

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer

Leonardo José da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Leonardo José da Silva
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Leonardo José da

Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer / Leonardo José da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

170 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Bioativos 2. Bioprospecção 3. Cinerubina B 4. *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. I. Título

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, exemplo de superação e a
minha mãe, exemplo de perseverança;*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo a Deus, a quem recorri em silêncio por inúmeras vezes. Entre as dúvidas do dia a dia, nas dificuldades pelos mais variados motivos e até mesmo quando pensei em desistir. Acredito ser desnecessário entender, contento-me apenas em reconhecer;

Aos meus pais, José Aduir da Silva e Aparecida Lurdes da Silva, os quais aplicaram todos os esforços para educação dos filhos. São exemplos de conduta, Fé, determinação e amor. As minhas irmãs, Thais, Érika e Mayra, e ao meu irmão Leandro, por me ensinarem a importância de estarmos sempre juntos e o valor inestimável da nossa família;

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo e por esses quase 10 anos de convivência. Sou afortunado por tê-lo como orientador. Serei eternamente grato, muito obrigado;

Aos professores e as instituições que possibilitaram a realização deste trabalho: (Luiz Henrique Rosa/UFMG; Valeria Maia de Oliveira/CPQBA; Luiz Alberto Beraldo de Moraes/FFCLRP; Eduardo Jose Crevelin/FFCLRP; Ana Lucia Tasca Gois Ruiz/UNICAMP; Fernando Dini Andreote/ESALQ; Claudio Lima de Aguiar/ESALQ);

Pra galera de laboratório: Wallace, Jorge, Danilo, Vasco, Suiki, Vanessa, Michelli, Lilian, Diego, Zucchi, Josi, Fabio Sérgio, Maike, Carol, Martinha, Harold, Laura, Mirian, Cassiano, Rodrigo, João, Roseli, Elke, Marcia, Anamaria, Tati, Rafael, _____ (esse espaço é pra você, que eu acabei não me lembrando de incluir, desculpa aí), valeu pela força pessoal!

Pro povo de Pira: Pedrão, Joelma, Dantas, Tiago, Armando e Simone. Com certeza a gente se vê por aí!

Aos amigos: Daniel, Samir, Gustavo e Leandro (ETERNOS MTB), Fábio Dig (Tucunaíra), Paulinho, Betão, Eliseu, Edinho, Juca, Sirvo, Carlão, Carlinho e Luigi, vocês ajudaram a aliviar a pressão. Com vocês por perto... é sempre só mais um dia!

Drica, obrigado por estar ao meu lado quando eu mais preciso. A sua luz me ilumina, desejo estar com você!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro (Processo141705/2014-0), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CNPMA) e ao Projeto MycoAntar (PROANTAR 407230/2013-0, INCT Criosfera) pelo aporte científico, e a Marinha do Brasil pelo apoio logístico durante a Expedição Antártica XXXII, 2014I).

Leonardo Silva

EPÍGRAFE

*"Não é necessário que você veja toda escada,
apenas dê o primeiro passo"*

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Breve história da microbiologia	15
2.1.1. Utilização de micro-organismos por civilizações antigas	15
2.1.2. Desvendando o universo microbiano	15
2.1.3. Avanços para a sistemática microbiana	16
2.2. Actinobacteria - Grupos bacteriano de interesse biotecnológico	17
2.3. Prospecção de agentes bioativos	18
2.3.1. Acesso aos recursos microbianos	20
2.3.2. Prospecção em ambientes extremos	23
2.3.3. Bactérias adaptadas a altas temperaturas	24
2.3.4. Bactérias adaptadas a baixas temperaturas	24
2.4. O Continente Antártico	25
2.4.1. A descoberta do "continente gelado"	25
2.4.2. Características ambientais	26
2.4.3. Vegetação	26
2.4.4. Microbiota antártica nos diferentes habitats	28
2.5. Câncer - Problema de saúde pública mundial	31
2.5.1. <i>Karkínos</i> - O "caranguejo" indesejado	31
2.6. Tipos de tumores e principais características	31
2.6.1. Tumores de partes moles	31
2.6.2. Tumores sólidos	32
2.6.3. Leucemias	33
2.7. Novas estratégias para o tratamento de câncer	34
2.7.1. Zika vírus no tratamento de glioblastomas	34
2.7.2. <i>Salmonella thypimurium</i> geneticamente modificada para imunoterapia	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo principal	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Características do local de amostragem	39
4.2. Coleta das amostras	40
4.3. Análise da comunidade associada à rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por método independente de cultivo	41
4.3.1. Extração de DNA ambiental	41
4.3.2. Preparo da biblioteca 16S rRNA para sequenciamento em plataforma <i>Ion Torrent</i>	42
4.3.3. Processamento dos dados gerados e assinaturas das unidades taxonômicas operacionais	42
4.3.4. Análise de predição funcional para o filo Actinobacteria	43
4.5. Seleção de DNA ambiental e clonagem de insertos gênicos	43
4.5.1. Reparo das extremidades	44
4.5.2. Ligação dos insertos gênicos ao vetor fosmídeo	44

4.5.3. Empacotamento do DNA recombinante	45
4.5.4. Transfecção do hospedeiro	45
4.5.5. Validação da biblioteca de clones	46
4.5.6. Preservação	46
4.5.7. Triagem funcional para L-asparaginases	47
4.6. Acesso a comunidade bacteriana associada à rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por abordagem dependente de cultivo	47
4.6.1. Preparo das amostras de solo e isolamento de actinobactérias	47
4.6.2. Avaliação da diversidade taxonômica dos isolados por sequenciamento parcial do gene 16 rRNA e seleção de taxa representantes	48
4.6.3. Análise da diversidade taxonômica das linhagens isoladas por sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rRNA	49
4.7. Abordagem taxonômica polifásica do isolado CMAA 1533	50
4.7.1. Análise filogenética	50
4.7.2. Avaliação das características culturais e fenotípicas	50
4.7.3. Avaliação quimiotaxonômica	50
4.8. Produção de compostos com propriedades antitumorais	51
4.8.1. Produção de metabólitos secundários em cultivo <i>in vitro</i>	51
4.8.2. Processo de extração dos metabólitos secundários	51
4.8.3. Triagem dos extratos bioativos, por atividade de antagonismo para <i>Pythium aphanidermatum</i> CMAA 243 ^T	52
4.8.4. Avaliação do potencial antiproliferativo <i>in vitro</i> dos extratos brutos, para células tumorais humanas	52
4.8.4.1. Culturas de células tumorais	52
4.8.4.2. Atividade antiproliferativa dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias <i>in vitro</i>	53
4.8.4.3. Avaliação do potencial antiproliferativo	55
4.9. Análise dos extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV) e acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)	56
4.9.1. Cultivo das linhagens selecionadas em escala maior e avaliação do perfil químico dos extratos brutos por CLAE-UV	56
4.9.2. Purificação dos compostos da fração Fr-3, por cromatografia em coluna clássica (CCC) ..	57
4.9.3. Análise dos extratos brutos, frações e subfrações bioativas, por espectrometria de massas via inserção direta (EM-ID e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)	57
4.10. Análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	58
4.11. Análise quimiométrica dos perfis metabolômicos das linhagens do gênero <i>Streptomyces</i> ..	59
5. RESULTADOS	61
5.1. Características do local de coleta	61
5.2. Coleta das amostras	62
5.3. Análise da comunidade bacteriana associada à rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por método independente de cultivo	62
5.3.1. Diversidade taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (UTOs)	62
5.3.2. Predição metagenômica para a comunidade bacteriana total e para o filo Actinobacteria..	64
5.4. Seleção de DNA ambiental e clonagem de insertos gênicos	66
5.4.1. Avaliação da integridade do DNA isolado e validação da biblioteca metagenômica de clones	66
5.4.2. Triagem funcional para L-asparaginases	67
5.5. Acesso a comunidade associada a rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por método	

dependente de cultivo	68
5.1. Isolamento de actinobactérias	68
5.2. Análise da diversidade taxonômica dos isolados, por sequenciamento parcial da região 16S rRNA e seleção de táxons representantes	68
5.3. Identificação taxonômica das linhagens selecionadas, por sequenciamento da região 16S rRNA	71
5.4. Caracterização taxonômica polifásica da linhagem CMAA 1533	72
5.4.1. Análise filogenética	72
5.4.2. Análise quimiotaixonômica	74
5.4.3. Características culturais e fenotípicas	76
5.5. Avaliação do potencial bioativo das linhagens de actinobactérias	79
5.5.1. Reativação das linhagens, produção e extração de metabólitos secundários	79
5.5.2. Triagem dos extratos bioativos, por atividade de antagonismo para <i>Pythium aphanidermatum</i> CMAA 243 ^T	79
5.5.3. Avaliação do potencial antiproliferativo dos metabólitos secundários para células tumorais humanas	80
5.6. Perfil químico dos extratos brutos das linhagens CMAA 1527 e CMAA 1653 (CLAE-DAD e CLAE-EM)	83
5.7. Fracionamento dos extratos brutos (CLAE-UV e CLAE-EM) e avaliação do potencial antiproliferativo das frações majoritárias	86
5.7.1. Análise das frações bioativas por CLAE-EM	89
5.7.2. Caracterização química dos constituintes bioativos da fração Fr-3, por CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN	90
5.8. Perfil metabolômico dos extratos brutos das linhagens <i>Streptomyces</i> spp.	98
6. DISCUSSÃO	101
6.1. Características do local e coleta das amostras	101
6.2. Análise da comunidade bacteriana associada a rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por método independente de cultivo	103
6.2.1. Diversidade taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (UTOs)	103
6.2.2. Predição metagenômica para a comunidade bacteriana total e para o filo Actinobacteria.	105
6.3. Seleção de DNA ambiental, clonagem de insertos gênicos e triagem da biblioteca metagenômica	106
6.3.1. Avaliação da integridade do DNA isolado e reação de clonagem	106
6.3.2. Triagem da biblioteca metagenômica de clones	106
6.3.3. Triagem funcional para L-asparaginases	107
6.4. Acesso a comunidade de actinobactérias associadas a rizosfera de <i>Deschampsia antarctica</i> , por método dependente de cultivo	109
6.4.1. Inferência filogenética para linhagens com potencial biotecnológico e baixo índice de similaridade para o gene 16S rRNA	110
6.4.2. <i>Streptomyces</i> spp.	110
6.4.3. <i>Rhodococcus</i> spp.	113
6.4.4. <i>Nocardia</i> spp.	116
6.5. Classificação taxonômica da linhagem CMAA 1533	118
6.5.1. Apresentação do novo taxon ao genero <i>Rhodococcus</i>	120
6.5.2. Descrição do taxon <i>Rhodococcus psychrotolerans</i> sp. nov.	120
6.6. Triagem das linhagens de actinobactérias para atividade antitumoral	121
6.6.1. Taxonomia das linhagens com atividade antiproliferativa pronunciada	122
6.6.2. Atividade antiproliferativa	124

6.6.2.1. CMAA 1527	124
6.6.2.2. CMAA 1653	124
6.6.3. Compostos bioativos produzidos pelas actinobactérias	125
6.7. Análises quimiométricas dos perfis metabolômicos dos extratos brutos das linhagens <i>Streptomyces</i> spp.	126
7. CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS	129
ANEXOS	165

RESUMO

Actinobactérias da Antártica produtoras de compostos anticâncer

A utilização de produtos naturais para a terapêutica do câncer foi iniciada com a actinomicina D, obtida a partir de culturas de *Streptomyces* e desde então, a busca por compostos bioativos de origem natural constitui uma importante linha de pesquisa. Estima-se que aproximadamente 60% dos agentes antineoplásicos, introduzidos para a terapia do câncer nas últimas décadas, tem origem vegetal ou microbiana. Dentre os micro-organismos proeminentes para produção de compostos ativos, as actinobactérias se destacam pela versatilidade metabólica, praticidade para cultivo *in vitro* e eficiência para produção de compostos com atividade anticâncer. Em seu último relatório, a Organização Mundial da Saúde reportou 8,8 milhões de mortes em decorrência de câncer, no ano de 2017. O índice representa um em cada seis óbitos em todo o mundo, sendo mais expressivo em países de média e baixa renda. Vale ressaltar que avanços significativos foram alcançados nos últimos anos para o tratamento de leucemia aguda infantil e tumores derivados de células germinais. Contudo, tumores sólidos de pulmão, próstata, mama e cólon ainda representam altos índices de mortalidade. Frente a isso, torna-se evidente a necessidade de identificar e desenvolver estratégias para o tratamento da doença. Com intuito de acessar novos recursos microbianos com potencial biotecnológico, a prospecção avança para áreas pouco exploradas, como por exemplo, o Continente Antártico. A Antártica foi o último dos continentes a ser acessado pelo homem e apresenta características edafoclimáticas favoráveis ao endemismo. Em vista da problemática e da potencialidade do Continente Antártico, os recursos microbiológicos associados à rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. foram acessados e avaliados para a produção de compostos com propriedade antitumoral. Em resultado foram obtidos 42.528 clones metagenômicos e 72 linhagens de actinobactérias, dentre as quais *Streptomyces* sp. CMAA 1527, que apresentou pronunciada atividade antiproliferativa *in vitro*, para tumores de mama, pulmão, rim e sistema nervoso central, através da produção de cinerubina B. A análise taxonômica das actinobactérias isoladas revelou a presença de linhagens com baixo índice de similaridade, com as linhagens tipo conhecidas, o que pode significar a presença de novas espécies para os gêneros *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*, reconhecidos pela capacidade de produzir metabólitos ativos e enzimas de interesse biotecnológico. A análise taxonômica polifásica da linhagem CMAA 1533 possibilitou a descrição da espécie *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. (TaxoNumber TA00191; NRRL B-65465^T = DSM 104532^T), grupo bacteriano promissor como agente de biorremediação e produção de compostos bioativos. Com isso, o Continente Antártico foi considerado um ambiente promissor para a busca de novos micro-organismos, dentre eles actinobactérias, eficientes na produção de compostos antitumorais e outras substâncias com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Bioativos; Bioprospecção, Cinerubina B; *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov.

ABSTRACT

Antarctic actinobacteria producing anticancer compounds

The use of natural products for cancer therapy was initiated with the actinomycin D, obtained from *Streptomyces*. Since then, the search of bioactive from natural sources represent an essential line of research. It is estimated that approximately 60% of the antineoplastic agents inserted for the cancer therapy in recent decades have vegetal and microbial origin. Among the prominent microorganisms used to produce active compounds, actinobacterias are known by their metabolical versatility, convenience related to *in vitro* culture, and efficiency on the production of anticancer compounds. The Health World Organization, on its last review, reported 8.8 million of deaths in 2017, caused by cancer. Those numbers represent one out of six deaths worldwide, being more expressive in middle and low income countries. It is worth pointing out that meaningful advances were established in recent years for the treatment of childhood acute leukemia and germ cell-derived tumors. However, solid tumors of the lung, prostate, breast and colon still represent high mortality rates. For this reason, it is necessary to identify and develop strategies for the treatment of the disease. With the aim of accessing new microbial resources that contain biological potential, the prospection advance to areas barely explored, such as the Antarctic Continent. Antarctica was the last of the continents to be accessed by man and presents edaphoclimatic characteristics favorable to endemism. In light of the problematic and the potentiality of the Antarctic Continent, the microbiological resources associated with the rhizosphere of *Deschampsia antarctica* Desv. were accessed and evaluated for the production of compounds with antitumor properties. The results obtained had shown 42,528 metagenomic clones and 72 strains of actinobacteria, among them *Streptomyces* sp. CMAA 1527, which had presented anti-proliferative activity *in vitro* to breast, lung, kidney and central nervous system tumors, through the production of cinerubin B. The taxonomic analysis of the actinobacteria isolated revealed the presence of strains with low rate of similarity, with known type strains, which may mean the presence of new species for the genera *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Streptomyces*, recognized for the ability to produce active metabolites and enzymes of biotechnological interest. The polyphasic approach of the CMAA 1533 strain made possible the description of the species *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. (TaxoNumber TA00191; NRRL B-65465T = DSM 104532T), promising bacterial group as a bioremediation agent and production of bioactive compounds. As a result, the Antarctic Continent was considered a promising environment to search new microorganisms, among them, the actinobacteria, which is efficient on the production of antitumor compounds and other substances with biotechnological potential.

Keywords: Bioactive; Bioprospecting; Cinerubin B; *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas substâncias bioativas e organismos eficientes à produção de compostos com interesse biotecnológico tem impulsionado grupos de pesquisa prospectar ambientes pouco explorados ou de condições ambientais extremas. Nesse sentido, o Continente Antártico apresenta-se como um ambiente promissor, pois se localiza em uma região geograficamente isolada, apresenta características ambientais únicas e é considerado um reservatório biológico praticamente inexplorado (DANILOVICH et al., 2018). Contudo, o “continente gelado” seria um ambiente promissor a busca de substâncias com propriedades antitumorais?

Agentes bioativos de origem natural trouxeram grande contribuição ao campo da terapêutica antineoplásica (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Estima-se que 50% dos agentes anticancerígenos utilizados atualmente tem origem em plantas e micro-organismos, movimentando aproximadamente 60 bilhões de dólares, por ano (AZMAN et al., 2015; CRAGG; NEWMAN, 2012). A maior parte dos quimioterápicos atua especificamente sobre a proliferação das células tumorais, por meio da interrupção do ciclo celular, inibição da vascularização e/ou apoptose seletiva dos tecidos malignos (BARNES et al., 2017).

A incidência de câncer aumentou aproximadamente 20% na última década, representando atualmente a segunda maior causa de morte e um problema de saúde pública mundial (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017, o número de óbitos em decorrência de câncer foi de 8,8 milhões de pessoas. Os tipos mais incidentes de tumores foram: pulmão, mama, sistema digestivo e próstata. Entre homens, câncer de pulmão e próstata apresentam taxas de incidência relativamente próximas (17% e 15%, respectivamente), enquanto em mulheres pode-se observar pronunciada incidência de tumores de mama (25%), em relação aos demais tipos de câncer (sistema digestivo 9%, pulmão 8,5% e colo do útero 8%). Para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevê a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer durante o ano de 2018, dentre os quais próstata e mama serão os tipos mais frequentes (exceto câncer de pele não melanoma). A estimativa de mortes é da ordem de 225 mil, representando um custo aproximado de R\$ 15 bilhões ao ano.

Como forma de tratamento, a terapêutica do câncer pode conciliar processos cirúrgicos para retirada do tecido maligno, e tratamentos de radioterapia e quimioterapia, como forma de inviabilizar o sistema biológico do tumor. Contudo, muitas linhagens tumorais ainda apresentam pronunciada resistência às abordagens usuais e fármacos utilizados, deixando evidente a necessidade do desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas e

agentes bioativos que promovam a expectativa de vida dos pacientes em tratamento (KINGHORN et al., 2016).

Cientes de que as comunidades bacterianas em solos Antárticos apresentam o filo Actinobacteria em abundância, reconhecido grupo produtor de substâncias ativas, e que a região rizosférica desempenha influência biológica para seleção e enriquecimento de grupos microbianos bioativos (ROSSMANN et al., 2017; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013) , as atividades de pesquisa foram centradas em prospectar o microbioma associado à espécie endêmica *Deschampsia antarctica* Desv. e avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* das actinobactérias isoladas, para linhagens tumorais humanas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Breve histórico da microbiologia

2.1.1. Utilização de micro-organismos por civilizações antigas

A descoberta de formas de vida microscópicas ocorreu durante o século XVII, porém processos fermentativos a partir de leveduras para fabricação de cervejas estão reportados aos povos Sumérios e Babilônios, primeiras civilizações da Mesopotâmia (atualmente Iraque e Síria), há cerca de 8 mil anos (DAMEROW, 2012). Posteriormente (há aproximadamente 6 mil anos), também de forma empírica, os Egípcios aplicaram a atividade biológica das leveduras a produção de pães e alimentos similares (DEMAIN; SOLOMON, 1981).

Processos fermentativos não possibilitaram apenas a produção de novos alimentos às antigas civilizações, como também contribuíram significativamente para a preservação dos alimentos por um maior período de tempo. À época, a preservação de alimentos era constituída principalmente pela desidratação dos alimentos por sal ou defumação, até que a prática da utilização do vinagre (subproduto do crescimento de bactérias acéticas) fosse iniciada pelos europeus, durante o império Romano. Outro benefício notório pode ser relatado pela produção de queijos, a partir do crescimento de bactérias lácticas, tal processo possibilitou o aproveitamento nutritivo do leite durante períodos de deslocamento (FREIRE et al., 2016).

2.1.2. Desvendando o universo microbiano

O desenvolvimento da microbiologia como ciência está diretamente relacionado com a invenção do microscópio. A elaboração do primeiro conjunto de lentes está atribuída a Hans Janseen e Zacharias Janseen, durante o ano de 1590. Contudo, os avanços na área microbiológica se deram por meio dos estudos do matemático e historiador natural Robert Hooke e do tecelão Antonie van Leeuwenhoek (MADIGAN et al., 2010).

O livro *Micrographia*, publicado por Hooke em 1655, foi pioneiro em conciliar diversas observações microscópicas, dentre elas a primeira imagem detalhada de estruturas de frutificação de bolores (MADIGAN et al., 2010). Baseado nas informações previamente dispostas por Hooke, Leeuwenhoek utilizou um outro conjunto de lentes, originalmente utilizadas para observação de fibras de tecidos, para realizar observações exploratórias em uma série de infusões. A descoberta de organismos menores que bolores e de movimentação livre, foi enviada para a revista *Royal Society of London* no ano de 1676, através do nome de animálculos. As observações foram publicadas em 1684, porém o real entendimento sobre o

universo microbiano, somente alavancou no século XIX, com os trabalhos realizados pelo químico francês Louis Pasteur e o médico alemão Robert Koch (MADIGAN et al., 2010).

Os experimentos de Pasteur foram responsáveis por elucidar a atividade catalisadora de leveduras em processos fermentativos e para refutação da teoria de geração espontânea. Koch foi pioneiro no cultivo de culturas puras em meios sólidos, metodologia que possibilitou o entendimento e o desenvolvimento da sistemática microbiana, bem como a correlação de determinados organismos e respectivas doenças. Os efeitos do *Bacillus anthracis* e da *Mycobacterium tuberculosis* isolados de indivíduos doentes, sobre indivíduos sadios intencionalmente infectados, possibilitaram que a etiologia de inúmeras doenças fosse estabelecida, ao que ficou conhecido como postulado de Koch (MADIGAN et al., 2010). Apesar do postulado ainda ser considerado “padrão de ouro” para etiologia de inúmeras doenças na microbiologia médica, algumas reconsiderações tiveram de ser realizadas, frente a impossibilidade de isolar muitos agentes patogênicos e a especificidade da doença sobre determinadas condições do hospedeiros (VONAESCH; ANDERSON; SANSONETTI, 2018).

2.1.3. Avanços para a sistemática microbiana

Desde a elaboração dos primeiros conjuntos de lentes para observação de vida microscópica até os dias atuais, o conhecimento sobre a importância da comunidade microbiana aumentou consideravelmente. Martinus Beijerinck estabeleceu a técnica de cultura de enriquecimento e Sergei Winogradsky utilizou o princípio para apresentar as primeiras inferências de grupos bacterianos em processos biogeoquímicos, as quais contribuíram significativamente para a consolidação dos fundamentos da microbiologia do solo e formar as bases para processos biotecnológicos posteriores (MADIGAN et al., 2010; ZAVARZIN, 2006).

A era moderna da microbiologia está centrada nos conhecimentos acumulados ao longo dos anos e avança com o auxílio de novas tecnologias (microscópios eletrônicos com resolução de até centenas de milhares de vezes e o processamento computacional de informações genéticas de culturas puras e comunidades microbianas complexas) (MADIGAN et al., 2010). A organização filogenética de micro-organismos está fundamentada sobre os genes que codificam o RNA ribossomal da subunidade menor (SSU – *Small Subunit*), determinada por Carl Woese, durante a década de 1970 (WOESE; FOX, 1977). O trabalho estabeleceu a organização dos organismos em três domínios da vida: Bacteria, Archaea e

Eukarya. Para micro-organismos procariotos esta subunidade codifica para o gene rRNA 16S e em eucariotos para rRNA 18S. A utilização destes marcadores evolutivos decorre da sua distribuição universal, conservação e tamanho; conjunto de características que possibilitam à reconstrução evolutiva de todos os seres vivos (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WOESE, 1987).

A partir dos anos 90, a massificação do sequenciamento molecular impulsionou a elaboração de diversas plataformas para depósito e análise de sequências de rRNA, como *The Ribosomal Database Project (RDP-II)*, *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e *EzBioCloud Server (EzTaxon)*, as quais possibilitaram melhor detalhamento à filogenia dos domínios Bacteria e Archaea (YOON et al., 2017; NCBI, 2016; COLE et al., 2005). Tais domínios estão constituídos por 35 filos, 80 classes, 178 ordens, 402 famílias e 2552 gêneros (PARTE, 2018; EUZÉBY, 2017) e crescem consideravelmente a medida que novas técnicas são estabelecidas para caracterização e isolamento de novas taxa.

2.2. Actinobacteria – Grupo bacteriano de interesse biotecnológico

O filo Actinobacteria é constituído pelas classes Acidimicrobia, Actinobacteria, Coriobacteria, Rubrobacteria e Thermoleophilia, as quais apresentam alta versatilidade metabólica e desempenham importante atividade à ciclagem de elementos e disponibilização de nutrientes em solos (MONREAL et al., 2018; LIU et al., 2017; NAVARRETE et al., 2013; PIAO et al., 2008). Análises independentes de cultivo estimam que o grupo possa representar de 12 a 20% da biomassa microbiana do solo. Dada sua importância, o filo pode ser empregado como bioindicador para avaliar o impacto do manejo de solos agrícolas, para a comunidade bacteriana do solo (NAVARRETE et al., 2015; POLYANSKAYA et al., 2003).

Como principais características, actinobactérias são bactérias Gram-positivas, possuem alto conteúdo de guanina e citosina (GC) em seu DNA e parede celular formada pelos isômeros L- ou *meso*- do ácido diaminopimélico (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Podem apresentar morfologia variada, desde células unicamente cocoide, bastonete, micélio rudimentar e ramificado altamente diferenciado ou ciclo de desenvolvimento de bastonete para coco (VENTURA et al., 2007; STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997). O metabolismo celular pode variar de aeróbio estrito, anaeróbio facultativo, microaerófilo ou anaeróbio estrito, além de autotrófico ou heterotrófico (MIAO; DAVIES, 2010; VENTURA et al., 2007; GAO; PARAMANATHAN; GUPTA, 2006).

Amplamente distribuídas em habitats terrestres e aquáticos, incluindo ambientes extremos como áreas congeladas, solos desérticos e zonas abissais (SILVA et al., 2018; OKORO et al., 2009; PATHOM-AREE et al., 2006), actinobactérias podem apresentar patogenicidade em humanos e plantas (*Actinomadura* e *Mycobacterium*, *Clavibacter* e *Curtobacterium*, respectivamente), bem como realizar associações benéficas no trato digestivo (*Bifidobacterium* spp.) e fixação biológica de nitrogênio (*Frankia* spp.) (GOODFELLOW, 2012; VENTURA et al., 2007).

A ordem Actinomycetales (classe Actinobacteria) destaca-se por apresentar grande potencial à produção de bioativos de interesse biotecnológico. Neste grupo, o gênero *Streptomyces* é extensivamente reportado como fonte de antibióticos, antifúngicos, antivirais, herbicidas, imunossuppressores e agentes antitumorais, respondendo a mais de 45% do total de agentes bioativos de origem microbiana (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; OLANO et al., 2009; NEWMAN; BÉRDY, 2005).

Porém, ainda existe um grande arcabouço metabólico a ser explorado, análises genômicas demonstraram que *Streptomyces avermitilis* MA-4680 e *Streptomyces coelicolor* A(3)2 possuem 20 ou mais vias biossintéticas para produção de metabólitos secundários potencialmente ativos (IKEDA et al., 2003; BENTLEY et al., 2002). Goodfellow e Fiedler (2010) apresentaram a estimativa de que apenas 10% dos produtos naturais de *Streptomyces* spp. estejam conhecidos e consideram as novas ferramentas moleculares de predição funcional uma importante via para descoberta de novos agentes bioativos. Nesse sentido, Rutledge e Challis (2015) reportam a utilização das ferramentas computacionais AntiSMASH (*Antibiotic and Secondary Metabolite Analysis Shell*) (MEDEMA et al., 2011) e BAGEL3 (*Bacteriocin Genome Mining Toll*) (van HEEL et al., 2013) na prospecção de novos clusters gênicos e apresentam estratégias para ativação de vias biossintéticas silenciosas em condições laboratoriais.

2.3. Prospecção de agentes bioativos

A busca por compostos inibidores de crescimento ou eficientes para morte celular, a partir de bibliotecas de moléculas sintéticas, deu início ao que chamamos de prospecção. Os primeiros agentes ao controle de micro-organismos patogênicos foram corantes, os quais desencadeavam inúmeros efeitos alérgicos (BROWN; WRIGHT, 2016). A percepção de que os micro-organismos produziam metabólitos ativos como estratégia natural de

sobrevivência trouxe uma nova ótica sobre as fontes de prospecção, em especial às ordens microbianas Actinomycetales e Bacillales.

O primeiro antibiótico de origem microbiana a ser comercializado foi a gramicidina (1939). A molécula corresponde a um polipeptídeo e foi descoberta pelo microbiologista René Dubos, a partir de culturas de *Bacillus brevis*. A ação antibiótica advém da formação de canais de íons e desregulação da membrana celular (KELKAR; CHATTOPADHYAY, 2007). Frente às evidências clínicas positivas da gramicidina, o farmacologista Howard Florey e o bioquímico Ernst Chain aplicaram seus esforços para produção em maior escala, purificação e viabilização comercial da substância penicilina, descoberta por Alexander Fleming, em 1928 (van EPPS, 2006).

Tais descobertas impulsionaram a bioprospecção nas décadas seguintes (1940-1960), dando origem a “Era de Ouro dos Antibióticos”. Selman Waksman estabeleceu a primeira plataforma para prospecção de produtos de origem microbiana *in vitro* (LEWIS, 2012). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de antibióticos isolados durante o período supracitado, bem como o mecanismo de ação e a classe química dos compostos.

Tabela 1: Substâncias isoladas durante a "Era de Ouro dos Antibióticos" (1940 – 1960)

Antibiótico	Mecanismo	Classe	Origem
Sulfanilamida	Citostático (síntese de folato)	Sulfonamidas	Síntese
Penicilinas, Carbapenen	Citocida (síntese de parede celular)	β -Lactâmicos	Natural
Canamicina, Neomicina	Citocida (síntese proteica)	Aminoglicosídeos	Natural
Tetraciclina, Doxiciclina	Citostático (síntese proteica)	Tetraciclinas	Natural
Cloranfenicol	Citostático (síntese proteica)	Cloranfenicol	Natural
Eritromicina	Citostático (síntese proteica)	Macrolídeos	Natural
Vancomicina	Citocida (síntese de parede celular)	Glicopeptídeos	Natural
Linezolida	Citostático (síntese proteica)	Oxazolidinonas	Síntese
Rifamicina	Citocida (síntese de RNA)	Ansamicinas	Natural
Ciprofloxacina	Citocida (síntese de DNA)	Quinolonas	Natural
Pristinamicina	Citocida (síntese proteica)	Estreptograminas	Natural

* Adaptado de Brown; Wright, 2016

Apesar de constituir uma abordagem relativamente dispendiosa, a busca por substâncias bioativas em ambiente marinho atraiu a atenção de inúmeros segmentos de pesquisa. A descoberta das substâncias espongotimidina e espongouridina, a partir de esponjas da espécie *Tethya crypta* no início dos anos 50 possibilitou o desenvolvimento de compostos antivirais e anticânceres (DEMUNSHI; CHUGH, 2010) e impulsionou os trabalhos de prospecção em organismos marinhos.

Desde então, muitos compostos bioativos foram isolados a partir de macro e micro-organismos. Paul Scheuer e John Faulkner (pesquisadores das Universidades do Hawaii e Califórnia, respectivamente), exploraram metabólitos secundários de esponjas, algas, celenterados, ascídias e briozoários durante 40 anos e reportaram aproximadamente 20.000 compostos bioativos, entre antibióticos, antivirais, antitumorais e anti-inflamatórios (GALLIMORE, 2017). O levantamento realizado por Hu e colaboradores (2011), indicou que 20% de todos os produtos bioativos acessados através de recursos do mar provêm de micro-organismos.

A partir dos anos 1960, o re-isolamento de substâncias bioativas impulsionou uma nova abordagem para prospecção; a modificação de moléculas previamente conhecidas por síntese química. O período ficou conhecido como a “Era da Química Medicinal” e marcou o início do tratamento de cepas resistentes, como por exemplo *Mycobacterium tuberculosis* e *Acinetobacter baumannii* (BROWN; WRIGHT, 2016).

A transformação das moléculas bioativas mostrou-se eficiente ao tratamento das principais doenças durante os anos 1960 e 1990. Porém, o eminente sucesso desestimulou a busca por novas substâncias bioativas, até que a recente onda de resistência bacteriana trouxesse à tona a necessidade de novos esforços de prospecção (BROWN; WRIGHT, 2016; KING et al., 2014). Assim, pesquisadores em todo o mundo aprenderam na prática o valor dos recursos naturais, em especial os agentes microbianos, para a descoberta de compostos líderes e potenciais modelos para a produção pela indústria farmacêutica. Frente ao exposto, pode-se considerar que a bioprospecção encontra-se novamente impulsionada, tendo como adjuvante a aplicação de estratégias e tecnologias inovadoras, capazes de viabilizar o cultivo em laboratório de novos grupos microbianos.

2.3.1. Acesso aos recursos microbianos

Durante muitos anos, o cultivo de bactérias em laboratório (*in vitro*) foi realizado sobre fatias de batatas, até que Robert Koch iniciasse o uso de gelatina como agente

solidificante de soluções nutritivas. A utilização do ágar veio posteriormente, frente a limitação da gelatina solidificar-se a 37 °C (temperatura ótima para o crescimento da maior parte dos patógenos humanos) e a eficácia de inúmeros grupos bacterianos em hidrolisá-la (HESSE, 1888). Porém, a técnica usual era constituída pela sobreposição do substrato nutritivo sobre lâminas de vidro, o que ocasionava a contaminação das culturas por agentes biológicos externos e dificultava o armazenamento de grandes quantidades de material. A solução para o problema foi apresentada em 1887, pelo bacteriologista alemão Richard Petri, o qual conciliou os conhecimentos previamente descritos para desenvolver o conjunto de placas em dupla face, as quais poderiam ser esterilizadas separadamente do meio nutritivo, fechadas para reduzir os riscos de contaminação e empilhadas durante o período de incubação e armazenamento (PETRI, 1887).

Desde então, placas de petri constituem a principal ferramenta para isolamento e cultivo de micro-organismos *in vitro*. Contudo, estima-se que apenas 1% da microbiota total esteja sendo recuperada através dos métodos usuais de cultivo (XIONG, 2016). Baixa abundância, crescimento fastidioso, especificidades nutricionais, relações interespecíficas e condições ambientais estão relacionadas como principais causas à limitação da viabilidade biológica da maior parte dos micro-organismos em laboratório (VARTOUKIAN et al., 2010).

Frente a isso, novos mecanismos para acessar grupos microbianos diretamente no ambiente foram estabelecidos. Kaeberlein, Lewis e Epstein (2002) elaboraram a primeira câmara de difusão, constituída por uma pequena cavidade separada por membranas de policarbonato, as quais possibilitariam a passagem de fluídos marinhos e a fixação de grupos bacterianos *in situ*. A estrutura favoreceu a identificação de um novo taxon para classe Sphingobacteria e tornou evidente a dependência deste isolado para o crescimento *in vitro* da espécie *Arcobacter nitrofigilis*.

Em seguida, Bollmann, Lewis e Epstein (2007) replicaram a metodologia de forma sucessiva e observaram a seleção de grupos bacterianos de menor abundância (*Acidobacteria* e *Verrucomicrobia*) nas câmaras subsequentes (segunda, terceira e quarta geração). O experimento também evidenciou a efetividade da câmara de difusão, frente ao modelo usual de plaqueamento direto de suspensões celulares e diluição seriada. Através das câmaras de difusão foram recuperados isolados de 10 diferentes filos bacterianos, enquanto apenas 6 filos foram recuperados pela metodologia convencional. Ademais, dos 44 isolados com índice de similaridade abaixo de 97% para sequências de 16S rRNA, 70% foram recuperados exclusivamente nas câmaras de difusão.

No artigo “*Short peptide induce an uncultivable microorganism to grow in vitro*”, NICHOLS et al., (2008), não apenas avaliaram a eficácia das câmaras de difusão ao isolamento e enriquecimento de grupos bacterianos raros, como também ampliaram os conhecimentos sobre moléculas sinalizadoras na ativação biológica de espécies até então não cultivadas em laboratório. O grupo de pesquisa denominou como linhagens auxiliares, cepas determinantes ao crescimento de taxa específicos e apresentou a relevância da concentração do peptídeo sinalizador LQPEV para ativação biológica do isolado *Psychrobacter* sp. MSC33. Posteriormente, os pesquisadores utilizaram o sistema de multi cavidades I-chip (*Isolation chip*) para isolamento de células microbianas *in situ* e relataram a possibilidade de “domesticação” de linhagens microbianas (NICHOLS et al., 2010).

O sistema de microtúbulos HFMC (*hollows-fiber membrane chambre*) é constituído por fluoreto de polivinilideno (PVDF) e pode conter 48 ou 96 cavidades (AOI et al., 2009). O sistema permite que comunidades microbianas previamente inoculadas sejam incubadas em condições ambientais reais ou manipuladas mediante controle do sistema de alimentação (fluídos nutritivos, aeração, temperatura, pH). Membranas com porosidade de 0,1 µm permitem a transição de nutrientes, metabólitos e moléculas sinalizadoras, e restringe a movimentação das células no interior da câmara. A avaliação quantitativa demonstrou que a utilização de HFMC permitiu a recuperação de 12,3%, 21% e 9,2% das células inoculadas, enquanto o plaqueamento das suspensões celulares em placas de petri possibilitou a recuperação de apenas 2,1%, 1,4% e 0,2% das células inoculadas.

Diferentemente dos sistemas supracitados, fabricados por indústrias especializadas, o sistema I-tip (*in situ cultivation by tip*) é constituído basicamente por uma ponteira de pipeta (20-200 µL), preenchida com meio de cultivo semi-sólido, esferas de vidro e vedação impermeável. Apesar da simplicidade do sistema, Jung e colaboradores (2014) conseguiram avaliar sob um ótica ecológica, a diversidade da comunidade microbiana associada às espécies de esponjas marinhas *Baicalospongia* sp. e *Lubormirskia baicalensis*.

Em alternativa aos métodos de isolamento, a clonagem de insertos gênicos em linhagens hospedeiras de fácil manipulação *in vitro* constitui um viés importante da bioprospecção. A metagenômica permite que recursos genéticos sejam explorados a partir de sequenciamento massivo e busca por marcadores característicos em plataformas de bioinformática ou através de triagens funcionais às propriedades de interesse (VESTER; GLARING; STOUGAARD, 2015).

O tamanho dos insertos carregados é determinado pelo vetor empregado na reação de clonagem: plasmídeos suportam fragmentos de até 15 kb, fosmídeos e cosmídeos suportam

fragmentos entre 25-35 e 25-40 kb, respectivamente e o cromossomo artificial bacteriano (BAC) suporta fragmentos de até 200 kb (EKKERS et al., 2012). A inserção de fragmentos gênicos maiores possibilita que clusters completos sejam incorporados, aumentando as chances de sucesso na triagem funcional (expressão heteróloga). Contudo, a manipulação de tais fragmentos não constitui um procedimento simples (VESTER; GLARING; STOUGAARD, 2015).

Outra condição determinante para a eficiência da expressão heteróloga é o hospedeiro da reação. Apesar de *Escherichia coli* se estacar como principal hospedeiro em bibliotecas metagenômicas, inúmeras limitações foram reportadas ao longo dos exercícios de prospecção (REBETS et al., 2017; AAKVIK et al., 2011; van ELSAS et al., 2008; WARREN et al., 2008; GABOR et al., 2004), assim linhagens bacterianas dos gêneros *Burkholderia* (CRAIG et al., 2010), *Bacillus* (BIVER et al., 2013), *Sphingomonas*, (SUAR et al., 2004), *Streptomyces* (McMAHON et al., 2012) e *Pseudomonas* (CUSANO et al., 2006) foram desenvolvidas como hospedeiros de clonagem e expressão.

O acesso aos recursos microbianos, através de ferramentas independentes de cultivo, tem possibilitado a descoberta de diversas substâncias de interesse biotecnológico. A revisão “*The great screen anomaly – a new frontier in product discovery through functional metagenomics*” (EKKERS et al., 2012), apresenta uma série de inovações alcançadas por empresas como BASF, Syngenta Morgen, Roche Vitamins, Sukahan e Libragen, as quais favoreceram indústrias do segmento de alimentos (enzimas), áreas farmacêuticas (biometabólitos) e medicina (antibióticos).

Assim como os avanços metodológicos, a prospecção em ambientes pouco acessados ou de condições extremas pode favorecer a descoberta de novos organismos e compostos bioativos. Ambientes extremos atraem a atenção de grupos de pesquisas, uma vez que as pressões de seleção podem favorecer o estabelecimento de características biológicas únicas, bem como a produção de compostos diferenciados.

2.3.2. Prospecção em ambientes extremos

A busca por conhecimento tem impulsionado pesquisas em ambientes inóspitos e sob condições extremas há muitos anos. Em termos gerais, ambientes extremos são subdivididos em dois grupos: físicos (temperatura, pressão e radiação) e geoquímicos (pH e salinidade) (van den BURG, 2003). Micro-organismos podem ser classificados de acordo com tais características ambientais, podendo ainda ser subdivididos entre obrigatórios ou tolerantes.

2.3.3. Bactérias adaptadas a altas temperaturas

Bactérias da ordem Chlamydobacteriales foi o primeiro grupo reportado em altas temperaturas (termófilas). Willian Brewer isolou algumas culturas em 1866, a partir de nascentes termais na Califórnia (Estados Unidos) (PIKUTA; HOOVER; TANG 2007). A descoberta possibilitou o estudo de enzimas termo estáveis, como por exemplo a *Taq polimerase*, obtida da bactéria *Thermus aquaticus* (BROCK; FREEZE, 1969).

A bactéria *Pyrolobus fumarii* foi considerada por muitos anos a espécie limite da termo resistencia, podendo manter-se ativa em temperatura de até 113 °C. Contudo, a espécie *Geogemma barossii* mostrou-se biologicamente viável após exposição por duas horas a 130 °C., o que tem levado alguns pesquisadores reconsiderarem os limites térmicos para a vida em altas temperaturas (COWAN, 2004; KASHEFI; LOVLEY, 2003; BLOCHL et al., 1997).

A possibilidade da presença de micro-organismos a centenas de metros abaixo da superfície terrestre foi primeiramente reportada pelo geólogo Edson Bastin em 1920. Após alguns anos (1926), Bastin teve apoio do microbiologista Frank Greer para obter as primeiras culturas bacterianas a partir de águas subterrâneas (FREDRICKSON; ONSTOTT, 1996). Interessado em saber quais os possíveis impactos dessa microbiota aos reservatórios de resíduos tóxicos e câmaras de materiais radioativos, o geólogo Frank Wooper estabeleceu em 1980 o Programa de Ciência Subterrânea, formado por geólogos, químicos e microbiologistas, os quais reportaram a presença de bactérias em temperaturas superiores a 75 °C, e aproximadamente 2.800 metros da superfície terrestre (FREDRICKSON; ONSTOTT, 1996).

2.3.4. Bactérias adaptadas a baixas temperaturas

O globo terrestre é constituído majoritariamente por ambientes gelados (temperaturas abaixo de 5 °C), entre cumes de montanhas, regiões polares e leitos oceânicos (MARGESIN; MITEVA, 2011). O estudo de bactérias em tais ambientes teve início com Forster em 1887, ao observar a presença de grupos bacterianos associados a peixes em temperaturas próximas a 0 °C (HOYOUX et al., 2004). O termo psicofílico, o qual designa organismos capazes de crescer exclusivamente em temperaturas abaixo de 15 °C, somente foi determinado em 1902, por Schmidt-Nielsen (MORITA, 1975).

Rivkina, Friedmann e McKay (2000) e Carpenter, Lin e Capone, (2000) avaliaram o potencial de atividade metabólica *in vitro*, em bactérias provenientes de solos congelados e neve, respectivamente, e constataram que apesar da taxa de crescimento ser relativamente lenta, grupos bacterianos mantêm o desenvolvimento celular em temperaturas abaixo de -17

°C. O limite térmico para a vida microbiana em baixas temperaturas ainda não está completamente estabelecido, visto as estratégias evolutivas estabelecidas por organismos dos domínios Archaea e Bacteria (DEMING, 2002) e a possibilidade da transferência lateral de genes entre tais comunidades microbianas (WELLS; DEMING, 2003; HOLLIBAUGH; BANO; DUCKLOW, 2002; BEJA et al., 2002).

Enzimas eficientes em baixas temperaturas, complexos anti-congelamento, exopolissacarídeos crioprotetores e grânulos glicoproteicos (MARTÍNEZ-ROSALES et al., 2012; CASANUEVA et al., 2010; DEMING, 2002) estão entre algumas das adaptações evolutivas à vida em baixa temperatura que despertaram o interesse biotecnológico. Marx e colaboradores (2007) apresentaram o artigo “*Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms*”, tornando evidente a aplicabilidade de tais substâncias. No trabalho, os autores reportam uma série de especificidades enzimáticas capazes de beneficiar processos da indústria têxtil e alimentícia, além da relação de patentes para produtos e processos decorrentes da prospecção em ambientes gelados.

2.4. O Continente Antártico

2.4.1. A descoberta do “continente gelado”

Localizado na porção meridional do globo terrestre e protegido pela confluência de fortes correntes oceânicas, o Continente Antártico foi o último dos continentes a ser descoberto. O explorador inglês James Cook foi pioneiro em cruzar o Círculo Polar Antártico (1772-1775), porém não obteve sucesso em determinar a existência de um possível continente austral, por conta da limitação visual causada pelo característico nevoeiro da região e dificuldade para navegação (FOGG, 2000).

Durante os anos 1822-1824, o navegador James Weddell realizou proeminente contribuição, ao estabelecer rotas livres de gelo para navegação, as quais favoreceram as expedições posteriores dos exploradores Henry Foster, James Ross, Copley Medallist e Charles Wilkes. Contudo, tais expedições estavam centradas em estabelecer a existência de um possível novo continente e cartas náuticas para navegação, sendo constituída principalmente por cartógrafos navegadores e bravos exploradores. Consequentemente, poucos registros biológicos foram realizados nas incursões, até que em 1872, Thomas Huxley fomentou a expedição britânica a bordo do navio *Challenger*, o qual foi devidamente equipado para inferências científicas, além dos naturalistas Benjamin Carpenter e Wyville Thomson. O retorno da expedição ocorreu em 1876, contendo as primeiras amostras de

sedimentos oceânicos, solos, macro-organismos e água marinha provenientes da região antártica, as quais podem ser consideradas um marco na exploração biológica no extremo do hemisfério Sul (FOGG, 2000; 1992).

2.4.2. Características ambientais

O continente Antártico é considerado um dos habitats mais extremos do planeta. Durante a maior parte do ano, a região apresenta temperaturas entre -20 e -60 °C, baixa incidência de luz solar e ventos superiores a 100 quilômetros por hora (km/h). O intervalo entre os meses Dezembro e Março constituem o período de maior atividade biológica da região, em que temperaturas podem variar entre -10 e 5 °C, luminosidade constante e altos índices de radiação ultravioleta (PECK; CONVEY; BARNES, 2006).

A Antártica possui aproximadamente 14 milhões de quilômetros quadrados (km²), no entanto, entre os meses de Abril e Novembro, a área pode atingir aproximadamente 23 milhões de km², devido o congelamento dos oceanos adjacentes (THOMAS et al., 2017). Apresentando áreas costeiras com elevado índice de precipitação e ciclos de degelo, como por exemplo a Península Antártica, regiões montanhosas permanentemente cobertas por neve, como o Maciço Vinson, e vales livres de gelo como o deserto de McMurdo, o “Continentes Gelado” pode apresentar um grande diversidade de habitats e espécies endêmicas, as quais tem atraído a atenção da comunidade científica nos últimos anos (WLOSTOWSKI; GOOSEFF; ADAMS., 2018; BOWMAN et al., 2016; HUGHES et al., 2015; IAKOVENKO et al., 2015).

2.4.3. Vegetação

As características ambientais do Continente Antártico constituem um dos cenários mais estressantes à sobrevivência vegetal. Dessecação, abrasão eólica, altos índices de radiação UV-B, baixa disponibilidade de água, solo oligotrófico e baixas temperaturas estão entre os principais limitantes ao estabelecimento de espécies vegetais (CONVEY et al., 2014; ROBINSON; WASLEY; TOBIN, 2003; ALBERDI et al., 2002).

Somente duas espécies de plantas vasculares são encontradas naturalmente no continente, *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*, popularmente chamadas de gramínea antártica e mosto de pérolas, respectivamente (ANDROSIUK et al., 2015;

GIELWANOWSKA et al., 2005). Inúmeros grupos de pesquisas empenham-se ao entendimento dos processos adaptativos destas espécies vegetais, bem como a exploração dos potenciais biotecnológicos intrínsecos à sobrevivência de plantas em condições adversas (TORRES-DIAZ et al., 2016; CAVIERES et al., 2016).

O maior interesse pela gramínea *Deschampsia antarctica* é justificado pelo endemismo da espécie ao Continente Antártico. Diversos autores reportaram a estrita relação desta espécie com musgos antárticos do gênero *Sanionia*, os quais possibilitam a formação de microambientes (proteção térmica, disponibilização de nutrientes e manutenção da humidade do solo) para o desenvolvimento de *Deschampsia antarctica* (CAVIERES et al., 2016; PARK; AHN; LEE, 2013; CASANOVA-KATNY; CAVIERES, 2012; DAY; RUHLAND; XIONG, 2008).

