UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

LUANA MIGUEL DOS ANJOS FERREIRA

ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ ROXO (*Tabebuia avellanedae*) e AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

RECIFE
2012

LUANA MIGUEL DOS ANJOS FERREIRA

ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ ROXO (*Tabebuia avellanedae*) e AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial (área de concentração Microbiologia e Bioprocessos) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Janete Magali de Araújo.
Co-Orientador: Prof[a]. Dr[a]. Gláucia Manoella de Souza Lima.

RECIFE
2012

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ferreira, Luana Miguel dos Anjos
Isolamento de micro-organismos endofíticos do Ipê Roxo (*Tabebuia avellanedae)* e avaliação da atividade antimicrobiana/ Luana Miguel dos Anjos Ferreira– Recife: O Autor, 2012.

74 folhas : il., fig., tab.
Orientadora: Janete Magali de Araújo
Coorientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2012.
Inclui bibliografia e anexos

1. Ipê- roxo- uso terapêutico 2. Microorganismos 3. Biotecnologia- indústria I. Araújo, Janete Magali de (orientadora) II. Lima, Gláucia Manoella de Souza (coorientadora) III. Título

583.95 CDD (22.ed.) UFPE/CCB- 2012- 247

LUANA MIGUEL DOS ANJOS FERREIRA

ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ ROXO (*Tabebuia avellanedae*) e AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial (área de concentração Microbiologia e Bioprocessos) da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof[a]. Dr[a]. Janete Magali de Araújo - UFPE.

_____

Prof[a]. Dr[a]. Tânia Lúcia Montenegro Stamford – UFPE

_____

Prof[a]. Dr[a]. Neiva Tinti de Oliveira – UFPE

Recife, 02 de julho de 2012.

Dedico à minha filhinha, já muito amada,
que está chegando ao mundo, Lorena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido forças para enfrentar os obstáculos encontrados e superá-los, quando por alguns momentos pensei que não conseguiria;

A minha família, minha base, por todo apoio, carinho e crédito constante! Em especial a minha filhinha Lorena, que mesmo ainda no ventre, já me proporciona motivos mil para prosseguir e que em momentos de "extremo cansaço" me desperta com seus chutinhos!

À minha orientadora Janete Magali de Araújo e a minha co-orientadora Gláucia Manoella de Souza Lima pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos, orientação e compreensão;

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro ao desenvolvimento desse projeto de pesquisa;

Aos amigos da turma do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial da UFPE: Maria Carolina, Débora, Gabriel, Bruno, Ingrid, Clarissa, Ludmilla, Luciana e Alexsander pelo companheirismo, colaborações, momentos de descontração e até mesmo de "tensão compartilhada" e, o mais importante pela amizade!

Aos amigos dos Laboratórios de Coleção Microbiana e Genética de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE: Fátima Regina, Érika, Eliziane, Ivana, Emerson, Janaína, Jefferson, Milca, Karine, Rosane, Lívia, Camila Diniz, Camila Valença, Diego, Rodrigo, Gustavo, Aline, Talita, Dani Patrice, entre outros, que direta ou indiretamente com sua ajuda técnica ou emocional, amizade, foram facilitadores de meu trabalho;

Ao Departamento de Farmácia e ao Herbário da UFPE, bem como ao Departamento de Química Orgânica do UFRPE pela disponibilidade e cooperação para realização de alguns testes necessários a essa pesquisa.

RESUMO

A ocorrência e o potencial farmacológico de metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos de plantas, têm sido amplamente investigados. *Tabebuia avellanedae,* (ipê-roxo) é utilizada como analgésico, antiinflamatório, antibióticos e anti-mutagênico. Diante do potencial biotecnológico desta planta, o presente trabalho teve como objetivo isolar endofíticos de folhas de *T. avellanedae* e avaliar a atividade antimicrobiana. Foram isolados 166 endofíticos dos quais aproximadamente 74% (123) são fungos, 22% (36) bactérias e 4% (7) actinobactérias. Todas as actinobactérias foram identificadas como *Streptomyces* spp. Utilizou-se como micro-organismos testes bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras patógenas oportunistas. Na seleção primária, actinobactérias (3) e fungos (9) apresentaram halos de inibição antimicrobiana. Destes endófitos na fermentação, aproximadamente 66,66% das actinobactérias tiveram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* e 11,11% dos fungos contra *Candida albicans*. Para extração dos compostos biativos os melhores solventes, pHs, meios de cultura e tempo de cultivo foram, respectivamente, para *Streptomyces* sp. PCA 3: acetato de etila, pH 7, MPE, 96 horas; para *Streptomyces* sp. PCA 4: clorofórmio, pH 7 (extrato) e acetona, pH 2 (biomassa), MPE, 72 horas; e para o fungo PEF 6: acetato de etila, pH 7, cinco dias. Foram detectados nos extratos da planta e endofíticos bioativos ß-amirina, ß-sitosterol, ácido ursólico, flavonóides e alcalóides sendo constatado que os compostos produzidos pelo isolado *Streptomyces* sp. PCA 4 são mais semelhantes aos produzidos pela planta. Diante desses resultados, conclui-se que os endofíticos bioativos apresentam potencial farmacológico, porém outros estudos são necessários para comprovar a efetividade dos mesmos.

Palavras-chave: endófitos, ipê roxo, metabólitos secundários.

ABSTRACT

The occurrence and pharmacological potential of secondary metabolites of endophytic microorganisms, colonizing the interior of plants, have been widely investigated. *Tabebuia avellanedae* (ipe-purple) is used as an analgesic, antiinflammatory, antibiotics and anti-mutagenic. Given the biotechnological potential of this plant, this study aimed to isolate endophytes from leaves of *T. avellanedae* and evaluate the antimicrobial activity. 166 were isolated endophytic of which approximately 74% (123) is fungi, 22% (36) bacteria and 4% (7) actinomycetes. All actinomycetes were identified as *Streptomyces* spp. Were used as test microorganisms Gram positive and Gram negative bacteria and yeasts opportunistic pathogens. In the primary selection, actinobacteria (3) and fungi (9) showed inhibition halos antimicrobial. Endophytes in the fermentation of these, approximately 66.66% of actinobacteria had activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus luteus* and 11.11% of fungi against *Candida albicans*. For extracting the antibiotics best solvents, pH, growth media and cultivation time are, respectively, Streptomyces sp. PCA 3: ethyl acetate, pH 7, MEP, 96 hours, to *Streptomyces* sp. PCA 4: chloroform, pH 7 (extract), and acetone, pH 2 (biomass), MEP, 72 hours, and the mold 6 PEP: ethyl acetate, pH 7, five days. Were detected in the extract of the plant and endophytic bioactive ß-amyrin, ß-sitosterol, ursolic acid, flavonoids and alkaloids and revealed that the compounds produced by strain *Streptomyces* sp. PCA 4 are more similar to those produced by the plant. From these results it is concluded that the bioactive endophytes have pharmacological potential, but further studies are needed to confirm the potential of the same.

Keywords: endophytes, purple ype, secondary metabolites.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS I
LISTA DE TABELAS IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS V
1 INTRODUÇÃO 1
2 OBJETIVOS 3
2.1 Objetivo Geral 3
2.2 Objetivos Específicos 3
3 REVISÃO DE LITERATURA 4
3.1 Produtos naturais como fonte de novos fármacos 4
3.2 *Tabebuia avellanedae* 8
***3.2.1* Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico 9**
3.2.2 Actinobactérias 12
3.2.3 Fungos 14
3.3 Metabólitos bioativos produzidos por micro-organismos endofíticos 15
4 MATERIAIS E MÉTODOS 19
4.1 Coleta do ipê roxo (T. avellanedae) 19
4.2 Assepsia e desinfestação das folhas 19
4.3 Isolamento dos micro-organismos endofíticos. 20
4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido 21
4.5 Avaliação da produção de antibióticos em meio líquido 23
4.6 Extração de compostos bioativos 25
4.7 Prospecção química comparativa do extrato da planta de T. avellanedae com os extratos dos metabólitos dos endofíticos bioativos 26
4.9 Classificação dos micro-organismos 27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
5.1 Isolamento e identificação de micro-organismos endofíticos 28
5.1.1 Experimento piloto 28
5.1.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos de folhas de ipê roxo nos período verão e inverno 29
5.1.3 Identificação de Actinobactérias 33
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido 35
5.2.1 Actinobactérias 35

5.3 Avaliação da produção de antibióticos em meio líquido.....39
5.3.1 Actinobactérias.....39
5.3.2 Fungos.....43
5.4 Extração dos compostos bioativos.....44
5.5 Prospecção química comparativa do extrato das folhas de T. avellanedae com os extratos dos metabólitos dos endofíticos bioativos.....50
6 CONCLUSÕES.....54
7 PERSPECTIVAS 56
REFERÊNCIAS.....557
ANEXOS 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Produtos naturais utilizados na terapêutica	6
Figura 3.2	Estrutura química do lapachol	7
Figura 3.3	Estrutura química da β-Lapachona	7
Figura 3.4	*Tabebuia avellanedae*	8
Figura 4.1	Etapas de desinfestação das folhas de *T. avellanedae* por mergulhos sucessivos em álcool 70% - 1 min. *(A),* hipoclorito de sódio 2,6% - 2 e 5 min. (B), novamente em álcool a 70% - 30 s. (C) e água 30 s. (D)	21
Figura 4.2	Processo de fragmentação das folhas (A) e distribuição dos fragmentos no meio de cultura específicos (B e C) para isolamento de endofíticos	22
Figura 4.3	Esquema simplificado da técnica de atividade antimicrobiana por bloco de gelose modificado. Suspensão do micro-organismo teste (A), meio de cultura específico para crescimento do micro-organismo teste (B), endofítico em blocos de gelose (C), teste pronto (D).	24
Figura 4.4	Esquema da avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido. Produção de moléculas bioativas (A), teste de difusão em disco (B).	25
Figura 5.1	Placa de Petri com fungo endofítico emergindo de fragmento de folha de *T. avellanedae* em isolamento piloto para determinação do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (2,6%) processo de desinfestação.	30
Figura 5.2	Isolamento de micro-organismos endofíticos do ipê roxo emergindo dos fragmentos foliares de *Tabebuia avellanedae* no período verão (A) e no período de inverno (B).	31
Figura 5.3	Percentual geral dos isolamentos dos grupos de micro-organismos endofíticos de folhas de *T. avellanedae* nos períodos de verão e inverno.	32
Figura 5.4	Frequência dos grupos de micro-organismos endofíticos isolados de folhas de *T. avellanedae* nos períodos de verão e	

inverno nos meios de cultura ALA, HT, ISP-2, BDA e SAB. 32

Figura 5.5 Micromorfologia dos isolados de *Streptomyces* spp. cultivadas durante 15 dias a 30˚C visualizadas em microscópio óptico no aumento 40x: PCA 22 (A), *e* PCA 22 (B) 35

Figura 5.6 Médias dos halos de inibição (mm) de *Streptomyces* spp. contra diferentes micro-organismos 36

Figura 5.7 Halo de inibição de *Streptomyces* sp. PCA 1 contra *M. furfur* UFPEDA 1320 37

Figura 5.8 Médias dos halos de inibição (mm) de fungos endofíticos do período de verão 39

Figura 5.9 Médias dos halos de inibição (mm) de fungos endofíticos do período de inverno 39

Figura 5.10 Média dos halos de inibição (mm) dos isolados *Streptomyces* sp. PCA 3 contra *S.aureus* UFPEDA 2, *B. subtilis* UFPEDA 86 , *M. luteus* UFPEDA 100 (A) e *Streptomyces* sp. PCA 4 contra *S.aureus* UFPEDA 2, *S. aureus* UFPEDA 663 e *M. luteus* UFPEDA 100 (B) durante a fermentação em diferentes meios de cultura líquido (ALA,ISP4, M1 e MPE) 42

Figura 5.11 Produção de biomassa e variação de pH dos diferentes meios de cultura líquidos (ALA, ISP4, M1 e MPE) ao longo do tempo dos bioprocessos das actinobactérias isoladas de folhas de *T. avellanedae Streptomyces* sp. PCA 3 (A) e *Streptomyces* sp. PCA 4 (B) 43

Figura 5.12 Halo de inibição do fungo endofíticos PEF 6 contra *C. albicans* UFPEDA 1007 44

Figura 5.13 Média dos halos de inibição contra *B. subtilis* UFPEDA 86 (A) e *S. aureus* UFPEDA 02 (B) dos extratos dos solventes do liquido metabólico de *Streptomyces* sp. PCA 3 a partir de diferentes pHs. 46

Figura 5.14 Média dos halos de inibição contra *M. luteus* UFPEDA 100

(A) e *S. aureus* UFPEDA 02 (B) dos extratos dos solventes do líquido metabólico de *Streptomyces* sp. PCA 4 a partir de diferentes pHs. 48

Figura 5.15 Média dos halos de inibição contra *M. luteus* UFPEDA 100 (A) e *S*. *aureus* UFPEDA 02 (B) dos solventes em diferentes pHs dos extratos da biomassa de *Streptomyces* sp. PCA 4. 48

Figura 5.16 Média dos halos de inibição (mm) dos extratos do solvente acetato de etila do líquido metabólico do isolado do fungo PEF 6 contra *C. albicans* UFPEDA 1007. 49

Figura 5.17 Cromatografia em camada delgada dos extratos de *T. avellanedae* e *Streptomyces* spp. para detecção de triterpenos e esteróides. (1) padrão, (2) extrato de PCA 3, (3) extrato de PCA 4, (4) extrato da biomassa de PCA 4, (5)extrato das folhas de *T. avellanedae*. 52

Figura 5.18 Cromatografia em camada delgada do extrato do fungo PEF 6 para detecção de triterpeno. 53

Figura 5.19 Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonóides e derivados no extrato do fungo PEF 6 (F) e no extrato de *T. avellanedae* (T). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Exemplos de metabólitos secundários de fungos endofíticos incluídos em diversas classes químicas 16

Tabela 4.1 Micro-organismos utilizados nos teste de atividade antimicrobiana com bloco de gelose, provenientes da coleção Microbiana do UFPEDA 23

Tabela 4.2 Grupos químicos pesquisados nos extratos do endofíticos bioativos selecionados e extrato da planta de *T. avellanedae* e características da Cromatografia em Camada Delgada 28

Tabela 5.1 Prospecção química dos grupos químicos dos extratos de folhas de *T. avellanedae* e de seus isolados endofíticos bioativos 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	– Alumínio
B.O.D.	– Biochemical oxygen demand
C + G	– Citosina + Guanina
CCD	– Cromatografia de Camada Delgada
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LAFEPE	– Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LME	– Líquido Metabólico Esgotado
LMO	– Líquido Metabólico Original
MS	– Mato Grosso do Sul
MRSA	– Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
OMS	– Organização Mundial de Saúde
SAB	– Ágar sabouraud
UFC	– Unidades Formadoras de Colônia
UFPE	– Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	– Coleção de Culturas Microbianas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
WHO	– World Health Organization
Zn	– Zinco

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, as plantas são utilizadas na medicina popular para controle de diversas enfermidades, tendo algumas destas, comprovação científica da eficácia de seu potencial farmacológico. Atualmente, os produtos naturais continuam sendo excelentes fontes de moléculas bioativas, pois possuem alta diversidade química e especificidade bioquímica elevada quanto a ligações com receptores específicos (MOLINARI, 2009). Aliado a isto, a crescente resistência apresentada pelos agentes etiológicos das doenças infecciosas bacterianas e fúngicas às drogas administradas representa um grave problema à terapêutica antimicrobiana. Tais fatos têm aumentado a busca por novas fontes de moléculas bioativas (STROBEL, 2003; LEVY, 2005).

