um potencial para produção de antifúngico por apresentar CIM relativamente boa para extrato bruto, impedindo crescimento e a multiplicação dos microrganismos testados.

A partir dos resultados dos testes biológicos, a cepa BA16.2.1 foi selecionada como a mais promissora para dar seguimento com análise de características químicas detalhadas usando técnicas de cromatografia e espectroscopia.

Um importante trabalho foi de (IBNOUF *et al.*, 2022) que encontrou dez compostos antimicrobianos com outras atividades biológicas, como anticâncer, antioxidante e cosmética, identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC-MS, sendo alguns desses compostos de natureza de ácidos graxos e outros hidrocarbonetos.

5.8 Isolamento por HPLC/ MS/MS de substâncias bioativas

Após a obtenção do extrato bruto da cepa BA16.2.1, foi realizado o fracionamento para isolamento dos compostos em UPLC semipreparativo, para comparar a separação das frações e similaridade química dos compostos. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas utilizando com o ionizador APCI nos modos negativo e positivo.

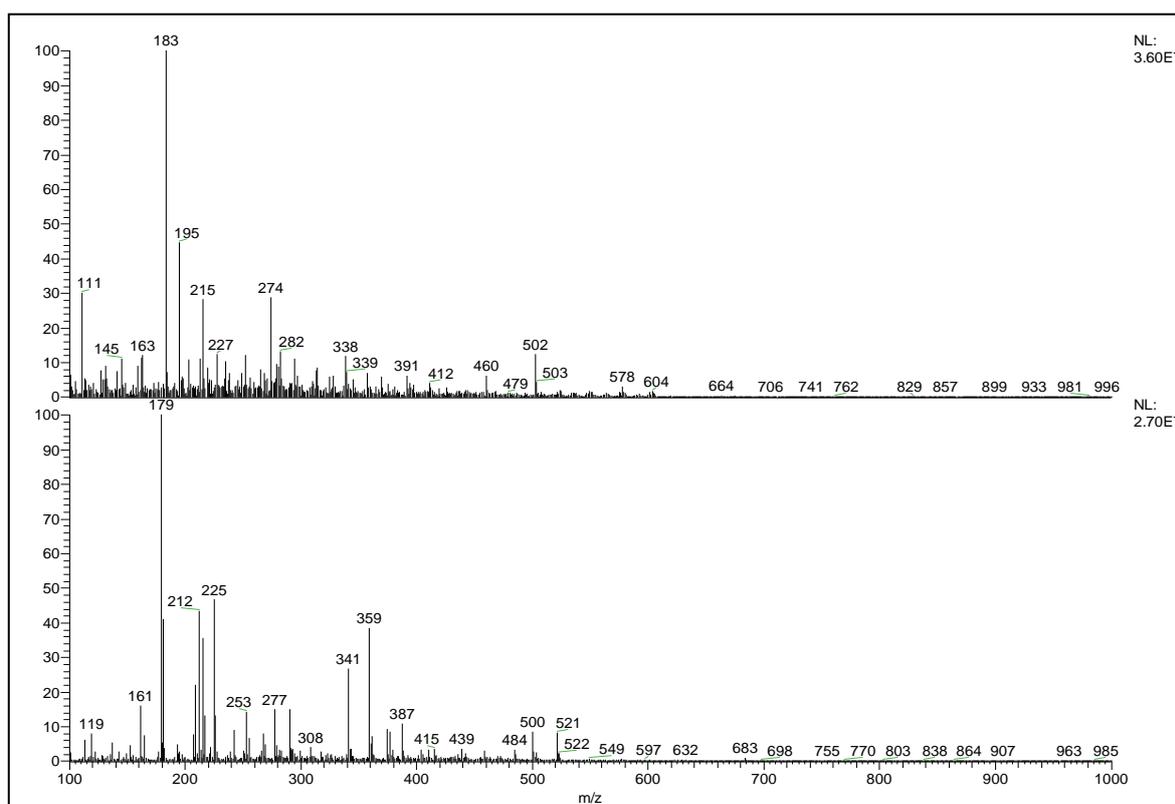


Figura 11 - Espectros de massas da amostra BA16.2.1 analisados em APCI nos modos negativo e positivo.

As análises de espectrometria de massas das frações obtidas após a separação em UPLC semi-preparativa, foram coletadas em ESI-MS e identificadas como F1 na figura 12 e F2 na figura 13.

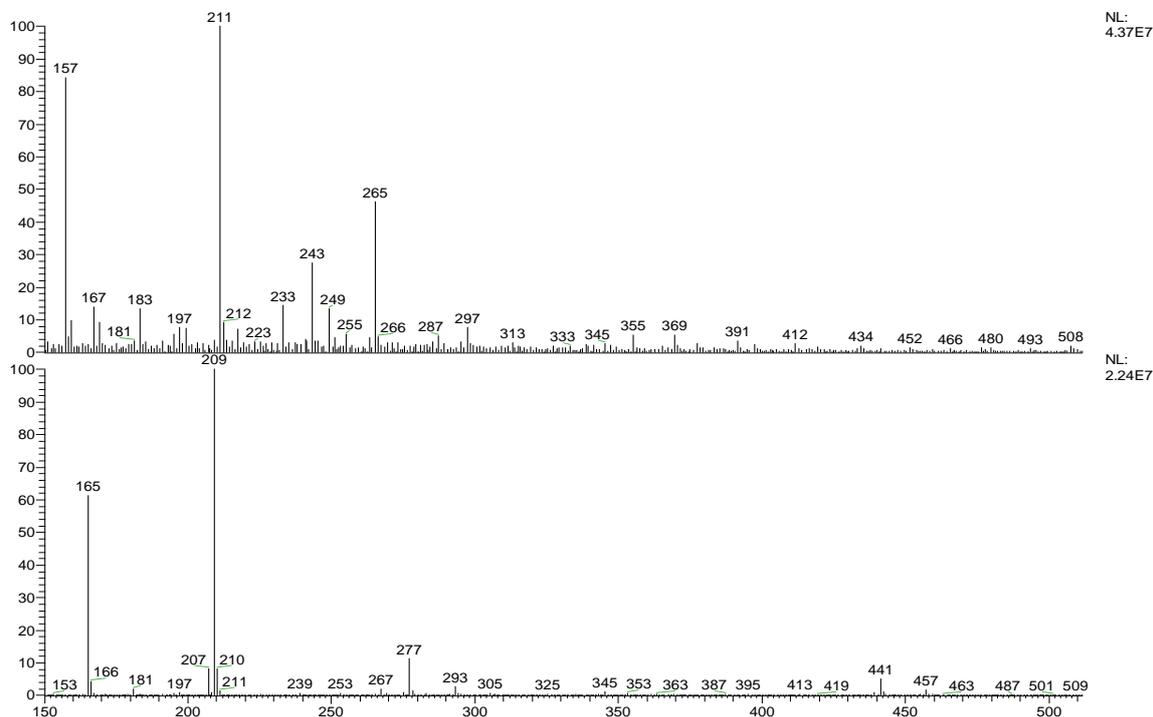


Figura 12- Fração 1- 265: (242) ($211 - M^+H - MeOH$) (243 - $M+H$) (265 - $M+Na$)

