

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
CURSO: MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

LUIS FELYPE GARCIA DE SOUSA CALDAS

Desenvolvimento de soluções biotecnológicas antiparasitárias voltadas ao controle *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir de bactérias quitinolíticas oriundas de sedimentos dos rios amazônicos

Manaus – AM
2025

LUIS FELYPE GARCIA DE SOUSA CALDAS

Desenvolvimento de soluções biotecnológicas antiparasitárias voltadas ao controle *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir de bactérias quitinolíticas oriundas de sedimentos dos rios Amazônicos

Dissertação elaborada no curso: Mestrado em Biotecnologia e apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: biotecnologias para a área agroflorestal.

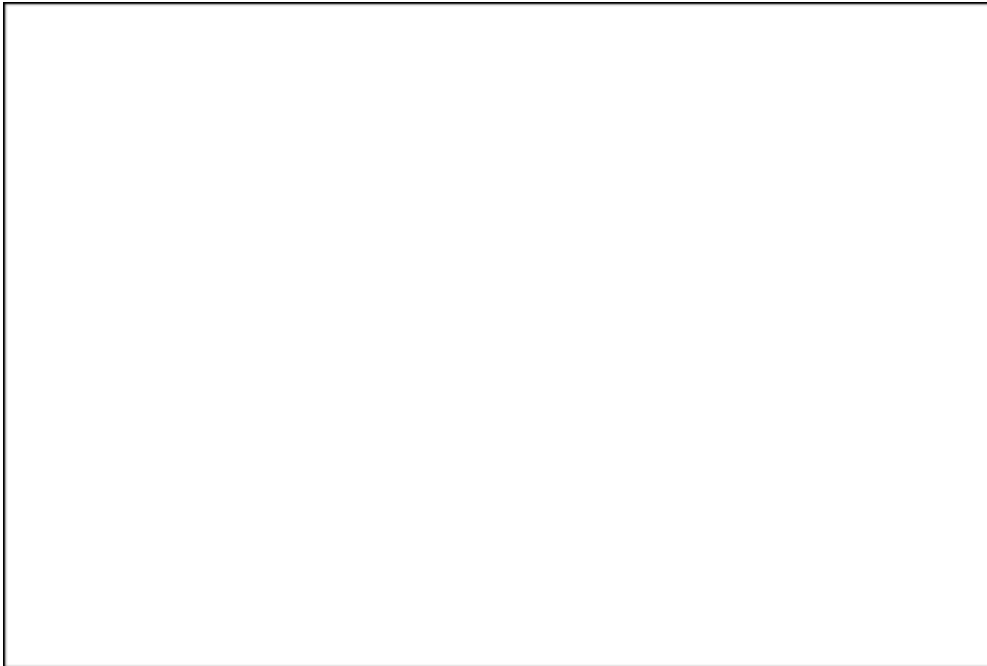
Linha de pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos microbianos da amazônia.

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Manaus – AM
2025

Ficha Catalográfica

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

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the cataloging data.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de soluções biotecnológicas antiparasitárias voltadas ao controle *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir de bactérias quitinolíticas oriundas de sedimentos dos rios Amazônicos

Dissertação elaborada no curso: Mestrado em Biotecnologia e apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em, de.....de 2025.

BANCA AVALIADORA

Luis Felype Garcia de Sousa Caldas
Discente

Prof.^a
1º Avaliador

Dr. Gilvan Ferreira da Silva
Orientador

Prof.^a
2º Avaliador

Prof.^a
3º Avaliador

Prof.^a. Dra.
Coordenadora
(Portaria Nº 1303/GR)
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia

Manaus – AM
2025

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

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTO

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

Agradeço à professora **Waldireny Rocha Gomes**, por tudo, principalmente por ser minha inspiração no mundo acadêmico e por sempre estar acessível quando precisei de ajuda, sendo paciente, amorosa e incrível. Ao professor **Gilvan Ferreira da Silva**, por ter aceitado a difícil missão de me orientar nesta etapa significativa da minha formação. Agradeço a todos de coração por tudo e os levo com carinho, nas etapas da vida que vierem.

Agradeço, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por fomentar minha pesquisa.

Agradeço, aos professores, técnicos e demais colaboradores do PPGBIOTEC.

A todos (as), minha eterna **GRATIDÃO**.

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

Wolfgang Amadeus Mozart.

RESUMO

CALDAS, Luis Felype Garcia de Sousa, M.Sc., Universidade Federal do Amazonas, dezembro de 2025. **Desenvolvimento de soluções biotecnológicas antiparasitárias voltadas ao controle *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir de bactérias quitinolíticas oriundas de sedimentos dos rios amazônicos.** Orientador: Gilvan Ferreira da Silva.

A aquicultura figura entre os setores de produção de alimentos de origem animal que mais crescem no mundo, mas sua expansão é fortemente limitada pela ocorrência de doenças parasitárias. No Brasil, a criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) é ameaçada pela acantocefalose, causada pelo parasita intestinal *Neoechinorhynchus buttnerae*, enfermidade que atualmente, não existem terapias plenamente eficazes e ambientalmente seguras, o que a torna um dos principais entraves sanitários à expansão sustentável da piscicultura nacional. Para suprir essa lacuna, o presente estudo investigou o potencial biotecnológico de 37 linhagens de bactérias quitinolíticas isoladas de sedimentos da bacia amazônica, integrando abordagens complementares de triagem fenotípica *in vitro* e mineração genômica *in silico*. Os resultados revelaram que 18 isolados apresentaram atividade contra o acantocéfalo *N. buttnerae*, com destaque para a linhagem *Streptomyces amazonensis* MAD 27, que demonstrou alta eficiência, induzindo 100% de mortalidade em *N. buttnerae* em apenas 2 a 5 horas, um desempenho equivalente ao controle positivo (cloridrato de levamisol). A análise comparativa com extratos confirmou a presença de metabólitos secundários bioativos, sugerindo um mecanismo de ação multifacetado que pode envolver a ação enzimática e a liberação de compostos. Testes comparativos com culturas vivas e autoclavadas das linhagens mais eficazes demonstraram que a atividade é termolábil e dependente da integridade e/ou atividade metabólica do microrganismo. A análise genômica das linhagens mais promissoras forneceu a base molecular para possivelmente explicar sua eficácia, revelando Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCs) responsáveis pela produção de metabólitos já conhecidos por apresentarem atividade antiparasitária, incluindo Policetídeos (como a Antimicina, um potente inibidor mitocondrial) e Peptídeos Não Ribossômicos (como a Actinomicina D, um inibidor de DNA/RNA). A presença destes BGCs sugere que a alta letalidade observada pode ser mediada por mecanismos de ação direcionados a alvos vitais do parasita. Este trabalho estabelece a linhagem *Streptomyces amazonensis* MAD 27 como um candidato de

primeira linha para o desenvolvimento de soluções biotecnológicas sustentáveis, seja como bioterápico de cultura viva ou como fonte de novos fármacos. A abordagem integrada fenotípica-genômica valida bactérias de sedimentos de rios como um reservatório de diversidade química para o combate parasitário na aquicultura, oferecendo uma alternativa ecologicamente mais segura aos tratamentos convencionais.

Palavras-chave: Acantocéfalos; Mineração genômica; Produtos naturais; Piscicultura.

ABSTRACT

CALDAS, Luis Felype Garcia de Sousa, M.Sc., Universidade Federal do Amazonas, dezembro de 2025. **Development of antiparasitic biotechnological solutions aimed at the control of *Neoechinorhynchus buttnerae* from chitinolytic bacteria from sediments of Amazonian rivers.** Adviser: Gilvan Ferreira da Silva.

Aquaculture is among the fastest-growing animal food production sectors globally, but its expansion is heavily constrained by the occurrence of parasitic diseases. In Brazil, the farming of tambaqui (*Colossoma macropomum*) is threatened by acanthocephalosis, caused by the intestinal parasite *Neoechinorhynchus buttnerae*. This disease currently lacks fully effective and environmentally safe therapies, making it one of the main sanitary obstacles to the sustainable expansion of national fish farming. To address this gap, the present study investigated the biotechnological potential of 37 chitinolytic bacterial strains isolated from Amazon basin sediments, integrating complementary approaches of *in vitro* phenotypic screening and *in silico* genomic mining. The results revealed that 18 isolates exhibited activity against the acanthocephalan *N. buttnerae*, with *Streptomyces amazonensis* strain MAD 27 standing out for its high efficiency, inducing 100% mortality in *N. buttnerae* within just 2 to 5 hours, a performance equivalent to the positive control (levamisole hydrochloride). Comparative analysis with extracts confirmed the presence of bioactive secondary metabolites, suggesting a multifaceted mechanism of action that may involve enzymatic activity and compound release. Comparative tests with live and autoclaved cultures of the most effective strains demonstrated that the activity is thermolabile and dependent on the integrity and/or metabolic activity of the microorganism. Genomic analysis of the most promising strains provided the molecular basis for their observed efficacy, revealing Biosynthetic Gene Clusters (BGCs) responsible for producing metabolites already known to possess antiparasitic activity, including Polyketides (such as Antimycin, a potent mitochondrial inhibitor) and Non-Ribosomal Peptides (such as Actinomycin D, a DNA/RNA inhibitor). The presence of these BGCs suggests that the high lethality observed may be mediated by mechanisms of action targeting vital parasite functions. This work establishes *Streptomyces amazonensis* strain MAD 27 as a prime candidate for the development

of sustainable biotechnological solutions, either as a live culture biotherapeutic or as a source of novel drugs. The integrated phenotypic-genomic approach validates bacteria from river sediments as a reservoir of chemical diversity for parasitic control in aquaculture, offering an ecologically safer alternative to conventional treatments.

Key words: Acanthocephalians; Genomic mining; Natural products; Fish farming.

LISTA DE SIGLAS

AE: Eficácia Anti-helmíntica

B: Número médio de parasitos mortos no grupo controle (na fórmula da AE)

BGCs: Clusters Gênicos Biossintéticos (do inglês *Biosynthetic Gene Clusters*)

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CL₅₀: Concentração Letal mediana (dose que mata 50% dos parasitas)

CL₉₀: Concentração Letal (dose que mata 90% dos parasitas)

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

dDDH: Hibridização DNA-DNA digital (do inglês *digital DNA-DNA Hybridization*)

FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*)

GGDC: Calculadora de Distância Genoma a Genoma (do inglês *Genome to Genome Distance Calculator*)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ISP2: International *Streptomyces* Project-2 Medium

LB: Luria Bertani

LPSN: Lista de Nomes Procariontes com Posição na Nomenclatura (do inglês *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*)

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEM: Meio Essencial Mínimo (do inglês *Minimum Essential Medium*)

MIBiG: Informação Mínima sobre um Cluster Gênico Biossintético (do inglês *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster*)

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês *National Center for Biotechnology Information*)

NRPs: Peptídeos Não Ribossomais (do inglês *Non-Ribosomal Peptides*)

OD: Densidade Óptica

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*)

PKs: Policetídeos (do inglês *Polyketides*)

RiPPs: Peptídeos Ribossomalmente Sintetizados e Pós-traducionalmente Modificados (do inglês *Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides*)

T: Número médio de helmintos mortos no grupo tratado (na fórmula da AE)

T1PKS: Sintetase de Policetídeos Tipo 1 (do inglês *Type I Polyketide Synthase*)

T2PKS: Sintetase de Policetídeos Tipo 2 (do inglês *Type II Polyketide Synthase*)

T3PKS: Sintetase de Policetídeos Tipo 3 (do inglês *Type III Polyketide Synthase*)

TYGS: Servidor de Genoma de Cepa Tipo (do inglês *Type Strain Genome Server*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Lista de bactérias quitinolíticas isoladas de sedimentos dos rios da bacia amazônica empregados neste trabalho..... 43

Tabela 02: Clusters gênicos biossintéticos identificados em *Streptomyces* e *Bacillus* que apresentam similaridade com clusters relacionados à biossíntese de compostos antimicrobianos..... 57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Volume da produção de tambaqui e a localização das pisciculturas brasileiras desta espécie, em todo o território brasileiro..... 21
- Figura 2:** (A) Intestino de tambaqui com infecção por acantocéfalos; (B) probóscide do acantocéfalo (*Neoechinorhynchus buttnerae*)..... 25
- Figura 3:** Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em Meio Essencial Mínimo (MEM)..... 39
- Figura 4:** Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em solução salina a 0,8%..... 40
- Figura 5:** Mapa de calor da avaliação comparativa da atividade anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas vivas e autoclavadas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em solução salina a 0,8%. Cada célula colorida representa a porcentagem de mortalidade de *N. buttnerae* ao longo de diferentes tempos de exposição aos isolados bacterianos. A escala de cores indica a intensidade da atividade anti-helmíntica observada, permitindo a comparação temporal da eficácia entre os tratamentos..... 41
- Figura 6:** Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de extratos de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em Meio Essencial Mínimo (MEM)..... 43
- Figura 7:** Análise de sintenia comparativa entre o cluster biossintético de referência para desferrioxamina B/E (MIBiG BGC0000940) e clusters homólogos de *Streptomyces* com atividade contra *Neoechinorhynchus buttnerae* (acantocéfalo). As linhagens exibidas são *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, *Streptomyces amazonensis* MAD 27 e MAD 39, *Streptomyces vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *Streptomyces albidoflavus* MPUR 28.3. As setas coloridas representam os genes, com cor e orientação indicando similaridade e direção de transcrição..... 66

Figura 8: Análise de sintenia comparativa entre o cluster gênico biossintético de actinomicina D identificado nas linhagens de *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3 e o cluster de referência depositado no MIBiG (BGC0000296). As setas coloridas representam os genes, com a cor e a orientação indicando a similaridade e a direção da transcrição. A análise destaca as correspondências e as variações estruturais entre os clusters, fornecendo uma visão detalhada da conservação e divergência na biossíntese de actinomicina D nas linhagens estudadas..... 65

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
SUMÁRIO.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1 OBJETIVOS.....	16
1.1 Geral.....	16
1.2 Específicos.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Aquicultura Brasileira.....	17
2.2 Tambaqui.....	18
2.3 Doenças parasitárias.....	21
2.4 Acantocéfalos.....	22
2.5 Microrganismos como fontes de produtos naturais.....	26
2.5.1 Gênero <i>Bacillus</i>	26
2.5.2 Gênero <i>Streptomyces</i>	27
3 MATERIAL & MÉTODOS.....	30
3.1 Aquisição dos peixes e parasitos.....	30
3.2 Obtenção e identificação de bactérias produtoras de quitinase.....	30
3.2.1 Identificação filogenômica e análise pangenômica.....	32
3.3 Triagem in vitro bactérias quitinolíticas no controle de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> em meio MEM.....	32

3.4 Triagem <i>in vitro</i> bactérias quitinolíticas no controle de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i> em solução salina.....	33
3.5 Avaliação comparativa da atividade anti-helmíntica de bactérias vivas e autoclavadas.....	34
3.6 Obtenção dos extratos.....	35
3.7 Ensaio <i>in vitro</i> com extratos de bactérias quitinolíticas no controle de <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>	35
3.8 Mineração genômica.....	36
3.8 Análises estatísticas.....	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Atividade de bactérias contra o Acanthocéfalo <i>N. buttnerae in vitro</i> em meio MEM.....	37
4.2 Atividade de bactérias contra <i>N. buttnerae in vitro</i> em solução salina.....	39
4.3 Atividade de <i>Streptomyces murinus</i> MAD 24 e <i>Streptomyces amazonensis</i> MAD 27 contra <i>N. buttnerae in vitro</i> com vivas e autoclavadas.....	40
4.4 Ensaio <i>in vitro</i> com extrato de bactérias no controle de <i>N. buttnerae</i>	42
4.5 Análise comparativa da atividade de bactérias contra <i>N. buttnerae</i> em diferentes condições: meio MEM, solução salina, extratos e tratamento térmico.....	43
4.6 Bioprospecção de moléculas antibióticas, antifúngicas e antiparasitárias em linhagem amazônica de <i>Streptomyces</i> e <i>Bacillus</i>	46
5. Discussão.....	68
6 Conclusão.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

INTRODUÇÃO

A aquicultura é atualmente o setor de produção de alimentos de origem animal que mais cresce no mundo, desempenhando um papel central na segurança alimentar e no desenvolvimento socioeconômico de diversos países (FAO, 2022). No Brasil, a piscicultura mantém trajetória ascendente, atingindo 887.029 toneladas de peixes cultivados em 2023, conforme o Anuário da Piscicultura PeixeBR (2024). A tilápia permanece como a espécie mais cultivada, porém os peixes nativos, liderados pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos, totalizaram cerca de 263 mil toneladas, equivalendo a aproximadamente 30% da produção nacional. Esse desempenho evidencia a importância estratégica do tambaqui para a piscicultura brasileira, sobretudo na região Norte, onde se consolidou como um dos principais pilares produtivos (PEIXEBR, 2024).

Contudo, a intensificação dos sistemas de produção tem favorecido o aumento da prevalência e severidade de enfermidades, especialmente as de origem parasitária, que impactam diretamente o desempenho zootécnico, a sanidade dos cultivos e a sustentabilidade econômica da cadeia aquícola (TAVARES-DIAS et al., 2019). Entre os patógenos de maior relevância econômica na piscicultura amazônica destaca-se o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*, importante parasita intestinal do tambaqui e de seus híbridos. Esse helminto, pertencente ao filo Acanthocephala, é responsável por lesões intestinais severas, redução do ganho de peso e mortalidades expressivas. Estimativas apontam prejuízos de aproximadamente US\$ 7.000 por hectare em sistemas de cultivo, e impactos que podem alcançar US\$ 84 milhões anuais no país, considerando mortalidades associadas a doenças parasitárias (JERÔNIMO et al., 2017; TAVARES-DIAS et al., 2019).

O controle de parasitas em peixes enfrenta um limitante estruturante: no Brasil, apenas um medicamento veterinário (Masoten®, à base de triclorfón/metrifonato) é registrado pelo MAPA para o tratamento de parasitoses em espécies aquícolas, apesar de sua ineficácia frente a acantocéfalos (MAPA, 2020). Essa lacuna regulatória e terapêutica tem impulsionado o uso off-label ou inadequado de fármacos não autorizados, elevando os riscos de contaminação ambiental, resíduos em pescado e falhas terapêuticas. No cenário internacional, há

ampla documentação de que a insuficiência de alternativas regulamentadas leva à intensificação do uso indiscriminado de quimioterápicos, favorecendo resistência antimicrobiana e comprometendo a segurança do consumidor (SCHAR et al., 2020). No Brasil, estudos igualmente relatam o emprego inadequado de medicamentos na piscicultura e a possibilidade de resíduos acima dos limites aceitáveis em produtos destinados ao consumo humano (BOSCOLO et al., 2021; ASSALIN et al., 2023).

Diante desses desafios, cresce o interesse científico por soluções terapêuticas inovadoras, naturais e ambientalmente seguras. Entre as alternativas mais promissoras encontram-se extratos vegetais, óleos essenciais e microrganismos produtores de compostos bioativos, capazes de atuar como antimicrobianos e antiparasitários (REVERTER et al., 2014; CHAGAS et al., 2017; REVERTER et al., 2021; MENDES et al., 2024). A Amazônia, por concentrar uma das maiores diversidades microbianas do planeta, constitui-se como um reservatório privilegiado para a bioprospecção de novos bioinsumos com potencial aplicação no manejo de patógenos aquícolas (MENDES et al., 2024).

Paralelamente, o avanço das ferramentas ômicas como genômica, transcriptômica e metabolômica, vem ampliando substancialmente a capacidade de identificar novos alvos moleculares e metabólitos bioativos para uso no controle de parasitos. A aplicação dessas abordagens tem permitido mapear vias metabólicas essenciais, prever estruturas proteicas e selecionar compostos com alta seletividade contra helmintos em geral e acantocéfalos em particular (STEIN et al., 2021; CHELLAPPAN et al., 2022).