De *Tabebuia avellanedae*, conhecida popularmente como ipê roxo, já foi extraído o composto bioativo Lapachol que foi descrito pela primeira vez em 1882 por Paternò (MORRISON et al, 1970). No uso popular, tem produzido resultados evidentes no tratamento de diabetes e úlceras gástricas, além de ser utilizado como analgésico, anti-inflamatório e até como anti-mutagênico. Também já tem sido empregado em hospitais, na forma de extrato fluído e em pó ou em pomada (GRANDIS et al, 2006).

Diversidade biológica está relacionada à variabilidade química uma vez que organismos e seus biótipos estão sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais, estes podem produzir novos metabólitos secundários conforme relatado por alguns autores. Podem também ser uma fonte promissora na produção de moléculas inéditas com aplicações diversas ou modelos para a inovação de novos fármacos (LAM, 2007; TAKAHASHI et al, 2008; MOLINARI, 2009).

Inúmeras pesquisas têm relatado a ocorrência e o potencial farmacológico de metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos, que são colonizadores dos interiores dos tecidos de folhas, ramos e raízes em alguma etapa do ciclo de vida do vegetal sem causar-lhe danos e em troca, a planta lhe proporciona nutriente e proteção (AZEVEDO, 1998; 1999). Estes endófitos conferem maior resistência ao seu hospedeiro para as condições de estresse hídrico, podendo alterar suas propriedades fisiológicas e produzir hormônios vegetais além de outros compostos, como enzimas e fármacos de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2000; VIEIRA et al., 2012). Além do mais produzem metabólitos secundários incomuns que

são importantes para a planta. Vale salientar também que os endófitos poderão ser utilizados como vetores para a introdução de genes de interesse econômico para o setor da agricultura (TAECHOWISAN et al., 2005; AZEVEDO et al., 2000).

Assim sendo, actinobactérias e fungos isolados de plantas medicinais apresentam importante fonte para obtenção de novos fármacos ou outras biomoléculas de interesse biotecnológico. Dessa forma, essa pesquisa visa Isolar micro-organismos endofíticos de folhas de *Tabebuia avellanedae* (ipê roxo) e avaliar se os mesmos possuem atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos de importância para a saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar micro-organismos endofíticos de folhas de *Tabebuia avellanedae* (ipê roxo) e avaliar a atividade antimicrobiana para diferentes micro-organismos.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar micro-organismos endofíticos das folhas de *Tabebuia avellanedae* no período de verão (janeiro/2011) e inverno (junho/2011).

- Avaliar atividade antimicrobiana das actinobactérias e fungos endofíticos isolados contra diferentes micro-organismos teste.

- Avaliar atividade antimicrobiana em diferentes meios de culturas líquidos dos endofíticos bioativos e determinar as melhores condições de cultivo para produção dos antibióticos.

- Realizar prospecção química comparativa entre o extrato da planta e o extrato dos endofíticos bioativos através da cromatografia em camada delgada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produtos naturais como fonte de novos fármacos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), várias práticas de saúde não convencionais, como fitoterapia, vem crescendo cada vez mais e despertando o interesse da sociedade a respeito de seu uso e benefício. Aspectos como baixo custo e fácil acesso à grande parte da população são primordiais na disseminação do uso de fitoterápicos (OMS, 2008).

Apesar das plantas medicinais fazerem parte da cultura popular há muitos anos, o interesse pela fitoterapia teve aumento considerável entre usuários, e serviços de saúde nas últimas décadas (WHO, 2011; HUFFORD, 1997; KENNY et al., 2001). A grande diversidade vegetal do Brasil aliada ao baixo custo da associação entre a utilização de plantas medicinais e a medicina terapêutica promove e incentiva a busca por novas fontes de fármacos. O país possui um terço da flora mundial e tem na Amazônia a maior reserva vegetal com grande potencial medicinal. Aliado à tais características, surge o interesse na busca de novos medicamentos desenvolvidos a partir da vasta e extensa flora brasileira (FRANÇA et al., 2008; SANTOS et al., 2011, YUNES et al.; 2001).

De início, os pesquisadores investigaram as características dos vegetais através de levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos. A riqueza da biodiversidade brasileira permitiu aos estudiosos o isolamento de compostos biologicamente ativos tendo como origem diferentes espécies vegetais. A partir daí, tais compostos são utilizados como modelo para a síntese de novos fármacos (GUERRA; NODARI, 2001). Os fundamentos histórico-culturais da população brasileira permitiram a permanência da fitoterapia até os dias atuais, sendo esse costume reconhecido por sua eficácia através da consciência popular (SACRAMENTO, 2000).

Atualmente um dos principais impulsionadores do progresso e fonte de soluções técnicas para os problemas atuais e futuros da humanidade é a busca por novos produtos biológicos, através da diversidade de micro-organismos e de sua atividade antimicrobiana, que apresentam uma ampla gama de aplicações (BELOQUI et al., 2008). Segundo Newman e Cragg (2007), os produtos naturais continuam sendo uma fonte importante de novos produtos farmacêuticos,

constituindo a fonte mais produtiva para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

Desde os primórdios, as plantas têm sido utilizadas pelo homem, por povos de várias civilizações há mais de cinco mil anos, como fonte de alimento e de tratamento de doenças, devido à sua abundância na natureza e facilidade de obtenção (CORDELL, 1993; FRANÇA, 2001). Avanços terapêuticos foram obtidos através de várias investigações de espécies de plantas que foram utilizadas pela população durante séculos, de modo empírico. Apenas entre o fim do século XIX e início do século XX é que foi possível isolar os primeiros produtos obtidos a partir de espécies vegetais, dentre eles, alcalóides como morfina e quinina (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; PHILLIPSON, 2001). Muitos autores relatam que os fitoterápicos estão entre 25% dos medicamentos receitados em países industrializados, sendo que 50% são constituídos por substâncias de origem sintética e 25% a partir de outras fontes de produtos naturais. (CRAGG; NEWMAN, 1999; CARVALHO, 2001; RATES, 2001).

No início do século XX, quase todos os medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas de plantas. Os produtos naturais atualmente são reconhecidos como fontes significativas de fármacos e protótipos, compondo aproximadamente 60% dos compostos anticancerígenos e 75% dos medicamentos para doenças infecciosas. De acordo com a OMS, em 2002, mais de 90% das substâncias terapêuticas são derivadas de um produto natural (McCHESNEY, VENKATARAMAN, HENRI, 2007).

É de grande importância o investimento em pesquisas relacionadas aos estudos químicos e farmacológicos de espécies vegetais. O resultado disso é a imensa produção de metabólitos secundários, podendo ter aplicação terapêutica (BRITO; BRITO, 1993). Segundo Montanari e Bolzani (2001) aproximadamente 50.000 metabólitos secundários são obtidos de mais ou menos 500.000 espécies de plantas.

Informações relevantes relacionadas à existência de metabólitos secundários nos vegetais são derivadas das análises fitoquímicas. Dessa forma, a busca e o isolamento de novos princípios ativos importantes na produção de fitoterápicos são de grande importância na descoberta de moléculas bioativas (SILVA et al, 2010).

A síntese química talvez não fosse capaz de produzir tantas estruturas complexas quanto as provenientes dos produtos naturais (DEMAIN, 2000). Deste

modo, a biodiversidade da natureza traz consigo a possibilidade da descoberta de novas moléculas com funcionalidade para o tratamento tanto de doenças antigas como novas (ZHANG, LIXIN, DEMAIN, 2006).

A literatura relata diversos exemplos de medicamentos que possuem a natureza como fonte e contribuem com a terapêutica, como o anti-inflamatório aspirina (1), o analgésico opióide morfina (2), o cardiotônico digitoxina (3), o antimalárico quinina (4), além da pilocarpina (5), utilizada para tratamento de glaucoma (BUTLER, 2004) (Figura 3.1). A terapia anticâncer também teve como base produtos naturais derivados de plantas como alcalóides da Vinca (6 e 7) e paclitaxel (8) (CALLERY e GANNETT, 2002) (Figura 3.1).

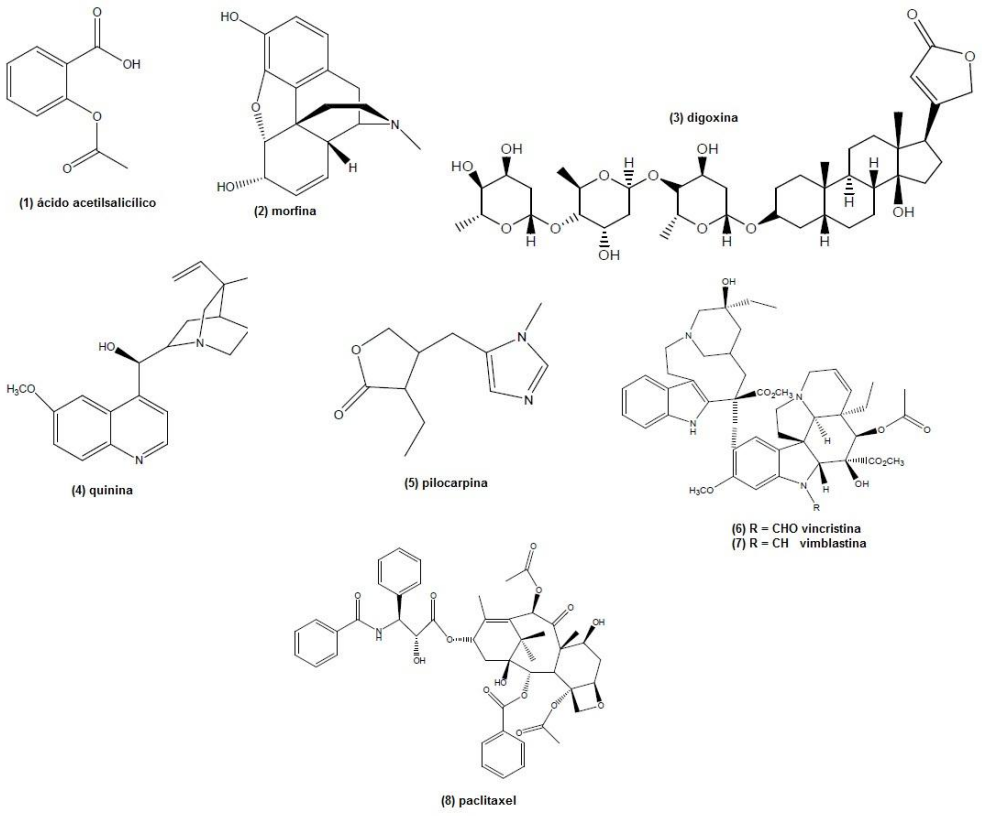

Figura 3.1. Produtos naturais utilizados na terapêutica (Adaptado de Silva, 2010).

O lapachol foi descrito pela primeira vez em 1882 por Paternò (MORRISON et al, 1970). Sua estrutura química foi definida por Hooker em 1896, que o identificou como uma naftoquinona, a 2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (RAO et al, 1968). O lapachol, com a ação controlada do calor, fornece a desidrolapachona

(xiloidona) e os isômeros α e β-lapachona (D'ALBUQUERQUE, 1968). Tais substâncias são bastante conhecidas por possuírem propriedades antitumorais, além de antiinflamatória, analgésica, antibiótica, antimalária, antitripanossoma e antiulcerogênica (Figura 3.2) (HUSSAIN et al., 2007).

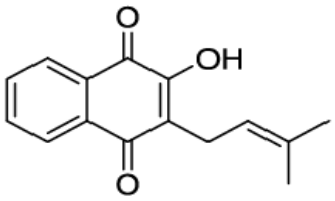

Figura 3.2. Estrutura química do lapachol (HUSSAIN et al., 2007).

β-Lapachona (Figura 3.3), um derivado do lapachol, apesar de ainda não ser um fármaco comercializado é uma substância muito importante do ponto de vista da pesquisa científica. Também apresenta atividade antitumoral e boa atividade farmacológica contra *Tripanossoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Devido a sua citotoxicidade, a β-Lapachona não pode ser utilizada no tratamento da Doença de Chagas, mas sua estrutura tem servido de modelo para o desenvolvimento de substâncias mais seletivas contra *T. cruzi*. Esta citoxicidade é importante para o controle da proliferação de diversos tipos de células cancerosas. β-Lapachona é eficaz, *in vitr*o, contra isolados de células humanas malignas de pulmão, mama, colo-retal, próstata; melanoma e leucemia (SILVA et al., 2003).

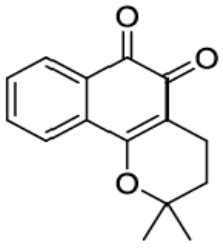

Figura 3.3. Estrutura química da β-Lapachona (HUSSAIN et al., 2007).

A vasta existência de compostos bioativos naturais ainda desconhecidos incentiva a busca por novos fármacos, assim como suas aplicações na indústria e agricultura (DEMAIN e DIJKHUIZEN, 2006).

3.2 *Tabebuia avellanedae*

Tabebuia avellanedae (Figura 3.4) pertence à família Bignoniaceae, é popularmente conhecida como ipê roxo, pau d'arco, ipê una, entre outros. Há relatos de 36 gêneros desta família utilizados na medicina popular (GENTRY, 1992). Os Ipês ou pau d'arcos roxos são árvores de até 30 m de altura que podem atingir 90 cm de diâmetro, e apresentam características de plantas heliófilas, ramos dicotômicos, tortuosos e grossos formando uma copa moderadamente ampla e globosa. O tronco é mais ou menos reto e cilíndrico, possui casca pouco espessa de coloração pardo-cinzenta. As raízes são vigorosas e profundas e as folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, com ápice agudo, além de apresentar a flor, roxa-violácea (LONGHI, 1995). São típicas de floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná. Ocorrem do Maranhão até a região Sul do Brasil. Sua madeira de lei de grande durabilidade é largamente utilizada na marcenaria (LORENZI, 1992).

Figura 3.4. *Tabebuia avellanedae* (HUSSAIN et al., 2007).