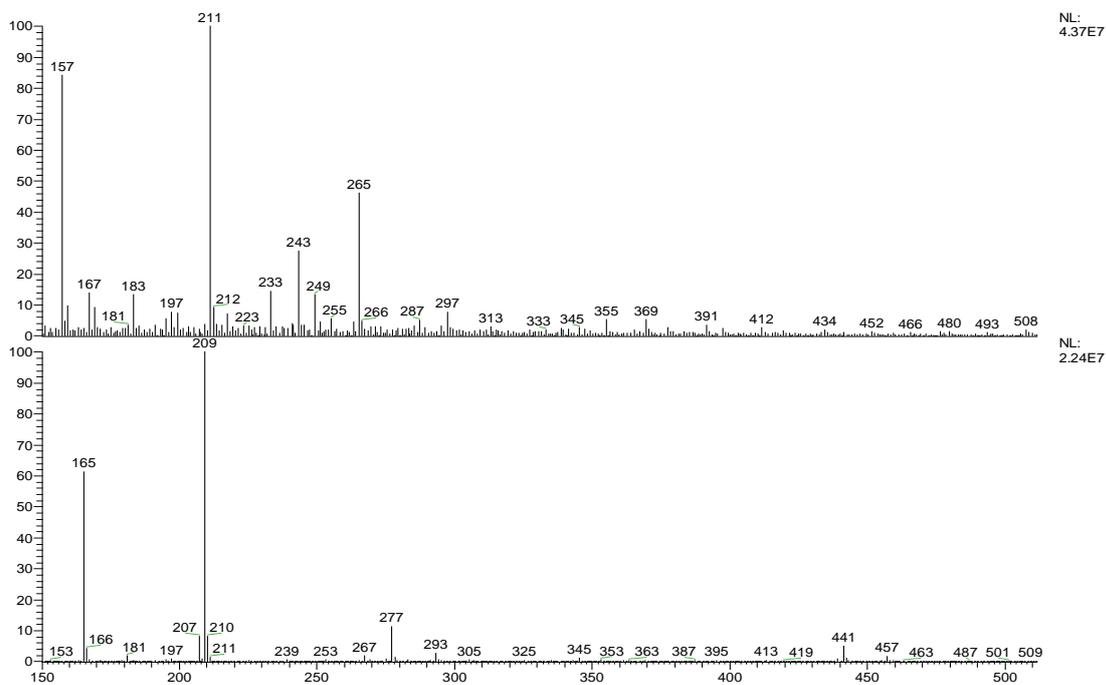


Figura 13- Fração 2- 266: (183 - $M+H - MeOH$) (215 - $M+H$) (237 - $M+Na$)

Após os fracionamentos e separação as mesmas foram secas, no qual se obteve F1 um rendimento de 1,8 mg e na F2 um rendimento de 2,5mg.

A grande maioria dos espectros de MS obtidos apresentam uma grande diversidade de sinais, que muitas vezes podem representar diversas moléculas presente no extrato bruto. Com as informações alcançadas está sendo realizado a busca nos bancos de dados das frações considerando o valor do espectro de massas.

5.9 Atividade antimicrobiana das frações

Foi realizado o teste de avaliação da atividade antimicrobiana das frações separadas em HPLC (F1 e F2), foi adicionado 1mg das frações no meio de cultivo LB com contra a bactéria *Escherichia coli*, com uma inibição de 6mm do extrato bruto, as duas frações juntas F1+F2 com 1mm de inibição e as frações separadas F1 e F2 apenas F2 com inibição de 2mm onde se obteve resultados satisfatórios contra a bactéria testada. Não foi realizado o teste em outras bactérias e fungos devido à quantidade das frações ser insuficiente (Figura 14).

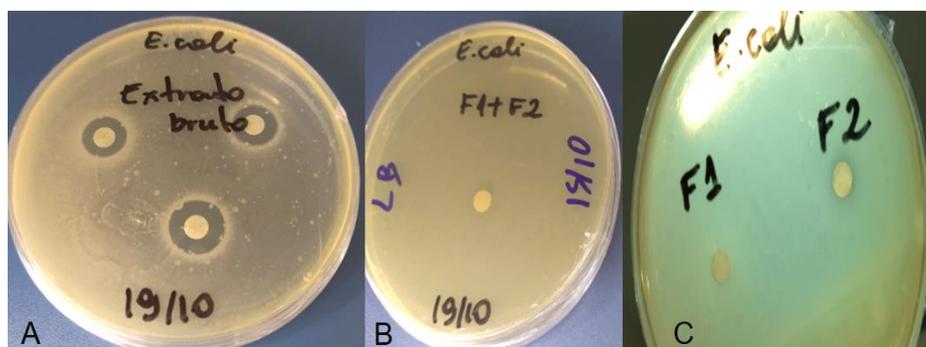


Figura 14- A- Extrato bruto com inibição de 6mm contra *E. coli*; B- Fração (1) + Fração (2) juntas com pequena inibição de 1mm contra *E. coli*, C- Fração(1) separada sem inibição, Fração (2) com pequena inibição de 2mm contra *E. coli*.

No estudo de (PARMAR, *et al.*, 2018) isolaram 5 pigmentos de actinomicetos que foi testado quanto à atividade antimicrobiana contra ampla patógenos humanos, realizado teste antioxidante, teste de toxicidade e mostrou uso seguro como corante natural em cosméticos, alimentos, indústrias farmacêuticas e têxteis. O que reforçam a expectativa desse estudo, e nos mostra o quanto é importante e promissor realizar a separação e identificação química da substância ativa dessas frações, podendo ser identificado como um novo composto antimicrobiano ou antifúngico de uso seguro e com diferentes propriedades.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, observou-se que os meios sólidos podem garantir rendimentos de extrato suficientes para o isolamento de compostos biologicamente ativos. Ressalto ainda a importância deste trabalho para a Amazônia, que possui uma rica e pouco conhecida biodiversidade que facilita a busca de novos microrganismos voltados à produção de antimicrobianos industrialmente significativos como o resultado alçado com o extrato BA16.2.1, que pode levar à descoberta de novas substâncias. Parte destes resultados foram publicados na Revista Research, Society and Development, conforme a seguir.

TÍTULO:

Prospecting of actinomycetes antimicrobials isolated from the intestinal tract of beetles (Insect: Coleoptera)

Thaís Karoline de Sousa Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7982-7371>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: thaiskarolyne2522@gmail.com

Maxwel Adriano Abegg

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: maxabegg@gmail.com

João Lucas da Silva Rufino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8547-5280>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: jjoão_lucas2018@outlook.com

Data de submissão: 20/11/2022

Data da publicação: 14/12/2022

Prospecção de antimicrobianos de actinomicetos isolados do trato intestinal de besouros (Insecta: Coleoptera)

Antimicrobial prospecting of actinomycetes isolated from the intestinal tract of beetles (Insecta: Coleoptera)

Prospección antimicrobiana de actinomicetos aislados del tracto intestinal de escarabajos (Insecta: Coleoptera)

Recebido: 20/11/2022 | Revisado: 26/11/2022 | Aceitado: 00/01/2022 | Publicado: 00/01/2022

Thaís Karoline de Sousa Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7982-7371>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: thaiskarolyne2522@gmail.com

Maxwel Adriano Abegg

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0328-1122>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: maxabegg@gmail.com

João Lucas da Silva Rufino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8547-5280>

Federal University of the Amazons, Brazil

E-mail: jjoaõ_lucas2018@outlook.com

Monique Antunes Negreiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6428-1460>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: moniqueantunes39@gmail.com