Entre as estratégias emergentes no biocontrole de parasitas, destacam-se os microrganismos produtores de quitinases, enzimas hidrolíticas capazes de degradar matrizes ricas em quitina e outros polissacarídeos estruturais presentes em ovos, cistos e tecidos de diversos organismos patogênicos. Estudos demonstram que quitinases produzidas por bactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Bacillus* podem comprometer a integridade da casca de ovos, inibir a eclosão larval e reduzir a viabilidade de helmintos, configurando-se como ferramentas promissoras (FELSE & PANDA, 1999; ZHANG et al., 2018; CHAPMAN et al., 2019; RANGANATHAN et al., 2020).

Especificamente para *N. buttnerae*, não existem informações sobre a composição de quitina nas estruturas do parasita adulto ou nas camadas dos ovos.

Embora o estudo de Gonçalves et al. (2022) descreva detalhadamente a morfologia e os estágios de desenvolvimento embrionário dos ovos de *N. buttnerae*, destacando a formação de camadas distintas e estruturas filamentosas cruciais para a proteção e dispersão do parasita, a composição química do ovo, e consequentemente a presença ou ausência de quitina, não foi investigada (GONÇALVES et al., 2022). Contudo, é importante notar que para *N. rutili*, espécie pertencente ao mesmo gênero, foi constatada a ausência de quitina na camada mais interna da casca dos ovos (TARASCHEWSKI et al., 1992).

A lacuna de informação sobre a composição quitinolítica de *N. buttnerae* não anula o potencial das quitinases; mesmo que a quitina não esteja presente nas camadas internas, acantocéfalos em geral apresentam uma casca de ovo complexa e altamente resistente em animais adultos possuem a probóscide, que é o órgão de fixação que carrega ganchos quitinoides. Além disso, estudos morfológicos indicam a presença de polissacarídeos e glicoconjugados que são suscetíveis à degradação enzimática, reforçando o potencial dessas enzimas no manejo e controle de *N. buttnerae*. (CROMPTON; NICKOL, 1985; TARASCHEWSKI, 2000; MHAISEN, 2014; PETKEVIČIŪTĖ et al., 2021).

Dessa forma, este estudo tem como objetivo explorar o potencial de bactérias quitinolíticas isolados de sedimentos de rios amazônicos no controle de *N. buttnerae*. Os resultados obtidos poderão subsidiar o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas eficazes, sustentáveis e alinhadas às particularidades biológicas do tambaqui, espécie de destacada relevância socioeconômica para a região Norte do Brasil.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Desenvolver soluções biotecnológicas voltadas ao controle *Neoechinorhynchus buttnerae* a partir de bactérias quitinolíticas oriundas de sedimentos dos rios amazônicos visando a prospecção de linhagens e metabólitos antiparasitários.

1.2 Específicos

1. Identificação de microorganismos quitinolíticos de potencial antagonista contra *Neoechinorhynchus buttnerae*;
2. Selecionar *in vitro* bactérias com atividade antiparasitária contra *Neoechinorhynchus buttnerae*;
3. Analisar a atividade antiparasitária de extratos obtidos das bactérias quitinolíticas selecionadas contra *Neoechinorhynchus buttnerae*;
4. Identificar e caracterizar clusters gênicos biossintéticos (BGCs) correspondentes às vias metabólicas relacionadas à produção de compostos do metabolismo secundário com potencial antiparasitário.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aquicultura Brasileira

A aquicultura nada mais é que a criação de organismos, que seu ciclo de vida se dá parcialmente ou totalmente dentro do meio aquático. Podendo ser de dois tipos, continental (água doce) e marinha (água salgada). E abrange as seguintes especialidades: piscicultura (criação de peixes, em água doce e marinha); malacocultura (criação de mexilhões, ostras, moluscos e outros); carcinicultura (criação de camarão em viveiros); algicultura (macro ou microalgas); ranicultura (rãs); criação de jacarés (SEBRAE, 2015). A aquicultura teve aumento exponencial nos últimos 50 anos, devido ao rápido crescimento da população no século XX, e a demanda de mais fontes de alimentos estimulou o aumento da busca por pescado (SAPKOTA et al., 2008; FAO, 2016).

Inicialmente, a pesca exploratória de estoques naturais supria essa demanda, onde após a Segunda Guerra Mundial, com recursos tecnológicos aplicados à atividade. O grande crescimento do comércio de pescado, o rápido desenvolvimento de tecnologias aplicadas às poucas espécies, sem o devido conhecimento acerca da biologia destas espécies, levaram no final da década de 80, a redução dos estoques naturais. Impulsionando assim o homem a se direcionar ao desenvolvimento da aquicultura (FAO, 2018).

Diante deste panorama de estagnação, a aquicultura sofreu um boom em seu crescimento, de forma a tentar suprir a demanda global por pescado e se tornando assim a alternativa viável para continuar aumentando a oferta nos próximos anos. Nos últimos anos (entre 2009 e 2016), a pesca de captura mostrou produção estável, em torno de 90 milhões de toneladas por ano, enquanto no mesmo período a aquicultura obteve um crescimento de 44% no mesmo período (FAO, 2016; 2018). Deste modo, a aquicultura é o setor de produção de alimentos com maior crescimento no mundo nas últimas quatro décadas (TVETERÅS et al., 2012; FAO, 2018).

O Brasil se apresenta entre os maiores destaques na piscicultura e com potencial de crescimento na aquicultura, devido a ser o quinto maior em área superficial e com aproximadamente 13% da água doce disponível do globo (RODRIGUES et al., 2012). A sua disponibilidade de recursos, como mão de obra e

hídricos, o clima extremamente favorável, a disponibilidade de insumos, a ocorrência natural de espécies aquáticas de interesse zootécnico e mercadológico, além da crescente demanda por pescado em seu mercado interno são fatores de ajudam a alavancar a aquicultura e a piscicultura no País (OECD/FAO, 2015).

A previsão é que o Brasil obterá até 2030 um dos maiores crescimentos (89%) no setor aquícola, e entre os países em desenvolvimento, se destaca como um dos poucos a possuir condições de atender à crescente demanda mundial por pescado (OECD/FAO, 2015; FAO, 2018). Embora atualmente, a piscicultura nacional venha crescendo devido ao mercado interno, pois as importa mais pescado que exporta (SEBRAE, 2015; VALLADÃO et al., 2018).

A grande biodiversidade brasileira oferece cerca de 4 mil espécies aquáticas, a maior variedade oferecida por qualquer país do mundo. O que permite a seleção de espécies para criação, bem como avaliação de investimento devem ser muito bem realizadas, de forma a permitir a viabilidade e sustentabilidade da atividade, assim como seu sucesso financeiro (SEBRAE, 2015).

A expansão aquícola brasileira, favorecida pela piscicultura, chegou a representar 89,6% da produção total da sua aquicultura em 2018, o equivalente a 519 mil toneladas de peixes (IBGE, 2019). Seu crescimento tem sido principalmente com o foco na produtividade máxima, de forma a disponibilizar pescados de boa qualidade ao mais baixo custo possível, o que permite ter o potencial de conquista dos mercados internacionais. Aos poucos se deixa de ser focado na exportação, que ainda se foca em camarão e na lagosta, e deve se diversificar na produção intensiva de tilápia e de espécies amazônicas, principalmente o tambaqui e o pirarucu (SEBRAE, 2015; IBGE, 2018).

2.2 Tambaqui

Embora a espécie mais produzida no Brasil seja uma espécie, a tilápia, à criação de peixes redondos vem recebendo aos poucos destaque, com crescimento expressivamente no País de 30,2% da produção da piscicultura nacional, este crescimento integra espécies nacionais como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pirapitinga (*Piaractus brachipomus*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seus híbridos. Vale destacar que esse aumento se deve, principalmente, à produção de

tambaqui, que é a segunda espécie mais criada no Brasil. Em 2018, 102 mil toneladas desta espécie foram produzidas, representando 19,7% da produção nacional. A Região Norte seguiu sendo a maior produtora de tambaqui, com destaque nacional para Rondônia, Maranhão e Roraima. Amajari (RR) foi o município com a maior produção, seguido por Almas (TO) e Ariquemes (RO) (IBGE, 2019a).

O tambaqui (Cuvier, 1818) pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e gênero *Colossoma* (BRITSKI, 1977; EIGENMANN, 1915). Ele ocorre de forma natural nas bacias do rio Amazonas e do rio Orinico, é o segundo maior peixe de escamas da bacia amazônica, ficando atrás apenas do pirarucu (*Arapaima gigas*). Ele habita águas ricas em nutrientes, com temperaturas entre 25 e 34°C, e de abundantes áreas alagáveis na amazônia durante seu período de cheia. É conhecido por cachama (na Venezuela), gamitama (no Perú) e cachama negra (na Colômbia) (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1997; BALDISSEROTTO; GOMES, 2013). O tambaqui se tornou nos últimos anos o peixe nativo mais produzido na aquicultura continental da América do Sul (VALLADÃO et al., 2016).

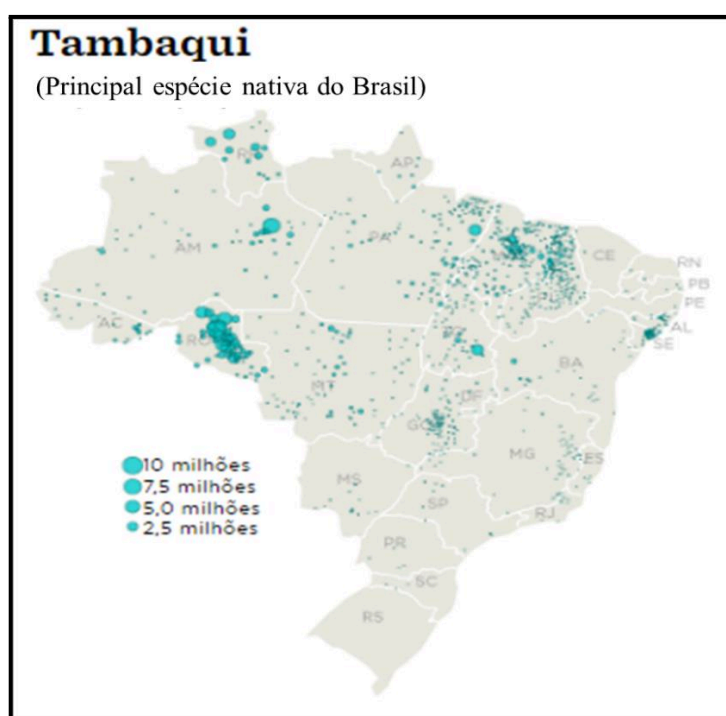
O tambaqui é um peixe de hábito alimentar onívoro, ou seja, alimenta-se de produtos tanto de origem animal como vegetal, conseguindo aproveitar diversos tipos de alimentos na sua nutrição. Há registros de que ele consiga atingir peso ao redor de 30 quilos, bem como alcançar um porte em torno de 100 cm de comprimento quando na natureza (BALDISSEROTTO; GOMES, 2013).

Fatores como o seu sabor inconfundível, a cor branca de sua carne e a consistência, possuir poucos espinhos intramusculares, é um dos peixes mais consumidos na sua região de origem e adjacentes (IZEL et al., 2014). A redução de estoques naturais coloca a produção em cativeiro deste peixe como uma das se não a mais importante fonte de importância para suprir as demandas do mercado. Se tornando assim a espécie nativa mais criada em todo o Brasil, seguida em segundo lugar por um de seus híbridos, o tambacu (IBGE, 2019; WOYNÁROVICH; VAN ANROOY, 2019).

Com exceção dos estados do sul, locais com águas em temperaturas abaixo de 17°C, o tambaqui é criado em todos os estados do país, com exceção de estados da região sul (IBGE, 2017). Devido ao risco de alta mortalidade dos peixes pelo frio

e pôr o tambaqui apresenta problemas de adaptação às baixas temperaturas da água nesta região do país. Concentrando a atividade nas regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste, devido ao clima favorável e boa aceitação de mercado para a espécie (IBGE, 2018; 2019). Enquanto seu híbrido tambacu consegue apresentar mais resistência ao frio que o tambaqui, de forma a ser uma boa opção de investimento para as regiões mais frias (BALDISSEROTTO; GOMES, 2013; WOYNÁROVICH; VAN ANROOY, 2019).

Figura 1: Volume da produção de tambaqui e a localização das pisciculturas brasileiras desta espécie, em todo o território brasileiro



Fonte: Adaptado de Nexo (2019).

Em ambientes de criação, o tambaqui possui boa aceitabilidade de ração, grãos e outros coprodutos agroindustriais. Apesar de se alimentar parcialmente do zooplâncton presente no viveiro, a ração é quem vai suprir a necessidade nutricional para que o tambaqui consiga atingir o crescimento desejado. Ela compromete cerca de 70 a 80% dos custos produtivos do produtor. Ou seja, qualquer desperdício e/ou sobras acabam por elevar o custo da produção, além é claro de piorar a qualidade da água, de forma a favorecer o surgimento de doenças entre os peixes, e causando

impactos na lucratividade (IZEL et al., 2014; PEDROZA FILHO et al., 2016). Por isso se faz necessário que ela seja balanceada de acordo com a fase da produção do peixe (IZEL et al., 2014).

A produção de tilápias e tambaquis nos polos produtores brasileiros, a menor produtividade do tambaqui, ao ser comparado com a tilápia, se dá devido às limitações tecnológicas do sistema de produção da espécie, em relação à ausência de rações específicas e de linhagens melhoradas. Pois o pacote tecnológico desta espécie nativa é pouco desenvolvido, o que dificulta o crescimento da produção de tambaqui, pois ele depende de inovações em diversas áreas (Pedroza Filho et al., 2016).

2.3 Doenças parasitárias

Apesar de a piscicultura representar uma alternativa de negócio rentável, e capaz de suprir a demanda mundial por proteína animal, no entanto ela enfrenta gargalos no seu sistema de criação, estes por sua vez precisam ser solucionados para que assim ela consiga desenvolver todo o seu potencial. Entre eles podemos destacar a ocorrência de enfermidades nos peixes, um grande fator limitante na piscicultura, pois compromete a produtividade e gera perdas econômicas devidos a baixa conversão alimentar dos animais e até devido a elevar as taxas de mortalidade.

As doenças e surtos de mortalidade no setor piscicultor são principalmente causados por agentes não infecciosos e infecciosos. As de origem não infecciosas são devidos principalmente por problemas relacionados à qualidade da água, erros de manejo e intoxicação por contaminação da água com agroquímicos ou outros produtos. Já as de origem infecciosa são causadas por organismos patogênicos como fungos, vírus, parasitos e bactérias, onde as duas últimas etiologias são as mais corriqueiras na piscicultura brasileira (FIGUEIREDO; LEAL, 2008; KAYIS et al., 2009; PILLAY; KUTTY, 2005).

Toda e qualquer espécie de peixe em ambiente natural apresentam uma fauna parasitária característica, assim como qualquer outro animal, muitas vezes sem apresentar patogenicidade, devido a conseguir um equilíbrio entre hospedeiro e parasita, seja devido a manutenção da intensidade parasitária sob controle pelo

sistema imunológico ou qualquer outro fator do equilíbrio (PILLAY; KUTTY, 2005; THATCHER, 2006). Os peixes são os vertebrados com maiores os maiores índices de infecção por parasitos, devido ao ambiente aquático conseguir de forma natural favorecer a propagação, reprodução e todo ciclo de vida dos parasitos (MALTA, 1984; PILLAY; KUTTY, 2005).

Estudos demonstraram que a maiorias das enfermidades presentes nos peixes é parasitária e que devido a intensificação do da produção tem por sua vez favorecido, de forma a promover surtos de mortalidade e consideráveis perdas econômicas (WEI et al., 2013). As doenças parasitárias ainda são portas de entrada para patologias originarias de bactérias patogênicas, as infecções oportunistas (SUOMALAINEN et al., 2005; XU et al., 2012). No Brasil, o desenvolvimento da piscicultura tem sido limitado devido à ocorrência de diferentes doenças parasitárias (MARTINS et al., 2001; PAVANELLI et al., 2013; TAVARES-DIAS et al., 2017).

2.4 Acantocéfalos

Os acantocéfalos constituem um grupo de helmintos endoparasitas amplamente distribuídos em ambientes aquáticos e terrestres, capazes de infectar uma grande diversidade de vertebrados. Seu ciclo de vida é indireto e baseado na cadeia trófica: um artrópode aquático atua como hospedeiro intermediário e um vertebrado funciona como hospedeiro definitivo, etapa na qual os parasitas alcançam sua maturidade reprodutiva. Essa plasticidade ecológica, aliada ao uso de múltiplos grupos de microcrustáceos, contribui significativamente para a dispersão e manutenção desses parasitos em ecossistemas aquáticos (KENNEDY, 2006). Entre as classes do filo Acanthocephala associadas a peixes destacam-se *Palaeacanthocephala*, *Eoacanthocephala* e *Polyacanthocephala* (AMIN, 1985; 1987; SANTOS et al., 2008).

No Brasil, acantocéfalos são frequentemente registrados em peixes selvagens e cultivados. Em ambientes naturais, infecções geralmente ocorrem em baixa intensidade e não resultam em danos severos ao hospedeiro, devido ao equilíbrio evolutivo parasito–hospedeiro mantido ao longo das gerações (MAYAMA, 1990; WILLIAMS; JONES, 1994). Entretanto, esse equilíbrio é facilmente rompido em sistemas de criação. Na piscicultura, fatores como alta densidade de estocagem,

manejo inadequado, estresse e abundância de hospedeiros intermediários criam condições favoráveis para surtos de elevada intensidade parasitária (DIAS et al., 2015; MARINHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019; SILVA et al., 2013). O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa cultivada na Amazônia, é especialmente vulnerável, com numerosos relatos de surtos e perdas produtivas a ele associadas (BARRETO et al., 2019; CHAGAS et al., 2015; FISCHER et al., 2003; MALTA et al., 2001; SILVA-GOMES et al., 2017).

Na piscicultura brasileira, os gêneros registrados com maior frequência são *Echinorhynchus*, *Neoechinorhynchus* e *Polyacanthorhynchus* (EIRAS et al., 2010). Contudo, até o momento, apenas uma espécie é reconhecida como parasita específica do tambaqui e de seus híbridos: *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (CHAGAS et al., 2015; EIRAS et al., 2010; JERÔNIMO et al., 2017; MALTA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2013). Recentemente, o *N. buttnerae* se tornou um dos principais entraves sanitários da piscicultura amazônica, devido à alta prevalência, danos severos e falta de métodos eficazes de controle (CASTRO et al., 2020).

A severidade e abrangência da parasitose têm sido confirmadas por estudos recentes. Pedroti e colegas (2024), ao avaliar 41 pisciculturas do estado de Rondônia, registraram a prevalência de *N. buttnerae* em 95% das propriedades, evidenciando sua ampla disseminação e caráter endêmico. Ainda existe uma forte correlação entre presença de ostracodes e copépodes, os quais são potenciais hospedeiros intermediários e a incidência da infecção, reforçando a importância ecológica desses crustáceos na manutenção do ciclo do parasita (AMIN, 1985; 1987; WOO;LEATHERLAND, 2006; KENNEDY, 2006; GONÇALVES et al., 2021; PEDROTI et al., 2024).

A superfície corporal dos acantocéfalos lhe garante uma rusticidade, o que permite essa “severidade” nas infestações do parasita, por serem constituída por uma cutícula sincicial, composta principalmente por proteínas estruturais, lipídios e polissacarídeos, organizada em múltiplas camadas. A probóscide, estrutura especializada responsável pela fixação mecânica do parasito ao intestino do hospedeiro, apresenta elevada densidade de proteínas estruturais e componentes quitinosos associados aos espinhos (hooks), os quais conferem rigidez e resistência mecânica (CROMPTON; NICKOL, 1985; TARASCHEWSKI, 2000). Embora os

acantocéfalos não apresentem uma cutícula quitinosa contínua como artrópodes, evidências histoquímicas e ultraestruturais indicam a presença de quitina ou polímeros quitina-like em estruturas específicas, especialmente nos espinhos da probóscide e na casca dos ovos (eggshell) (HADAS; TARASCHEWSKI, 1993; PETKEVIČIŪTĖ et al., 2021).