Na medicina popular a entrecasca do ipê roxo é a parte que contêm propriedades farmacológicas, sendo dentre estas a mais destacada propriedade a anti-inflamatória (CARVALHO, 2003). Ainda das cascas, no Brasil, esta espécie

nativa das florestas tropicais da América do Sul, é utlizada como anti-fúngico, anti-mutagênico, contra eczema, doença de Hodgkin, leucemia, estomatite, sífilis, úlceras, analgésico, anti-inflamatório e diurético (ALMEIDA, 1993; MIRANDA; et al., 2001) além de ser frequentemente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas outras doenças.

Entre os primeiros estudos de atividade biológica estão os do Instituto de Antibióticos/UFPE, assinados pelo Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima a partir de 1956, que encontrou atividade antimicrobiana do ipê-roxo frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Sthaphylococcus aureus*, *M. flavus*, *B anthracis*, *B. cereus* e *E. coli* (LIMA et al, 1956; ARAÚJO et al., 2002).

Pereira et al. (2006), obtiveram do extrato de *T. avellanedae* os compostos lapachol e β-lapachona e constataram atividade antimicrobiana e citotóxica contra cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Sadananda et al. (2011) obtiveram lapachol a partir dos endofíticos do extrato de *T. argentea* e foram detectadas atividades antimicrobianas e antioxidante.

3.2.1 Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico

Uma fonte muito estimulante e promissora são os micro-organismos endofíticos que vivem nos tecidos das plantas. Compostos produzidos por micro-organismos são historicamente mais recentes do que os produzidos a partir de plantas. Após a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, houve uma revolução no tratamento de infecções bacterianas, e os pesquisadores começaram uma busca intensa por produtos bioativos originados a partir de micro-organismos. Um grande número de fármacos foi desenvolvido com ampla variedade de indicações terapêuticas (GALLO et al., 2008).

Novos problemas de saúde surgem gradativamente, como o agravamento de enfermidades causadas por diferentes tipos de câncer, surgimento de multirresistência bacteriana e fúngica. São apenas alguns exemplos que representam um grande desafio para o desenvolvimento de novos fármacos, o que amplia a busca por agentes bioativos mais eficazes. Dessa forma, os endofíticos são considerados uma fonte nova para obtenção de novas moléculas (STROBEL, 2003).

Segundo Azevedo (1998; 1999), endofíticos são micro-organismos que estão presentes no interior de plantas, ramos e caules e podem ser isolados de material

vegetal desinfectado superficialmente. Normalmente, não causam dano à planta, mas de acordo com as condições do ambiente e do próprio estado fisiológico do hospedeiro, podem ser considerados patógenos.

Consideram-se endofíticos aqueles que vivem toda ou uma parte do seu ciclo de vida no interior de plantas sem causar, aparentemente, sintomas de doenças (TAN; ZOU, 2001).

Os endófitos foram descritos pela primeira vez por Bary em 1866, porém durante mais de um século eles foram quase que ignorados, principalmente devido ao fato de que se conhecia pouco sobre suas reais funções no interior dos vegetais e também por não produzirem em seus hospedeiros, estruturas externas visíveis. Sendo talvez, por isso, atualmente bastante estudados, os micro-organismos benéficos que colonizam o interior do tecido vegetal (NETO et al., 2002).

De acordo com a fase do ciclo vegetativo da planta, a população de endofíticos em raízes, folhas, frutos e ramos apresenta variações quantitativas e qualitativas. Essas variações dependem da ação que os ambientes químico, físico e biológico exercem sobre cada organismo presente na população de micro-organismos. (VALDEBENITO; SANHUEZA, 1997).

A entrada do micro-organismo no interior da planta pode ocorrer através de feridas, estômatos, hidatódios, sementes, aberturas naturais, assim como pode ser causada por insetos e sendo a raiz , uma das principais portas de entrada. A emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por ferimentos que servem de entrada para os micro-organismos. A entrada ativa dá-se também pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração desses micro-organismos (AZEVEDO, 1998).

A microscopia eletrônica pode detectar a presença dos endofíticos no interior do tecido vegetal, assim como o isolamento em meio de cultura como foi observado por Sardi et al. (1992). Entretanto, para que o isolamento seja eficaz, a desinfestação da superfície externa do hospedeiro é de extrema importância na preparação da amostra, bem como a seleção de plantas sadias para evitar o isolamento de micro-organismos endofíticos patogênicos (BACON; HINTON, 1997).

Desde o surgimento do termo “endofítico”, supõe-se que este pode tornar-se parasita sob determinadas condições, uma vez que é bastante afetado por fatores abióticos e bióticos, dentro dos limites de seu genótipo. Dessa forma, seu período de latência varia. Em termos evolutivos, os fungos endofíticos evoluíram de parasitas

ou de agentes patogênicos através da extensão nos períodos de latência e redução da virulência (SIEBER, 2007).

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa. Estima-se que cada espécie vegetal possua micro-organismos endofíticos ainda não classificados e com propriedades pouco conhecidas, mas potencialmente de grande importância biotecnológica. Um desses potenciais seria sua utilização como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico em planta, produção de uma variedade de compostos secundários (alcalóides, terpenóides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos), produção de enzimas (celulases e ligninases), fitormônios de crescimento (giberelina), com capacidade de mineralizar fosfato orgânico, além da produção metabólitos bioativos com capacidade de inibir a presença ou matar fitopatógenos, como fungos, bactérias e vírus e da produção de antibióticos a partir de endofíticos do solo (AZUMA, 2011; DOWNIG et al., 2000; STROBEL, 2003; TOMASINO et al., 1995; VARGAS et al., 2011).

Os micro-organismos endofíticos surgiram durante a evolução das plantas, promovendo um potencial adaptativo às espécies hospedeiras na presença de condições de adversidade geradas por fatores abióticos, como salinidade, estresses oxidativos, seca, solos ácidos com alto teor de Zn e Al, ou bióticos, como micro-organismos, herbívoros, ou insetos-praga. Os endofíticos conferem maior resistência aos seus hospedeiros a condições de estresse hídrico, podendo alterar suas propriedades fisiológicas, produzir hormônios vegetais e outros compostos, como importantes enzimas e fármacos de interesse biotecnológico (AZEVEDO et al., 2000; VIEIRA et al., 2012). Também produzem metabólitos secundários incomuns de importância para planta (TAECHOWISAN et al., 2005).

A utilização de micro-organismos endofíticos em práticas agrícolas tem aumentado substancialmente nos últimos anos, atuando tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas, entre outras aplicações, podendo substituir o uso de produtos químicos, favorecendo, desta maneira, a preservação do ambiente (SOUZA, 2001). Eles podem parasitar os fitopatógenos por competição de nutrientes, produzindo substâncias antagônicas ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência. Para a utilização dessas características, deve-se inicialmente conhecer as espécies

microbianas envolvidas e as estratégias utilizadas pelos micro-organismos nesta interação (ALVES, 1998; ATHAYDE et al., 2001).

Luz (1996) afirma que a agricultura moderna tem enfrentado um grande desafio: aumentar a produção das culturas gerando sustentabilidade, dentro de uma visão holística de desenvolvimento, baseando-se num enfoque voltado para a proteção ambiental e uma das alternativas em potencial para atingir esse objetivo consiste no uso de micro-organismos endofíticos. Em contrapartida, Neto et al. (2002) afirmam que apesar de os endofíticos apresentarem a capacidade de estimular o crescimento das plantas, aumentando a produtividade, o conhecimento do genótipo da planta e do micro-organismo envolvido na promoção do crescimento é de extrema importância, pois, fungos e bactérias endofíticas podem expressar genes de interesse, e serem utilizados no controle de patógenos, promoção de crescimento vegetal e síntese de vitaminas, aminoácidos e vacinas no interior de plantas hospedeira.

3.2.2 Actinobactérias

O *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2004), classifica as actinobactérias dentro do Filo e da classe Actinobacteria, a qual compreende 6 ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. Dentre os gêneros incluídos nessa classe, estão os *Streptomyces, Streptosporangium, Actinomadura, Nocardiopsis, Actinoplanes, Micromonospora, Amycolatopsis Actinomyces*.

As actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram-positivas e apresentam alta razão de guanina/citosina em seu DNA, podendo exceder 70% do total de bases nucleotídicas, variando de 51% em *Corynebacteria* e mais de 70% em *Streptomyces* e *Frankia*. Uma exceção é o genoma do patógeno obrigatório *Tropheryma whipplei*, com menos de 50% de C+G em seu DNA. (BERGEY´S, 2004). Possuem aspectos morfológicos e de ciclo celular diferenciados dos demais organismos Gram-positivos e podem ser aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios (LACAZ et al., 2002).

As actinobactérias possuem grande importância para a Biotecnologia, produzem metabólitos secundários com atividade biológica e destacam-se como produtores de vitaminas, enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores, antiparasiticos, antihelmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de

herbicidas e inseticidas de ampla aplicação na agricultura (SANGLIER et al., 1993; DEMAIN, 1995). A maioria dos antibióticos em uso hoje são derivados de produtos naturais de actinobactérias e fungos (RAJU *et al*., 2010).

As actinobactérias possuem vasta distribuição na natureza, tendo capacidade de desenvolvimento em diversos substratos. O solo é o habitat mais comum dessas bactérias, sendo abundante também na rizosfera, mas embora a maioria seja saprófita estrito, alguns podem formar associações parasíticas ou mutualísticas com plantas e animais (GOODFELLOW; WILLIANS, 1983).

As primeiras observações sobre actinobactérias endofíticas foram feitas por Mundt e Hinkle em 1976, que descreveram o isolamento de 19 gêneros de bactérias do interior de sementes e óvulos de plantas, destacando – se os gêneros *Corynebacterium*, com 35 isolados, seguido por *Nocardia* e *Streptomyces*, ambos com apenas um isolado.

Trejo-Estrada et al. (1998) relataram que actinobactérias endofíticas foram encontradas produzindo pelo menos três tipos de substâncias antagonistas em tecidos vegetais, incluindo antibióticos, enzimas e sideróforos. Araújo et al. (2000) identificaram endofíticos nas raízes e folhas do milho, dos quais 43,4% apresentaram atividade antimicrobiana. Teixeira et al. (2007) detectaram a presença de actinobactérias endofíticas em plantas de mandioca com capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e potencial para promover o crescimento da planta. Damasceno et al. (2011) utilizaram actinobactérias no biocontrole de fitonematóides em mudas de quiabeiro, potencializando seu crescimento. Cunha et al. (2009) analisando a influência de cinco diferentes meio de cultura na produção de metabólitos secundários do isolado *Streptomyces* sp. isolada de raízes da planta *Conyza bonariensis* (L), observou no extrato etanólico, atividade antimicrobiana para bactérias Gram positivas sendo o melhor resultado obtido para *Micrococcus .luteus* ATCC 2225 < 12,5 µg/mL. Já Stamford et al. (2001) constatou que a enzima α-amilase produzida pelo endofítico *Nocardiopsis* sp. isolado de folhas de jacatupé e a enzima glucoamilase produzida pelo endofítico *Streptosporangium* sp. isolado de folhas de *Zea mays* L. (STAMFORD et al.; 2002) possuem grande potencial para aplicações diversas na indústria devido ao fato de ser termoestável.

3.2.3 Fungos

Na classificação taxonômica, os fungos endofíticos podem ser ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos e oomicetos, possuindo alta especificidade quanto à planta hospedeira ou podem ser colonizadores mais generalistas (SAIKKOMEN et al., 1998).

A maioria das plantas, senão todas as plantas estudadas, em seu ecossistema natural estão colonizadas por fungos sem nenhuma manifestação patogênica (KOGEL, FRANKEN, HÜCKELHOVEN, 2006). Estes fungos podem habitar seu hospedeiro intracelularmente (CABRAL et. al., 1993; SADANANDA et. al. 2011) ou intercelularmente (BOYLE et al., 2001), presentes em quaisquer órgãos das plantas e em todos os estágios de seu desenvolvimento, colonizando todos os nichos ecológicos existentes (SCHULZ e BOYLE, 2005).

A presença dos fungos endofíticos nas raízes de seus hospedeiros pode favorecer ao seu crescimento, originando uma interação mutualista, onde há o fornecimento de nutrientes necessários à sobrevivência do micro-organismo. O endófito também pode sintetizar metabólitos capazes de inibir plantas epífitas e agentes patogênicos que competem pelo mesmo hospedeiro, assim como regular o metabolismo do hospedeiro (SCHULZ et al., 2002).

Os fungos endofíticos também podem produzir enzimas extracelularmente, que apresentam grande importância para a digestão e transporte de nutrientes para a célula do hospedeiro, além de enzimas envolvidas no processo de patogênese (BATENAM; BASHAM, 1976). Essas enzimas são de grande importância na degradação dos substratos, sendo os produtos utilizados por estes organismos para crescimento e reprodução; na digestão e transporte de nutrientes para a célula, com também, no processo de patogênese, principalmente em relação aos fungos necrotróficos, os quais matam as células do tecido colonizado (PATERSON; BRIDGE, 1994; ASSUNÇÃO et al., 1999).

Com a utilização excessiva e descontrolada dos tradicionais antibióticos e antifúngicos, ocorre o surgimento de micro-organismos patogênicos multirresistentes, tanto em humanos quanto em animais e plantas. Tal fato constitui atualmente uma enorme preocupação para a saúde pública, representando uma clara e crescente ameaça à saúde mundial (PABLOSMENDEZ et al., 1997; RAVIGLIONE et al., 1995; SADANANDA, 2011).

Há pelo menos um milhão de espécies novas de fungos endofíticos em todas as plantas (GANLEY et al., 2004), que apresentam potencial para fornecer uma ampla variedade de produtos naturais, bioativos e de estrutura única (TAN e ZOU, 2001; HUANG et al.; 2007).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos são pertencentes a diversos grupos estruturais, como esteroides, xantanas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenos, citocalasanas, alcalóides e diversos outros grupos estruturais (RAMOS, 2008). Pode-se observar na Tabela 3.1 alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, enfatizando a extensa diversidade química dessas substâncias, sendo classificadas como policetídeos, derivados do chiquimato, terpenos, esteroides, alcalóides e peptídeos, geralmente dotados de atividades antimicrobiana e citotóxica. Além dos metabólitos secundários, os endofíticos também têm importância na produção de enzimas aplicadas em processos biotecnológicos para biotransformação de moléculas e na alimentação do homem (BORGES et al., 2009).

3.3 Metabólitos bioativos produzidos por micro-organismos endofíticos

Mutações genéticas podem desenvolver novos fenótipos e essas novas sequências gênicas podem ser adquiridas pelas bactérias. Os eventos mutacionais ocorrem quando as sequências gênicas são modificadas, podendo conferir vantagens ao micro-organismo, tornando-o algumas vezes patogênico e perpetuando esta característica à sua progênie. Também pode ocorrer transferência de material genético entre as bactérias, sendo essa outra forma de aquisição de genes envolvidos com virulência (VIEIRA, 2009).