Resumo

A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos e antifúngicos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats. Os besouros da família *Passalidae* vivem e se alimentam de madeira em decomposição e seus intestinos são ricamente colonizados por diferentes micro-organismos. Os actinomicetos representam uma das classes importantes de bactérias por sua capacidade de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários. Foi isolado 103 cepas de actinomicetos. Seguindo para os testes de atividade antimicrobiana preliminar com o método de difusão ágar sendo selecionados cinco melhores para testes posteriores. Foi realizado fermentações líquida com caldo de amido caseína e CZAPEC e meio sólido com ágar batata-dextrose e amido. Ao final dos processos fermentativos, os cultivos foram submetidos a extração em acetato de etila, com a obtenção dos extratos brutos, o material foi filtrado, concentrado e seco, e calculado os rendimentos. Os extratos foram analisados quanto a atividade antimicrobiana, antifúngica e quanto a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição. Foi realizada cromatografia em camada delgada CCD na proporção clorofórmio metanol (70:30) para avaliar a complexidade das amostras. Em seguida o extrato bruto da cepa BA16.2.1 foi selecionado como mais promissor e seguiu para purificação e isolamento de frações ativas em HPLC preparativa em MS/MS. Através deste estudo espera-se obter frações ativas e identificadas quanto a sua atividade antimicrobiana e antifúngica.

Palavras-chave: Besouros *Passalidae*; Actinomicetos; Atividade antimicrobiana.

Summary

Microbial resistance is a global problem and consequently it is necessary to intensively search for new antimicrobial and antifungal agents from natural sources, through the exploration of new niches and habitats. The beetles of the *Passalidae* family live and feed on decaying wood and their intestines are richly colonized by different microorganisms. Actinomycetes represent one of the important classes of bacteria for their ability

to produce a wide range of secondary metabolites. 103 strains of actinomycetes were isolated. Moving on to the preliminary antimicrobial activity tests with the agar diffusion method, the top five being selected for further testing. Liquid fermentations were carried out with casein starch broth and CZAPEC and solid medium with potato-dextrose and starch agar. At the end of the fermentation processes, the cultures were subjected to extraction in ethyl acetate, obtaining the crude extracts, the material was filtered, concentrated and dried, and the yields were calculated. The extracts were analyzed for antimicrobial and antifungal activity and for the minimum inhibitory concentration using the microdilution technique. CCD thin layer chromatography was performed in the chloroform methanol ratio (70:30) to assess the complexity of the samples. Then the crude extract of the BA16.2.1 strain was selected as the most promising and proceeded to purification and isolation of active fractions in preparative HPLC in MS/MS. Through this study it is expected to obtain active and identified fractions regarding their antimicrobial and antifungal activity.

Keywords: Passalidae beetles; Actinomycetes; Antimicrobial activity.

Resumen

La resistencia microbiana es un problema global y, en consecuencia, es necesario buscar intensamente nuevos agentes antimicrobianos y antifúngicos de fuentes naturales, mediante la exploración de nuevos nichos y hábitats. Los escarabajos de la familia Passalidae viven y se alimentan de madera en descomposición y sus intestinos están ricamente colonizados por diferentes microorganismos. Los actinomicetos representan una de las clases importantes de bacterias por su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios. Se aislaron 103 cepas de actinomicetos. Pasando a las pruebas preliminares de actividad antimicrobiana con el método de difusión en agar, se seleccionaron los cinco primeros para realizar más pruebas. Las fermentaciones líquidas se realizaron con caldo de caseína-almidón y CZAPEC y en medio sólido con patata-dextrosa y agar almidón. Al finalizar los procesos de fermentación, los cultivos se sometieron a extracción en acetato de etilo, obteniendo los extractos crudos, el material se filtró, concentró y secó, y se calcularon los rendimientos. Se analizó la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos y la concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de microdilución. La cromatografía de capa fina CCD se realizó en la relación cloroformo metanol (70:30) para evaluar la complejidad de las muestras. Luego se seleccionó el extracto crudo de la cepa BA16.2.1 como el más prometedor y se procedió a la purificación y aislamiento de las fracciones activas en HPLC preparativa en MS/MS. A través de este estudio se espera obtener fracciones activas e identificadas en cuanto a su actividad antimicrobiana y antifúngica.

Palabras llave: Escarabajos Passalidae; actinomicetos; Actividad antimicrobiana.

1. Introdução

A resistência microbiana é um problema global e conseqüentemente se faz necessário a busca intensiva por novos agentes antimicrobianos de fontes naturais, através da exploração de novos nichos e habitats (Arora *et al.*, 2018).

As actinobactérias possuem um extenso metabolismo secundário e produzem uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo antivirais, antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, anti-helmínticos, imunossupressores e antioxidantes (Barka *et al.*, 2016; Ser *et al.*, 2017).

Entre os metabólitos secundários produzidos por actinomicetos estão os compostos com atividade antimicrobiana que podem atuar no tratamento de doenças infecciosas. O uso indiscriminado e excessivo desses antimicrobianos leva ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, tornando-se uma ameaça à saúde pública, o que contribuem para efetivação de estudos que direcionem à descoberta de novos antimicrobianos (Alvan; Edlund; Heddini, 2011).

Na Amazônia brasileira há poucos estudos com actinomicetos isolados de plantas e de solo, podendo citar o trabalho realizado por (Suela Silva *et al.*, 2013) e (Silva *et al.*, 2016), não encontrando nenhum trabalho relacionado ao isolamento de actinomicetos do intestino de besouros, o que demonstra a importância de estudo com esses microrganismos amazônicos.

Pretende-se explorar particularmente essas bactérias associadas com conteúdo intestinal de besouros passalídeos (Coleoptera) que se alimentam principalmente de apodrecimento madeira e passam a maior parte de suas vidas dentro de troncos podres (Reyes-Castillo, 1970; Boucher, 2005). A prospecção de micro-organismos a partir de diferentes nichos biológicos pode favorecer o isolamento de novas cepas e que, eventualmente possam ser produtoras de antibióticos ainda não descritos.

Os micro-organismos apresentam uma grande vantagem para a produção de compostos de interesse comercial devido ao fato de serem cultivados em grandes escalas e seus compostos facilmente purificados. Embora na literatura já se tenha conhecido resultados realmente admiráveis envolvendo os actinomicetos, estes relatos não esgotam nem de longe frente aos benefícios científicos que estão por ser descobertos. É evidente que, no Brasil, um número maior de pesquisadores deve ser formado, não só para estudar as espécies já conhecidas, como também toda a biodiversidade ainda explorada, principalmente nas regiões de clima tropical como a Amazônia (De Oliveira Martins *et al.*, 2021).

A busca por novos antibióticos através de actinomicetos é promissora e a proposta deste trabalho é de investigar novos grupos de actinomicetos isolados a partir de novos habitats, como fontes de novos metabólitos secundários bioativos candidatos a fármacos.

2. Metodologia

O estudo foi realizado com a coleta de 35 besouros em três pontos da floresta amazônica: no Campus II da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no Km 260 da rodovia AM-010 (S03°05.654' W058°27.464'), no ramal da comunidade Sol Nascente (S03°01.045' W058°28.830' e no aeroporto (S3° 7' 35" W 58° 28' 54") ambos no município de Itacoatiara – AM. Com o isolamento 103 actinomicetos do trato intestinal de besouros.