O ciclo de vida de *N. buttnerae* segue o padrão clássico dos acantocéfalos. Ovos eliminados nas fezes dos peixes contêm a larva acântor, capaz de infectar o hospedeiro intermediário após ingestão. No interior de microcrustáceos aquáticos, especialmente ostracodes (GONÇALVES et al., 2021), o parasita evolui para cistacanto, estágio infectante para os peixes. A infecção do hospedeiro definitivo é passiva, ocorrendo pela ingestão de crustáceos parasitados (CHAGAS et al., 2015; WOO; LEATHERLAND, 2006). Estudos recentes mostraram que os ovos apresentam múltiplas camadas e elevada resistência ambiental, quanto a origem e composição química desta casca, as informações são insuficientes ou escassas, ainda que ela reforce a persistência do parasita nos sedimentos e na coluna d'água (GONÇALVES et al., 2021).

Uma vez no hospedeiro definitivo, *N. buttnerae* aloja-se preferencialmente no intestino delgado, figura 2A (PAVANELLI et al., 2013). Sua principal estrutura patogênica é a probóscide armada com espinhos, que se fixa de maneira profunda na mucosa intestinal, causando lesões como ulcerações, hemorragias, necroses, hiperplasia e inflamação granulomatosa, figura 2B (CHAGAS et al., 2015; MATOS et al., 2017). Estudos mais recentes descrevem lesões ainda mais severas: destruição transmural, reação inflamatória crônica e formação de granulomas, evidenciados por análises patológicas detalhadas em tambaquis de cultivo (COSTA, 2024; GASPAROTTO et al., 2023). Dependendo da profundidade de penetração da probóscide, a resposta inflamatória pode variar de leve a intensa (JERÔNIMO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

Figura 2: (A) Intestino de tambaqui com infecção por acantocéfalos; (B) probóscide do acantocéfalo (*Neoechinorhynchus buttnerae*)



Fonte: Obtida e adaptada de MATOS et al., 2017.

Além das lesões mecânicas, *N. buttnerae* compromete de forma significativa o desempenho zootécnico dos peixes. O dano ao epitélio intestinal reduz a área funcional de absorção, ao passo que o parasita compete diretamente pelos nutrientes, resultando em redução de crescimento, pior conversão alimentar e retardo no desenvolvimento (SANIL et al., 2011; JERÔNIMO et al., 2017). Esse impacto é particularmente relevante porque os peixes infectados continuam se alimentando, mas deixam de crescer (KABATA, 1985; SILVA-GOMES et al., 2017; CHAGAS et al., 2019), levando a perdas produtivas silenciosas e contínuas, que podem se acumular ao longo do ciclo de produção.

O ciclo completo é favorecido pela presença constante de hospedeiros intermediários nos viveiros, especialmente ostracodes, que proliferam em ambientes com elevada matéria orgânica e condições estáveis de cultivo (BRASIL-SATO; PAVANELLI, 1999). Isso torna a acantocefalose uma parasitose de difícil erradicação, exigindo intervenção contínua e estratégias integradas de manejo.

No âmbito terapêutico, a situação é igualmente desafiadora. Estudos recentes demonstram que o triclorfon (Masoten®), único antiparasitário registrado no Brasil para aquicultura, apresenta eficácia limitada de cerca de 53% no controle de *N. buttnerae* (CASTRO et al., 2021). Essa eficácia parcial não impede a manutenção da parasitose na população e tampouco evita reinfecções, reforçando a necessidade de alternativas terapêuticas inovadoras e ambientalmente seguras.

A crescente demanda mundial por alimentos de origem aquícola seguros e de alta qualidade torna ainda mais urgente a implementação de estratégias eficazes para o controle de parasitos e a prevenção de resíduos de medicamentos, aspectos fundamentais para a sustentabilidade da cadeia produtiva (GERMANO; GERMANO, 2013). Assim, compreender profundamente a biologia, ciclo de vida, patogênese e epidemiologia de *N. buttnerae* é essencial para o desenvolvimento de soluções eficazes e sustentáveis para a piscicultura amazônica.

E no caso de *N. buttnerae*, embora não haja ainda estudos específicos que descrevem quantitativamente a distribuição de quitina em sua cutícula ou ns ovos, a presença confirmada desse polímero em estruturas especializadas, como a

probóscide, sugere que a ação de quitinases pode comprometer a estabilidade estrutural do parasito, especialmente quando associada a outros mecanismos de ação mediados por metabólitos secundários.

2.5 Microrganismos como fontes de produtos naturais

2.5.1 Genêro *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito em 1872 por Cohn, ele pertence à família Bacillaceae presente ao filo Firmicutes. As espécies desse gênero se encontram em diferentes habitats, dentre eles solos, lagos, sedimentos de rios e marinhos, fontes, tecidos de animais, plantas e insetos, e areias do deserto (LIU et al., 2019, TANG et al., 2023). Elas são Gram-positivas, formam endósporos, e possuem baixo teor de conteúdo G+C no DNA, com formas de bastonete, elas são aeróbicas ou ou anaeróbias facultativas (SON et al., 2019). Algumas possuem alto impacto na biotecnologia, medicina e agricultura, dentre elas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, (GUPTA et al., 2020, MO et al., 2020).

É um grupo de microrganismo com ampla gama de diversidade taxonômica e metabólica, com 5 a 8% do seu genoma total dedicado a biossíntese de metabólitos secundários (FIRA et al., 2018; DIMKÍĆ et al., 2022). Seus compostos podem ser classificados em antibióticos, peptídeos não ribossômicos (NRPs), policetídeos (PKs), lipopeptídeos lineares, lipopeptídeos cíclicos, dihidroisocoumarinas e macrolídeos (MONDOL et al., 2013; KASPAR et al., 2019).

Peptídeos lineares como as gageostatins possuem atividade antifúngica reportada e antibiótica contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar *Typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além de possuírem atividade citotóxica (TAREQ et al., 2014). *Bacillus pumilus* as dihidroisocoumarinas se apresentam como potentes antibióticos frente ao *Helicobacter pylori*, além de efeitos gastroprotetores e anti-úlceras (SADDIQA et al., 2017).

Este gênero ainda é um grande produtor de várias enzimas de interesse industrial, como quitinases, celulasas, glucanases, pectinases, lipases e proteases,

que possuem emprego nas indústrias de alimentos, rações, papel, detergentes, têxteis e farmacêutica (BERINI et al., 2018, SU et al., 2020).

2.5.2 Genêro *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertence ao filo das actinobactérias, um dos principais produtores de metabólitos secundários com bioativos de ação médicas, industriais e agrícolas (GHANEM et al., 2022, ALAM et al., 2022). Elas constituem um dos 30 principais filos do domínio Bactéria, com 374 gêneros registrados, onde as *Streptomyces* são o maior gênero deste filo, estas por sua vez podem ser encontradas em nos mais diversos ambientes terrestres e marinhos, devido a possuir a maior diversidade registrada nesses habitats (DONALD et al., 2022).

Elas são bactérias Gram-positivas de alto teor de G+C em seu conteúdo genômico de 69-78%, com descrição pela primeira vez por Waksman e Henrici (1943), devido a produzirem uma grande variedade de antibióticos. Elas se assemelham fisiologicamente às de diversas espécies de fungos, ao produzirem hifas filiformes, as quais por sua vez penetram as superfícies em busca de nutrientes, quando em condições ambientais desfavoráveis e com recursos limitados, elas produzem hifas aéreas que se dividem em esporos, os quais visam permitir a resistência a condições desfavoráveis e são transportados para novos ambientes ou novas fontes de nutrientes de forma facilitada (QUINN et al., 2020, DONALD et al., 2022).

Dentre as diversas capacidades presentes nas *Streptomyces*, pode-se destacar a produção de antibióticos, antifúngicos, inseticidas e enzimas de interesse biotecnológico e industrial, elas são responsável por a produção de 7600 substâncias bioativas (SALWAN; SHARMA, 2020, BORUTA et al., 2021).

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

Entre os antibióticos, antifúngicos e antiparasitários de importância na medicina veterinária que são produzidos pelas *Streptomyces* estão a anfoteracina B, produzida por *Streptomyces nodosus*, a estreptomicina, produzida por *Streptomyces griseus*, a tetraciclina produzida por *Streptomyces rimosus* e a gentamicina, produzida por *Streptomyces tenebrarius* e a ivermectina produzida por *Streptomyces avermitilis* (MONÉ et al., 2010; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010; SILVA, 2016).

3- MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Aquisição dos peixes e parasitos

Vinte espécimes de *C. macropomum* naturalmente infectados por *N. buttnerae* (de intensidade média) foram mantidos no setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus, Brasil). Os peixes foram mantidos em tanques escavados para manutenção do ciclo do parasita, com aeração constante e de aquecimento de água. Com alimentação duas vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta até saciedade aparente.

Este estudo foi desenvolvido com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Amazônia Ocidental (protocolo 03/20).

Juvenis de tambaqui (passaram por anestesia profunda com benzocaína a 10 % (250 mg/L) solução aquosa de eugenol (50 mg/L) e eutanasiados por perfuração craniana, conforme CONCEA 03/2018, com a coleta dos intestinos para obtenção dos espécimes adultos de *N. buttnerae*. Eles foram removidos dos intestinos de *C. macropomum*, com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica, EZ4), depois foram lavados em solução de cloreto de sódio (0,9%), de modo a permitir a confirmação da integridade tanto morfológica quanto de vitalidade dos parasitas.

3.2 Obtenção e identificação de bactérias produtores de quitinase

Os microrganismos utilizados neste trabalho são microrganismos previamente selecionados para a produção de quitinases e fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na rodovia AM 010, km 29, estrada Manaus-Itacoatiara-Amazonas e estão identificadas sob os códigos conforme tabela a tabela 01. Preservados em glicerol 20% e

armazenadas a -80 °C. As bactérias foram reativadas em meio de cultura líquida LB (Luria Bertani) para *Bacillus* e ISP2 (International *Streptomyces* Project-2 Medium) para *Streptomyces*, a 28°C por 24 horas.

Tabela 01. Lista de bactérias quitinolíticas isoladas de sedimentos dos rios da bacia amazônica empregados neste trabalho

Bactéria	Gênero	Localização Isolado	Espécie
MAD 24	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces murinus</i>
MAD 27	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces amazonensis</i>
MAD 39	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces amazonensis</i>
MAD 41	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces gramineus</i> *
MAD 42	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces amazonensis</i>
MAD 51	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Streptomyces amazonensis</i>
MAD 113	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 117	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 119	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 125	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 130	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 131	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 159	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 168	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	Potencial espécie nova
MAD 170	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 171	<i>Não identificado</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 181	<i>Não identificado</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 184	<i>Achromobacter</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 187	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 202	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Bacillus cereus</i>
MAD 205	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	-
MAD 1010	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Madeira</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
MPUR 28.3	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

MPUR 40.3	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces murinus</i>
MPUR 40.7	<i>Bacillus</i>	<i>Rio Purus</i>	-
MPUR 46.7	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	-
APUR 26.2	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces vinaceusdrappus</i>
APUR 26.8	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces vinaceusdrappus</i>
APUR 32.5	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces amazonensis</i>
APUR 36.1	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	<i>Streptomyces sampsonii</i>
APUR 36.4	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Purus</i>	-
SOL 41	<i>Não identificado</i>	<i>Rio Solimões</i>	-
SOL 105	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Rio Solimões</i>	<i>Stenotrophomonas riyadhensis</i>
SOL 140	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Solimões</i>	<i>Streptomyces griseoluteus*</i>
SOL 159	<i>Streptomyces</i>	<i>Rio Solimões</i>	Potencial espécie nova
SOL 196	<i>Não identificado</i>	<i>Rio Solimões</i>	<i>Streptomyces sampsonii</i>
RN 03	<i>Não identificado</i>	<i>Rio Negro</i>	-
Total: 37			

3.2.1 Identificação filogenômica e análise pangenômica

A delimitação das espécies foi realizada por meio de análises comparativas de genomas completos, utilizando o valor de hibridização DNA-DNA digital (dDDH) como métrica principal (SANDOVAL-POWERS et al., 2021). Os cálculos de dDDH com base na fórmula d2 foram obtidos pelo **Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC)**, disponível em <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>, empregando os parâmetros padrão recomendados (MEIER-KOLTHOFF et al., 2021). Para complementar a análise taxonômica, a plataforma **Type Strain Genome Server (TYGS)** (<https://tygs.dsmz.de>) foi utilizada para estimativas de dDDH pela fórmula d4 e para a construção da árvore filogenômica inferida automaticamente.

De acordo com os critérios taxonômicos aceitos internacionalmente, novas espécies só foram propostas quando apresentaram valores de dDDH **inferiores a 70%** em comparação com a espécie tipo correspondente registrada no **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)** (<https://lpsn.dsmz.de>) (MEIER-KOLTHOFF et al., 2021). Esse ponto de corte é amplamente reconhecido

como equivalente ao limiar clássico de 70% de hibridização DNA-DNA experimental, garantindo robustez na definição de novas espécies bacterianas.

3.3 Triagem *in vitro* bactérias quitinolíticas no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae* em meio MEM

Os parasitos (n = 10) foram transferidos para placas de petri (5,5 cm), com 5 mL de meio MEM (Minimum Essential Medium (MEM), developed by Harry Eagle), a temperatura de $25 \pm 1,0$ °C, os tratamentos eram compostos de um controle negativo somente o meio (MEM) e sem nenhum microrganismo, um controle positivo com (cloridrato de levamisol na concentração de 15 mg/mL) e 37 tratamentos contendo as diferentes bactérias selecionadas, com três repetições por tratamento. Todos os microrganismos foram crescidos em meio líquido, LB para *Bacillus* e ISP2 para *Streptomyces*, a 28°C com 150 rpm em um shaker até alcançar OD de 0,5. Após alcançar a OD, realizou-se a centrifugação 10 minutos por 1500 rpm, em seguida o pellet foi retirado e foram solubilizados usando o meio MEM.

Os parasitos foram observados, com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica, EZ4), a cada 15 m até o período de seis horas de exposição, e novamente observados somente após o período de 24 h para o registro do número de parasitos vivos e mortos, das alterações no comportamento e eventuais deformações. Os parasitos foram considerados mortos na ausência de qualquer motilidade, mesmo após estímulo (OLIVEIRA et al., 2019a). Ao final do período de avaliação, determinou-se a viabilidade dos parasitos por 24 h calculando-se o índice dos isolados que conseguissem apresentar concentração letal (CL50 anti-helmíntica) nos intervalos de 2, 6 e 24 horas de exposição de *N. buttnerae* e a eficácia anti-helmíntica aos 37 microrganismos, usando o método de Zhang et al. (2014): $AE = [B - T] \times 100\% / B$, onde AE é a eficácia anti-helmíntica, B é o número médio de *N. buttnerae* mortos no grupo controle e T é o número médio de helmintos mortos no grupo tratado.

3.4 Triagem *in vitro* bactérias quitinolíticas no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae* em solução salina

A fim de determinar se a composição do meio MEM interferia no desempenho bacteriano durante, foi conduzido um teste de estresse em solução salina 0,85%, no qual as bactérias foram avaliadas na ausência do meio nutritivo. Essa abordagem permitiu verificar a capacidade das linhagens de manter sua viabilidade e atividade mesmo sob condições nutricionalmente limitantes, de modo a usar o parasita como única fonte nutricional. Onde, novamente parasitos (n = 10) foram transferidos para placas de petri (5,5 cm), com 5 mL de meio solução salina (0,85%), a temperatura de $25 \pm 1,0$ °C, os tratamentos eram compostos de um controle negativo somente com (solução salina 0,85%), um controle positivo (cloridrato de levamisol 15 mg/mL) e 37 tratamentos contendo as diferentes bactérias selecionadas, com três repetições por tratamento. Os microrganismos foram crescidos em meio líquido, LB para *Bacillus* e ISP2 para *Streptomyces*, a 28°C com 150 rpm em um shaker até alcançar OD de 0,5, os quais foram mensurados com auxílio de uma cubeta no espectrofotômetro. Após alcançar a OD, realizou-se a centrifugação 10 minutos por 1500 rpm, em seguida o pellet foi retirado e foram solubilizados em solução salina (0,8%). A avaliação de letalidade foi realizada conforme descrito no item 2.3.

3.5 Avaliação comparativa da atividade anti-helmíntica de bactérias vivas e autoclavadas

Para investigar a natureza da atividade anti-helmíntica observada e considerando que as bactérias foram testadas após crescimento em meio ISP2 e subsequente lavagem e suspensão em solução salina a 0,8%, avaliamos comparativamente a ação dos isolados *S. murinus* MAD 24 e *Streptomyces amazonensis* MAD 27 utilizando culturas vivas e autoclavadas.

Foi conduzido um ensaio comparativo utilizando suspensões de bactérias vivas e inativadas por autoclavagem em solução salina estéril a 0,85%. As linhagens bacterianas selecionadas foram cultivadas, centrifugadas, lavadas e ressuspensas em solução salina, com padronização da concentração celular. Alíquotas dessas suspensões foram submetidas à autoclavagem (121 °C por 15 minutos) para obtenção das bactérias inativadas, sendo a ausência de viabilidade confirmada por plaqueamento em meio sólido.

Os parasitos foram distribuídos em solução salina e expostos às suspensões bacterianas vivas ou autoclavadas, mantendo-se grupos controle sem adição bacteriana. A atividade anti-helmíntica foi avaliada por observação da motilidade e integridade dos parasitos em intervalos de tempo pré-definidos, considerando-se mortos os indivíduos sem resposta a estímulos mecânicos.

3.6 Obtenção dos extratos

Os microrganismos que apresentaram letalidade igual ou maior do que 50% (CL₅₀) nos testes *in vitro* anteriores, foram submetidos a obtenção de extrato. Para tanto, um pré-inóculo em tubos Falcon de 50 mL contendo 19,5 mL do meio e 0,5 mL do cultivo reativado foi preparado para cada bactéria. Os pré-inóculos foram incubados por cinco dias a 30 °C e 200 rpm.

Para cada meio de cultura foram preparados 1500 mL de cultivos, meio ISP2 para *streptomyces* e Landy para os demais microrganismos, divididos em três garrafas de vidro de 1000 mL contendo 500mL de meio cada, e adicionado 2 mL do pré-inóculo em cada garrafa, deixando um como controle negativo. Os cultivos serão incubados por 7 dias a 30 °C e 180 rpm.

Para a obtenção dos extratos dos cultivos em meio líquido, as culturas e os controles foram filtrados a vácuo. O líquido do filtrado foi transferido para béqueres contendo 500 mL de acetato de etila para cada 1:1. As misturas foram então submetidas a 30 minutos e depois separadas em um filtro de decantação. O conteúdo dos béqueres foi filtrado e o extrato em acetato de etila obtido foi seco em rotaevaporadora.

3.7 Ensaios *in vitro* com extratos de bactérias quitinolíticas no controle de *Neoechinorhynchus buttnerae*

Os extratos obtidos conforme descrito acima foram avaliados em um novo ensaio, com 10 parasitos dispostos em para placas de petri (5,5 cm), com 5 mL de meio MEM, um controle positivo (cloridrato de levamisol 15 mg/mL) a temperatura de 25±1,0 °C, os tratamentos eram compostos de um controle negativo (meio

MEM+TWEEN), e 18 com os extratos das bactérias selecionadas, com três repetições por tratamento. O extrato foi solubilizado em Tween antes de ser adicionado ao meio MEM. Uma nova avaliação de letalidade foi realizada segundo o que foi descrito no item 2.3.

3.8 Mineração genômica

A prospecção dos clusters gênicos foi feita para a anotação do cluster de genes de interesse. Os possíveis clusters gênicos relacionados a metabólitos secundários foram identificados através da ferramenta de predição antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell), versão 7.0 (BLIN et al., 2021) através da versão para bactérias.