O aumento na predominância de bactérias multirresistentes, tem tornado a busca por novos agentes antimicrobianos uma importante estratégia para as terapias alternativas uma vez que poderá contribuir para debelar estas infecções com bactérias multirresistentes (LEVY, 2005). Em decorrência dessas multirresistências, um imenso mercado para novas drogas com atividade antimicrobiana é relevante, principalmente, levando em consideração a grande biodiversidade, que ocorre no Brasil. Tal fato faz com que estudos com endofíticos sejam bastante promissores e principalmente com a possibilidade na descoberta de

novos antimicrobianos, que poderão gerar dividendos para o país (NETO et al., 2002).

Tabela 3.1. Exemplos de metabólitos secundários de fungos endofíticos incluídos em diversas classes químicas (adaptado de SILVA, 2010).

Fungo endofítico	**Classe química**	**Metabólito secundário**	**Atividade biológica**
Neotyphodium sp.	Alcalóide	Chanoclavina	Inseticida
Colletotrichum sp.	Esteróide	1-oxoergosta-4,6,8(14),22-tetraeno	Antifúngico
Taxomyces andreanae	Terpeno	Taxol® (paclitaxel)	Anticancerígeno
Pezicula sp.	Derivados e isocumarina	(R)-Mellein	Herbicida, fungicida e algicida
Hormonema dermatioides	Quinona	Rugulosina	Inseticida
Endofíticos do capim-azul (*Poa ampla*)	Flavonóide	Tricina	Tóxico para larvas de mosquitos
Acremonium sp.	Peptídeo	Leucinostatina A	Anticancerígeno e antifúngico
Phoma sp.	Fenol	Ácido 2-Hidroxi-6-metilbenzóico	Antibacteriano
Phyllosticta sp.	Compostos clorados	Criptosporiopsina	Antimicrobiano e algicida

O desenvolvimento de resistência a antibióticos em diversos patógenos, representa um grave problema à terapêutica antimicrobiana, sendo, portanto, necessário e relevante, a busca por novas fontes de moléculas bioativas. O aumento das infecções hospitalares por *S. aureus* MRSA vem sendo acompanhada pela

resistência a vários antibióticos, como os aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos e tetraciclinas (RIBEIRO, 2005).

A busca por novos produtos bioativos que possam contribuir de maneira eficaz no combate a bactérias patogênicas, constitui uma meta importante tendo em vista o combate à bactérias multirresistentes como por exemplo *Staphylococcus aureus.* (DEMAIN, 1999; TAN E ZOU, 2005), devido à sua patogenicidade e seu frequente isolamento em amostras biológicas. Vários fatores contribuem para sua virulência como a formação de cápsula, produção da proteína A, toxinas, enzimas e constituintes da parede celular (KONEMAN, 2001).

Nas primeiras décadas do século XX, o surgimento de alguns medicamentos marcou a história da humanidade. Entre outros, pode ser mencionada a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928 (CALIXTO E SIQUEIRA JR., 2008). A estreptomicina foi o primeiro antibiótico ativo, desenvolvido em 1945, por Waksman, Schatz e Bugie, citado por Demain, 2006, utilizado contra a bactéria da tuberculose. Três anos depois, em 1948, Lechevalier e Waksman, citado por Demain, 2006, relataram a descoberta da neomicina, e a candicidina em 1953. A neomicina é um aminoglicosídeo utilizado como um antibacteriano tópico e a candicidina é um polieno utilizado como produto antifúngico tópico (DEMAIN, 2006).

Surgia uma nova era antibiótica, conduzida por metabólitos secundários isolados de micro-organismos com ação seletiva sobre bactérias patogênicas e fungos. Muitos medicamentos surgiram como as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, entre outros (DEMAIN, 2006). Em 2002, já haviam sido descritos mais de 22.000 compostos bioativos desenvolvidos a partir de micro-organismos. Entre eles estavam incluídos antibióticos produzidos, principalmente, por actinobactérias (45%), fungos (38%), e as bactérias unicelulares (17%) principalmente por *Pseudomonas* e *Bacillus* (BERDY, 2005).

Dentre as principais fontes de novos compostos bioativos estão as actinobactérias. Os antibióticos produzidos por espécies marinhas possuem características diferentes e únicas quando comparadas aos provenientes de fontes terrestres. Actinobactérias isoladas de amostras marinhas coletadas da região entremarés, na China, produziram efeito inibitório em relação a bactérias patogênicas como *Bacillus cereus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa) (LU, 2009).

Como exemplo, pode-se citar a abissomicina C, considerado um excelente inibidor de bactérias Gram-positivas, de isolados clínicos multirresistentes e de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina. O composto policíclico é produzido a partir do gênero *Verrucosispora* da subordem Micromonosporineae isolado de amostras de sedimento marinho (FIEDLER, 2005).

Outros dois compostos ativos, a partir do metabólito secundário do *Streptomyces*, designado de L0804, isolado de lodo marinho na China, apresentam atividades antimicrobiana e anti-tumoral, sendo um deles identificado como a griseoviridina (LIN, 2010).

Da planta medicinal *Kenedia nigricans*, nativa da Austrália, foram isolaram 24 isolados de *Streptomyces* endofíticos com destaque para *Streptomyces* sp. 114c-NRRL 30562 que produz o antibiótico Mumumbicina com elevada atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, esta atividade foi da ordem de 4,5 ng/mL enquanto a cloroquina, antibiótico padrão, a atividade para *M. tuberculosis* é da ordem de 7,0 ng/mL. Posteriormente, da planta do norte da Austrália *Grevillea pteridofilia*, também foram isolaram *Streptomyces* sp. NRRL 30566 que produz o antibiótico Kakadumicina com elevada atividade para *Plasmodium falciparum* cujo IC_{50} é da ordem de 7,0 ng/mL (CASTILLO, et. al., 2002).

Vários fungos endofíticos têm atraído atenção especial por causa de sua capacidade de produzir diferentes pigmentos com alta estabilidade química (SADANANDA, 2011). Os endofíticos também podem produzir antibióticos e esses produtos naturais têm sido observados inibindo ou matando uma ampla variedade de micro-organismos prejudiciais incluindo fitopatógenos, assim como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL et al., 2004).

Outros fungos endofíticos também já foram descritos como produtores de inúmeras substâncias bioativas com atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também atividade contra outros fungos de igual interesse clínico, como *Candida albincans* e *Trichophyton* spp. Algumas substâncias como criptocina (LI et. al., 2000) e criptocandina foram isoladas de fungos endofíticos e apresentavam elevada atividade antifúngica (STROBEL, et. al., 1999).

Pesquisa realizada por Ramos (2010) com fungos endofíticos isolados de *Sonchifolius smallanthus* mostraram ótima atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus, Kocuria rhizophila, Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Vieira et al. (2012) publicaram recentemente o primeiro registro de fungos

endofíticos em folhas da planta popularmente conhecida como alfinete-de-soldado (*Ixora coccinea* L., Rubiaceae) em Pernambuco.

Alguns grupos de pesquisa identificaram mais de centenas de isolados de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais do sul da Índia, que apresentaram atividade promissora contra antitumorais e antimicrobianos (GANGADEVI e MUTHUMARY, 2007, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do ipê roxo (*T. avellanedae*)

Uma coleta prévia foi realizada de três indivíduos diferentes de Ipê roxo, localizadas em diferentes pontos do Campus da Universidade Federal de Pernambuco e as amostras foram encaminhadas ao Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco para confirmação da espécie *Tabebuia avellanedae*, sendo as exsicatas dessas amostras anexadas no referido herbário. As coletas para o isolamento de micro-organismos endofíticos foram realizadas em dois períodos distintos: verão e inverno. As folhas sadias foram coletadas da região basal das árvores e acondicionadas em sacolas devidamente identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos/UFPEDA.

4.2 Assepsia e desinfestação das folhas

As folhas foram lavadas em água corrente e em seguida com água destilada para retirada de resíduos, sendo posteriormente colocadas sobre papel absorvente em temperatura ambiente para secar.

Em seguida, cada folha foi submetida ao processo de desinfestação para eliminação dos micro-organismos epifíticos, segundo a técnica de PEREIRA et. al., (1993); ARAÚJO et al. (2002), onde as folhas foram submetidas a tratamento com álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2,6% por cinco e dois minutos, novamente em álcool a 70% por 30 segundos e duas vezes consecutivas em água destilada por 30 segundos, sendo a última água de lavagem utilizada para controle

do processo através de semeio em placa de Petri com cada tipo de meio de cultura utilizado no isolamento (Figura 4.1).

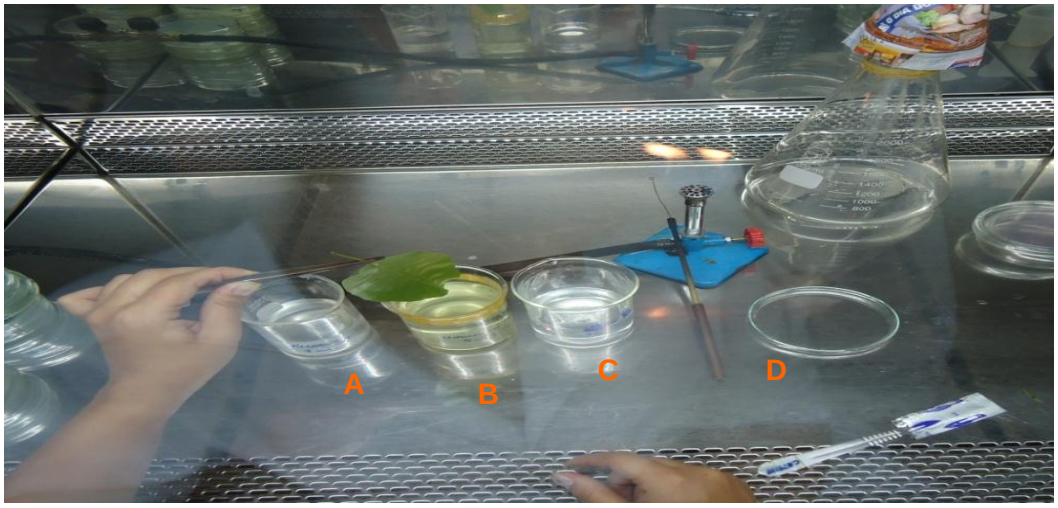

Figura 4.1. Etapas de desinfestação das folhas de *T. avellanedae* por imersão em álcool 70% (A), hipoclorito de sódio 2,6% (B), álcool a 70% (C) e água 30 s. (D).

4.3 Isolamento dos micro-organismos endofíticos.

O isolamento foi realizado utilizando a técnica de fragmentação segundo Araújo et. al. (2002). Foram retiradas as bordas e nervuras das folhas com estilete esterilizado sendo em seguida cortadas em fragmentos que foram transferidos para placas de Petri com os diferentes meios de cultura (Figura 4.2).

Para o isolamento de fungos, foram utilizados os meios de cultura Batata Dextrose Ágar - BDA (batata 200 g, glicose 20 g, Ágar 15 g, H_2O 1000 mL), pH 6,8 – 7 e Ágar Sabouraud – SAB (peptona 10 g, D+ glicose 40 g, Ágar 15 g, H_2O 1000 mL) pH 5,6 sendo ambos, acrescidos de clorafenicol (100 µg/mL); e para o isolamento de bactérias e actinobactérias foram utilizados os meios: Ágar Extrato de Levedura-extrato de Malte (ISP-2) (extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, dextrose 4 g, Ágar 15 g, H_2O 1000 mL) pH 7,2, H.T (extrato de carne e levedura 1 g, dextrina 10 g, N-Z amina A 2 g, CaCl $7H_2O$ 0,02 g, Ágar 13 g, 1000mL de água) pH 7,3 e ALA (L-arginina 0,3 g, glicose 1 g, glicerol 1 g, K_2HPO_4 0,3 g, $MgSO_4$ 7 H_2O 0,2 g, NaCl 0,3 g, extrato de levedura a 0,1%, $CuSO_45H_2O$ 1 mg, $MnSO_4H_2O$ 1 mg, $ZnSO_47H_2O$ 1 mg, Ágar 15 g, H_2O 1000 mL) pH 6,4, todos acrescidos de nistatina (100 µg/mL).

Figura 4.2. Processo de fragmentação das folhas (A) e distribuição dos fragmentos nos meios de cultura específicos (B e C).

As placas foram incubadas a 30°C por até 40 dias em estufa para B.O.D sendo o crescimento dos micro-organismos acompanhado diariamente.

A purificação dos micro-organismos foi realizada por esgotamento visando obter colônias isoladas de cada micro-organismo. A preservação das culturas puras foi realizada em tubos de penicilina, contendo meio sólido inclinado e adicionado óleo mineral esterilizado. Os tubos foram fechados com tampas de borracha, vedados com selo de alumínio e estocados a temperatura ambiente.

A frequência de isolamento foi obtida através do número de fragmentos com o crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos utilizados (ARAÚJO, et al, 2002).

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido

Visando selecionar os micro-organismos endofíticos isolados com atividade antimicrobiana, foi realizada uma seleção primária em meio sólido através da técnica do teste em bloco de gelose (ICHIKAWA et al., 1971) modificado.

Para obtenção dos blocos de gelose foram confeccionados “tapetes” a partir da cultura pura de cada endofítico a ser testado. Para tal, foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada esterilizada, da qual 100 µL foram transferidos para a placa de Petri contendo 20 mL dos meios de cultura SAB ou BDA

para fungos e dos meios de cultura ALA, ISP-2 ou MC para actinobactérias, sendo a suspensão espalhada com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30°C durante sete e 10 dias para crescimento de fungos e actinobactérias, respectivamente. Após período de incubação, os blocos de gelose circulares de seis mm de diâmetro foram feitos com auxílio de um furador esterilizado. Aos tapetes de fungos, foi adicionado um mL de clorofórmio na tampa da placa de Petri invertida, a fim de estacionar o crescimento celular.

Os micro-organismos testes utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana, foram provenientes de culturas pertencentes à Coleção de Culturas Microbianas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (Tabela 4.1). As suspensões microbianas foram preparadas em água destilada e sua concentração determinada e diluída até a escala 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Tabela 4.1. Micro-organismos utilizados nos teste de atividade antimicrobiana com bloco de gelose, provenientes da coleção Microbiana do UFPEDA.

Microrganismos	**Número (UFPEDA)**
Sthaphylococcus aureus	02
Bacillus subtilis	86
Mycobacterium smegmatis	71
Micrococcus. luteus	100
Escherichia coli	224
Enterococus faecalis	138
Klebsiella pneumoniae	396
Pseudomonas aeruginosa	416
Proteus vulgaris	740
Candida albicans	1007
Candida. krusei	1002
Malassezia furfur	1320
S. aureus (isolado clínico)	687
S. aureus (isolado clínico)	633
S. aureus (isolado clínico)	660
S. aureus (isolado clínico)	676
S. aureus (isolado clínico)	712
S. aureus Multiressistente	733

Todos os testes de atividade antimicrobiana, mostrados de maneira geral na Figura 4.3, foram realizados em triplicata e obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor de cada bloco.