2.1 Isolamento e conservação de actinomicetos

Os besouros foram mantidos em placas de petri estéreis por 3 dias, sem alimentação, depois congelados e submetidos a dissecação. Segundo (Suh & Blackwell, 2004), manter as espécies sem alimento auxilia na eliminação de alguns organismos contaminantes que possam ser eventualmente isolados do intestino. Em seguida, foi feita uma desinfecção superficial dos insetos por submersão em etanol 70% (5 min), água sanitária (5 min) e água estéril (10 min) antes da remoção do intestino. Uma alíquota de água estéril (100µL) foi semeada em meio ZSSE segundo (Zhang, 2011): (5g de amido solúvel, 1g KNO₃, 1000mL de extrato de solo, 10g de ágar, acrescido de bifenil 50 mg/mL) como controle negativo.

Os intestinos foram removidos assepticamente com auxílio de estereomicroscópio em cabine de segurança biológica. Após a dissecação, o intestino grosso dos insetos foi cortado em três segmentos com bisturi estéril e esmagados com auxílio de uma pinça em microtubos de 2mL estéreis contendo 100µL de solução salina 0,9% e este macerado foi espalhado em meio ágar ZSSE. As culturas foram incubadas na estufa microbiológica à 30°C de 7 à 14 dias.

Em seguida as colônias foram purificadas pelo método de estrias por esgotamento em placas contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) com amido, sendo um ótimo meio de padrão de crescimento e conservação destes microrganismos.

Para a preservação, os actinomicetos isolados foram mantidos em tubos de ensaios contendo meio de cultivo BDA com amido e glicerol em uma temperatura de -4°C.

2.2 Atividade antimicrobiana preliminar

Foi realizado o teste de difusão em ágar seguindo a técnica de Kirby-Bauer modificado (Bauer *et al.*, 1966) para verificação da atividade antibacteriana e antifúngica dos isolados de actinomicetos. As bactérias foram cultivadas em meio Ágar Müeller-Hinton (AMH) a 37°C, e para os fungos o meio Levedura Peptona Dextrose (YPD) a 28°C, por 24 horas. As cepas testes foram fornecidas pela Laboratório de Diversidade e motilidade- ICET/UFAM. Inicialmente no cultivo do microrganismo isolado em meio de cultura BDA com amido. Após dez dias de incubação a 28° C, foi realizado blocos de ágar circulares de 6 mm de diâmetro nos isolados purificados, que foram transferidos para as placas contendo meio (AMH) e (YPD), previamente inoculadas com os microrganismos teste respectivamente: *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella sp.* ATCC2890, *Staphylococcus aureus* ATCC9040, *Candida albicans* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22014.

Foi utilizada uma suspensão de células padronizadas dos microrganismos teste para bactérias e fungos. Foi realizada na determinação da densidade óptica (OD) de 600nm. A suspensão padrão para os microrganismos selecionados foi 0,02 para a suspensão de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, 0,05 para suspensão de *Staphylococcus aureus*, e 0,02 para suspensão de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. O teste foi realizado em duplicata para todas as linhagens isoladas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foram medidos (em mm) com auxílio de um paquímetro.

2.3 Cultivo em meio sólido

Com base na triagem primária foi realizada a fermentação em meio sólido para a detecção de atividade antimicrobiana. As cepas selecionadas ativas foram fermentadas em placa no meio de cultivo amido caseína (SCA) e incubado a 28 ° C por 15–20 dias. Após o período de incubação o meio foi cortado e filtrado em papel de filtro com um volume igual de acetato 1: 1 (w / v) foi misturado e agitado vigorosamente em 2 h para extração completa. A camada orgânica coletada foi incubada para a evaporação em rotaevaporador. Em seguida o extrato bruto foi pesado para demonstrar a concentração de massa final e seguir para investigação de atividade antimicrobiana em DMSO 2% (Iniyan, *et al.*, 2017 adaptado).

2.4 Atividade antimicrobiana de extratos brutos

Os extratos brutos foram testados para atividade antimicrobiana diante do teste de susceptibilidade em discos, seguindo protocolo de (Patel, J. B. *et al.*, 2015) adaptado. Inicialmente, foram preparadas placas de Petri contendo o meio Ágar Mueller Hinton (MHA) e (YPD). Após solidificação dos meios foram produzidas suspensões do microrganismo teste as quais foram adicionadas sobre o meio de cultivo de maneira uniforme, visando a formação de um tapete de células. A suspensão foi realizada diante da determinação da densidade óptica (OD) a ser padronizada por meio do Espectrofotômetro com densidade óptica de 600nm. As suspensões produzidas foram inoculadas nas placas de MHA e YPD, de maneira uniforme formando um tapete dos micro-organismos no meio de cultivo. Após inóculo da suspensão, foram adicionados 3 discos de 7 mm de diâmetro contidos de 10µL (na concentração de 200mg/ml) dos extratos brutos. As placas foram submetidas a estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C. Após tempo decorrido, os testes foram interpretados com base na formação de halo de inibição dos extratos brutos sobre as suspensões dos microrganismos testes e foram medidos (em mm) com auxílio de um paquímetro.

2.5 Cromatografia em Camada Delgada CCD

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia preparativa em camada delgada com placas de cromatografia padrão revestidas com sílica gel 60, com indicador fluorescente F254, de acordo com a metodologia

descrita em (Holkar *et al.*,2013). Primeiramente, 1 mg das frações de interesse foram pesados e solubilizados em 1mL de metanol. A amostra solubilizada foi adicionada a 1cm da base inferior das placas e o inóculo foi adicionado através de um tubo capilar com a extremidade inferior cortada. Após a aplicação das frações, as placas foram colocadas em câmaras cromatográficas de vidro, eluídas com sistema clorofórmio: metanol 70:30 e observado em uma câmara de luz UV.

2.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração inibitória mínima dos extratos de actinomicetos com atividade antimicrobiana foi obtida pela técnica de microdiluição, utilizando microplacas estéreis de 96 poços. Para atividade antibacteriana, 100µL de caldo Luria-Bertani (LB) foram dispensados em todos os poços da placa e 100µL de cada extrato na concentração de 2mg/mL foram adicionados ao poço de teste para diluição em série, resultando em uma concentração inicial de 1mg/ml. O processo de diluição seriada foi realizado sete vezes, sendo homogeneizado e transferido 100µL para cada poço, e assim sucessivamente. A droga controle cloranfenicol 2mg/mL, foi aplicada a todos os poços de controle positivo de bactérias, assim como metanol PA para controle positivo de fungos. O controle negativo tinha solução de DMSO 2%. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35°C, após esse período foi adicionado em cada poço 20µL de reagente resazurina (0,15mg/mL) que indica crescimento microbiano quando muda a coloração de azul para rosa (Riss *et al.*,2016). Para ambos os testes, verificou-se o efeito do solvente DMSO 2% sobre a cepa microbiana, sendo realizadas diluições seriadas nas mesmas condições dos extratos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1 Coleta de besouros

Neste estudo, foram realizadas quatro coletas em diferentes locais da UFAM, estrada do Aeroporto e Floresta Amazônica no Piquiá. Foram coletadas 35 espécies de besouros, e a identificação foi realizada levando em consideração as diferenças na morfologia, como cor, formato da cabeça, aparelhos orais, eles foram identificados no Laboratório de Entomologia do INPA e todos são pertencentes à família *Passalidae*.