Os input foi realizado por meio dos genomas em arquivos no formato FASTA, com parâmetro de rigor sendo o relaxed para a detecção dos agrupamentos, com os algoritmos extras (KnownClusterBlast, ActiveSiteFinder, ClusterBlast, Cluster Pfam analysis, SubClusterBlast e Pfam-based GO term annotation) que são disponibilizados pela ferramenta. As sequências com maior similaridade preditas pelo antiSMASH foram submetidas à ferramenta onlineBLAST do NCBI. De modo a identificar se os agrupamentos são característicos aos gêneros.

Para filtragem e classificação dos clusters de maior similaridade apresentados pela predição do antiSMASH, bancos de dados específicos foram empregados. O MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster), versão 4.0, foi empregado como base de comparação para a identificação de clusters com similaridade a BGCs experimentalmente validados, uma vez que esse repositório reúne informações manualmente curadas sobre clusters gênicos biossintéticos caracterizados. A inferência das potenciais funções e produtos do metabolismo secundário foi realizada a partir da comparação entre os BGCs preditos pelo antiSMASH e os clusters depositados no MIBiG por meio da análise de sintenia utilizando a ferramenta Clinker (GILCHRIST; CHOOI, 2021).

3.9 Análises estatísticas

Após 24 horas de exposição aos microrganismos quitinolíticos e aos extratos, os dados de mortalidade e eficácia sobre os acantocéfalos foram submetidos aos testes de normalidade e homocedasticidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Barlett, respectivamente. Após, os dados foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis, seguido do teste post-hoc de Student Newman Keus (SNK) para comparações múltiplas. Esta análise foi realizada usando o Software R versão 4.4.2.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade de bactérias contra *N. buttnerae* *in vitro* em meio MEM

A avaliação preliminar de 37 linhagens de bactérias quitinolíticas quanto à sua letalidade contra *N. buttnerae* foi realizada em Meio Essencial Mínimo (MEM). Este meio, rico em componentes como vitaminas, aminoácidos e glicose, proporciona condições ótimas para a manutenção do parasita *in vitro*. A análise da eficácia anti-helmíntica, conforme ilustrado no **Figura 3** revelou variabilidade nas respostas das linhagens. As linhagens de *S. amazonensis* MAD 27 e *S. murinus* MAD 24 destacaram-se por sua ação rápida, alcançando 54,16% de letalidade em apenas 45 minutos e a mortalidade completa (100%) em 2 horas de exposição. De forma similar, a linhagem *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 demonstrou alta eficácia, atingindo 79,16% de mortalidade em 2 horas e 100% em 5 horas. Para essas linhagens (MAD 24, MAD 27 e APUR 26.8), a concentração letal mediana (CL₅₀) variou de 3,10 a 4,79 horas, e a CL₉₀ de 4,26 a 5,17 horas, indicando uma capacidade letal em curtos períodos de exposição.

Outras linhagens, como *S. murinus* MPUR 40.3 e *S. amazonensis* MAD 51, apresentaram uma ação mais gradual, mas igualmente eficaz a longo prazo, atingindo 100% de mortalidade em 24 horas. Em contraste, um grupo de 18 linhagens exibiu atividade limitada ou quase nula, como a *Stenotrophomonas riyadhensis* SOL 41 e *S. albidoflavus* MPUR 28.3, que apresentaram eficácia máxima de 8,33% e 4,16% em 24 horas, tendo em vista que este parasita pode

sobreviver até 20 dias em condições *in vitro* sem suplementação com antibiótico, respectivamente, e a *Bacillus* sp. MAD 159 (potencial espécie nova)), que não demonstrou nenhuma ação anti-helmíntica. *S. amazonensis* APUR 32.5 e *S. sampsonii* APUR 36.1 apresentam resposta, com aumentos significativos, mas não atingiram 100%. A primeira atingiu 16,66% em 4 horas e 83,33% em 24 horas, e a segunda não apresenta nenhuma ação antiparasitária até 2 horas, mas atinge 29,16% em 2 horas e 95,83% em 24 horas.

Dos 37 isolados avaliados em meio MEM, 18 apresentaram CL₅₀ detectável, evidenciando a presença de algum fator associado à atividade bacteriana capaz de induzir a morte do parasita. Embora não seja possível confirmar a produção de metabólitos específicos com base nos resultados obtidos, a intensidade e a rapidez do efeito observado sugerem que mecanismos mediados por produtos bacterianos, possam contribuir para a atividade anti-helmíntica detectada.

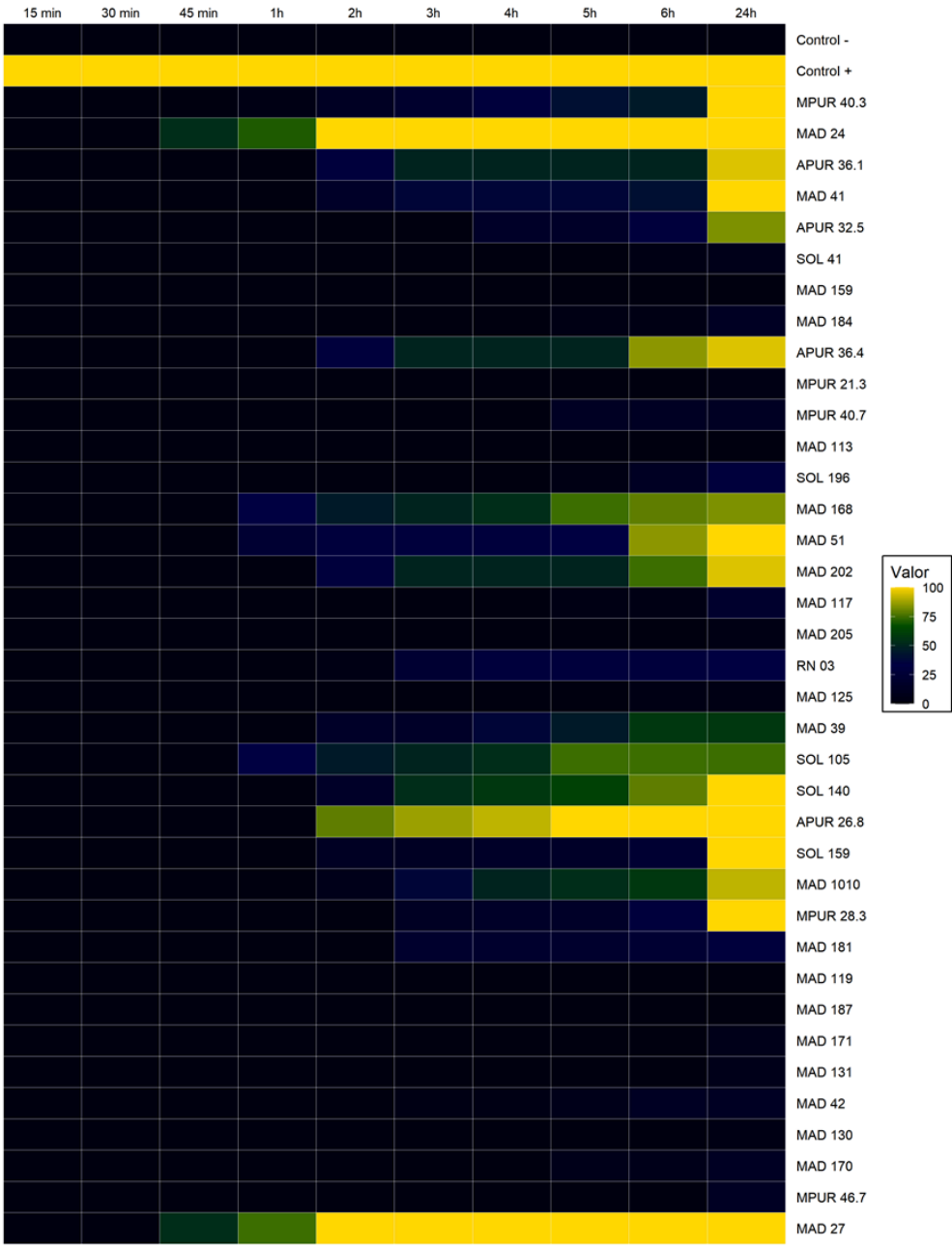


Figura 3. Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em Meio Essencial Mínimo (MEM). Cada célula colorida representa a porcentagem de mortalidade dos parasitas *Neoechinorhynchus buttnerae* em diferentes tempos de exposição aos isolados bacterianos.

4.2 Atividade de bactérias contra *N. buttnerae* in vitro em solução salina

Considerando que a riqueza de nutrientes do meio MEM poderia influenciar a colonização bacteriana ou a expressão de metabólitos, conduzimos um ensaio subsequente em solução salina a 0,8%, um ambiente menos favorável ao metabolismo bacteriano e à manutenção do parasita. Esta condição mais "estressante" visava discernir se a eficácia observada era intrínseca às bactérias ou potencializada pelo meio rico (**Figura 4**).

As linhagens *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 mantiveram o desempenho alcançando 100% de eficácia. A *S. amazonensis* MAD 27 destacou-se por apresentar mortalidade total desde o início do experimento, enquanto *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 atingiram 100% em 2 e 5 horas, respectivamente. Adicionalmente, as linhagens *S. murinus* MPUR 40.3, *S. amazonensis* MAD 41 e *S. albidoflavus* MPUR 28.3 demonstraram um aumento progressivo na taxa de eficácia, culminando em 100% de mortalidade em 24 horas. Outras, como *S. amazonensis* APUR 32.5 e MAD 1010, atingiram eficácias elevadas (83,33% e 91,67%, respectivamente) em 24 horas. Contudo, um número maior de bactérias (listadas como APUR 36.4, MPUR 28.3, MAD 113, entre outros) apresentou eficácia marginal, variando de 0 a 20,833%, indicando a ausência de propriedades antiparasitárias elevadas nessas condições mais restritivas.

De forma geral, 13 dos 37 microrganismos testados na solução salina demonstraram atividade contra *N. buttnerae*, reafirmando o valor das linhagens *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 como as mais eficientes. Pois estas linhagens apresentaram as maiores taxas de eficácia, alcançando 100% de mortalidade dos parasitas em diferentes períodos de exposição. onde, o isolado *S. amazonensis* MAD 27 demonstrou ação imediata, com mortalidade total desde o início do experimento, indicando efeito letal rápido (CL_{50} e CL_{90} inferiores a 1 hora). Em seguida, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 atingiram 100% de eficácia após 2 e 5 horas de exposição, respectivamente, com valores de CL_{50} de 3,16 h e 4,79 h e CL_{90} de 4,41 h e 5,17 h, evidenciando resposta biológica rápida e eficiente.

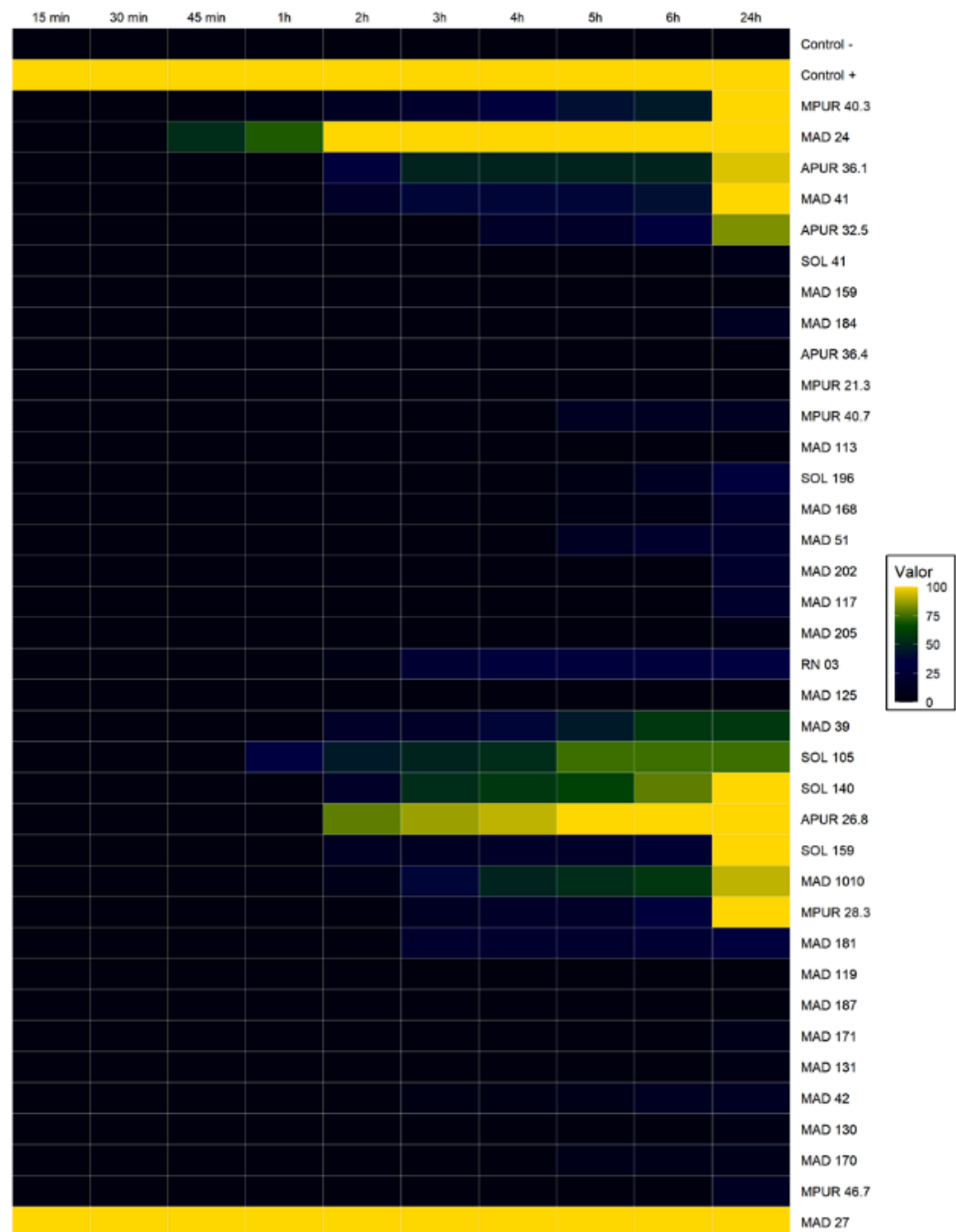


Figura 4- Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em solução salina a 0,8%. Cada célula colorida representa a porcentagem de mortalidade dos parasitas *N. buttnerae* em diferentes tempos de exposição aos isolados bacterianos em um ambiente de solução salina.

4.3 Atividade de *Streptomyces murinus* MAD 24 e *Streptomyces amazonensis* MAD 27 contra *N. buttnerae* *in vitro* com vivas e autoclavadas

Para avaliar se atividade observada contra *N. buttnerae* é devido a presença das bactérias vivas e de seus componentes termolábeis (células íntegras, proteínas de integradas a parede, metabólitos sensíveis ao calor) que já estavam associados ou pré-produzidos pelas células no momento da co-cultura selecionamos as duas melhores linhagens MAD 24 e MAD 27 para este teste.

S. murinus MAD 24 apresentou o mesmo padrão de tempo observando anteriormente de 45 min e 1 h, e atingiu atividade máxima a partir de 2 h, a qual se manteve estável até 24 h. Esse comportamento sugere que o agente responsável pela letalidade, provavelmente um fator biológico ativo associado às células ou liberado gradualmente por elas, requer um tempo de contato ou acumulação para manifestar sua ação máxima. Uma vez que as bactérias foram lavadas e suspensas em salina, a liberação lenta de componentes pré-formados ou uma interação gradual com o parasita para uma produção *de novo* de metabólitos no ambiente. Quando submetido à autoclavagem, o tratamento *S. murinus* MAD 24 (autoclavada) não apresentou atividade detectável em nenhum dos tempos analisados, indicando que o agente responsável pela atividade observada requer a produção durante o co-cultivo com o parasita ou é termoestável.

O isolado *S. amazonensis* MAD 27, por sua vez, demonstrou atividade máxima constante desde os 15 minutos assim como nos testes anteriores, indicando uma ação imediata. Isso sugere que seus componentes ativos são rapidamente disponibilizados, seja por estarem prontamente acessíveis na superfície celular ou por serem liberados de forma muito eficiente, agindo velozmente sobre o parasita. Entretanto, assim como observado para *S. murinus* MAD 24, a autoclavagem das células (MAD 27 – autoclavada) resultou na completa perda de atividade, reforçando a hipótese de que o efeito observado depende do componente biológico vivo. De forma geral, os resultados demonstram que a atividade observada por *S. murinus* MAD 24 e *Streptomyces amazonensis* MAD 27, como ilustrado na **Figura 5**, é dependente do tempo e da integridade dos microrganismos, corroborando a participação destes no efeito detectado.

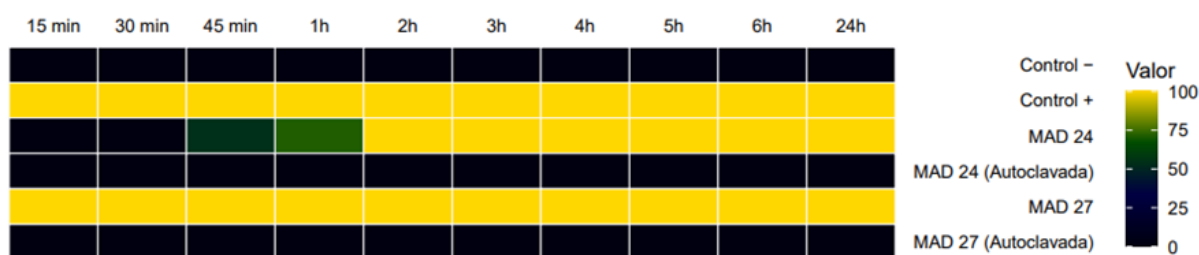


Figura 5- Mapa de calor da avaliação comparativa da atividade anti-helmíntica *in vitro* de linhagens bacterianas quitinolíticas vivas e autoclavadas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em solução salina a 0,8%. Cada célula colorida representa a porcentagem de mortalidade de *N. buttnerae* ao longo de diferentes tempos de exposição aos isolados bacterianos. A escala de cores indica a intensidade da atividade anti-helmíntica observada, permitindo a comparação temporal da eficácia entre os tratamentos.

4.4 Ensaios *in vitro* com extrato de bactérias no controle de *N. buttnerae*

Após a triagem inicial das linhagens bacterianas vivas, as linhagens que demonstraram os resultados mais promissores na letalidade contra *N. buttnerae* foram submetidas à obtenção de extratos em acetato de etila. Esta etapa visou investigar se os compostos bioativos produzidos por essas bactérias, uma vez isolados, manteriam a letalidade contra *N. buttnerae* observada anteriormente. Os extratos na concentração de 500 µg/mL foram então avaliados *in vitro* em meio MEM, que é o meio padronizado para manutenção dos parasitos, com a adição de Tween para solubilização, conforme a metodologia descrita.

Os resultados desses ensaios revelaram que apenas 8 dos 18 extratos obtidos de linhagens previamente eficazes foram capazes de apresentar atividade antiparasitária. As linhagens cujos extratos mantiveram atividade contra *N. buttnerae*, replicando em grande parte o desempenho observado com as bactérias vivas, incluíram as linhagens de *S. amazonensis* (representada pelos isolados MAD 27, APUR 32.5, MAD 39 e MAD 51), bem como *S. murinus* MAD 24, *S. albidoflavus* MPUR 28.3, *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *S. graminearus* MAD 41. Dentre esses, os extratos de *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* (MAD 24) e de *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 se destacaram particularmente, demonstrando um desempenho comparável ao observado com as células bacterianas inteiras e

atingindo 100% de eficácia em tempos de exposição variáveis. Outras linhagens, como o isolado *S. amazonensis* MAD 39 e *Stenotrophomonas riyadhensis* SOL 105, também exibiram atividade considerável de seus extratos, alcançando 75% e 79,16% de letalidade, respectivamente, após 24 horas. Em contrapartida, os extratos de linhagens como *S. sampsonii* APUR 36.1 e as duas linhagens de *S. amazonensis* APUR 32.5 e MAD 51, *S. griseoluteus* SOL 140 e *Streptomyces* sp. SOL 159 (potencial espécie nova) apresentaram uma ação antiparasitária limitada, posicionando-se bem abaixo de 50% de letalidade ao final de 24 horas. Para 10 dos extratos testados, não se observou qualquer ação anti-helmíntica significativa

A variabilidade na eficácia dos extratos, mesmo daqueles derivados de linhagens que mostraram alta atividade quando vivas, sugere a complexidade dos fatores envolvidos na letalidade. Isso pode ser atribuído à sensibilidade dos metabólitos ao processo de extração com acetado, à necessidade de sinergia entre múltiplos compostos que podem não ter sido extraídos em proporções adequadas, ou à possibilidade de que a ação direta da célula bacteriana (por exemplo, via contato ou colonização) contribua para a eficácia observada.