Contudo, *Deschampsia antarctica* apresenta adaptações evolutivas próprias à sobrevivência nas particularidades ambientais da região. Kohler e colaboradores (2017) apresentam a eficiência da espécie para produção de lipoperóxidos (agentes antioxidantes), em resposta a intensa incidência de radiação UV-B e indicam a possibilidade de uma nova via fotossintética, caso exista deficiência dos fotossistemas PSI e PSII (*photosystem I e II*). Gielwanowska e Szczuka (2005) reportam modificações fenotípicas favoráveis ao rápido desenvolvimento vegetal, nos sistemas respiratórios e fotossintéticos, como a alta densidade de estômatos por área foliar, a formação de vesículas nos cloroplastos e a forte aderência de peroxissomos ou mitocôndrias aos cloroplastos. Altas porcentagens de ácidos graxos saturados e deidrinas em tecidos foliares, acúmulo de prolina e sacarose nas extremidades das folhas, produção de complexos poli proteicos e enzimas anti-congelamento possibilitam que a gramínea *Deschampsia antarctica* suporte temperaturas de até -17 °C (CAVIERES et al., 2016; CHEW et al., 2012; OLAVE-CONCHA et al., 2007; ALBERDI et al., 2002).

Associações mutualísticas entre *Deschampsia antarctica* e fungos micorrízicos ou bactérias fixadoras de nitrogênio não são conhecidas, porém os grupos de pesquisa de Rosa et al., (2009) e Upton, Newsham e Read (2009; 2008) relatam a estrita associação entre a gramínea e fungos negros endofíticos, as quais possivelmente estejam relacionados a processos de nutrição. Hill e colaboradores (2011) demonstraram que aminoácidos livres e pequenas cadeias de peptídeos presentes no solo podem ser diretamente assimilados por *Deschampsia antarctica*, como forma de contornar a baixa disponibilidade de nitrogênio mineralizado nos solos antárticos.

2.4.4. Microbiota antártica nos diferentes habitats

A constituição taxonômica das comunidades microbianas nos diferentes habitats de gelo tende a ser variável. A comunidade bacteriana em geleiras formadas pelo congelamento de água marinha na Antártica é constituída majoritariamente por grupos bacterianos das classes Flavobacteriia (gêneros *Polaribacter*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus* e *Flavobacterium*) e Gammaproteobacteria (gêneros *Glaciecola* e *Colwellia*), podendo também conter indivíduos das classes Alphaproteobacteria, Verrucomicrobia e Bacilli, em menor abundância (COWIE et al., 2014).

A predominância de grupos heterotróficos em geleiras marinhas é decorrente da habilidade dos grupos bacterianos utilizarem a matriz de exopolissacarídeos (EPS) das algas “aprisionadas” no gelo (ASLAM et al., 2012a; GROSSMANN; DIECKMANN, 1994). Contudo, Koh e colaboradores (2010) reportaram o potencial das classes Flavobacteriia, Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria realizarem a suplementação nutricional por meio da proteína fotoativa proteorodopsina, o que trouxe novas perspectivas à ecologia microbiana de ambientes congelados.

O florescimento de cristais de gelo, sobre a superfície de mares congelados constitui um habitat particularmente diferenciado aos demais ambientes antárticos (BARBER et al., 2014; BOWMAN et al., 2013). A comunidade microbiana deste ambiente é constituída majoritariamente por bactérias da ordem Rhizobiales, as quais não apresentam capacidade para fixação de nitrogênio e nodulação, em virtude da deficiência dos genes *IAH* (*indole-3-acetamine hydrolase*), *NifH* (*dinitrogenase reductase*) e *NodA-J* (*bacterial nodulatoin*) (BOWMAN et al., 2014).

Juntamente com as florações de gelo, nota-se o aumento da salinidade e a maior disponibilidade de compostos orgânicos no ambiente, devido a pronunciada produção de EPS por membros dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhisobium*, *Sphingomonas*, *Moorela* e *Cellulophaga*. Diferentemente das matrizes poliméricas secretadas pelas algas em gelos marinhos, exopolissacarídeos em florações de gelo são degradadas e disponibilizadas para grupos microbianos heterotróficos, a partir de fotólise e intempéries atmosféricas (BOWMAN et al., 2013; ASLAM et al., 2012b; BOWMAN; DEMING, 2010).

Os microambientes formados pelo florescimento dos cristais de gelo ocorrem por um curto período de tempo, sendo colapsados após o acúmulo de neve sobre as sensíveis estruturas, dando origem a um novo microambiente altamente salinizado. Apesar do estudo apresentado por Ewert e colaboradores (2013) reportar que 85% das células microbianas neste novo ambiente encontram-se em estado de morte celular, estudos recentes asseguram que

novas abordagens devam ser realizadas para assegurar a baixa atividade biológica após as florações de gelo (BOETIUS et al., 2015; BARBER et al., 2014).

A camada superficial dos glaciares sofre constante influência atmosférica. A deposição de neve ocasiona incremento de micro-organismos, nutrientes e minerais aos glaciares, os quais modulam a dinâmica biológica do habitat (IRVINE-FYNN et al., 2012). A maior atividade biológica (*hotspots*) concentra-se em fissuras ou buracos (*cryoconite holes*) formados a partir da deposição de partículas sólidas, sobre a superfície de gelo. Neste microambiente nota-se a pronunciada interação entre micro-organismos fotossintetizantes e grupos heterotróficos (STIBAL; SABACKA; ZAESKY; 2012).

Os gêneros *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Nostoc* (filo Cyanobacteria) constituem importantes colonizadores primários em fissuras de glaciares, disponibilizando constituintes orgânicos e formando aglomerados minerais para comunidade bacteriana heterotrófica subjacente (HODSON et al., 2008; STIBAL; SABACKA; KASTOVSKA, 2006). Apesar de representar menor abundância, os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteriodetes, Acidobacteria, Chloroflexi e Planctomycetes também estão reportados como importantes colonizadores das fissuras de glaciares (EDWARDS et al., 2014; SINGH; SINGH; DHAKEPHALKAR, 2014).

Durante as épocas mais frias os glaciares aumentam seu tamanho, fazendo com que a porção inferior da geleira tenha um forte atrito com o leito rochoso. O processo denominado movimentação dos glaciares ocasiona a formação de detritos basais ricos em minerais e sedimentos orgânicos e possibilita novos nichos para colonização de grupos microbianos (BOETIUS et al., 2015).

Neste ambiente, a formação rochosa constitui o principal modulador da comunidade microbiana primária, formada basicamente por bactérias quimiolitotróficas, capazes de fixar carbono inorgânico, a partir de reações químicas dos constituintes dos detritos subglaciais (SHTARKMAN et al., 2013). Fendas geotermiais podem também contribuir significativamente com a modulação da comunidade microbiana, através da formação de lagos subglaciais e favorecimento de grupos heterotróficos. Christner e colaboradores (2014) reportaram a presença de aproximadamente $1,3 \times 10^5$ células bacterianas, por mL de água do lago subglacial Whillans, bem como a importância desta diversificada comunidade aos demais ecossistemas Antárticos. Atualmente, cerca de 400 lagos subterrâneos estão catalogados no Continente Antártico (SIEGERT; ROSS; LeBROCQ, 2016), apresentando predominância das classes Betaproteobacteria, Actinobacteria e Bacteriodetes (BOETIUS et al., 2015, CHRISTNER et al., 2014; SKIDMORE et al., 2005).

Solos permanentemente congelados (*permafrost*) correspondem a aproximadamente 26% da superfície terrestre e podem apresentar profundidade superior a 1000 metros (m). A idade de congelamento dos solos antárticos é estimada em 30 milhões de anos, o que torna esse ambiente um repositório biológico de eras passadas e importante área para estudos científicos. Recentemente, a astrobiologia tem utilizado este ambiente como simulador das características do planeta Marte, o que tem possibilitado inferências importantes à vida em outros planetas (MICKOL; TAAKAGI; KRAL, 2018; HAUBER et al., 2018).

Pioneiros à exploração microbiológica de *permafrost* James e Sutherland, Boyd e Boyd e Harowitz e colaboradores consideraram o ambiente impróprio ao estabelecimento de qualquer comunidade biológica, relacionando os poucos isolados recuperados em laboratório como possíveis contaminantes (JAMES; SUTHERLAND, 1942; BOYD; BOYD, 1964; HAROWITZ et al., 1972). Gilichinsky et al., (1992) e Shi et al., (1997) trouxeram nova compreensão sobre a dinâmica microbiológica de *permafrost*, ao determinarem a presença de microambientes com água em estado líquido, os quais possibilitam a ativação de grupos microbianos em estado de dormência (anabiose), os quais já haviam sido reportados anteriormente.

Apesar dos organismos eucariotos apresentarem baixa taxa de crescimento sob cultivo *in vitro*, análises microscópicas de solos permanentemente congelados indicam a relação de 10:1, entre células eucarióticas e procarióticas (STEVEN et al., 2006). *Cryptococcus*, *Rhodotorulla* e *Saccharomyces* estão entre os gêneros eucarióticos frequentemente isolados de *permafrost*. Entre procariotos, os gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Psychrobacter*, *Streptomyces*, *Rhodococcus* e *Paenibacillus* apresentam maior taxa de recuperação pelas abordagens tradicionais de cultivo (BAKERMANS et al., 2003; VOROBYOVA et al., 1997).

O artigo “*Characterization of the structure of the prokaryotic complex of Antarctic permafrost by molecular genetic techniques*” (MANUCHAROVA et al., 2016) apresenta a utilização de pirofosfato de potássio, resorcinol metil e autolisado de levedura, como forma de lavagem e ativação de células em estado de anabiose. Como resultado, o grupo de pesquisa conseguiu reverter o estado de dormência de aproximadamente 10% da biomassa microbiana total do solo, recuperar isolados dos gêneros *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Variovorax* e *Brevibacillus* (Proteobacteria e Firmicutes) e selecionar linhagens de *Brevibacillus brevis* eficientes para a produção de enzimas hidrolíticas.

2.5. Câncer – Problema de saúde pública mundial

2.5.1. *Karkínos* – O “caranguejo” indesejado

Câncer é o termo genérico empregado a um conjunto superior a 100 doenças diferentes, podendo haver distinção entre caráter benigno e maligno. Pode ser descrito como uma doença poligênica e apresenta como principal característica o crescimento desordenado do tecido celular. A proliferação do tumor é invasiva as células sadias adjacentes e pode apresentar resistência a apoptose. A característica longitudinal de crescimento foi responsável pelo nome câncer, derivado do latim *Karkínos*, o qual significa caranguejo.

O surgimento e o desenvolvimento do tumor, processo denominado carcinogênese, pode ser decorrente de fatores exógenos (hábito alimentar, estilo de vida, agentes físicos, químicos e/ou biológicos) (KOGURE; KATAOKA, 2017; ONO et al., 2012; MURAKAMI et al., 2007) ou endógenos (deficiência no sistema imunológico, endócrino e/ou genético, processos inflamatórios, além de idade e/ou condições fisiológicas) (MIAO et al., 2017; TOKUNAGA et al., 2014; OHSHIMA et al., 2005; 2003).

A carcinogênese é constituída pelas etapas de iniciação, promoção e progressão (OLIVEIRA et al., 2007). A fase de iniciação é caracterizada pela exposição celular primária a agentes cancerígenos e alterações genéticas clinicamente imperceptíveis. O estágio de promoção é caracterizado pela “ativação” das células pré-iniciadas por agentes oncopromotores e conseqüentemente a alteração fisiológica do tecido celular sadio para tecido maligno. A interrupção do agente oncopromotor nesta fase pode inativar o processo de alteração celular. No estágio de progressão, evidências clínicas da doença tornam-se aparentes e a proliferação celular descontrolada torna-se um processo fisiologicamente irreversível.

Perdas cromossômicas e danos no processo de reparo do DNA estão relacionados ao desenvolvimento de inúmeros outros tipos de câncer, conforme Hagmar et al., (1998) e Bonassi et al., (2007). Dentre os processos mais relevantes ao desenvolvimento tumoral destacam-se as disfunções gênicas relacionadas ao controle da proliferação celular e reparo de danos do DNA (OJOPI; BERTONCINI; NETO, 2004).

2.6. Tipos de tumores e principais características

2.6.1. Tumores de partes moles

Tumores de partes moles (tecido celular entre a epiderme e as vísceras) podem ser formados em toda a extensão do corpo, porém, a maior parte dos casos está relatada em braços, pernas, tórax e abdômen. Em algumas ocasiões, o desenvolvimento do tumor pode ser

assintomático, até que o aglomerado celular torne suficientemente grande para pressionar órgãos adjacentes e causar incômodo. Em outros casos, a formação de nódulos pode ser brevemente observada, apresentando sensibilidade na área de acometimento do tumor. Entre os diversos tipos de câncer em tecidos moles, a rhabdomyosarcoma destaca-se por representar o tipo de câncer de maior incidência em crianças até 10 anos. As variantes histológicas mais comuns para este tipo de câncer são rhabdomyosarcoma embrionário e rhabdomyosarcoma alveolar. Rhabdomyosarcoma embrionário inicia-se principalmente nas regiões da cabeça, pescoço e sistema genito urinário, durante os cinco primeiros anos de vida, enquanto rhabdomyosarcoma alveolar tem por característica o desenvolvimento mais tardio, localizando-se principalmente nas regiões de tórax e abdômen (KEBUDI et al., 2017; EGAS-BEJAR; HUH, 2014).

Em adultos, tumores estromais gastrointestinais são os tipos mais frequentes de sarcomas de tecidos moles. Apresentam crescimento lento e maior incidência no estômago e intestino delgado, mas podem também se desenvolver na região do colo, esôfago e reto. Os principais sintomas clínicos da doença estão relacionados a fadiga, dor abdominal, disfagia e obstrução. A área afetada apresenta massa celular bem circunscrita, com superfície rosada ou escurecida e pode conter necrose hemorrágica e degeneração cística (CORLESS, 2014; von MEHREN et al., 2014).

Como formas de tratamento da doença, a terapia do câncer pode incluir intervenções químicas, radioativas e procedimentos cirúrgicos (MAISHI; HIDA; 2017), medidas relacionadas às características do aglomerado celular, região de incidência, estágio de desenvolvimento e severidade da doença.

Substâncias da classe das antraciclinas são os principais agentes quimioterápicos empregados ao tratamento de sarcomas de partes moles. A administração do medicamento pode ser realizada de forma individual ou através de duas ou mais drogas conjuntas (quimioterapia combinatória) (ZER et al., 2018; MAUREL et al., 2009). Dentre os diversos agentes quimioterápicos comerciais, a doxorubicina destaca-se como droga padrão de tratamento, apesar de apresentar cardiotoxicidade e restrição ao tempo de uso (BESIROGLU et al., 2017; VOLKOVA; RUSSEL, 2011;).

2.6.2. Tumores sólidos

Tumores sólidos são decorrentes da disfunção no crescimento celular em ossos e órgãos, e correspondem a aproximadamente 85% dos casos de câncer conhecidos. As

principais características apresentadas por este tipo de tumor são a ausência de líquidos e cistos (GAVHANE et al., 2011).

O Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos apresentou a estimativa de aproximadamente 14 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo (ROLSTON, 2017), considerando a incidência majoritária para tumores sólidos. Em adultos, câncer de mama, pulmão e próstata estão entre os maiores índices, enquanto leucemia e tumores cerebrais apresentam maiores índices em crianças e jovens de 0 a 19 anos (SIEGEL et al., 2018).

Substâncias da classe dos taxanos estão entre as drogas de primeira linha no tratamento de tumores sólidos (OJIMA; DAS, 2009). Tais compostos apresentam mecanismo de ação específico à despolimerização dos microtúbulos, através da ligação do componente β -tubulina ao dímero α - β -tubulina (SUN et al., 2009). Compostos da classe estão atualmente divididos em duas categorias: paclitaxel e docetaxel, as quais podem ser administradas conjuntamente ao anticorpo monoclonal trastuzumabe ou a algum tipo de antraciclina (AJABNOOR, 2017; BIGANZOLI et al., 2016).

2.6.3. Leucemias

Leucemia corresponde ao conjunto de doenças relacionados a deficiência do sistema hematopoiético, responsável pela produção, manutenção e apoptose de células do sangue e do sistema imunológico. A deficiência, denominada leucemogênese, é decorrente do acúmulo de inúmeros eventos genéticos, responsáveis por desencadear a desregulação à produção de glóbulos brancos (BATLLE; CLEVERS, 2017; NGUYEN et al., 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leucemias de acordo com o tipo celular acometido e o nível de progressão da doença; Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Mielóide Crônica, Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Linfóide Crônica. Progressão aguda causa uma perda de diferenciação celular rápida, ocasionando o acúmulo de células imaturas (blastos), enquanto a derivação crônica da doença ocasiona um acúmulo de células já diferenciadas, porém com limitações às funções fisiológicas do organismo (HERRMANN et al., 2012).

Considerado o tipo de câncer de maior incidência em crianças, a Leucemia Linfóide Aguda representa aproximadamente 26% dos casos de câncer diagnosticados na faixa etária de 0 a 4 anos (WARD et al., 2014). Fatores como a radiação durante o ciclo de pré-natal ou em estágios iniciais de desenvolvimento da criança (RON et al., 1994), tabagismo dos

progenitores (FARIOLI et al., 2014; MILNE et al., 2012; PRESTON et al., 2004) e exposição a agentes químicos (COGLIANO et al., 2011; MA et al., 2002) estão relacionados como prováveis causas para incidência de leucemia infantil (MORRA et al., 2017). O tratamento é inicialmente realizado através da administração da enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1) (EL-NAGGAR et al., 2016; VERMA; KUMAR; KAUR, 2007), responsável por catalisar a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico, necessário ao crescimento e a proliferação de tecidos neoplásicos. A indisponibilidade do aminoácido ocasiona interrupção do processo de síntese proteica e bloqueio do mecanismo anti-apoptótico, característico de tecidos tumorais (COSTA et al., 2016; SONG et al., 2015).

O tratamento de Leucemia Mielóide Aguda baseia-se na administração conjunta de citarabina (Ara-C) e daunorrubicina. Ara-C corresponde a um análogo de citosina e sua ação decorre da incorporação como substrato para a DNA polimerase e rompimento da fita dupla pela DNA topoisomerase (PRENKERT, 2010).

Reações adversas são recorrentes tanto no tratamento de tumores sólidos e de partes moles, quanto para o tratamento de leucemias. A administração prolongada de L-asparaginase pode ocasionar hipersensibilidade e anafilaxia, como consequência de reações alérgicas (SHRIVASTAVA et al., 2015; ZUO et al., 2015; NARAZAKI et al., 2012; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). A citotoxicidade da substância citarabina pode acometer danos ao sistema nervoso, lesões no miocárdio e edema pulmonar (FELIX et al., 2017; KOPTERIDES et al., 2005; GONEN et al., 2005; SANDOVAL et al., 2003). Frente a tais circunstâncias, a busca por alternativas de tratamento, novos quimioterápicos e/ou isoformas com menor efeito alergênico representam as linhas de trabalho de inúmeros grupos de pesquisa em inovação biotecnológica.

2.7. Novas estratégias para o tratamento de câncer

2.7.1. Zika vírus no tratamento de glioblastomas

Tumores no sistema nervoso central estão entre os 20 tipos de cânceres mais incidentes em todo o mundo (WEN; KESARI, 2008). Dentre eles, o glioblastoma multiforme constitui um tumor cerebral maligno, de rápida evolução e difícil tratamento. Após diagnóstico da doença o tempo de sobrevida médio dos pacientes é de aproximadamente 11 meses, e as taxas de cura da doença pelos tratamentos atualmente utilizados está em torno de 10% (STEWART; WILD, 2016; SIEGEL; MILER; JEMAL, 2016).

No artigo “*MALDI-Imaging detects endogenous Digoxin in glioblastoma cells infected by Zika virus – Would it be the oncolytic key?*” (LIMA, et al., 2017), o grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP, avalia o potencial de aplicação do vírus Zika ao tratamento de glioblastomas. O vírus despertou a atenção da comunidade científica, por ser relatado como provável causa da epidemia de microcefalia no Brasil nos anos 2015 e 2016 (CUGOLA et al., 2016). Apesar dos mecanismos de ação do vírus Zika ainda estarem em estudo, sabe-se que a infecção ocasiona desregulação transcricional, anomalias morfológicas e elevadas taxas de morte às células progenitoras neurais humanas (TANG et al., 2017).

Os resultados do trabalho revelam a eficiência do vírus Zika para infectar células tumorais do sistema nervoso, bem como promover pronunciado efeito citopático e induzir o processo de morte celular por apoptose. Além disso, o grupo de pesquisa identificou que o vírus promove na célula tumoral infectada a produção do metabólito digoxina, o qual foi reportado como responsável pelo processo de morte das células tumorais e possível novo agente ao tratamento de glioblastomas (LIMA et al., 2017).

2.7.2. *Salmonella thypimurium* geneticamente modificada para imunoterapia

A aplicação de bactérias no tratamento do câncer não consiste uma abordagem inovadora. Experimentos desta natureza foram realizados por volta dos anos 1850, utilizando *Clostridia* sp. e *Streptococcus* sp., como agentes de tratamento (CANN; NETTEN; NETTEN, 2003). Apesar da regressão dos tumores, o descontrole da infecção induzida ocasionava o óbito dos pacientes tratados.

O início da imunoterapia teve início com pesquisador americano William Coley, através da atenuação dos efeitos adversos, comumente associados a utilização de microorganismos no tratamento de doenças. Nos experimentos foram utilizadas culturas de *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*, inativadas por aquecimento. O composto produzido foi chamado de toxina de Coley (*Coley's Toxin*) e foi utilizado no tratamento de mais de 1000 pacientes de câncer. O complexo microbiano era administrado por injeções aplicadas diretamente sobre a área acometida e regiões adjacentes ao tumor. O tratamento resultou na regressão de inúmeros tumores e até mesmo no completo desaparecimento do aglomerado celular, porém a dificuldade em esclarecer os mecanismos de ação do complexo biológico formulado, não possibilitou a liberação do composto pela Associação Médica Americana (McCARTHY, 2006; CANN; NETTEN; NETTEN, 2003; COLEY, 1909).

O melhor entendimento do sistema imunológico e os avanços da engenharia genética possibilitaram que o grupo de pesquisadores Coreanos e Americanos desenvolvesse uma bactéria capaz de induzir a imunidade inata do organismo, para o combate de tecidos tumorais – “*Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin*” (ZHENG, et al., 2017). A inserção de um plasmídeo carreador do gene *flaB* (gene responsável pela expressão da proteína flagelina em *Vibrio vulnificus*) em células de *Salmonella typhimurium* possibilitou a ativação da via metabólica dos receptores do tipo Toll 5 (*TLR5*), alterando o microambiente do tumor e consequentemente a supressão em fase de metástase. Os ensaios demonstraram que se a expressão de *flaB* for iniciada no terceiro dia após a infecção por *S. typhimurium*, os efeitos inflamatórios e disfunções renais geralmente observadas não ocorrerão. Portanto, essa alternativa se apresenta como uma alternativa promissora ao tratamento de câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Acessar a comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica* e prospectar substâncias antitumorais.

3.2. Objetivos específicos

- Acessar os recursos genéticos microbianos por abordagem dependente e independente de cultivo;
- Explorar o potencial bioativo dos recursos acessados, para produção de compostos antitumorais;
- Selecionar linhagens de actinobactérias promissoras às propriedades de interesse;
- Caracterizar os compostos responsáveis pela atividade antitumoral;
- Avaliar a identidade taxonômica das linhagens recuperadas, para descrever taxonomicamente possíveis novas espécies de actinobactérias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características do local de amostragem

Ao contrário do que possa parecer, o Continente Antártico apresenta grande diversidade de ecossistemas. Durante o verão, regiões costeiras podem apresentar temperaturas superiores a 5 °C e alta disponibilidade de água. Enquanto regiões centrais do continente apresentam em qualquer período do ano temperaturas abaixo dos -10 °C e pouca água em estado líquido (DUCKLOW et al., 2013).

O aumento da temperatura e a luminosidade constante, entre os meses de Dezembro e Março, acarretam o recuo de geleiras e o surgimento de porções de solo livres de gelo (Figura 1). Tais condições tornam as regiões costeiras um oásis intermitente para alimentação e reprodução de organismos marinhos, nidificação de aves migratórias, crescimento de espécies vegetais e estabelecimento de comunidades microbianas (CAVIERES et al., 2016; VERA et al., 2013).



Figura 1: Península Antártica – Degelo das calotas polares feriféricas e formação de áreas livres de gelo (verão antártico).

A área de estudo está localizada no arquipélago das Ilhas Shetlands do Sul, Península Antártica (S 62°23' e W 58° 27'). Essa região é a parte continental mais setentrional da Antártica e apresenta relevo predominantemente montanhoso, clima antártico marinho com temperaturas constantes durante o verão e intensa atividade biológica. Tais características fazem dessa região uma importante área para o desenvolvimento de pesquisa, concentrando a

maior quantidade de bases científicas internacionais na Antártica, entre elas, a Estação Brasileira Comandante Ferraz (Figura 2).



Figura 2: Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Península Antártica). Base de pesquisa Estação Brasileira Comandante Ferraz (Módulos Antárticos Emergenciais - MAE).

4.2. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas durante a 33ª Operação Antártica (Nov/2014 e Abr/2015). A expedição percorreu diversas ilhas da Península Antártica, sob suporte logístico do Navio Polar Almirante Maximiano - Marinha do Brasil (Figura 3a) e aporte científico do Projeto Micologia Antártica (MycoAntar), coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa, do Departamento de Microbiologia – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As áreas de coleta foram acessadas por meio da utilização de botes infláveis e deslocamento terrestre (Figuras 3b, c e d).



Figura 3: Atividade de campo. A) Navio Polar Almirante Maximiano, utilizado para deslocamento, acondicionamento das amostras, alimentação e alojamento; B) Acesso às áreas de interesse através de botes infláveis; C e D) Deslocamento terrestre aos sítios de coleta.

As amostragens foram realizadas em três pontos distintos da Ilha Rei George, conforme: P1: Torre Meteoro – TMD (S 62°05'10.4''/W 58°23'43.6''); P2: Torre Meteoro Pluviômetro – TME (S 62°05'08.1''/W 58°23'36.6'') e P3: Morro da Cruz – MDC (S 62°05'04.3''/W 58°23'41.7'') (Figuras 4a e b). Para cada ponto de amostragem foram coletados quatro exemplares da gramínea *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) (Figura 4c e d). O solo excedente, não aderido nas porções radiculares, foi cuidadosamente removido. As amostras foram acondicionadas individualmente em saco esterilizado modelo *Whirl-pak* e armazenadas em ultra freezer (-80 °C).



Figura 4: Sítios de amostragem. A) Torre Meteoro; B) Morro da Cruz; C) Coleta e acondicionamento das amostras; D) *Deschampsia antarctica* Desv. - Espécie endêmica ao Continente Antártico.

4.3. Análise da comunidade microbiana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica* por método independente de cultivo

4.3.1. Extração de DNA ambiental

A fim de reduzir possíveis efeitos adversos da constante manipulação das amostras, as mesmas foram particionadas em tubos *eppendorf* esterilizados, em porções de aproximadamente 1 grama (g) e imediatamente retornadas ao ultra freezer. O procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar (Pachane – Uberaba, MG, Brasil), para reduzir o risco de contaminação das amostras.

O isolamento e a purificação do DNA ambiental (*eDNA*) foram realizados usando o kit comercial *Power Soil DNA Isolation* (Mo Bio - Carlsbad, CA, Estados Unidos), a partir de 0,25 g de cada amostra, conforme instruções do fabricante. Para cada ponto de coleta foram

selecionadas três porções fracionadas, as quais foram agrupadas após o procedimento de extração e purificação.

4.3.2. Preparo da biblioteca 16S rRNA para sequenciamento em plataforma *Ion Torrent*

A amplificação da região hipervariável V6 do gene 16S rRNA foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o conjunto dos oligonucleotídeos iniciadores 967F (5'-CAACGCGAAGAACCTTACC-3'; SOGIN et al. 2006) e 1193R (5'-CGTCRTCCCCRCCTTCC-3'; WANG; QIAN, 2009), conforme Kavamura et al (2013). O conjunto responde a formação de fragmentos de aproximadamente 230 pares de bases (pb) de comprimento. Todas as amostras foram marcadas pela inserção de *barcodes*, contendo cinco nucleotídeos específicos.

Os produtos de PCR foram agrupados em razão equimolar, dando origem a biblioteca de *amplicon*, a qual foi purificada pelo sistema de eletroforese *E-Gel SizeSelect EX* (Life Technologies - San Diego, CA, Estados Unidos). Em seguida, os fragmentos recuperados foram novamente purificados usando o kit *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter - Brea, CA, Estados Unidos). O produto da biblioteca purificada foi quantificado usando o sistema *Qubit Fluorimetric Quantification 2.0* (Invitrogen - Carlsbad, CA, Estados Unidos). O procedimento de PCR em emulsão e o enriquecimento das amostras foram realizadas no sistema *Ion OneTouch 2™* com o kit *Ion Template PGM™ OT2 400* (Life Technologies - San Diego, CA, Estados Unidos). O chip V2 316™ foi utilizado para sequenciamento, conforme instruções contidas no manual da plataforma *Ion Torrent* (Personal Genome Machine™ - PGM).

4.3.3. Processamento dos dados gerados e assinaturas das unidades taxonômicas operacionais

O arquivo *.fastq*, contendo as sequências brutas geradas pela plataforma *Ion Torrent*, foi filtrado para a exclusão de sequências de baixa qualidade utilizando a plataforma Galaxy (GOECKS; NEKRUTENKO; TAYLOR, 2010), conforme: *score* de qualidade = 25; tamanho de *barcode* = 5; janela de qualidade = 50 e número máximo de homopolímeros = 6. Sequências inferiores a 180 pares de bases (pb) foram excluídas.

Após filtragem inicial, as sequências foram analisadas pelo pacote de ferramentas do software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) versão 1.9 (CAPORASO et al., 2010). As assinaturas das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram determinadas em 97% de similaridade, utilizando o método UCLUST (EDGAR, 2011) e alinhamento pelo algoritmo PyNAST (CAPORASO et al., 2009). A afiliação taxonômica de cada sequência representativa das UTOs foi realizada por comparação com banco de sequências de referência *Greengenes* (versão gg_13_8), usando o UCLUST (MCDONALD et al., 2012). Sequências quimeras foram excluídas usando o método UCHIME (EDGAR et al., 2011). Sequências não relacionadas a nenhuma sequência do banco de referência ou presente uma única vez (*singletons*) foram descartadas do conjunto de dados, bem como sequências provenientes de cloroplastos e sem classificação ao nível do domínio Bacteria (*no-blast hit*).

4.3.4. Análise de predição funcional para o filo Actinobacteria

Para analisar a provável funcionalidade das actinobactérias associadas à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, as sequências com assinaturas para o filo foram filtradas do banco de dados totais, comparadas com o banco de sequências de referência *Greengenes* (versão gg_13_8) e normalizadas segundo a abundância relativa de cada sequência. Em seguida, a ferramenta PICRUSt (LANGILLE et al., 2013) foi utilizada para categorização das funções, a partir da identificação de ortólogos KEGG para cada sequência. A avaliação inicial foi baseada na abundância relativa das principais funções relacionadas. Posteriormente, os dados foram analisados pelo software *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP), a fim de avaliar diferenças funcionais entre os pontos amostrados. Inferências estatísticas foram determinadas por *G-test (w/Yates) + Fisher's*, método *DP: Asymptotic-CC 0,95* e *p-value > 0,05*.

4.5. Seleção de DNA ambiental e clonagem de insertos gênicos

A biblioteca metagenômica de clones foi construída em colaboração com a Profa. Dra. Valeria Maia de Oliveira, do Departamento de Recursos Microbianos – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

O DNA ambiental (*eDNA*) de alto peso molecular utilizado no procedimento de clonagem foi isolado e purificado pelo Kit *PowerMax Soil* (Mo Bio - Carlsbad, CA, Estados

Unidos). Porções das amostras coletadas foram agrupadas, a fim de formar uma amostra composta por ponto de coleta (0,25 g de solo rizosférico de cada planta amostrada). A reação final de extração conteve 3 g de amostra composta, sendo 1 g de cada ponto de coleta.

A integridade do material isolado foi avaliada por eletroforese de campo pulsado (CHEF-DR III, Biorad), utilizando gel de agarose 1% *Low Melting SeaPlaque* (Lonza - Anaheim, CA, Estados Unidos) e tampão de corrida TBE 0,5% (Tris-Ácido Bórico-EDTA), nas seguintes condições de corrida: temperatura = 14 °C, *switch* inicial = 0,5; *switch* final = 0,5; ângulo para o gradiente = 120° e corrente = 9V. O fluoróforo Sybr Safe (Life Technologies - San Diego, CA, USA) foi utilizado para possibilitar a visualização do DNA e o marcador de alto peso molecular *GeneRuler DNA Ladder High Range* (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, Estados Unidos). O material foi quantificado pelo sistema *Qubit Fluorimetric Quantification 2.0* (Invitrogen - Carlsbad, CA, Estados Unidos).

O vetor de clonagem utilizado foi o pCC2FOS, tendo como hospedeiro competente a linhagem de *Escherichia coli* EPI300-T1, dispostos no kit *CopyControl HTP Fosmid Library Production* (Epicentre - Madison, WI, Estados Unidos). As condições das reações de reparo das extremidades, ligação dos insertos gênicos ao vetor fosmídeo, empacotamento do DNA recombinante e transfecção da célula hospedeira foram modificadas*, conforme:

4.5.1. Reparo das extremidades

Componentes da reação: End-Repair buffer (10x) - 8 µl; dNTP mix (2,5 mM) - 8 µl; ATP (10mM) - 8 µl; eDNA (0,5 µg/µl) - 52 µl e End-Repair enzyme mix - 4 µl

* A reação de reparo foi incubada por 1 hora, a 25 °C. A inativação da enzima *End-Repair* foi realizada por aquecimento da reação por 1 hora, a 70 °C.

4.5.2. Ligação dos insertos gênico ao vetor fosmídeo

Componentes da reação: Fast-Link ligation buffer (10x) - 1 µl; ATP (10 mM) - 1 µl; CopyControl pCC2FOS vector (0,5 µg/µl) - 1 µl; DNA (0,25 µg) - 6 µl e Fast-Link DNA ligase - 1 µl

* A reação de ligação foi incubada por 16 horas, a 25 °C. A inativação da enzima *Fast-link DNA Ligase* foi realizada pelo aquecimento da reação por 10 minutos, em 70°C.

4.5.3. Empacotamento do DNA recombinante

Componentes da reação: DNA recombinante - 10 µL; MaxPlax Lambda packaging extract - 50 µL; Phage buffer - 940 µL e clorofórmio - 25 µL (Merck – Darmstadt, HE, Alemanha)

* A reação de empacotamento foi realizada em dois estágios. No primeiro estágio 25 µL de suspensão de fago (*MaxPlax Lambda Packaging Extract*) foram adicionados ao produto da reação de ligação (10 µL). A reação foi incubada por 90 minutos, em 30 °C. Em seguida, o volume restante da solução de fago (aproximadamente 25 µL) foi incorporado à reação, sendo novamente incubada por 90 minutos, em 30 °C. Para estabilizar os componentes, 940 µL do tampão de fago (*Phage Buffer* - 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM NaCl e 10 mM MgCl₂) e 25 µL de clorofórmio foram incorporados a reação. O produto do empacotamento foi mantido em 4 °C, até o procedimento da transfecção.

4.5.4. Transfecção do hospedeiro

Componentes da reação: *Escherichia coli* EPI300-T1; meio Luria Bertani; sulfato de magnésio; cloranfenicol e reação de empacotamento - 500 µL

* A ativação das células competentes de *Escherichia coli* (EPI300-T1) foi realizada em meio de cultivo Luria Bertani Ágar - LBA (Anexo A), através da técnica de esgotamento do inóculo. A cultura foi incubada por 24 horas, em 37 °C. Para o preparo do inóculo da cultura de clonagem, uma colônia isolada de *E. coli* (EPI300-T1) foi selecionada do meio de reativação e inoculada em 50 mL de caldo Luria Bertani - LB (Anexo A), suplementado com MgSO₄ (10 mM). A cultura foi incubada em agitação constante (180 rpm), por 24 horas, em 37 °C.

Para a reação de transfecção, 500 µL da reação de empacotamento foram adicionados em 4,5 mL do inóculo de *E. coli* (EPI300-T1), contendo aproximadamente 1×10^7 células por mL (DO₆₀₀ = 0,9 de absorbância). A reação foi incubada a 37 °C, por 45 minutos. Os clones gerados foram semeados pela técnica de *spread-plate*, em meio LBA (Anexo A), suplementado com MgSO₄ (10 mM) e cloranfenicol (12,5 µg/ml). O volume de inóculo foi de 30 µL por placa de Petri (150x15 mm), conforme prévia avaliação para determinar o volume ideal para formação de colônias isoladas. Como controle negativo da reação, 30 µL do inóculo de *E. coli* (EPI300-T1) não transfectadas foram semeadas, sob as mesmas condições aplicadas aos clones metagenômicos. As placas foram incubadas por 16 horas, a 37 °C.

4.5.5. Validação da biblioteca de clones

Componentes da reação: endonuclease buffer 2 μL ; endonuclease NotI (10U/ μL) - 0,5 μL ; BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) - 0,2 μL ; meio Luria Bertani - 500 mL; L-arabinose e cloranfenicol

* Para validação da biblioteca de clones, 40 colônias foram selecionadas aleatoriamente e inoculadas individualmente em 15 mL de caldo LB (Anexo A), suplementado por cloranfenicol (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e solução de L-arabinose (0,2 %). As culturas foram incubadas em agitação constante (180 rpm), por 16 horas, a 37 °C.

Para o processo de extração, alíquotas de 3 mL das culturas foram centrifugadas (7000 rpm x 5 min) e lavadas com solução salina (NaCl 0,85 %). Os fósseos foram extraídos da biomassa recuperada, pelo processo de lise alcalina e submetidos ao processo de digestão pela enzima de restrição NotI (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante.

A diversidade dos insertos carregados pelo vetor foi avaliada por eletroforese de campo pulsado (CHEF-DR III, Biorad), utilizando gel de agarose 1,2 % (Biorad – Hercules, CA, Estados Unidos) e tampão de corrida TBE 0,5 % (Tris-Ácido Bórico-EDTA), nas seguintes condições de corrida: temperatura = 14 °C, *switch* inicial = 1, *switch* final = 12, ângulo para o gradiente = 120° e corrente = 6V., a partir da variação dos padrões de bandas de cada clone metagenômico selecionado. O fluoróforo Sybr Safe (Life Technologies - San Diego, CA, Estados Unidos) foi utilizado para possibilitar a visualização dos fragmentos gênicos e o marcador de alto peso molecular *GeneRuler DNA Ladder High Range* (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, Estados Unidos).

4.5.6. Preservação

Os clones foram coletados manualmente e transferidos para o meio de criopreservação 2YT-HMFM (Anexo A), suplementado por cloranfenicol (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). As culturas foram cultivadas em agitação constante (180 rpm), por 16 horas, a 37 °C. Em seguida, as placas foram seladas com filme hermético *MicroAmp Optical Adhesive Film* (ThermoFischer Scientific - Waltham, MA, Estados Unidos) e preservadas em ultra freezer.

4.5.7. Triagem funcional para L-asparaginases

Os clones foram reativados em meio LBA (Anexo A), suplementado por cloranfenicol (12,5 µg/mL), por 16 horas, a 37 °C. Em seguida, as colônias foram transferidas para placas de 96 poços, contendo 180 µL de meio de cultivo LB (Anexo A), suplementado por cloranfenicol (12,5 mg/mL) e 0,4 µL de solução *CopyControl Fosmid Autoinduction* (500x). As culturas foram cultivadas em agitação constante (180 rpm), por 16 horas, a 37 °C. A triagem funcional foi realizada em meio de cultivo M9 modificado (Anexo A) suplementado cloranfenicol (12,5 mg/mL) e vermelho de fenol (0,009 g/mL), em placas de petri de 120x20 mm (carimbo de repicagem 96 poços). As culturas foram incubadas por 36 horas, a 37 °C, para avaliação da alteração do pH do meio de cultivo (de amarelo para vermelho), em decorrência da liberação de amônia na reação de hidrólise da asparagina.

4.6. Acesso a comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, por abordagem dependente de cultivo

4.6.1. Preparo das amostras de solo e isolamento de actinobactérias

Para o isolamento de actinobactérias fragmentos radiculares, contendo o solo aderido (aproximadamente 1 g para cada planta amostrada) foram selecionados e agrupados, a fim de formar uma amostra composta de todos os pontos de coleta. A massa final selecionada totalizou aproximadamente 12 g.

A amostra composta foi solubilizada em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85 %), suplementada com Tween 80 (0,01 %) (Merck – Darmstadt, HE, Alemanha). A dispersão dos agregados de solo e o desprendimento das células aderidas as porções radiculares foram realizados através do uso de vórtex (3000 rpm x 2 min) (Cole-Parmer – Vernon Hills, IL, USA) e mesa de agitação JEIO SI-300R (90 rpm x 30 min) (Jeio Tech Inc - Yuseong-gu, DJ, Korea). Em seguida, diluições seriadas (1:9 mL) foram realizadas, utilizando solução salina (NaCl 0,85 %) como eluente, até a relação 1×10^{-5} .

As diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas pela técnica de *spread-plate* (100 µL) nos meios de cultivo Amido Caseína Ágar - ACA, Extrato de Carne Triptona Ágar - PMBA e Extrato de Solo Ágar - ESA (AnexoA). Em virtude dos solos antárticos serem um ambiente oligotrófico, os substratos nutritivos foram preparados em concentrações reduzidas (1:100 m/v).

Os meios de cultivo foram suplementados com os antifúngicos ciclohexamida e nistatina (25 µg/mL). As placas inoculadas foram incubadas durante 6 semanas, em 4 e 16°C. Durante o período de incubação, colônias que apresentaram características morfológicas para a classe Actinobacteria foram selecionadas e purificadas pela técnica de esgotamento de inóculo, em meio de cultivo Glicose Extrato de Levedura Ágar - GYEA (Anexo A). As linhagens selecionadas foram criopreservadas em solução de glicerol 20% (-80 °C) e depositadas na Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA), Embrapa Meio Ambiente.

4.6.2. Avaliação da diversidade taxonômica dos isolados, por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e seleção de taxa representantes

O DNA genômico foi isolado e purificado pelo kit *PureLink Genomic DNA* (Invitrogen – Carlsbad, CA, Estados Unidos). A amplificação do gene que codifica para o rRNA 16S foi modulada pelo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), (LANE, 1991) em equipamento *Veriti Thermal Cycler* (Life Technologies, Foster CA, USA), a partir da reação: 1 µL de DNA [10 nanogramas (ng)], 2,5 µL de 10x PCR buffer [Tris-HCl 200 milimolar (pH 8,4), KCl 500 mM], 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,25 de µL dNTP mix (10 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 µL dos oligonucleotídeos (10 µM), 0,3 µL de *Taq* DNA polymerase e 18,45 µL de água ultrapura esterilizada. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: (1) 94 °C por 2 minutos (min), (2) 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, (3) 72 °C por 10 min, conforme White et al (1990).

Os produtos de PCR foram purificados e quantificados usando os kits *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, USA) *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), respectivamente. Em seguida, os fragmentos gênicos foram amplificados utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies, Foster, CA, USA), conforme: 1 µL PCRp (35 ng), 2 µL 5x *BigDye Terminator Sequencing Buffer*, 1,6 µL oligonucleotídeos iniciadores (5 pmol), 1 µL *Ready Reaction PreMix BigDye* e 4,4 µL água ultrapura esterilizada. Os parâmetros de ciclagem aplicados foram: (1) 96 °C por 1 min, (2) 35 ciclos de 96 °C por 15 segundos (seg), 50 °C por 15 seg e 60 °C por 4 min, em equipamento *Veriti Thermal Cycler* (Life Technologies, Foster CA, USA). O conjunto de iniciadores utilizados na reação foram 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 704R

(5'-TCTACGSATTTACCCSCTAC-3') (LANE, 1991). O sequenciamento foi realizado no analisador genético *Applied Biosystems 3500* (Life Technologies, Foster CA, USA).

A qualidade das sequências e a montagem dos *contigs* consenso foram realizadas no programa PhredPhrap/Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O alinhamento do conjunto de dados foi realizado por *ClustalW* e a similaridade das sequências foi determinada pelo método estatístico de *maximum-likelihood* (ML) (FELSENSTEIN, 1981), usando o pacote do software MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

A partir dos cladogramas estabelecidos pela análise genotípica e da análise de identidade taxonômica das sequências obtidas (*Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST), representantes de prováveis taxa distintos foram selecionados para compor o acervo de actinobactérias utilizadas nos ensaios futuros.

4.6.3. Análise da diversidade taxonômica das linhagens isoladas, por sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rRNA

As assinaturas taxonômicas dos isolados selecionados foram determinadas pelo sequenciamento do gene que codifica para o rRNA 16S. Os produtos de PCR previamente purificados foram amplificados usando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e os oligonucleotídeos iniciadores: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 357F (5'-CCTACGGGAG-3'), 357R (5'-CTGCGCCTCCCGTAGG-3'), 704F (5'-GTAGSGGTGAATSCCTAGA-3'), 704R (5'-TCTACGSATTTACCCSCTAC-3'), 1114R (5'-GGGTYKCGCTCGTTGC-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). O sequenciamento foi realizado no analisador genético *Applied Biosystems 3500*. As condições para amplificação e os parâmetros de ciclagem seguiram conforme apresentado no item 4.6.2.

A avaliação de qualidade e a montagem dos *contigs* consenso foram realizadas no programa PhredPhrap/Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O índice de similaridade entre as sequências obtidas, com as sequências 16S rRNA disponíveis no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI), foram determinadas a partir da plataforma EzBioCloud (YOON et al., 2017).

4.7. Abordagem taxonômica polifásica do isolado CMAA 1533

4.7.1. Análise filogenética

A análise comparativa da sequência 16S rRNA do isolado CMAA 1533 foi realizada usando o banco de dados *GenBank*, pela plataforma EzBioCloud (YONN et al., 2017). O alinhamento do conjunto de dados foi realizado por *ClustalW* e as inferências filogenéticas foram avaliadas pelos métodos estatísticos de *neighbor-joining* (NJ) (SAITOU, NEI; 1987), *maximum-likelihood* (ML) (FELSENSTEIN, 1981) e *maximum-parsimony* (MP) (Fitch, 1971), usando o pacote de ferramentas do software MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.7.2. Avaliação das características culturais e fenotípicas

As características fisiológicas do isolado CMAA 1533 foram determinadas pelo crescimento nos meios de cultivo *International Streptomyces Project* - ISP 2, 3, 4 e 5 e GYEA (Anexo A), após 21 dias de incubação, a 20 °C. O ciclo de desenvolvimento celular foi observado por microscopia eletrônica de varredura, em equipamento LEO 435VP durante 20 dias de crescimento em meio GYEA, a 20 °C.

As propriedades fenotípicas do isolado CMAA 1533 e das linhagens de referência *Rhodococcus triatomae* DSM 44892^T, *R. trifolii* LMG 26204^T e *R. corynebacterioides* DSM 20151^T foram determinadas pela capacidade de crescimento em diferentes pHs (4.0-10.0), temperaturas (4-37 °C), salinidade (0-15 % NaCl) e fontes únicas de carbono, e pela habilidade em hidrolisar carboidratos complexos, conforme Souza et al., (2017). Os ensaios foram avaliados após 20 dias de incubação, a 20 °C. O potencial enzimático foi determinado através do kit APiZYM (Biomérieux - Marcy-l'Étoile, França), conforme instruções do fabricante.

4.7.3. Avaliação quimiotaxonômica

O perfil quimiotaxonômico do isolado CMAA 1533 e das linhagens de referência *Rhodococcus triatomae* DSM 44892^T, *R. trifolii* LMG 26204^T e *R. corynebacterioides* DSM 20151^T foi determinado de acordo com as metodologias estabelecidas para o gênero *Rhodococcus*. A metodologia de Staneck e Roberts (1974) foi empregada para determinação dos isômeros de ácido diaminopimélico. A constituição dos açúcares de parede foi

determinada conforme Hasegawa et al., (1983). A presença de ácidos micólicos e o perfil de lipídios polares foram determinados por cromatografia de camada delgada (CCD), conforme Minnikin e colaboradores (1980, 1984). Isoprenóides de membrana foram extraídos conforme Minnikin et al., (1984) e determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), (COLLINS; GOODFELLOW; MINNIKIN, 1979). Os ácidos graxos das membranas celulares foram extraídos, metilados, separados por cromatografia gasosa (CG) (Hewlett Packard 6890 – Agilent Analytical Instruments), e analisados pelo sistema *Sherlock Microbial Identification* (MIDI), utilizando a versão 5 do banco de dados para Actinos, conforme Sasser (1990). O conteúdo G+C do DNA genômico da linhagem CMAA 1533 foi estimado utilizando o método de desnaturação térmica, descrito por Gonzales e Saiz-Jimenez (2005).

4.8. Produção de compostos com propriedades antitumorais

4.8.1. Produção de metabólitos secundários em cultivo *in vitro*

As linhagens de actinobactérias foram reativadas em meio Czapeck modificado (Anexo A), por técnica de esgotamento de inóculo e incubadas por 15 dias, a 16 °C. O pré inóculo foi preparado a partir da inoculação de colônias isoladas em 25 mL de caldo GYEA (Anexo A), incubadas a 150 rpm, por 5 dias, a 16 °C. Em seguida, alíquotas de 500 µL do pré inóculo foram transferidas para 500 mL de caldo Batata Dextrose - BD (Anexo A). As culturas foram incubadas a 180 rpm, por 15 dias, a 16 °C.

4.8.2. Processo de extração dos metabólitos secundários

Os metabólitos secundários foram recuperados do sobrenadante das culturas de actinobactérias utilizando a metodologia de extração por partição líquido-líquido, usando o solvente Acetato de Etila de média polaridade como fase orgânica (3:1 v/v). Para o procedimento, a biomassa celular foi removida por centrifugação (30 min/7000 rpm), seguido de filtração usando filtros millipore de 0,22 µm. Em seguida, o pH do filtrado foi acidificado até pH 3 por meio de uma solução de ácido clorídrico na concentração de 0,1 mol/L (M). A relação entre o volume de solvente orgânico utilizado para o volume de filtrado (fase aquosa) foi de 3:1, sendo incorporado em três estágios. A separação das fases e o recolhimento da fase orgânica foram realizados em funil de separação. Os metabólitos extraídos foram concentrados em rotavaporador (Buchi R-300 - Flawil, Suíça), com temperatura de 40 °C. Os extratos brutos obtidos foram protegidos da exposição luminosa e acondicionados em -20 °C.