Tabela 2 -Identificação de besouros coletados

Família	Gênero	Espécie	Número de espécimes
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>magdalenae</i>	6
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>sinuosus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>cephalotes</i>	1
<i>Passalidae</i>	Veturis	<i>paraenses</i>	1
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>latifrons</i>	12
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>coniferus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>variiphyllus</i>	3
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>abortivus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Passalus	<i>amazonicus</i>	1
<i>Passalidae</i>	Popilius	<i>marginatus</i>	2
<i>Passalidae</i>	Spasalus	<i>aquina</i>	2

Legenda: Identificação das espécie e quantidade de besouros encontrados na região amazônica. Fonte: autores (2022)

3.2 Isolamento de actinomicetos

Um total de 103 colônias de actinomicetos foram isoladas do intestino de besouros, devido à dificuldade em identificar microrganismos somente a cepa mais promissora será realizada a identificação pela metodologia molecular.

As colônias isoladas mostraram as características macroscópicas pelo aspecto de tamanho, consistência, micélio aéreo, micélio submerso, cor e pigmentos difusíveis típicos de actinomicetos como mostra a figura 1.

Figura 1. Colônias isoladas do trato intestinal do besouro no meio ZSSE.

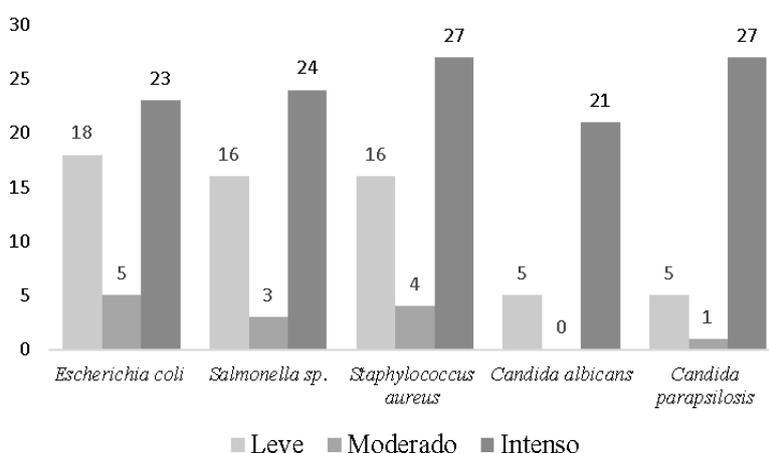


Legenda: Placa de petri após a semeadura do trato intestinal dos besouros com diversidade de colônias. Fonte: autores (2022)

3.3 Atividade antimicrobiana preliminar

O teste de difusão em ágar foi realizado para detectar a inibição das bactérias e fungos em todas as 103 colônias isoladas. Os resultados positivos foram medidos os halos de inibição e classificados quanto ao nível de intensidade, leve, moderado e intenso. Leve (+): diâmetro do halo de inibição entre 5 a 12 mm; Moderada (++): diâmetro do halo de inibição entre 13 a 19 mm; Intenso (+++): diâmetro do halo de inibição superior a 20 mm e negativo (-): ausência de halo. Todos os microrganismos testados obtiveram resultados satisfatórios se destacando *Staphylococcus aureus* e *C. parapsilosis* que tiveram 27 linhagens com inibição intensa como mostra a Figura 2 abaixo.

Figura 2. Inibição dos microrganismos testados no método de difusão em ágar.



Legenda: Classificação dos isolados testados quanto a intensidade do halo em leve (+): diâmetro de inibição entre 5 a 12 mm; moderada (++): diâmetro inibição entre 13 a 19 mm; intenso (+++): diâmetro de inibição superior a 20 mm e negativo (-): ausência de halo. Fonte: autores (2022)

No estudo de (De Oliveira, 2018) ele avaliou o potencial antimicrobiano de actinomicetos do solo amazônico e obteve um total de 153 extratos de actinomicetos, onde doze (7,84%) demonstraram atividade antimicrobiana, nove morfoespécies com atividade antibacteriana contra bactérias positivas, cinco contra *C. albicans* e nenhuma contra

bactérias Gram negativas, sendo o principal gênero produtor de antimicrobiano *Streptomyces*. Contribuindo significativamente para este trabalho, mostrando que a biodiversidade amazônica é rica de fontes exploráveis e com potencial para produzir diferentes metabólicos ativos.

No entanto, apenas as cinco cepas que demonstraram atividade antimicrobiana superior foram selecionados para seguirem para os testes posteriores, como podemos observar na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana medida pelos halos de inibição: +++> 20mm / ++ >13-19mm/ + > 5-12mm / -sem zona de inibição.

Linhagem de Actinomicetos	Atividade antibacteriana	Atividade antifúngica
BA16.2.1	++++	+++
BU11.3.1	++	-
BU33.2.1	++	++
BU6.1.5	+++	-
BU6.2.3	++	-

Legenda: Cinco isolados que se destacaram quanto a atividade antimicrobiana. Fonte: autores (2022)

Esses achados corroboram com trabalhos de outros autores, como de (Santamaría,2020) os autores isolaram actinomicetos do intestino e fezes de besouros *C. welensii* larvas. O isolamento de vários actinomicetos permitiu estudar sua capacidade de produzir enzimas como: celulasas, hemicelulasas, amilases e proteases em condições de laboratório além de produção de antibióticos e antifúngicos que também foi examinada, e os resultados mostraram que cerca de 58% das cepas tinham a capacidade de produzir diferentes moléculas ativas contra bactérias Gram-positivas, contribuindo de forma significativa para este trabalho, mostrando a potencialidade desse micro-organismo isolado de uma fonte pouco explorada.

Outro importante trabalho foi de (Chevrette *et.al.*,2019) que afirma que o trato gastrointestinal dos insetos permanece um habitat amplamente inexplorado, em seus ensaios de bioatividade destaca que cepas de *Streptomyces* associadas a insetos tiveram atividade antifúngica significativamente maior comparado a cepas de *Streptomyces* de solo e cepas associadas a plantas. E a partir de uma fração positiva em seu estudo com camundongos, descreveu um novo composto antifúngico a cifomicina, de um *Streptomyces* brasileiro (ISID311) isolado do microbiota da formiga *Cyphomyrmex sp.*

3.4 Fermentação em meio sólido

Foi selecionado 3 linhagens que se destacaram na produção de pigmentos e seguiram para fermentação em meio sólido. Sendo elas BU26.3.2 (vermelho), BA16.2.1 (amarelo) e BU11.3.1 (amarelo) como podemos observar na figura 3.

As amostras selecionadas foram concentradas, onde amostra BA16.2.1 obteve o maior rendimento com 5,7mg, seguido de BU26.3.2 com 4mg e BU11.3.1 com 1,3mg como mostra a tabela 3. As cepas também foram testadas quanto a atividade antibacteriana e antifúngica com podemos observar os diâmetros de inibição na tabela 4.

Figura 3- Amostras selecionadas A-BU26.3.2, B- BA16.3.1 e C-BU11.3.1 para fermentação e atividade antimicrobiana e antifúngica



Legenda: Extração com acetato de etila das fermentações em meio sólido.
 Fonte: autores (2022)

Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido.

Código da amostra	Peso seco (mg)
BA16.2.1 (amarelo)	5,7mg
BU26.3.2 (vermelho)	4mg
BU11.3.1 (amarelo)	1,3mg

Legenda: Extratos brutos das amostras selecionadas com pigmentos. Fonte: autores (2022)

Tabela 4. Resultado da atividade antimicrobiana e antifúngica dos extratos obtidos.