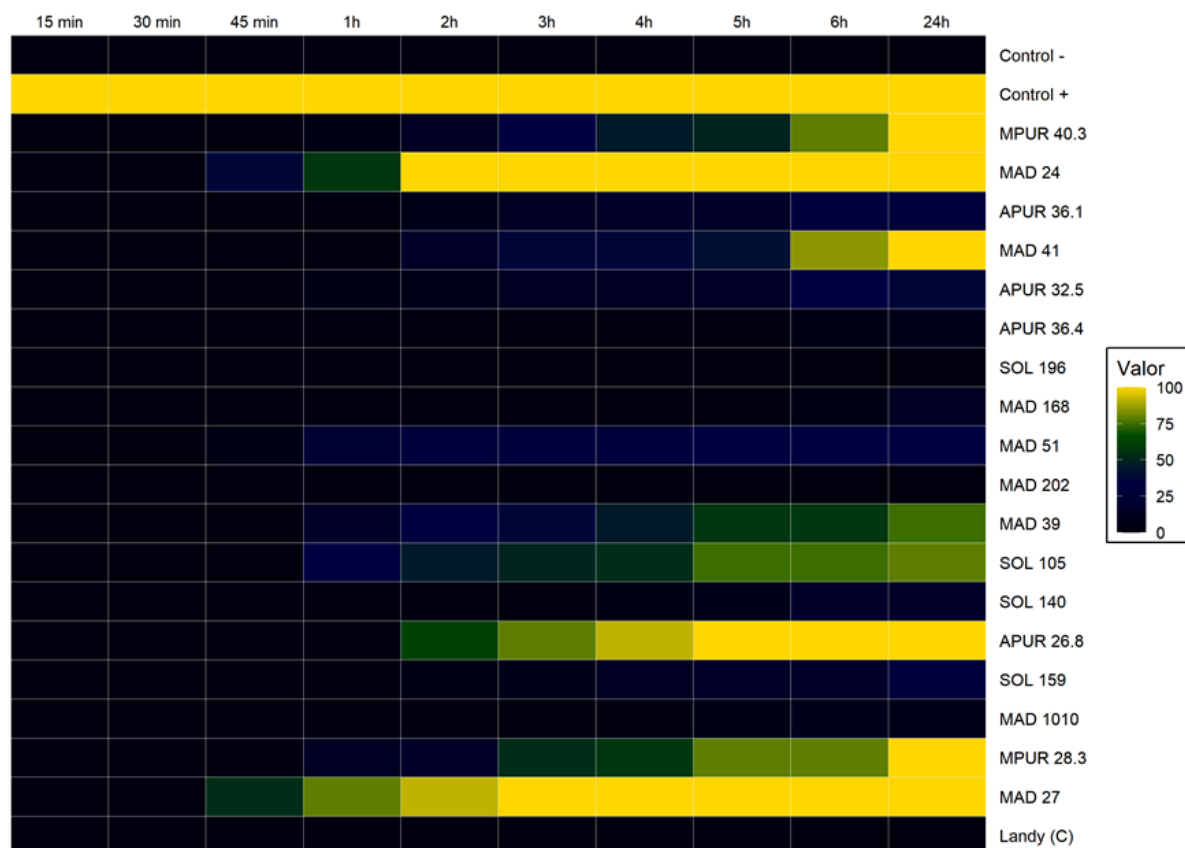


Figura 6- Mapa de calor da eficácia anti-helmíntica *in vitro* de extratos de linhagens bacterianas quitinolíticas contra *Neoechinorhynchus buttnerae* em Meio Essencial Mínimo (MEM). Cada célula colorida indica a porcentagem de mortalidade dos parasitas *N. buttnerae* (eixo Y) após exposição aos extratos das linhagens bacterianas (eixo X) em diferentes pontos no tempo.

4.5 Análise comparativa da atividade de bactérias contra *N. buttnerae* em diferentes condições: meio MEM, solução salina, extratos e tratamento térmico

A comparação entre os quatro cenários experimentais avaliados – bactérias vivas em meio MEM, solução salina, extratos bacterianos em MEM, e a atividade de culturas vivas versus autoclavadas (para MAD 24 e MAD 27) – fornece uma compreensão abrangente do comportamento funcional das linhagens bacterianas e da robustez de sua atividade contra *N. buttnerae*. A análise integrada desses resultados evidencia diferenças significativas relacionadas à dependência nutricional, à estabilidade dos compostos bioativos, à termolabilidade dos fatores

ativos e à diversidade intraespecífica na capacidade de induzir mortalidade em *N. buttnerae*.

No ambiente nutricionalmente rico do MEM, 18 das 37 linhagens demonstraram atividade mensurável contra *N. buttnerae* (CL_{50}), com destaque para *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8, que atingiram 100% de mortalidade em apenas 2 a 5 horas. Essas linhagens apresentaram ainda valores reduzidos de CL_{50} (3,10–4,79 h) e CL_{90} (4,26–5,17 h), refletindo sua capacidade de atuar de maneira rápida e eficiente. Outras linhagens, como *S. murinus* MPUR 40.3 e *S. amazonensis* MAD 51, embora com cinética mais lenta, também alcançaram 100% de mortalidade em 24 horas. Esses resultados sugerem que, mesmo sob condições nutricionais ideais para o parasita, diversas linhagens expressam fatores ativos contra *N. buttnerae*, ainda que os mecanismos subjacentes permaneçam indeterminados e possam envolver tanto metabólitos secundários quanto enzimas hidrolíticas.

A avaliação em solução salina 0,8%, um ambiente nutricionalmente restritivo, permitiu explorar a robustez da atividade contra *N. buttnerae* em condições de estresse. O número de linhagens ativas reduziu-se levemente (de 18 para 13), indicando que parte expressiva da atividade observada no MEM não depende exclusivamente da disponibilidade de nutrientes para a produção *de novo* de metabólitos durante o ensaio. As principais linhagens eficazes no MEM mantiveram seu desempenho: *S. amazonensis* MAD 27 permaneceu letal desde o início do ensaio, *S. murinus* MAD 24 atingiu 100% de mortalidade em 2 horas e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 em 5 horas. Além dessas, isolados como *S. murinus* MPUR 40.3, *S. graminearus* MAD 41 e *S. albidoflavus* MPUR 28.3 também alcançaram 100% de letalidade em 24 horas, enquanto *S. amazonensis* MAD 39 e *Stenotrophomonas riyadhensis* SOL 105 mantiveram taxas elevadas de mortalidade (75–83%). Essa manutenção da eficácia em ambiente pobre sugere que algumas linhagens produzem compostos ativos de forma constitutiva, independentemente de estímulos nutricionais, ou que esses compostos possuem estabilidade suficiente para manter sua ação mesmo sem multiplicação bacteriana, dependendo da liberação de componentes pré-formados.

Um aspecto crucial para a compreensão do mecanismo de ação foi a avaliação comparativa da atividade de culturas vivas e autoclavadas para os

isolados MAD 24 e MAD 27. Os resultados demonstraram que, em ambos os casos, a autoclavagem levou à completa perda da atividade letal contra *N. buttnerae*. Para *S. murinus* MAD 24, que exibiu um padrão tempo-dependente, a inativação térmica eliminou qualquer efeito. Similarmente, a ação imediata e robusta de *S. amazonensis* MAD 27 foi totalmente abolida após o tratamento. Este achado evidencia que a atividade observada é intrinsecamente ligada à termolabilidade dos fatores ativos, sejam eles as próprias células bacterianas vivas, enzimas sensíveis ao calor (como as quitinases, que são proteínas e poderiam ser desnaturadas) ou metabólitos secundários que são degradados por altas temperaturas ou dependem da integridade celular para sua liberação e ação. Isso reforça a hipótese de que o efeito não é mediado por substâncias termoestáveis pré-existentes que agiriam de forma passiva.

A análise dos extratos em acetato de etila destacou um cenário distinto, revelando maior seletividade e expressiva redução da atividade contra *N. buttnerae*, já que apenas 8 dos 18 extratos de linhagens previamente eficazes mantiveram efeito significativo. Os extratos mais ativos foram provenientes de *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24, *S. albidoflavus* MPUR 28.3, *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8, *S. graminearus* MAD 41 e *S. murinus* MPUR 40.3, que atingiram até 100% de mortalidade, embora com cinética geralmente mais lenta do que as culturas vivas. Em contraste, linhagens como *S. amazonensis* MAD 39 e *Stenotrophomonas riyadhensis* SOL 105 preservaram parte da atividade (75–79%), enquanto outras, incluindo as linhagens de *S. amazonensis* MAD 51 e APUR 32.5, *S. sampsonii* APUR 36.1, *S. griseoluteus* SOL 140 e *Streptomyces* sp. SOL 159 (potencial espécie nova), exibiram atividade limitada ou ausência completa de efeito. Esses resultados indicam que a letalidade pode depender de interações sinérgicas entre múltiplos metabólitos, da presença de compostos instáveis ao processamento ou da necessidade de atividade metabólica contínua da célula viva. Também reforçam que alguns mecanismos bacterianos podem envolver contato direto célula-parasita, o que não é replicado com o uso de extratos isolados.

Outro aspecto relevante observado foi a expressiva variabilidade intraespecífica entre linhagens, como *S. amazonensis*: MAD 27, MAD 39, MAD42, MAD 51 e APUR 32.5, que apesar de pertencerem à mesma espécie, apresentaram perfis funcionais bastante distintos. *S. amazonensis* MAD 27 demonstrou

desempenho robusto em todas as condições testadas (vivo em MEM, vivo em salina, e em extrato, além da termolabilidade confirmada). Enquanto que MAD 39 manteve parte da eficácia mesmo após extração, indicando a presença de compostos mais estáveis ou apolares. Já MAD 51 e APUR 32.5, embora eficazes como culturas vivas, perderam completamente a atividade na forma de extrato, reforçando a hipótese de dependência da célula viva, de sinergia metabólica ou de produção de compostos sensíveis ao processo de extração. Embora 4 das cinco linhagens de *S. amazonensis* tenham apresentado atividade variada, a linhagem MAD 42 não apresentou nenhuma atividade nos testes realizados, ressaltando que a atividade é linhagem específica. O mesmo pode ser observado para as linhagens de *S. murinus* MAD 24 e MAD 40.3 que apresentaram diferenças em sua efetividade contra *N. buttnerae*.

Essa heterogeneidade funcional destaca a plasticidade metabólica característica de *Streptomyces* e demonstra que a proximidade taxonômica não necessariamente prediz o perfil bioativo de uma linhagem. Diferenças na expressão de clusters biossintéticos, na estabilidade dos metabólitos e na necessidade de interações diretas com o parasita podem explicar a diversidade de respostas observadas.

Em conjunto, os resultados obtidos fornecem evidências de que as linhagens amazônicas avaliadas apresentam atividade biológica e habilidade para desenvolvimento de produtos biotecnológicos, seja para uso como culturas vivas com ação direta contra *N. buttnerae*, seja como fontes de compostos bioativos com possível aplicação terapêutica no controle de *N. buttnerae*.

A robustez funcional das linhagens mais promissoras, especialmente *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8, em diferentes condições experimentais e a confirmação da termolabilidade da atividade, reforçam seu potencial para desenvolvimento de estratégias inovadoras, sustentáveis e compatíveis com as necessidades da aquicultura brasileira. Esses achados fornecem as bases para estudos futuros voltados à purificação e caracterização de metabólitos, análises metabolômicas integradas, investigações de mecanismos de ação e ensaios *in vivo* para validação de eficácia e segurança.

4.6 Bioprospecção de moléculas antibióticas, antifúngicas e antiparasitárias em linhagem amazônica de *Streptomyces* e *Bacillus*.

Para desvendar a base molecular por trás da eficácia das linhagens mais promissoras, foi realizada uma bioprospecção genômica *in silico* dos clusters gênicos biossintéticos (BGCs) nas oito linhagens cujos extratos apresentaram potencial anti-helmíntico (*S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24, *S. murinus* MPUR 40.3, *S. graminearus* MAD41, *S. amazonensis* MAD 39, *Stenotrophomonas riyadhensis* SOL 105, *Streptomyces vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *Streptomyces albidoflavus* MPUR 28.3). Esta análise revelou um espectro diversificado de BGCs, indicando a capacidade dessas bactérias de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários com atividades terapêuticas conhecidas ou presumidas, conforme detalhado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Clusters gênicos biossintéticos identificados em *Streptomyces* e *Bacillus* que apresentam similaridade com clusters relacionados à biossíntese de compostos antimicrobianos.

Isolado	Região do Contig	Cluster Biossintético	Bioativo	Atividade Antiparasitária	Confiança	Referência
MAD 27	6.1	NRPS-like, T1PKS	cinnabaramide A	<i>Atividade antifúngica (potencial vs. parasitas fúngicos)</i>	Baixa	RASHID et al., 2011
MAD 27	<i>11.1</i>	<i>Lanthipeptide-cla ss-v</i>	<i>thioholgamide A/B</i>	<i>Atividade antibacteriana (pode inibir protozoários)</i>	Alta	Dahlem et al., 2020
MAD 27	<i>19.1</i>	<i>NI-siderophore</i>	<i>kinamycin</i>	<i>Atividade antitripanossomal (Trypanosoma cruzi)</i>	Baixa	Herrmann et al., 2015
MAD 27	<i>22.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>friulimicin A/B/C/D</i>	<i>Atividade antimicrobiana (amplo espectro)</i>	Baixa	SCHNEIDER et al., 2009
MAD 27	<i>28.1</i>	<i>T2PKS</i>	<i>tetracenomycin C</i>	<i>Atividade antiprotozoária (Leishmania spp.)</i>	Alta	KUMAR et al., 2025

MAD 27	46.1	T2PKS, T1PKS	spore pigment	Toxicidade a helmintos	Alta	GUALERZI et al., 2005
MAD 27	75.1	T3PKS	flaviolin	Atividade antioxidante (proteção celular)	Alta	GHAZEMIAN et al., 2019
MAD 27	104.1	NI-siderophore	desferrioxamin B/E	Sideróforos com ação contra Plasmodium	Alta	GORDEUK et al., 1992
MAD 27	176.1	T1PKS	angolamycin	Atividade antitripanossomal e antimalária	Alta	IWATSUKI et al., 2010
MAD 24	3.1	NRPS	diisonitrile antibiotic SF2768	Antibiótico com ação contra protozoários	Média	WIPF; SADOWSKY, 2010
MAD 24	6.1	NRPS, NI-siderophore, RRE-containing	omnipeptin	Depsipeptídeo com atividade antifúngica/antiparasitária	Baixa	KJER et al., 2007
MAD 24	22.1	NRPS	actinomycin D	Atividade antitripanossomal (Trypanosoma cruzi)	Alta	DO VALLE et al., 2008

MAD 24	24.1	T2PKS	spore pigment	Toxicidade a helmintos	Alta	GUALERZI et al., 2005
MAD 24	27.1	NRPS-like, phosphonate, betalactone	leupeptin Pr/Ac	Inibidor de proteases (anti-Leishmania)	Alta	KLEMBÁ; GOLDBERG, 2013
MAD 24	41.1	T1PKS	pentamycin	Antifúngico/potencial contra protozoários	Média	IWAI; ŌMURA, 1982
MAD 24	49.1	Ectoine	ectoine	Protetor osmótico (alvo indireto em Plasmodium)	Alta	GALINSKI; STEIN, 2001
MAD 24	65.1	T1PKS, azoxy-crosslink	tambjamine BE-18591	Alcaloide com atividade antiprotozoária	Baixa	PIEL, 2004
MAD 24	72.1	NI-siderophore	desferrioxamin B/E	Sideróforos que inibem crescimento de Plasmodium	Alta	GORDEUK et al., 1992
MAD 24	76.1	NRPS, NRP-metallophore	mirubactin	Quelante de metais (inibição de patógenos)	Alta	HELFRICH; PIEL, 2016

MAD 24	<i>79.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>flaviolin</i>	<i>Antioxidante (proteção contra estresse oxidativo)</i>	Alta	GHASEMIAN et al., 2019
MAD 24	<i>105.1</i>	<i>Terpene</i>	<i>geosmin</i>	<i>Atividade repelente/antimicrobi ana</i>	Alta	WANG, et al., 2019
MAD 24	<i>198.1</i>	<i>lassopeptide</i>	<i>albusnodin</i>	<i>Atividade antibacteriana (potencial cruzado)</i>	Alta	LI et al., 2018
MAD 24	<i>259.1</i>	<i>Melanina</i>	<i>melanin</i>	<i>Proteção contra radiação UV (indireto)</i>	Média	GUALERZI et al., 2005
MPUR 40.3	<i>14.1</i>	<i>NRPS, T1PKS, lanthipeptide-cla ss-ii</i>	<i>zwittermicin A</i>	<i>Atividade antibacteriana ampla (potencial cruzado)</i>	Alta	STACHELHA U; MARAHIEL, 1995
MPUR 40.3	<i>20.1</i>	<i>T2PKS, T1PKS</i>	<i>spore pigment</i>	<i>Toxicidade a helmintos</i>	Alta	GUALERZI et al., 2005
MPUR 40.3	<i>52.1</i>	<i>hydrogen-cyanide</i>	<i>aborycin</i>	<i>Atividade antimicrobiana (RiPP)</i>	Baixa	LI; WANG, 2017

MPUR 40.3	<i>61.1</i>	<i>ectoine</i>	<i>ectoine</i>	<i>Protetor osmótico (alvo indireto)</i>	Alta	GALINSKI; STEIN, 2001
MPUR 40.3	<i>84.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>leupeptin Pr/Ac</i>	<i>Inibidor de proteases (anti-Leishmania)</i>	Baixa	KLEMBA; GOLDBERG, 2013
MPUR 40.3	<i>107.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>flaviolin</i>	<i>Antioxidante (proteção celular)</i>	Alta	GHAZEMIAN et al., 2019
MPUR 40.3	<i>119.1</i>	<i>NI-siderophore</i>	<i>petrobactin</i>	<i>Sideróforo (inibição crescimento parasitário)</i>	Alta	CROSA; SCHRYVERS, 2022
MPUR 40.3	<i>168.1</i>	<i>terpene</i>	<i>hopene</i>	<i>Atividade repelente/antimicrobi ana</i>	Alta	OURISSON et al., 1987
MPUR 40.3	<i>172.1</i>	<i>T3PKS, NRPS</i>	<i>A-47934 (glicopeptídeo)</i>	<i>Atividade antibacteriana</i>	Baixa	BARNA; WILLIAMS, 1984
MPUR 40.3	<i>224.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>surugamide A/D</i>	<i>Atividade antifúngica</i>	Baixa	WANG et al., 2019