4.8.3. Triagem dos extratos bioativos, por atividade de antagonismo para *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T

O potencial bioativo dos extratos foi determinado pela técnica de difusão de disco em ágar, frente o oomiceto *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T. Santos e Melo (2016) apresentaram a correlação positiva entre a atividade de antagonismo de extratos microbianos à linhagem *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T e compostos com propriedades antitumorais.

Para os bioensaios, os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck – Darmstadt, HE, Alemanha) e padronizados para a concentração de 1 mg/mL. Discos de papel de filtro esterilizados foram distribuídos sobre a superfície do meio de cultivo Batata Dextrose Ágar - BDA (Anexo A) (Himedia – Einhausen, Alemanha), com distância de 1,8 cm do centro da placa de Petri (90x15 mm). Alíquotas de 10 µL de extrato foram utilizadas para impregnar os discos de avaliação. A linhagem *P. aphanidermatum* CMAA 243^T foi inserida por meio de *plug* (1x1 cm), retirado de cultura recém estabelecida. As culturas foram incubadas por 12 horas, a 28 °C.

O potencial de atividade foi estimado pelo tamanho do halo de inibição, tendo como critérios quantitativos de avaliação: extrato não ativo (-), extrato com baixa atividade (+), extrato com atividade moderada (++) e extrato com atividade pronunciada (+++).

4.8.4. Avaliação do potencial antiproliferativo *in vitro* dos extratos brutos, para células tumorais humanas

4.8.4.1. Cultura de células tumorais

Os bioensaios para avaliação do potencial antiproliferativo dos extratos selecionados foram realizados em colaboração com o Profa. Dra. Ana Lucia Tasca Gois Ruiz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNICAMP). A triagem inicial avaliou a atividade dos extratos para apenas 3 linhagens tumorais humanas: MCF-7, NCI-H460 e U-251 (tumores de mama, pulmão e sistema nervoso central, respectivamente). As linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute* – NCI, Frederick, MA, Estados Unidos). A linhagem celular de queratinócitos humanos HaCaT (não tumoral), cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) foi incluída no ensaio como parâmetro de citotoxicidade dos extratos para células saudáveis.

O cultivo das células foi realizado em frascos de 25 cm² (T25), contendo 5 mL de meio Roswell Park Memorial Institute - RPMI 1640 (Anexo A), suplementado com soro fetal bovino (5%) (Gibco – Dun Laoghaire, Irlanda) e solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina - 1 mg/L). As garrafas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera de 5% de gás carbônico. Após verificação do crescimento celular e certificação da não contaminação dos tecidos celulares, as culturas foram lavadas em tampão fosfato (pH 7.0), para retirada de resíduos de meio de cultivo. Em seguida, as células foram desprendidas da garrafa de cultivo, através da adição de 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell – Waldkirk, Alemanha) e incubação da reação por 5 minutos, a 37 °C. Períodos superiores a 5 minutos podem acarretar danos aos tecidos celulares, dada a característica proteolítica da tripsina. A integridade celular e a quantificação das suspensões celulares foram determinadas por contagem em câmara de Neubauer, utilizando solução de azul de trypan como indicador de células viáveis.

4.8.4.2. Atividade antiproliferativa dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias *in vitro*

A atividade antiproliferativa dos extratos foi determinada de acordo com a metodologia estabelecida por Monks e colaboradores (1991), segundo as inferências para avaliação do crescimento celular por espectrofotometria, utilizando o corante proteico sulforrodamina B (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Alemanha) como indicador de densidade celular (SHOEMAKER, 2006; MONKS et al., 1991).

Os bioensaios foram iniciados pela inoculação de 100 µL das linhagens MCF-7, NCI-H460, U-251 e HaCaT, em meio RPMI 1640 (Anexo A), suplementado com soro fetal bovino (5%) e solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina - 1 mg/L), em placas de 96 poços (Corning – Nova Iorque, Estados Unidos). Em seguida, o potencial antiproliferativo *in vitro* das frações majoritárias dos extratos com melhor atividade bioativa foi avaliado frente o painel completo de linhagens tumorais humanas: K-562 (leucemia), MCF-7 (mama), NCI-ADR (ovário com fenótipo de resistência), UACC-62 (melanoma), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), HT-29 (cólon), OVCAR-3 (ovário), U251 (glioblastoma) e 786-0 (rim), além de células sadias HaCaT (queratinócito humano) (Figura 5).

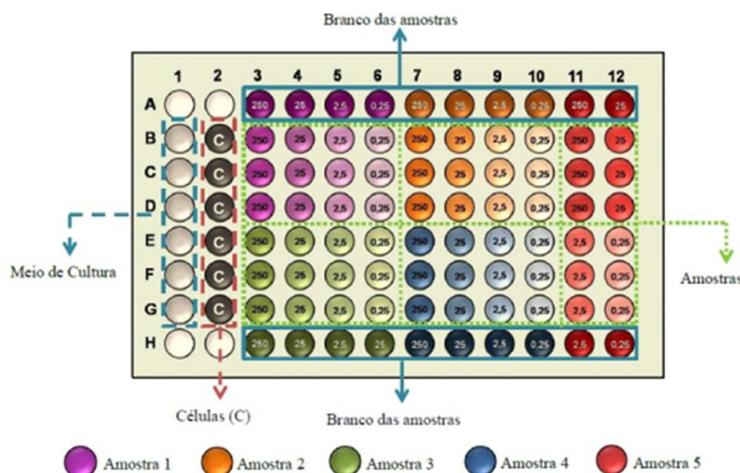


Ilustração de Adriana Della Torre

Figura 5: Ensaio antiproliferativo em placas de 96 poços. Ilustração esquemática da distribuição das amostras e células do ensaio.

Os inóculos iniciais das linhagens tumorais foram preparados com diferentes densidades celulares (Tabela 2), devido à diferença no tempo para crescimento e variações no tamanho das células. As culturas foram incubadas em câmara úmida, por 24 horas, em 37 °C e atmosfera de 5% de gás carbônico.

Tabela 2: Densidades celulares para inóculo inicial do ensaio antiproliferativo

Tecido celular	Código	Inóculo inicial (x10 ⁴ cels/mL)
Leucemia	K-562	6
Mama	MCF-7	6
Ovário (fen. Res)	NCI-ADR/RES	5
Pulmão	NCI-H460	4
Próstata	PC-3	5
Cólon	HT-29	4
Ovario	OVCAR-3	7
Glioblastoma	U251	4
Rim	786-0	4,4
Queratinócitos	HaCaT	4

As amostras foram inicialmente solubilizadas em DMSO (Merck – Darmstadt, HE, Alemanha) e ajustadas para a concentração de 100 mg/mL. Em seguida, a citotoxicidade do solvente foi reduzida pela diluição das amostras em meio RPMI 1460, suplementado com soro fetal bovino (5%) e solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina - 1 mg/L). Como controle positivo de ação antiproliferativa, o quimioterápico comercial doxorrubicina (Dox) (Europharma, São Paulo, Brasil) Para controle do inóculo (T₀), o crescimento da cultura foi

interrompido, logo que os extratos foram adicionados à reação, por meio da adição de 50 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% e incubação por 1 hora, em 4 °C. Todas as reações foram preparadas em triplicatas e incubadas em câmara úmida, por 48 horas, em 37 °C e atmosfera de 5% de gás carbônico.

A interrupção do crescimento das demais placas foi realizada conforme a placa T₀. Resíduos de meio de cultivo, metabólitos secundários e TCA foram removidos por lavagem das placas em água corrente. Após secagem das placas em temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 mL de sulforrodamina B (0,4%) (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Alemanha), solubilizada em ácido acético (1%) e incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente. A lavagem do corante não ligado às proteínas celulares foi realizada com solução de ácido acético (1%). Após secagem das placas, 150 µL de Trizma-Base 10 mM, pH 5.0 (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Alemanha) foram adicionados à solubilização e quantificação da sulforrodamina B (Sigma-Aldrich – Darmstadt, Alemanha), em espectrofotômetro VersaMax (Molecular Devices – San Jose, CA, Estados Unidos) e comprimento de onda de 540 nm.

4.8.4.3. Avaliação do potencial antiproliferativo

A proliferação das linhagens tumorais sob as condições experimentais foram avaliadas pela média das absorbâncias entre as triplicadas, menos o valor do branco de cada amostra. A avaliação quantitativa foi determinada pelas condições: $T > C$ = estímulo para o crescimento da linhagem; $T_0 \leq T < C$ = redução na taxa de crescimento da linhagem (atividade citostática) e $T < T_0$ = mortalidade da linhagem (atividade citocida). O percentual de crescimento celular foi determinado pelas equações: $(T - T_0) / (C - T_0) \times 100$ (atividade citostática) e $(T - T_0) / T_0 \times 100$ (atividade citocida).

Os resultados foram plotados no software ORIGIN 8.0 *Graphing & Analysis* (OriginLab – Northampton, MA, Estados Unidos) e analisados através de regressão não linear, tipo sigmoideal, para determinação da curva de crescimento celular em relação a concentração das amostras. As relações determinaram as concentrações efetivas para inibir totalmente o crescimento celular (*total growth inhibition* – TGI) e inibir 50% da viabilidade celular (*lethal concentration* – LC₅₀).

4.9. Análise dos extratos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (CLAE-UV) e acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)

4.9.1. Cultivo das linhagens selecionadas em escala maior e avaliação do perfil químico dos extratos brutos por CLAE-UV

As análises cromatográficas e espectroscópicas das amostras microbianas para a caracterização química das substâncias responsáveis pela atividade antitumoral foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicado a Química de Produtos Naturais - LabEMass em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, do Departamento de Química – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), sob a supervisão do Dr. Eduardo José Crevelin.

As linhagens CMAA 1527 e CMAA 1653 foram cultivadas em 10 L de caldo BD (Anexo A), sob as mesmas condições descritas no item 4.8.1. Os procedimentos para separação do sobrenadante, extração dos metabólitos secundários e acondicionamento das amostras foram realizados conforme item 4.8.2.

Os extratos brutos das linhagens CMAA 1527 e CMAA 1653 foram primeiramente analisados por CLAE-UV em modo analítico, e em seguida, submetidos ao processo de purificação em escala preparativa usando um equipamento Shimadzu, equipado com uma controladora CBM-20a, 2 bombas LC-6AD e injetor de amostra manual Rheodyne, detector UV-vis SPD-20A, degaseificador DGU-20A5 e coletor automático de frações. A separação dos compostos em modo analítico foi realizada em uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 3,5 µm o diâmetro da partícula) da Agilent. O volume de amostra injetado na coluna foi de 10 µL, e a taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. Em escala preparativa, foi também utilizada uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 µm o diâmetro da partícula) da Agilent. Nesse caso, o volume de amostra injetado na coluna foi de 200 µL, e a taxa de fluxo da fase móvel foi de 4 mL/min. A fase móvel utilizada tanto em escala analítica, quanto na preparativa, consistiu de uma solução de ácido fórmico 0,1% (solvente A) e Acetonitrila + 0.1% de ácido fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente iniciando com 30% de Acetonitrila, em seguida, aumentou para 100% de Acetonitrila em 30 min, mantendo-se em 100% de Acetonitrila durante 5 min. Logo, as condições iniciais foram restabelecidas com 30% de Acetonitrila. O tempo total de análise foi de 41 min. O monitoramento dos compostos no ultravioleta foi realizado nos comprimentos de onda 270 nm e 320 nm. Foram coletadas 33 frações para o extrato bruto CMAA 1527 e 36 frações para o extrato bruto CMAA 1653. As

frações de cada linhagem foram agrupadas separadamente com base em seus perfis químicos, quando analisadas por espectrometria de massas via inserção direta e CLAE-EM, sendo posteriormente avaliadas para atividade antiproliferativa *in vitro*, em linhagens tumorais humanas.

4.9.2. Purificação dos compostos da fração bioativa Fr-3, por cromatografia em coluna clássica (CCC)

A fração Fr-3, proveniente do extrato bruto da linhagem CMAA 1527 apresentou um certo grau de impureza, constatado por CLAE-UV. Esta fração foi submetida ao processo de separação cromatográfica em coluna clássica (CCC, 100 cm de comprimento x 8 cm de diâmetro), utilizando Sephadex LH-20 (Sigma-aldrich - Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária (20 g/g de amostra) e Metanol como fase móvel. Foram coletadas 10 subfrações, as quais foram analisadas por espectrometria de massas via inserção direta (EM-ID) e CLAE-EM. Posteriormente, essas frações foram reunidas de acordo com o perfil químico e pureza apresentado nas análises por EM-ID e CLAE-EM, respectivamente. O rendimento dos extratos e das respectivas frações estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento de extrato bruto e frações purificadas (linhagens CMAA 1527 e CMAA 1653)

	Extrato Bruto		Frações (mg)											
	0,5 L	10 L	Fr1	Fr2	Fr3	Fr4	Fr5	Fr6	Fr7	Fr8	Fr9	Fr10	Fr11	SubFr-1
A	35	660	< 1	< 1	120	< 1	10	10	-	-	-	-	-	16
B	28	350	-	-	-	-	-	-	50	10	6	19	5	-

Legenda: A) linhagem CMAA 1527; B) linhagem CMAA 1653

4.9.3. Análise dos extratos brutos, frações e subfrações bioativas por espectrometria de massas via inserção direta (EM-ID) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detectores de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

Os extratos brutos, bem como as frações e subfrações ativas foram solubilizados em 1,0 mL de metanol, obtendo-se uma concentração de 1,0 mg/mL. A solução estoque foi diluída para obter uma concentração final de 10 µg/mL, e posteriormente, analisada via EM-ID em um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD) e ao espectrômetro de massas (EM) quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização *Z-spray* operando em modo positivo e negativo de análise. Cerca de 5 µL de amostra foi injetada dentro da fonte de

ionização *Z-spray* (do inglês, electrospray ionization – ESI) em modo de análise Full-Scan. A faixa de massas analisada foi de 150-1300 u.

As amostras foram também analisadas pela técnica hifenada CLAE-DAD-EM. Um volume de 5 µL de amostra na concentração de 100 µg/mL foi injetada em uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm, 3,5 µm o diâmetro da partícula) da Agilent. A fase móvel consistiu de uma solução aquosa contendo 0.1% de Ácido Fórmico (solvente A) e Acetonitrila + 0.1% de Ácido Fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 30 a 90% de Acetonitrila em 25 min, mantendo esta condição por 5 min. Em seguida, as condições iniciais foram restabelecidas com 30% de Acetonitrila a uma taxa de fluxo de 500 µL/min. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização *Z-spray* foram: voltagem do capilar = 3,2 kV em modo positivo e 2,5 kV em modo negativo, voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte *Z-spray* = 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 700 L/h. A faixa de massas monitorada no modo de análise *Full-Scan* foi de 150 a 1300 unidades de massa (u). Os perfis cromatográficos foram monitorados em uma faixa de comprimentos de onda no DAD de 220-600 nm. Os experimentos de espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM) foram realizados por dissociação induzida por colisão (DIC) usando argônio como gás de colisão para os íons precursores de interesse ($[M + H]^+$).

O agrupamento das amostras por EM-ID e CLAE-EM possibilitou a obtenção de 6 frações reunidas para a linhagem CMAA 1527 e 5 frações para a linhagem CMAA 1653, correspondentes aos compostos majoritários dos extratos. Posteriormente, as frações reunidas foram novamente submetidas aos bioensaios de ação antiproliferativa para células tumorais humanas.

4.10. Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Análise por RMN de hidrogênio (RMN de ¹H) e RMN bidimensional (COSY - correlation spectroscopy; gHSQC - gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence e HMBC - gradient-enhanced heteronuclear multiple bond correlation) da subfração ativa reunida SubFr-1 foi realizada em um espectrômetro Bruker DRX 500 operando em 500 e 125 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. Aproximadamente 16 mg de amostra foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma-Aldrich) e submetida aos experimentos de RMN de ¹H, COSY, gHSQC e gHMBC.

4.11. Análise quimiométrica dos perfis metabolômicos das linhagens do gênero *Streptomyces* em cultivo *in vitro*

Os procedimentos para reativação das linhagens e preparo do pré inóculo foram seguidos conforme item 4.8.1. Em seguida, as linhagens foram cultivadas em caldo Czapeck (Anexo A), em agitação constante, por 10 dias, e temperatura de 16 °C. Os extratos brutos foram extraídos conforme item 4.8.2 e analisados por CLAE-DAD-EM (triplicatas), conforme item 4.9.3. As análises dos perfis metabolômicos foram realizadas em tempo real utilizando a fonte *Z-spray* com polaridade positiva e negativa, bem como em uma faixa de comprimentos de onda no DAD de 220-600 nm. O tratamento dos dados obtidos foi realizado utilizando a ferramenta estatística para descoberta metabolômica em espectrometria de massas, denominada de Waters® MarkerLynx™ Application Manager contida no software MassLynx™ V4.1. Para a construção do método de processamento de dados, os seguintes parâmetros foram utilizados: Function (1-modo positivo; 2-modo negativo); Initial retention time (0 min) e final retention time (30 min); Low Mass (150 u) e High Mass (1200 u); XIC Window (Da) = 0,15; peak width at 5 % height = 1,0; Apply Smoothing = Yes; Marker Intensity threshold (counts) = 40; Mass window = 0,05; Retention time window = 0,20; Noise elimination level = 6,0.

5. RESULTADOS

5.1. Características do local de coleta

O arquipélago Antártico Shetlands do Sul é constituído por 29 ilhas. Dentre elas, a ilha Rei George se destaca por apresentar 1.250 km² de área, sendo considerada a maior de todas as ilhas. Localizada na porção oeste do continente (Figura 6a), o clima do arquipélago é classificado como Polar Oceânico, apresentando forte influência de sistemas ciclônicos marítimos, responsáveis pela disposição de correntes de ar quente e úmido, e consequentemente elevado volume de precipitação. A maior parte desta precipitação ocorre em forma de neve, porém durante os meses de verão (Dez./Mar.) podem ocorrer em forma de chuva. A variação média de temperatura entre os períodos de inverno e verão é de -15,5 a -1,0 °C e -1,3 a 3,0 °C, respectivamente. Durante o verão, regiões periféricas da Ilha Rei George podem apresentar áreas de solo livres da cobertura de gelo (Figura 6b) e intensa atividade biológica, principal motivo para a escolha da região como local de amostragem dos recursos microbianos utilizados neste trabalho.

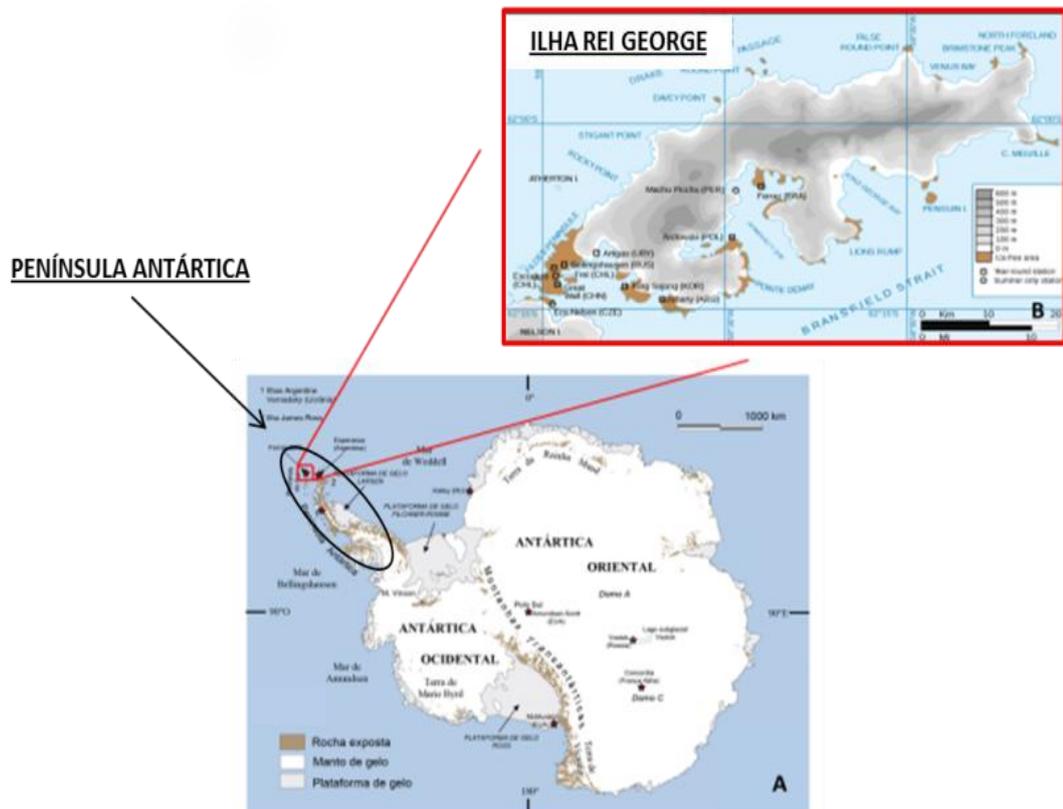


Figura 6: Imagem esquemática do Continente Antártico. A) Península Antártica; B) Destaque para Ilha Rei George e áreas de solo livres de gelo durante o verão

5.2. Coleta das amostras

Apesar da proximidade dos pontos de coleta, algumas variações ambientais puderam ser observadas durante o procedimento de amostragem, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Características observadas nos pontos de coleta, durante a amostragem

Variação	Torre Meteoro (TMD)	Torre Meteoro (TME)	Morro da Cruz (MDC)
Efeito			
Antrópico	Moderado	Alto	Reduzido
Característica 1	Solo descoberto	Solo descoberto	Cobertura parcial
Característica 2	Solo rochoso	Solo rochoso	Solo arenoso
Característica 3	<i>D. antarctica</i>	<i>D. antarctica</i>	<i>D. antarctica</i> e <i>C. quitensis</i>

5.3. Análise da comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, por método independente de cultivo

5.3.1. Diversidade taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (UTOs)

As UTOs foram inicialmente classificadas a nível de filo e apresentaram correlações para 14 filios bacterianos estabelecidos e 7 filios candidatos (Figura 7). A média das assinaturas taxonômicas entre todas as réplicas demonstrou que Actinobacteria (34%) constitui o filo mais abundante em todos os pontos amostrados, seguido pelos filios Chloroflexi (21%) e Proteobacteria (20%). Contudo, o ponto de coleta TME apresentou pronunciado enriquecimento de Actinobacteria e redução da abundância relativa para o filo Proteobacteria, quando comparado com os demais sítios de amostragens. Sequências assinadas para os filios Acidobacteria e Verrucomicrobia também puderam ser recuperadas, porém em baixa abundância (5% cada). Sequências bacterianas que não puderam ser classificadas totalizaram uma média de 7%, em relação a abundância relativa de todo o conjunto de dados analisados.

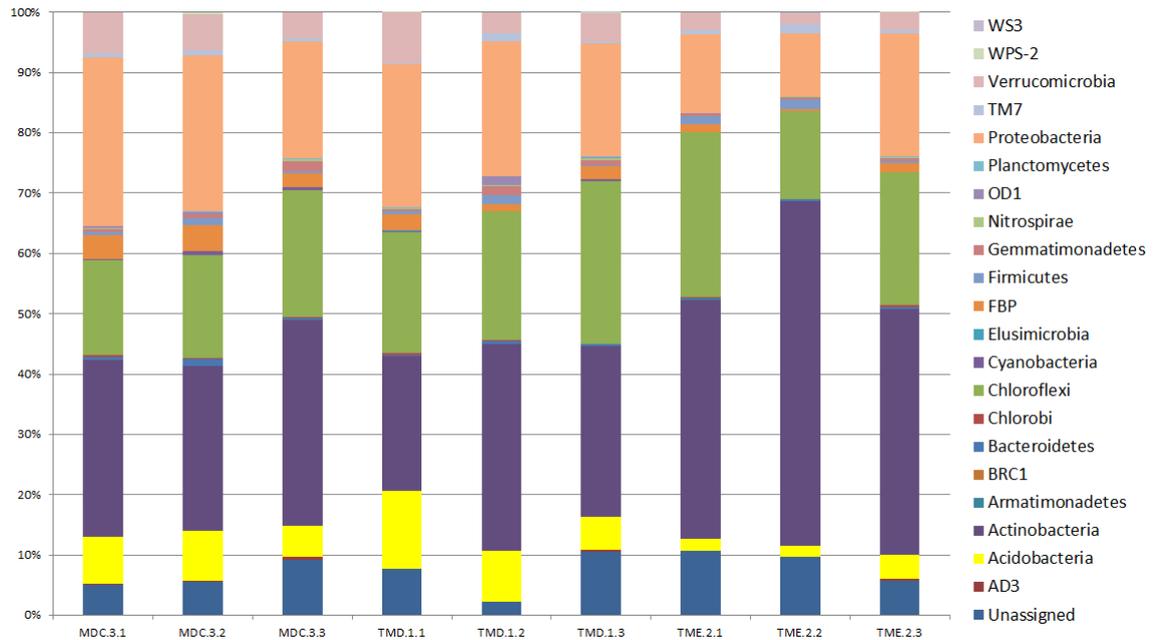


Figura 7: Diversidade taxonômica dos filios bacterianos associados a rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv.

As UTOs assinadas para o filo Actinobacteria foram analisadas em maior detalhamento taxonômico, aos níveis de ordem e família. Os resultados demonstraram a pronunciada abundância da ordem Actinomycetales (86%), seguida de menor representatividade para as ordens Acidimicrobiales (8%) e Solirubrobacteriales (3%) (Figura 8a). Explorando a diversidade da ordem Actinomycetales, as OTUs foram classificadas em 20 famílias, apresentando maior correlação taxonômica à família Intrasporangiaceae (48%). As famílias Frankiaceae, Micromonosporaceae, Microbacteriaceae, Cellulomonadaceae e Nocardiodaceae também foram representadas, porém em menor abundância, conforme apresentado na Figura 8b.

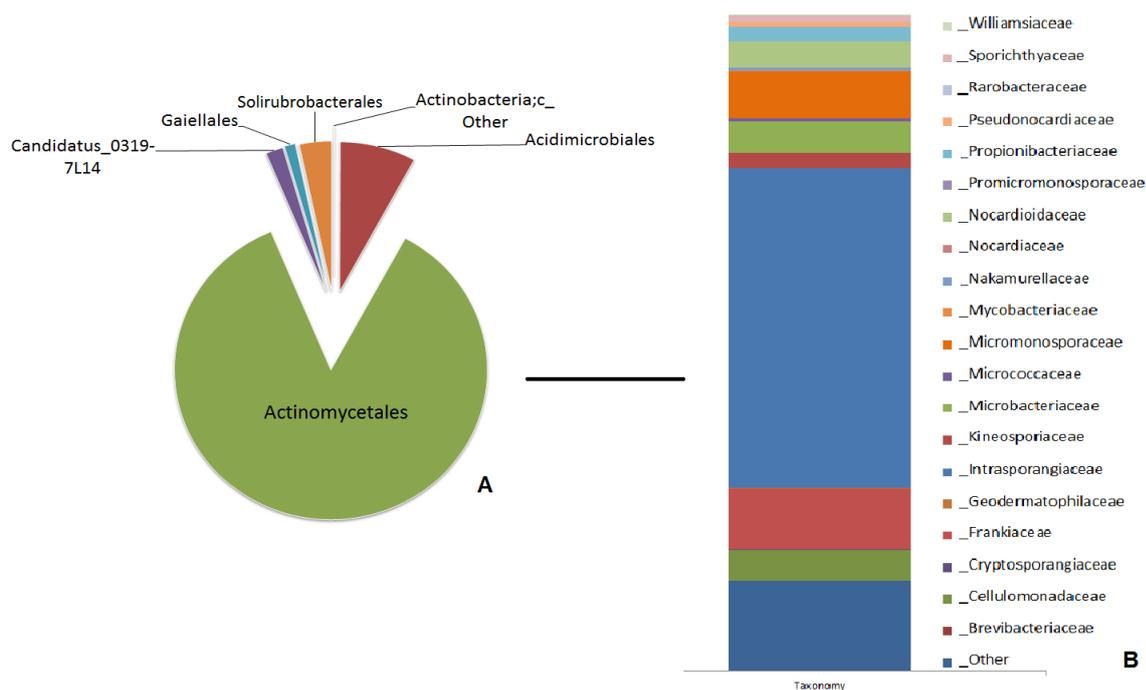


Figura 8: Diversidade taxonômica do filo Actinobacteria. A) Inferência taxonômica das OTUs a nível de ordem; B) Inferência taxonômica das OTUs a nível de família

5.3.2. Predição metagenômica para a comunidade bacteriana total e para o filo Actinobacteria

As inferências metagenômicas foram realizadas a partir de sequências do gene 16S rRNA, utilizando o índice NSTI de $0,23 \pm 0,02$. ZARRAONAINDIA et al. (2015) e CHEN et al. (2016) apresentaram este índice de confiabilidade para predição metagenômica em amostras de solo. A predição realizada para a comunidade de bactérias totais associadas à rizosfera de *D. antarctica* resultou em mais de 6.500 genes codificadores de proteínas, dos quais, 329 foram preditos.

Para a comunidade bacteriana, vias metabólicas relacionadas ao ciclo de crescimento celular (transportadores de membrana, metabolismo energético de carboidratos e aminoácidos, além de replicação e reparo celular) apresentaram maior prevalência, representando aproximadamente 45% das funções detectadas. Nesse sentido, amostras provenientes da Torre Meteoro (TME e TMD) estiveram enriquecidas, em comparação com as amostras do ponto de coleta Morro da Cruz (MDC) (Figura 9). Apesar da baixa abundância, marcadores genéticos para o metabolismo secundário também foram identificados (~3%), dentre eles, se destacam as funções relacionadas ao metabolismo de terpenóides e policetídeos. Sequências não classificadas em nenhuma categoria funcional representaram 5% do total de sequências da análise.

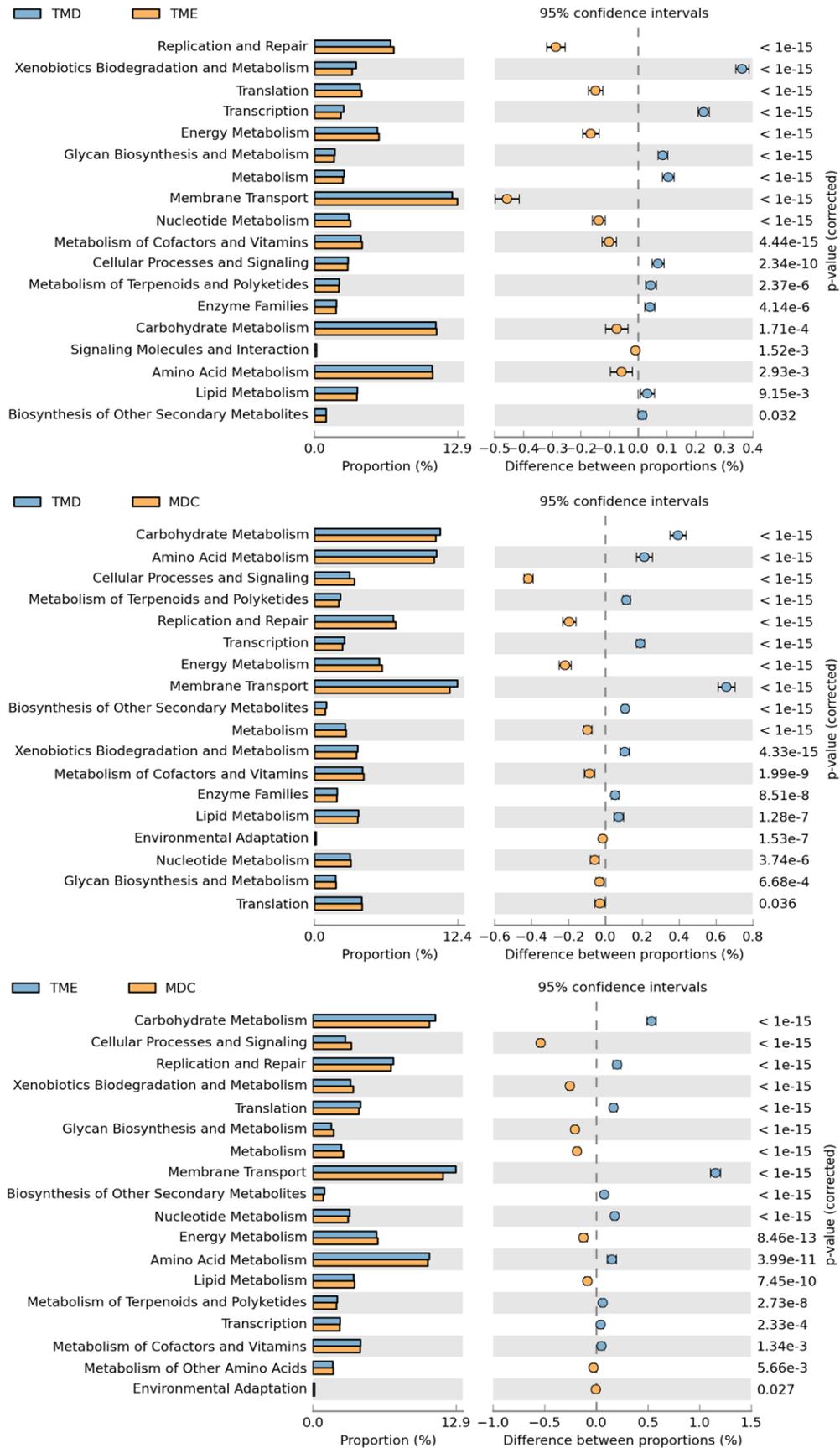


Figura 9: Diferença proporcional entre as principais vias metabólicas, em cada sítio de amostragem (STAMP).

A análise comparativa entre as predições funcionais para o domínio Bacteria e o filo Actinobacteria reforçou a abundância de vias metabólicas para processos de crescimento celular. Sequências afiliadas a transportadores de membrana, replicação e reparo de DNA, metabolismo de terpenóides e policetídeos, e famílias enzimáticas foram enriquecidas em Actinobacterias, em relação a comunidade de bactérias totais. Vias relacionadas ao metabolismo secundário foram exploradas em maior profundidade, as quais foram caracterizadas como vias biossintéticas de estreptomicina, novobiocina, fenilpropanóides, alcaloides de piridina, estilbenóides, neomicina, vancomicina e tetraciclina. Funções adicionais atribuídas às sequências recuperadas e suas respectivas A abundância relativa das funções atribuídas para Bacteria e Actinobacteria está apresentada na Figura 10.

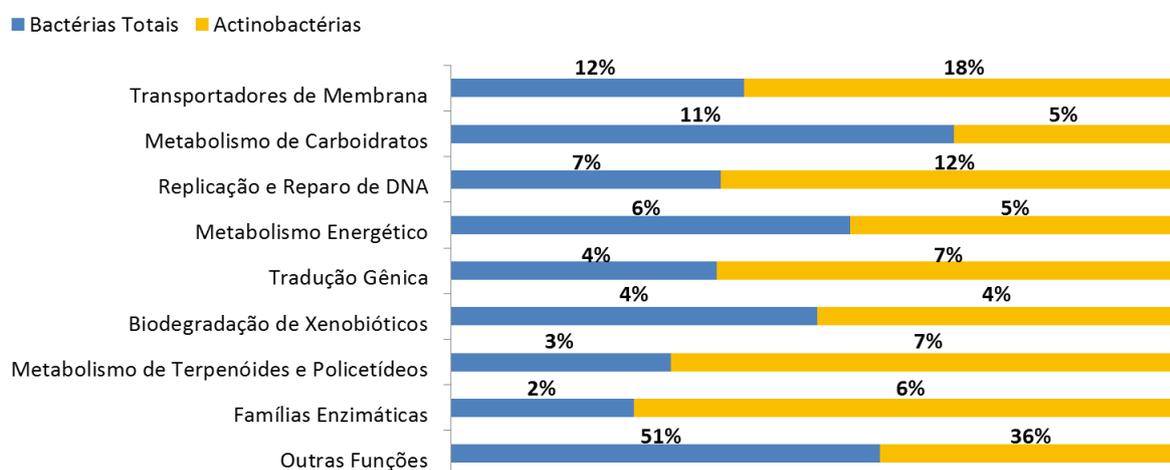


Figura 10: Predição funcional de vias metabólicas por PICRUSt. Abundância relativa entre sequências assinadas para o domínio Bacteria e para o filo Actinobacteria.

5.4. Seleção de DNA ambiental e clonagem de insertos gênicos

5.4.1. Avaliação da integridade do DNA recuperado e validação da biblioteca metagenômica de clones

O procedimento utilizado para extração do DNA ambiental (*eDNA*) foi eficiente para obtenção de fragmentos com alto peso molecular. O gel de eletroforese por campo pulsado (Figura 11a) possibilitou aferir a qualidade do produto de extração, a integridade dos fragmentos gênicos e uma estimativa quantitativa para os insertos de interesse. A quantificação das duas reações de extração pelo sistema *Qubit Fluorimetric Quantification 2.0* (Invitrogen - Carlsbad, CA, Estados Unidos) determinou a concentração do *eDNA* total em aproximadamente 50 ng/ μ L.

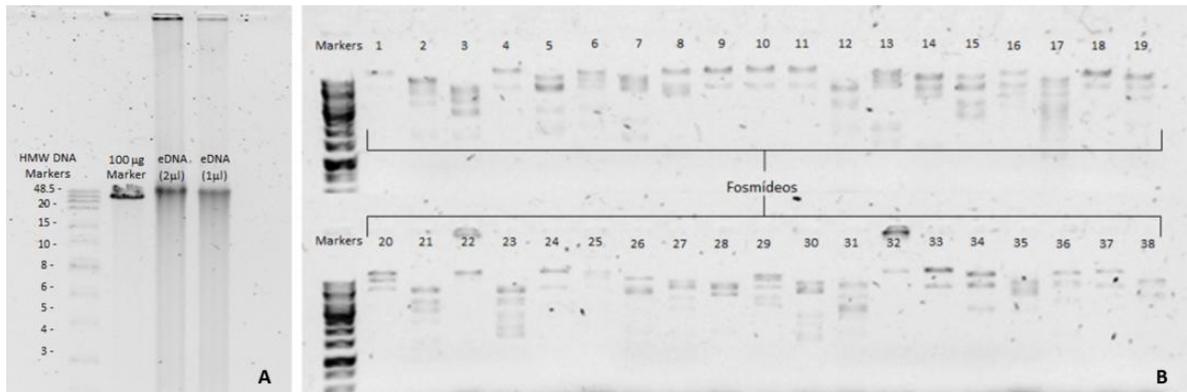


Figura 11: Gel de eletroforese de campo pulsado. A) Extração de *eDNA* de alto peso molecular; B) Diversidade dos insertos metagenômicos clonados

A diversidade dos insertos clonados foi determinada pela digestão dos fosmídeos pela endonuclease de restrição *NotI* e eletroforese de campo pulsado. O padrão apresentado pelos fragmentos gerados, a partir de 40 clones selecionados aleatoriamente (Figura 11b), possibilitou a validação da biblioteca metagenômica. Ao final dos procedimentos de preservação, a biblioteca foi estabelecida com 42.528 clones (~1,5 Gb de DNA metagenômico) e encontra-se depositada na Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA).

5.4.2. Triagem funcional para de *L*-asparaginase

A utilização de glicose como fonte de carbono ao meio de cultivo M9 não foi eficiente ao crescimento dos clones metagenômicos. Com isso, a fonte de carbono de fácil assimilação usualmente utilizada foi substituída por lactose. O potencial para expressão de *L*-asparaginase de 9.405 clones (~20% da biblioteca) foi avaliado, não havendo nenhum clone positivo para a função prospectada.

Em virtude da demanda de trabalho exigida para a triagem funcional e a necessidade de também explorar os recursos microbianos cultiváveis, as atividades de prospecção com a biblioteca metagenômica de clones foram suspensas. Contudo, os recursos genéticos acessados estão disponíveis para grupos de pesquisas interessados em prospectar o potencial biotecnológico do Continente Antártico, conforme as normas estabelecidas pela Embrapa Meio Ambiente para parcerias institucionais.

5.5. Acesso a comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, por método dependente de cultivo

5.1. Isolamento de actinobactérias

Os esforços empregados a recuperação de actinobactérias *in vitro* resultaram em 72 linhagens. O substrato amido caseína ágar possibilitou a recuperação da maior parte dos isolados (51%), seguido dos meios de cultivo dextrose extrato de carne triptona (29,5%) e extrato de solo (19,5%), conforme a Figura 12.

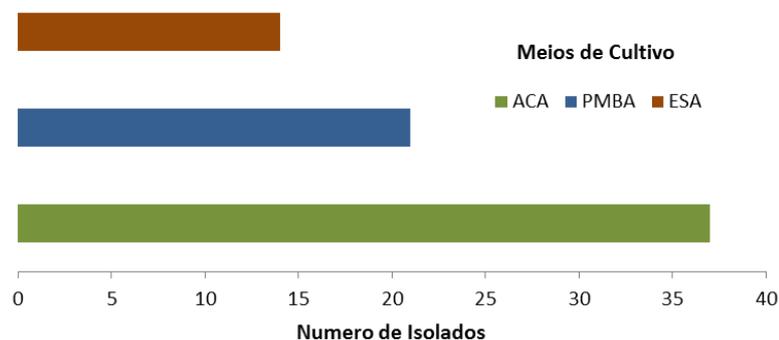


Figura 12: Relação entre o numero de isolados recuperados para cada meio de cultivo

5.2. Análise da diversidade taxonômica dos isolados, por sequenciamento parcial da região 16S rRNA e seleção de táxons representantes

A análise comparativa entre as sequências possibilitou a formação de 9 clados principais (Figura 13). A abordagem constitui uma avaliação genotípica e não filogenética, o que justifica a não inclusão de uma sequência de grupo externo como raiz (*outgroup*). Dentre os clados formados pode-se inferir sequências com alta similaridade (clado III, IV e V) e agrupamento de sequências com maior variabilidade genotípica (clado IX). As sequências de cada conjunto foram exploradas em maior detalhamento (*align two or more sequences*; Blast – NCBI) para seleção de apenas um representante taxonômico, em caso de sequências com 100% de similaridade.

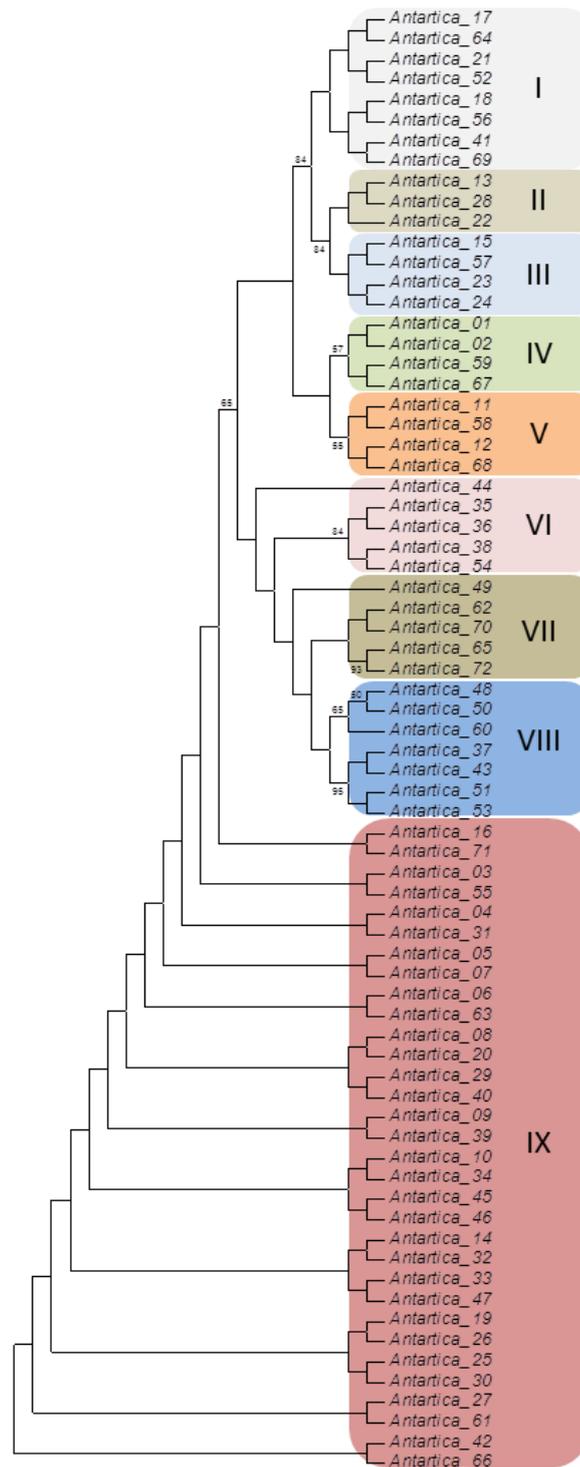


Figura 13: Análise genotípica de fragmentos 16S rRNA (~700 pb), por método de *maximum-likelihood* (MEGA 7.0)

Os 30 taxa selecionados para representar a diversidade cultivável de actinobactérias, associadas a rizosfera de *Deschampsia antarctica* estão apresentados na Figura 14.



Figura 14: Taxa representantes da diversidade de actinobactérias isoladas da rizosfera de *Deschampsia antarctica*, depositados na Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA)

5.3. Identificação taxonômica das linhagens selecionadas, por sequenciamento da região 16S rRNA

O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores possibilitou a geração de sequências com cobertura quase completa para a região 16S rRNA. A inferência genética indicou a distribuição das linhagens entre os gêneros: *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Kribella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pilimelia*, *Pseudoarthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptacidiphilus*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*. Embora a família Intrasporangiaceae tenha se apresentado como predominante nos resultados de sequenciamento massivo, nenhum representante para a família foi recuperado pela estratégia de isolamento.

O índice de similaridade entre as sequências 16S rRNA das linhagens selecionadas com as linhagens tipo mais próximas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Inferência taxonômica e número de acesso para sequências 16S rRNA das linhagens de actinobactérias

Código	Família	Táxon mais próximo	Ident. (%)	GenBank
CMAA 1515	Streptomycetaceae	<i>Streptacidiphilus albus</i>	98,99	MH241008
CMAA 1516	Streptomycetaceae	<i>Pilimelia columellifera subsp. pallida</i>	98,37	MH241011
CMAA 1517	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	99,61	MH241013
CMAA 1518	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces avidinii</i>	99,69	MH241014
CMAA 1519	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	99,65	MH241015
CMAA 1520	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces luridiscabiei</i>	99,93	MH241016
CMAA 1521	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces globisporus</i>	100	MH241017
CMAA 1522	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	100	MH241019
CMAA 1523	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	99,92	MH241020
CMAA 1524	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces olivaceus</i>	99,93	MH241021
CMAA 1525	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces diastaticus subsp. ardesiacus</i>	99,65	MH241022
CMAA 1526	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces parvulus</i>	99,86	MH241023
CMAA 1527	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i>	99,37	MH241026

continua

continuação

Código	Familia	Táxon mais próximo	Ident. (%)	GenBank
CMAA 1528	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces alni</i>	98,25	MH241029
CMAA 1529	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	99,22	MH241030
CMAA 1530	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus trifolii</i>	98,79	MH241033
CMAA 1531	Tsukamurellaceae	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	99,93	MH241034
CMAA 1532	Nocardiaceae	<i>Nocardia asteroides</i>	100	MH241035
CMAA 1533	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	96,91	KY317932
CMAA 1536	Streptomycetaceae	<i>Streptacidiphilus carbonis</i>	98,96	MH241010
CMAA 1537	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter cryoconiti</i>	98,53	MH241018
CMAA 1538	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces violaceochromogenes</i>	99,50	MH241025
CMAA 1539	Nocardiaceae	<i>Nocardia ninae</i>	98,18	MH241036
CMAA 1650	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium hodleri</i>	98,85	MH241031
CMAA 1651	Micrococcaceae	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	99,22	MH241028
CMAA 1652	Nocardioidaceae	<i>Kribbella ginsengisoli</i>	99,28	MH241024
CMAA 1653	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces fildesensis</i>	99,72	MH241012
CMAA 1654	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces fildesensis</i>	99,43	MH241009
CMAA 1703	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces ossamyceticus</i>	98,90	MH241027
CMAA 1704	Micromonosporaceae	<i>Actinoplanes brasiliensis</i>	98,69	MH241032

Legenda: CMAA – Coleção de Micro-Organismos de Importância Agrícola e Ambiental (EMBRAPA)

5.4. Caracterização taxonômica polifásica da linhagem CMAA 1533

5.4.1. Análise filogenética

A sequência 16S rRNA da linhagem CMAA 1533 apresentou baixa similaridade (~96,9%) quando comparada com as sequências 16S rRNA de taxa mais próximos, retiradas do servidor EzTaxon. Com isso, a linhagem foi selecionada para uma análise taxonômica mais aprofundada, a qual avaliou a possibilidade da descrição de um novo taxon para o gênero *Rhodococcus*.

O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores possibilitou a obtenção de uma sequência 16S rRNA com cobertura de 1.434 pb (acesso GenBank KY317932). A análise comparativa da sequência, frente as sequências de 16S rRNA depositadas nos bancos de dados (Tabela 6), indicou que a linhagem CMAA 1533 pertence a família Nocardiaceae. A sequência apresentou maiores índices de similaridade para as linhagens tipo: *Rhodococcus baikonurensis* DSM 44587^T, *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477^T, *Rhodococcus degradans* CCM 4446^T, *Rhodococcus erythropolis* NBRC 15567^T e *Rhodococcus triatomae* DSM 44892^T.