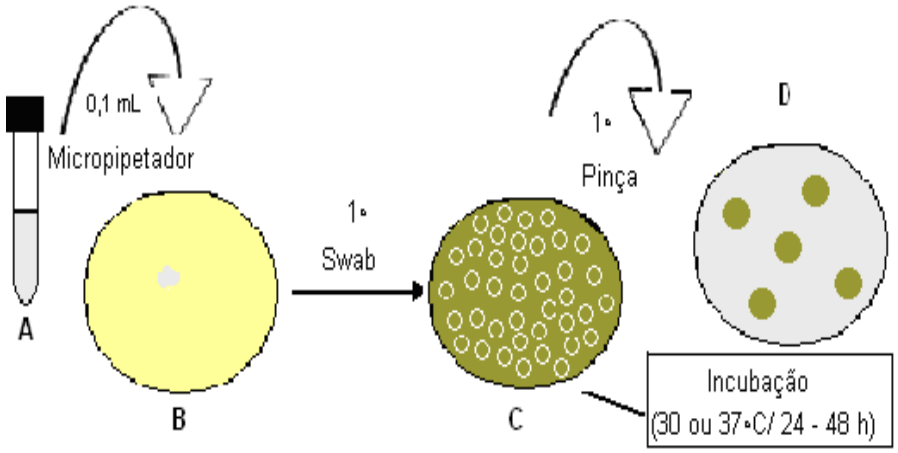

Figura 4.3. Esquema simplificado da técnica de atividade antimicrobiana por bloco de gelose (ICHIKAWA et al., 1971) modificado. Suspensão do micro-organismo teste (A), meio de cultura específico para crescimento do micro-organismo teste (B), endofítico em blocos de gelose (C), teste pronto (D).

4.5 Avaliação da produção de antibióticos em meio líquido

As actinobactérias endofíticas selecionadas em meio de cultura sólido, foram testadas contra os micro-organismos teste que se apresentaram sensíveis a estes, através da técnica de Difusão em Ágar (BAUER, et al., 1966) em diferentes meios de cultura líquidas de onde foram retiradas amostras e acompanhadas a variação de pH e produção de biomassa em diferentes tempos durante todo o bioprocesso. Tal procedimento visou determinar as melhores condições de cultivo para maior produção do antibiótico e sua posterior extração. Os meios de cultura líquidos utilizados comuns às actinobactérias foram M1, MPE e ISP-4 e ainda, um meio de cultura com a mesma composição do meio sólido em que o endofítico apresentou atividade antimicrobiana na seleção primária (Figura 4.4).

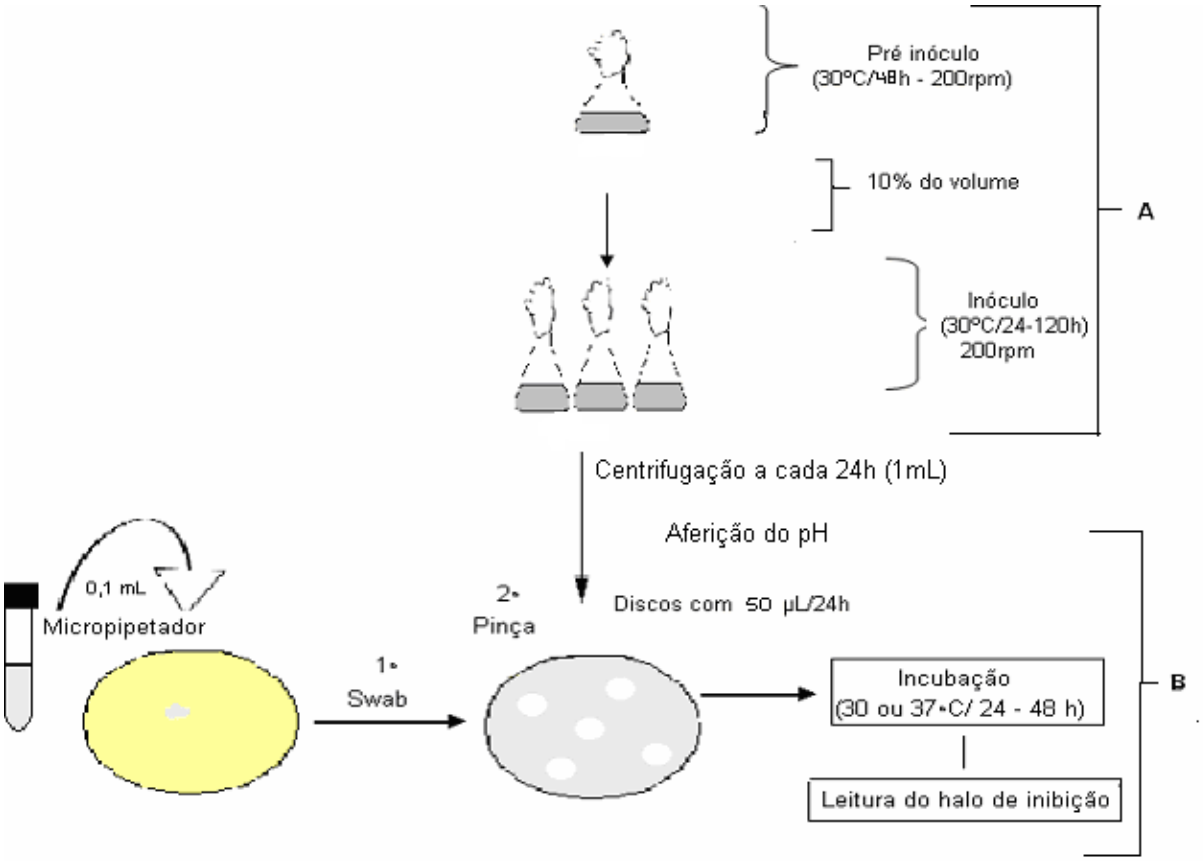

Figura 4.4. Esquema da avaliação de atividade antimicrobiana em meio líquido. Produção de moléculas bioativas (A), teste de difusão em disco (B).

Antes da realização do teste de atividade antimicrobiana, foram confeccionados tapetes do endofítico para obtenção do pré inóculo, este, foi cultivado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultura líquido aos quais foram adicionados três blocos de gelose do tapete.

O pré inóculo foi submetido à agitação de 180 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente (28-30 °C). Transcorrido o período de incubação, 10% v/v (5 mL) foram adicionados a frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de cada meio de cultura líquido para obtenção de diferentes inóculos que foram mantidos por até 120 horas sob agitação de 180 rpm a temperatura ambiente. Para realização dos testes de atividade antimicrobiana em difusão em Agar, a cada 24 horas de cultivo (chegando até 120 horas), alíquotas de 1 mL de cada frasco de Erlenmeyer foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas durante 2 minutos a 1000 rpm para separação do líquido metabólico da biomassa, que foi obtida através da diferença entre o peso do Eppendorf contendo apenas biomassa do seu peso inicial. O pH também foi aferido durante todo o bioprocesso.

Já para o cultivo líquido dos fungos foram utilizados os meios BDA e SAB líquidos tanto no pré inoculo quanto no inóculo. O procedimento utilizado na preparação do pré inóculo e inóculo foi similar ao utilizado para as actinobactérias sendo o tempo de retirada das amostras dos inóculos de 5 e 10 dias. Para separação do líquido metabólico da biomassa, as amostras foram transferidas para tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 rpm sendo em seguida filtradas. Discos de papel foram umedecidos com 50 µL do líquido metabólico (actinobactérias/fungos) para realização dos testes antimicrobianos e postos para secar,sendo em seguida transferidos para placas contendo suspensão do micro-organismo teste e incubadas a 30-37 °C por 24-48 horas em estufa B.O.D. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição.

4.6 Extração de compostos bioativos

Dos isolados de actinobactérias selecionadas na avaliação da produção de antibióticos em meio de cultura líquido, foram realizados inóculos com 500 mL de meio de cultura de acordo com as melhores condições de meio de cultivo (meio de cultura, tempo e pH). O líquido metabólico foi separado da biomassa através de centrifugação (10.000 rpm por 5 minutos).

Para a extração dos compostos bioativos no líquido metabólico das actinobactérias foram utilizados os solventes acetato de etila, hexano e clorofórmio em pH 2,0, 7,0 e 9,0 na proporção de 100 mL de líquido metabólico original para 50 mL de solvente. Os frascos contendo as misturas foram colocados sob agitação por 15 minutos permanecendo em repouso para separação em duas fases, sendo em seguida o extrato retirado e acondicionado em frasco âmbar e posto sob refrigeração. E para a extração da biomassa, foram utilizados os solventes acetona, metanol e etanol para a extração do princípio ativo em pH 2,0, 7,0 e 9,0. A cada 10 mL de solvente foi adicionado 0,2 g de peso úmido da massa celular e colocado sob agitação por 30 minutos (para a desidratação das células e extração dos produtos bioativos intracelulares), sendo o extrato separado em frasco âmbar e refrigerado.

Discos de papel foram umedecidos com 50 µL de ambos os extratos (líquido metabólico e biomassa) e com o extrato bruto. Em seguida, procedeu-se o teste

antimicrobiano através da técnica de difusão em Ágar, sendo as condições de incubação de acordo com o micro-organismo teste.

Para a extração dos compostos bioativos do isolado fúngica bioativa o líquido metabólico utilizado foi obtido de acordo com a preparação para avaliação da produção de antibióticos em meio líquido descrito no item 4.5 e foi utilizado como solvente extrator o acetato de etila de acordo com Sadananda et al. (2011), sendo a técnica de extração similar a das actinobactérias.

4.7 Prospecção química comparativa do extrato da planta de *T. avellanedae* com os extratos dos metabólitos dos endofíticos bioativos

Dos isolados de actinobactérias e fungo bioativo foram preparados extratos de acordo com o procedimento descrito no item 4.5 utilizando as condições específicas de tempo, pH, solvente e meio de cultura que resultaram numa melhor atividade antimicrobiana.

Para obtenção do extrato da planta, a partir de 100 gramas de folhas, que foram trituradas e maceradas, foi realizada uma infusão alcoólica contendo 90 mL do solvente para 10 gramas de folhas. A mistura foi submetida a agitação durante 15 minutos e posterior filtração, sendo armazenada em frasco escuro que foi mantido sob refrigeração.

A prospecção química comparativa dos extratos foi realizada através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando os compostos, fase móvel e padrões, mostrados na Tabela 4.2. A identificação dos componentes teve como suporte (fase estacionária) placas cromatográficas do tipo Merck 60 GF 254, Alugram SilG UV 254, Polygram SilG UV com espessura de 0,250 nm.

Tabela 4.2. Grupos químicos pesquisados nos extratos dos micro-organismos endofíticos bioativos selecionados e extrato da planta de *T. avellanedae* e características da Cromatografia em Camada Delgada.

Grupo químico	Fase móvel (v/v)	Revelador	Padrão
Quinonas	Tolueno (6): Acetato de etila (4): Ácido Fórmico (3)	Vapores de amônia	Lapachol
Polifenóis	Acetato de etila (100): Ácido Fórmico (3): Ácido Acético (3): Água (3)	NEU - Wagner & Bladt (1996); Neu (1956)	Luteolina Quercetina
Alcalóides	Acetato de etila (100): Ácido Fórmico (11): Ácido acético (11): Água (26)	Dragendorff(Wagner; Bladt,1996)	Pilocarpina
Triterpenos/ esteróides	Tolueno (90): Acetato de etila (12)	Lieberman Burchard (Harborne, 1998)	Ácido ursólico, ß-amirina, ß-sitosterol
Taninos	Acetato de etila (100): Ácido Fórmico (3): Ácido Acético (3): Água (3)	Vanilina clorídrica (Roberts et al.,1957)	Epicatequina
Iridoide	Acetato de etila (100): Ácido Fórmico (3): Ácido Acético (3): Água (3)	Vanilina clorídrica (Roberts et al.,1957)	Ipolamida
Compostos fenolicos	Acetato de Etila (100): Metanol (17): Água (13)	KOH 5% em metanol	cumarina padrão Merck

4.9 Classificação dos micro-organismos

A classificação das actinobactérias foi realizada através da Taxonomia convencional, no Laboratório de Coleção de micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE segundo Baltimore; Wikins (1986). Para tal, foram realizados micro cultivos em que cada micro-organismo foi inoculado em forma de estrias paralelas em placas de Petri contendo o meio de cultura no qual se obteve melhor crescimento e esporulação, sendo em seguida inseridas três lamínulas por estria em ângulo de 45°. Os micro cultivos foram incubados a 30 °C durante 15 dias em estufa para B.O.D. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas e postas sobre lâminas e observadas ao microscópio óptico onde se observou as características micromorfológicas dos isolados como presença ou ausência de esporos, forma de cadeia de esporos ou a presença de esporângio. As bactérias endofíticas isoladas foram classificadas através da Técnica de coloração de Gram em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. Os fungos foram classificados por códigos e serão posteriormente identificados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de micro-organismos endofíticos

5.1.1 Experimento piloto

Para isolamento de endofíticos se faz necessária a eliminação dos micro-organismos epifíticos por técnicas químicas visando a desinfestação cujo tempo de tratamento é variável. Diante disto, foi realizado um isolamento prévio (piloto) para determinar o tempo adequado de desinfestação.

Folhas de três diferentes indivíduos de *T. avellanedae*, foram desinfestadas por cinco minutos com hipoclorito de sódio (2,6%) sendo observado escurecimento das folhas, indicativo de oxidação. Após 12 dias foi observada alta oxidação em todos os fragmentos e surgimento apenas de uma colônia de fungo (Figura 5.1). Em decorrência deste resultado o tempo determinado em hipoclorito de sódio foi de dois minutos.

Soares (2011) afirma que a não observação de oxidação das folhas durante o processo de desinfestação com hipoclorito de sódio interfere positivamente no crescimento dos endofíticos isolados. Tal fato foi constatado em sua pesquisa em que isolou endofíticos de folhas de *Eugenia uniflora* L. conhecida popularmente como pitanga.

Motta et al. (2010) utilizaram no processo de desinfestação de folhas de *Ricinus communis* L. (mamoma) hipoclorito de sódio (3%) durante três minutos, não observando oxidação dos fragmentos foliares e observaram altas taxas (350) de isolados de fungos endofíticos após incubação de 100 fragmentos de folhas.