MPUR 40.3	<i>256.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>actinomycin D</i>	<i>Atividade antitripanossomal</i>	Baixa	DO VALLE et al., 2008
MPUR 40.3	<i>279.1</i>	<i>NI-siderophore</i>	<i>desferrioxamin B/E</i>	<i>Sideróforos anti-Plasmodium</i>	Alta	GORDEUK et al., 1992
MPUR 40.3	<i>326.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>bacillibactin</i>	<i>Quelante de metais (inibição patógenos)</i>	Média	MIETHKE; MARAHIEL, 2007
MPUR 40.3	<i>338.1</i>	<i>lassopeptide</i>	<i>albusnodin</i>	<i>Atividade antibacteriana (RiPP)</i>	Alta	LI et al., 2018
MPUR 40.3	<i>453.1</i>	<i>terpene</i>	<i>geosmin</i>	<i>Modulação ecológica</i>	Alta	WANG, et al., 2019
MPUR 40.3	<i>481.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>vioprolides A-D</i>	<i>Atividade antifúngica/antiparasitária</i>	Baixa	PIEL, 2002
MPUR 40.3	<i>547.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>leupeptin Pr/Ac</i>	<i>Inibidor de proteases</i>	Baixa	KLEMBA; GOLDBERG, 2013

MPUR 40.3	<i>613.1</i>	<i>terpene-precursor</i>	<i>detoxin SI</i>	<i>Atividade antifúngica</i>	Baixa	OMURA; TANAKA, 1984
MAD 41	<i>1.1</i>	<i>NRPS-like</i>	<i>cloranfenicol</i>	<i>Atividade antimicrobiana ampla (anti-protozoários)</i>	Baixa	SLEIGH; TOVEY, 1984
MAD 41	<i>2.1</i>	<i>butirolactona</i>	<i>A-factor</i>	<i>Modulador de quorum sensing (indireto)</i>	Alta	TAKANO, 2006
MAD 41	<i>7.1</i>	<i>T2PKS+NRPS+oligossacarídeo</i>	<i>arixantomicina A/B/C</i>	<i>Sinergia antibiótico-poliketídico</i>	Média	WANG; WANG, 2018
MAD 41	<i>14.1</i>	<i>T2PKS</i>	<i>tetracenomicina C</i>	<i>Atividade antiprotozoária (Leishmania/Trypanosoma)</i>	Alta	KUMAR et al., 2025
MAD 41	<i>24.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>flaviolina</i>	<i>Antioxidante (interações hospedeiro-patógeno)</i>	Alta	GHASEMIAN et al., 2019
MAD 41	<i>28.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>quinamicina</i>	<i>Atividade antitripanossomal</i>	Baixa	Herrmann et al., 2015

MAD 41	35.1	<i>terpene+RiPP</i>	<i>hopeno</i>	<i>Desestabilizador de membranas</i>	Alta	OURISSON et al., 1987
MAD 41	50.2	<i>terpeno</i>	<i>geosmina</i>	<i>Modulador ecológico</i>	Alta	WANG, et al., 2019
MAD 41	65.1	<i>NRPS</i>	<i>friulimicinas A-D</i>	<i>Lipopeptídeos cíclicos (atividade antiparasitária)</i>	Baixa	SCHNEIDER et al., 2009
MAD 41	66.1	<i>T2PKS+T1PKS</i>	<i>pigmento de esporo</i>	<i>Toxicidade a helmintos</i>	Alta	GUALERZI et al., 2005
MAD 41	96.1	<i>ectoína</i>	<i>ectoína</i>	<i>Protetor osmótico (indireto)</i>	Alta	GALINSKI; STEIN, 2001
MAD 41	100.1	<i>NI-sideróforo</i>	<i>desferrioxamina B/E</i>	<i>Quelante de ferro (anti-Plasmodium)</i>	Alta	GORDEUK et al., 1992
MAD 41	104.1	<i>T1PKS</i>	<i>pentamicina</i>	<i>Antifúngico/antiprotozoário</i>	Média	IWAI; ŌMURA, 1982
MAD 41	106.1	<i>T1PKS+sacarídeo</i>	<i>stambomicinas A-D</i>	<i>Macrolídeos políenos (atividade ampla)</i>	Baixa	OMURA; TANAKA, 1985

MAD 41	<i>138.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>stenotricina</i>	<i>Depsipeptídeo (desestabilização de membranas)</i>	Baixa	OMURA; TANAKA, 1986
MAD 41	<i>234.1</i>	<i>NRPS-like</i>	<i>bovienimida A</i>	<i>Lipopeptídeo (nematodocida)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1987
MAD 39	<i>5.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>desferrioxamina B/E</i>	<i>Quelante de ferro (anti-Plasmodium)</i>	Alta	GORDEUK et al., 1992
MAD 39	<i>34.1</i>	<i>T2PKS</i>	<i>tetracenomicina C</i>	<i>Antibiótico (anti-Leishmania/Tryp anosoma)</i>	Alta	KUMAR et al., 2025
MAD 39	<i>20.1</i>	<i>T2PKS+T1PKS</i>	<i>pigmento de esporo</i>	<i>Toxicidade a helmintos</i>	Alta	GUALERZI et al., 2005
MAD 39	<i>24.1</i>	<i>terpeno+RiPP</i>	<i>hopeno</i>	<i>Desestabilizador de membranas</i>	Alta	OURISSON et al., 1987
MAD 39	<i>27.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>flaviolina</i>	<i>Antioxidante (proteção celular)</i>	Alta	GHASEMIAN et al., 2019
MAD 39	<i>106.1</i>	<i>Terpeno</i>	<i>geosmina</i>	<i>Modulação ecológica</i>	Alta	WANG, et al., 2019

MAD 39	<i>248.1</i>	<i>Ectoína</i>	<i>ectoína</i>	<i>Protetor osmótico</i>	Alta	GALINSKI; STEIN, 2001
MAD 39	<i>1.2</i>	<i>NRPS-like</i>	<i>cloranfenicol</i>	<i>Atividade antibacteriana ampla (Protozoários, potencial cruzado)</i>	Baixa	SLEIGH; TOVEY, 1984
MAD 39	<i>154.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>omnipeptin</i>	<i>Depsipeptídeo cíclico (Helmintos/Protozoários)</i>	Baixa	KJER et al., 2007
MAD 39	<i>25.1</i>	<i>lanthipeptide+poliino</i>	<i>cepacina A</i>	<i>Atividade antifúngica (Infecções oportunistas)</i>	Baixa	OMURA; TANAKA, 1988
Sol 105	<i>2.1</i>	<i>RiPP-like</i>	<i>Peptídeos modificados</i>	<i>Atividade antimicrobiana (protozoários/bactérias)</i>	-	OMURA; TANAKA, 1989
Sol 105	<i>3.1</i>	<i>Terpene-precursor</i>	<i>Terpenoides</i>	<i>Antimalárico (artemisinina-like), antiprotozoário</i>	-	OMURA; TANAKA, 1990

Sol 105	6.1	<i>Arylpolyene</i>	<i>Policetídeos aromáticos (APE Vf-like)</i>	<i>Atividade antifúngica/antiprotzoária</i>	Baixa	OMURA; TANAKA, 1991
Sol 105	29.1	<i>NRP-metallophore (NRPS)</i>	<i>Sideróforos (e.g., 2,3-DHBS)</i>	<i>Privação de ferro (inibição de patógenos dependentes)</i>	Média	MIETHKE; MARAHIEL, 2007
Sol 105	35.1	<i>Terpene-precursor</i>	<i>Terpenoides</i>	<i>Atividade anti-helmíntica/antiprotzoária</i>	-	OMURA; TANAKA, 1990
Apur 26.8	1.1	<i>Lanthipeptide-class-iii</i>	<i>SapB</i>	<i>Atividade antibacteriana (potencial cruzado)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1992
Apur 26.8	2.2	<i>Terpene</i>	<i>albaflavenone</i>	<i>Atividade antifúngica/antiprotzoária</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1993
Apur 26.8	4.1	<i>Indole</i>	<i>5-dimethylallylindole-3-acetonitrile</i>	<i>Modulador de vias de sinalização</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1994

Apur 26.8	<i>6.1</i>	<i>T2PKS</i>	<i>enterocin</i>	<i>Antibiótico de amplo espectro</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1995
Apur 26.8	<i>43.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>desferrioxamin B/E</i>	<i>Quelante de ferro (anti-Plasmodium)</i>	Alta	GORDEUK et al., 1992
Apur 26.8	<i>50.1</i>	<i>Indole</i>	<i>7-prenylisatin</i>	<i>Atividade antiprotzoária</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1996
Apur 26.8	<i>82.1</i>	<i>NRPS/NRP-metal lophore</i>	<i>coelibactin</i>	<i>Sideróforo com atividade antimicrobiana</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1997
Apur 26.8	<i>106.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>flaviolin</i>	<i>Antioxidante (proteção celular)</i>	Alta	GHASEMIAN et al., 2019
Apur 26.8	<i>136.1</i>	<i>Terpene</i>	<i>geosmin</i>	<i>Modulador ecológico</i>	Alta	WANG, et al., 2019
Apur 26.8	<i>177.1</i>	<i>Ectoine</i>	<i>ectoína</i>	<i>Protetor osmótico</i>	Alta	GALINSKI; STEIN, 2001

Apur 26.8	<i>7.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>borrelidin</i>	<i>Atividade antitripanossomal reportada</i>	-	OMURA; TANAKA, 1998
Apur 26.8	<i>128.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>CDA lipopeptídeos</i>	<i>Atividade membranolítica</i>	-	OMURA; TANAKA, 1999
Apur 26.8	<i>148.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>kinamycin</i>	<i>Atividade antitripanossomal</i>	-	Herrmann et al., 2015
Apur 26.8	<i>328.1</i>	<i>NRPS</i>	<i>antimycin</i>	<i>Inibidor da cadeia respiratória</i>	-	OMURA; TANAKA, 2000
MPUR 28.3	<i>9.1</i>	<i>TIPKS, NRPS, lanthipeptídeo-II</i>	<i>Antimicina</i>	<i>Muito Alto (Ação antiparasitária e citotóxica comprovada)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 2000
MPUR 28.3	<i>53.1</i>	<i>TIPKS</i>	<i>Candidicina</i>	<i>Alto (Documentada contra leveduras e protozoários)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 2001
MPUR 28.3	<i>62.1</i>	<i>T3PKS</i>	<i>Naringenina</i>	<i>Alto (Efeitos antiparasitários relatados)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 2002

MPUR 28.3	<i>319.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>Desferrioxamina B</i>	<i>Alto (Interfere na captação de ferro de parasitas)</i>	Alta	GORDEUK et al., 1992
MPUR 28.3	<i>236.1</i>	<i>Terpeno</i>	<i>Albaflavenona</i>	<i>Moderado (Ação antimicrobiana conhecida, potencial antiparasitário)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 1993
MPUR 28.3	<i>133.1</i>	<i>NRPS-like</i>	<i>10-epi-HSAF / derivados</i>	<i>Moderado (Ação contra fungos e microrganismos)</i>	Alta	OMURA; TANAKA, 2003
MPUR 28.3	<i>24.1</i>	<i>NRPS, azole-containing RiPP</i>	<i>Surugamidas A/D</i>	<i>Alto (Surugamidas possuem efeito citotóxico e imunossupressor)</i>	Média	WANG et al., 2019
MPUR 28.3	<i>380.1</i>	<i>NI-sideróforo</i>	<i>Desferrioxamina (não especificada)</i>	<i>Alto (Mecanismo de competição por ferro aplicável a parasitas)</i>	Média	MIETHKE; MARAHIEL, 2007
MPUR 28.3	<i>68.1</i>	<i>T2PKS</i>	<i>Fredericamicina A</i>	<i>Moderado (Ação antimicrobiana e potencial antiparasitário)</i>	Média	OMURA; TANAKA, 2004

MPUR 28.3	<i>276.1</i>	<i>RiPP-like</i>	---	<i>Moderado (Potencial bioativo por natureza peptídica modificada)</i>	-	OMURA; TANAKA, 1989
------------------	--------------	------------------	-----	--	---	---------------------------

Total: 97

Obs.: NRPS: Sintetase de peptídeos não ribossomais, PKS: sintetase de policetídeos tipo 1 (T1PKS), sintetase de policetídeos tipo 2 (T2PKS), sintetase de policetídeos tipo 3 (T3PKS), NAPAA: Não alfa Poliaminoácidos tipo e-Polilisina, PKS-like: Fragmento do tipo PKS, NRPS-like: Fragmento do tipo NRPS.

Entre os achados, destacam-se BGCs relacionados a Sideróforos, como Desferrioxamin B/E identificados em (*S. amazonensis* MAD 27, e MAD 39, *S. graminearus* MAD 41, *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *S. albidoflavus* MPUR 28.3), Petrobactina (MPUR 40.3), Quinamicina (MAD 27, MAD 41, APUR 26.8) e Coelibactina (APUR 26.8). Esses compostos são quelantes de ferro altamente eficientes, e sua importância reside na capacidade de privar parasitas (como *Plasmodium* e *Trypanosoma cruzi*) de um elemento essencial para sua sobrevivência e crescimento.

A classe dos Policetídeos (PKS) e Híbridos também foi extensivamente representada. Encontrou-se a Tetracenomicina C (em *S. amazonensis* MAD 27 e MAD 39), *S. graminearus* MAD 41 um antibiótico com atividade antiprotozoária conhecida contra *Leishmania* spp. e tripanossomatídeos. BGCs para Pigmentos de Esporo (presentes em *S. amazonensis* MAD 27, e MAD 39, *S. graminearus* MAD 41, *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, foram associados à toxicidade a helmintos. De grande relevância é a Antimicina (em *S. albidoflavus* MPUR 28.3 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8), um BGC com atividade antiparasitária e citotóxica comprovada, atuando como um potente inibidor da cadeia respiratória mitocondrial, um mecanismo letal para diversos parasitas. A Enterocina (em *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8), um antibiótico de amplo espectro, também foi identificada com potencial ação cruzada contra parasitas. Além disso, as Flaviolinas (policetídeos tipo 3, presentes em *S. amazonensis* MAD 27 e MAD 39, *S. graminearus* MAD 42, *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8), embora não apresentem ação antiparasitária direta, são antioxidantes que podem conferir proteção celular contra o estresse oxidativo induzido por infecções.

A prospecção também revelou a presença de BGCs de Peptídeos Não Ribossomais (NRPS) e Peptídeos Ribossomais Modificados (RiPPs). A Actinomicina D (em *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3), um conhecido inibidor de DNA/RNA, demonstrou alta confiança para atividade antitripanossomal (*Trypanosoma cruzi*). As Leupeptinas (em *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3), descritas como inibidores de proteases, apresentaram atividade anti-*Leishmania*. Outros representantes, como Thioholgamide (em *S. amazonensis* MAD 27) e Albusnodin (em *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3), são RiPPs com atividades antimicrobianas e potencial antiparasitário.

Por fim, diversos Terpenos foram identificados. O Hopeno (em *S. murinus* MPUR 40.3, *S. amazonensis* MAD 39 e *S. graminearus* MAD 42) é reconhecido como um desestabilizador de membranas parasitárias, um mecanismo de ação de grande interesse. A Geosmina (em *S. murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, *S. graminearus* MAD 41, *Streptomyces amazonensis* MAD 39, *Streptomyces vinaceusdrappus* APUR 26.8) foi associada à modulação ecológica e potencial modulação de interações parasita-hospedeiro. A Albaflavenona (em *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *S. albidoflavus* MPUR 28.3) também foi encontrada, com atividade antifúngica/antibacteriana e eficácia considerada contra protozoários como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*.

A diversidade de BGCs identificados nas linhagens mais eficazes, abrangendo compostos que interferem em processos vitais dos parasitas, como a homeostase de ferro, a integridade da membrana celular, a função enzimática e a respiração mitocondrial, sublinha o imenso potencial biotecnológico desses microrganismos amazônicos. Tais achados reforçam a promessa dessas linhagens como uma fonte inestimável para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários, oferecendo múltiplas vias para o controle eficaz de *N. buttnerae*.

Para confirmação do potencial biossintético, a análise sintênica foi realizada para clusters associados à biossíntese de desferrioxamina do tipo B/E. Essa abordagem permitiu avaliar a conservação da organização gênica, da ordem, da orientação e da similaridade entre os genes codificadores envolvidos na biossíntese desse sideróforo **Figura 7**. Em todas as linhagens em que o cluster foi identificado, observou-se a manutenção da colinearidade gênica, com elevada similaridade proteica entre os seis ortólogos necessários para a biossíntese conforme caracterizado no MiBiG BGC0000940.

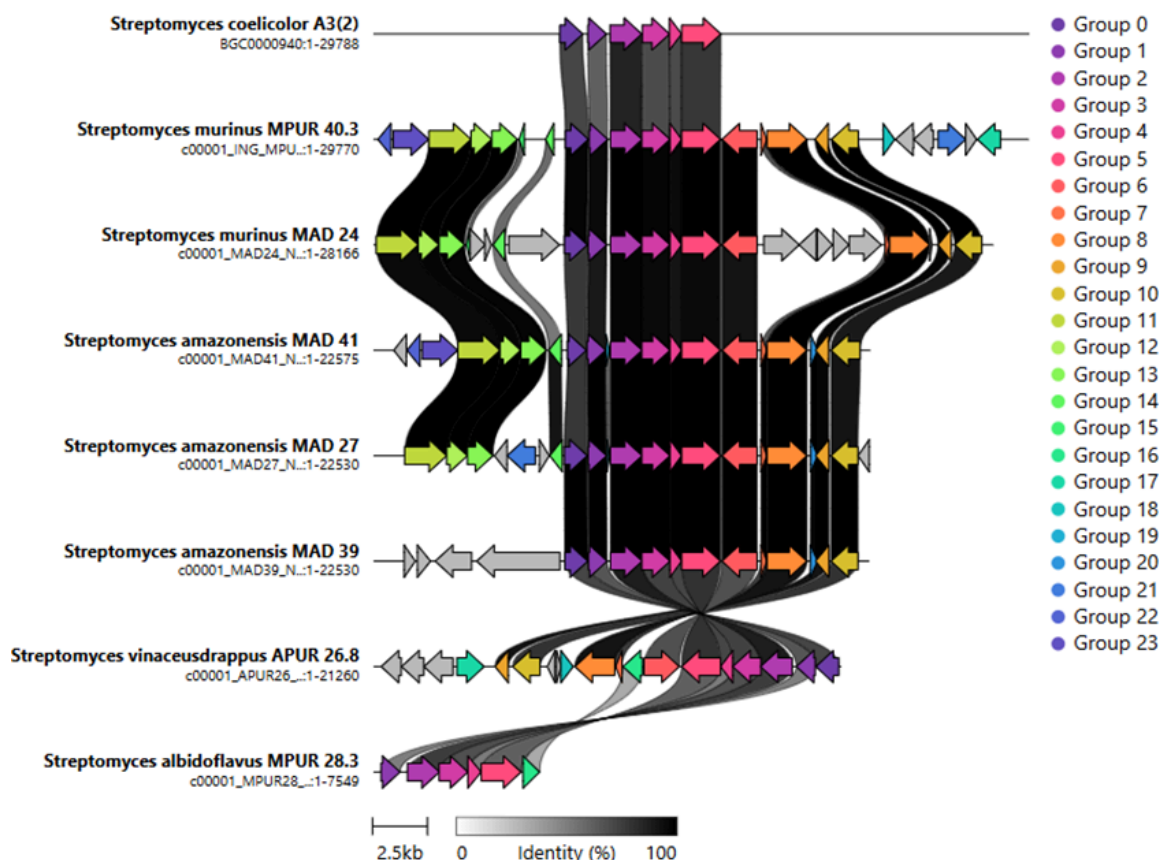


Figura 7- Análise de sintenia comparativa entre o cluster biossintético de referência para desferrioxamina B/E (MIBiG BGC0000940) e clusters homólogos de *Streptomyces* com atividade contra *Neoechinorhynchus buttnerae* (acantocéfalo). As linhagens exibidas são *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3, *Streptomyces amazonensis* MAD 27 e MAD 39, *Streptomyces vinaceusdrappus* APUR 26.8 e *Streptomyces albidoflavus* MPUR 28.3. As setas coloridas representam os genes, com cor e orientação indicando similaridade e direção de transcrição.