Tabela 6: Índice de similaridade entre a sequência 16S rRNA da linhagens CMAA 1533 e sequências 16S rRNA de linhagens tipo mais próximas (EzTaxon)

Táxon mais próximo (numero de acesso)	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência	Descrição da amostra
<i>R.baikonurensis</i> (AB071951)	93.6	96,9	Li et al., 2009	Ar – Estação Espacial MIR.
<i>R.qingshengii</i> (DQ090961)	100	96,9	Xu et al., 2007	Solo (China).
<i>R.degradans.</i> (JQ776649)	100	96,9	Svec et al., 2015	Solo (Switzerland)
<i>R.erythropolis</i> (BCRM01000055)	100	96,9	Yoon et al., 1997	Solo (ND)
<i>R.triatomae</i> (AJ854055)	100	96,8	Yassin, 2005	Inseto – <i>Triatoma</i> sp.
<i>R.corynobioides</i> (AF430066)	100	96,6	Yassin; Schaal, 2005	ND
<i>R.trifolii</i> (FR714843)	94.5	96,5	Kampfer et al., 2013	Superfície foliar – <i>Trifolium repens</i> (Alemanha)
<i>Nocardia niwae</i> (BDCK01000073)	100	96,5	Moser et al., 2011	Pulmão – Clínico (Estados Unidos)
<i>R. enclensis</i> (HQ858009)	94.9	96,4	Dastager et al., 2014	Sedimento marinho (Índia)
<i>N. bhagyanarayanae</i> (JX076851)	100	96,4	Vaddavalli et al., 2014	Rizosfera – <i>Callistemon citrinus</i> (Índia)
<i>R. pedocola</i> (KT301938)	100	96,2	Nguyen; Kim, 2016	Floresta tropical (Coreia do Sul)
<i>R.fascians</i> (JMEN01000010)	100	96,2	Goodfellow, 1984	ND

Legenda: ND: Não Determinado

A reconstrução filogenética revelou que a linhagem CMAA 1533 forma uma linha filogenética distinta dentro da árvore 16S rRNA de *Rhodococcus* (Figura 15), adjacente às linhagens *Rhodococcus triatomae* DSM 44892^T, *Rhodococcus corynobioides* DSM

201151^T e *Rhodococcus trifolii* LGM 26204^T. Embora o valor de *bootstrap* resultante da reconstrução filogenética por *neighbor-joining* esteja baixo, a topologia da árvore foi mantida nos modelos evolutivos de máxima verossimilhança e máxima parcimônia (círculos pretos e brancos).

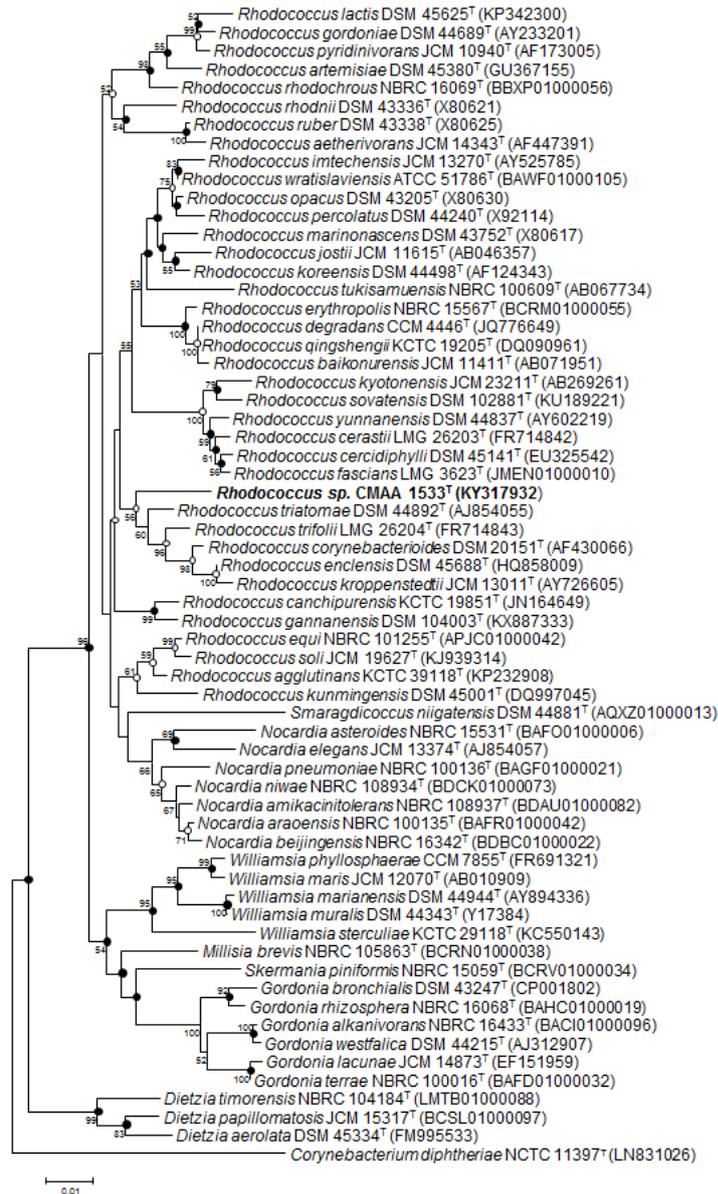


Figura 15: Reconstrução filogenética por *neighbour-joining*, com base na sequência 16S rRNA da linhagem CMAA 1533 e sequências de linhagens tipo da família Nocardiaceae. Círculos pretos indicam ramificações correspondentes nos algoritmos *maximum-likelihood* e *maximum-parcimony*. Círculos brancos indicam ramificações correspondentes em *maximum-likelihood* ou *maximum-parcimony*. Os valores nos clados indicam a porcentagem de *bootstrap* (1.000 repetições; apenas valores superiores a 50% foram apresentados). A linhagem *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 11397^T foi empregada como *outgroup*.

5.4.2. Análise quimiotaxonômica

O hidrolisado da linhagem, CMAA 1533, apresentou predominância de arabinose e galactose como açúcares da parede celular (parede quimiotipo IV e padrão de açúcar tipo A;

LECHEVALIER e LECHEVALIER, 1970) (Figura 16a), além de difosfatidilglicerol (DPG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilinositol manoside (PIDM) como lipídios polares (padrão de lipídios polares tipo II; Lechevalier et al., 1977) (Figura 16b, c, d), e presença de ácidos micólicos (Figura 16e).

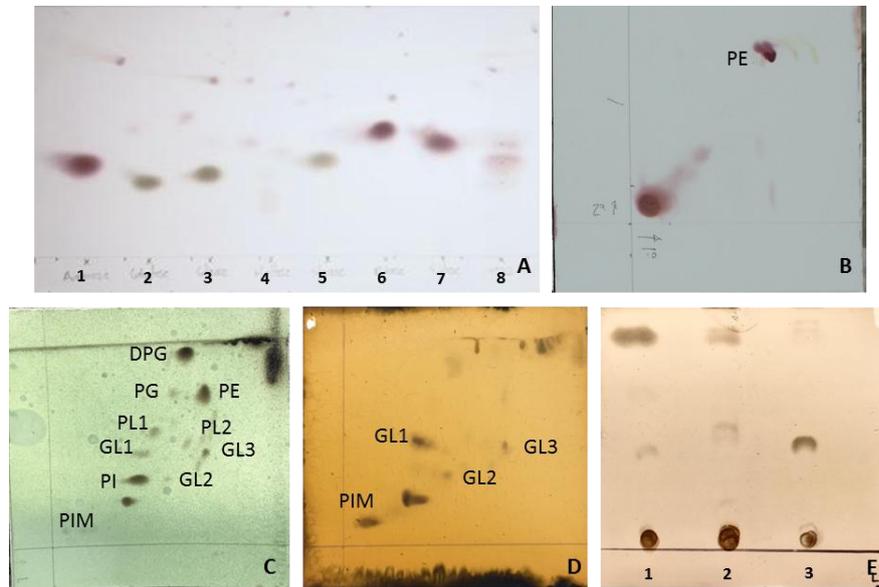


Figura 16: Perfil quimiotaxonômico do hidrolisado celular da linhagem CMAA 1533. A) Padrão de açúcar: 1 – arabinose; 2 – galactose; 3 – glicose; 4 – maltose; 5 – manose; 6 – ribose; 7 – xilose; 8 – CMAA 1533; B, C e D) Lipídios polares: difosfatidilglicerol (DPG); fosfatidilglicerol (PG); fosfatidiletanolamina (PE); fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilinositol manoside (PIDM); E) Ácido micólico: 1) CMAA 1533; 2) *Mycobacterium gordoniae* JCM 6382^T; 3) *Gordonia bronchialis* NCB 0305^T.

Menaquinonas di-hidrogenadas, contendo 8 unidades de isopreno [MK-8(H₂)] foram predominantes (~72,3%). O cromatograma da Figura 17 apresenta correlação direta com o padrão cromatográfico estabelecido por Collins e Goodfellow (1979).

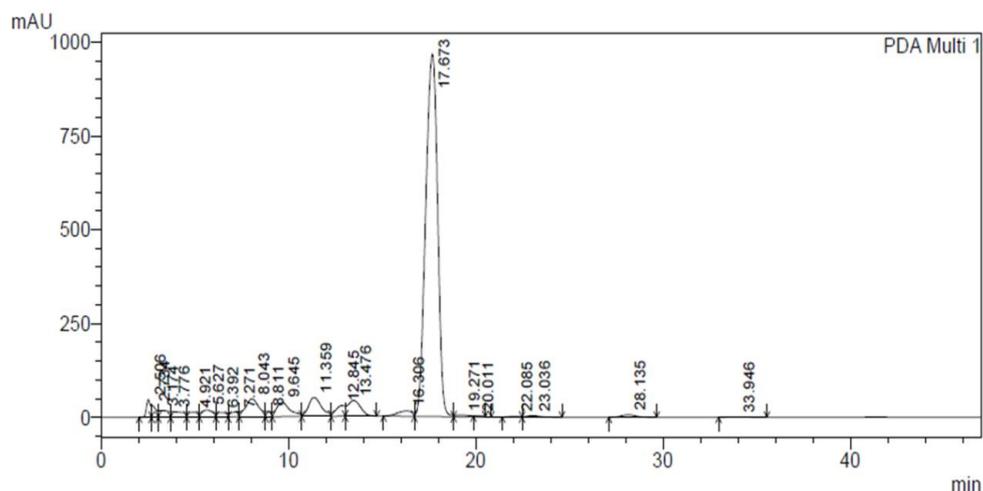


Figura 17: Análise cromatográfica – Perfil de menaquinonas da linhagem CMAA 1533

Os ácidos graxos $C_{16:1}\omega 6c/C_{16:1}\omega 7c$; $C_{16:0}$; $C_{18:1}\omega 9c$ e 10-metil $C_{18:0}$ formam os principais constituintes dos fosfolipídios das membranas celulares. Os demais ácidos graxos e suas respectivas concentrações estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos – CMAA 1533

Ácidos graxos	Quantidade (%)
Saturados	
$C_{12:0}$	0,1
$C_{14:0}$	1,5
$C_{16:0}$	27,5
$C_{18:0}$	0,3
$C_{19:0}$	0,2
Insaturados	
$C_{17:1}\omega 8c$	1,0
$C_{18:1}\omega 9c$	19,0
Metil	
10-Metil $C_{17:0}$	0,2
10-Metil $C_{18:0}$	13,4
Somados	
$C_{16:1}\omega 7c/C_{16:1}\omega 6c$	35,1
$C_{19:1}\omega 11c/C_{19:1}\omega 9c$	0,4
10-Metil $C_{16:0}/iso-C_{17:1}\omega 9c$	1,1

5.4.3. Características culturais e fenotípicas

A linhagem CMAA 1533 apresentou bom crescimento em todos os meios utilizados, exceto no meio de cultivo *International Streptomyces Project-4*. Pigmentos solúveis não foram produzidos em nenhum dos substratos testados. As colônias apresentam crescimento circular, de constituição seca e quebradiça, e coloração creme opaca. As células são Gram-positivas, sem motilidade e apresentam variações morfológicas durante o ciclo de desenvolvimento (Figura 18).

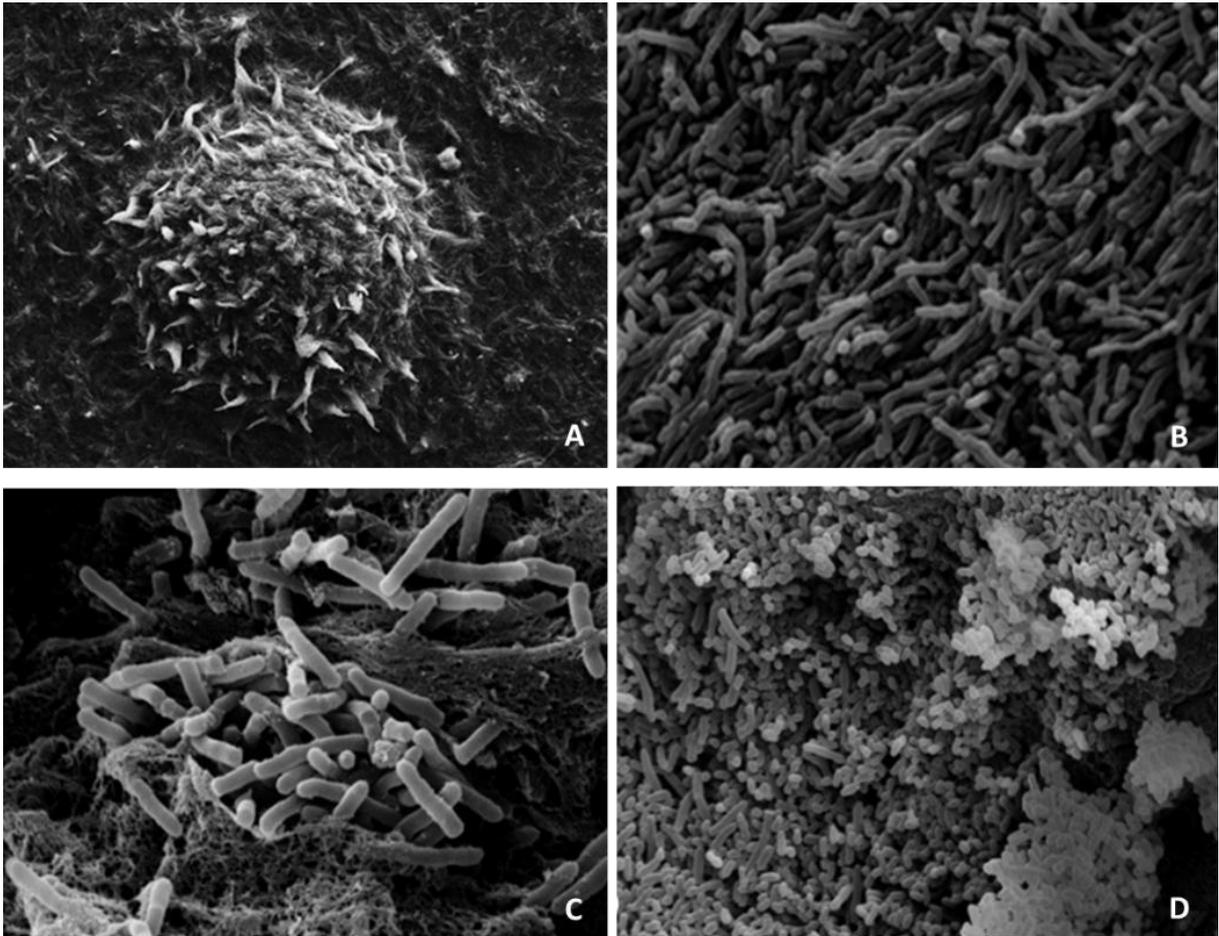


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura – Ciclo de crescimento da linhagem CMAA 1533, em meio de cultivo GYEA. A) Fase inicial; B) Micélio ramificado; C) Bastonetes; D) Coccos

O organismo apresentou crescimento no intervalo térmico de 4-28 °C (ótimo entre 16-20 °C), pH 4.0-10.0 (ótimo em 7.0) e suportou até 7,0% de NaCl em meio de cultivo (ótimo 0-2,5%). As diferenças fenotípicas entre a linhagem CMAA 1533 e as linhagens tipo filogeneticamente mais próximas estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Diferenças fenotípicas e quimiotaixonômicas – CMAA 1533 e linhagens tipo mais próximas

Características	CMAA 1533	<i>R. triatomae</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. corynebacterioides</i>
Crescimento:				
4 °C	+	-	-	-
37 °C	-	+	+	+
Utilização - Fonte única de Carbono:				
Adonitol	+	-	-	-

continua

Características	CMAA 1533	continuação		
		<i>R. triatomae</i>	<i>R. trifolii</i>	<i>R. corynebacterioides</i>
Utilização - Fonte única de Carbono:				
D-Celubiose	+	-	-	+
D-Galactose	+	-	-	-
D-Sorbitol	+	-	-	+
<i>Myo</i> -Inositol	-	-	+	+
Degradação de:				
Caseína	+	-	ND	-
Hipoxantina	+	-	ND	-
Composição:				
Menaquinonas	MK-8(H ₂)	MK-8(H ₂)	MK-8(H ₂), MK-9(H ₂), MK-7(H ₂), MK-6(H ₂)	MK-8(H ₂)
Ácidos Graxos (>10%)	C _{16:1} (ω 6C/ ω 7c), C _{16:0} , C _{18:1} (ω 9c), 10-Metil C _{18:0}	10-Metil C _{18:0} , C _{16:0}	C _{16:0} , 10-Metil C _{18:0} , C _{18:1} (ω 9c), C _{16:1} (ω 7c)	C _{16:0} , C _{18:1} (ω 9c)

Legenda: (+) positivo; (-) negativo e (ND) Não Determinado

Adicionalmente, a linhagem CMAA 1533 apresentou potencial para produção de esterase (C₄), esterase lipase (C₈), lipase (C₁₄), leucina arilamidase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -glucosidase e α -manosidase, e não apresentou indícios metabólicos à produção de fosfatase alcalina, cisteína arilamidase, tripsina, valina arilamidase, α -quimotripsina, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucoronidase, N-acetil- β -glucosaminidase ou α -fucosidase (Figura 19).



Figura 19: API ZYM Test – Sistema aplicado para inferência de potencial enzimático da linhagem CMAA 1533.

5.5. Avaliação do potencial bioativo das linhagens de actinobactérias

5.5.1. Reativação das linhagens, produção e extração de metabólitos secundários

Os procedimentos aplicados à ativação das linhagens e obtenção de colônias isoladas foram eficientes, possibilitando o crescimento e inoculação de todos os isolados preservados. As condições de cultivo possibilitaram o crescimento e a produção de metabólitos secundários diversificados, conforme a coloração apresentada nos sobrenadantes das culturas. A fase orgânica proveniente do processo de extração líquido-líquido com Acetato de Etila, também se mostrou eficiente à recuperação dos metabólitos presentes na fase aquosa, uma vez que a fase orgânica adquiriu a coloração intensa idêntica a da fase aquosa após o procedimento de extração. Os procedimentos supracitados estão apresentados na Figura 20.



Figura 20: Produção de metabólitos secundários. A) Obtenção de colônias isoladas; B) Cultivo de actinobactérias em caldo batata dextrose e C) Extração líquido-líquido

5.5.2. Triagem dos extratos bioativos, por atividade de antagonismo para *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T

O método utilizado para triar as linhagens com melhor potencial para produção de compostos antitumorais, indicou maior desempenho bioativo para os extratos brutos das linhagens CMAA 1517, CMAA 1527, CMAA 1532 e CMAA 1653. Entre os extratos avaliados, 57% apresentaram inibição ao crescimento de *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T, revelando o potencial bioativo das actinobactérias associadas à gramínea *Deschampsia antarctica*. As inferências quantitativas, com base no tamanho do halo de inibição, estão

apresentadas na Tabela 9. Todos os extratos que apresentaram bioatividade foram submetidos ao bioensaio preliminar de atividade antiproliferativa.

Tabela 9: Avaliação quantitativa – Potencial bioativo dos extratos brutos, contra o crescimento *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T

Linhagem:	Atividade
CMAA 1515	++
CMAA 1516	+
CMAA 1517	+++
CMAA 1518	+
CMAA 1519	++
CMAA 1520	+
CMAA 1521	-
CMAA 1522	++
CMAA 1523	++
CMAA 1524	++
CMAA 1525	+
CMAA 1526	-
CMAA 1527	+++
CMAA 1528	-
CMAA 1529	-
CMAA 1530	+
CMAA 1531	-
CMAA 1532	+++
CMAA 1533	-
CMAA 1536	++
CMAA 1537	-
CMAA 1538	-
CMAA 1539	-
CMAA 1650	-
CMAA 1651	-
CMAA 1652	-
CMAA 1653	+++
CMAA 1654	+
CMAA 1703	++
CMAA 1704	-

Legenda: (-) sem atividade; (+) baixa atividade; (++) atividade moderada; (+++) atividade pronunciada

5.5.3. Avaliação do potencial antiproliferativo dos metabólitos secundários para células tumorais humanas

O ensaio preliminar avaliou a efetividade de 17 extratos ativos, para inibição completa do crescimento (*TGI*) das linhagens U251, MCF-7, NCI-H460 e HaCaT (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos (TGI)

Linhagem	Linhagens			
	U251	MCF-7	NCI-H460	HaCaT
CMAA 1515	99,8	83,5	*	90,3
CMAA 1516	42,5	57,1	94,8	64,1
CMAA 1517	151,2	166,1	*	108,8
CMAA 1518	*	*	*	101,4
CMAA 1519	190,1	120,1	213,6	123,3
CMAA 1520	3,7	1,3	0,5	0,8
CMAA 1522	110,4	112,6	*	*
CMAA 1523	68,7	109,3	199,2	71,4
CMAA 1524	52,3	33,6	51,9	42,8
CMAA 1525	*	170,9	*	*
CMAA 1527	0,8	**	0,5	**
CMAA 1530	117,1	140,9	77,2	55,2
CMAA 1532	57,2	30,1	46,3	25,3
CMAA 1536	77	73	200,7	123,9
CMAA 1653	**	**	1,3	0,3
CMAA 1654	56,5	97,3	83,5	15,9
CMAA 1703	16,5	24,1	38,7	48
Doxorrubicina	1	0,04	0,35	0,39

Legenda: Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-H460 (pulmão); Linhagem não tumoral HaCaT (queratinócito); * Concentração > 250 µg/mL para inibição total do crescimento celular; ** Concentração < 0,25 µg/mL para inibição total do crescimento celular

O ensaio preliminar tornou evidente o pronunciado potencial antiproliferativo das linhagens CMAA 1520, CMAA 1527 e CMAA 1653 (Tabela 10). O caráter citostático do extrato bruto CMAA 1520, mesmo em concentrações de 25 µg/mL, despertou a atenção (Figura 21b). Ademais, o extrato foi eficiente para inibir quase completamente a proliferação de tumores de glioma e mama, em concentração de 0,25 µg/mL. No entanto, a produção de extrato bruto foi reduzida, de forma a inviabilizar os ensaios antiproliferativos futuros e a caracterização química do agente bioativo. O incremento da produção de extrato bruto pode ser realizada através de fontes de carbono diferente e melhor conhecimento sobre a fisiologia da linhagem CMAA 1520.

A linhagem CMAA 1527 apresentou inibição completa para o crescimento das linhagens tumorais de glioma e pulmão, em concentrações de 0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL (Figura 21c). No entanto, o extrato demonstrou caráter citocida para a linhagem tumoral de mama, mesmo na menor concentração avaliada (0,25 µg/mL). O extrato bruto CMAA 1653 apresentou inibição completa para o crescimento do tumor de pulmão, mantendo o caráter citostático nas concentrações 0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL e 25 µg/mL (Figura 21d).

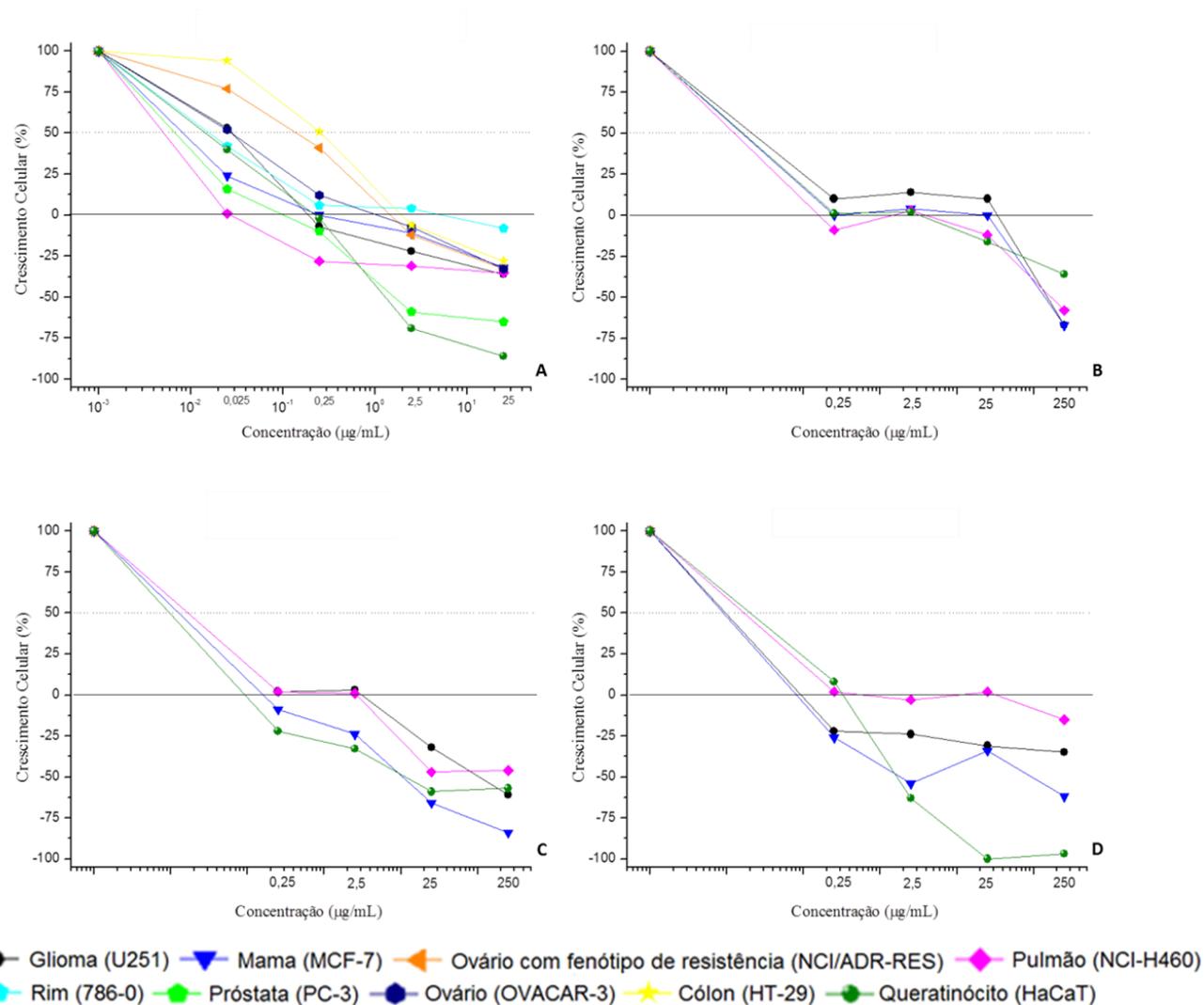


Figura 21: Potencial antiproliferativo dos metabólitos secundários, contra linhagens tumorais humanas. A) Doxorubicina; B) Extrato bruto da linhagem CMAA 1520; C) Extrato bruto da linhagem CMAA 1527 e D) Extrato bruto da linhagem CMAA 1653. Linhagens celulares U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmão) e HaCaT (queratinócitos).

Com base nos resultados, as linhagens CMAA 1527 e CMAA 1653 foram selecionadas para continuidade dos ensaios antiproliferativos e caracterização dos agentes ativos, responsáveis pelas propriedades de inibição.

5.6. Perfil químico dos extratos brutos CMAA 1527 e CMAA 1653 (CLAE-DAD e CLAE-EM)

A fim de identificar os agentes responsáveis pela propriedade antiproliferativa, os extratos brutos foram inicialmente analisados por CLAE-DAD (Figuras 22a e b).

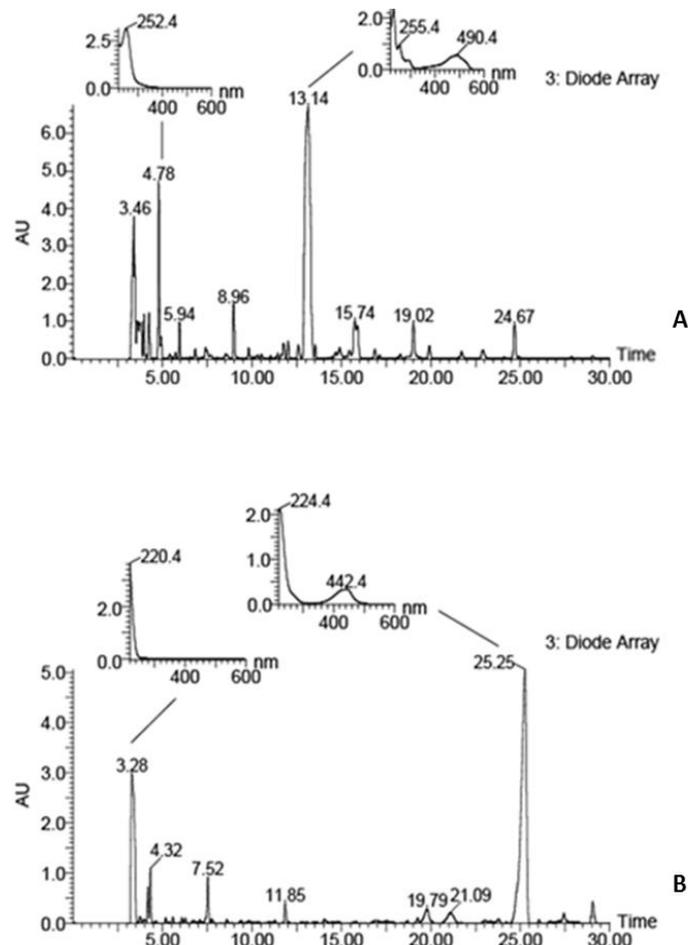


Figura 22: Perfil químico dos extratos brutos, por CLAE-DAD. A) Extrato bruto da linhagem CMAA 1527; B) Extrato bruto da linhagem CMAA 1653.

Os extratos apresentaram perfis químicos distintos, conforme espectros de UV dos constituintes majoritários e respectivos tempos de retenção (t_R). Os picos majoritários para o

extrato bruto da linhagem CMAA 1527 ($t_R = 4,78$ min e $t_R = 13,14$ min) apresentaram baixas absorções na região do UV (252 nm e 255 nm), no entanto o pico referente ao $t_R = 13,14$ apresentou distintamente absorção na região do ultravioleta visível (UV-vis) em 490 nm. Com isso, os metabólitos presentes no extrato devem pertencer a classes químicas diferentes (Figura 22a). O extrato bruto da linhagem CMAA 1653 também apresentou metabólitos de diferentes classes químicas, conforme variações de absorção na região do UV e UV-vis. Os picos cromatográficos referentes aos metabólitos majoritários ($t_R = 3,28$ min e $t_R = 25,25$ min) apresentaram baixas absorções na região do UV (220 nm e 224 nm) e absorção na região do UV-vis em 442 nm, somente para $t_R = 25,25$ min (Figura 22b).

Em seguida, os extratos foram analisados por CLAE-EM, em modo positivo e negativo, para avaliação do perfil químico por meio da massa molecular. Contudo, os resultados obtidos em modo positivo foram mais satisfatórios em termos de resolução cromatográfica e ionização dos compostos, em comparação com a análise realizada em modo negativo (dados não mostrados). Os cromatogramas em modo positivo (*Total Ionic Current - TIC*) estão apresentados na Figura 23a e b.

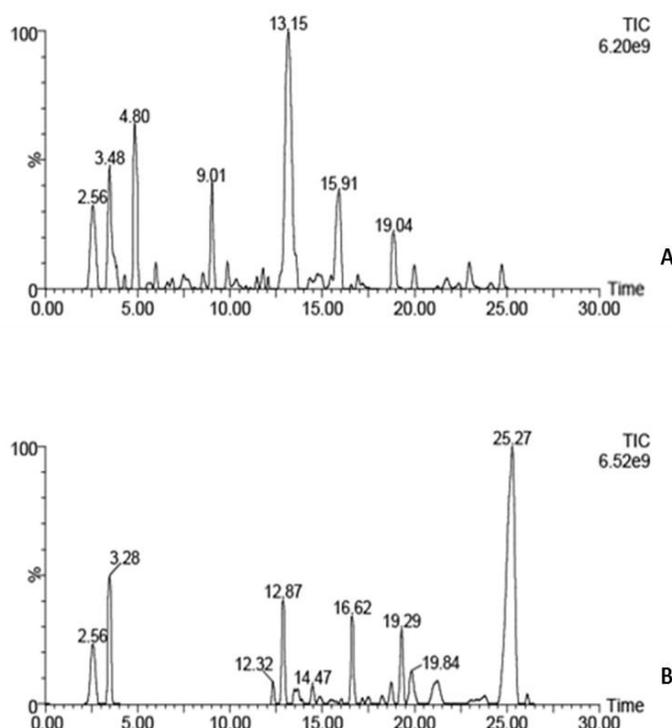


Figura 23: Perfil químico dos extratos brutos, por CLAE-EM. A) Extrato bruto da linhagem CMAA 1527; B) Extrato bruto da linhagem CMAA 1653.

Os espectros de massas dos principais picos cromatográficos observados nos extratos CMAA 1527 e CMAA 1653 e seus respectivos tempos de retenção estão apresentados na Figura 24a e b.

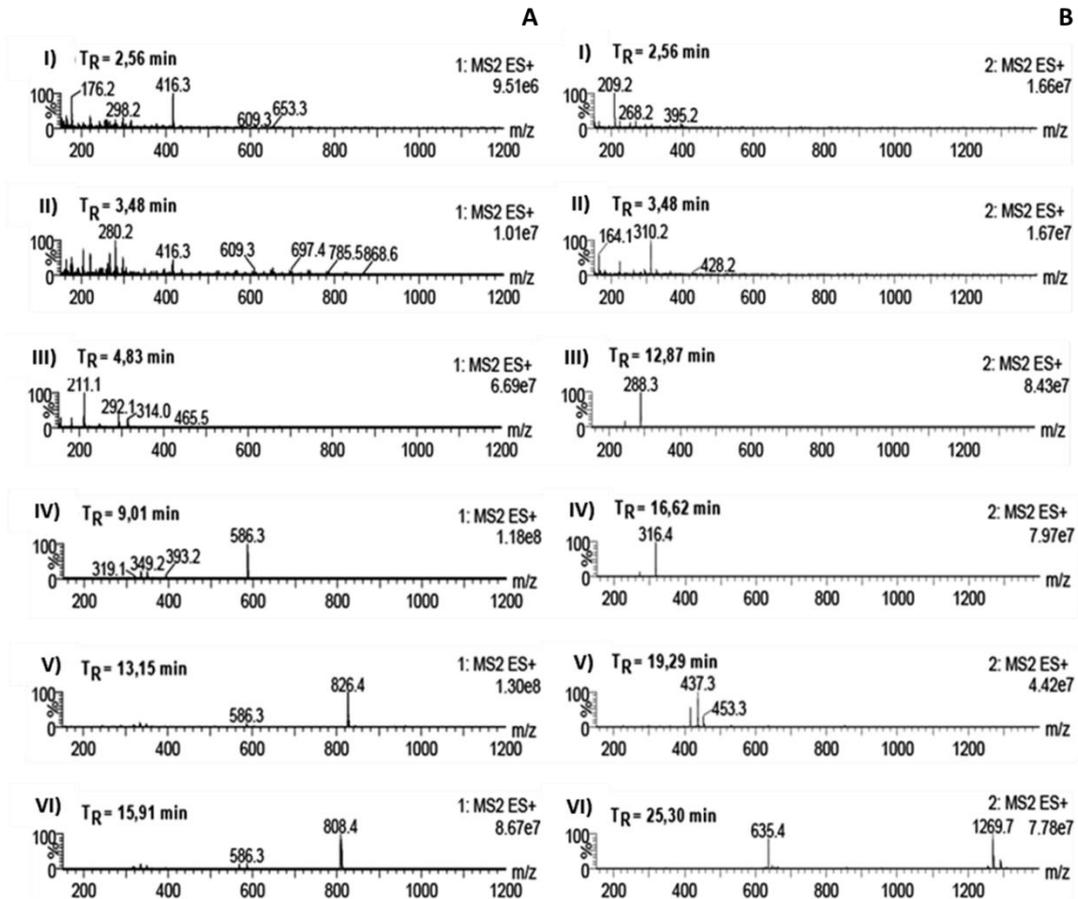


Figura 24: Espectro de massas dos principais picos cromatográficos. A) Extrato bruto da linhagem CMAA 1527; B) Extrato bruto da linhagem CMAA 1653.

Os resultados dos espectros de massas confirmam a diversidade metabólica entre os extratos brutos, conforme previamente indicado por CLAE-DAD. Tanto o extrato bruto da linhagem CMAA 1527, quanto o extrato bruto da linhagem CMAA 1653 mostraram um conjunto de metabólitos na faixa de massas de 200-600 Da (Figura 24a e b). Para o extrato bruto CMAA 1527, os picos cromatográficos majoritários ($t_R = 9,01$ min, $13,15$ min e $15,91$ min) apresentaram majoritariamente os metabólitos de m/z 586, m/z 826 e m/z 808, respectivamente. Já no extrato bruto CMAA 1653, o pico cromatográfico referente ao tempo de retenção $t_R = 12,87$ min mostra apenas o metabólito de m/z 288, assim como o pico de $t_R = 16,62$ min apresenta apenas o metabólito de m/z 316.

5.7. Fracionamento dos extratos brutos (CLAE-UV e CLAE-EM) e avaliação do potencial antiproliferativo das frações majoritárias

A fim de identificar os agentes responsáveis pela propriedade antiproliferativa, os extratos brutos foram purificados por CLAE-UV em escala semipreparativa. As frações coletadas foram reunidas, de acordo com a semelhança química dos metabólitos presentes em cada uma das frações (CLAE-EM) e avaliadas frente às linhagens tumorais: U251 (glioma), MCF-7 (mama), NCI/ADR-Res (ovário com fenótipo de resistência para múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (côlon) e K-562 (leucemia), além da linhagem não tumoral HaCaT (queratinócitos).

Para o extrato bruto da linhagem CMAA 1527 foram reunidos em 6 frações, das quais apenas 3 frações (Fr-3, Fr-5 e Fr-6) puderam ter seu potencial antiproliferativo avaliado. As frações Fr-1, Fr-2 e Fr-4 não foram submetidas ao bioensaio, devido ao baixo rendimento após o processo de purificação cromatográfica ($< 1 \mu\text{g}$). Para o extrato bruto CMAA 1653 foram recuperadas 5 frações (Fr-7, Fr-8, Fr-9, Fr-10 e Fr-11), em quantidades suficientes para serem avaliadas. Para parâmetro de avaliação, o potencial antiproliferativo do quimioterápico comercial doxorrubicina foi apresentado na Figura 25a.

O ensaio antiproliferativo para as frações recuperadas do extrato bruto da linhagem CMAA 1527, revelou maior atividade inibitória para a fração Fr-3, em relação as frações Fr-5 e Fr-6 (Figura 25b, c e d). Tal observação indica a eficiência do processo de purificação por CLAE-UV e demonstra a presença dos agentes responsáveis pela atividade antitumoral na fração Fr-3. Para as frações do extrato bruto da linhagem CMAA 1653, o efeito antiproliferativo pode ser observado às frações Fr-7, Fr-8, Fr-9, Fr-10 e Fr-11 (Figura 25e, f, g, h e i). Tal condição pode significar uma baixa eficiência do processo de purificação ou a presença de compostos variados com propriedades antitumorais.

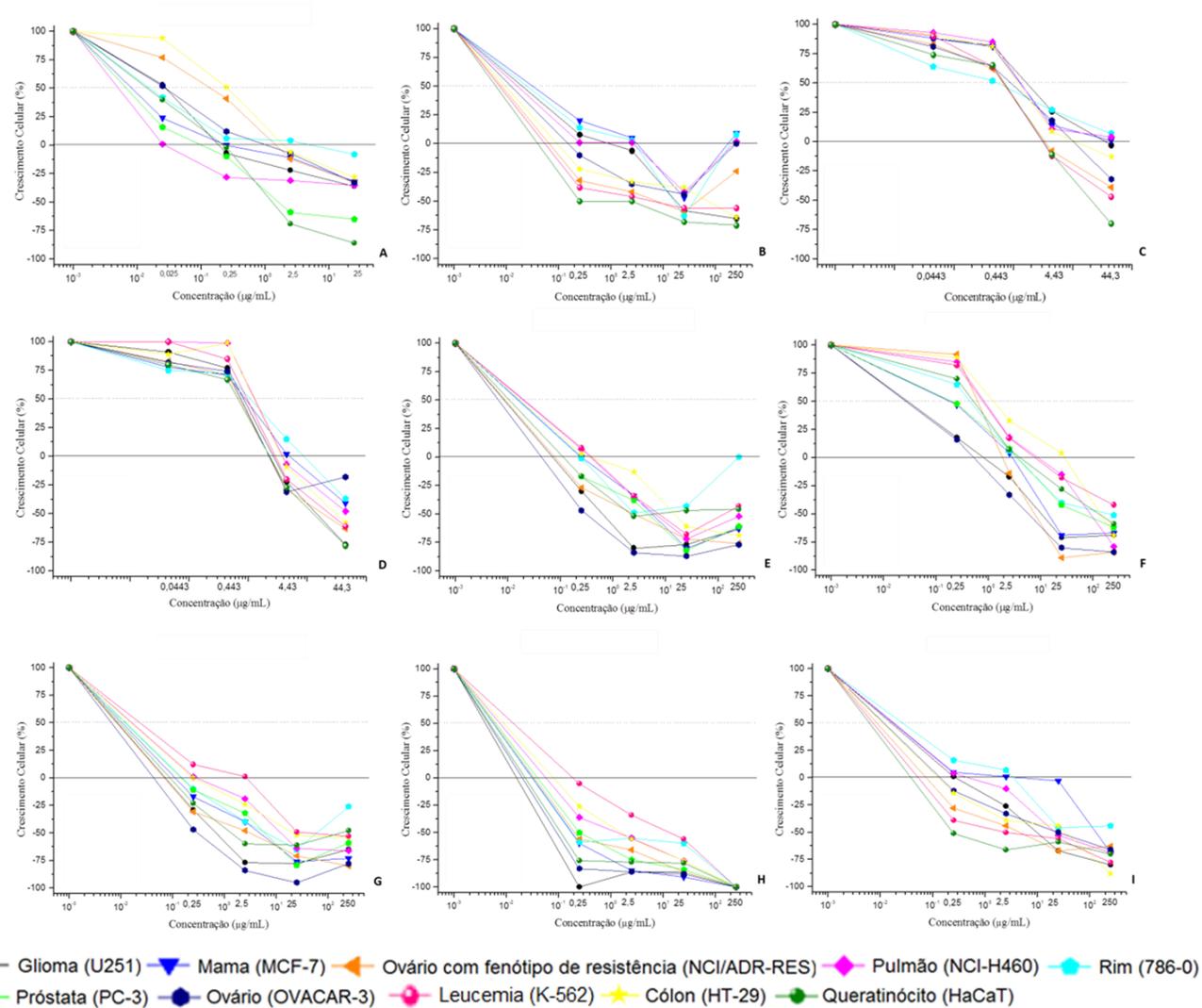


Figura 25: Potencial antiproliferativo das frações purificadas, contra linhagens tumorais humanas. A) Doxorrubicina; B) fração Fr-3; C) fração Fr-5; D) fração Fr-6; E) fração Fr-7; F) fração Fr-8; G) fração Fr-9; H) fração Fr-10; I) fração Fr-11. Linhagens tumorais humanas: U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão); PC-3 (próstata); HT-29 (cólon); K-562 (leucemia). Linhagem não tumoral: HaCaT (queratinócitos).

As Tabelas 11 e 12 apresentam as inferências quantitativas para inibição completa do crescimento (*TGI*) e dose letal para 50% das células em avaliação (LC_{50}).

Tabela 11: Atividade antiproliferativa das frações majoritárias (*TGI*)

Frações	Linhagens									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fr-3	0,65	3,20	**	0,62	**	-	**	**	**	**
Fr-5	29,90	> 44,3	5,30	> 44,3	> 44,3	-	10,20	15,90	4,40	3,20
Fr-6	3,30	6,60	2,80	9,10	6,10	-	5,90	5,0	3,70	2,40
Fr-7	**	**	**	**	0,25	**	**	0,43	**	**
Fr-8	0,70	2,10	2,0	5,0	8,70	3,50	0,50	17,30	12,80	6,10
Fr-9	**	**	**	**	0,25	**	**	0,25	2,50	**
Fr-10	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Fr-11	0,31	1,40	< 0,25	1,50	0,51	-	**	**	**	**
Dox.	0,56	0,42	2,30	4,20	**	**	1,30	3,60	-	**

Legenda: Linhagens tumorais humanas: 1 = U251 (glioma); 2 = MCF-7 (mama); 3 = NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência para múltiplos fármacos), 4 = 786-0 (rim), 5 = NCI-H460 (pulmão); 6 = PC-3 (próstata), 7 = OVCAR-3 (ovário), 8 = HT-29 (côlon), 9 = K-562 (leucemia); Linhagem não tumoral 10 = HaCaT (queratinócito); (*) Concentração > 250 µg/mL para inibição total do crescimento celular; (**) Concentração < 0,25 µg/mL para inibição total do crescimento celular; (-) ensaio não avaliado pela deficiência no crescimento da linhagem na placa controle (T_0).

Tabela 12: Atividade antiproliferativa das frações majoritárias (LC_{50})

Frações	Linhagens									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fr-3	38,8	*	*	*	*	-	*	54,1	11,2	0,51
Fr-5	> 44,3	> 44,3	> 44,3	> 44,3	> 44,3	-	> 44,3	> 44,3	> 44,3	35,2
Fr-6	42,6	> 44,3	23,4	> 44,3	> 44,3	-	> 44,3	35,8	29,2	41,6
Fr-7	0,52	9,40	3,0	*	23,8	6,70	0,14	26,9	55,3	123,3
Fr-8	16,1	17,0	24,0	*	95,6	85,5	6,3	145,4	*	137,7
Fr-9	0,70	5,60	2,6	*	24,1	11,2	0,25	67,5	103,0	13,5
Fr-10	**	**	**	**	1,20	**	**	1,70	10,1	**
Fr-11	12,2	162,6	6,70	*	38,1	-	28,8	13,7	2,60	**
Dox.	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	3,5	> 25	> 25	-	1,6

Legenda: Linhagens tumorais humanas: 1 = U251 (glioma); 2 = MCF-7 (mama); 3 = NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência para múltiplos fármacos); 4 = 786-0 (rim), 5 = NCI-H460 (pulmão); 6 = PC-3 (próstata); 7 = OVCAR-3 (ovário); 8 = HT-29 (côlon); 9 = K-562 (leucemia); Linhagem não tumoral 10 = HaCaT (queratinócito); (*) Concentração > 250 µg/mL para inibição total do crescimento celular; (**) Concentração < 0,25 µg/mL para inibição total do crescimento celular; (-) ensaio não avaliado pela deficiência no crescimento da linhagem na placa controle (T_0).

As frações obtidas a partir do extrato bruto da linhagem CMAA 1653 apresentaram majoritariamente caráter citocida, mesmo em baixas concentrações. Dessa forma, a fração Fr-3, proveniente do extrato bruto da linhagem CMAA 1527 foi selecionada para os experimentos de caracterização química.

5.7.1. Análise das frações bioativas por CLAE-EM

Os cromatogramas TIC para as frações Fr-3, Fr-5 e Fr-6 apresentaram perfil químico de metabólitos bastante distintos (Figura 26a, b, c e d).

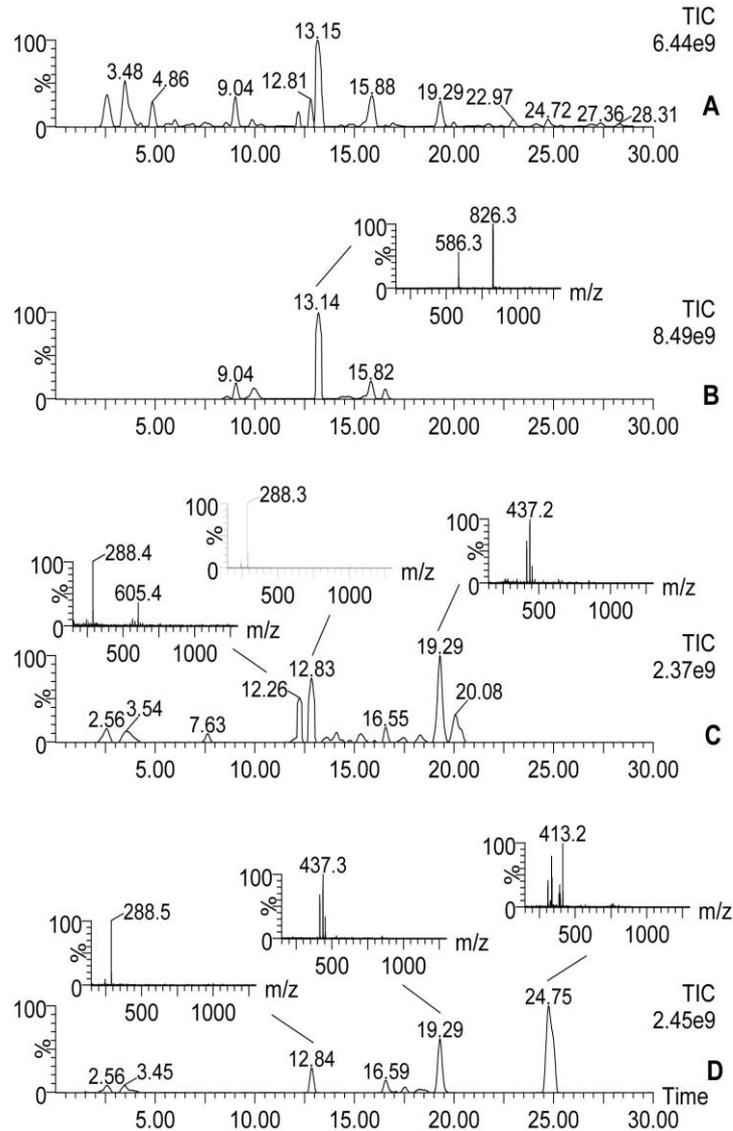


Figura 26: Cromatograma TIC das frações, selecionadas do extrato bruto da linhagem CMAA 1527. A) Extrato bruto, B) Fração Fr-3; C) Fração Fr-5 e D) Fração Fr-6

A análise das amostras em ensaio por CLAE-EM, revelou compostos em misturas às frações Fr-5 e Fr-6, conforme picos cromatográficos em $t_R = 12,26$ min, $12,83$ min e $19,29$ min (Figura 26c) e em $t_R = 12,84$ min, $19,29$ min e $24,75$ min (Figura 26d). Além do mais, estas frações apresentaram um rendimento baixo em massa (Tabela 3), o que inviabilizou o re-fracionamento. Assim, os estudos químicos posteriores foram direcionados para a fração Fr-3 (Figura 26b).