Código da amostra	Atividade antimicrobiana (diâmetro de inibição)	Atividade antifúngica (diâmetro de inibição)
BA16.2.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 9mm <i>E.coli</i> - 8mm <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> -7mm <i>C. parapsilosis</i> - 7mm
BU26.3.2 (vermelho)	<i>Staphylococcus aureus</i> negativo <i>E.coli</i> - negativo <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> - negativo <i>C. parapsilosis</i> - negativo
BU11.3.1 (amarelo)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 6mm <i>E.coli</i> - 6mm <i>Salmonella</i> - negativo	<i>C. albicans</i> - negativo <i>C. parapsilosis</i> - negativo

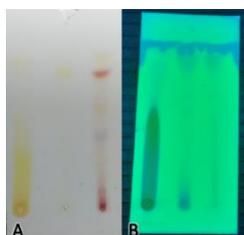
Legenda: Bactérias e fungos selecionados para teste de atividade antimicrobiana. Fonte: autores (2022)

3.5 Cromatografia em camada delgada CCD

Com a finalidade de estimar a composição química dos extratos, as amostras selecionadas BA16.2.1 (amarelo), BU11.3.1 (amarelo) e BU26.3.2 (vermelho) foram alocadas para câmaras cromatográficas e eluídas em

sistema clorofórmio: metanol na proporção de 70:30, porem como é possível observar na figura 4, ocorreu um arraste na amostra A, não obtendo uma boa separação para avaliar a pureza das substâncias isoladas.

Figura 4- Perfil cromatográfico em CCD



Legenda: A- sem revelação na ordem BA16.2.1, BU11.3.1 e BU26.3.2, e B- com revelação em UV. Fonte: autores (2022)

3.6 Avaliação da atividade biológica em função dos meios de cultivo

A cepa selecionada para a avaliação de atividade biológica em função dos meios foi a BU16.2.1. Foi cultivada em três meios para avaliar a atividade inibitória, sendo eles: Caldo CZAPEC, caldo amido caseína e placas em meio BDA amido. Foi extraída com solvente metanol e a biomassa foi ressuspensa em 2% de DMSO para teste de atividade inibitória. A cepa se destacou na fermentação em placas de BDA com amido, seus pigmentos foram produzidos e bactérias patogênicas e fungos foram inibidos. Os parâmetros para a fermentação tais como tempo de crescimento, agitação e temperatura foram os mesmos, porém o comportamento do microrganismo é diferente em cada meio de cultivo devido a fonte de nutrientes de cada um, não apresentou produção de pigmentos nos caldos selecionados e as zonas de inibição podem ser observadas na tabela 5 e os rendimentos obtidos foram diferente em cada meio utilizado como mostra a tabela 6.

Tabela 5- Inibição cos microrganismos testados no método difusão em disco

Meios de cultivo	Zonas de inibição do extrato BU16.2.1
Caldo CZAPEC	Negativo
Caldo amido caseína	Negativo
Placas em BDA amido	<i>S.aureus</i> -6mm intensa inibição/ <i>E.coli</i> - 5mm intensa inibição/ <i>Salmonella</i> - 7mm intensa inibição/ <i>Cândida albicans</i> - 6mm moderado/ <i>Cândida parapsilosi</i> -negativo

Legenda: Avaliação de atividade biológica em função dos meios de cultivo do extrato bruto BA16.2.1 com inibição somente em placas de BDA amido. Fonte: autores (2022)

Tabela 6. Rendimento dos extratos brutos da fermentação em meio sólido e líquido.

Meios de cultivo	Peso seco (mg)
Caldo CZAPEK	36,4mg
Caldo amido caseína	74mg
Placas em BDA amido	11516,6mg

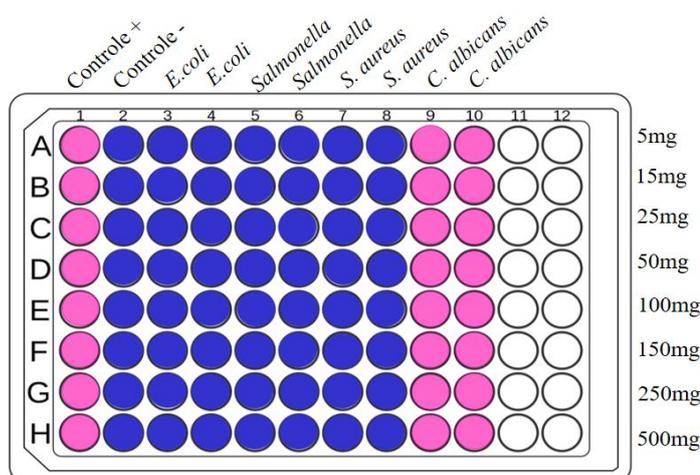
Legenda: Extrato bruto BA16.2.1 com rendimento maior em placas de BDA amido. Fonte: autores (2022)

No trabalho de (Ouchari L. *et al.*, 2019) os autores isolaram 163 actinomicetos do deserto de Merzouga, realizaram análise comparativa da atividade antimicrobiana dos isolados e dividiram em 15 grupos. Relataram que 58% desses isolados apresentaram atividade antibacteriana com inibição dos patógenos testados e mostraram o quanto e importante meio de cultura para a expressão da atividade antimicrobiana. Este fato observado colabora com os resultados apresentados nesse trabalho, mostrando que o escolha do meio de cultivo deve ser realizada de forma criteriosa para alcance de bons resultados. Já que os microrganismos se comportam diferente em cada meio de cultura.

3.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em duplicata com o extrato bruto da cepa BU16.2.1 em DMSO 2%, que variou de 5mg à 500mg. Houve resposta inibitória somente para o fungo *candida albicans* em todas as concentrações testadas, e sem inibição dos patógenos para as bactérias selecionadas como mostra a figura 5.

Figura 5- Resultado da concentração Inibitória Mínima (CIM)



Legenda: Demonstração do processo de microdiluição e diluição seriada. As bactérias foram testadas no caldo LB e o fungo no caldo YPD nas seguintes concentrações, 5mg, 15mg, 25mg, 50mg, 100mg, 150mg, 250mg. Fonte: autores (2022).

A CIM demonstra um potencial para produção de antifúngico por apresentar concentrações relativamente boa para extrato bruto, impedindo crescimento e a multiplicação dos microrganismos testados. A partir dos resultados das análises biológicas, a cepa BA16.2.1 foi selecionada como a mais promissora para dar seguimento com análise de características químicas detalhadas usando técnicas de cromatografia e espectroscopia.