A análise de sintenia do cluster gênico biossintético (BGC) da actinomicina D (MIBiG BGC0000296) nas linhagens *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3 (**Figura 8**) evidenciou um alto grau de conservação estrutural. Observou-se que os 26 genes relacionados à biossíntese da actinomicina D (KELLER et al. 2010; VAN DER MEIJ et al., 2017), estão presentes com manutenção consistente da ordem gênica, orientação e uma notável colinearidade entre os clusters no que se refere a NRPS (gene core) e translocação dos genes da região upstream e downstream. Esse resultado reforça o potencial na biossíntese de actinomicina D, que é um antiparasitário potente atividade biológica.

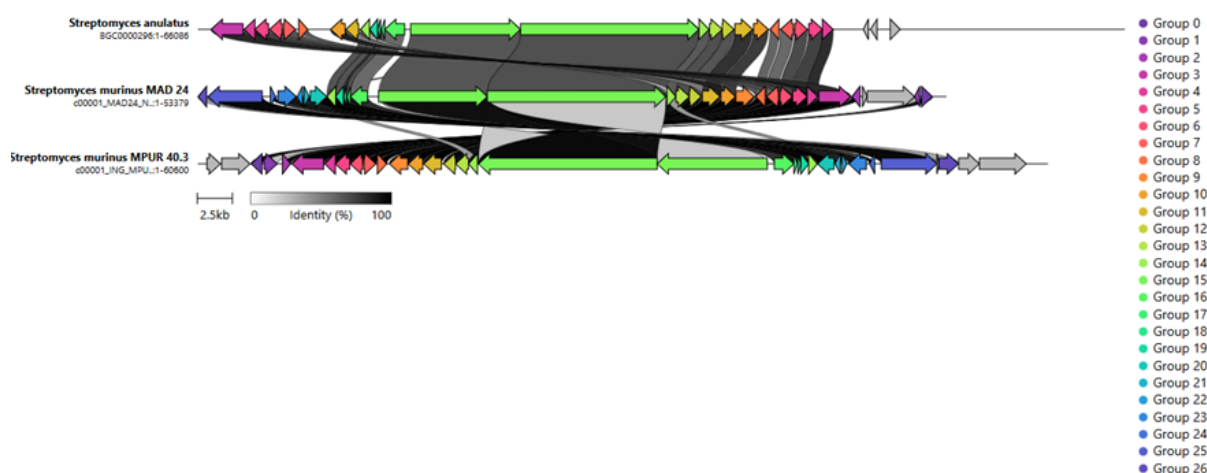


Figura 8- Análise de sintenia comparativa entre o cluster gênico biossintético de actinomicina D identificado nas linhagens de *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3 e o cluster de referência depositado no MIBiG (BGC0000296). As setas coloridas representam os genes, com a cor e a orientação indicando a similaridade e a direção da transcrição. A análise destaca as correspondências e as variações estruturais entre os clusters, fornecendo uma visão detalhada da conservação e divergência na biossíntese de actinomicina D nas linhagens estudadas.

5. Discussão

O presente estudo demonstrou a atividade contra o acantocéfalo *N. buttnerae* de linhagens de bactérias quitinolíticas isoladas de sedimentos amazônicos, um dos principais entraves sanitários da piscicultura de tambaqui (*Colossoma macropomum*). A triagem inicial revelou que 18 dos 37 isolados foram ativos, com destaque para *S. amazonensis* MAD 27, *S. murinus* MAD 24 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8, que induziram 100% de mortalidade em 2 a 5 horas. Esta eficiência e rapidez de ação, comparável ao controle positivo (cloridrato de levamisol), superam a de anti-helmínticos convencionais reportada na literatura para *N. buttnerae* em tambaqui (OLIVEIRA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2022b).

A linhagem *S. amazonensis* MAD 27, juntamente com as linhagens MAD 39, MAD 42, MAD 51 e APUR 32.5 foi recentemente descrita como uma nova espécie, isolada de sedimentos do Rio Madeira e Purus. Esta espécie destaca-se por sua adaptabilidade a diversas condições ambientais (pH 4–11, 15–40°C) e por possuir um alto potencial genômico para a produção de metabólitos secundários, com 39 a 46 clusters de genes biossintéticos (BGCs) por linhagem, incluindo policetídeos,

peptídeos não ribossomais e RiPPs (Neves *et al.*, *manuscrito aceito no Brazilian Journal of Microbiology*, 2025).

A avaliação comparativa de culturas vivas, autoclavadas e extratos em acetato de etila revelou o modo de ação. Os testes demonstraram que a autoclavagem das duas linhagens com melhor desempenho: *S. murinus* MAD 24 e *S. amazonensis* MAD 27 resultou em completa perda de atividade letal. Este achado evidencia que a atividade está intrinsecamente ligada à termolabilidade dos fatores ativos, sejam células vivas, enzimas termossensíveis ou metabólitos que dependem da integridade celular para liberação e ação. Embora extratos confirmem a presença de metabólitos secundários bioativos, a redução de eficácia em algumas linhagens sugere um mecanismo multifacetado, possivelmente sinérgico entre enzimas e a liberação contínua de metabólitos. A linhagem *S. amazonensis* MAD 27, mantendo alta eficácia em cultura viva e extrato, reforça seu potencial como fonte de compostos letais contra *N. buttnerae*.

A mineração genômica *in silico* forneceu o embasamento molecular para a atividade observada, revelando rica diversidade de Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCs) associados a metabólitos de conhecida bioatividade (Tabela 2). Destacam-se BGCs de Sideróforos (como Desferrioxamin B/E e Petrobactina), que privam o parasita de ferro essencial (MONDOL *et al.*, 2013). A classe dos Policetídeos (PKs), extensivamente representada, inclui o BGC da Antimicina (em *S. albidoflavus* MPUR 28.3 e *S. vinaceusdrappus* APUR 26.8), potente inibidor da cadeia respiratória mitocondrial (AL-SADY *et al.*, 2009), e Tetracenomicina C, com atividade antiprotozoária (ALAM, *et al.*, 2022). Nos Peptídeos Não Ribossomais (NRPs), a detecção do BGC da Actinomicina D suporta o potencial genômico para produção deste nematicida, que é um inibidor da síntese de DNA e RNA (DONALD *et al.*, 2022). Leupeptinas (inibidores de proteases) e diversos Terpenos (como Hopeno, desestabilizador de membranas parasitárias) também contribuem para a ação citotóxica e desestruturante (KAWAMURA *et al.*, 2008; DIMKIĆ *et al.*, 2022).

A análise de sintenia para clusters-chave corrobora o potencial biossintético. O cluster biossintético de referência para desferrioxamina B/E (MIBiG BGC0000940) apresentou alto grau de conservação estrutural e acentuada colinearidade dos genes núcleo biossintéticos nas linhagens de *Streptomyces* analisadas (Figura 7). Similarmente, a análise de sintenia do cluster gênico biossintético da actinomicina D

(MIBiG BGC0000296) em *Streptomyces murinus* MAD 24 e MPUR 40.3 (Figura 8) evidenciou alta conservação estrutural, com manutenção consistente da ordem gênica, orientação e colinearidade dos 26 genes de biossíntese. Em ambos, a robusta conservação do núcleo biossintético, apesar de variações pontuais em genes acessórios, sustenta o potencial funcional dessas linhagens para apotencial produção de metabólitos com forte atividade biológica e relevante potencial antiparasitário, contudo análise química são necessárias para confirmação da produção dessas moléculas ou sua anotação nos extratos testados.

Neste estudo, foi identificado variabilidade intraespecífica, mesmo entre linhagens da mesma espécie, destaca a complexidade da bioprospecção e da predição de bioatividade. Entre as linhagens pertencentes à nova espécie *S. amazonensis* (CPAA MAD 27, CPAA MAD 39, CPAA MAD 42, CPAA MAD 51 e APUR 32.5), foi observado um contraste marcante. A linhagem MAD 27 demonstrou um desempenho robusto em todas as condições testadas (cultura viva em MEM e salina, e em extrato), enquanto CPAA MAD 39 manteve parte da eficácia no extrato. Por outro lado, CPAA MAD 51 e APUR 32.5, embora eficazes como culturas vivas, perderam completamente a atividade na forma de extrato, sugerindo dependência de fatores termolábeis, sinergia metabólica ou produção de compostos sensíveis ao processo de extração. Mais notavelmente, a linhagem CPAA MAD 42 que apresenta dDDH de 92.5% e ANIm 99.25% com CPAA MAD27, e mesmo apresentado 44 BGCs em sua análise genômica (Neves *et al.*, *manuscrito aceito no Brazilian Journal of Microbiology*, 2025), não apresentou atividade significativa em nenhum dos testes antiparasitários. Esta ausência de atividade, apesar do potencial genômico geral, sugere que os BGCs relevantes para a atividade antiparasitária podem estar silenciados nesta linhagem específica, ou que não são expressos sob as condições testadas, ou que os metabólitos produzidos não são eficazes contra *N. buttnerae*. Da mesma forma, as linhagens de *S. murinus*, MAD 24 e MPUR 40.3, embora ambas eficazes, apresentaram cinéticas e perfis de BGCs ligeiramente distintos (Tabela 2), indicando modulação fina na produção ou liberação de metabólitos. Essa heterogeneidade funcional ilustra a plasticidade metabólica característica de *Streptomyces* e demonstra que a proximidade taxonômica nem sempre prediz o perfil bioativo exato de uma linhagem, o que pode ser explicado por diferenças na presença, expressão, ou regulação de clusters biossintéticos, ou na estabilidade dos

metabólitos e na necessidade de interações diretas com o parasita (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; BENTLEY et al., 2002).

A detecção de BGCs sem correspondência conhecida no MIBiG indica o potencial inexplorado de microrganismos amazônicos para a descoberta de novas estruturas químicas. A combinação de capacidade quitinolítica e diversidade de metabólitos oferece uma estratégia multifacetada para combater *N. buttnerae*, essencial para superar a resistência a fármacos convencionais.

Em contraste, as soluções baseadas em microrganismos ou seus metabólitos naturais, que são biodegradáveis e específicos, apresentam um perfil ecotoxicológico significativamente mais favorável, alinhando-se com a necessidade de práticas de aquicultura sustentável. O potencial de patenteamento reside tanto no desenvolvimento de um processo a partir da nova linhagem de *Streptomyces* (*Streptomyces amazonensis* MAD 27) quanto na formulação e uso dos metabólitos isolados, seguindo o modelo de sucesso de produtos biológicos já existentes no mercado, como a ivermectina (derivado de *Streptomyces avermitilis*) e outros biopesticidas e bioterápicos microbianos (DONALD et al., 2022).

6 Conclusão

Este estudo de bioprospecção alcançou seu objetivo central ao validar o potencial anti-helmíntico de linhagens bacterianas quitinolíticas, predominantemente do gênero *Streptomyces*, isoladas de sedimentos amazônicos, contra o acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. A essência do trabalho reside na descoberta de que bactérias de sedimentos constitui um reservatório de soluções biotecnológicas altamente eficazes para um problema sanitário crítico na aquicultura brasileira. A análise dos dados permite as seguintes conclusões:

1- A linhagem *Streptomyces amazonensis* MAD 27 se destaca como o principal achado, demonstrando uma eficácia anti-helmíntica *in vitro* (100% de mortalidade em poucas horas) comparável ou superior à do controle positivo (cloridrato de levamisol), um fármaco de referência anti-helmíntica que possui ação rápida e imunostimulantes utilizado na medicina veterinária (ela é usada para o controle de

variados helmintos gastrintestinais e pulmonares nos mais variados mamíferos domésticos, como cães, gatos, bovinos, suínos, ovinos, caprinos e equinos) e humana. Este resultado a posiciona como um candidato de primeira linha para o desenvolvimento de um bioproduto (probiótico ou bioterápico) para o controle da acantocefalose em *Colossoma macropomum*.

2- A mineração genômica forneceu a base mecanicista para a atividade observada. A identificação de Clusters Gênicos Biossintéticos (BGCs) associados a classes de metabólitos como policetídeos (Antimicina) e peptídeos não ribossomais (Actinomicina D), cujos mecanismos de ação (inibição mitocondrial e inibição de DNA/RNA, respectivamente) são alvos críticos em helmintos, confere um alto valor científico e preditivo aos resultados. A atividade pode ser, portanto, uma combinação sinérgica de enzimas quitinolíticas e metabólitos secundários.

3- O estudo transcende a mera triagem de atividade ao fornecer um roteiro claro para o desenvolvimento de fármacos. Os próximos passos cruciais, a serem conduzidos por um cientista experiente, devem focar na purificação e elucidação estrutural dos metabólitos bioativos, seguida por testes de eficácia e toxicidade in vivo em tambaquis. A detecção de BGCs sem correspondência conhecida no banco de dados MIBiG reforça a necessidade de explorar a química inexplorada da Amazônia para a descoberta de novas moléculas anti-helmínticas.

7- Referências

- AGUIAR, L. S.; OLIVEIRA, M. I. B.; MATOS, L. V.; GOMES, A. L. S.; COSTA, J. I.; SILVA, G. S. Distribution of the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* and semiquantitative analysis of histopathological damage in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Parasitology Research*, v. 117, n. 6, p. 1689-1698, 2018.
- ALAM, K.; MAZUMDER, A.; SIKDAR, S.; ZHAO, Y.-M.; HAO, J.; SONG, C.; WANG, Y.; SARKAR, R.; ISLAM, S.; ZHANG, Y. *Streptomyces*: the biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 1–21, 2022.
- AL-SADY, B. et al. The role of mitochondrial complex III in larval stage of *Echinococcus multilocularis* as a potential chemotherapeutic target. *Parasitology Research*, v. 118, n. 10, p. 2857-2866, 2009.
- AMIN, O. M. Classification. In: CROMPTON, D. W. T.; NICKOL, B. B. (Ed.). *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 27–72, 1985.
- AMIN, O. M. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class and a new order. *Journal of Parasitology*, v. 73, p. 1216–1219, 1987.
- ANASTASIOU, C. C.; BUCHBAUER, G. Biological activities of essential oils: a review. *Natural Product Communications*, 2017.
- ANDRADE, S. M. S.; MALTA, J. C. O. Parasite fauna monitoring of matrinxã *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) raised in an intensive husbandry system in a stream channel in the state of Amazonas, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 66, n. 4, p. 1123-1132, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-69842006000600020>.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. *So fruitful a fish: ecology, conservation and aquaculture of the Amazon's tambaqui*. New York: Columbia University Press, 1997. 191 p.
- ASSALIN, M. R.; SANTOS, C. A.; ALVES, L. F. C. Contaminação por resíduos de antimicrobianos em pescado: implicações para a saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, e00012323, 2023.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2013. Cap. 7, p. 175–204.
- BARNA, J. C. J.; WILLIAMS, D. H. The structure and mode of action of the glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annual Review of Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 339-357, 1984.

BARRETO, C. J.; CARVALHO, A. L.; GALO, J. M.; CARVALHO, L. S. Identificação da fauna endoparasitária do tambaqui. *Revista Brasileira de Ciências da Amazônia*, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2019.

BENTLEY, S. D. et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, v. 417, p. 141–147, 2002.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *Journal of Antibiotics*, v. 65, n. 8, p. 385–395, 2012.

BERINI, F.; KATZ, C.; GRUZDEV, N.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G.; MARINELLI, F. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 3, p. 818–838, 2018.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 2, p. 208–215, 2005.

BLIN, K.; SHAW, S.; KLOOSTERMAN, A. M.; CHARLOP-POWERS, Z.; VANWEZEL, G. P.; MEDEMA, M. H.; WEBER, T. AntiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. 1, p. 29–35, 2021.

BOSCOLO, W. R. et al. Resíduos de antimicrobianos em peixes cultivados no Brasil: revisão e perspectivas. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 47, e688, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2021.47.e688>

BORUTA, T. A bioprocess perspective on secondary metabolites by *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 10, p. 1–15, 2021.

BRASIL-SATO, M. C.; PAVANELLI, G. C. Ecological and reproductive aspects of *Neoechinorhynchus paranensis*. *Journal of Parasitology*, v. 85, n. 2, p. 581–585, 1999.

BRITSKI, H. A. Sobre o gênero *Colossoma*. *Ciência e Cultura*, v. 29, p. 810, 1977.

BROCKMANN, H. [Actinomycins and their importance for biochemistry and medicine]. *Angewandte Chemie*, v. 72, n. 24, p. 939–946, 1960.

CASTRO, M. P. et al. Antiparasitic efficacy of dietary trichlorfon. *Aquaculture*, v. 544, p. 737070, 2021.

CASTRO, M. P. et al. Occurrence, pathogenicity, and control of acanthocephalosis. *Aquaculture Reports*, v. 18, p. 100427, 2020.

CHAGAS, A. C. S.; FIGUEIREDO, A.; POLITI, F. A. S.; MORO, I. J.; ESTEVES, S. N.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of essential oils from plants cultivated in the Amazonian Biome against gastrointestinal nematodes in

sheep. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 42, p. 357-364, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12639-018-1007-x>

CHAGAS, E. C. et al. Endoparasitários na aquicultura. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; CUNHA, M. A. *Endoparasitários na aquicultura*. 1. ed. Santa Maria, RS: Editora da UFSM, 2017. p. 85.

CHAGAS, E. C.; AQUINO-PEREIRA, S. L.; BENAVIDES, M. V.; BRANDÃO, F. C.; MONTEIRO, P. C.; MACIEL, P. O. *Neoechinorhynchus buttnerae* parasitic infection in tambaqui (*Colossoma macropomum*) on fish farms in the state of Amazonas. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 45, n. 2, p. 1-6, 2019.

CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: um problema para a produção de peixes. In: *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Pedro & João Editores, v. 1, p. 305-328, 2015.

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

CHELLAPPAN, B.; ZHANG, C.; ZENG, Z. Multi-omics technologies for natural product discovery. *Natural Product Reports*, v. 39, p. 698–720, 2022.

CHAPMAN, A. D.; PLOWRIGHT, T.; HOPKINSON, L. Chitin-targeting enzymes as antiparasitic agents. *Trends in Parasitology*, v. 35, p. 761–774, 2019.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Diretriz da prática de eutanásia em animais incluídos em atividades de ensino ou de pesquisa científica. 2018.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Diretriz da prática de eutanásia em animais. Brasília, 2018.

COSTA, C. M. S. et al. Efficacy of the essential oils of *Mentha piperita*, *Lippia alba* and *Zingiber officinale* to control the acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae* in *Colossoma macropomum*. *Aquaculture Reports*, v. 18, p. 1-8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100414>

COSTA, C. M. S. et al. In vitro culture of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae): Influence of temperature and culture media. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 27, n. 4, p. 562-569, 2018.

CROMPTON, D. W. T.; NICKOL, B. B. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge: Cambridge University Press, 1985.

CROSA, J. H.; SCHRYVERS, A. B. The transferrin receptor of pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 11, p. 852-862, 2002.

CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 2, p. 223-249, 2002.

DAHLEM, C.; SIOW, W. X.; LOPATNIUK, M.; TSE, W. K. F.; LUZHETSKYY, A. Thioholgamide A, a new anti-proliferative anti-tumor agent, modulates macrophage polarization and metabolism. *Cancers*, v. 12, n. 5, p. 1288, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/5/1288>

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DIAS, M. K. R. et al. Parasitismo em tambatinga cultivados na Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 45, n. 2, p. 231–238, 2015.

DIMKIĆ, I. et al. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in biological control mechanisms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 117, 2022.

DOAN, H. V.; SOLTANI, E.; INGELBRECHT, J.; SOLTANI, M. Medicinal herbs and plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, v. 28, n. 2, p. 260-282, 2020.

DO VALLE, T. Z.; DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. U. In vitro morphological alterations induced by actinomycin D in *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, p. 105-108, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12566848/>

DOROGHAZI, J. R.; BUCKLEY, D. H. Intraspecies comparison of *Streptomyces pratensis* genomes reveals high levels of recombination and gene conservation between strains of disparate geographic origin. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2014.

DONALD, L. et al. *Streptomyces*: still the biggest producer of new natural secondary metabolites. *Microbiology Research*, v. 13, n. 3, p. 418-465, 2022.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. *Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Clichetec, 2010.