5.7.2. Caracterização química dos constituintes bioativos da fração Fr-3, por CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN

O espectro de massas do pico cromatográfico majoritário da fração Fr-3 apresenta o pico referente ao íon de m/z 586 (intensidade relativa de 32%) e o pico referente ao íon de m/z 826 (pico base no espectro de massas), conforme demonstrado na Figura 26b. Contudo, o espectro de massas em modo negativo mostrou apenas a presença do íon de m/z 824, como pico base no espectro de massas e não a presença do íon de m/z 584, equivalente a perda neutra de 240 u (Figura 27).

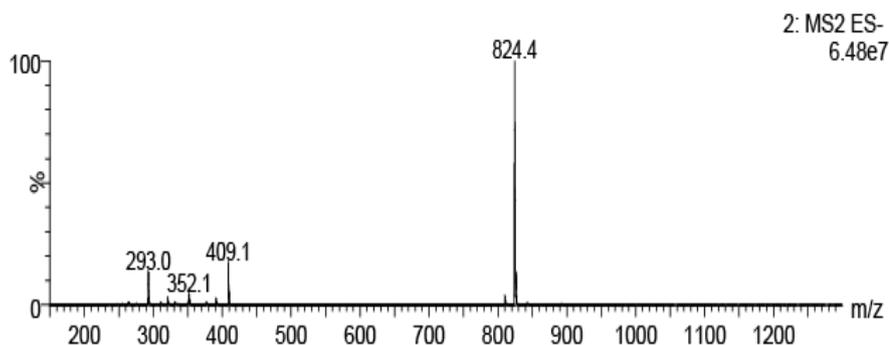


Figura 27: Espectro de massas da fração Fr-3, em modo negativo.

Adicionalmente, a fração Fr-3 foi submetida ao experimento de espectrometria de massas tandem (EM/EM), em modo positivo com energia de colisão 25 elétron volts (eV) e argônio como gás de colisão (Figura 28a e b).

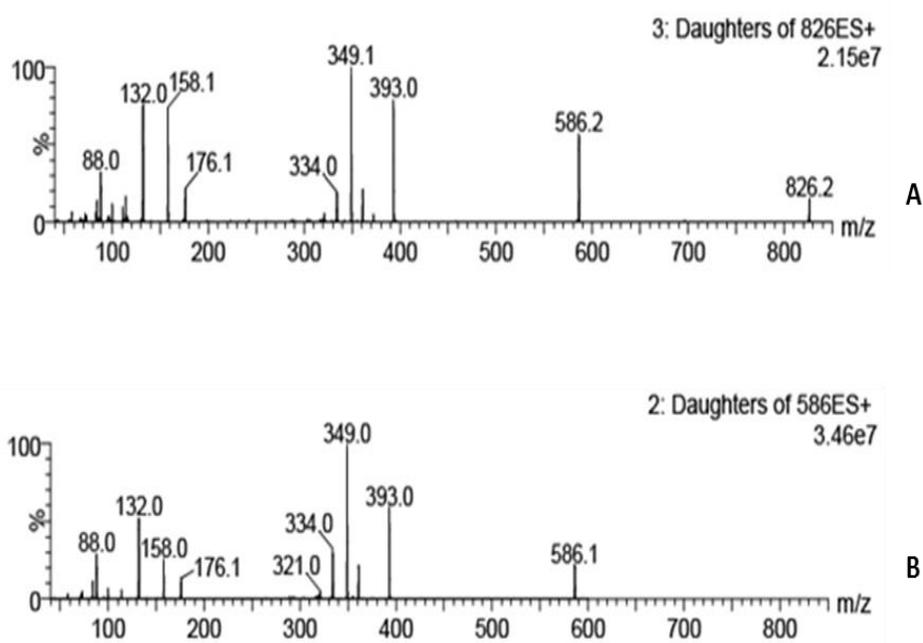


Figura 28: Espectros de massas tandem (EM/EM), da fração Fr-3. A) Íon precursor de m/z 826; B) Íon precursor de m/z 586

Os resultados indicam que o íon de m/z 586 representa um íon produto, gerado na fonte de ionização a partir do íon de m/z 826. Convém ressaltar, que esta análise foi realizada em uma espécie de experimento do tipo EM³. Com base nesse experimento, podemos concluir que o metabólito de m/z 826 possui uma perda neutra de 240 u, além de outras perdas como: 18 u (H₂O), 32 u (CH₃OH), 44 u (CO₂) e perda radicalar de 59 u (CH₃COO·).

A caracterização da estrutura química do metabólito presente na fração Fr-3 foi iniciada pela busca no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais, através da massa molecular 825 u e filtro para compostos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*. Como resultado, 12 metabólitos foram sugeridos, os quais foram analisados separadamente, de acordo com as informações de UV e interpretação qualitativa do espectro de EM/EM (Figura 28a) do íon precursor protonado de m/z 826.

A fração Fr-3 foi submetida a um novo processo de purificação, usando sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente. Como resultado foram coletadas 10 frações, as quais foram analisadas por CLAE-EM (via inserção direta) e reunidas conforme pureza (massa de 825 u), formando a subfração SubFr-1 com aproximadamente 16 mg.

O metabólito da SubFr-1 foi isolado na forma de pó amorfo, apresentando coloração vermelho intenso. Cerca de 10 mg da amostra foi selecionada e submetida à análise por RMN ¹H, COSY, gHSQC e gHMBC usando CDCl₃. O espectro de ¹H apresentou sinais na região de 1,09-12,99 ppm, conforme demonstrado na Figura 29.

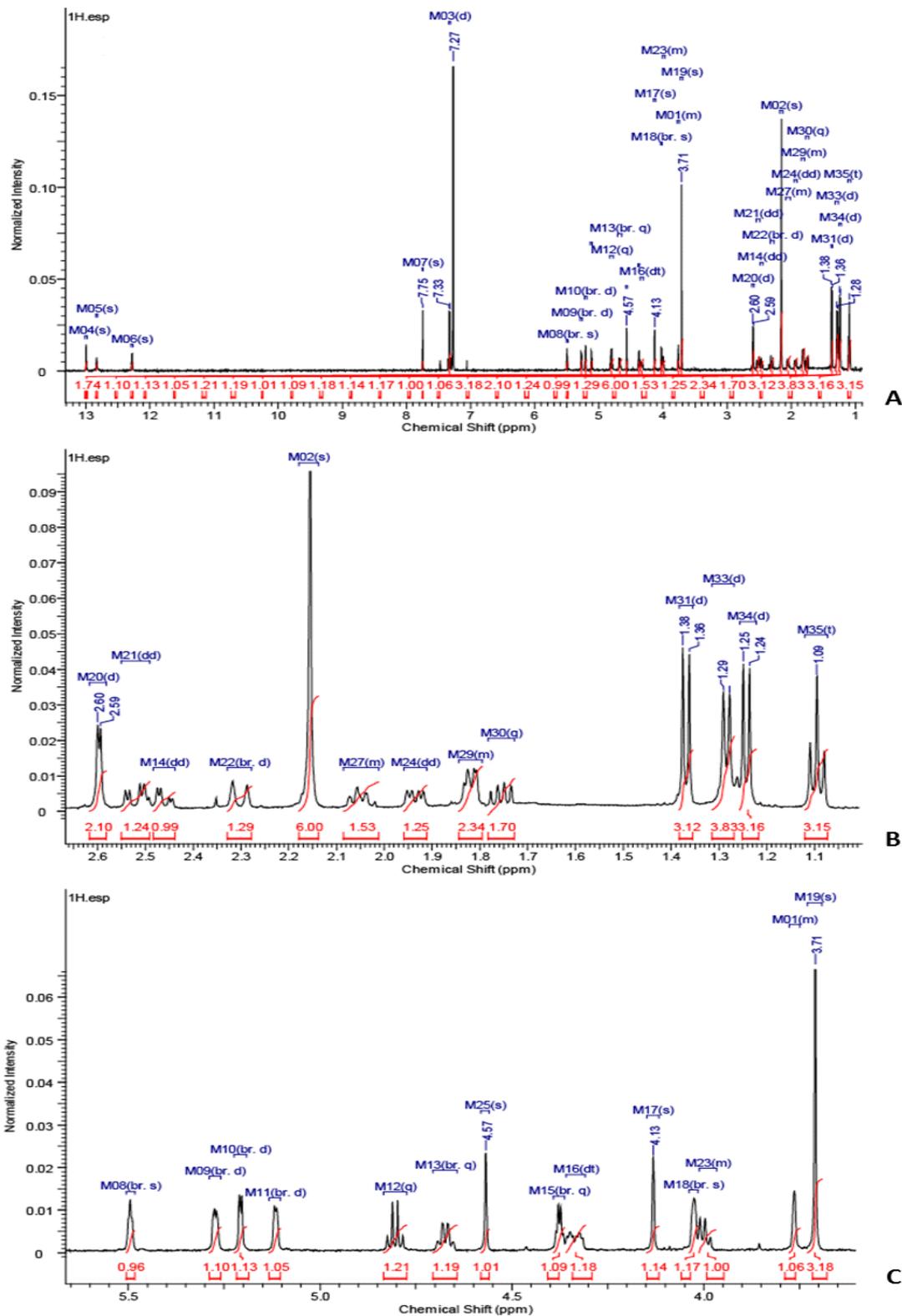
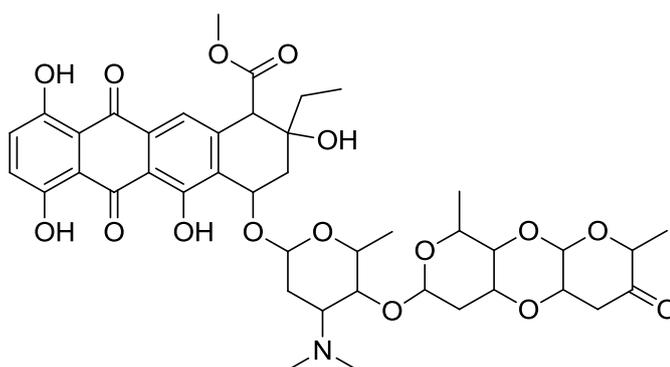


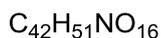
Figura 29: Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN). A) Análise ^1H da subfração SubFr-1 (500 MHz, CDCl_3); B); C) Expansões em duas regiões distintas: δ ppm 1.09 (t, $J=7.00$ Hz, 3 H), 1.24 (d, $J=6.49$ Hz, 3 H) 1.28 (d, $J=6.49$ Hz, 3 H) 1.37 (d, $J=6.75$ Hz, 6 H) 1.76 (q, $J=7.00$ Hz, 2 H) 1.80 - 1.84 (m, 2 H) 1.94 (dd, $J=12.20$, 4.00 Hz, 1 H) 2.01 - 2.08 (m, 1 H) 2.16 (s, 6 H) 2.30 (dl, $J=15.30$ Hz, 1 H) 2.46 (dd, $J=12.20$, 3.60 Hz, 1 H) 2.52 (dd, $J=15.30$, 4.00 Hz, 1 H) 2.60 (d, $J=2.9$ Hz, 2 H) 3.71 (s, 3 H) 3.75 - 3.78 (m, 1 H) 3.97 - 4.01 (m, 1 H) 4.03 (sl, 1 H) 4.13 (s, 1 H) 4.33 (dt, $J=12.20$, 3.60 Hz, 1 H) 4.38 (ql, $J=2.90$, 2.90, 2.90 Hz, 1 H) 4.57 (s, 1 H) 4.67 (ql, $J=1.00$, 1.00, 1.00 Hz, 1 H) 4.80 (q, $J=6.70$ Hz, 1 H) 5.12 (dl, $J=2.90$ Hz, 1 H) 5.21 (dl, $J=2.90$ Hz, 1 H) 5.27 (dl, $J=2.50$ Hz, 1 H) 5.49 (sl, 1 H) 7.33 (d, $J=4.41$ Hz, 2 H) 7.75 (s, 1 H) 12.28 (s, 1 H) 12.83 (s, 1 H) 12.99 (s, 1 H).

Pela análise foram identificados: 3 sinais de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios fenólicos em δ 12,99 (s, 1H), δ 12,83 (s, 1H) e δ 12,28 (s, 1H); 1 sinal referente a um hidrogênio metínico aromático em δ 7,75 (s, 1H); 1 dubleto referente a dois hidrogênios metínicos aromáticos em δ 7,33 (d, $J=4.41$ Hz, 2 H); 1 dubleto largo referente a um hidrogênio metínico carbinólico em δ 5,27 (dl, $J=2.50$ Hz, 1 H); 1 singlete referente a um hidrogênio metínico em δ 4,13 (s, 1H); 1 singlete referente a três hidrogênios de grupo metoxila em δ 3,71 (s, 3H); sinais de hidrogênios de um grupamento etila em δ 1.76 (q, $J=7.0$ Hz, 2H) e δ 1.09 (t, $J=7.0$ Hz, 3H); sinais de hidrogênios metílicos pertencentes a um grupo *N*-dimetil em δ 2,16 (s, 6H). Além disso, a presença de três hidrogênios anoméricos em δ 5.49 (sl, 1H), δ 5.12 (dl, $J=2.9$ Hz, 1H) e δ 5.21 (dl, $J=2.9$ Hz, 1H) indica a presença de uma porção trissacarídica na estrutura química do metabólito.

Para maiores informações sobre a estrutura química, técnicas bidimensionais de correlação ^1H - ^{13}C a curta (1J) (gHSQC, Anexo B) e a longa distância (2J e 3J) (gHMBC, Anexo B) e COSY (Anexo B) foram utilizadas. Com base nas correlações e multiplicidades dos sinais apresentados, bem como a comparação desses sinais com dados da literatura (Li et al., 2014; Nakata et al., 1992) foi possível sugerir a estrutura química do metabólito como cinerubina B, pertencente à classe das antraciclina (Figura 30).



cinerubina B



M.M. = 825.85 u

Figura 30: Estrutura química da antraciclina cinerubina B. Composto de caráter antiproliferativo, produzido pela linhagem CMAA 1527.

A Tabela 13 apresenta os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , bem como as correlações a partir dos espectros bidimensionais (Figura 31).

Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN (^1H e ^{13}C)

Posições	δC (ppm)*	δH (ppm)*	HMBC*	COSY*
1	157,9	---	---	---
1-OH	---	12,99 (s, 1H)	C-1, C12a	---
2	129,8	7,33 (d, $J=4.4$ Hz, 2H)	C-1, C-12a	H-3
3	129,8	7,33 (d, $J=4.4$ Hz, 2H)	C-4, C-4a	H-2
4	157,9	---	---	---
4-OH	---	12,28 (s, 1H)	C-4, C-4a, C-5	---
4a	112,4	---	---	---
5	190,6	---	---	---
5a	114,8	---	---	---
6	162,2	---	---	---
6-OH	---	12,83 (s, 1H)	C-5a, C-6	---
6a	131,3	---	---	---
7	70,4	5,27 (dl, $J=2.5$ Hz, 1H)	C-6, C-6a, C-1', C-9, C-10a	H-8
8a	33,7	2,52 (dd, $J=15.3$ Hz, 4.0 Hz, 1H)	C-6a, C-9, C-10	H-7, H-8b
8b	33,7	2,30 (dl, $J=15.3$ Hz, 1H)	C-6a, C-9, C-10	H-8a
9	71,7	---	---	---
10	56,9	4,13 (s, 1H)	C-6a, C-8, C-9, C-10a, C-11, C-13	---
10a	142,3	---	---	---
11	120,3	7,75 (s, 1H)	C-5, C-5a, C-6a, C-10, C-12	---
11a	130,4	---	---	---
12	185,9	---	---	---
12a	112,4	---	---	---
13	171,2	---	---	---
14	52,6	3,71 (s, 3H)	C-13	---
15	32	1,76 (q, $J=7.0$ Hz, 2H)	C-8, C-9, C-16	H-16
16	6,6	1,09 (t, $J=7.0$ Hz, 3H)	C-9, C-15	H-15
1'	101,3	5,49 (sl, 1H)	C-5'	H-2'
2'	29,2	1,82 (m, 2H)	C-1', C-3', C-4'	H-3'
3'	61,4	2,05 (m, 1H)	N-(CH ₃) ₂	H-2'
4'	74,1	3,76 (m, 1H)	C-2', C-3', C-1''	H-3'
5'	68	4,00 (m, 1H)	C-4', C-6'	H-6'
6'	17,7	1,28 (d, $J=6.5$ Hz, 3H)	C-2', C-4', C-5'	H-5'

Uma vez identificado à estrutura química do metabólito cinerubina B, tornou possível a caracterização da perda neutra de 240 u, para o íon precursor de m/z 826 (EM-EM; Figura 28) A perda corresponde ao rearranjo de hidrogênio remoto, com consequente perda do dissacarídeo aculosil-rodinose (Figura 32), para formação do íon produto de m/z 586.

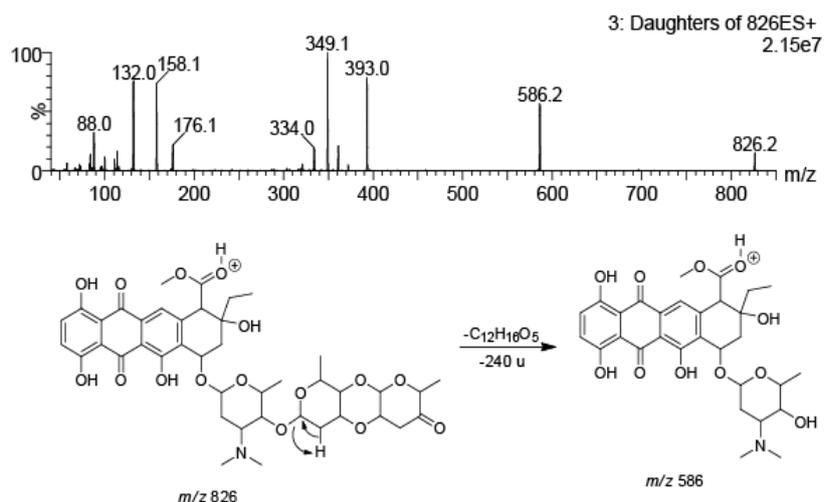


Figura 32: Proposta de fragmentação para formação do íon produto de m/z 586

Na literatura há relato de uma antraciclina isolada de *Streptomyces* cuja massa molecular é de 585 u, denominada de pirromicina (STEINHEIDER et al., 1988) (Figura 33), a qual apresenta atividade antitumoral. Acreditamos que este metabólito também esteja presente no extrato bruto CMAA 1527, conforme observado na Figura 24a (espectro de massas IV, em tempo de retenção $t_R = 9,01$ min). O espectro de EM/EM deste íon mostrou o mesmo padrão de fragmentação apresentado para o íon de m/z 586 formado na fonte de ionização a partir do íon de m/z 826 (Figura 28b).

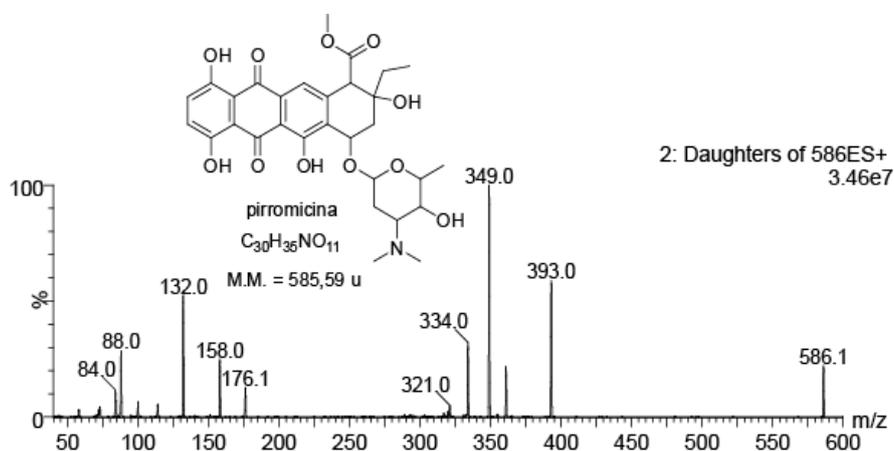


Figura 33: Espectro de massas e estrutura química da pirromicina

Na tentativa de identificar outras antraciclinas possuindo a porção aculosil-rodinose, o extrato bruto CMAA 1527 foi analisado por CLAE-EM/EM empregando a metodologia de perda neutra de 240 u, com energia de colisão de 20 eV (Figura 34).

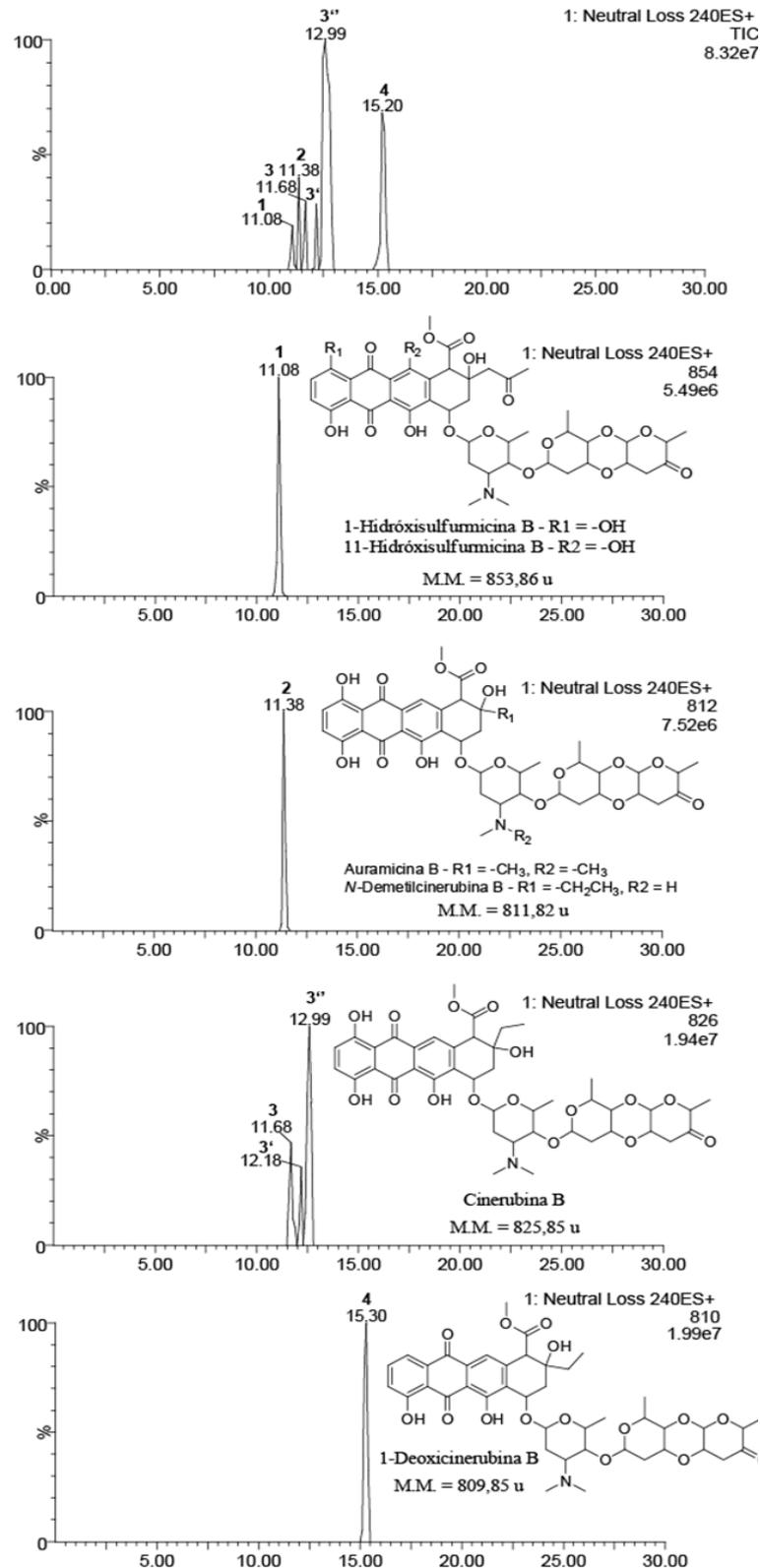


Figura 34: Cromatogramas extraídos a partir do experimento de perda neutra e os respectivos metabólitos sugeridos

A Figura 34 apresenta o perfil cromatográfico e as estruturas químicas dos metabólitos sugeridos, de acordo com a massa molecular de cada antraciclina. Todos os compostos possuem o grupo dissacarídico aculosil-rodinose, responsável pela perda neutra de 240 u. A metodologia empregada demonstra a capacidade analítica da técnica, a qual possibilitou resolução cromatográfica e separação dos metabólitos presentes no extrato bruto da linhagem CMAA 1527. Convém ressaltar que esses metabólitos possuem estruturas isoméricas, assim, para real confirmação das estruturas, faz-se necessário a caracterização espectroscópica por RMN, para cada um dos metabólitos propostos.

5.8. Perfil metabolômico das linhagem do gênero *Streptomyces*

As análises quimiométricas revelaram a formação de 3 agrupamentos metabolômicos (Figura 35). Preliminarmente, pode-se também observar a eficiência do método para identificação e seleção dos íons entre cada amostra, uma vez que todas as triplicatas foram agrupadas ordenadamente. O perfil metabolômico dos extratos brutos apresentou distribuição em três conjuntos majoritários (clados a, b e c)

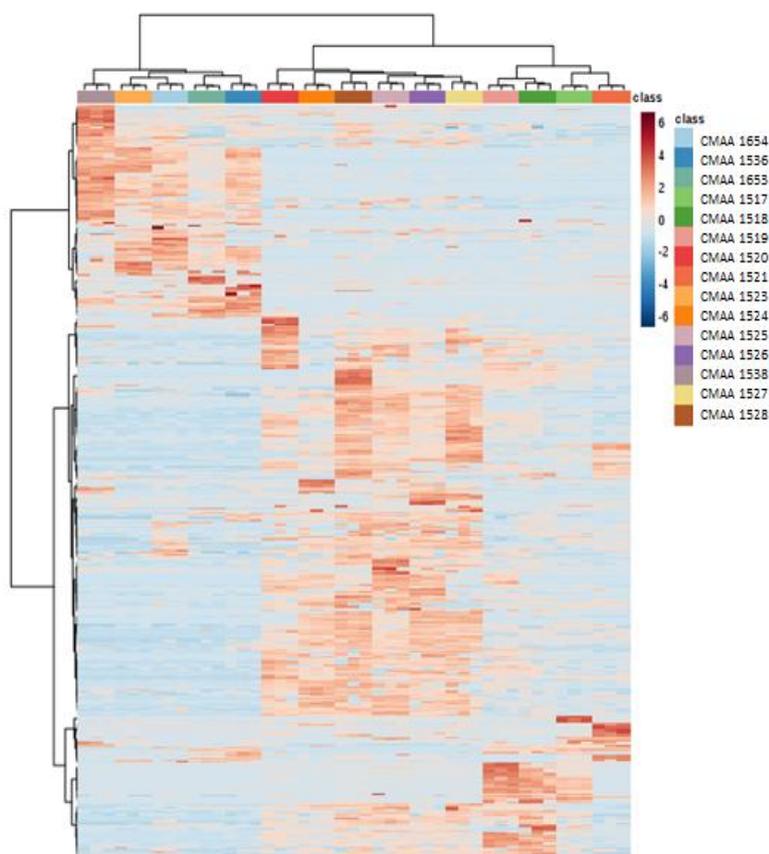


Figura 35: Agrupamento hierárquico dos extratos brutos das linhagens *Streptomyces* sp. (heatmap; distance measure – Euclidean; clusterin algorithm – Ward)

A análise de agrupamento por componentes principais (PCA) (Figura 36) apresentou a mesma distribuição observada no agrupamento hierárquico pelo mapa de aquecimento (*heatmap*). Os três conjuntos formados são constituídos pelos extratos brutos das linhagens: a) CMAA 1523, CMAA 1536, CMAA 1538, CMAA 1653 e CMAA 1654; b) CMAA 1520, CMAA 1524, CMAA 1525, CMAA 1526, CMAA 1527, CMAA 1528 e c) CMAA 1517, CMAA 1518, CMAA 1519 e CMAA 1521.

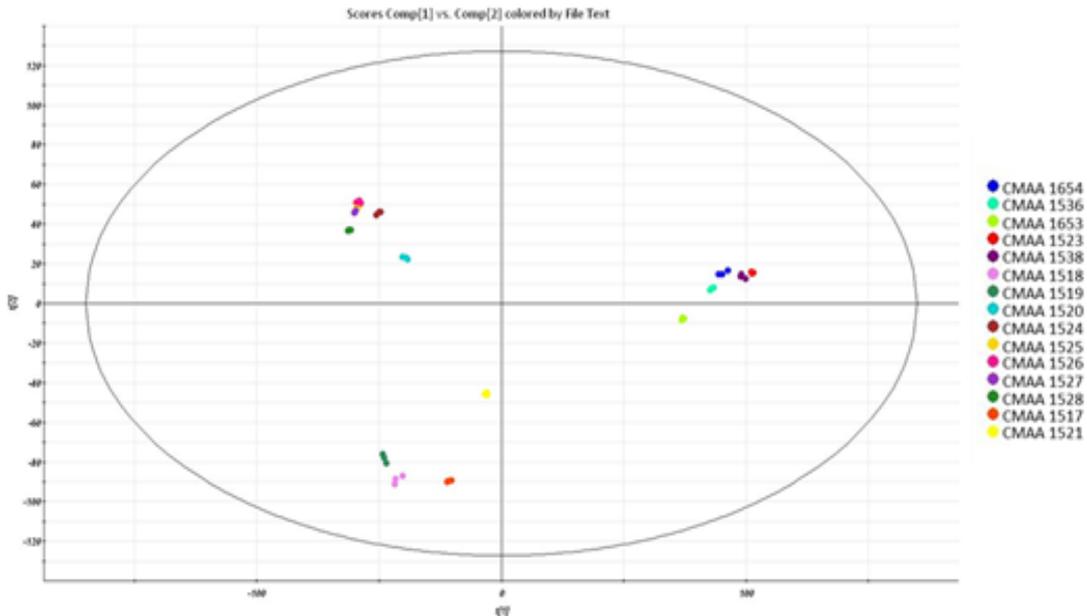


Figura 36: Agrupamento por componentes principais dos extratos brutos das linhagens *Streptmyces* sp.

Nenhum dos grupos formados foi constituído exclusivamente por extratos com atividades antitumorais ou ausência de atividade. No entanto, as análises possibilitaram a identificação dos 50 íons mais abundantes às distinções dos grupos (Tabela 14), os quais poderão ser explorados posteriormente para atribuição de funcionalidade para as linhagens isoladas.

Tabela 14: Íons mais importantes para diferenciação das amostras (VIP n=50)

	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min.)
clado a	245	4,05
	168	9,06
	749	24,70
	772	24,72
	816	24,40
	898	23,80
	793	24,40
	261	3,36

continua

continuação

	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> (min.)
clado a	213	4,74
	227	6,02
	247	5,31
	261	6,58
	255	4,00
	211	3,55
	164	2,50
	167	3,35
	197	3,58
	164	3,91
	284	4,97
	181	3,62
clado b	167	3,59
	164	4,18
	211	4,10
	245	2,78
	227	6,56
	166	5,08
	261	7,19
	269	17,50
	247	5,76
	405	22,23
	305	22,23
	308	21,22
	405	22,23
	351	21,22
	276	3,60
	291	22,23
	243	5,75
	301	24,59
	259	2,55
	317	2,58
clado c	267	3,99
	265	3,86
	284	5,34
	301	2,57
	259	4,38
	195	4,02
	213	5,15
	181	3,85
	158	3,57

6. DISCUSSÃO

6.1. Características do local e coleta das amostras

Frente as características climáticas do Continente Antártico, a Península Antártica representa um oásis para a vida. A região apresenta elevada disponibilidade de água e acúmulo de matéria orgânica no solo, as quais implicam diferenças biológicas significativas à região, em relação a maior parte do Continente (BALKS et al., 2013; CHOWN; CONVEY, 2007).

Durante os meses de verão, áreas de solos sem cobertura de gelo podem representar 0,35% do Continente Antártico e apresentar intensa atividade biológica (HOPKINS et al., 2006). No artigo “*Conservation biogeography of the Antarctic*”, Terauds e colaboradores (2012) avaliaram por meio de metadados, a biodiversidade dos solos expostos durante o período de verão. Como resultado, o grupo propôs a distinção biogeográfica dos solos Antárticos livres de gelo em 5 grandes regiões (Figura 37). Segundo os autores, a biogeografia da Península Antártica ainda poderia ser subdividida em 5 pontos distintos: Ilhas Órcades do Sul, Península Antártica do Nordeste, Península Antártica do Noroeste (região onde as foram coletadas as amostras deste trabalho), Península Antártica Central Sul e Península Antártica Meridional.



Imagem adaptada de Terauds et al., 2012.

Figura 37: Regiões com solos livres de gelo durante o verão Antártico

A formação de campos de musgos sobre o solo exposto é uma característica marcante para todos os pontos biogeográficos da Península Antártica. A turfa decorrente da decomposição desta formação biológica enriquece o solo com elevadas taxas de matéria orgânica e favorece processos biogeoquímicos (BALKS et al., 2013; SIMAS et al., 2008). Neste contexto, os solos da Península Antártica são mais ativos, em relação a outras regiões do Continente Antártico, porém ainda apresentam reduzida taxa de ciclagem de nutrientes em comparação com as taxas médias globais (BOTTOS et al., 2014).

As expedições científicas ao Continente Antártico são atualmente suportadas pelo Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), o qual estabelece o processo logístico das atividades em 4 fases de 30 dias. Em cada uma das fases, ocorre a substituição dos grupos de pesquisas, a fim de possibilitar uma maior abrangência das atividades científicas na região. A primeira fase (Outubro/Novembro) contempla o estágio final das condições extremas da região e é constituída majoritariamente por grupos de pesquisas voltadas ao avistamento e contagem de aves migratórias, estudos de populações, além de grupos interessados no sensoriamento remoto de fendas oceânicas e estudos de sedimentos e macro-organismos marinhos. Durante os meses Novembro e Dezembro (segunda fase da expedição) inicia-se o descongelamento de regiões periféricas e o surgimento de porções de solo livres de gelo. Esta época é também caracterizada pelo brotamento das espécies vegetais *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis*, e aumento da atividade biológica da região. A fase 3 (Janeiro/Fevereiro) já apresenta maior estabilidade climática, e consolidação do verão antártico, em que grandes áreas expostas são cobertas por mantos de musgos, líquens e plantas. A fase final das atividades científicas são realizadas durante os meses Março e Abril (fase 4), o qual contempla o final do período de verão. Neste estágio ocorre a redução da predominante luminosidade, inversão das condições climáticas, congelamento e cobertura dos solos expostos, e formação da calota de gelo marinho ao redor do Continente.

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas durante a fase 2 da Expedição Antártica XXXIII (Dezembro, 2014) e, com isso poucas áreas com solos livres de gelo foram encontradas. Essa condição acabou por limitar o número de amostragens, uma vez que o brotamento dos espécimes de *Deschampsia antarctica* esteve limitado a poucos sítios isolados. Para trabalhos futuros que demandem a coleta de amostras vegetais antárticas, a escolha por um período mais tardio (fases 3 ou 4) ou ao longo de todo o verão Antártico poderá constituir uma melhor estratégia para obtenção de um volume maior e mais diversificado de amostras.

6.2. Análise da comunidade bacteriana associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, por método independente de cultivo

6.2.1. Diversidade taxonômica das unidades taxonômicas operacionais (UTOs)

A utilização de técnicas moleculares independentes de cultivo tem possibilitado o melhor entendimento sobre a composição das comunidades microbianas e contribuído significativamente à descoberta de novos genes com aplicação biotecnológica no Continente Antártico (PUDASAINI, et al., 2017; JI et al., 2015; van DORST et al., 2014; COWAN et al., 2014; JANSSON; TAS, 2014). Entretanto, mesmo trabalhos recém-publicados ainda apresentam uma alta proporção de filotipos bacterianos desconhecidos ou não classificados em solo Antárticos (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2018; MOLINA-MONTENEGRO et al., 2018; TRIPATHI et al., 2018), o que reforça a necessidade de trabalhos contínuos neste ambiente.

A estrutura das comunidades bacterianas na Antártica é altamente heterogênea nos diferentes habitats estudados, contudo os filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Gemmatimonadetes e Proteobacteria estão frequentemente reportados às diferentes formações de solo do Continente, apresentando variações de abundância, em decorrência da geografia, temperatura, parâmetros físicos e químicos do solo e influência biológica local (SMYKLA et al., 2018; BOTTOS et al., 2014).

Teixeira e colaboradores (2010) avaliaram a diversidade das comunidades bacterianas em solos Antárticos e demonstraram não haver diferenças significativas entre comunidades sob a cobertura vegetal de *Deschampsia antarctica* ou *Colobanthus quitensis*. Tal constatação contradiz as evidências de que diferentes espécies vegetais selecionam comunidades microbianas específicas à rizosfera (BURNS et al., 2015; MENDES et al., 2014; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013; BERG; SMALLA, 2009; HARDOIM et al., 2008) e foi justificada pela influência ambiental extrema da região, a qual foi considerada o fator responsável pela composição da comunidade bacteriana, uma vez que a cobertura vegetal dispõe maior umidade, proteção térmica e compostos orgânicos, conforme também observado posteriormente por Niederberger et al (2015).

Dentre os sítios amostrados, os pontos Torre Meteoro Lado Direito (TMD) e Torre Meteoro Lado Esquerdo (TME) apresentavam solo livre de gelo e cobertura por *Deschampsia antarctica*, enquanto o ponto Morro da Cruz (MDC) apresentava cobertura vegetal das espécies vegetais *Deschampsia antarctica* e *Colobanthus quitensis* e solo parcialmente coberto por neve. A estrutura das comunidades bacterianas não apresentou diferenças significativas entre os filos dominantes, exceto ao ponto TME, onde foi observado

pronunciado enriquecimento para o filo Actinobacteria e redução para Proteobacteria e Acidobacteria. A variação pode estar relacionada ao efeito antrópico no ponto TME, uma vez que o ponto está localizado próximo a instrumentação meteorológica da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e recebe constantemente pesquisadores para coleta de dados e manutenção. Infelizmente, o volume de amostra coletado não foi suficiente para determinar os atributos físicos e químicos ou possíveis contaminantes dos sítios de coleta, o que também poderia auxiliar o entendimento da diferenciação da comunidade bacteriana no ponto TME.

A predominância de sequências para o filo Actinobacteria entre todos os pontos de coleta é justificada pela capacidade do grupo produzir estruturas de resistência, bem como o período de amostragem (TEIXEIRA et al., 2010). Os filios Proteobacteria, Acidobacteria e Chloroflexi reportados como abundantes em solos Antárticos (ZHU et al., 2015; ROESCH et al., 2012) também apresentaram grande representatividade em todos os sítios amostrados. Contudo os filios Firmicutes e Bacteroidetes comumente presentes à região rizosférica de *Deschampsia antarctica* (MOLINA-MONTENEGRO et al., 2018; ROESCH et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2010; não apresentaram pronunciada representatividade.

Ao explorar o filo Actinobacteria em maior profundidade, sequências relacionadas à ordem Actinomycetales se apresentaram como mais abundantes. Santamans e colaboradores (2017) demonstraram que a comunidade bacteriana em solos antárticos sob forte influência de pinguins apresentam predominância dos filios Firmicutes (Clostridiaceae e Bacillaceae) e Bacteroidetes, enquanto solos não ornitogênicos apresentam maior representatividade para os filios Actinobacteria (Actinomycetales) e Proteobacteria (Rhodobacteraceae). Tais observações cooperam com os dados de diversidade bacteriana levantados neste trabalho, uma vez que os sítios de coleta não representaram áreas fortemente influenciadas por colônias de pinguins.

O trabalho “*Comparison of two bioinformatic tools used to characterize the microbial diversity and predictive functional attributes of microbial mats from Lake Obersee, Antarctica*” (KOO et al., 2017), realizou a comparação entre inferências taxonômicas e funcionais pelos bancos de dados *Silva* (123) e *Greengenes* (13.5) e apresentou uma série de divergências entre filios identificados e a abundância relativa entre eles, além da identificação de 80 táxons exclusivamente ao banco de dados *Silva* e 32 exclusivamente para *Greengenes*. Tendo em vista o número restrito de sítios amostrados, bem como as limitações intrínsecas ao método sequenciamento (ROSS et al., 2013) e análise dos dados (KOO et al., 2017), os resultados atribuídos à diversidade da comunidade bacteriana associada a rizosfera de *Deschampsia antarctica* devem ser observados com cautela. Novas avaliações deverão ser

realizadas, partindo de um maior número de amostragem, utilizando outras plataformas de sequenciamento (ex.: Illumina e PacBio) e bancos de dados para análise.

6.2.2. Predição metagenômica para a comunidade bacteriana total e para o filo Actinobacteria

Apesar de a ferramenta PICRUSt contribuir significativamente para inferências funcionais, os resultados podem apresentar algumas divergências quando confrontados com dados de sequenciamento metagenômico. A principal razão está relacionada ao fato de que para todo sequenciamento, OTUs apresentarão correlações com genomas não disponíveis, além da possibilidade de linhagens de uma mesma apresentarem conteúdo genético diferenciado (LOPES et al., 2016). KOO et al (2017) apresentam maiores informações a respeito das limitações (*bias*) intrínsecos aos processos de amplificação e divergências entre as análises de dados realizadas pelos softwares de predição funcional PICRUSt e Tax4Fun.

Dentre as predições mais abundantes, transportadores de membrana se destacaram tanto para a análise de bactérias totais, como para o filo Actinobacteria, havendo predominância de transportadores do tipo ABC. O sistema é responsável por controlar diversos processos fisiológicos e determina o fluxo de componentes orgânicos e inorgânicos, através da membrana celular (DAVIDSON et al., 2008). Transportadores ABC acentuados estão relacionados como estratégia do metabolismo microbiano em ambientes oligotróficos, pois confere capacidade para mobilização de compostos variados, desde aminoácidos e nucleotídeos, até aglomerados metálicos e moléculas lipídicas (Wilkins et al., 2012).

A abundância de vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos indica a alta incidência de grupos bacterianos heterotróficos na região rizosférica (SCALLY et al., 2016), conforme esperado. Exudados radiculares e a fragmentação de tecidos vegetais em atrito ao solo são fontes nutricionais valiosas em ambiente em processo de ativação biológica.

Para o filo Actinobacteria, o enriquecimento de vias de replicação e reparo de DNA pode indicar uma adaptação evolutiva, uma vez que tal característica está descrita como resposta de grupos bacterianos às elevadas taxas de radiação em glaciares e permafrost da Sibéria e Antártica (STEVEN et al., 2006; RIVKINA et al., 2004; PONDER et al., 2005). Além do mais, a observação de um maior número de sequências para famílias enzimáticas e metabolismo secundário sugerem que este ambiente seja promissor para prospecção prospectar enzimas adaptadas a baixas temperaturas e compostos bioativos.

6.3. Seleção de DNA ambiental, clonagem de insertos gênicos e triagem da biblioteca metagenômica

6.3.1. Avaliação da integridade do DNA isolado e reação de clonagem

Bibliotecas metagenômicas em vetor fosmídeo são construídas com fragmentos de *e*DNA contendo aproximadamente 35-40 quilobases. O material genético pode ser recuperado pela excisão do gel de agarose ou incorporado diretamente do produto de extração, conforme inferência quantitativa dos insertos de interesse (DONAHUE; EBLING, 2007). A análise do *e*DNA por eletroforese de campo pulsado indicou predominância de fragmentos com tamanho desejado, permitindo que a reação de reparo das extremidades fosse iniciada diretamente com o produto de extração. A eficiência do processo de extração em recuperar fragmentos de *e*DNA com alto peso molecular trouxe vantagem ao processo de clonagem, uma vez que a reação requer grande quantidade de material genético e a recuperação por excisão do gel de agarose ocasiona perdas consideráveis de material durante o processo.

6.3.2. Triagem da biblioteca metagenômica de clones

A triagem dos clones pode ser realizada por abordagem funcional e/ou genotípica. A triagem funcional constitui uma abordagem menos dispendiosa, sendo comumente exercida por diversos segmentos de pesquisa. A estratégia favorece a descoberta de novos genes e substâncias bioativas, em relação a triagem genotípica. Como principais restrições à estratégia de busca funcional pode-se destacar a limitação do hospedeiro às condições de cultivo, a ineficiência do vetor em expressar os insertos abrigados e a sensibilidade do hospedeiro para a substância sintetizada. O vetor CopyControl pCC2FOS não constitui um vetor propriamente de expressão, porém apresenta potencial para “ativação” da região *oriV/trfA* e consequentemente o aumento do número de cópias de fosmídeos por célula (50:1). O sistema de múltiplas cópias foi desenvolvido por Wild, Hradecna e Szybalsky (2002), justamente para aumentar as chances de expressão em triagem funcional de bibliotecas de clones. O uso de sondas específicas possibilita a triagem indireta dos insertos metagenômicos, por meio da amplificação ou sinalização de marcadores genéticos (GINOLHAC et al., 2004; KNIETSCH et al., 2003; PRECIGOU; GOULAS; DURAN, 2001) . Apesar de constituir uma abordagem mais onerosa, o reconhecimento prévio dos recursos genéticos recuperados possibilita o direcionamento às buscas de potenciais propriedades e reduz o volume de material em trabalhos futuros. Como principal limitante, o uso de sondas restringe as buscas para genes e propriedades já conhecidas (DANIEL. 2005).

Os resultados obtidos pelas inferências de diversidade (abundância do filo Actinobacterias) e predição metagenômica PICRUSt (enriquecimento de famílias enzimáticas) podem ser utilizados como direcionamento à exploração da biblioteca de clones, construída a partir do microbioma rizosférico de *Deschampsia antarctica*. Bibliotecas de fosmídeos são ideais para prospecção de novas enzimas, pois o tamanho dos insertos clonados possibilitam que vias enzimáticas completas estejam inseridas (SUENAGA; OHNUKI; MIYAZAKI, 2007). Neste sentido, o trabalho “*Construction and screening of a functional metagenomic library to identify novel enzymes produced by Antarctic bacteria*” (FERRÉS et al., 2015) apresenta a obtenção de esterases (lipases), celulases e fenoloxidasas (manganês peroxidase), a partir da biblioteca de fosmídeos (52.000 clones) construídas com água de degelo da Península Antártica. O potencial dos ecossistemas Antárticos à exploração enzimática está bem representado no material suplementar da revisão “*Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production*” (TIWARI et al., 2017).

6.3.3. Triagem funcional para L-asparaginases

Asparaginases são enzimas hidrolíticas fundamentais ao tratamento da Leucemia Linfóide Aguda. A enzima atua na conversão do aminoácido asparagina, em ácido aspártico e amônia (KUMAR et al., 2013; FU; SAKAMOTO, 2007). Células sadias podem sintetizar o aminoácido asparagina pela via asparagina sintetase, contudo, células tumorais não apresentam potencial para síntese e dependem da disponibilidade deste aminoácido na corrente sanguínea para proliferação (KAWEDIA; RYTTING, 2014).

O tratamento com a L-asparaginase pode variar entre 2 a 5 anos, com taxa de cura em até 90% dos casos. Os principais fármacos relacionados ao tratamento são: Elspar (Lundbeck - Deerfield, IL, Estados Unidos), Oncaspar (SigmaTau Pharmaceuticals - Gaithersburg, MD, Estados Unidos), Erwinaze (Jazz Pharmaceuticals - Palo Alto, CA, Estados Unidos) e Aginasa (Medac - Wedel, Alemanha) (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Entretanto, em 2017, por conta do vencimento no registro do fármaco Elspar, junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Saúde aplicou aproximadamente 8 milhões de reais à compra do novo lote de L-asparaginase (Leuginase – Beijing SL Pharmaceutical) ao tratamento da leucemia linfóide aguda. O fármaco apresentou custo reduzido, se comparado a outros medicamentos da categoria (Tabela 15), porém

desencadeou efeitos adversos aos pacientes em tratamento e não demonstrou efetividade para a regressão da doença.

Tabela 15: Empresas fornecedoras de L-asparaginases e custos dos fármacos

Fabricante	Fármaco	Substancia ativa	Valor da unidade (US\$)
Beijing	Leuginase	L-asparaginase	38,00
Medac	Aginasa	INN-asparaginase	582,17
Sigma-Tau	Oncaspar	PEG-asparaginase	1.619,10

A qualidade do Leuginase foi avaliada pelo grupo de pesquisa do Centro Infantil Boldrini e apresentada recentemente no artigo “*Low bioavailability and high immunogenicity of a new brand of E. coli L-asparaginase with active host contaminating proteins*” (ZENATTI et al., 2018). Os resultados demonstram a baixa efetividade do componente ativo do fármaco (Figura 37), a elevada concentração de proteínas contaminantes (19-37%) e os riscos inerentes à utilização do fármaco. Frente aos resultados, o fármaco foi proibido em todo o território nacional e os tratamentos em andamento tiveram de ser interrompidos.