Um importante trabalho foi de (Ibnouf *et al.*, 2022) que encontrou dez compostos antimicrobianos com outras atividades biológicas, como anticâncer, antioxidante e cosmética, que foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC-MS, sendo alguns desses compostos de natureza de ácidos graxos e outros hidrocarbonetos

Os resultados apresentados neste trabalho são preliminares e reforçam a expectativa desse estudo pois nos mostra o quanto é importante realizar a separação e identificação química da substância ativa, podendo ser identificado um novo composto antimicrobiano ou antifúngico de uso seguro e com diferentes propriedades

4. Considerações Finais

Neste estudo, observou-se que meios sólidos podem garantir rendimentos de extrato satisfatórios para o isolamento de compostos biologicamente ativos. O extrato obtido da cepa BA16.2.1 se mostrou promissor para a dá seguimento para a purificação e identificação das substâncias ativas, bem como a identificação molecular do actinomiceto isolado. Ressalto ainda a importância deste trabalho para a Amazônia, que possui uma rica e pouco conhecida biodiversidade que facilita a busca de novos microrganismos voltados à produção de antimicrobianos industrialmente significativos, o que pode levar à descoberta de novas substâncias.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao PROCAD-Programa Amazônia e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

Referências

- Alvan, G., Edlund, C., & Heddini, A. (2011). The global need for effective antibiotics—a summary of plenary presentations. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 70-76.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, 45, 149-158.
- Boucher, S. (2005, January). Évolution et phylogénie des coléoptères Passalidae (Scarabaeoidea) Les taxons du groupe famille la tribu néotropical des Proculini et son complexe Veturius. In *Annales de la Société entomologique de France* (Vol. 41, No. 3-4, pp. 239-604). Taylor & Francis Group.
- Chevrette, M. G., Carlson, C. M., Ortega, H. E., Thomas, C., Ananiev, G. E., Barns, K. J., ... & Currie, C. R. (2019). The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. *Nature communications*, 10(1), 1-11.
- De Oliveira Martins, S. D. S., de Mendonça, J. L. V., do Nascimento, A. P., Neto, P. D. Q. C., & Barbosa, A. M. (2021). Ação antimicrobiana de actinomicetos rizosféricos de guaranazeiro. *Nature and Conservation*, 14(1), 83-89.
- De Oliveira, R. C., & Branco-AC, R. I. O. (2018). Potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos.
- Holkar, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., & Upadhyay, A. (2013). Análogos de rodomicina de *Streptomyces purpurascens*: isolamento, caracterização e atividades biológicas. *SpringerPlus*, 2 (1), 1-13.
- Ibnouf, E. O., AldawsarI, M. F., & Waggiallah, H. A. (2022). Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(8), 103352.
- Iniyar, A. M., Kannan, R. R., & Vincent, S. G. P. (2017). Characterization of culturable actinomycetes associated with halophytic rhizosphere as potential source of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87(1), 233-242.

- Patel, J. B., Cockerill, F. R., Bradford, P. A., Eliopoulos, G. M., Hindler, J. A., Jenkins, S. G., ... & Limbago, B. (2015). M02-A12: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—.
- Ouchari, L., Boukeskase, A., Bouizgarne, B., & Ouhdouch, Y. (2019). Antimicrobial potential of actinomycetes isolated from the unexplored hot Merzouga desert and their taxonomic diversity. *Biology open*, 8(2), bio035410.
- Reyes-Castillo, P. (1970). Coleoptera, Passalidae: morfología y división en grandes grupos; géneros americanos. *Folia ent. Mex.*, 20, 1-240.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
- Santamaría, R. I., Martínez-Carrasco, A., Sánchez de la Nieta, R., Torres-Vila, L. M., Bonal, R., Martín, J., ... & Díaz, M. (2020). Characterization of actinomycetes strains isolated from the intestinal tract and feces of the larvae of the longhorn beetle *Cerambyx welensii*. *Microorganisms*, 8(12), 2013.
- Ser, H. L., Tan, L. T. H., Law, J. W. F., Chan, K. G., Duangjai, A., Saokaew, S., ... & Lee, L. H. (2017). Focused review: cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2065.
- Silva, J. M., Clementino, E. L., Cunha, M. N., Porfírio, K. P., Mota, R. A., Teixeira, M. F., ... & Porto, C. S. (2016). Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 805-810.
- Suela Silva, M., Naves Sales, A., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Ribeiro Dias, D., & Schwan, R. F. (2013). Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. *BioMed Research International*, 2013.
- Suh, S. O., & Blackwell, M. (2004). Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. *FEMS Yeast Research*, 5(1), 87-95.
- Zhang, J., & Zhang, L. (2011). Improvement of an isolation medium for actinomycetes. *Modern Applied Science*, 5(2), 124.

7. REFERÊNCIAS

1. ALVAN G.; EDLUND C.; HEDDINI A. The global need for effective antibiotics – summary for plenary presentatios. **Drug Resistance Updates** v. 14, p. 70-76, 2011.
2. ANTUNES, T. C. et al. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 131-138, 2013.
3. ARASU, M. VALAN *et al.* Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, n. 3, p. 147-153, 2008
4. ARORA, D. S.; KAUR, N. Antimicrobial Potential of Fungal Endophytes from *Moringa oleifera*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 10, n. 8, 2018.
5. ARPA, Programa Áreas Protegidas da Amazônia. Gestão participativa do SNUC. **Ministério do Meio Ambiente – MMA**, 2004. <http://programaarpa.gov.br/> Accessed 26 abril 2021
6. BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. Bioactive microbial metabolites: a personal view. **The Journal of Antibiotics**, Reino Unido, v. 58, p. 1-26, 2005 ou 2016.
7. BAUER, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J clin pathol**, 45, 149-158.
8. BERDY, Janos. Metabólitos microbianos bioativos. **The Journal of antibiotics** , v. 58, n. 1, pág. 1-26, 2005.
9. BLODGETT, Joshua AV et al. Common biosynthetic origins for polycyclic tetramate macrolactams from phylogenetically diverse bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11692-11697, 2010.
10. BREZNAK, JA Invertebrates-insects, in microbial diversity and bioprospecting. **Amer Soc Microbio**:191–203, 2004.
11. BOUCHARD P., BOUSQUET Y., DAVIES A. E., ALONSO-ZARAZAGA M. A., LAWRENCE J. F., LYAL C. H. C., NEWTON A. F., REID C. A. M., SCHMITT M., ŚLIPÍŃSKI S. A., SMITH A. B. T. **Family-group names in Coleoptera (Insecta)**. **ZooKeys** 88: 1–972, 2011.
12. BOUCHER, S.. Evolution and phylogeny of Passalidae (Scarabaeoidea). **Annales de la Société Entomologique de France**, 41: 1-603, 2005.

13. BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1a Edição. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004.
14. CARR, Gemma; BLÖSCHL, Günter; LOUCKS, Daniel P. Evaluating participation in water resource management: **A review**. **Water Resources Research**, v. 48, n. 11, 2012.
15. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved **Standard—Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1987-1898 USA, v. 23, n. 1, 2003.
16. CHEVRETTE, Marc G. *et al.* O potencial antimicrobiano de Streptomyces de microbiomas de insetos. **Comunicações da natureza**, v. 10, n. 1, pág. 1-11, 2019.
17. EVANS, Glyn *et al.* **A vida dos besouros**. George Allen & Unwin Limited., 1975.
18. HASANI, A.; KARIMINIK, A.; ISSAZADEH, K. Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**. v. 2, n. 1, p. 63-75. 2014.
19. HOOPER, Lora V. *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.
20. HUANG, X.L.; ZHUANG, L.; LIN, H.P.; GOODFELLOW, M.; HONG, K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.
21. HUG, Joachim J. *et ai.* Conceitos e métodos para acessar novos antibióticos de actinomicetos. **Antibióticos**, v. 7, n. 2, pág. 44, 2018.
22. IBNOUF, E. O., ALDAWSARI, M. F., & WAGGIALLAH, H. A. (2022). Isolation and extraction of some compounds that act as antimicrobials from actinomycetes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 29(8), 103352.
23. IKEDA, HARUO *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 526, 2003
24. INIYAN, Appadurai Muthamil; KANNAN, Rajaretinam Rajesh; VINCENT, Samuel Gnana Prakash. Characterization of culturable actinomycetes associated with halophytic rhizosphere as potential source of antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 2017, 87.1: 233-242.
25. KUMAR, R. R.; JADEJA, V. J. Isolation of Actinomycetes: A complete approach. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 606-618, 2016.