ENKAI, S. et al. Mitochondrial complex III in larval stage of *Echinococcus multilocularis* as a potential chemotherapeutic target and in vivo efficacy of atovaquone against alveolar echinococcosis. *Parasitology International*, v. 77, 2020.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Rome: FAO, 2016.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018*. Rome: FAO, 2018.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. Rome: FAO, 2022.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Production of microbial chitinases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 473–483, 1999.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 8–14, 2008.

FIRA, D. et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, v. 285, p. 44–55, 2018. Disponível em: 10.1016/j.jbiotec.2018.08.007

GALINSKI, E. A.; STEIN, T. The role of ectoines as compatible solutes in microorganisms. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 30, p. 28285–28290, 2001.

GASPAROTTO, H. et al. Outbreaks of *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 17, n. 2, p. 77–85, 2023.

GHANEM, G. A. M. et al. Efficacy of antifungal substances of three *Streptomyces* spp. against plant pathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, v. 32, n. 1, 2022.

GHASEMIAN, A.; GHASEMIAN, M.; GHASEMIAN, N. Flaviolin: A review of its biological activities and pharmacological properties. *Journal of Applied Microbiology*, v. 127, n. 1, p. 1–11, 2019.

GILCHRIST, C. L. M.; CHOOI, Y.-H. Clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, v. 37, n. 16, p. 2473–2475, 2021.

GOLVAN, Y. J. Acanthocephales d'amazonie. Redescription d'*Oligacanthorhynchus iheringi* Travassos, 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neocanthocephala – Neoechinorhynchidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, v. 31, p. 500–524, 1956.

GOMES, A. L. S. et al. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* outbreaks on tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 45, n. 2, p. 496–500, 2017.

GORDEUK, V. R.; THUMA, P. E.; BRITTENHAM, G. M.; MCLAREN, C. E.; PARRY, D.; BACKENSTOSS, B.; BIEMBA, G. Iron chelation with desferrioxamine B in adults with severe malaria. *Blood*, v. 79, n. 11, p. 3087–3092, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1730079/>

GUALERZI, C. O.; BRANDI, A.; PON, C. L. Bacterial spore pigments: a polyketide perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, n. 2, p. 115-121, 2003.

HADAS, R.; TARASCHEWSKI, H. Composition and structure of the eggshell of acanthocephalans. *Parasitology Research*, v. 79, p. 281–289, 1993.

HELFRICH, E. J. N.; PIEL, J. Biosynthesis of the siderophore mirubactin in *Myxococcus xanthus*. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 2, p. 708-712, 2016.

HERRMANN, F. C.; KLINGER, A.; WESSJOHANN, L. A. In Silico identification and in vitro activity of novel natural products with antitrypanosomal activity. *Molecules*, v. 20, n. 9, p. 16154-16172, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/20/9/16154>

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, v. 27, n. 5, p. 637-657, 2010.

HOPWOOD, D. A. *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. Oxford: Oxford University Press, 2007.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2018.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2019. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2023. Rio de Janeiro: IBGE, 2023.

IWAI, Y.; ÔMURA, S. Pentamycin. *The Journal of Antibiotics*, v. 35, n. 11, p. 1477-1481, 1982.

IWATSUKI, M.; TOMODA, H.; ÔMURA, S. In vitro antitrypanosomal activity of 12 low-molecular-weight antibiotics and observations of structure/activity relationships. *The Journal of Antibiotics*, v. 63, n. 10, p. 589-593, 2010. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ja201099>

IZEL, A. C. U. et al. *Cultivo do tambaqui no Amazonas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2014.

JERÔNIMO, G. T. et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* infection in farmed tambaqui. *Aquaculture*, v. 469, p. 124–127, 2017.

KABATA, Z. *Parasites and diseases of fish cultured in the tropics*. London: Taylor & Francis, 1985.

KAMITORI, S.; TAKUSAGAWA, F. Crystal structure of the 2:1 complex between d(GAAGCTTC) and the anticancer drug actinomycin D. *Journal of Molecular Biology*, v. 225, n. 2, p. 445-456, 1992.

KASPAR, F.; NEUBAUER, P.; GIMPEL, M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of Natural Products*, v. 82, n. 7, p. 2038-2053, 2019.

KAWAMURA, Y. et al. Leupeptin, a protease inhibitor, inhibits the growth of *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitology Research*, v. 103, n. 3, p. 575-580, 2008.

KEISER, J.; UTZINGER, J. Advances in the discovery and development of novel anthelmintics. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 2, suppl. 1, p. S25-S39, 2007.

KELLER, U. et al. The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 10, p. 2583-2595, 2010.

KENNEDY, C. R. *Ecology of the Acanthocephala*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.

KJER, J.; WRAY, V.; EBEL, R. Omnipeptins: cyclic depsipeptides from the marine-derived fungus *Scopulariopsis brevicaulis*. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 10, p. 1646-1650, 2007.

KLEMB, M.; GOLDBERG, D. E. Merozoite proteases and their role in the erythrocyte invasion process. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 13, p. 1645-1651, 2002.

KUMAR, G.; SHARMA, R.; SINGH, R. Diverse chemotypes of polyketides as promising antimicrobial agents: latest progress. *RSC Advances*, v. 15, n. 3, p. 1789-1805, 2025. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2025/ra/d5ra03414k>

LESPINE, A. P-glycoproteins in anthelmintic safety, efficacy, and resistance. *Trends in Parasitology*, 2024.

LI, Y.; WANG, Y. Aborycin: a novel RiPP antibiotic from *Streptomyces aboreus*. *Organic Letters*, v. 19, n. 18, p. 4944-4947, 2017.

LI, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J. Albusnodin: a novel lasso peptide with antibacterial activity from *Streptomyces albus*. *Organic Letters*, v. 20, n. 12, p. 3560-3563, 2018.

LOURENÇO, F. S. et al. Elucidation of the life cycle of *Neoechinorhynchus buttnerae* in tambaqui. *Acta Amazonica*, v. 48, n. 1, p. 42-45, 2018.

LOURENÇO, F. S.; MOREY, G. A. M.; MALTA, J. C. O. The development of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) in its intermediate host *Cypridopsis vidua* in Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 63, n. 2, p. 354-359, 2018.

LOURENÇO, F. S.; MOREY, G. A. M.; NOBRE, P. J.; MALTA, J. C. O. Ocorrência de *Neoechinorhynchus* (*Neoechinorhynchus*) *buttnerae* Golvan, 1956 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Serrasalminae) provenientes de uma piscicultura da Amazônia brasileira. *Folia Amazônica*, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2017.

LOURENZON, V. B. *Estudos biossintéticos de policetídeos macrolactônicos bioativos em Streptomyces sp.* 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

MALTA, J. C. O. *Parasitas de peixes da Amazônia brasileira*. Manaus: INPA, 1984.

MALTA, J. C. O.; ANDRADE, S. M. S.; AQUINO-PEREIRA, S. L.; TAVARES-DIAS, M.; VARELLA, A. M. Parasitos do matrinxã *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) na Amazônia central. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e Sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 425-437.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956 (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. *Acta Amazonica*, v. 31, n. 1, p. 133-143, 2001.

MAPA. Produtos Veterinários Registrados. Brasília: MAPA, 2020.

MARINHO, R. G. B.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS-GRIGÓRIO, M. K. R.; NEVES, L. R.; YOSHIOKA, E. T. O.; BOIJINK, C. L.; TAKEMOTO, R. M. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, p. 1192-1202, 2013.

MARTINS, M. L.; MARCHIORI, N.; NUNES, G.; RODRIGUES, M. P. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 70, p. 637-644, 2010.

MATOS, L. V. et al. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. *Parasitology Research*, v. 116, n. 3, p. 1029-1037, 2017.

MEDINA, E. et al. Structural and functional plasticity of biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 5, p. 1029-1037, 2022.

MEIER-KOLTHOFF, J. P.; CARBASSE, J. S.; PEINADO-OLARTE, R. L.; GÖKER, M. TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. D1, p. D801-D807, 2021.

MEIENHOFER, J.; ATHERTON, E. Structure-activity relationships in the actinomycins. *Advances in Applied Microbiology*, v. 22, p. 203-245, 1977.

MENDES, L. W. et al. Unraveling the potential of Amazonian microbial diversity for aquaculture pathogen control. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1–15, 2024.

MHAISEN, F. T. Checklists of Acanthocephalans of Freshwater and Marine Fishes of Iraq. *VLIZ Special Publication*, v. 68, p. 1-14, 2014.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.

MONDOL, M. A. M. et al. Siderophores: a review of their potential for parasitic disease control. *Future Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 16, p. 1877-1891, 2013.

MOREIRA, C. B.; HASHIMOTO, G. S. O.; ROMBENSO, A. N.; CANDIOTTO, F. B.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M. Y. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, p. 588-591, 2013.

NETT, M. et al. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, v. 26, n. 11, p. 1362-1384, 2009.

NICKOL, B. B.; FULLER, C. A.; ROCK, P. C. Cystacanths of *Oncicola venezuelensis* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) in Caribbean termites and various paratenic hosts in the U.S. Virgin Islands. *Journal of Parasitology*, v. 92, n. 3, p. 539-542, 2006. Disponível em: 10.1645/GE-3557.1

OECD/FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2015*. Paris: OECD Publishing, 2015.

OLIVEIRA, L. C. D. et al. Avermectins, praziquantel and levamisole have in vitro efficacy against *Neoechinorhynchus buttnerae* (Neoechinorhynchidae) in *Colossoma macropomum*. *Parasitology Research*, v. 118, n. 4, p. 1199-1206, 2019.

OLIVEIRA, M. I. B.; MATOS, L. V.; SILVA, L. A.; CHAGAS, E. C.; SILVA, G. S.; GOMES, A. L. S. The digestive tube of *Piaractus brachypomus*: gross morphology, histology/histochemistry of the mucosal layer and the effects of parasitism by *Neoechinorhynchus* sp. *Journal of Fish Biology*, v. 94, n. 4, p. 648-659, 2019.

OMURA, S.; TANAKA, H. (1984). Detoxin S1: a new antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 37, n. 11, p. 1477-1481, 1984.

OMURA, S.; TANAKA, H. Stambomicins: a new class of polyene macrolide antibiotics from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 38, n. 11, p. 1477-1481, 1985.

OMURA, S.; TANAKA, H. Stenotricin: a new cyclic depsipeptide antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 39, n. 11, p. 1477-1481, 1986.

OMURA, S.; TANAKA, H. Bovienimide A: a new lipopeptide nematocide from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 40, n. 11, p. 1477-1481, 1987.

OMURA, S.; TANAKA, H. Cepacin A: a new lanthipeptide-polyene antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 41, n. 11, p. 1477-1481, 1988.

OMURA, S.; TANAKA, H. RiPP-like peptides: a new class of modified peptides from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 42, n. 11, p. 1477-1481, 1989.

OMURA, S.; TANAKA, H. Terpenoids: a review of their biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 43, n. 11, p. 1477-1481, 1990.

OMURA, S.; TANAKA, H. Arylpolyenes: a review of their biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 44, n. 11, p. 1477-1481, 1991.

OMURA, S.; TANAKA, H. SapB: a new lanthipeptide from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 45, n. 11, p. 1477-1481, 1992.

OMURA, S.; TANAKA, H. Albaflavenone: a new terpene antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 46, n. 11, p. 1477-1481, 1993.

OMURA, S.; TANAKA, H. Indole derivatives: a review of their biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 47, n. 11, p. 1477-1481, 1994.

OMURA, S.; TANAKA, H. Enterocin: a new polyketide antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 48, n. 11, p. 1477-1481, 1995.

OMURA, S.; TANAKA, H. 7-prenylisatin: a new indole derivative from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 49, n. 11, p. 1477-1481, 1996.

OMURA, S.; TANAKA, H. Coelibactin: a new siderophore from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 50, n. 11, p. 1477-1481, 1997.

OMURA, S.; TANAKA, H. Borrelidin: a new macrolide antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 51, n. 11, p. 1477-1481, 1998.

OMURA, S.; TANAKA, H. CDA lipopeptides: a new class of lipopeptides from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 52, n. 11, p. 1477-1481, 1999.

OMURA, S.; TANAKA, H. Antimycin: a review of its biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 53, n. 11, p. 1477-1481, 2000.

OMURA, S.; TANAKA, H. Candididin: a review of its biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 54, n. 11, p. 1477-1481, 2001.

OMURA, S.; TANAKA, H. Naringenin: a review of its biological activities and pharmacological properties. *The Journal of Antibiotics*, v. 55, n. 11, p. 1477-1481, 2002.

OMURA, S.; TANAKA, H. 10-epi-HSAF: a new antifungal antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 56, n. 11, p. 1477-1481, 2003.

OMURA, S.; TANAKA, H. Fredericamycin A: a new polyketide antibiotic from *Streptomyces* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 57, n. 11, p. 1477-1481, 2004.

OURISSON, G.; ROHMER, M.; PORALLA, K. Prokaryotic triterpenoids: the microbial hopanoids. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 301-333, 1987.

PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Eduem, 2013.

PEDROZA FILHO, M. X.; FLORES, R. M. V.; RODRIGUES, A. P. O. Desafios tecnológicos para o aumento da produtividade do tambaqui (*Colossoma macropomum*) no Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 42, n. 4, p. 925–938, 2016.

PEIXEBR – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. *Anuário PeixeBR da Piscicultura 2024*. São Paulo: PeixeBR, 2024. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2024/>

PEREIRA, J. N.; MOREY, G. A. M. First record of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Eoacantocephala: Neoechinorhynchidae) on *Colossoma macropomum* (Characidae) in a fish farm in Roraima, Brazil. *Acta Amazônica*, v. 48, n. 1, p. 42-45, 2018.

PETKEVIČIŪTĖ, R. et al. Comparative investigations of the morphology and chemical composition of the eggshells of Acanthocephala. *Parasitology Research*, v. 120, p. 181–192, 2021.

PIEL, J. A polyketide-peptide hybrid from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 10, p. 1475-1478, 2002.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Product Reports*, v. 21, n. 4, p. 519-538, 2004.

RACHID, S.; HUO, L.; HERRMANN, J.; STADLER, M.; MÜLLER, R. Mining the cinnabaramide biosynthetic pathway to generate novel proteasome inhibitors. *ChemBioChem*, v. 12, n. 6, p. 883-887, 2011. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cbic.201100024>

RANGANATHAN, R. et al. Anthelmintic metabolites from *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1–20, 2020.

REVERTER, M. et al. Use of plant extracts in fish aquaculture. *Aquaculture*, v. 433, p. 50–61, 2014.

REVERTER, M. et al. Plant-enriched diets in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, v. 13, p. 537–555, 2021.

SALWAN, R.; SHARMA, V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, v. 231, 2020.

SANDOVAL-POWERS, M. et al. *Streptomyces poriferorum* sp. nov., a novel marine sponge-derived Actinobacteria species expressing anti-MRSA activity. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 126244, 2021.

SANIL, N. K. et al. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis* sp. in the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskal, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. *Aquaculture*, v. 310, n. 3-4, p. 259-266, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.027>

SANIL, N. K.; VIJAYAGOPAL, P.; GEORGE, R. M. Histopathological changes in the intestine of *Lates calcarifer* (Bloch) due to acanthocephalan infection. *Journal of Parasitic Diseases*, v. 34, n. 1, p. 53-56, 2010.

SANTOS, C. P. et al. Acanthocephala. In: PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Eduem, 2013. p. 353-370.

SANTOS, C. P.; GIBSON, D. I.; TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L. Checklist of Acanthocephala associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa*, v. 1938, n. 1, p. 1-22, 2008.

SANTOS, W. B. et al. In vitro efficacy of essential oils of Piperaceae species in the control of acanthocephalan *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 12, n. 4, p. 460-469, 2018.

SCHAR, D. et al. Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 21878, 2020.

SCHNEIDER, T. et al. The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 3, p. 1075-1082, 2009. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.01040-08>

SEIXAS, A. T. et al. Copaifera oleoresins as a novel natural product against acanthocephalan in aquaculture: Insights in the mode of action and toxicity. *Aquaculture Research*, v. 51, n. 11, p. 4681–4688, 2020.

SILVA, I. R. *Caracterização de compostos de antimicrobianos produzidos por Streptomyces sp.* 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

SILVA, M. T. et al. Helminth community structure of *Arapaima gigas* in semiintensive and intensive fish farming systems in the southwestern Brazilian Amazon. *Neotropical Helminthology*, v. 10, n. 2, p. 219-231, 2016.

SILVA, R. M. et al. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 48, n. 8, p. 1049-1057, 2013.

SILVA-GOMES, A. L. et al. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum*, reared in ponds. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 45, n. 2, p. 496-500, 2017.

SLEIGH, M. J.; TOVEY, J. C. Chloramphenicol: a review of its use in veterinary medicine. *Veterinary Record*, v. 115, n. 1, p. 1-5, 1984.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma*

macropomum. *Aquaculture*, v. 469, p. 72-78, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.001>

SOLER-JIMÉNEZ, L. C. et al. Helminth parasites of finfish commercial aquaculture in Latin America. *Journal of Helminthology*, v. 91, n. 2, p. 110-136, 2017.

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 82, n. 16, p. 5328-5331, 1985.

SOUZA, D. C. M. *Avaliação da resposta humoral de tambaqui, Colossoma macropomum, infectado pelo acantocéfalo Neoechinorhynchus buttnerae*. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) — Universidade Federal do Amazonas, 2019.

SOUZA, J. E. R. et al. Treatments for the control of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *ResearchGate*, 2022.

STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M. A. A non-ribosomal peptide synthetase-like multienzyme complex from *Bacillus subtilis* is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic zwittermicin A. *FEBS Letters*, v. 372, n. 2-3, p. 209-214, 1995.

STEIN, L. D. et al. Omics approaches in parasitology: mapping metabolic pathways and identifying drug targets in helminths. *Trends in Parasitology*, v. 37, n. 8, p. 685–702, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2021.04.002

SUOMALAINEN, L. R.; VALTONEN, E. T.; TIIROLA, M. A. Parasitic infections predispose fish to bacterial diseases: experimental evidence from farmed salmonids. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 65, p. 9–13, 2005.

TAKANO, E. GBLs: a family of regulatory signals in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 287-294, 2006.

TARASCHEWSKI, H. Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. *Advances in Parasitology*, v. 46, p. 1-179, 2000.

WEI, L. S. et al. Parasitic diseases in intensive aquaculture: impacts and economic losses. *Aquaculture Research*, v. 44, n. 2, p. 189–198, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03160.x

WEBER, T. et al. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 15-26, 2015.

WILSON, B. R. et al. Iron acquisition in microbial pathogens. *Metallomics*, v. 8, n. 9, p. 887-898, 2016.

WIPF, P.; SADOWSKY, J. D. Total synthesis of the diisonitrile antibiotic SF2768. *Organic Letters*, v. 9, n. 17, p. 3387-3390, 2007.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, v. 34, p. 694–701, 2017.

XU, D. H. et al. The role of parasitic infections in predisposing fish to secondary bacterial diseases: a review. *Journal of Fish Diseases*, v. 35, n. 7, p. 501–514, 2012.

VALLADÃO, G. M. R. et al. Challenges in the control of acanthocephalosis in aquaculture: special emphasis on *Neoechinorhynchus buttnerae*. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1360-1372, 2020.

VALLADÃO, G. M. R. et al. Use of plant-derived compounds in fish disease control. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 106, p. 20-29, 2020.

VALLADÃO, G. M. R. et al. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. *Parasitology*, v. 141, p. 662-669, 2014.

VAN DER MEIJ, A. et al. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 3, p. 392–416, 2017.

ZHANG, R. et al. Chitinase-producing bacteria against helminths. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, p. 1239–1250, 2018.

ZHANG, X. P. et al. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture*, v. 420, p. 302-307, 2014.

ZIEMERT, N. et al. The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports*, v. 33, p. 988–1005, 2016.