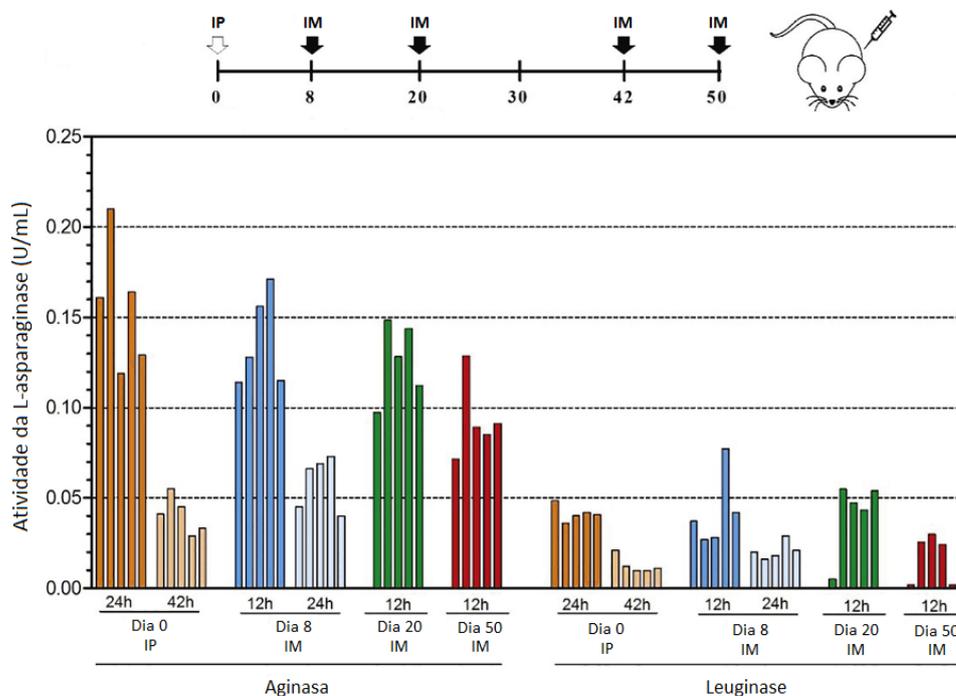


Figura 37: Avaliação da disponibilidade de L-asparaginase em plasma de murinos, tratados com os fármacos Aginasa e Leuginase. IP) injeção intraperitoneal; IM) injeção intramuscular.

O infortúnio tornou evidente a necessidade em prospectar novas fontes de asparaginases, bem como o potencial desse mercado para as indústrias nacionais. Apesar de a asparaginase ser comercializada há mais de 50 anos, ainda existe grande demanda de mercado para novas isoformas ou estruturas de encapsulamento que tragam maior estabilidade e menor efeito alergênico. Nesse sentido, a exploração da biblioteca metagenômica de clones em busca de L-asparaginases pode contribuir significativamente, uma vez que *Escherichia coli* está descrita como um hospedeiro compatível para expressão deste tipo de enzima e os insertos clonados apresentam tamanho suficiente para alocar a via biosintética completa para o complexo enzimático de asparaginases (700-800 pb).

6.4. Acesso a comunidade de actinobactérias associada à rizosfera de *Deschampsia antarctica*, por método dependente de cultivo

O filo Actinobacteria é constituído por mais de 300 gêneros bacterianos e representa o maior grupo entre o domínio Bacteria. É reconhecido pela versatilidade em produzir metabolitos secundários bioativos (BERDY, 2005; STROBEL; DAISY, 2003) e dispõe importante contribuição ao desenvolvimento de antibióticos (KUMAR; JADEJA, 2016; LAVIN et al., 2016), antifúngicos (SILVA et al., 2014; COOMBS; MICHELSEN; FRANCO, 2004), complexos enzimáticos (SHIVAJI; REDDY; CHATTOPADHYAY, 2017) e agentes antitumorais (AHMAD et al., 2015; IGARASHI et al., 2006).

No intuito de isolar novas linhagens bacterianas, estratégias são aplicadas para favorecer a recuperação *in vitro* de grupos raros ou enriquecer a abundância de grupos de interesse. O pré-tratamento de suspensões celulares com fenol promove a redução da incidência de bactérias e fungos, e favorece o crescimento de actinobactérias fastidiosas (PISANO et al., 1986). Suplementar o meio de cultivo com ácido nalidíxico reduz o crescimento de bactérias não filamentosas e favorece a seleção de linhagens produtoras de compostos bioativos (CHU; KHOO; CHEAH, 2017; DEMAINE, 2013; GOODFELLOW; FIEDLER, 2010; BALTZ, 2007). A utilização dos usuais meios de cultivo, em baixas concentrações possibilita o isolamento de grupos estritamente oligotróficos e reduz a competição por espaço, decorrente ao crescimento de grupos bacterianos de crescimento rápido (PULSCHEN et al., 2017; WANG et al., 2014).

Outro importante viés da prospecção está em acessar recursos biológicos de ambientes pouco explorados e sob condições extremas (GOODFELLOW et al., 2018; CHU et al., 2017), como por exemplo o Continente Antártico. O artigo “*Isolation of uncultured*

bacteria from Antarctica using long incubation periods and low nutrition media” (PULSCHEN et al., 2017) demonstra claramente o potencial da região à descoberta de novos grupos bacterianos (família, gênero e espécie).

A estratégia aplicada para acessar a comunidade de actinobactérias associadas à rizosfera de *Deschampsia antarctica* mostrou-se eficiente, resultando em 72 isolados, distribuídos entre 9 gêneros. O gênero *Streptomyces* apresentou maior abundância (~55%), seguido pelos gêneros *Rhodococcus* (10%), *Nocardia* e *Streptacidiphilus* (~6% cada). Os gêneros *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Kribella*, *Mycobacterium*, *Pilimelia*, *Pseudoarthrobacter* e *Tsukamurella* apresentaram uma única linhagem representante, correspondendo a aproximadamente 3% da abundância relativa dos isolados recuperados. Com intuito de avaliar o posicionamento taxonômico de linhagens com potencial biotecnológico, a reconstrução filogenética das sequências 16S rRNA com baixo índice de similaridade foi realizada, utilizando sequências de referência de linhagens tipo mais próximas.

6.4.1. Inferência filogenética para linhagens com potencial biotecnológico e baixo índice de similaridade para o gene 16S rRNA

6.4.2. *Streptomyces* spp.

Conforme previamente descrito, o gênero *Streptomyces* corresponde ao grupo mais explorado à produção de metabólitos bioativos. Dentre os isolados recuperados, as sequências 16S rRNA das linhagens CMAA 1528 (1.293 pb) e CMAA 1703 (1.473 pb) apresentaram índices de similaridade abaixo de 99%, em relação as linhagens tipo mais próximas.

A linhagem CMAA 1528 apresentou similaridade de 98,25% para a linhagem tipo *Streptomyces alni*, equivalente a 28 diferenças nucleotídicas (dif/nt). *Streptomyces alni* NRRL B-24611^T foi descrita em 2009, através dos esforços de prospecção entre o grupo de pesquisa da Universidade de Beijing e o laboratório farmacêutico Zhejiang Hisun. A linhagem endofítica foi recuperada a partir da porção radicular da espécie *Alnus nepalensis* D. Don (Betulaceae) e apresenta potencial bioativo contra o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* e a proliferação da linhagem de melanoma B16 (LIU et al., 2009). Espécies do gênero *Alnus* estão amplamente reportadas como agentes ativos da medicina oriental, sendo empregadas ao tratamento de disenteria aguda, dores abdominais e mais recentemente explorados como reserva de compostos com propriedades antitumorais (KIM et al., 2018; DONG et al., 2017; REN et al., 2017; SATI; SATI; SATI, 2011).

A linhagem CMAA 1703 apresentou maior correlação genética para a linhagem *Streptomyces ossamyceticus* (98,90%; 16 dif/nt). A espécie *Streptomyces ossamyceticus* DSM 40824^T foi proposta por Rong e Huang (2012), para reestruturação filogenética da subespécie *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *ossamyceticus* JCM 4965^T. Linhagens estabelecidas no clado filogenético da espécie *Streptomyces hygrosopicus* apresentam produção de mais de 650 compostos bioativos, promissores ao desenvolvimento de novos antibióticos e pesticidas, devido a baixa toxicidade residual (RAMBABU; SUBA; VIJAYAKUMAR, 2015; RONG; HUANG, 2012; GOODFELLOW et al., 2007; LAM et al., 1990).

A reconstrução filogenética das linhagens CMAA 1528 e CMAA 1703, em relação às linhagens tipo de *Streptomyces* mais próximas (Figura 38a e b), revelou a formação de linhas filéticas distintas, as quais indicam que os isolados recuperados da rizosfera de *Deschampsia antarctica* possam corresponder a novas taxa dentro ao gênero *Streptomyces*. Contudo, para que a hipótese seja confirmada, a análise de hibridização DNA-DNA precisa ser realizada e determinada como abaixo de 70% de similaridade (WAYNE et al., 1987), visto que o índice de similaridade para o gene 16S rRNA entre a linhagem recuperada e a linhagem tipo mais próxima é superior a 97% (MEIER-KOLTHOFF et al., 2013).

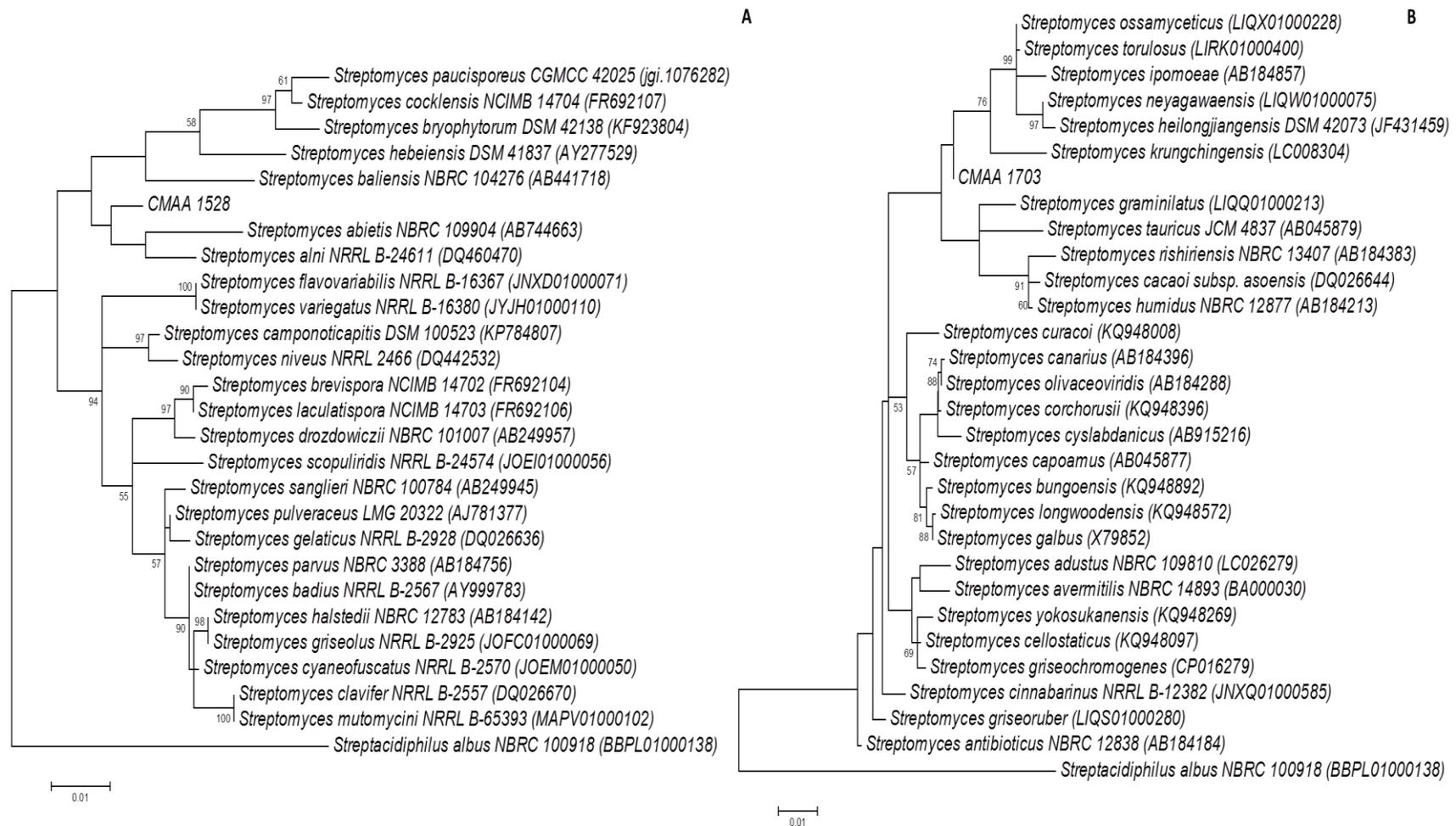


Figura 38: Reconstrução filogenética por *maximum-likelihood* e modelo evolutivo Tamura-Nei, sob distribuição gamma com sítios invariados G+I, com base nas sequências 16S rRNA das linhagens CMAA 1528, CMAA 1703 e linhagens tipo *Streptomyces* spp. mais próximas. Os valores apresentados nos ramos filogenéticos indicam a estabilidade da inferência em 1.000 repetições (apenas valores superiores a 50% foram apresentados)

6.4.3. *Rhodococcus* spp.

Devido a alta incidência no re-isolamento de compostos, diferentes gêneros de actinobactérias passaram a ser explorados. Neste contexto, *Rhodococcus* apresentou ser um grupo promissor na produção de metabólitos bioativos (KITAGAWA; TAMURA, 2008a; KITAGAWA; TAMURA, 2008b; IWATSUKI et al., 2006). O gênero foi descrito por Zopf (1981), como representante da família Nocardiaceae. Ao longo dos anos, a família passou por uma série emendas, e atualmente também comporta os gêneros *Nocardia* (STACKEBRANDT et al., 1997), *Smaragdicoccus* (ADACHI et al., 2007), *Gordonia*, *Millisia*, *Skermania* e *Williamsia* (ZHI et al., 2009).

Chiba e colaboradores (1999) foram pioneiros na identificação de compostos bioativos entre *Rhodococcus* spp. No primeiro trabalho, o grupo identificou 5 novos tetrapeptídeos cíclicos com pronunciada atividade antifúngica (rodopeptina C1, C2, C3, C4 e B5), o que despertou a atenção de outros grupos de pesquisas. Nos anos seguintes, muitos outros agentes bioativos foram isolados, consolidando as expectativas do gênero *Rhodococcus* como nova fonte de recursos microbianos, com potencial biotecnológico.

A revisão recém publicada “*The genus Rhodococcus as a source of a novel bioactive substances*” (ELSAYED et al., 2017) apresenta em maiores detalhes a potencialidade de aplicação dos recursos biológicos de várias espécies de *Rhodococcus*, dentre as quais pode-se destacar a produção dos compostos antimicrobianos lariatinas A e B (IWATSUKI et al., 2006), aurachina RE (KITAGAWA; TAMURA, 2008a) e rhodostreptomycinas A e B (KUROSAWA et al., 2008); presença dos carotenoides anti oxidativos OH-clorobacteno glicosídeo, OH- γ -caroteno glicosídeo, OH-4-ceto- γ -caroteno glicosídeo hexadecanoato e OH-clorobacteno glicosídeo hexadecanoato (OSAWA et al., 2011); especificidade para produção dos sideróforos rhodobactina e rhodochelina (BOSELLO et al., 2011; MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2008; DHUNGANA et al., 2007) e versatilidade para diversas classes enzimáticas, como estireno monoaminoxidases, N-oxigenase, limoneno-1,2-epóxido hidrolase e endoglicoceramidases (INDEST; EBERLY; HANCOCK, 2015; TISCHLER et al., 2009; van der WERF; OVERKAMP; BONT, 1998; ITO; YAMAGATA, 1989).

A análise preliminar da sequencia 16S rRNA da linhagem CMAA 1530 (1.321 pb) apresentou similaridade de 98,79% (16 dif/nt) para a linhagem tipo *Rhodococcus trifolii*. A espécie *Rhodococcus trifolii* LMG 26204^T (KAMPFER et al., 2013) foi isolada de superfície foliar de *Trifolium repens* L. (Fabaceae), a qual é descrita como bem adaptada ao clima temperado e a baixa disponibilidade de água (HOFER; SUTER; BUCHAMANN, 2017), e

promotora de benefícios diretos aos sistemas de pastagens, durante períodos de estiagem (SUTER et al., 2015; LUSCHER et al., 2014). Até o presente momento, a produção de compostos bioativos não foi relacionada para a espécie *Rhodococcus trifolii*, entretanto, muitos trabalhos de bioprospecção concentram seus esforços somente à obtenção e caracterização dos metabólitos secundários, não designando a posição taxonômica das linhagens de trabalho (ELSAYED et al., 2018; ZHANG et al., 2017; YELLAMANDA; VIJAYALAKSHMI; KAVITHA, 2016).

A sequencia 16S rRNA da linhagem CMAA 1533 (1.443 pb), apresentou 41 diferenças nucleotídicas (similaridade de 96,91%), em relação a linhagem tipo mais próxima *Rhodococcus baikonurensis* DSM 44587^T (LI et al., 2004a), isolada do ar das câmaras interespaciais da estação espacial russa Mir. O grupo de pesquisa tinha por objetivo avaliar a comunidade microbiana na estação espacial e determinar possíveis patógenos oportunistas, o que acabou não sendo comprovado para *Rhodococcus baikonurensis* DSM 44587^T (KAWAMURA et al., 2001). Peeters e colaboradores (2011) isolaram a espécie *Rhodococcus baikonurensis* de amostras coletadas no lago Lundstrom (Continente Antártico), durante o extenso trabalho para caracterizar a diversidade da comunidade bacteriana cultivável, nas montanhas Shackleton e Pensacola. O potencial biotecnológico de espécie foi apresentado por Lee e colaboradores (2006), ao observarem a eficiência da cepa *Rhodococcus baikonurensis* EN3 para degradação de óleo diesel. Em seguida, duas novas isoformas do antimicrobiano aurachina (Q e R) foram reportadas como resultado do metabolismo secundário da cepa *Rhodococcus baikonurensis* Acta 2259, isolada na Inglaterra em amostras de tratamento de esgoto (NACHTIGALL et al., 2010).

A reconstrução filogenética para as linhagens CMAA 1530 e CMAA 1533 (Figura 39) revelou a formação de linhas filéticas distintas (suportadas por alto valor de *bootstrap*), dentre o subclado *Rhodococcus equi*, proposto por Jones e Goodfellow (2015).

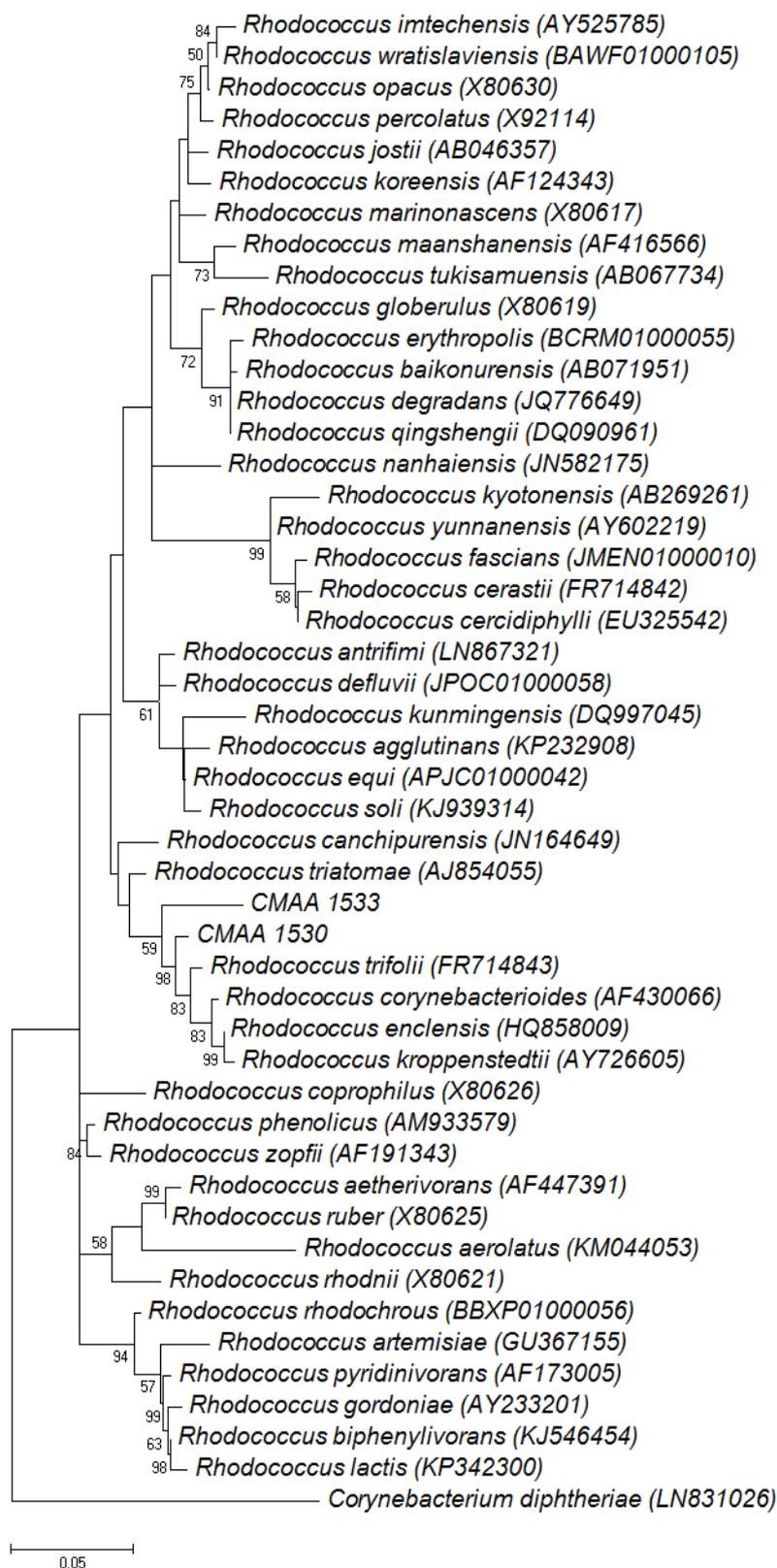


Figura 39: Reconstrução filogenética por *maximum-likelihood* e modelo evolutivo Kimura-3, sob distribuição gamma com sítios invariados G+I, com base nas sequências 16S rRNA das linhagens CMAA 1530, CMAA 1533 e linhagens tipo *Rhodococcus* spp. mais próximas. Os valores apresentados nos ramos filogenéticos indicam a estabilidade da inferência em 1.000 repetições (apenas valores superiores a 50% foram apresentados)

A linhagem CMAA 1533 foi apresentada como uma nova espécie, denominada *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. (SILVA et al., 2018). A similaridade entre as sequências 16S rRNA das linhagens CMAA 1530 e *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. corresponde a 97% (35 dif/nt), o que indica que as linhagens correspondam a espécies diferentes. Para confirmação da hipótese e classificação da linhagem CMAA 1530 como um novo taxon ao gênero *Rhodococcus* a análise de hibridização DNA-DNA precisa ser realizada.

6.4.4. *Nocardia* spp.

O gênero *Nocardia* está estabelecido dentro da ordem Corynebacteriales (STACKEBRANDT et al., 1997). A primeira linhagem de *Nocardia* foi isolada pelo veterinário francês Edmond Nocard e desde então espécies foram reportadas em solos, sedimentos marinhos, lagos e áreas contaminadas (KAMPFER et al., 2007; YAMAMURA et al., 2005; MALDONADO et al., 2000; JIANG; XU, 1996).

Algumas espécies de *Nocardia* são descritas como patógenos oportunistas (ex.: *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia nova* e *Nocardia otitidiscaviarum*) e responsáveis por causar micetoma cutânea e nocardiose pulmonar em pacientes imunodeprimidos (ZIJLSTRA et al., 2016; VONGPHOUMY et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2010). No entanto, o grupo também apresenta potencial para produção de agentes antimicrobianos (HARA et al., 2018; HARA et al., 2017) e antitumorais (KAWADA et al., 2018; KAWADA, 2016; CHRISTOVA et al., 2014). A revisão “Underpinning the secondary metabolites from *Nocardia* spp.” apresenta detalhadamente as vias metabólicas de linhagens de *Nocardia* responsáveis pela produção de nocardicina, nargenicina, tubelactomicina, brasilicardina, brasiliquinonas e transvalecina (DHAKAL et al., 2013).

A inferência taxonômica preliminar da linhagem CMAA 1539 (1.442 pb) indicou semelhança de 98,18% para a linhagem tipo *Nocardia ninae* (27 dif/nt). No entanto, a análise teve cobertura de apenas 91% da região 16S rRNA, pois a sequência depositada para linhagem de referência possui apenas 1.320 pb. Contudo, o índice de similaridade entre CMAA 1539 e a linhagem tipo *Nocardia alba* (segundo melhor *score*) foi de 97,38%, referente a 29 dif./nt entre os 1.437 sítios analisados.

Nocardia ninae DSM 44978^T foi isolada em ambiente hospitalar (LAURENT et al., 2007) e apesar de não ter sido reportada como agente patogênico, a linhagem apresenta

potencial para degradação de antibióticos β -lactâmicos. A linhagem tipo *Nocardia alba* DSM 44684^T foi inicialmente isolada de amostras de solo (LI et al., 2004b) e posteriormente reportada como endófito à espécie vegetal *Tripterygium wilfordii* Hook F. (Celastraceae) (LI et al., 2015), a qual é empregada há mais de 200 anos como agente bioativo ao tratamento de carbúnculos, edemas, estado de pirexia e infecções intestinais (CHEN, 2001). Dentre os inúmeros metabólitos presentes no extrato vegetal, as substâncias triptolida, triptiolida e triptonida recebem destaque, por apresentarem pronunciada atividade antitumoral, anti-inflamatória e anti-reumática (ZHOU et al., 2018a; ZHOU et al., 2018b; GOLDBACH-MANSKY et al., 2009; QIU; KAO, 2003).

A reconstrução evolutiva da linhagem CMAA 1539, a partir do fragmento 16S rRNA (Figura 40), indicou a diferenciação taxonômica, frente as sequências de *Nocardia* spp. A linha filética formada reforça a inferência preliminar de maior similaridade taxonômica para a espécie *Nocardia ninae* DSM 44978^T, suportada pela repetição em mais de 50% das 1.000 reconstruções. Considerando as descrições taxonômicas recentes para o gênero *Nocardia* (LI et al., 2017; TANASUPAWAT et al., 2016; GILQUIN et al., 2016; LASKER et al., 2015), pode-se pressupor que a linhagem CMAA 1539 corresponda a um novo taxon. Para tanto, a análise de hibridização DNA-DNA deve ser comprovada abaixo de 70%, para a linhagem tipo mais próxima.

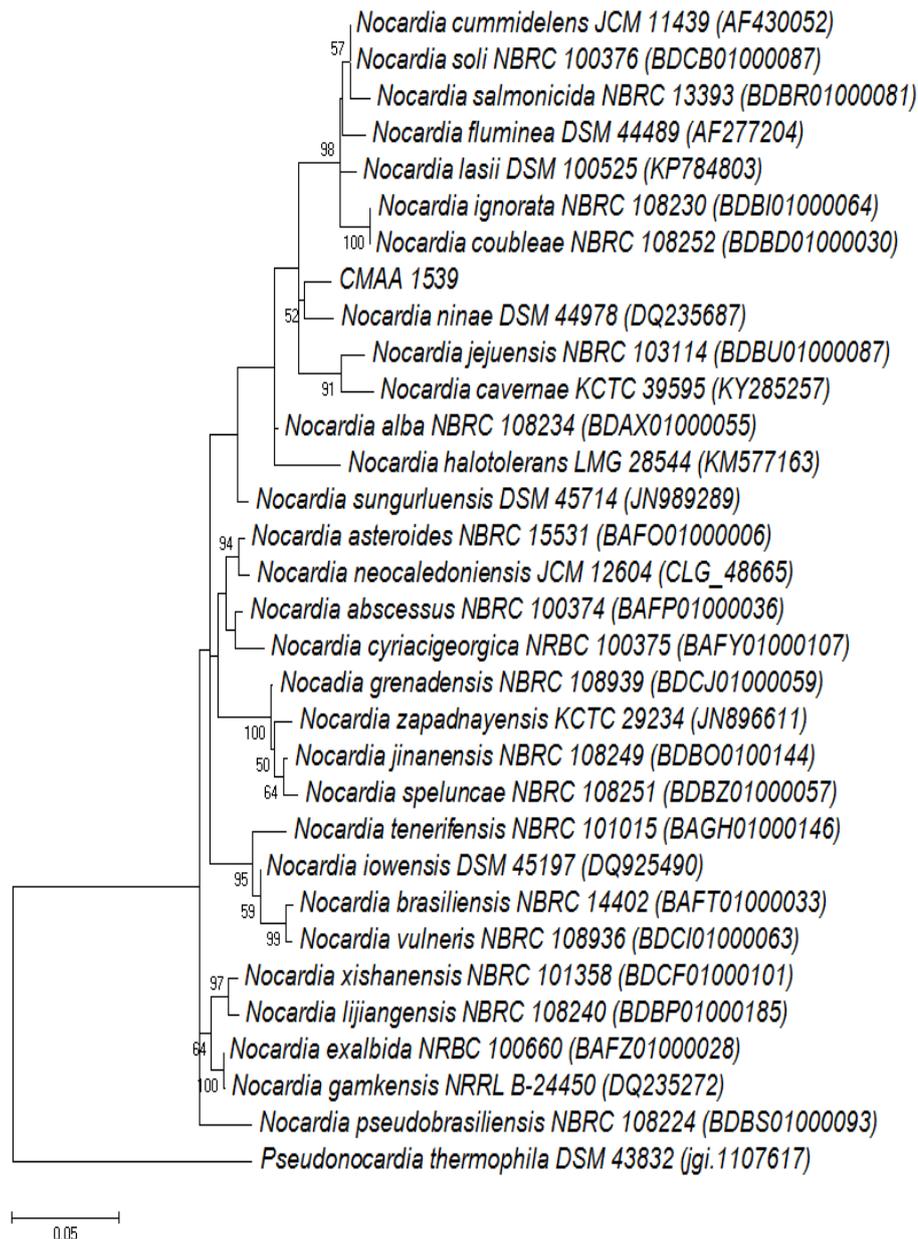


Figura 40: Reconstrução filogenética por *maximum-likelihood* e modelo evolutivo Tamura-Nei, sob distribuição gamma com sítios invariados G+I, com base nas sequências 16S rRNA das linhagem CMAA 1539 e linhagens tipo *Nocardia* spp. mais próximas. Os valores apresentados nos ramos filogenéticos indicam a estabilidade da inferência em 1.000 repetições (apenas valores superiores a 50% foram apresentados)

6.5. Classificação taxonômica da linhagem CMAA 1533

Linhagens de *Rhodococcus* são descritas como cosmopolitas (PEETERS et al., 2011). Atualmente, o gênero comporta mais de 40 espécies (<http://www.bacterio.net/rhodococcus.html>), subdivididas com base na filogenia por 16S rRNA em 3 subclados: *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis* e *Rhodococcus rhodochrous* (JONES e GOODFELLOW, 2015). Contudo, a comparação interespecífica a

partir de genomas completos, tem revelado que o grupo pode ser mais heterogêneo, do que a atual subdivisão. Sangal e colaboradores (2016) apresentaram a proposta para a divisão do gênero *Rhodococcus* em 6 subgrupos de espécies, onde um deles poderia ser relacionado como o novo gênero, *Prescottella* gen. nov. No entanto, a validação desta nova proposta ainda não está estabelecida e estará sob melhores condições de avaliação a medida que um número maior de genomas estiverem sequenciados e/ou novas sequências 16S rRNA para *Rhodococcus* forem depositadas aos bancos de dados (ANASTASI et al., 2016; SANGAL et al., 2016).

Rhodococcus spp. possuem genomas grandes, podendo conter megaplasmídeos codificadores de vias enzimáticas e apresentar mecanismo de recombinação genética altamente eficientes (McLEOD et al., 2006). A diversidade catabólica apresentada pelo grupo favorece a sua aplicação em processos de biorremediação de áreas contaminadas. Os artigos “*The complete genome of Rhodococcus sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse*” (McLEOD et al., 2006) e “*Biodegradation potential of the genus Rhodococcus*” (MARTÍNKOVÁ et al., 2009) apresentam de forma detalhada a versatilidade genômica de espécies do gênero *Rhodococcus* para vias de degradação de xenobióticos aromáticos. Contudo, os autores reportam que a efetividade das linhagens para biorremediação “in situ” pode ser relativamente lenta e estar limitada pelas características ambientais locais (principalmente pH e temperatura). Nesse sentido, o emprego da engenharia genética para ampliar a funcionalidade dos recursos genômicos microbianos acessados apresenta-se como uma importante estratégia.

A prospecção de actinobactérias no Continente Antártico possibilitou a recuperação da linhagem CMAA 1533, a qual apresentou baixos índices de similaridade filogenética com as linhagens tipo *Rhodococcus triatoma* DSM 44892^T (96,82%), *Rhodococcus corynabacterioides* DSM 201151^T (96,61%) e *Rhodococcus trifolii* LGM 26204^T (96,55%). Os valores de similaridade correspondem a 45, 46 e 48 diferenças nucleotídicas, dentre os 1.434 pb analisados. Meier-Kolthoff et al (2013) assume como mandatório à descrição de novas espécies de Actinobacteria, a condução da análise de hibridização DNA-DNA, caso os valores de similaridade para o gene 16S rRNA estiverem superiores a 97%. Dessa forma, os estudos de hibridização entre a linhagem CMAA 1533 e as linhagens tipo mais próximas não foram necessários.

6.5.1. Apresentação do novo táxon ao gênero *Rhodococcus*

Os resultados da abordagem taxonômica polifásica demonstraram que apesar da correlação filogenética entre a linhagem CMAA 1533 e as linhagens tipo *Rhodococcus triatomae* DSM 4489^T, *Rhodococcus trifolii* LGM 26204^T e *Rhodococcus corynebacterioides* DSM 201151^T, a mesma possui uma série de características fenotípicas exclusivas, as quais podem ser consideradas suficientes à diferenciação da linhagem dos taxa mais próximos. Portanto, suportada pelo conjunto de propriedades genotípicas e fenotípicas apresentadas, a linhagem, CMAA 1533, foi proposta como um novo táxon representativo ao gênero *Rhodococcus*, denominado *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov. O protólogo digital para o novo táxon é TaxoNumber TA00191.

6.5.2. Descrição do táxon *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov.

Rhodococcus psychrotolerans (psy.chro.to'le.rans. Gr. adj. *psychros* frio; L. pres. part. *tolerans* tolerante; N.L. part. adj. *psychrotolerans* tolerante ao frio).

Cultura aeróbica, Gram-positiva, desprovida de motilidade, actinobacteria com colônias creme opaca. As células apresentam variação morfológica ao longo do ciclo de desenvolvimento (bastonete - coco) em meio de cultivo GYEA. Não produz pigmento nas condições avaliadas. Cresce em 4-28 °C (ótimo 16-20 °C), pH de 4.0-10.0 (ótimo 7.0) e tolera até 7% de NaCl (ótimo 0-2,5 %). Hidrolisa amido, biotina, caseína, celulose, elastina, guanina, hypoxantina, pectina e xantina, mas não hidrolisa, gelatina, quitina, trealose, tween (20-80%) ou xilana (1,0% p/v). Utiliza adonitol, L-arabinose, α -lactose, D-celobiose, dextrina, D-frutose, D-galactose, glucose, glicerol, D-maltose, D-manose, *meso*-erytritol, D-lactose, L-ramanose, L-rafinose, sacarose e D-sorbitol, mas não utiliza glicogênio, *myo*-inositol, D-ribose, trealose, xilitol, ou xilose como única fonte de carbono. L-glutamina, L-serina, L-tirosina e L-valina são utilizadas como única fonte de nitrogênio, mas L-histidina ou L-lisina não. Propriedades quimiotaxonômicas são típicas de membros do gênero *Rhodococcus*. O conteúdo G+C é 65,5 mol%.

A linhagem CMAA 1533 (=NRRL B-65465^T = DSM 104532^T) foi isolada da rizosfera de *Deschampsia antarctica*, coletado na Ilha Rei George, Península Antártica. A descrição da espécie foi baseada em uma única linhagem e serve, portanto, para descrição da linhagem tipo. O número de acesso do *GenBank* para a sequência 16S rRNA da linhagem CMAA 1533 é KY317932.

O artigo *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov., isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica* foi publicado na revista *Antonie van Leeuwenhoek* e pode ser acessado através do *Digital Object Identifier* (DOI): 10.1007/s10482-017-0983-7.

6.6. Triagem das linhagens de actinobactérias para atividade antitumoral

A utilização da linhagem *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T como modelo para triagem de compostos com propriedades antitumorais apresentou aplicabilidade satisfatória. O bioensaio é constituído por técnicas laboratoriais simples, amplamente difundidas em rotinas microbiológicas e concilia duas importantes variáveis da prospecção: rápida resposta e baixo custo para execução.

O princípio da técnica está centrado na fisiologia do oomyceto *Pythium aphanidermatum*. Enquanto fungos apresentam quitina ou quitosana como principais constituintes de parede celular, oomycetos ou também denominados fungos falsos, apresentam majoritariamente polissacarídeos β -glucanos e celulose (~80-90%), além de lipídios (~8%) e proteínas (~2%) (BLASCHEK et al., 1992). A porção lipídica (~1-3% colesterol) é a responsável por designar *Pythium aphanidermatum* como organismo modelo para bioensaios de antitumorais. O artigo “*In vitro studies of Brazilian propolis against a phytopathogen agent: analyzing bioactive and mechanism of action on model membranes*” (PAZIN et al., 2014) apresenta a correlação entre metabolitos selecionados por antagonismo para *Pythium aphanidermatum* e a especificidade para desestruturação de membranas sintéticas formuladas a partir de esteroides.

O acúmulo de colesterol está relatado como característica marcante em tumores de próstata, mama e boca (MARTIN; van GOLEN, 2012; FREEMAN; SOLOMON, 2004; KOLANJIAPPAN et al., 2003; DESSI et al., 1994). Entretanto, o desequilíbrio no metabolismo de colesterol está correlacionado para diversos outros tipos de câncer, entre eles pulmão e leucemia (LI et al., 2006; DUNCAN et al., 2004; EL-SOHEMY; ARCHER, 2000). Dessa forma, a estratégia aplicada como forma de triagem deve favorecer a seleção de substâncias que atuem sobre a síntese ou desestabilização das camadas lipídicas.

A atividade de antagonismo para o crescimento *in vitro* de *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T foi observada em linhagens dos gêneros *Nocardia*, *Pilimelia*, *Rhodococcus*, *Streptacidiphilus* e *Streptomyces*. Em relação a inferência quantitativa, apenas linhagens dos gêneros *Nocardia* (CMAA 1532) e *Streptomyces* (CMAA 1517, CMAA 1527, CMAA 1653)

desempenharam atividade pronunciada de inibição. Contudo, vale ressaltar que as mesmas condições de cultivo para produção de metabólitos secundários (meio nutritivo, temperatura, agitação e tempo de incubação) foram seguidas para todas as linhagens, o que provavelmente influenciou (positivamente ou negativamente) o metabolismo de determinados grupos. A revisão “*Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria*” (BARKA et al., 2016) descreve detalhadamente fatores determinantes para ativação de vias metabólicas relacionadas a produção de compostos bioativos. De forma complementar, Balouiri et al (2016) apresentaram por meio de estudo comparativo, a divergência decorrente da inferência quantitativa para bioatividade, dentre as inúmeras metodologias usualmente aplicadas nas rotinas laboratoriais.

6.6.1. Taxonomia das linhagens com atividade antiproliferativa pronunciada

Apesar do reconhecimento que as condições de cultivo podem ter “mascarado” o potencial bioativo de determinados grupos de actinobactérias, as linhagens que apresentaram inibição para o crescimento de *Pythium aphanidermatum* CMAA 243^T foram selecionadas para o ensaio antiproliferativo preliminar. O ensaio foi constituído pelos extratos brutos das linhagens: CMAA 1515, CMAA 1516, CMAA 1517, CMAA 1518, CMAA 1519, CMAA 1520, CMAA 1522, CMAA 1523, CMAA 1524, CMAA 1525, CMAA 1627, CMAA 1530, CMAA 1532, CMAA 1536, CMAA 1653, CMAA 1654 e CMAA 1703, pelas linhagens tumorais: U251, MCF-7 e NCI-H460 e a linhagem não tumoral: HaCaT.

Os extratos brutos das linhagens CMAA 1520, CMAA 1527 e CMAA 1653 apresentaram melhores respostas para inibição do crescimento das linhagens tumorais. Conforme inferência taxonômica (Tabela 5) todas as linhagens apresentam similaridade superior a 99% para o gênero *Streptomyces*. A linhagem CMAA 1520 apresentou maior correlação para a linhagem tipo *Streptomyces luridiscabiei* LMG 21390^T (PARK et al., 2003), isolada de tubérculos de batata na Coreia e caracterizada por causar danos à cultura (sarna da batata). Contudo, o artigo “*Phytotoxins produced by plant pathogenic Streptomyces species*” avaliou vias metabólicas das espécies (*S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies*, *S. europaescabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. ludidiscabiei*, *S. niveiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. cheloniumii* e *S. ipomoeae*) e não apresentou comprovação da produção de fitotoxinas por *Streptomyces luridiscabiei* (BIGNELL; FYANS; CHENG, 2013).

Dentre as substâncias relacionadas ao acometimento de doenças em batatas está a borrelidina. Interessantemente, a substância também é reportada como agente antiangiogênico

para carcinoma oral e hepático (GAO et al., 2017; SIDHU et al., 2015; WAKABAYASHI et al., 1997) e foi recentemente isolada de culturas de bactérias extremofílicas (*Nocardiopsis* sp.) de ambiente hipersalino (KIM et al., 2017).

A linhagem CMAA 1527 apresentou maior correlação genética para a linhagem *Streptomyces glomeroaurantiacus* JCM 4677^T, isolada de solo coletado na Rússia. Wang et al (2014) também reportaram o acesso a espécie, em amostra de solo da China, por meio da utilização de meios de cultivo diluídos. Os autores apresentaram o potencial bioativo da linhagem contra *Verticillium dahliae* e *Staphylococcus aureus*.

A espécie *Streptomyces fildesensis* DSM 41987^T (LI et al., 2011), linhagem tipo mais próxima a CMAA 1653, foi isolada e descrita a partir de amostra de solo Antártico (Ilha Rei George, Península Antártica). Posteriormente, Lavin e colaboradores (2016) também recuperaram a espécie no Continente Antártico e avaliaram o potencial bioativo do isolado (juntamente com outras 17 linhagens recuperadas), frente o crescimento de *Staphylococcus* spp e *Escherichia coli*. A partir do halo de inibição, a linhagem *Streptomyces fildesensis* INCH3013^T foi considerada como a mais promissora como agente de biocontrole e avaliada como resistente para múltiplos antibióticos.

Em trabalho complementar, Perron et al (2015) aplicaram estratégias metagenômicas para descrever 8 genes relacionados a resistência a antibióticos e assumiram tal característica como resposta para ambientes com alta competição. Considerando o curto período de tempo, em que todo o sistema biológico precisa se desenvolver (verão Antártico), a resistência microbiana a antibióticos pode ser realmente atribuída a uma característica de competição, mesmo em um ambiente com pouca influência antropogênica.

Apesar de não ter sido selecionada para os estudos antiproliferativos complementares, a linhagem CMAA 1703 apresentou pronunciado efeito inibitório contra as linhagens U251, MCF-7 e NCI-H460 e baixa similaridade taxonômica com a linhagem tipo mais próxima *Streptomyces ossamyceticus* NRRL B-3822^T. O extrato bruto apresentou perfil antiproliferativo citostático, mesmo em altas concentrações (25 µg/mL). Estudos futuros para esta linhagem poderá representar a comprovação de um novo taxon, com potencial para produção de compostos antitumorais.

6.6.2. Atividade antiproliferativa

6.6.2.1. CMAA 1527

O ensaio antiproliferativo complementar revelou que os compostos ativos do extrato bruto da linhagem CMAA 1527 foram selecionados na fração Fr-3. A fração apresentou atividade de caráter citostático (inibição > 75-100%), sob concentrações de 0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL, em tumores de mama (MCF-7), glioma (U251), rim (786-0) e pulmão (NCI-H460). Em comparação com o quimioterápico comercial doxorrubicina, o potencial antiproliferativo da fração Fr-3 para a linhagem 786-0 esteve equivalente, nas concentrações 0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL e apresentou relativa similaridade de atividade para a linhagem MCF-7.

Vale relembrar a estimativa apresentada pelo Instituto Nacional do Cancer dos Estados Unidos (NCI), de 14 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo para o ano de 2018, dentre os quais tumores de mama, pulmão serão os mais incidentes em adultos, enquanto leucemias e tumores no sistema nervoso central serão os mais representativos entre crianças e jovens (ROLSON, 2017; SIEGEL et al., 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, Brasil), o número de mortes no ano de 2018 na população brasileira poderá ser de 225 mil. Tais previsões reforçam a necessidade dos exercícios de prospecção para agentes antitumorais e reforçam a importância da continuidade dos trabalhos com a linhagem CMAA 1527.

6.6.2.2 CMAA 1653

Para o extrato bruto da linhagem CMAA 1653 o caráter citostático pode ser observado predominantemente na fração Fr-8 (0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL), enquanto nas frações Fr-7, Fr-9, Fr-10 e Fr-11, o efeito citocida foi característico para a maior parte das linhagens tumorais. A fração Fr-8 (0,25 µg/mL) foi efetiva em controlar ($\geq 50\%$) a proliferação das linhagens U251 (glioma), MCF-7 (mama), OVCAR-3 (ovário com fenótipo de resistência para múltiplos fármacos) e PC-3 (próstata). Apesar do caráter citotóxico, as frações Fr-7 e Fr-9 em concentração de 0,25 µg/mL apresentaram inibição $\geq 90\%$ à proliferação celular dos tumores de pulmão (NCI-H460), cólon (HT-29) e leucemia (K-562). A fração Fr-10 ocasionou morte celular em todas as linhagens tumorais, mesmo em concentração de 0,25 µg/mL ($\geq 50\%$ às linhagens U251, NCI/ADR-RES; 786-0, MCF-7 e OVCAR-3). Para a fração fr-11, pode-se destacar o controle proliferativo (70-100%) às linhagens U251, MCF-7, NCI-H460 e 786-0, em concentração de 0,25 µg/mL.

Para continuidade do trabalho, o entendimento sobre os mecanismos de ação dos compostos acessados torna-se imprescindível. Para isso, o algoritmo COMPARE (Zaharevitz et al., 2002) pode representar grande contribuição, principalmente por ser uma plataforma de análise gratuita. A ferramenta correlaciona o mecanismo de ação previamente estabelecido, através de ensaios antiproliferativos do NCI em 60 linhagens tumorais, e o perfil inibitório observado pelos compostos em estudo, para predição do mecanismo de ação responsável pela propriedade antiproliferativa (SHOEMAKER, 2006).

6.6.3. Compostos bioativos produzidos pelas actinobactérias

Com base nos experimentos realizados, o composto cinerubina B (classe das antraciclina) foi considerado o agente responsável pela atividade antiproliferativa, do extrato bruto da linhagem CMAA 1527. Cinerubina B foi descrita como antibiótico em 1970, por Keller-Schierlein e Richle W. e desde então diversas variantes estruturais foram apresentadas. Trabalhos posteriores demonstraram o potencial da cinerubina como agente antiparasitário e antitumoral (PANG, 2016; HAYASE et al., 2015; GAMO et al., 2010; NAKATA et al., 1992).

Antraciclina foram descobertas em 1960, sendo produzidas originalmente por actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Estruturalmente são constituídas por aglicona tetracíclica planar e esqueleto 7,8,9,10-tetrahidro-tetraceno-5-12-quinona, contendo pelo menos um açúcar (geralmente aminoglicosídeo), ligado por uma ligação O-glicosídica (GEWIRTZ, 1999), sendo portanto classificadas como policetídeos aromáticos (La FERLA, et al., 2011). Considerando as drogas de primeira linha ao tratamento de tumores sólidos e Leucemia Mielóide, as antraciclina são consideradas as estruturas naturais mais exploradas na última década. Contudo, os mecanismos de ação ao controle de tumores ainda requer melhor entendimento. Lu et al (2011) e Rahman et al (2007) assumem como mecanismo de ação a inibição da DNA topoisomerase II, por meio da intercalação do sistema de anel planar, entre as bases nucleotídicas C-G e interação dos resíduos de açúcar à região *minor groove* do DNA. No entanto, o artigo “*The structure of anthracycline derivatives determine their subcellular localization and cytotoxic activity*” (SHAUL et al., 2013), apresenta por meio de microscopia confocal maiores variações para as características até então descritas, como por exemplo a concentração de antraciclina em lisossomos.

Dhakal et al (2018) apresentam o genoma completo da linhagem *Streptomyces peucetius* ATCC 27952^T, espécie descrita como proeminente produtora compostos

antitumorais. A análise de predição para clusters biosintéticos por antiSMASH indicou a presença de vias metabólicas com 65% de similaridade para o cluster de cinerubina B, bem como para outras antraciclinas (PKS tipo II), o que reforça e complementa os resultados obtidos em nossas avaliações.

Em relação aos compostos bioativos produzidos pelas linhagens CMAA 1653 e CMAA 1703, a continuidade dos experimentos de purificação, seleção dos componentes majoritários e caracterização química das frações com maior atividade antiproliferativa são necessárias, para que então correlações mais precisas possam ser atribuídas.

6.7. Análises quimiométricas dos perfis metabolômicos dos extratos brutos das linhagens *Streptomyces*

Os resultados obtidos indicam variabilidade metabólica entre as linhagens *Streptomyces* sp. No entanto, nenhum dos clados estabelecidos foi formado exclusivamente por linhagens ativas contra a proliferação de linhagens tumorais. O estudo mais aprofundado sobre os principais íons referentes a separação dos grupos (CLAE-EM/EM) poderá apresentar alguma especificidade funcional para as linhagens dos clados estabelecidos.