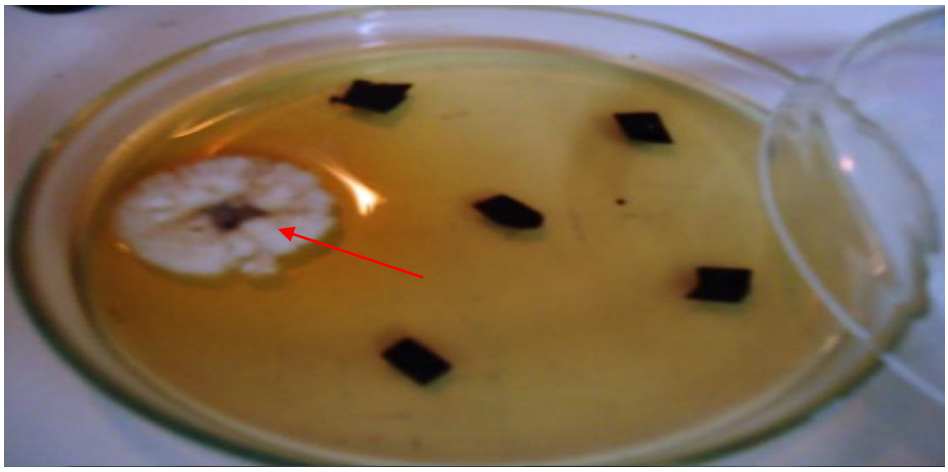

Figura 5.1. Placa de Petri com fungo endofítico emergindo de fragmento de folha de *T. avellanedae* em isolamento piloto para determinação do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (2,6%) processo de desinfestação.

5.1.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos de folhas de ipê roxo nos período verão e inverno

Nos isolamentos dos períodos de verão e inverno logo após o procedimento de desinfestação não foi observada oxidação das folhas, sugerindo que o tempo de dois minutos estabelecido para imersão em hipoclorito de sódio no processo de desinfestação das folhas foi adequado, bem como no plaqueamento da última água de lavagem não foi observado crescimento. Das amostras coletadas no período de verão, foram observadas a partir do sexto dia de isolamento, colônias de bactérias e de fungos emergindo dos fragmentos das folhas (Figura 5.2 A). No isolamento do período de inverno houve crescimento de colônias com características de fungos e bactérias após três e nove dias, respectivamente (Figura 5.2 B), e após 18 dias de incubação colônias de actinobactérias que imediatamente passaram por processo de purificação.

Já Vieira et al. (2012) avaliaram na microbiota endofítica de *Ixora coccinea* L., a presença de colônias fúngicas dos fragmentos foliares a partir do terceiro dia. Soares (2011) isolando endofíticos de folhas de *Eugenia uniflora* L. observou o surgimento das colônias bacterianas e fúngicas após 48 horas de cultivo.

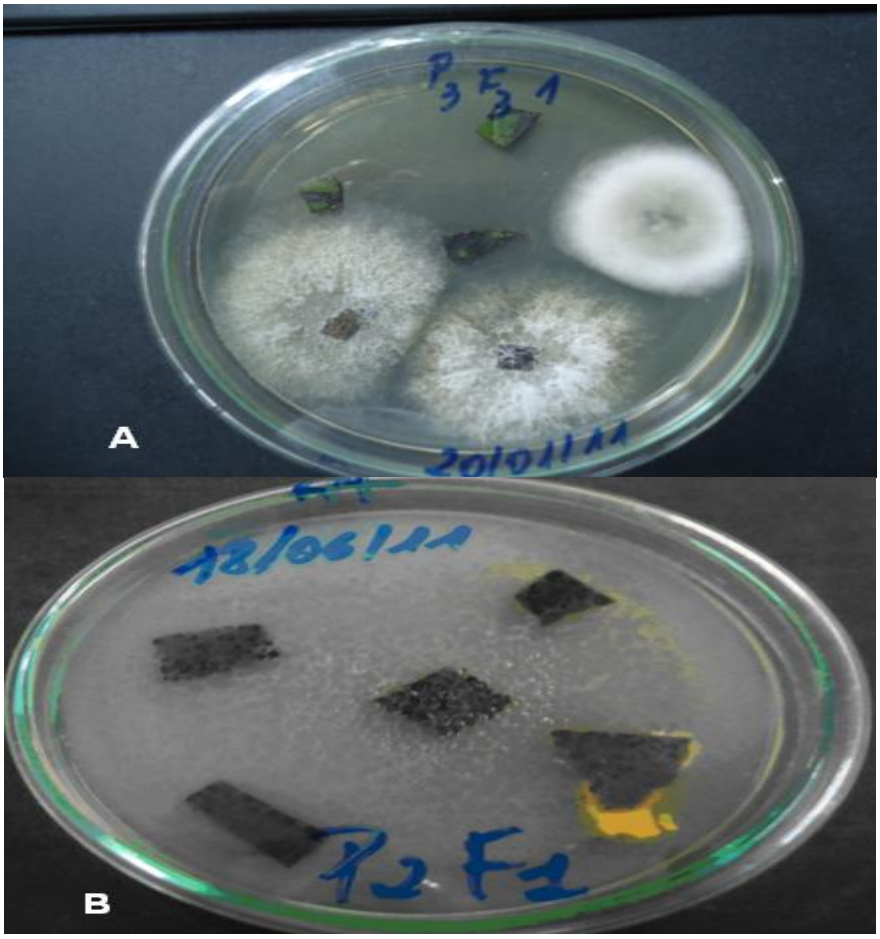

Figura 5.2. Isolamento de micro-organismos endofíticos do ipê roxo emergindo dos fragmentos foliares de *Tabebuia avellanedae* no período verão (A) e no período de inverno (B).

Foram isolados um total de 166 micro-organismos endofíticos sendo 73 correspondentes ao período de verão, dos quais 68,5% (50) fungos, 31,5% (23) bactérias. No período de inverno foram isolados 93 micro-organismos dos quais 78,5% (73) foram fungos, 14% (13) bactérias e 7,5% (7) actinobactérias. Tais resultados, apresentados na Figura 5.3 mostram que em ambos os isolamentos ocorreu maior predominância de fungos seguida por bactérias e em que o maior percentual foi observado no período de inverno, onde ocorreu também o isolamento de actinobactéria observada apenas neste período e com baixo percentual.

Ainda, das bactérias provenientes do isolamento do verão 82,6% foram Gram positivas e 17,4 % Gram-negativas, já no período de inverno 90% foram Gram-positivas e apenas 10% Gram-negativas.

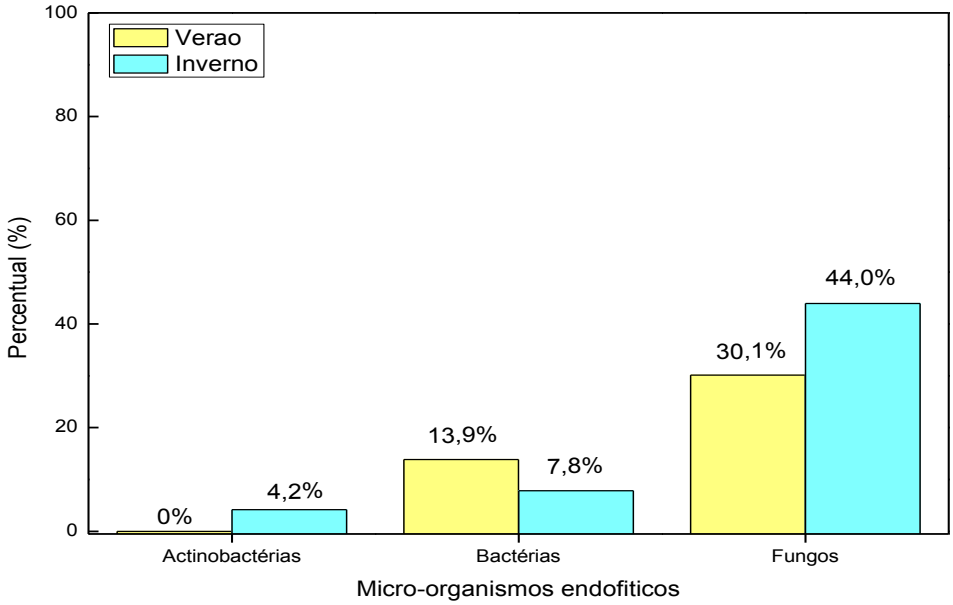

Figura 5.3. Percentual geral dos isolamentos dos grupos de micro-organismos endofíticos de folhas de *T. avellanedae* nos períodos de verão e inverno.

Entre os 166 micro-organismos endofíticos isolados nos períodos de verão e de inverno, 123 fungos (74,1%) 36 bactérias (21,7%) e 7 actinobactérias (4,2%).Observou-se melhor crescimento de fungos no meio SAB, enquanto que para bactérias e actinobactérias os meios ISP 2 e ALA, respectivamente. (Figura 5.4).

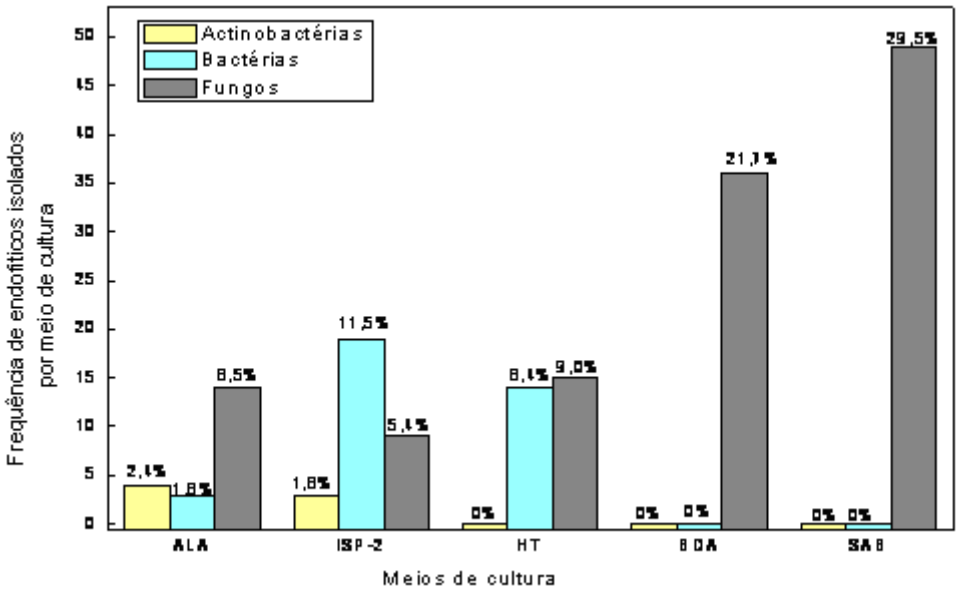

Figura 5.4. Frequência dos grupos de micro-organismos endofíticos isolados de folhas de *T. avellanedae* nos períodos de verão e inverno nos meios de cultura ALA, HT, ISP-2, BDA e SAB.

Nossos dados corroboram com os que foram obtidos por Soares (2011) no isolamento de micro-organismos endofiticos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) no qual houve também maior ocorrência de fungos (43) seguido por bactérias (7) e actinobactéria (1).

Similarmente, Conti (2007) avaliando a diversidade de micro-organismos endofíticos da planta medicinal *Borreria verticillata* (L.) obteve 87 isolados dos quais 50,6% fungos, 35,6% bactérias e 13,8% actinobactérias.

Costa (2012) obteve 158 isolados de bactérias endofíticas de folhas de *Phaseolus vulguris* (feijoeiro) sendo que 36,7%, 32,9%, 29,7% e 0,6% pertencem aos Filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobactéria e Bacteroidetes, respectivamente.

Ainda, Favoretto (2008) isolou um total de 26 bactérias endofíticas de folhas de diferentes plantas (Coquinho do cerrado, Lobeira, Barbatimão, Quaresmeira branca e Tamanqueira) coletadas do cerrado de São Carlos-SP e dentre essas, duas apresentaram características de *Streptomyces* spp.

Magalhães et al. (2008) isolaram 159 fungos endofíticos de diferentes partes de plantas de *Eremanthus erythropappus*, (DC.) MacLeish, popularmente conhecida como candeia e constataram que existe diferença significativa entre as taxas de colonização em cada tecido vegetal analisado, sendo a relação no caule (115) >, folhas (35) > e sementes (9).

Rodrigues (2010) pesquisando a frequência de fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex. Schult.f. (canela de ema) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins obteve 97 fungos endofíticos dos quais 37 foram isolados das folhas e 60 das raízes.

O grande percentual de fungos endofíticos encontrado neste trabalho possivelmente pode ser decorrente de algum mecanismo de resistência dos mesmos ao antifúngico nistatina utilizado nos isolamentos.

Pileggi (2006) utilizou para os isolamentos de endófitos de diferentes partes (folhas, caule e pecíolo) de espinheira-santa os meios de cultura: BDA+ tetraciclina 100 µg/mL (fungos), Ágar nutriente + Benomyl 6 µg/mL (bactérias) e Meio seletivo para isolamento de actinobactérias (AC) + nistatina 50 µg/mL+ ciclohexamida 50 µg/mL + ácido Nalidíxico 10 µg/mL, além de variar a temperatura de incubação e/ou o pH do meio, com o propósito de isolar uma diversidade maior de micro-organismos endofíticos. No total, foram isolados 915 endofíticos, entre eles 793 fungos

filamentosos, 121 bactérias e 1 actinobactéria. Nos isolados de folhas e pecíolos foram mais frequentes fungos filamentosos, já nas sementes a frequência de isolados de bactérias foi predominante.

Devaraju; Satish (2011) utilizaram os meios de cultura sólidos Potato Dextrose Ágar (PDA), Malt Extract Ágar (MEA) e Czapek-dox-*Ágar* (CZ) para o isolamento de fungos endofíticos a partir de *Mirabilis jalapa* L, sendo o meio de cultura BDA o mais eficaz tanto para o isolamento dos endófitos quanto para produção de compostos bioativos.

Randall et al. (2009) afirmam que a escolha do meio de cultivo é essencial para o sucesso do processo de crescimento e metabolismo microbiano, bem como aumento na frequência de micro-organismos isolados.

5.1.3 Identificação de Actinobactérias

Foram realizadas observações microscópicas das actinobactérias PCA 1, PCA 2, PCA 3, PCA 4, PCA 5, PCA 22 e PCA 25 isoladas no período inverno, através da microscopia óptica, além de observações macroscópicas. A classificação dos endófitos foi realizada segundo Baltimore; Wikins (1986).

As actinobactérias foram identificadas pelas características micromorfológicas, observando-se onde foi observada a presença de longas hifas ramificadas, filamentos ondulados ou retos e esporóforos em forma de espirais longas em todos os isolados mostrando que pertencem ao gênero *Streptomyces* (Figura 5.5). Estudos moleculares a serem realizados posteriormente utilizando primers da região 16S rDNA, associada a algumas características bioquímicas possibilitarão a identificação da espécie.