26. LABEDA, DP et al. Estudo filogenético das espécies da família Streptomycetaceae. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 1, pág. 73-104, 2012.
27. LECHEVAILIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Williams & Wilkins, v. 4, 1989.
28. LUDWIG, W. *et al.* Road map of the phylum Actinobacteria. In: **Bergey's manual of systematic bacteriology** (eds. Goodfellow, M. et al.), EUA, Springer-Verlag, v. 5, p. 1-28, 2012.
29. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª Edição, p. 610, 2004
30. MAHAJAN, Girish Badrinath; BALACHANDRAN, Lakshmi. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 4, n. 4, p. 240-53, 2012.
31. MARTINS, S. S. O.; MENDONÇA, J. L. V.; NASCIMENTO, A. P.; COSTA NETO, P. Q.; BARBOSA, A. M.. Ação antimicrobiana de actinomicetos rizosféricos de guaranazeiro. **Nature and Conservation**, v.14, n.1,p.83-89, 2021.
32. MATIAS, Emerson; PIMENTEL, N. Biotecnologia: Um desafio para o Amazonas. **Parcerias Estratégicas**, v. 21, n. 1, 2005.
33. MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; SONIA MAFFIOLI, SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, v.7, n. 3, p. 209–220, 2014.
34. MORAIS et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ**, v. 17, n.1, p. 27-34, 2014
35. NARDI, JAMES B. *et al.* Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. **Arthropod structure & development**, v. 35, n. 1, p. 57-68, 2006.
36. OH, Dong-Chan *et al.* Sceliphrolactam, a polyene macrocyclic lactam from a wasp-associated Streptomyces sp. **Organic letters**, v. 13, n. 4, p. 752-755, 2011.
37. OLIVEIRA, M. F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. **Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.
38. OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; LIANZA, M. C. S.; FERNANDES, H. M. B.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; SOUZA, I. A. Atividade Antifúngica de Extratos Isolados de Streptomyces

spp. Obtidos em Solos Paraibanos Contra Leveduras do Gênero *Candida* spp. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 51-58, 2013.

39. PARMAR, R. S., & SINGH, C. (2018). A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. **Biochemistry and Biophysics reports**, 13, 22-26.
40. PEREIRA, JO, DE SOUZA, AQL, DE SOUZA, ADL, DE CASTRO FRANÇA, S., & DE OLIVEIRA, LA. Visão Geral da Biodiversidade, Química e Potencial Biotecnológico de Microrganismos da Amazônia Brasileira. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**, 71–103, 2017.
41. PIMENTEL, Vitor Paiva *et al.* Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança, 2015.
42. RAJAN, BENITA MERCY; KANNABIRAN, KRISHNAN. Extraction and identification of antibacterial secondary metabolites from marine *Streptomyces* sp. VITBRK2. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 3, n. 3, p. 130, 2014.
43. RAVIKUMAR S. *et al.* Antagonistic properties of seagrass associated *Streptomyces* sp. RAUACT- 1: a source for anthraquinone rich compound. **Asian Pacific Journal Tropical Medicine**, v. 5, n. 11, p. 887–90, 2012
44. REYES-CASTILLO, Pedro. Coleoptera, Passalidae: morfología y división en grandes grupos; géneros americanos. Coleoptera, Passalidae: morphology and division into large groups; American genera. **Folia Entomológica Mexicana.**, v. 20, n. 22, p. 217-232, 1970.
45. RISS, Terry L. *et al.* Cell viability assays. Assay Guidance Manual [Internet], Acessado em maio de 2021.
46. RUSMANA, Iman *et al.* Metagenomic of actinomycetes based on 16S rRNA and *nifH* genes in soil and roots of four Indonesian rice cultivars using PCR-DGGE. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 22, n. 3, p. 113-121, 2015.
47. SANTAMARÍA, Ramón I. *et al.* Caracterização de cepas de actinomicetos isoladas do trato intestinal e fezes das larvas do besouro-do-chifre *Cerambyx welensii*. **Microorganismos** , v. 8, n. 12, pág. 2013, 2020.
48. SCOTT, Jarrod J. *et al.* Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, v. 322, n. 5898, p. 63-63, 2008.
49. SELIM, Manal Selim Mohamed; ABDELHAMID, Sayeda Abdelrazek; MOHAMED, Sahar Saleh. Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2021.

50. SER, H. L. et al. Focused Review: Cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, Suíça, v. 8, n. 2065, 2017.
51. SILVA, J. M.; CLEMENTINO, E. L.; CUNHA, M. N. C.; PORFÍRIO, K. P. S.; MOTA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; PORTO, C. S. Atividade antimicrobiana de moléculas bioativas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes de mastite bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p.805-810, 2016.
52. SILVA, M. S.; SALES, A. N.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed Research International**, v. 2012, p.1-10, 2012.
53. SILVA, J. E., PARANATINGA, I. L., OLIVEIRA, E. C., ESCHER, S. K., ANTONIO, A. S., Nascimento, L. S., ... & Veiga-Júnior, V. F. (2022). Natural Products from the Amazon Region as Potential Antimicrobials. **In Eco-Friendly Biobased Products Used in Microbial Diseases** (pp. 23-42). CRC Press.
54. SILVEIRA, Luiz Mário da Silva et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.
55. SMITH, S.A.; TANK, D.C.; BOULANGER, L.A.; BASCOM-SLACK, C.A., EISENMAN, K.; *et al.* Bioactive Endophytes Warrant Intensified Exploration and Conservation. **Plos One**, v.3, p. 30-52, 2008.
56. SOUZA, J.V.B.; MORIYA, R.Y.; SOUZA, E.S. Bioprospecção de substâncias antifúngicas produzidas por actinomycetes Isolados da Região Amazônica. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, 94-102, 2009.
57. SUH, Sung-Oui; BLACKWELL, Meredith. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 87-95, 2004.
58. TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
59. USHA, Rajamanickam. BIODIVERSITY OF ACTINOMYCETES AND SECONDARY METABOLITES-A REVIEW. **Innoriginal: International Journal Of Sciences**, p. 22-27, 2018.
60. VAN DER MEIJ, Anne et al. Ecologia química da produção de antibióticos por actinomicetos. **Revisões de microbiologia FEMS** , v. 41, n. 3, pág. 392-416, 2017.
61. WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **American Society for Microbiology Press**, EUA, 2003(a).

62. WATVE, MILIND G. *et al.* How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. **Archives of microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386-390, 2001.
63. WAWRIK B., Kutliev D, Abdivasievna U.A, Kukor J.J, Zylstra G.J and Kerkhof L. Biogeography of actinomycete communities and Type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and central Asia. **Appl. Environ. Microbiol**, 2007,73: 2982–2989.
64. ZAREENKOUSAR, K., HUNGUND BASAVARAJ, S., DIKSHA, D., BANAPURMATH NAGARAJ, R., & YARADODDI JAYACHANDRA, S. (2022). Potential Biomedical implications of bioactive pigment and silver nanoparticles produced by the actinobacteria *Rhodococcus* sp. NCIM 5126. **Research Journal of Biotechnology** Vol, 17, 5.
65. ZHANG, Jinhua; ZHANG, Liping. Improvement of an isolation medium for actinomycetes. **Modern Applied Science**, v. 5, n. 2, p. 124, 2011.