7. CONCLUSÃO

A comunidade bacteriana associada a rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. é altamente diversificada. Dentre os 34 filos estabelecidos para do domínio Bacteria, 14 foram identificados através da abordagem independente de cultivo, além de 7 filos candidatos.

Sequências assinadas para o filo Actinobacteria foram as mais abundantes, em todos os pontos de amostragem. A predição funcional para bactérias totais e actinobactérias revelou o enriquecimento de vias metabólicas para famílias enzimáticas, vias relacionadas a replicação e ao processo de reparo de DNA, e vias para produção de terpenóides e policetídeos bioativos, entre o filo Actinobacteria. Tais observações possibilitam a afirmação de que a rizosfera subjacente a gramínea *D. antarctica* Desv. constitui um ambiente promissor à busca por organismos e substâncias com propriedades bioativas.

Como resultado da abordagem dependente de cultivo, o novo taxón *Rhodococcus psychrotolerans* sp. nov., foi descrito e outras 4 linhagens foram apresentadas como possíveis novas espécies. Os resultados demonstram que a rizosfera de *Deschampsia antarctica* Desv. constitui um ambiente promissor para isolamento de novas espécies de actinobactérias;

Os ensaios antiproliferativos revelaram a alta eficiência das linhagens isoladas para produção de compostos antitumorais, o que responde a hipótese inicial deste trabalho. Nesse sentido, o composto cinerubina B foi identificado como metabólito secundário majoritário, responsável pela atividade antitumoral da linhagem CMAA 1527. As análises cromatográficas indicaram a possibilidade da linhagem CMAA 1527 produzir outras antraciclinas, dentre as quais destacam-se auramicina B, hidróxisulfurmicina B e pirromicina.

O caráter citotóxico apresentado pelo extrato bruto da linhagem CMAA 1653 não elimina o interesse pela linhagem, uma vez que processos de aprimoramento, seletividade do mecanismo de ação e estabelecimento de dosagem segura são comuns ao longo do desenvolvimento e formulação de substâncias bioativas.

O trabalho poderá ser continuado, visto que apenas uma pequena parcela da biblioteca metagenômica de clones foi explorada e as linhagens isoladas estão depositadas na Coleção de Culturas de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental (Embrapa Meio Ambiente), a disposição de grupos de pesquisas interessados.

REFERÊNCIAS

AAKVIK, T.; LALE, R.; LILES, M.; VALLA, S. Metagenomic Libraries for Functional Screening. **Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches**, Willey Blackwell, London, v. 1, n. 4, p. 171–181, 2011.

ADACHI, K.; KATSUTA, A.; MATSUDA, S.; PENG, X.; MISAWA, N.; SHIZURI, Y.; KROPPESTEDT, R. M.; YOKOTA, A.; KASAI, H. *Smaragdicoccus niigatensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder Corynebacterineae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, p. 297–301 2007.

AHMAD, M. S.; YASSER, M. M.; ALI, A. M.; MEHANNI, M. M. Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess_ama-I. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, p. 3389–3401, 2015.

AJABNOOR, G. M. Classical Taxane versus the New Generation, Nab- Paclitaxel Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer. **MOJ Cell Science & Report**, Edmond, v. 4, n. 3, p. 7, 2017.

ALBERDI, M.; BRAVO, L.; GUTIÉRREZ, A.; GIDEKEL, M.; CORCUERA, L. J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 4, p. 479–486, 2002.

ANASTASI, E.; MACARTHUR, I.; SCORTTI, M.; ALVAREZ, S.; GIGUÈRE, S.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 8, n.1 p. 3140-3148, 2016.

ANDROSIUK, P.; CHWEDORZEWSKA, K.; SZANDAR, K.; GIELWANOWSKA, I. Genetic variability of *Colobanthus quitensis* from King George Island (Antarctica). **Polish Polar Research**, Warszawa, v. 36, n. 3, p. 281-295, 2015.

AOI, Y.; KINOSHITA, T.; HATA, T.; OHTA, H.; OBOKATA, H.; TSUNEDA, S. Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 11, p. 3826–3833, 2009.

ASLAM, S. N.; UNDERWOOD, G. J. C.; KAARTOKALLIO, H.; NORMAN, L.; AUTIO, R.; FISCHER, M.; KUOSA, H.; DIECKMANN, G. S.; THOMAS, D. N. Dissolved extracellular polymeric substances (dEPS) dynamics and bacterial growth during sea ice formation in an ice tank study. **Polar Biology**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 661–676, 2012a.

ASLAM, S. N.; CRESSWELL-MAYNARD, T.; THOMASET, D. N.; UNDERWOOD, G. J. C. Production and Characterization of the Intra and Extracellular Carbohydrates and Polymeric Substances (EPS) of Three Sea-Ice Diatom Species, and Evidence for a Cryoprotective Role for Eps. **Journal of Phycology**, New York, v. 48, n. 6, p. 1494–1509, 2012b.

AZMAN, A. S.; OTHMAN, I.; VELU, S. S.; CHAN, K. G.; LEE, L. H. Mangrove rare actinobacteria: taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. **Frontiers in Microbiology**, Lousanne, v. 20, n. 6, p. 856, 2015.

BAKERMANS, C.; TSAPIN, A. I.; SOUZA-EGIPSY, V.; GILICHINSKY, D. A.; NEALSON, K. H. Reproduction and metabolism at -10 °C of bacteria isolated from Siberian permafrost. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 321-326, 2003.

BALKS, MEGAN R; LÓPEZ-MARTÍNEZ, JERÓNIMO; GORYACHKIN, SERGEY V; MERGELOV, NIKITA S; SCHAEFER, CARLOS E G R; SIMAS, FELIPE N B; ALMOND, PETER C; CLARIDGE, GRAEME G C; MCLEOD, MALCOLM & SCARROW, J. Windows on Antarctic soil – landscape relationships: comparison across selected regions of Antarctica. **The Geological Society of London**, London, n. 1958, p. 397–410, 2013.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Xian, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BALTZ, R. H. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. **Cell, Host and Microbe**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 125–131, 2007.

BARBER, D.; EHN, J. K.; PUĆKO, M.; RYSGAARD, S.; DEMING, J. W.; BOWMAN, J. S.; PAPAKYRIAKOU, T.; GALLEY, R. J.; SØGAARD, D. H. Frost flowers on young Arctic sea ice: The climatic, chemical, and microbial significance of an emerging ice type. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, Washington, p. 593–612, 2014.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 80, n. 1, p. 1–44, 2016.

BARNES, T. A.; AMIR, E.; TEMPLETON, A. J.; GARCIA, S. G.; NAVARRO, B.; SERUGA, B.; OCANA, A. Efficacy, safety, tolerability and price of newly approved drugs in solid tumors. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 1-7, 2017.

BATLLE, E.; CLEVERS, H. Cancer stem cells revisited. **Nature Medicine**, New York, v. 23, n. 10, p. 1124–1134, 2017.

BENTLEY, S.; CHATER, K. F.; CERDENÑO-TÁRRAGA, A. M.; CHALLIS, G. L.; THOMSON, N. R.; JAMES, K. D.; HARRIS, D. E. QUAIL, M. A.; KIESER, H.; HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature**, New York, v. 417, n. 6885, p. 141–147, 2002.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, New York. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 1–13, 2009.

BESIROGLU, M.; DANE, F.; CILTAS, A.; BENEKLIET, M. Systemic chemotherapy of advanced soft tissue sarcomas. **Journal of Oncological Sciences**, London, v. 3, n. 2, p. 66–70, 2017.

BIGANZOLI, L.; AAPRO, M.; LOIBL, S.; WILDIERS, H.; TAXANES, E. B. Taxanes in the treatment of breast cancer: Have we better defined their role in older patients? A position paper from a SIOG Task Force. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 43, p. 19–26, 2016.

BIGNELL, D.R.D.; FYANS, J. K.; CHENG, Z. Phytotoxins produced by plant pathogenic *Streptomyces* species. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 116, p. 223–235, 2013.

BIVER, S.; STEELS, S.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. *Bacillus subtilis* as a tool for screening soil metagenomic libraries for antimicrobial activities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 23, n. 6, p. 850–855, 2013.

BLASCHEK, W.; KASBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell-wall composition, and isolation and structure of antitumour storage and solubilised cell-wall (1 + 3),(1 + 6)-P-D-glucans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 231, p. 293–307, 1992.

BLOCHL, E.; RACHEL, R.; BURGGRAB, S.; HAFENBRADL, D.; JANNASCH, H. W.; STETTER, K. O. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113°C. **Extremophiles**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 14–21, 1997.

BOETIUS, A.; ANESIO, A. M.; DEMING, J. W.; MIKUCKI, J. A.; RAPP, J. Z. Microbial ecology of the cryosphere: Sea ice and glacial habitats. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 13, n. 11, p. 677–690, 2015.

BOLLMANN, A.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6386–6390, 2007.

BONASSI, S. ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; WASILEWSKA, A. C.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v.28, n. 3, 625–631, 2007.

BOSELLO, M.; ROBBEL, L.; LINNE, U.; XIE, X.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of the Siderophore Rhodochelin Requires the Coordinated Expression of Three Independent Gene Clusters in *Rhodococcus jostii* RHA1. **Journal of the American Chemical Society**, New York, v. 133, n. 12, p. 4587–4595, 2011.

BOTTOS, E. M.; SCARROW, J. W.; ARCHER, S. D. J.; MCDONALD, I. R.; CARY, S. C. (2014) Bacterial Community Structures of Antarctic Soils. In: **Antarctic Terrestrial Microbiology**. Cowan, D. A. (Eds), v.1 pp. 9-33, Berlin, Springer-Verlag.

BOWMAN, J. S.; BERTHIAUME, C. T.; ARMBRUST, E. V.; DEMING, J. W.; The genetic potential for key biogeochemical processes in Arctic frost flowers and young sea ice revealed by metagenomic analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 376–387, 2014.

BOWMAN, J. S.; DEMING, J. W. Elevated bacterial abundance and exopolymers in saline frost flowers and implications for atmospheric chemistry and microbial dispersal. **Geophysical Research Letters**, Washington, v. 37, n. 13, p. 1–5, 2010.

BOWMAN, J. S.; LAROSE, C.; VOGEL, T. M.; DEMING, J. W. Selective occurrence of Rhizobiales in frost flowers on the surface of young sea ice near Barrow, Alaska and distribution in the polar marine rare biosphere. **Environmental Microbiology Reports**, Hoboken, v. 5, n. 4, p. 575–582, 2013.

BOWMAN, J. S.; VICK-MAJORS, T. J.; MORGAN-KISS, R.; TAKACS-VESBACH, C.; DUCKLOW, H. W.; PRISCU, J. C. Microbial community dynamics in two polar extremes: The lakes of the McMurdo Dry Valleys and the West Antarctic Peninsula marine ecosystem. **BioScience**, London, v. 66, n. 10, p. 829-847, 2016.

BOYD, W. L.; BOYD, J. W. The presence of bacteria in permafrost of the Alaskan Arctic. **Canadian Journal of Research**, Ottawa, v. 10, p. 917-919, 1964.

BRAVO, L. A.; GRIFFITH, M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 414, p. 1189–1196, 2005.

BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 98, n. 1, p. 289–297, 1969.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, New York, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

BURNS, J. H.; ANACKER, B. L.; STRAUSS, S. Y.; BURKE, D. J. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. **AoB Plants**, Oxford, v. 7, p. 1–10, 2015.

CANN, S. A. H.; van NETTEN, J. P.; van NETTEN, C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 79, n. 938, p. 672–680, 2003.

CAPORASO, J. G.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R. PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics**, London, v. 26, n. 2, p. 266-267, 2009.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. D.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, New York, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CARPENTER, E. J.; LIN, S.; CAPONE, D. G. Bacterial activity in South Pole snow. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4514–4517, 2000.

CARTER, J.; WEAVER, B. A.; CHIACCHIO, M. A.; MESSERSMITH, A. R.; LYNCH, W. E.; FESKE, B. D.; GUMINA, G. Synthesis, stereochemical characterization and antimicrobial evaluation of a potentially nonnephrotoxic 3'-C-acetylhydrazide puromycin analog. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, Oxford, p. 1-18, 2016.

CASANOVA-KATNY, M. A.; CAVIERES, L. A. Antarctic moss carpets facilitate growth of *Deschampsia antarctica* but not its survival. **Polar Biology**, Berlin, v. 35, n. 12, p. 1869–1878, 2012.

CASANUEVA, A.; TUFFIN, M.; CARY, C.; COWAN, D. A. Molecular adaptations to psychrophily: The impact of “omic” technologies. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 18, n. 8, p. 374–381, 2010.

CAVIERES, L. A.; SAÉZ, P.; SANHUEZA, C.; SIERRA-ALMEIDA, A.; RABERT, C.; CORCUERA, L. J.; ALBERDI, M.; BRAVO, L. A. Ecophysiological traits of Antarctic vascular plants: their importance in the responses to climate change. **Plant ecology**, Dordrecht, v. 217, n. 3, p. 343-358, 2016.

CHEN, B. J. Triptolide , A Novel Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Agent Purified from A Chinese Herb Tripterygium Wilfordii Hook F. **Leukemia and Lymphoma**, London, v. 42, n. 3, p. 253–265, 2001.

CHEN, L.; LUO, Y.; XU, J.; YU, Z.; ZHANG, K.; BROOKES, P. C. Assessment of bacterial communities and predictive functional profiling in soils subjected to short-term funigation-incubation. **Microbial Ecology**, New York, v. 72, n. 1, p. 240-251, 2016.

CHEW, O.; LELEAN, S.; JOHN, U. P.; SPANGENBERG, G. C. Cold acclimation induces rapid and dynamic changes in freeze tolerance mechanisms in the cryophile *Deschampsia antarctica* E. Desv. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 35, n. 4, p. 829–837, 2012.

CHIBA, H.; AGEMATU, H.; KANETO, R.; TERASAWA, T.; SAKAI, K.; DOBASHI, K.; YOSHIOKA, T. Rhodopeptins (Mer-N1033) , Novel Cyclic Tetrapeptides with Antifungal Activity from *Rhodococcus* sp. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 52, n. 8, p. 695–699, 1999.

CHOWN, S. L.; CONVEY, P. Spatial and temporal variability across life ' s hierarchies in the terrestrial Antarctic. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v. 362, n. 1488, p. 2307–2331, 2007.

CHRISTNER, B. C.; PRISCU, J. C.; ACHBERGER, A. M.; BARBANTE, C.; CARTER, S. P.; CHRISTIANSON, K.; MICHAUD, A. B.; MIKUCKI, J. A.; MITCHELL, A. C.; SKIDMORE, M. L.; VICK-MAJORS, T. J.; WISSARD Science Team. A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. **Nature**, Basingstoke, v. 512, p. 310-313, 2014.

CHRISTOVA, N.; LANG, S.; WRAY, V.; KALOYANOV, K.; KONSTANTINOV, S.; STOINEVA, I. Production, Structural Elucidation, and In Vitro Antitumor Activity of Trehalose Lipid Biosurfactant from *Nocardia farcinica* Strain. **Journal Microbiology Biotechnology**, Seoul, v. 25, n. 4, p. 439-447, 2014.

CHU, P. L.; KHOO, C. H.; CHEAH, Y. K. Actinobacteria from Greenwich Island and Dee Island: Isolation, diversity and distribution. **Life Sciences, Medicine and Biomedicine**, Maragheh, v. 1, n. 1, 2017.

COGLIANO, V. J.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; LAUBY-SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; FREEMAN, C.; GALICHET, L.; WILD, C. P. Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene. **American Journal of Industrial Medicine**, New York, v. 54, n. 2, p. 165-167, 2011.

COLE, J. R.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; WANG, Q.; KULAM, S. A.; MCGARRELL, D. M.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, database, p. 294-296, 2005.

COLEY, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, London, v. 3, p. 1-48, 1909.

COLLINS, M. D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. E. Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. **Microbiology**, London, v. 110, n. 1, p. 127-136, 1979.

CONVEY, P.; CHOWN, S. L.; CLARKE, A.; BARNES, D. K. A.; BOKHORST, S.; CUMMINGS, V.; DUCKLOW, H. W.; FRATI, F.; GREEN, T. G. A.; GORDON, S.; GRIFFITHS, H. J.; HOWARD-WILLIAMS, CL.; HUISKES, A. H. L.; LAYBOURN-PARRY, J.; LYONS, W. B.; MCMINN, A.; MORLEY, S. A.; PECK, L. S.; QUESADA, A.; ROBINSON, S. A.; SCHIAPARELLI, S.; WALL, D. H. The spatial structure of antarctic biodiversity. **Ecological Monographs**, Washington, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014.

COOMBS, J. T.; MICHELSEN, P. P.; FRANCO, C. M. M. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. **Biological Control**, Atlanta, v. 29, n. 3, p. 359-366, 2004.

CORLESS, C. L. Gastrointestinal stromal tumors: What do we know now? **Modern Pathology**, New York, v. 27, n. SUPPL. 1, p. S1-S16, 2014.

COSTA, I. M.; SCHULTZ, L.; PEDRA, B. A. B.; LEITE, M. S. M.; FARSKY, S. H. P.; OLIVEIRA, M. A.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: An allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, New York, v. 6, n. 4, p. 1–11, 2016.

COWAN, D. A. The upper temperature of life--where do we draw the line? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 53–58, 2004.

COWAN, D. A.; MAKHALANYANE, T. P.; DENNIS, P.; HOPKINS, D. W. Microbial ecology and biogeochemistry of continental Antarctic soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2014.

COWIE, R. O. M.; WILLIAMS, G. J.; MAAS, E. W.; VOYLES, K. M.; RYAN, K. G. Antarctic sea-ice microbial communities show distinct patterns of zonation in response to algal-derived substrates. **Aquatic Microbial Ecology**, Luhe, v. 73, n. 2, p. 123–134, 2014.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, New York, v. 109, p. 3012–3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products as sources of new drugs over 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, p. 311–335, 2012.

CRAIG, J. W.; CHANG, F. Y.; KIM, J. H.; OBIJULU, S. C.; BRADYET, S. F. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1633–1641, 2010.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; FREITAS, B. C.; DIAS, J. L. M.; GUIMARÃES, K. P.; BENAZZATO, C.; ALMEIDA, N.; PIGNATARI, G. C.; ROMERO, S.; POLONIO, C. M.; CUNHA, I.; FREITAS, C. L. BRANDÃO, W. N.; ROSSATO, C.; ANDRADE, D. G.; FARIA, D. P.; GARCEZ, A. T.; BUCHPIGEL, C. A.; BRACONI, C. T.; MENDES, E.; SALL, A. A.; ZANOTTO, P. M. A.; PERON, J. P. S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, London, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.

CUSANO, M. A.; PARRILLI, E.; MARINO, G.; TUTINO, M. L. A novel genetic system for recombinant protein secretion in the Antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 1–8, 2006.

DAMEROW, P. Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. **Cuneiform Digital Library Journal**, Berlin, v. 2, p. 1–20, 2012.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 6, p. 470–478, 2005.

DANILOVICH, M. E.; SÁNCHEZ, L. A.; ACOSTA, F.; DELGADO, O. D. Antarctic bioprospecting: in pursuit of microorganism producing new antimicrobials and enzymes. **Polar Biology**, Berlin, v. 41, p. 1417–1434, 2018.

DAVIDSON, A. L.; DASSA, E.; ORELLE, C.; CHEN, J. Structure , Function , and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 72, n. 2, p. 317–364, 2008.

DAY, T. A.; RUHLAND, C. T.; XIONG, F. S. Warming increases aboveground plant biomass and C stocks in vascular-plant-dominated Antarctic tundra. **Global Change Biology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 1827–1843, 2008.

DELGADO-BAQUERIZO, MANUEL; REITH, FRANK; DENNIS, PAUL G; HAMONTS, KELLY; POWELL, JEFF R; YOUNG, ANDREW; SINGH, BRAJESH K; BISSETT, A. Ecological drivers of soil microbial diversity and soil biological networks in the Southern Hemisphere. **Ecology**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 583–596, 2018.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2013.

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. Introducing an issue on the making of food, drink, pharmaceuticals and industrial chemicals by microorganisms, with special reference to newer methods of programming the microorganisms for their task. **Scientific American**, New York, v. 245, n. 3, 1981.

DEMING, J. W. Psychrophiles and polar regions. TL-5. **Current opinion in microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 301–309, 2002.

DEMUNSHI, Y.; CHUGH, A. Role of traditional knowledge in marine bioprospecting. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 19, n. 11, p. 3015–3033, 2010.

DESSI, S.; BATETTA, B.; PULISCI, D.; SPANO, O.; ANCHISI, C.; TESSTORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M.; AROASIO, E.; PANI, P. Cholesterol Content in Tumor Tissues Is Inversely Associated with High-Density Lipoprotein Cholesterol in Serum in Patients with Gastrointestinal Cancer. **Cancer**, Hoboken, v. 73, n. 2, p. 253–8, 1994.

DHAKAL, D.; CHAUDHARY, A. K.; POKHREL, A. R.; JHA, A. K.; DARSANDHARI, S.; SHRESTHA, B.; SOHNG, J. K. Underpinning the secondary metabolites from *Nocardia* spp. **Biomolecule Reconstruction**, Basel, v. 10, n. 1, p. 9–17, 2013.

DHAKAL, D.; LIM, S. K.; KIM, D. H.; KIM, B. G.; YAMAGUCHI T.; SOHNG, J. K. Complete genome sequence of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952, the producer of anticancer anthracyclines and diverse secondary metabolites. **Journal of Biotechnology**, Timisoara, v. 267, p. 50–54, 2018.

DHUNGANA, S.; MICHALCZYK, R.; BOUKHALFA, H.; LACK, J. G.; KOPPISCH, A. T.; FAIRLEE, J. M.; JOHNSON, M. T.; RUGGIERO, C. E.; JOHN, S. G.; COX, M. M.; BROWDER, C. C.; FORSYTHE, J. H.; VANDERBERG, L. A.; NEU, M. P.; HERSMAN, L. E. Purification and characterization of rhodobactin: a mixed ligand siderophore from *Rhodococcus rhodochrous* strain OFS. **Biometals**, Dordecht, v. 20, p. 853–867, 2007.

DONAHUE, W. F.; EBLING, H. M. Fosmid Libraries for Genomic Structural Variation Detection. **Current Protocols in Human Genetics**, New York, v. 54, n. 1, p. 1–18, 2007.

DONG, G. Z.; JEONG, J. H.; LEE, Y.I.; LEE, S. Y.; ZHAO, H. Y.; JEON, R.; LEE, H. J.; RYU, J. H. Diarylheptanoids suppress proliferation of pancreatic cancer PANC-1 cells through modulating shh-Gli-FoxM1 pathway. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 40, n. 4, p. 509–517, 2017.

DUCKLOW, H. W.; FRASER, W. R.; MEREDITH, M. P.; STAMMERJOHN, S. E.; DONEY, S. C.; MARTINSON, D. G.; SAILLEY, S. F.; SCHOFIELD, O. M.; STEINBERG, D. K.; VENABLES, H. J.; AMSLER, C. D. West Antarctic Peninsula: an ice-dependent coastal marine ecosystem in transition. **Oceanography**, New York, v. 26, n. 3, p. 190-203, 2013.

DUNCAN, R. E.; EL-SOHEMY, A.; ARCHER, M. C. Mevalonate Promotes the Growth of Tumors Derived from Human Cancer Cells in Vivo and Stimulates Proliferation in Vitro with Enhanced Cyclin-dependent Kinase-2 Activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 32, p. 33079–33084, 2004.

EDGAR, R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, London, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDWARDS, A.; MUR, L. A. J.; GIRDWOOD, S. E.; ANESIO, A. M.; STIBAL, M.; RASSNER, S. M. E.; HELL, K.; PACHEBAT, J. A.; POST, B.; BUSSELL, J. S.; CAMERON, S. J. S.; GRIFFITH, G. W.; HODSON, A. J. SATTTLER, B. Coupled cryoconite ecosystem structure–function relationships are revealed by comparing bacterial communities in alpine and Arctic glaciers. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, p. 1-16, 2014.

EGAS-BEJAR, D.; HUH, W. W. Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives. **Adolescent Health, Medicine and Therapeutics**, New Zealand, v. 5, p. 115–25, 2014.

EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v. 7, n. 2, p. 62–71, 2016.

EKKERS, D. M.; CRETOIU, M. S.; KIELAK, A. M.; VAN ELSAS, J. D. The great screen anomaly-a new frontier in product discovery through functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n. 3, p. 1005–1020, 2012.

EL-NAGGAR, N. E. A.; DERAZ, S. F.; SOLIMAN, H. M.; EL-DEEB, N. M.; EL-EWASY, S. M. Purification, characterization, cytotoxicity and anticancer activities of L-asparaginase, anti-colon cancer protein, from the newly isolated alkaliphilic *Streptomyces fradiae* NEAE-82. **Scientific Reports**, New York, v. 6, n. August, p. 1–16, 2016.

ELSAYED, Y. REFAAT, J.; ABDELMOHSEN, U. R.; FOUAD, M. A. The Genus *Rhodococcus* as a source of novel bioactive substances: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New, Dheli, v. 6, n. 3, p. 83–92, 2017.

ELSAIED, Y.; REFAAT, J.; ABDELMOHSEN, U. R.; OTHMAN, E. M.; STOPPER, H.; FOUAD, M. A. Metabolomic profiling and biological investigation of the marine sponge - derived bacterium *Rhodococcus* sp . UA13. **Phytochemical Analysis**, Chichester, (10.1002/pca.2765), 2018.

EL-SOHEMY, A.; ARCHER, M. C. Inhibition of N -methyl- N -nitrosourea- and 7 , 12- dimethylbenz [a] anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by dietary cholesterol is independent of Ha- ras mutations. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 827–831, 2000.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet.** (1997) (Atualizado em: 05 de Junho, 2018). Disponível em: <<http://www.http://www.bacterio.net/>>. Acesso em: 10 out. 2017.

EWERT, M.; CARPENTER, S. D.; COLANGELO-LILLIS, J.; DEMING, J. W. Bacterial and extracellular polysaccharide content of brine-wetted snow over Arctic winter first-year sea ice. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, Hoboken, v. 118, p. 726-735, 2013.

FARIOLI, A.; LEGITTIMO, P.; MATTIOLI, S.; MILIGI, L.; BENVENUTI, A.; RANUCCI, A.; SALVAN, A.; RONDELLI, R.; CONTER, V.; MAGNANI, C. Tobacco smoke and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the SETIL case–control study. **Cancer Causes and Control**, Dordrecht, v. 25, n. 6, p. 683–692, 2014.

FELIX, A.; LEBLANC, T.; PETIT, A.; NELKEM, B.; BERTRAND, Y.; GANDEMER, V.; SIRVENT, A.; PAILLARD, C.; SCHMITT, C.; ROHRLICH, P. S.; FENNETEAU, O.; RAGU, C.; MICHEL, G.; AUVRIGNON, A.; BARUCHEL, A.; LEVERGER, G.; Acute myeloid leukemia with central nervous system involvement in children. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, Hagerstown, v. 40, n. 1, p. 43-47 2018.

FELSENSTEIN, Joseph. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of molecular evolution**, New York, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FERRÉS, I.; AMARELLE, V.; NOYA, F.; FABIANO, E. Construction and screening of a functional metagenomic library to identify novel enzymes produced by Antarctic bacteria. **Advances in Polar Science**, Beijing, v. 26, n. 1, p. 96–101, 2015.

FITCH, W. M Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology, **Systematic Zoology**, Seoul, v. 20, n. 4, p 406-416, 1971.

FOGG, G. E. The Royal Society and the Antarctic. **Notes and Records – The Royal Society of London**, London, v. 54, n. 1, p. 85–98, 2000.

FOOG, G. E. (1992). **A history in Antarctic Science.** In: Studies in Polar Researches. John Turner (Eds), pp. 309-310, v. 483, Cambridge University. FREDRICKSON, J. K.; ONSTOTT, T. C. Microbes deep inside the earth. **Scientific American**, New York, v. 275, n. 4, p. 68–73, 1996.

FREDRICKSON, J. K.; ONSTOTT, T. C. Microbes deep inside the earth. **Scientific American**, New York, v. 275, n. 4, p. 68–73, 1996.

FREEMAN, M. R.; SOLOMON, K. R. Cholesterol and Prostate Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 91, p. 54–69, 2004.

FREIRE, A. L.; ZAPATA, S.; MOSQUERA, J.; MEIJA, M. L.; TRUEBA, G. Bacteria associated with human saliva are major microbial components of Ecuadorian indigenous beers (*chicha*). **PeerJ**, Corte Madera, v. 4: e1962, n. 4, 2016.

FU, C. H.; SAKAMOTO, K. M. PEG-asparaginase. **Expert Opinion Pharmacother**, London, v. 8, n. 12, p. 1977–1984, 2007.

GABOR, E. M.; ALKEMA, W. B. L.; JANSSEN, D. B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 879–886, 2004.

GALLIMORE, W. (2017) **Pharmacognosy**. Badal, S.; Delgoda, r. (Eds). In: Marine Metabolites: Oceans of Opportunity (part IV), pp. 377-400, Amsterdam, Elsevier inc.

GAMO, F. J.; SANZ, L. M.; VIDAL, J.; COZAR, C.; ALVAREZ, E.; LAVANDERA, J. L.; VANDERWALL, D. E.; GREEN, D. V. S.; KUMAR, V.; HASAN, S.; BROWN, J. R.; PEISHOFF, C. E.; CARDON, L. R.; GARCIA-BUSTOS, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, New York, v. 465, n. 20, p. 305-310, 2010.

GAO, B.; PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 90, n. 1, p. 69–91, 2006.

GAO, X.; JIANG, Y.; HAN, L.; CHEN, X.; HU, C.; SU, H.; MU, Y.; GUAN, P.; HUANG, X. Effect of borrelidin on hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. **RSC Advances**, Cambridge, v. 7, p. 44401-44409, 2017.

GAVHANE, Y. N.; Shete, A. S.; Bhagat, A. K.; Shinde, V. R.; Bhong, K. K.; Khairnar, G. A.; Yadav, A. V. Solid Tumors : Facts, Challenges and Solutions. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, Jhansi, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2011.

GEWIRTZ, D. A. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 57, p. 727–741, 1999.

GIELWANOWSKA, I.; SZCZUKA, E. New ultrastructural features of organelles in leaf cells of *Deschampsia antarctica* Desv. **Polar Biology**, Berlin, v. 28, n. 12, p. 951–955, 2005.

GIELWANOWSKA, I.; SZCZUKA, E.; BEDNARA, J.; GÓRECKI, R. Anatomical features and ultrastructure of *Deschampsia antarctica* (Poaceae) leaves from different growing habitats. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n.1, p. 1109-1119, 2005.

GILICHINSKY, D. A.; VOROBYOVA, E. A.; EROKHINA, L. G.; FYORDOROV-DAYVDOV, D. G.; CHAIKOVSKAYA, N. R. Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. **Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 255-263, 1992.

GILQUIN, J. M.; RIVIERE, B.; JURADO, V.; AUDOUY, B.; KOUATCHE, J. B.; BERGERON, E.; OUNIÉE, D.; MOLINA, T.; FAURE, F.; SAIZ-JIMENEZ, C.; RODRÍGUEZ-NAVA, V. First Case of Actinomycetoma in France Due to a Novel Nocardia Species, *Nocardia boironii* sp. nov. **Clinical Science and Epidemiology**, Washington, v. 1, n. 6, p. 1–8, 2016.

GINOLHAC, A.; JARRIN, C.; GILLET, B.; ROBE, P.; PUJIC, P.; TUPHILE, K.; BERTRAND, H.; VOGEL, T. M.; PERRÈRE, G.; SIMONET, P.; NALIN, R. Phylogenetic Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil Metagenomic Libraries Allows Selection of Promising Clones. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 9, p. 5522–5527, 2004.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v. 11., n. 8: R86, 2010.

GOLDBACH-MANSKY, R.; WILSON, M.; FLELSCHMAN, R.; OLSEN, N.; SILVERFIELD, J.; KEMPF, P.; KIVITZ, A.; SHERRER, Y.; PUCINO, F.; CSAKO, G.; COSTELLO, R.; PHAM, T. H.; SNYDER, C.; HEIJDE, D. VAN DER; TAO, X.; WESLEY, R.; LIPSKY, P. E. Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F Versus Sulfasalazine in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 151, n. 4, p. 229–40, 2009.

GONEN, C.; CELIK, I.; CETINKAYA, Y. S.; HAZNEDAROGLU, I. Cytarabine-induced fever complicating the clinical course of leukemia. **Anti-Cancer Drugs**, London, v. 16, n. 1, p. 59–62, 2005.

GONZALEZ, J. M.; SAIZ-JIMENEZ, C. A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness between closely related microorganisms by thermal denaturation temperatures. **Extremophiles**, Berlin, v. 9, n. 1, p. 75–79, 2005.

GOODFELLOW, M. (2012) **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. In: Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K (Eds). Classe Actinocateria, v. 5, pp. 1-2. , 5th ed., New York, Springer.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: Informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 119–142, 2010.

GOODFELLOW, M.; KUMAR, Y.; LABEDA, D. P.; SEMBIRING, L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for streptomycetes with rugose ornamented spores. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 92, p. 173–199, 2007.

GOODFELLOW, M.; NOUIOUI, I.; SANDERSON, R.; XIE, F.; BULL, A. T. Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abundant in Atacama Desert soils Rare taxa and dark microbial matter: novel bioactive actinobacteria abundant in Atacama Desert soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, (10.1007/s10482-018-1088-7), 2018.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome research**, New York, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GROSSMANN, S.; DIECKMANN, G. S. Bacterial Standing Stock, Activity, And Carbon Production During Formation And Growth Of Sea-Ice In The Weddell Sea, Antarctica. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 8, p. 2746–2753, 1994.

HAGMAR, L.; BONASSI, S.; STROMBERG, U.; BREGGER, A.; KNUDSEN, L. E.; NORPPA, H.; REUTERWALL, C.; European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer: A Report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)¹. **Cancer Research**, Chicago, v. 58, p. 4117-4121, 1998.

HARA, S.; ISHIKAWA, N.; HARA, Y.; NEHIRA, T.; SAKAI, K.; GONOI, T.; ISHIBASHI, M. Nabscessins A and B, Aminocyclitol Derivatives from *Nocardia abscessus* IFM 10029. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 80, n. 2, p. 565–568, 2017.

HARA, Y.; ARAI, M. A.; SAKAI, K.; ISHIKAWA, N.; GONOI, T.; YAGUCHI, T.; ISHIBASHI, M. Dehydropropylpantothenamide isolated by a co - culture of *Nocardia tenerifensis* IFM - 10554 T in the presence of animal cells. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 72, n. 1, p. 280–289, 2018.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HAROWITZ, N. H.; CAMERON, R. E.; HUBBARD, J. S. Microbiology of the Dry Valleys of Antarctica. **Science**, New York, v. 176, p. 242-245, 1972.

HASEGAWA, T.; TAKIZAWA, M.; TANIDA, S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 29, n. 4, p. 319-322, 1983.

HAUBER, E.; SASSENROTH, C.; DE VERA, J. P.; SCHMITZ, N.; JAUMANN, R.; REISS, D.; HIESINGER, H.; JOHNSON, A. Debris flows and water tracks in northern Victoria Land, continental East Antarctica: a new terrestrial analogue site for gullies and recurrent slope lineae on Mars. **Geological Society London Special Publications**, Oxford, 2018.

HAYASE, H.; WATANABE, N.; LIM, C. L.; NOGAWA, T.; KOMATSUYA, K.; KITA, K.; OSADA, H. Inhibition of malaria parasite growth by quinomycin A and its derivatives through DNA-intercalating activity. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Abingdon, v. 79, n. 4, p. 633-635, 2015.

HERRMANN, H.; BLATT, K.; SHI, J.; GLEIXNER, K. V.; CERNY-REITERER, S.; MÜLLAUER, L.; VAKOC, C. R.; SPERR, W. R.; HORNY, H. P.; BRADNER, J. E.; ZUBER, J.; VALENT, P. Small-molecule inhibition of BRD4 as a new potent approach to eliminate leukemic stem- and progenitor cells in acute myeloid leukemia (AML). **Oncotarget**, New York, v. 3, n. 12, p. 1588–1599, 2012.

HESSE, W. Bemerkungen zur quantitativen Bestimmung der Mikroorganismen in der Luft. **Zeitschrift für Hygiene**, Berlin, v. 4, n. 1, p. 19–21, 1888.

HILL, P. W.; FARRAR, J.; ROBERTS, P.; FARRELL, M.; GRANT, H.; NEWSHAM, K. K.; HOPKINS, D. W.; BARDGETT, R. D.; JONES, D. L. Vascular plant success in a warming Antarctic may be due to efficient nitrogen acquisition. **Nature Climate Change**, London, v. 1, n. 1, p. 50–53, 2011.

HODSON, A.; ANESIO, A. M.; TRANTER, M.; FOUNTAIN, A.; OSBORN, M.; PRISCU, J.; LAYBOURN-PARRY, J.; SATTLER, B. Glacial Ecosystems. **Ecological Monographs**, Washington, v. 78, n. 1, p. 41-67, 2008.

HOFER, D.; SUTER, M.; BUCHMANN, N. Severe water deficit restricts biomass production of *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L. and causes foliar nitrogen but not carbohydrate limitation. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 421, n. 1–2, p. 367–380, 2017.

HOLLIBAUGH, J. T.; BANO, N.; DUCKLOW, H. W. Widespread Distribution in Polar Oceans of a 16S rRNA Gene Sequence with Affinity to Nitrospira-Like Ammonia-Oxidizing Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1478–1484, 2002.

HOPKINS, D. W.; SPARROW, A. D.; NOVIS, P. M.; GREGORICH, E. G.; ELBERLING, B.; GREENFIELD, L. G. Controls on the distribution of productivity and organic resources in Antarctic Dry Valley soils. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 273, p. 2687–2695, 2006.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, n. 4, p. 735–750, 1999

HOYOUX, A.; BLAISE, V.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; GRATIA, E.; HUSTON, A. L.; MARX, J. C.; SONAN, G.; ZENG, Y.; FELLER, G.; GERDAY, C. Extreme catalysts from low-temperature environments. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 98, n. 5, p. 317–330, 2004.

HU, G. P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z. G.; WU, J. H.; LAN, X. J.; ZHU, X.; LIN, Y. C.; CHEN, S. P. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, Basel, v. 9, p. 514-525, 2011.

HUGHES, K. A.; PERTIERRA, L. R.; MOLINA-MONTENEGRO, M. A.; CONVEY, P. Biological invasions in terrestrial Antarctica: what is the current status and can we respond? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 24, n. 5, p. 1031–1055, 2015.

IAKOVENKO, N. S.; SMYKLA, J.; CONVEY, P.; KASPAROVA, E.; KOZERETSKA, I. A.; TROKHMETTS, V.; DYKYY, I.; PLEWKA, M.; DEVETTER, M.; DURIS, Z.; JANKO, K. Antarctic bdelloid rotifers: diversity, endemism and evolution. **Hydrobiologia**, Den Hagg, v. 761, p. 5-43, 2015.

IGARASHI, Y.; MIURA, S. S.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Pterocidin, a Cytotoxic Compound from the Endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. **The Journal of the antibiotics**, Tokyo, v. 59, n. 3, p. 193–195, 2006.

IKEDA, H.; ISHIKAWA, J.; HANAMOTO, A.; SHINOSE, M.; KIKUCHI, H.; SHIBA, T.; SAKAKI, Y.; HATTORI, M.; OMURA, S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 5, p. 526–531, 2003.

INDEST, K. J.; EBERLY, J. O.; HANCOCK, D. E. Expression and characterization of an N - oxygenase from *Rhodococcus jostii* RHA1. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 61, p. 217–223, 2015.

IRVINE-FYNN, T. D. L.; EDWARDS, A.; NEWTON, S.; LANGFORD, H.; RASSNER, S. M.; TELLING, J.; ANESIO, A. M.; HODSON, A. J. Microbial cell budgets of an Arctic glacier surface quantified using flow cytometry. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 2998-3012, 2012.

ITO, M.; YAMAGATA, T. Purification and characterization of glycosphingolipid-specific endoglycosidases (endoglycoceramidas) from a mutant strain of *Rhodococcus* sp. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 16, p. 9510–9519, 1989.

IWATSUKI, M.; TOMODA, H.; UCHIDA, R.; GOUDA, H.; HIRONO, S.; OHMURA, S. Lariatins , Novel Anti-mycobacterial Peptides with a Lasso Structure , Produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 128, n. 1, p. 7486-7491, 2006.

JAMES, N.; SUTHERLAND, M. L. Are there living bacteria in permanently frozen subsoil? **Canadian Journal of Research**, Ottawa, v. 20, n. 4, p. 228-235, 1942.

JANSSON, J. K.; TAS, N. The microbial ecology of permafrost. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, p. 414–425, 2014.

JI, M.; VAN DORST, J.; BISSETT, A.; BROWN, M. V.; PALMER, A. S.; SNAPE, I.; SICILIANO, S. D.; FERRARI, B. C. Microbial diversity at Mitchell Peninsula, Eastern Antarctica: a potential biodiversity “hotspot”. **Polar Biology**, Berlin, v. 39, p. 237–249, 2015.

JIANG, C. I.; XU, L. H. Diversity of Aquatic Actinomycetes in Lakes of the Middle Plateau , Yunnan , China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 249–253, 1996.

JONES, A. L.; GOODFELLOW, M (2015). *Rhodococcus*. In: **Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. Springer Science, Berlin.

JUNG, D.; SEO, E. Y.; EPSTEIN, S. S.; JOUNG, Y.; HAN, J.; PARFENOVA, V. V.; BELYKH, O. I.; GLADKIKH, A. S.; AHNE, T. S. Application of a new cultivation technology, I-tip, for studying microbial diversity in freshwater sponges of Lake Baikal, Russia. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 90, n. 2, p. 417–423, 2014.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. **Science**, New York, v. 296, n. 5570, p. 1127–1129, 2002.

KAMPFER, P.; HUBER, B.; BUCZOLITS, S.; THUMMES, K.; GRUN-WOLLNY, I.; BUSSE, H.-J. *Nocardia acidivorans* sp. nov., isolated from soil of the island of Stromboli. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 57, p. 1183–1187, 2007.

KAMPFER, P.; WELLNER, S.; LOHSE, K.; LODDERS, N.; MARTIN, K. *Rhodococcus cerastii* sp. nov. and *Rhodococcus trifolii* sp. nov., two novel species isolated from leaf surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 63, p. 1024–1029, 2013.

KASHEFI, K.; LOVLEY, D. R. Extending the upper temperature limit for life. **Science**, New York, v. 301, n. 5635, p. 934, 2003.

KAVAMURA, V. N.; TAKETANI, R. G.; LANÇONI, M. D.; ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; MELO, I.S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.

KAWADA, M. Small molecules modulating tumor – stromal cell interactions: new candidates for anti-tumor drugs. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 69, n. 6, p. 411–414, 2016.

KAWADA, M.; ATSUMI, S.; WADA, S.; SAKAMOTO, S. Novel approaches for identification of anti-tumor drugs and new bioactive compounds. **Nature**, Basingstoke, v. 71, n. 1, p. 39–44, 2018.

KAWAMURA, Y.; LI, Y.; LIU, H.; HUANG, X.; LI, Z.; EZAKI, T. Bacterial Population in Russian Space Station " Mir ". **Microbiology. Immunology**, Richmond, v. 45, n. 12, p. 819–828, 2001.

KAWEDIA, J. D.; RYTTING, M. E. Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, New York, v. 14, n. September, p. S14–S17, 2014.

KEBUDI, R.; KOC, B. S.; GORGUN, O.; CELIK, A.; KEBUDI, A.; DARENDELILER, E. Breast metastases in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A large single-institution experience and literature review. **Journal of Pediatric ematology/Oncology**, New York, v. 39, n. 1, p. 67–71, 2017.

KELKAR, D. A.; CHATTOPADHYAY, A. The gramicidin ion channel: A model membrane protein. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1768, n. 9, p. 2011–2025, 2007.

KIM, J.; SHIN, D.; KIM, S. H.; PARK, W.; SHIN, Y.; KIM, W. K.; LEE, S. K.; OH, K. B.; SHIN, J.; OH, D. C. Borrelidins C–E: New Antibacterial Macrolides from a Saltern-Derived Halophilic *Nocardioopsis* sp. **Marine Drugs**, Basel, v. 15, n. 166, p. 1–11, 2017.

KIM, S.; KIM, Y. S.; SHIN, W. B.; PARK, J. S.; MOON, S. H.; JEON, B. T.; PARK, P. J. Induction of caspase-mediated apoptosis using *Alnus japonica* extracts in AGS human gastric carcinoma cells. **Journal of Applied Biomedicine journal**, Wroclaw, v. 173, p. 1–10, 2018.

KING, A. M.; REID-YU, S. A.; WANG, W.; KING, D. T.; PASCALE, G.; STRYNADKA, N. C.; WALSH, T. R.; COOMBES, B. K.; WRIGHT, G. D. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- β -lactamase antibiotic resistance. **Nature**, Amsterdam, n. 6, v. 510, 518, 2014.

KINGHORN, A. D.; DE BLANCO, E. J. C.; LUCAS, D. M.; RAKOTONDRAIBE, H. L.; ORJALA, J.; SOEJARTO, D. D.; OBERLIES, N. H.; PEARCE, C. J.; WANI, M. C.; STOCKWELL, B. R.; BURDETTE, J. E.; SWANSON, S. M.; FUCHS, J. R.; PHELPS, M. A.; XU, L.; ZHANG, X.; SHEN, Y. Y. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. **Anticancer Research**, London, v. 36, p. 5623-5638, 2016.

KITAGAWA, W.; TAMURA, T. A Quinoline Antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824. **The Journal of Antibiotics**, London, v. 61, n. 11, p. 680–682, 2008a.

KITAGAWA, W.; TAMURA, T. Three Types of Antibiotics Produced from *Rhodococcus erythropolis* Strains. **Microbes and Environments**, Tagajo, v. 23, n. 2, p. 167–171, 2008b.

KNIETSCH, A.; BOWIEN, S.; WHITED, G.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and Characterization of Coenzyme B₁₂-Dependent Glycerol Dehydratase- and Diol Dehydratase-Encoding Genes from Metagenomic DNA Libraries Derived from Enrichment Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3048–3060, 2003.

KOGURE, Y.; KATAOKA, K. Genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Cancer Science**, London, v. 108, n. 9, p. 1719–1725, 2017.

KOH, E. Y.; ATAMNA-ISMAEEL, N.; MARTIN, A.; COWIE, R. O. M.; BEJA, O.; DAVY, S. K.; MAAS, E. W.; RYAN, K. G. Proteorhodopsin-Bearing Bacteria in Antarctic Sea Ice. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 17, p. 5918—5925, 2010.

KOHLER, H.; CONTRERAS, R. A.; PIZARRO, M.; CORTÉS-ANTIQUERA, R.; ZUNIGA, G. E. Antioxidant responses induced by UVB radiation in *Deschampsia antarctica* Desv. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 921, 2017.

KOLANJIAPPAN, K.; RAMACHANDRAN, C. R.; MANOHARAN, S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. **Clinical Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 61–65, 2003.

KOO, H.; HAKIM, J. A.; MORROW, C. D.; EIPERS, P. G.; DAVILA, A.; ANDERSEN, D. T.; BEJ, A. K. Comparison of two bioinformatics tools used to characterize the microbial diversity and predictive functional attributes of microbial mats from Lake Obersee, Antarctica. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 140, n. 9, p. 15–22, 2017.

KOPTERIDES, P.; LIGNOS, M.; MENTZELOPOULOS, S.; ARMAGANIDIS, A.; PAPPA, V. Cytarabine-induced lung injury: Case report. **Anti-Cancer Drugs**, London, v. 16, n. 7, p. 743–745, 2005.

KUMAR, K.; KAUR, J.; WALIA, S.; PATHAK, T.; AGGARWAL, D. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (All). **Leukemia & Lymphoma**, London, v. 55, n. 2, p. 256–62, 2013.

KUMAR, R. R.; JADEJA, V. J. Endophytic Actinomycetes : A Novel Antibiotic Source. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 5, n. 8, p. 164–175, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K.. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUROSAWA, K.; GHIVIRIGA, I.; SAMBANDAN, T. G.; LESSARD, P. A.; BARBARA, J. E.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Rhodostreptomycins , Antibiotics Biosynthesized Following Horizontal Gene Transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. **Journal of the American Chemical Society**, New York, v. 130, n. 4, p. 1126–1127, 2008.

LA FERLA, B.; AIROLDI, C.; ZONA, C.; ORSATO, A.; CARDONA, F.; MERLO, S.; SIRONI, E.; D'ORAZIO, G.; NICOTRA, F. Natural glycoconjugates with antitumor activity. **Natural Products Report**, London, v. 28, n. 1, p. 630-648, 2011.

LAM, K. S.; HESLER, G. A.; MATTEI, J. M.; MAMBER, S. W.; FORENZA, S. Himastatin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 329, n. 109, p. 956–960, 1990.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley, 1991, p. 115-175.

LANGILLE, M. G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; THURBER, R. L. V.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, New York, v. 31, n. 9, p. 814, 2013.

LASKER, B. A.; BELL, M.; KLENK, H. P.; SCHUMANN, P.; BROWN, J. M. *Nocardia arizonensis* sp. nov ., obtained from human respiratory specimens. **Antonie van Leeuwenhoek**, Weinengein, v. 108, n. 5, p. 1129–1137, 2015.

LAURENT, F.; RODRIGUEZ-NAVA, V.; NOUSSAIR, L.; COUBLE, A.; NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BOIRON, P. *Nocardia ninae* sp. nov., isolated from a bronchial aspirate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v.57, p. 661–665, 2007.

LAVIN, P. L.; YONG, S. T.; WONG, C. M. V. L.; DE STEFANO, M. Isolation and characterization of Antarctic psychrotroph *Streptomyces* sp . strain INACH3013. **Antarctic Science**, Oxford, v. 10, p. 1-10, 2016.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 21, p. 71–100, 1967.

LEE, M.; NOH, E. K.; CHOI, H. S.; SHIN, S. C.; PARK, H.; LEE, H. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 325–333, 2006.

LEWIS, K. Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. **Nature**, London, v. 485, n. 7399, p. 439–440, 2012.

LI, J.; TIAN, X. P.; ZHU, T. J.; YANG, L. L.; LI, W. J. *Streptomyces fildesensis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from Antarctic soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, Weinengein, v. 100, n. 1, p. 537–543, 2011.