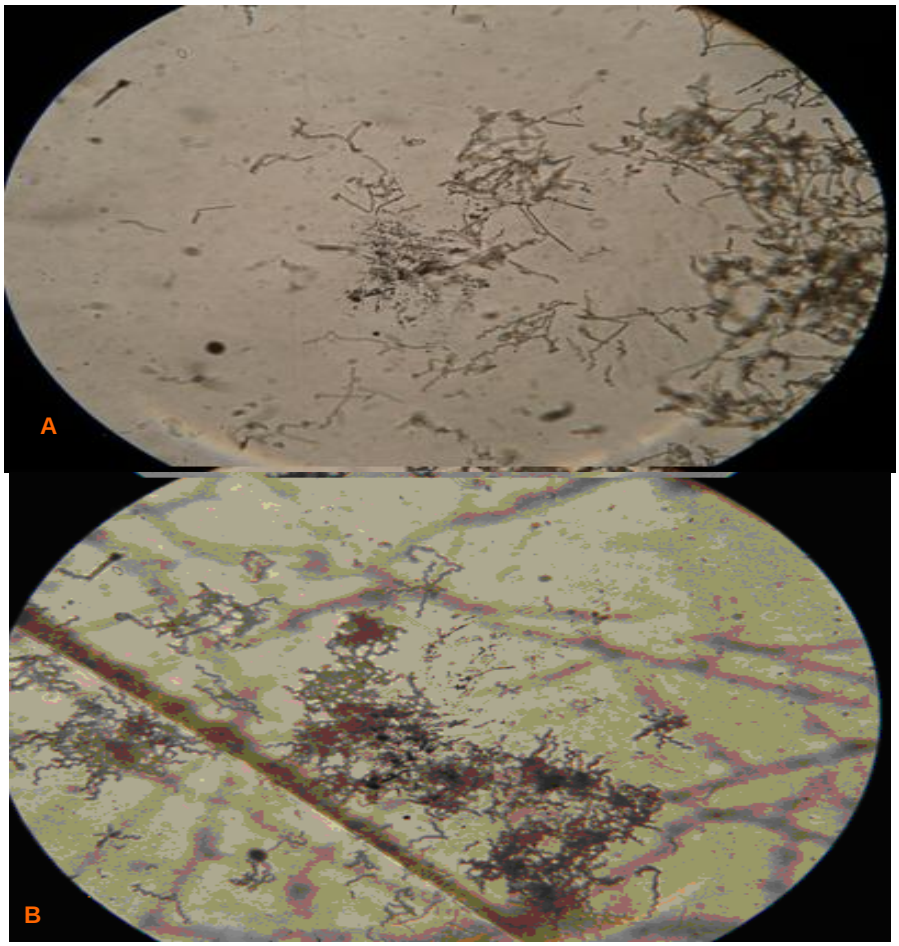

Figura 5.5. Micromorfologia dos isolados de *Streptomyces* spp. cultivadas durante 15 dias a 30°C visualizadas em microscópio óptico no aumento 40x: PCA 22 (A), *e* PCA 22 (B) .

Verma et al. (2009) isolaram 55 actinomicetos de diferentes partes de *Azadirachta indica* A. Juss. e através da observação das características macroscópicas morfológicas das culturas e observação em microscópio óptico, seguindo de acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica, os isolados foram identificadas como *Streptomyces* spp. (49,09%); *Streptosporangium* spp. (14,5%); *Microbispora* spp (10,9%); *Streptoverticillium* spp. (5,5%) e *Nocardia* spp. (3,6%).

Zhao et al. (2011) dentre 560 espécies de actinomicetos isolados a partir da raiz, caule e folhas de 26 diferentes plantas medicinais identificaram a maioria como *Streptomyces* spp. seguidos dos gêneros *Micromonospora, Nonomuraceae, Oerskovia, Promicromonospora e Rhodococcus*.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido

5.2.1 Actinobactérias

Dos sete *Streptomyces* spp. obtidos (PCA 1, PCA 2, PCA 3, PCA 4, PCA 5, PCA 22, PCA 25) 43% (3) apresentaram atividade antimicrobiana para alguns dos micro-organismos testados. Nenhum dos *Streptomyces* spp. apresentou atividade contra bactérias Gram negativas. A média dos diâmetros dos halos de inibição variou entre 13,5 e 31,5 mm para *S. aureus* UFPEDA 02 e *M. furfur* UFPEDA 1320 (Figura 5.6), respectivamente. Observa-se que dos isolados de *Streptomyces* que apresentaram atividade antimicrobiana, apenas *Streptomyces* sp. PCA 4 apresentou atividade contra o isolado clínico *S. aureus* UFPEDA 663 e *Streptomyces* sp. PCA 3 contra *B. subtilis* UFPEDA 86 (Figura 5.7).1.

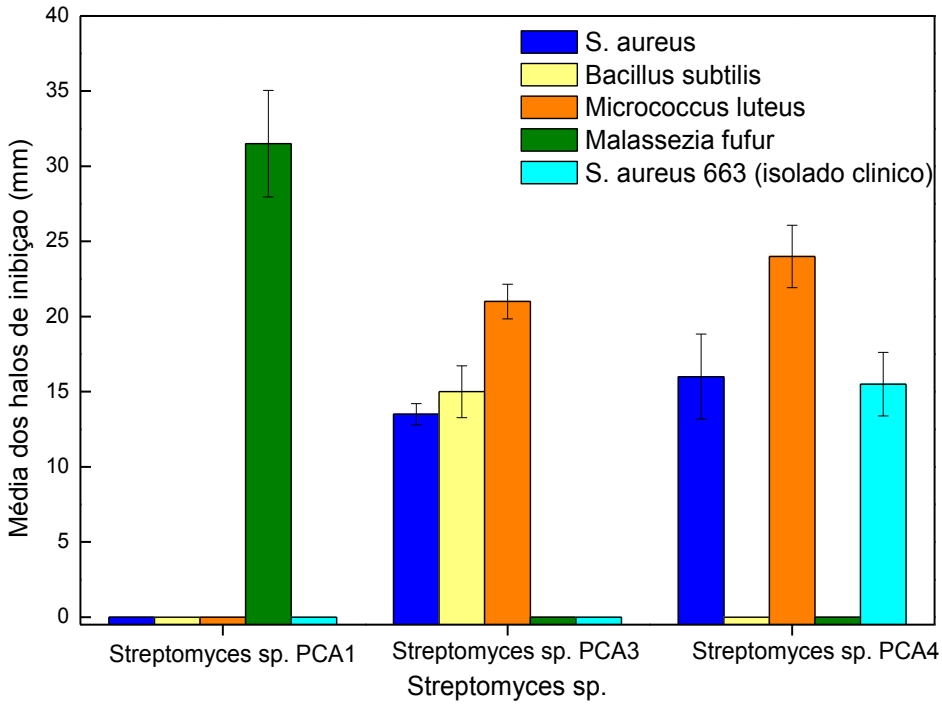

Figura 5.6 Médias dos halos de inibição (mm) de *Streptomyces* spp. contra diferentes micro-organismos.

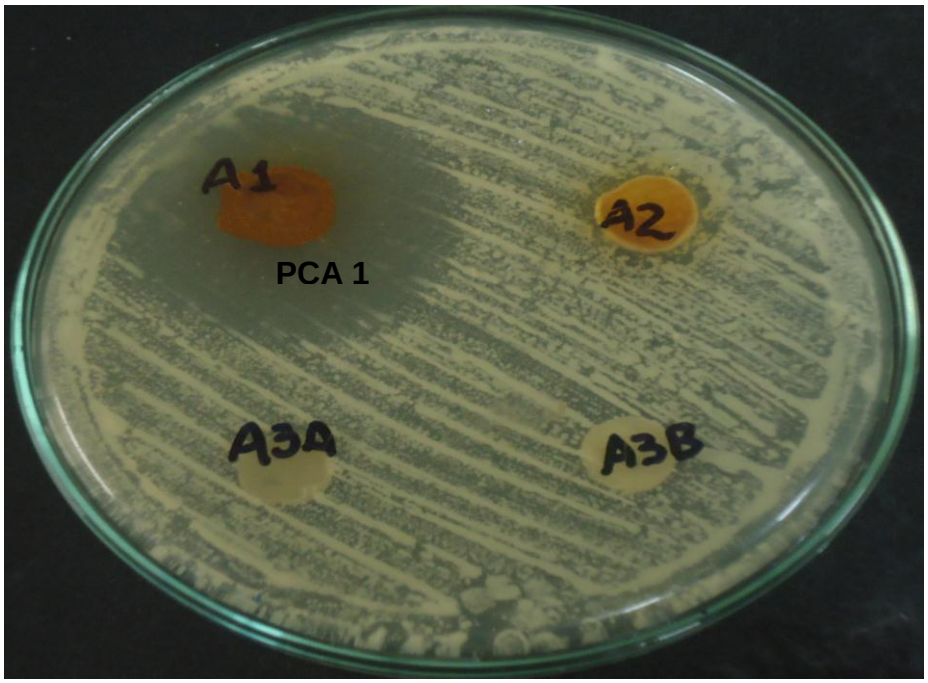

Figura 5.7 Halo de inibição de *Streptomyces* sp. PCA 1 contra *M. furfur* UFPEDA 1320.

Lima (2006) isolou 289 micro-organismos endofíticos, sendo 71 das folhas (72% fungos, 21% bactérias e 7% actinomicetos) e 218 das raízes (55% fungos, 38% bactérias e 7% actinomicetos) de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.). Os testes de bloco de gelose (meio de cultura sólido) mostraram que 35,2% dos actinomicetos (*Streptomyces* spp.) apresentam atividade antimicrobiana, sendo 23,5% endofíticos da raiz e 11,7% da folha para pelo menos um dos seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, quatro isolados de *Malassezia* spp. e quatro de *Candida* spp.

De actinobactérias endofiticas isoladas de plantas da região de Chiang Mai na Tailândia, três dos *Streptomyces* spp. inibiram o fungo *Colletotrichum musae*, cinco apresentaram alta ação antagonista contra *Fusarium oxysporum* e inibiram significamente o crescimento de ambos (Taechowisan et al 2005).

Conti (2007) em seleção primária da atividade antimicrobiana de endofíticos isolados de vassourinha-de-botão (*Borreria verticillata* (L.)) constatou que sete isolados de actinobactérias apresentaram-se bioativas contra bactérias Gram negativas, Gram positivas e leveduras.

Do total (26) de bactérias endofíticas isoladas de folhas de diferentes plantas provenientes do Cerrado, dos isolados de *Streptomyces* spp. tiveram seus potenciais

antagônicos testados em meio de cultura sólido contra *Sthaphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia Marcensis* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC10231 dessas apenas *Streptomyces* sp. proveniente de *Butia capitata* apresentou-se bioativa contra *S. aureus* e *E. faecalis* com halos de inbição de 11 e 13 mm, respectivamente (FAVORETTO , 2010).

Atividade antimicrobiana siginificativa contra dermatófitos e outros fungos de importância clínica foi observada em testes realizados com *Streptomyces* sp. Hedaya48 (El-Gendy; El-Bondkly, 2010).

Soares (2011), apesar de ter isolado apenas uma actinobactéria como endofitica de folhas de pitanga de um total de 51 endofíticos isolados, constatou que a mesma possui um amplo espectro de ação antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos.

Em seleção primária da atividade antimicrobiana de um total de 560 espécies de actinomicetos isolados de diferentes plantas medicinais contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos filamentosos, Zhao et al. (2011) constataram que 59 dos isolados mostraram atividade antibacteriana contra 11 micro-organismos e 15 isolados apresentaram antibiose contra *S. aureus*.

5.2.2. Fungos

Do total de fungos testados no período do verão, apenas três (PEA 35, PEF 28, PEF 6) representando 6% do total de isolados apresentaram-se bioativos contra quatro dos micro-organismos testes utilizados (*S. aureus* UFPEDA 02, *M. smegmatis* UFPEDA 71*, C. albicans* UFPEDA 1007 *e Enterococcus faecalis* UFPEDA 138). A média dos halos de inibição variou entre 15 e 29 mm em que o isolado PEF 28 destacou-se pelo maior halo contra *M. smegmatis* e o isolado PEF 6 pelo amplo espectro de ação contra bactérias (*S. aureus* e *Enterocccus faecalis*) e levedura (*C. albicans*) (Figura 5.8).

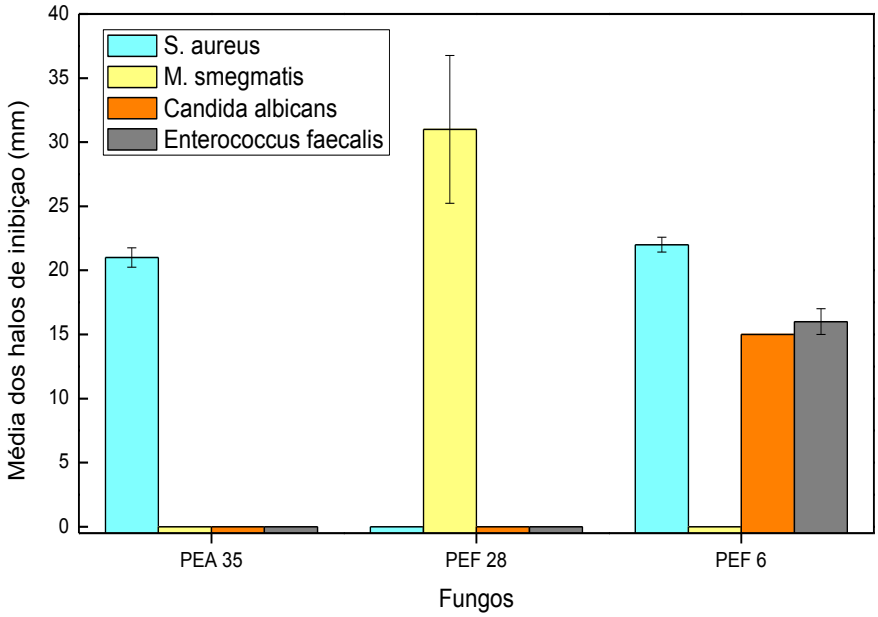

Figura 5.8. Médias dos halos de inibição (mm) de fungos endofíticos do período de verão.

Dos 73 fungos isolados no período do inverno, seis (PCA 19, PCA 20, PCF 49, PCF 80, PCF 97, PCF 112) apresentaram atividade antimicrobiana contra *S.aureus* UFPEDA 02, *B.subtilis* UFPEDA 86, *P.vulgaris* UFPEDA 740, *E. faecalis* UFPEDA 138 *e E. coli* UFPEDA 224. A média dos halos de inibição variou entre 13 e 22 mm. (Figura 5.9).