LI, S.; MING, H.; DUAN, Y. Y.; HUANG, J. R.; ZHAO, Z. L.; ZHANG, L. Y.; JI, W. L.; MENG, X. L.; LI, W. J.; NIE, G. X. *Nocardia tengchongensis* sp. nov., isolated from a soil sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, Weinengein v. 110, n. 9, p. 1149–1155, 2017.

LI, Y.; KAWAMURA, Y.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; LIU, .; HUANG, X.; KOBAYASHI, K.; EZAKI, T. *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, p. 827–835, 2004a

LI, W. J.; JIANG, Y.; KROPPESTEDT, R. M.; XU, L. H.; JIANG, C. L. *Nocardia alba* sp. nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 27, n. 3, p. 308–312, 2004b.

LI, W.; YANG, X.; YANG, Y.; QIN, S.; LI, Q.; ZHAO, L.; DING, Z. A new natural nucleotide and other antibacterial metabolites from an endophytic *Nocardia* sp. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 29, n. 2, p. 132–6, 2015.

LI, W.; YANG, X.; YANG, Y.; XU, L.; DING, Z. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 68, n. 15, p. 216–219, 2015.

LI, Y. C.; PARK, M. J.; YE, S. Elevated Levels of Cholesterol-Rich Lipid Rafts in Cancer Cells Are Correlated with Apoptosis Sensitivity Induced by Cholesterol-Depleting Agents. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 168, n. 4, p. 1107–1118, 2006.

LIMA, E. O.; GUERREIRO, T. M.; MELO, C. F. O. R.; OLIVEIRA, D. N.; MACHADO, D.; LANCELLOTI, M.; CATHARINO, R. R. MALDI imaging detects endogenous digoxin in glioblastoma cells infected by Zika virus - Would it be the oncolytic key? **Journal of Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 53, n. 3, p. 257–263, 2018.

LIU, N.; WANG, H.; LIU, M.; GU, Q.; ZHENG, W.; HUANG, Y. *Streptomyces alni* sp. nov., a daidzein-producing endophyte isolated from a root of *Alnus nepalensis* D. Don. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, p. 254–258, 2009.

LIU, X. CONG, J.; LU, H.; XUE, Y.; WANG, X.; LI, D.; ZHANG, Y. Community structure and elevational distribution pattern of soil Actinobacteria in alpine grasslands. **Acta Ecologica Sinica**, Amsterdam, v. 37, n. 4, p. 213–218, 2017.

LOPES, L. D.; CÁSSIA, M. DE; ANDREOTE, F. D. Bacterial Abilities and Adaptation Toward the Rhizosphere Colonization. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1–13, 2016.

LU, Y.; WANG, G. K.; LV, J.; ZHANG, G. S.; LIU, Q. F. Study on the Interaction of an Anthracycline Disaccharide with DNA by Spectroscopic Techniques and Molecular Modeling. **Journal of Fluorescence**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 409-414, 2011.

LUSCHER, A.; MUELLER-HARVEY, I.; SOUSSANA, J. F.; REES, R. M.; PEYRAUD, J. L. Potential of legume-based grassland – livestock systems in Europe: a review. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 206–228, 2014.

MA, X.; BUFFLER, P. A.; GUNIER, R. B.; DAHL, G.; SMITH, M. T.; REINIER, K.; REYNOLDS, P. Critical windows of exposure to household pesticides and risk of childhood leukemia. **Environmental Health Perspectives**, New York, v. 110, n. 9, p. 955–960, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1128 p.

MAGALHÃES, G. M.; OLIVEIRA, S. C. DE C.; SOARES, A. C. DE B.; MACHADO-PINTO, J.; RESENDE, M. A. DE. Tropical medicine rounds Mycetoma caused by *Nocardia caviae* in the first Brazilian patient. **The International Society of Dermatology**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 56–58, 2010.

MAISHI, N.; HIDA, K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. **Cancer Science**, London, v. 108, n. 10, p. 1921–1926, 2017.

MALDONADO, L.; HOOKEY, J. V.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, Weinengein, v. 78, p. 367–377, 2000.

MANUCHAROVAA, N. A.; TROSHEVAA, E. V.; KOLTSOVAA, E. M.; DEMKINAB, E. V.; KARAEVSKAYAC, E. V.; RIVKINAC, E. M.; MARDANOVD, A. V.; EL REGISTANB, G. I. Characterization of the Structure of the Prokaryotic Complex of Antarctic Permafrost by Molecular Genetic Techniques. **Microbiology**, Washington, v. 85, n.1, p. 102-108, 2016.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 3, p. 346–361, 2011.

MARTIN, B. J.; GOLEN, K. L. VAN. A Comparison of Cholesterol Uptake and Storage in Inflammatory and Noninflammatory Breast Cancer Cells. **International Journal of Breast Cancer**, Cairo, v. 2012, p. 1–10, 2012.

MARTÍNEZ-ROSALES, C.; FULLANA, N.; MUSTO, H.; CASTRO-SOWINSKI, S. Antarctic DNA moving forward: Genomic plasticity and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 331, n. 1, p. 1–9, 2012.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NESVERA, J.; KREN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environment International**, Elmsford, v. 35, n.1, p. 162–177, 2009.

MARX, J. C.; COLLINS, T.; D'AMICO, S.; FELLER, G.; GERDAYET, C. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. **Marine Biotechnology**, New York, v. 9, n. 3, p. 293–304, 2007.

MAUREL, J.; LÓPEZ-POUSA, A.; DE LAS PENÑAS, R.; FRA, J.; MARTÍN, J.; CRUZ, J.; CASADO A.; POVEDA, A.; MARTÍNEZ-TRUFERO, J.; BALANÁ, C.; GÓMEZ, M. A.; CUBEDO, R.; GALLEGO, O.; RUBIO-VIQUEIRA, B.; RUBIÓ, J.; ANDRÉS, R.; SEVILLA, I.; DE LA CRUZ, J. J.; DEL MURO, X. G.; BUESA, J. M. Efficacy of sequential high-dose doxorubicin and ifosfamide compared with standard-dose doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma: An open-label randomized phase II study of the Spanish group for research on sarcomas. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 27, n. 11, p. 1893–1898, 2009.

MCCARTHY, E. F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. **The Iowa Orthopaedic Journal**, Bethesda, v. 26, p. 154–8, 2006.

MCDONALD, D.; PRICE, M. N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E. P.; DESANTIS, T. Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G. L.; KNIGHT, R.; HUGENHOLTZ, P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME journal**, London, v. 6, n. 3, p. 610, 2012.

MCLEOD, M. P.; WARREN, R. L.; HSIAO, W. W. W.; ARAKI, N.; MYHRE, M.; FERNANDES, C.; MIYAZAWA, D.; WONG, W.; LILLQUIST, A. L.; WANG, D.; DOSANJH, M.; HARA, H.; PETRESCU, A.; MORIN, R. D.; YANG, G.; STOTT, J. M.; SCHEIN, J. E.; SHIN, H.; SMAILUS, D.; SIDDIQUI, A. S.; MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; HOLT, R.; BRINKMAN, F. S. L.; MIYAUCHI, K.; FUKUDA, M.; DAVIES, J. E.; MOHN, W. W.; ELTIS, L. D. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 42, p. 15582–15587, 2006.

MCCMAHON, M. D.; GUAN, C.; HANDELSMAN, J.; THOMAS, M. G. Metagenomic analysis of *Streptomyces lividans* reveals host-dependent functional expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 10, p. 3622–3629, 2012.

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

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GOKER, M.; SPROER, C.; KLENK, H.-P. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 195, n. 6, p. 413–418, 2013.

MENDES, LUCAS W; KURAMAE, EIKO E; NAVARRETE, ACÁCIO A; VEEN, JOHANNES A VAN; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, London, v. 8, n. 8, p. 1577–1587, 2014

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant-beneficial, plant-pathogenic and human-pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MIAO, V.; DAVIES, J. Actinobacteria: the good, the bad, and the ugly. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 2, p. 143–150, 2010.

MIAO, Z.; ALI, A.; HU, L.; ZHAO, F.; YIN, C.; CHEN, C.; YANG, T.; QIAN, A. Microtubule actin cross-linking factor 1, a novel potential target in cancer. **Cancer Science**, London, v. 108, n. 10, p. 1953–1958, 2017.

MICKOL, R. L.; TAKAGI, Y. A.; KRAL, T. A. Survival of non-psychrophilic methanogens exposed to martian diurnal and 48-h temperature cycles. **Planetary and Space Science**, Oxford, v. 157, p. 63-71, 2018.

MILNE, E.; GREENOP, K. R.; SCOTT, R. J.; BAILEY, H. D.; ATTIA, J.; DALLA-POZZA, L.; DE KLERK, N. H.; ARMSTRONG, B. K. Parental prenatal smoking and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **American Journal of Epidemiology**, Cary, v. 175, n. 1, p. 43–53, 2012.

MINNIKIN, D. E.; O'DONNELL, A. G.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; ATHALYE, M.; SCHAAL, A.; PARLETT, J. H. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 2, n. 5, p. 233-241, 1984.

MINNIKIN, D. E.; HUTCHINSON, I. G.; CALDICOT, A. B. Thin-layer chromatography of methanolysates of mycolic acid-containing bacteria. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p. 221-233, 1980.

MIRANDA-CASOLUENGO, R.; PRESCOTT, J. F.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; MEIJER, W. G. The Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi* Produces a Catecholate Siderophore Required for Saprophytic Growth. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 5, p. 1631–1637, 2008.

MOLINA-MONTENEGRO, M. A.; BALLESTEROS, G. I.; CASTRO-NALLAR, E.; MENESES, C.; TORRES-DÍAZ, C.; GALLARDO-CERDA, J. Metagenomic exploration of soils microbial communities associated to Antarctic vascular plants. **PeerJ**, San Francisco, v. 2, n.1, p. 1-20, 2018.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, London, Cary, v. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MONREAL, C. M. ZHANG, J.; KOZIEL, S.; VIDMAR, J.; GONZÁLEZ, M.; MATUS, F.; BAXI, S.; WU, S.; DEROSA, M.; ETCHEVERRIA, P. Bacterial community structure associated with the addition of nitrogen and the dynamics of soluble carbon in the rhizosphere of canola (*Brassica napus*) grown in a Podzol. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 5, n. 9 2017, p. 16–25, 2018.

MORITA, R. Y. Psychrophilic Bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 39, n. 2, p. 144–167, 1975.

MORRA, M. E.; KIEN, N. D.; ELMARAEZY, A.; ABDELAZIZ, O. A. M.; ELSAYED, A. L.; HALHOULI, O.; MONTASR, A. M.; VU, T. L.; HO, C.; FOLY, A. S.; PHI, A. P.; ABDULLAH, W. M.; MIKHAIL, M.; MILNE, E.; HIRAYAMA, K.; HUY, N. T. Early vaccination protects against childhood leukemia: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

MURAKAMI, S.; NOGUCHI, T.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Stress signaling in cancer. **Cancer Science**, London, v. 98, n. 10, p. 1521–1527, 2007.

NACHTIGALL, J.; SCHNEIDER, K.; NICHOLSON, G.; GOODFELLOW, M.; ZINECKER, H.; IMHOFF, J. F.; SUSSMUTH, R. D.; FIEDLER, H.-P. Two new aurachins from *Rhodococcus* sp. Acta 2259 *. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, n. 9, p. 567–569, 2010.

NAKATA, M.; SAITO, M.; INOUE, Y.; NAKAMURA, S. A new anthracycline antibiotic. Cinerubina R, taxonomy, structural elucidation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 45, n. 10, 1992.

NARAZAKI, H.; KAIZU, K.; MIYATAKE, C.; KOIZUMI, S.; ASANO, T.; FUJINO, O. Delayed-type Hypersensitivity in Response to L-asparaginase in a Case of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Nippon Medical School**, Tokyo, v. 79, n. 6, p. 489–493, 2012.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007.

NAVARRETE, A. A.; DINIZ, T. R.; BRAGA, L. P. P.; SILVA, G. G. Z.; FRANCHINI, J. C.; ROSSETTO, R.; EDWARDS, R. A.; TSAI, S. M. Multi-analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2015.

NAVARRETE, A. A.; KURAMAE, E. E.; HOLLANDER, M.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 607–621, 2013.

NCBI. Resouce Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, database, p. 7-19, 2016.

NGUYEN, L. V.; VANNER, R.; DIRKS, P.; EAVES, C. J. Cancer stem cells: an evolving concept. **Nature reviews cancer**, London, v. 12, n. 2, p. 133–143, 2012.

NICHOLS, D.; CAHOON, N.; TRAKHTENBERG, E. M.; PHAM, L.; MEHTA, A.; BELANGER, A.; KANIGAN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S. S. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable microbial species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p. 2445–2450, 2010.

NICHOLS, D.; K.; ORJALA, L. J.; MO, S.; ORTENBERG, R.; O'CONNOR, P.; ZHAO, C.; VOUIROS, P.; KAEBERLEIN, T.; EPSTEIN, S. S. Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p. 4889–4897, 2008.

NIEDERBERGER, THOMAS D; SOHM, JILL A; GUNDERSON, TROY E; PARKER, ALEXANDER E, TIRINDELLI, JOELLE; CAPONE, DOUGLAS G; CARPENTER, EDWARD J; CARY, S. C. Microbial community composition of transiently wetted Antarctic Dry Valley soils. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. January, p. 1–13, 2015.

OHSHIMA, H.; TATEMICH, M.; SAWA, T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 417, 3-11, 2003.

OHSHIMA, H.; TAZAWA, H.; SYLLA, B. S.; SAWA, T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 591, p. 110-122, 2005.

OJIMA, I.; DAS, M. Recent Advances in the Chemistry and Biology of New Generation Taxoids. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, n. 3, p. 554–565, 2010.

OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B.; NETO, E. D. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 26-33, 2004.

OKORO, C. K.; BROWN, R.; JONES, A. L.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 95, n. 2, p. 121–133, 2009.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. **Marine Drugs**, Basel, v. 7, p. 210-248, 2009.

OLAVE-CONCHA, N.; BRAVO, L. A.; RUIZ-LARA, S.; CORCUERAET, L. J. Differential accumulation of dehydrin-like proteins by abiotic stresses in *Deschampsia antarctica* Desv. **Polar Biology**, Berlin, v. 28, n. 7, p. 506–513, 2005.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 593–616, 2007.

ONO, H.; IWASAKI, M.; KUCHIBA, A.; KASUGA, Y.; YOKOYAMA, S.; ONUMA, H.; NISHIMURA, H.; KUSAMA, R.; OHNAMI, S.; SAKAMOTO, H.; YOSHIDA, T.; TSUGANE, S. Association of dietary and genetic factors related to one-carbon metabolism with global methylation level of leukocyte DNA. **Cancer Science**, London, v. 103, n. 12, p. 2159–2164, 2012.

OSAWA, A.; KASAHARA, A.; MASTUOKA, S.; GASSEL, S.; SANDMANN, G.; SHINDO, K. Isolation of a Novel Carotenoid, OH-chlorobactene Glucoside Hexadecanoate, and Related Rare Carotenoids from *Rhodococcus* sp. CIP and Their Antioxidative Activities. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Abingdon, v. 75, n. 11, p. 2142–2147, 2011.

PANG, S. K. Quantum-chemically-calculated mechanistically interpretable molecular descriptors for drug-action mechanism study – a case study of anthracycline anticancer antibiotics. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, n. 78, p. 74426-74435, 2016.

PARK, D. H.; KIM, J. S.; KNOW, S. W.; WILSON, C.; YU, Y. M.; HUR, J. H.; LIM. *Streptomyces luridiscabiei* sp. nov., *Streptomyces puniscabiei* sp. nov.; and *Streptomyces niveiscabiei* sp. nov., which cause potato common scab disease in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 53, n. 6, p. 2049-2054, 2003.

PARK, J. S.; AHN, I. Y.; LEE, E. J. Spatial Distribution Patterns of the Antarctic Hair Grass *Deschampsia antarctica* in Relation to Environmental Variables on Barton Peninsula, King George Island. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, Boulder, v. 45, n. 4, p. 563-574, 2013.

PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with standing in nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, New York, v. 60, n.1, p. 1825-1829, 2018.

PATHOM-AREE, W.; STACH, J. E. M.; WARD, A. C.; HORIKOSHI, K.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, Berlin, v. 10, n. 3, p. 181–189, 2006.

PAZIN, W. M.; SANTOS, S. N.; QUEIROZ, S. C. N.; SOARES, A. E. E.; ITO, A. S. In vitro studies of Brazilian propolis against a phytopathogen agent: analyzing bioactivity and mechanism of action in model membranes. **Revista Brasileira de Física Médica**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 2, p. 2–5, 2014.

PECK, L. S.; CONVEY, P.; BARNES, D. K. A. Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: Tempos, timings and predictability. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 81, n. 1, p. 75–109, 2006.

PEETERS, K.; ERTZ, D.; WILLEMS, A. Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, p. 360–367, 2011.

PERRON, G. G.; WHYTE, L.; TURNBAUGH, P. J.; GOORDIAL, J.; HANAGE, W. P.; DANTAS, G.; DESAI, M. M. Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 3, e0069533, 2015.

PETRI, R. J. A minor modification of the plating technique of Koch. **Milestones in Microbiology**: 1546-1940, p. 218–219, 1887.

PIAO, Z.; YANG, L.; ZHA, L.; YIN, S. Actinobacterial community structure in soils receiving long-term organic and inorganic amendments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 2, p. 526–530, 2008.

PIKUTA, E. V.; HOOVER, R. B.; TANG, J. Microbial extremophiles at the limits of life. **Critical Reviews in Microbiology**, Florida, v. 33, n. 3, p. 183–209, 2007.

PISANO, M. A.; SOMMER, M. J.; LOPEZ, M. M. Applied Microbiology Biotechnology Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, p. 285–288, 1986.

POLYANSKAYA, L. M.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKINA, G. A.; IVANUSHKINA, N. E.; GOLOVCHENKO, A. V.; ZVYAGINTSEV, D. G. The Abundance and Structure of the Root-Associated Microbial Complexes of Two Greenhouse Rose Cultivars. **Microbiology**, Moskva, v. 72, n. 4, p. 554–562, 2003.

PONDER, M. A.; GILMOUR, S. J.; BERGHOLZ, P. W.; MINDOCK, C. A.; HOLLINGSWORTH, R.; THOMASHOW, M. F.; TIEDJE, J. M. Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychrotolerant bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 103–115, 2005.

PRECIGOU, S.; GOULAS, P.; DURAN, R. Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 204, n. 1, p. 155–161, 2001.

PRENKERT, M.; UGGLA, B.; TINA, E.; TIDEFELT, U.; STRID, H. Rapid induction of P-glycoprotein mRNA and protein expression by cytarabine in HL-60 Cells. **Anticancer Research**, Attiki, v. 29, p. 4071-4076, 2009.

PRESTON, D. L.; PIERCE, D. A.; SHIMIZU, Y.; CULLINGS, H. M.; FUJITA, S.; FUNAMOTO, S.; KODAMAL, K. Effect of recent changes in atomic bomb survivor dosimetry on cancer mortality risk estimates. **Radiation research**, Bozeman, v. 162, n. 4, p. 377–89, 2004.

PUDASAINI, S.; WILSON, J.; JI, M.; VAN DORST, J.; SNAPE, I.; PALMER, A. S.; BURNS, B. P.; FERRARI, B. C. Microbial Diversity of Browning Peninsula, Eastern Antarctica Revealed Using Molecular and Cultivation Methods. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 591, 2017.

PULSCHEN, A. A.; BENDIA, A. G.; FRICKER, A. D.; PELLIZARI, V. H.; GALANTE, D.; RODRIGUES, F. Isolation of Uncultured Bacteria from Antarctica Using Long Incubation Periods and Low Nutritional Media. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 7, p. 1–12, 2017.

QIU, D.; KAO, P. N. Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Mechanisms of Triptolide, the Principal Active Diterpenoid from the Chinese Medicinal Herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. **Drugs in R&D**, Auckland, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2003.

RAHMAN, A. M.; YUSUF, S. W.; EWER, M. S. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 4, n. 1, p. 567-583, 2007.

RAMBABU, V.; SUBA, S.; VIJAYAKUMAR, S. Antimicrobial and antiproliferative prospective of kosinostatin — a secondary metabolite isolated from *Streptomyces* sp. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Xian, v. 5, n. 6, p. 378–382, 2015.

REBETS, Y.; KORMANEC, J.; LUTZHETSKYY, A.; BERNAERTS, K.; ANNÉ, J. (2017). In: STREIT, W. R.; DANIEL, R. (Eds). **Metagenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Cloning and Expression of Metagenomic DNA in *Streptomyces lividans* and Subsequent Fermentation for Optimized Production Metagenomics, v. 1539, pp. 99-144, Springer Science, New York.

REN, X.; HE, T.; CHANG, Y.; ZHAO, Y.; CHEN, X.; BAI, S.; WANG, L.; SHEN, M.; SHE, G. The Genus *Alnus*, A Comprehensive Outline of Its Chemical Constituents and Biological Activities. **Molecules**, Basel, v. 21, 22, n. 8, 2017.

RIVKINA, E. M.; FRIEDMANN, E. I.; MCKAY, C. P. Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3230–3233, 2000.

RIVKINA, E.; LAURINAVICHIOUS, E.; MCGRATH, J.; TIEDJE, J.; SHCHERBAKOVA, V.; GILICHINSKY, D. Microbial life in permafrost. **Advances in Space Research**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 1215–1221, 2004.

ROBINSON, S.; WASLEY, J.; TOBIN, A. K. Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. **Global Change Biology**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 1681–1717, 2003.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; PEREIRA, A. B.; PEREIRA, C. K.; LEMOS, L. L.; BARBOSA, A. D.; SULEIMAN, A. K. A.; GERBER, AL. L.; PEREIRA, M. G.; LOSS, A.; COSTA, E. M. Soil bacterial community abundance and diversity in ice-free areas of Keller Peninsula, Antarctica. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, n. 12, p. 7–15, 2012.

ROLSTON, K. V. I. Infections in Cancer Patients with Solid Tumors: A Review. **Infectious Diseases and Therapy**, Los Angeles, v. 6, n. 1, p. 69–83, 2017.

RON, E.; PRESTON, D. L.; MABUCHI, K.; THOMPSON, D. E.; SODA, M. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part IV: Comparison of cancer incidence and mortality. **Radiation research**, Bozeman, v. 137, n. 2, p. 98-112, 1994.

RONG, X.; HUANG, Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA – DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 35, n. 1, p. 7–18, 2012.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, Berlin, v. 32, n. 2, p. 161–167, 2009.

ROSS, M. G.; RUSS, C.; COSTELLO, M.; HOLLINGER, A.; LENNON, N. J.; HEGARTY, R.; NUSBAUM, C.; JAFFE, D. B. Characterizing and measuring bias in sequence data. **Genome Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 1–20, 2013.

ROSSMANN, M.; SARANGO-FLORES, S. W.; CHIARAMONTE, J. B.; KMIT, M. C. P.; MENDES, R. (2017) Plant microbiome: Composition and functions in plant compartments. In: PYLRO, V. ROESCH, L. (Eds) *The Brazilian Microbiome*, p. 7-20, Springer Cham.

RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 13, p. 1-15, 2015.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANDOVAL, C.; KATZ, B.; STRINGEL, G.; JAYABOSE, S.; LEOVICS, E. Cholelithiasis and choledocholithiasis after sequential cytarabine and asparaginase. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, Hagerstown, v. 25, n. 8, p. 637–639, 2003.

SANGAL, V.; GOODFELLOW, M.; JONES, A. L.; SCHWALBE, E. C.; BLOM, J.; HOSKISSON, P. A.; SUTCLIFFE, I. C. Next-generation systematics: An innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. **Scientific Reports**, London, v. 6, 38392, 2016.

SANTAMANS, A. C.; BOLUDA, R.; PICAZO, A.; GIL, C.; RAMOS-MIRAS, J.; TEJEDO, P.; PERTIERRA, L. R.; BENAYAS, J.; CAMACHO, A. Soil features in rookeries of Antarctic penguins reveal sea to land biotransport of chemical pollutants. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 16, 12, n. 8, p. 1–26, 2017.

SANTOS, S. N.; MELO, I. S. A rapid primary screening method for antitumor using the oomycete *Pythium aphanidermatum*. **Natural Products Chemistry and Research**, Los Angeles, v. 4. n. 6, p. 1-4, 2016.

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. **Microbial ID**, n. 2, p. 1–6, 1990.

SATI, S. C.; SATI, N.; SATI, O. P. Bioactive constituents and medicinal importance of genus *Alnus*. **Pharmacognosy Review**, Mumbai, v. 5, n. 10, p. 174–183, 2011.

SCALLY, S. Z.; MAKHALANYANE, T. P.; FROSSARD, A.; HOGG, I.D.; COWAN, D. A. Soil Biology and Biochemistry Antarctic microbial communities are functionally redundant , adapted and resistant to short term temperature perturbations. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 103, p. 160–170, 2016.

SHAUL, P.; FRENKEL, M.; GOLDSTEIN, E. B.; MITTELMAN, L.; GRUNWALD, A.; EBENSTEIN, Y.; TSARFATY, I.; FRIDMAN, M. The structure of anthracycline derivatives determines their subcellular localization and cytotoxic activity. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Washington, v. 4, n. 1, p. 323-328, 2013.

SHI, T.; REEVES, R. H.; GILICHINSKY, D. A.; FRIEDMANN, E. I. Characterization of Viable Bacteria from Siberian Permafrost by 16S rDNA Sequencing. **Microbial Ecology**, Luhe, v. 33, p. 169-179, 1997.

SHIVAJI, S; REDDY, G S N; CHATTOPADHYAY, M. K. Bacterial Biodiversity , Cold Adaptation and Biotechnological Importance of Bacteria Occurring in Antarctica. **India National Science Academy**, New Dheli, v. 83, n. 2, p. 327–352, 2017.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Review Cancer**, New York, v. 6, n. 1, p. 813-823, 2006.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; KHURSHID, M.; KALAM, M. A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 100, p. 1–10, 2015.

SHTARKMAN, Y. M.; KOCER, Z. A.; EDGAR, R.; VEERAPANENI, R. S.; D'ELIA, T.; MORRIS, P. F.; ROGERS, S. O. Subglacial Lake Vostok (Antarctica) Accretion Ice Contains a Diverse Set of Sequences from Aquatic, Marine and Sediment-Inhabiting Bacteria and Eukarya. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-13 (e67221), 2013.

SIDHU, A.; MILLER, J. R.; TRIPATHI, A.; GARSHOTT, D. M.; BROWNELL, A. L.; CHIEGO, D. J.; AREVANG, C.; ZENG, Q.; JACKSON, L. C.; BECHLER, S. A.; CALLAGHAN, M. U.; YOO, G. H.; SETHI, S.; LIN, H. S.; CALLAGHAN, J. H.; TAMAYO-CASTILLO, G.; SHERMAN, D. H.; KAUFMAN, R, J.; FRIBLEY, A. M. Borrelidin Induces the Unfolded Protein Response in Oral Cancer Cells and Chop-Dependent Apoptosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Washington, v. 6, n. 11, p. 1122-1127, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: Cancer Journal for clinicians**, Hobboken, v. 68, n. 1, p. 1–24, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: Cancer Journal for clinicians**, Hobboken, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SIEGERT, M. J.; ROSS, N.; LE BROCCQ, A. M. Recent advances in understanding Antarctic subglacial lakes and hydrology. **Philosophical Transactions A**, London, v. 374, p. 1-12, 2016.

SILVA, L. J. .; CREVELIN, E. J.; SOUZA, W. R.; MORAES, L. A. B.; MELO, I. S.; ZUCCHI, T. D. *Streptomyces araujoniae* Produces a Multiantibiotic Complex with Ionophoric Properties to Control *Botrytis cinerea*. **Phytopathology.**, S^l. Paul, v. 104, n. 12, p. 1298–1305, 2014.

SILVA, L. J.; SOUZA, D. T.; GENUARIO, D. B.; HOYOS, H. A. V.; SANTOS, S. N.; ROSA, L. H.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. *Rhodococcus psychrotolerans* sp . nov ., isolated from rhizosphere of *Deschampsia antarctica*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 111, n. 4, p. 629–636, 2018.

SIMAS, F. N. B.; SCHAEFER, C. E. G. R.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R.; FRANCELINO, M. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; DA COSTA, L. M. Genesis , properties and classification of Cryosols from Admiralty Bay , maritime Antarctica. **Geoderma**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 116–122, 2008.

SINGH, P.; SINGH, S. M.; DHAKEPHALKAR, P. Diversity, cold active enzymes and adaptation strategies of bacteria inhabiting glacier cryoconite holes of High Arctic. **Extremophiles**, Berlin, v. 18, p. 229-242, 2014.

SKIDMORE, M.; ANDERSON, S. P.; SHARP, M.; FOGHT, J.; LANOIL, B.D. Comparison of Microbial Community Compositions of Two Subglacial Environments Reveals a Possible Role for Microbes in Chemical Weathering Processes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 6986–6997, 2005.

SMYKLA, J.; PORAZINSKA, D. L.; IAKOVENKO, N. S.; DEVETTER, M.; DREWNIK, M.; HIL, Y. S.; EMSLIE, S. D. Geochemical and biotic factors influencing the diversity and distribution of soil microfauna across ice-free coastal habitats in Victoria Land, Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 116, n. November 2017, v. 116, p. 265–276, 2018.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

SONG, P.; YE, L.; FAN, J.; LI, Y.; ZENG, X.; WANG, Z.; WANG, S.; ZHANG, G.; YANG, P.; CAO, Z.; JU, D. Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, New York, v. 6, n. 6, p. 3861–3873, 2015.

SOUZA, D. T.; SILVA, F. S. P.; SILVA, L. J.; CREVELIN, E. J.; MORAES, L. A. B.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. *Saccharopolyspora spongiae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the marine sponge *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 67, n. 6, p. 2019-2025, 2017.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actino bacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 47, n. 2, p. 479–491, 1997.

STANECK, J. L.; ROBERTS, G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, n. 2, p. 226-231, 1974.

STEINHEIDER, G.; SCHAEFER, A.; WESTENDORF, J.; MARQUARDT, H. Induction of erythroid differentiation by the abtracycline antitumor antibiotic pyrromycin. **Cell Biology and Toxicology**, vol. 4, n. 1, 1988.

STEVEN, B.; LÉVEILLÉ, R. POLLARD, W. H.; WHYTE, L. G. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. **Extremophiles**, Berlin, v. 10, n. 4, p. 259–267, 2006.

STEWART, B. W.; WILD, C. W. World cancer report. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, v. 13, p. 16-52, 2014.

STIBAL, M.; SABACKÁ, M.; KASTOVSKA, K. Microbial Communities on Glacier Surfaces in Svalbard: Impact of Physical and Chemical Properties on Abundance and Structure of Cyanobacteria and Algae. **Microbial Ecology**, Amsterdam, v. 52, 644-654, 2006.

STIBAL, M.; SABACKÁ, M.; ZÁRSKY, J. Biological processes on glacier and ice sheet surfaces. **Nature Geoscience**, New York, v. 5, p. 771-774, 2012.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SUAR, M.; VAN DER MEER, J. R.; LAWLOR, K.; HOLLIGER, C.; LAL, R. Dynamics of multiple lin gene expression in *Sphingomonas paucimobilis* B90A in response to different hexachlorocyclohexane isomers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6650–6656, 2004.

SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, n. 9, p. 2289–2297, 2007.

SUN, L.; SIMMERLING, C.; OJIMA, I. Recent Advances in the Study of the Bioactive Conformation of Taxol. **ChemMedChem**, Hoboken, v. 4, n. 5, p. 719–731, 2009.

SUTER, M.; CONNOLLY, J. A.; LOGES, R.; KIRWAN, L.; SEBASTIÀ, M. T. LUSCHER, A. Nitrogen yield advantage from grass-legume mixtures is robust over a wide range of legume proportions and environmental conditions. **Global Change Biology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 2424–2438, 2015.

TANASUPAWAT, S.; PHONGSOPITANUN, W.; SUWANBORIRUX, K.; OHKUMA, M.; KUDO, T. *Nocardia rayongensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 66, n. 5, p. 1950–1955, 2016.

TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S. C.; WEN, Z.; QIAN, X.; LI, Y.; BAO, Y.; SHIN, J.; ZHANG, F.; LEE, E. M.; CHRISTIAN, K. M.; DIDIER, R. A.; JIN, P.; SONG, H.; MING, G. L. Zika virus infect human cortical neural precursors and attenuates their growth. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; CURY, J. C.; SUL, W. J.; PELLIZARI, V. H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **The ISME Journal**, London, v. 4, n. 8, p. 989–1001, 2010.

TERAUDS, A.; CHOWN, S. L.; MORGAN, F.; PEAT, H. J.; WATTS, D. J.; KEYS, H.; CONVEY, P.; BERGSTROM, D. M. Conservation biogeography of the Antarctic. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 726-741, 2012.

THOMAS, E. R.; VAN WESSEM, J. M.; ROBERTS, J.; ISAKSSON, E.; SCHLOSSER, E.; FUDGE, T. J.; VALLELONGA, P.; MEDLEY, B.; LENAERTS, J.; BERTLER, N.; VAN DEN BROEKE, M. R.; DIXON, D. A.; FREZZOTTI, M.; STENNI, B.; CURRAN, M.; EKAYKIN, A. A. Regional Antarctic snow accumulation over the past 1000 years. **Climate of the Past**, Munich, v. 13, n. 11, p. 1491–1513, 2017.

TISCHLER, D.; EULBERG, D.; LAKNER, S.; KASCHABEK, S. R.; VAN BERKEL, W. J. H.; SCHLOMANN, M. Identification of a Novel Self-Sufficient Styrene Monooxygenase from *Rhodococcus opacus* 1CP. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 15, p. 4996–5009, 2009.

TIWARI, R.; NAIN, L.; LABROU, N. E.; SHUKLA, P. Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, Florida, v. 44, n. 2, p. 244–257, 2017.

TOKUNAGA, E.; HISAMATSU, Y.; TANAKA, K.; YAMASHITA, N.; SAEKI, H.; OKI, E.; KITAO, H.; MAEHARA, Y. Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer. **Cancer Science**, London v. 105, n. 11, p. 1377–1383, 2014.

TORRES-DÍAZ, C.; GALLARDO-CERDA, J.; LAVIN, P.; OSES, R.; CARRASCO-URRA, F.; ATALA, C.; ACUNÁ-RODRÍGUEZ, I. S.; CONVEY, P.; MOLINA-MONTENEGRO, M. A. Biological Interactions and Simulated Climate Change Modulates the Ecophysiological Performance of *Colobanthus quitensis* in the Antarctic Ecosystem. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 10, 2016.

TRIPATHI, V. C.; SATISH, S.; HORAM, S.; RAJ, S.; LAL, A.; AROCKIARAJ, J.; PASUPULETI, M.; DIKSHIT, D. K. Natural products from polar organisms: Structural diversity, bioactivities and potential pharmaceutical applications. **Polar Science**, Berlin, n. April, p. 0–1, 2018.

UEKI, N.; WANG, W.; SWENSON, C.; MCNAUGHTON, C.; SAMPSON, N. S.; HAYMAN, M. J. Synthesis and preclinical evaluation of a highly improved anticancer produg activated by histone deacetylases and cathepsin L. **Theranostics**, Wyoming, v. 6, n. 6, p. 808–816, 2016.

UPSON, R.; NEWSHAM, K. K. READ, D. J. Root-Fungal Associations of *Colobanthus Quitensis* and *Deschampsia Antarctica* in the Maritime and Subantarctic. **Arctic, Antarctic, and Alpine Research**, Boulder, v. 40, n. 3, p. 592–599, 2008.

UPSON, R.; READ, D. J.; NEWSHAM, K. K. Nitrogen form influences the response of *Deschampsia antarctica* to dark septate root endophytes. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2009.

VAN DEN BURG, B. Extremophiles as a source for novel enzymes. **Ecology and industrial microbiology**, Berlin, v. 6, p. 213–218, 2003.

VAN DER WERF, M. J.; OVERKAMP, K. M.; BONT, J. A. Limonene-1,2-Epoxyde Hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 Belongs to a Novel Class of Epoxyde Hydrolases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 19, p. 5052–5057, 1998.

VAN DORST, J.; BISSETT, A.; PALMER, A. S.; BROWN, M.; SNAPE, I.; STARK, J. S.; RAYMOND, B.; MCKINLAY, J.; JI, M.; WINSLEY, T.; FERRARI, B. C. Community fingerprinting in a sequencing world. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 316–330, 2014.

VAN EPPS, H. L. René Dubos: unearthing antibiotics. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 203, n. 2, p. 259–259, 2006.

VAN HEEL, A. J.; JONG, A.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; KOK, J.; KUIPERS, O. P. BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and non-bactericidal posttranslationally modified peptides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, n. Web Server, p. 448–453, 2013.

VARTOUKIAN, S. R.; PALMER, R. M.; WADE, W. G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VERA, M. L.; FERNÁNDEZ-TERUEL, T.; QUESADA, A. Distribution and reproductive capacity of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* on Byers Peninsula, Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. **Antarctic Science**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 292–302, 2013.

VERMA, N.; KUMAR, K.; KAURET, G. *E. coli* K-12 asparaginase-based asparagine biosensor for leukemia. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, Abington, v. 35, n. 4, p. 449–456, 2007.

VESTER, J. K.; GLARING, M. A.; STOUGAARD, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. **Extremophiles**, Berlin, v. 19, n. 1, p. 17–29, 2015.

VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. **Current Cardiology Reviews**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. 214–220, 2011.

VON MEHREN, M.; RANDALL, R. L.; BENJAMIN, R. S.; BOLES, S.; BUI, M. M.; CASPER, E. S.; CONRAD III, E. U.; DELANEY, T. F.; GANJOO, K. N.; GEORGE, S.; GONZALEZ R. J.; HESLIN, M. J.; KANE III, M.; MAYERSON, J.; MCGARRY, S. V.; MEYER, C.; O'DONNELL, R. J.; PAPPO, A. S.; PAZ, B.; PFEIFER, J. D.; RIEDEL, R. F.; SCHUETZE, S.; SCHUPAK, K. D.; SCHWARTZ, H. S.; VAN TINE, B. A.; WAYNE, J. D.; BERGMAN, M. A.; SUNDAR, H. Gastrointestinal Stromal Tumors, Version 2.2014. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, New York, v. 14, n. 3, 2014.

VONAESCH, P.; ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J. Pathogens, microbiome and the host: emergence of the ecological Koch's postulates. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, (<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy003>), 2018.

VONGPHOUMY, I.; DANCE, D. A. B.; DITTRICH, S.; LOGAN, J.; DAVONG, V.; RATTANAVONG, S.; BLESSMANN, J. Case Report: Actinomycetoma Caused by *Nocardia aobensis* from Lao PDR with Favourable Outcome after Short-Term Antibiotic Treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2015.

VOROBYOVA, E.; SOINA, V.; GORLENKO, M.; MINKOVSKAYA, N.; ZALINOVA, N.; MAMUKELASHVILI, A.; GILICHINSKY, D.; RIVKINA, E.; VISHNIVETSKAYA, T. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 20, p. 277-290, 1997.

WAKABAYASHI, T.; KAGEYAMA, R.; NARUSE, N.; TSUKAHARA, N.; FUNAHASHI, Y.; KITO, K.; WATANABE, Y. Borrelidin is an Angiogenesis Inhibitor; Disruption of Angiogenic Capillary Vessels in a Rat Aorta Matrix Culture Model. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 50, n. 8, p. 671-676, 1997.

WANG, D. S.; XUE, Q. H.; MA, Y. Y.; WEI, X. L.; CHEN, J.; HE, F. Oligotrophy is helpful for the isolation of bioactive Actinomycets. **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 54, n. 2, p. 178-184, 2014.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WARD, E.; DESANTIS, C.; ROBBINS, A.; KOHLER, B.; JEMAL, A. Childhood and Adolescent Cancer Statistics, 2014. **CA: Cancer Journal for clinicians**, Hoboken, v. 64, n. 2, p. 83–103, 2014.

WARREN, L.; FREEMAN, J. D.; LEVESQUE, R. C.; SMAILUS, D. E.; FLIBOTTE, S.; HOLT, R. A. Transcription of foreign DNA in *Escherichia coli*. **Genome Research**, New York, v. 18, n. 604, p. 1798–1805, 2008.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRUPER, H. G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 37, n. 4, p. 463–464, 1987.

WELLS, L. E.; DEMING, J. W. Abundance of bacteria, the Cytophaga-Flavobacterium cluster and Archaea in cold oligotrophic waters and nepheloid layers of the Northwest Passage, Canadian archipelago. **Aquatic Microbial Ecology**, Luhe, v. 31, n. 1, p. 19–31, 2003.

WEN, P.; KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 359, p. 492–507, 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, London, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally Amplifiable BACs: Switching From Single-Copy to High-Copy Vectors and Genomic Clones. **Genome Research**, New York, v. 12, n. 9, p. 1434–1444, 2002.

WILKINS, D.; YAU, S.; WILLIAMS, T. J.; ALLEN, M. A.; BROWN, M. V.; DEMAERE, M. Z.; LAURO, F. M.; CAVICCHIOLI, R. Key microbial drivers in Antarctic aquatic environments. **Blackwell**, Hoboken, v. 37, n. 5, p. 303–335, 2012.

WLOSTOWSKI, A. N.; GOOSEFF, M. N.; ADAMS, B. J. Soil Moisture Controls the Thermal Habitat of Active Layer Soils in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, Washington, v. 123, n. 1, p. 46–59, 2018.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221–71, 1987.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

XIONG, Z. Q. Bioprospecting of Uncultured Microorganisms: The Dawning of Antibiotic Discovery. **Clinical Microbiology**, New York, v. 05, n. 01, p. 13–14, 2016.

YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; NAKAGAWA, Y.; TAMURA, Y.; KOHNO, T.; KOMATSU, F.; LIMURA, Y. *Nocardia takedensis* sp. nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 55, p. 433–436, 2005.

YELLAMANDA, B.; VIJAYALAKSHMI, M.; KAVITHA, A. Extraction and bioactive profile of the compounds produced by *Rhodococcus* sp. VLD-10. **3 Biotech**, Berlin, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2016.

YOON, S. H. HA, S. M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

ZAHAREVITZ, D. W.; HOLBECK, S. L.; BOWERMAN, C.; SVETLIK, P. A. COMPARE: a web accessible tool for investigating mechanisms of cell growth inhibition. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 20, n.1, p. 297–303, 2002.

ZARRAONAINDIA, I.; OWENS, S. M.; WEISENHORN, P.; WEST, K.; HAMPTON-MARCELL, J.; LAX, S. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiote. **mBio**, Washington, v. 6, n. e2527-14, 2015.

ZAVARZIN, G. A. Winogradsky and modern microbiology. **Microbiology**, London, v. 75, n. 5, p. 501–511, 2006.

ZENATTI, P. P.; MIGITA, N. A.; CURY, N. M.; MENDES-SILVA, R. A.; GOZZO, F. C.; CAMPOS-LIMA, P. O.; YUNES, J. A.; BRANDALISE, S. R. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, Amsterdam, v. 30, p. 158–166, 2018.

ZER, A. PRINCE, R. M.; AMIR, E.; RAZAK, A. R. A. Multi-agent chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma (STS) – A systematic review and meta-analysis. **Cancer Treatment Reviews**, Amsterdam, v. 63, p. 71–78, 2018.

ZHANG, X.; LIU, Z. Y.; LIU, J. W.; ZENG, Y. L.; GUO, G. J.; SUN, Q. Y. Antitumor activity of a *Rhodococcus* sp. Lut0910 isolated from polluted soil. **Tumour Biology**, Tokyo, v. 39, n. 6, p. 1–9, 2017.

ZHENG, J. H.; NGUYEN, V. H.; JIANG, S. N.; PARK, S. H.; TAN, W.; HONG, S. H.; SHIN, M. G.; CHUNG, I. J.; HONG, Y.; BOM, H. S.; CHOY, H. E.; LEE, S. E.; RHEE, J. H.; MIN, J. J. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 9, n. 376, p. 1–11, 2017.

ZHI X. Y.; LI W. J.; STACKEBRANDT, E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, p. 589–608, 2009.

ZHOU, Y. Y.; XIA, X.; PENG, W. K.; WANG, Q. H.; PENG, J. H.; LI, Y. L.; WU, J. X.; ZHANG, J. Y.; ZHAO, Y.; CHEN, X.M.; HUANG, R. Y.; JAKOBSSON, P. J.; WEN, Z. H.; HUANG, Q. C. The Effectiveness and Safety of Extracts in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, n. April, p. 1–10, 2018a.

ZHOU, Y. Z.; ZHAO, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; WANG, D. F.; HUANG, L. F.; LV, Q. W.; LIU, B.; LI, Z.; WEI, W.; LI, H.; LIAO, X.; LIU, H.; LIU, X.; JIN, H.; WANG, J.; FEI, Y. Y.; WU, Q. J.; ZHANG, W.; SHI, Q.; ZHENG, W. J.; ZHANG, F.; TANG, F. J.; LIPSKY, P. E.; ZHANG, X. Comparison of the impact of *Tripterygium wilfordii* Hook F and Methotrexate treatment on radiological progression in active rheumatoid arthritis: 2-year follow up of a randomized, non-blinded, controlled study. **Arthritis Research & Therapy**, London, v. 20, n. 70, p. 2-12, 2018b.

ZHU, R.; SHI, Y.; MA, D.; WANG, C.; XU, H.; CHU, H. Bacterial diversity is strongly associated with historical penguin activity in an Antarctic lake sediment profile. **Nature**, New York, n. 11, p. 1–13, 2015.

ZIJLSTRA, E. E.; VAN DE SANDE, W. W. J.; WELSH, O.; MAHGOUB, E. S.; GOODFELLOW, M.; FAHAL, A. H. Mycetoma: a unique neglected tropical disease. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 1, p. 100–112, 2016.

ZOPF, W. Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 9 p. 22-28, 1981.

ZUO, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; UM, W. Recent research progress on microbial L-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, n. 3, p. 1069–1079, 2014.

ANEXOS

Anexo A: Meios de Cultivo

Glicose Extrato de Levedura Ágar (GYEA)

Extrato de levedura	10 g
Glicose	10 g
Agar	16 g
Água Destilada	1000 mL

Caldo Extrato de Levedura (GYE)

Extrato de Levedura	10 g
Glicose	10 g
Água Destilada	1000 mL

Amido Caseína Ágar (ACA)

Amido de milho	10 g
Caseína	0,3 g
Sulfato de Ferro II	0,01 g
Sulfato de Magnésio	0,05 g
Fosfato de Potássio Bibásico	2 g
Cloreto de Sódio	1000 mL
Água Destilada	16 g
Agar	16 g

Extrato de Carne Triptona Agar (PMBA)

Extrato de Carne	1 g
Triptona	2 g
Glicose	10 g
Carbonato de Cálcio	0,1 g
Extrato de Levedura	2 g
Agar	16 g
Água Destilada	1000 mL
* * Solução de Sais	0,1 mL
* * Para 50 mL de água destilada: Sulfato de ferro II (0,05 g); Cloreto de Manganês (0,05 g); Sulfato de Zinco (0,05 g)	

Extrato de Solo Ágar (ESA)

Agar	15 g
* Solução de Solo	1000 mL
* Solubilizar 200 g de solo em 1000 mL de água destilada e ferver por 5 minutos. Recolher o sobrenadante.	

International Streptomyces Project - ISP2

Extrato de Levedura	4 g
Extrato de Malte	10 g
Dextrose	4 g
Agar	20 g
Água Destilada	1000 mL
pH	7.3

International Streptomyces Project - ISP3

* Solução de Aveia	999 mL
* * Solução Traço de Sais	1 mL
Agar	18 g

pH	7.2
* 20 g de aveia para 999 mL de água destilada. Ferver por 20 minutos e recolher o sobrenadante.	
* * Para 100 mL de água destilada: Sulfato de Ferro II (0,1 g); Cloreto de Manganês (0,1 g); Sulfato de Zinco (0,1 g)	

International Streptomyces Project - ISP4

Fosfato de Potássio Bibásico	1 g
Sulfato de Magnésio	1 g
Sulfato de Amônia	2 g
Cloreto de Sódio	1 g
Cloreto de Calcio	2 g
Água Destilada	500 mL
* Solução de amido	500 mL
Agar	20 g
pH	7.0-7.4
* 10 g de amido de milho em 500 mL de água destilada. Aquecer por 5 minutos para solubilizar.	

International Streptomyces Project - ISP5

L-asparagina	1 g
Glicerol	10 g
Fosfato de Potássio Bibásico	1 g
Agar	15 g
Água Destilada	1000 mL
pH	6.8-7.0
* * Solução Traço de Sais	1 mL
* * Para 100 mL de água destilada: Sulfato de Ferro II (0,1 g); Cloreto de Manganês (0,1 g); Sulfato de Zinco (0,1 g)	

2YT-HMFM

Caldo Nutritivo	
Triptona	8 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio	2,5 g
Água Destilada	450 mL

Solução A

Sulfato de Magnésio	0,038 g
Citrato de Sódio	0,022 g
Sulfato de Amônia	0,45 g
Glicerol	17,6 mL
Água Destilada	40 mL

Solução B

Fosfato de Potássio Monobásico	0,9 g
Fosfato de Potássio Dibásico	2,35 g
Água Destilada	10 mL

* Autoclavar as soluções separadamente e reunir no momento da utilização.

Czapeck

Extrato de Levedura	5 g
Dextrose	5 g
Fosfato de Potássio Dibásico	1 g
Sulfato de Magnésio	0,5 g
Cloreto de Potássio	0,5 g
Sulfato de Ferro II	0,001 g

Agar	16 g
Água Destilada	1000 mL

M9

Lactose	10 g
L-asparagina	20 g
Fosfato de Potássio Dibásico	10 g
Agar	20 g
Água Destilada	1000 mL
pH	7.4
Solução de vermelho de Fenol	0,009 % (após autoclar)

RPMI 1640

Gibco - Dun Laoghaire, Irlanda

Luria Bertani Agar (LBA)

Difco - Altrincham, Cheshire

Caldo Luria Bertani (LB)

Difco - Altrincham, Cheshire

Todos os meios de cultivo foram autoclavados por 15 minutos, em 121 °C.

Anexo B: Espectros 2D - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