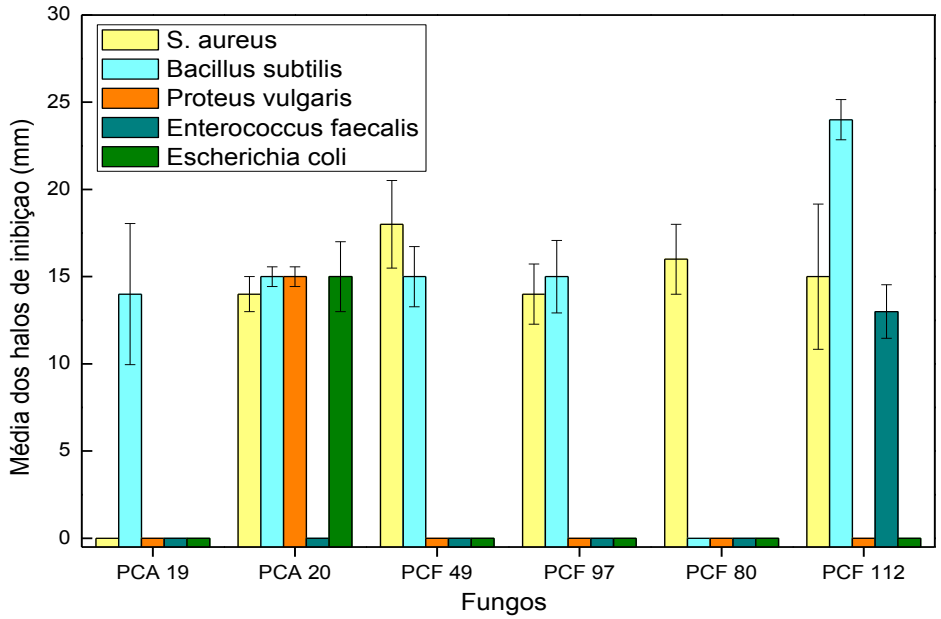

Figura 5.9. Médias dos halos de inibição (mm) de fungos endofíticos do período de inverno.

Gong e Guo (2009) isolaram um total de 300 fungos endofíticos de plantas medicinais chinesas sendo provenientes de *Dracaena cambodiana* (172) *Aquilaria sinensis* (128). Na seleção primária da atividade antimicrobiana contra *Bacillus subitlis, Sthaphylococcus aureus, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus neoformans e Candida albicans* 12,2% (*D. cambodiana*) e 3,1% (*A. sinensis*) dos fungos apresentaram-se bioativos com halos de inibição entre 7 a 27 mm para pelo menos um dos micro-organismos teste.

Santos et al. (2010) submeteram um isolado endofítico de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtido de *Indigofera suffruticosa* Mill., ao teste de atividade antimicrobiana em meio sólido frente a *Staphylococcus aureus* 02; *Bacillus subtilis* 8*6; Escherichia coli* 224; *Klebsiella pneumoniae* 396 e *Pseudomonas aeruginosa* 416 da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE e constaram que esse endófito possuia atividade antimicrobiana considerável contra todos os micro-organismos testes analisados com média dos halos de inibição entre 11 a 35mm de diâmetro.

Devaraju e Satish (2011) do total (17) de fungos endofíticos isolados de *Mirabilis jalapa* L. avaliaram a atividade antimicrobiana do isolado *Fusarium* sp. em caráter seletivo preliminar contra diferentes bactérias Gram positivas e Gram negativas patógenas humanas e fitopatógenos, diversos fungos filamentosos e leveduras e constataram que o endófito testado apresentava atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram positivas (*Sthaphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Bacillus subtilis*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, quatro cepas diferentes de *Xanthomonas campestris*, *X. axonopodis malvacearum*) e diferentes espécies de *Aspergillus*.

5.3 Avaliação da produção de antibióticos em meio líquido

5.3.1 Actinobactérias

Os isolados *Streptomyces* spp. PCA 3 e PCA 4 apresentaram atividade no teste de fermentação em meio líquido nos diferentes meios de cultura (ALA, ISP4, M1 e MPE) que foram avaliados durante 96 horas e 72 horas, respectivamente. A

média dos halos de inibição do fermentado de *Streptomyces* sp PCA 3 durante 96 h variou de 11 a 32 mm para *S. aureus* UFPEDA 02, *M. luteus* UFPEDA 100, *B. subtilis* UFPEDA 86 enquanto as médias dos halos de inibição de *Streptomyces* sp. PCA 4 variou de 13 a 35 mm para *S.aureus* UFPEDA 2, *S. aureus* UFPEDA 663 e *M. luteus* UFPEDA 100 (Figura 5.10). Apenas *Streptomyces* sp. PCA 1 não continuou a apresentar antibiose contra *M. furfur* UFPEDA 1320 na fermentação.

Observa-se ainda na Figura 5.10 que o melhor meio de cultura para a produção do antibiótico com maior espectro de ação para ambos os isolados *Streptomyces* spp. foi o meio de cultura MPE. O isolado *Streptomyces* sp. PCA 3 apresentou melhor produção de metabólito bioativo no tempo de 96 h (Figura 5.10 A) enquanto *Streptomyces* sp. PCA 4 apresentou-se com melhores resultados após 72 horas de cultivo (Figura 5.10 B).

Cunha et al (2009) analisando o processo fermentativo em diferentes meios de cultura do isolado endofitica *Streptomyces* sp. EBR-49 UFPEDA isolada das raízes da planta *Conyza bonariensis* (L.) observaram maiores halos de inibição contra *Bacillus subtillis* ATCC 6633 no meio de cultura ISP2, concluindo que este é o melhor meio de cultura para produção do composto bioativo desse isolado.

Semelhantemente aos resultados obtidos nesta pesquisa, Soares (2011) concluiu que dentre os quatro meios testados para a fermentação de *Streptomyces* sp. UFPEDA 968, isolado de folhas de *Eugenia uniflora* (L), o meio MPE foi o que favoreceu maior produção de metabólitos bioativos por 96 h, sendo a média dos halos de inibição para *Mycobacterium tuberculosis* de 25 mm e para *S.aureus* UFPEDA 667 *(*isolado clínico) 672 de 27 mm.

Do total de 300 endofíticos de diferentes árvores da floresta Amazônica no Peru, 14 actinomicetos apresentaram atividade antimicrobiana expressiva (≥ inibição do crescimento de 90%) contra pelo menos seis micro-organismos teste. Dos endófitos bioativos, oito exibiram alta inibição em processo fermentativo para pelo menos três bactérias patógenas e três mostram-se inibidoras de *Candida Albicans* (Bascom-Slack et al, 2009).

Zhang et al. (2012) também observaram atividade antibacteriana de 65 isolados de actinomicetos endofíticos, obtidos a partir de diferentes espécimes de plantas medicinais na China, contra *Staphylococcus aureus* MRSA (resistente à penicilina). Os resultados mostraram que aproximadamente 18,5% dos isolados mostraram atividade contra a bactéria.

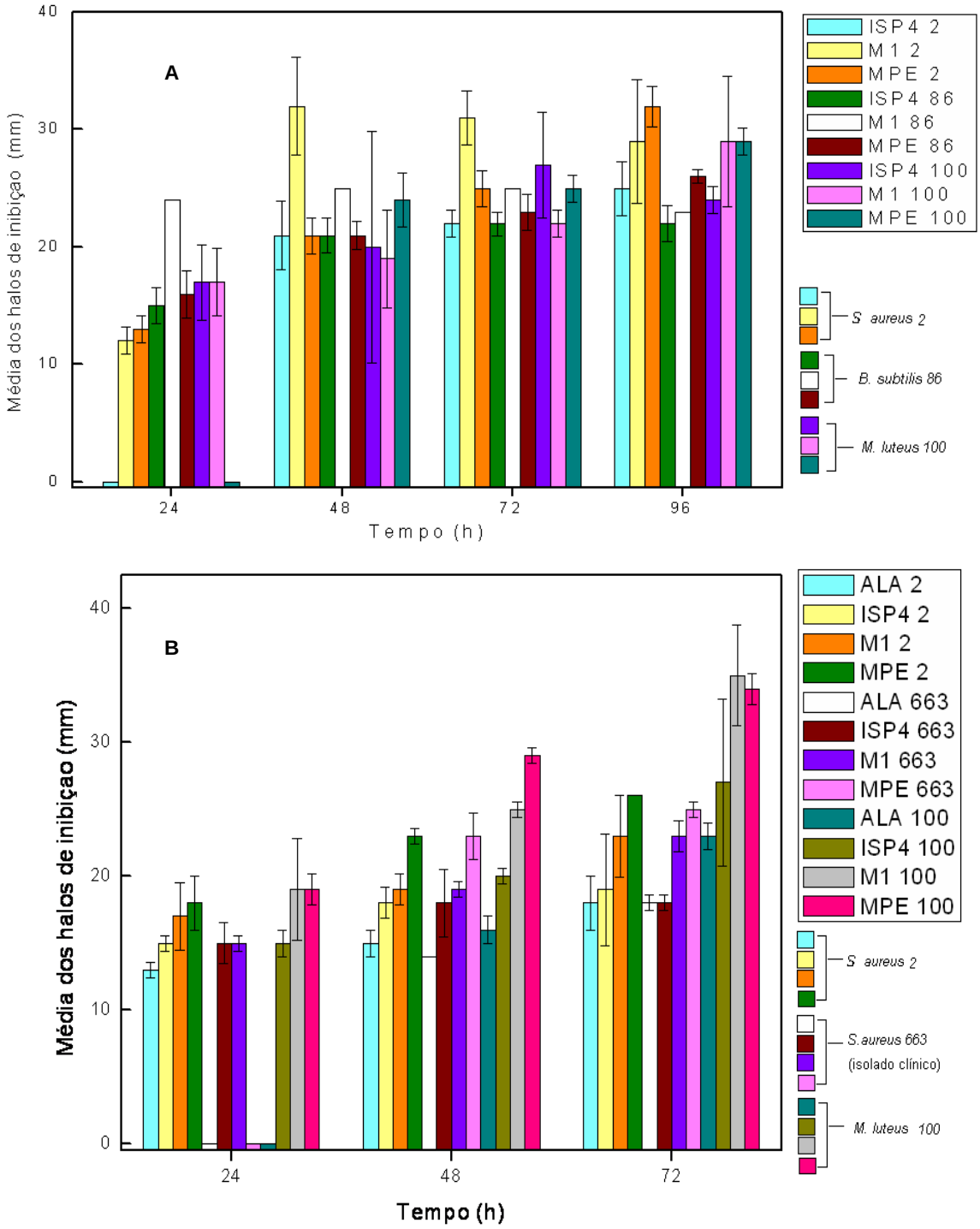

Figura 5.10. Média dos halos de inibição (mm) dos isolados *Streptomyces* sp. PCA 3 contra *S.aureus* UFPEDA 2, *B. subtilis* UFPEDA 86 , *M. luteus* UFPEDA 100 (A) e *Streptomyces* sp. PCA 4 contra *S.aureus* UFPEDA 2, *S. aureus* UFPEDA 663 e *M. luteus* UFPEDA 100 (B) durante a fermentação em diferentes meios de cultura líquido (ALA,ISP4, M1 e MPE).

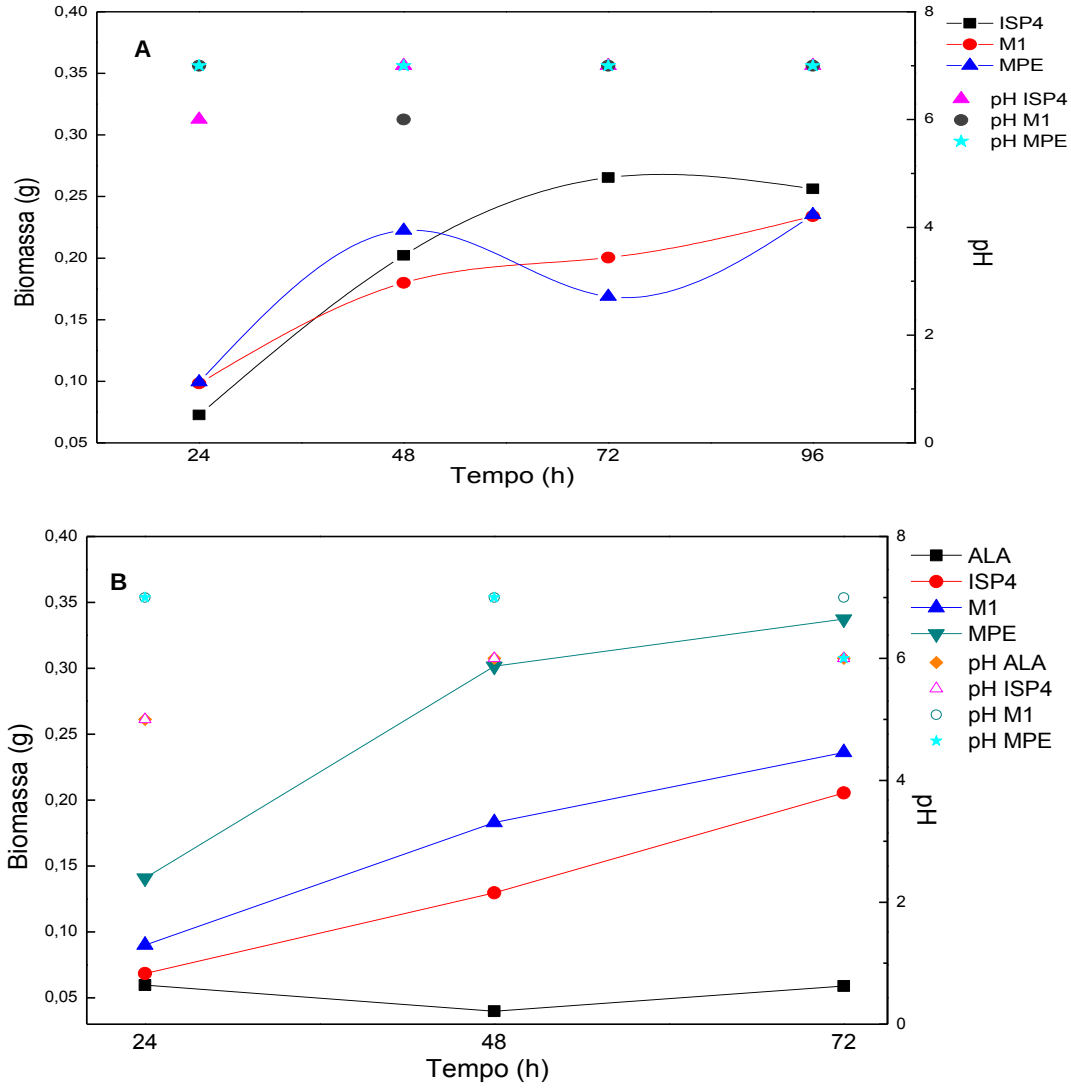

Figura 5.11. Produção de biomassa e variação de pH dos diferentes meios de cultura líquidos (ALA, ISP4, M1 e MPE) durante a fermentação das linhagens de *Streptomyces* sp. PCA 3 (A) e *Streptomyces* sp. PCA 4 (B).

Salamoni et al. (2010) conduziram experimentos utilizando 25 espécies de actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Dos isolados, 90% mostraram atividade contra bactérias, sendo que todos inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas e 55,6%, de Gram-negativas, entre elas, *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os isolados foram cultivados utilizando meio mineral de caseína e amido e ISP2. Detectou-se que 80% dos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias

teste em meio de cultura sólido (seleção primária) e desses, 44,4% foram capazes de produzir metabólitos bioativos em meio de cultura líquido, fermentação (seleção secundária).

De *Streptomyces malachitofuscus*, por processo fermentativo, foi observada excelente atividade antifúngica contra *Mucor miehei* e *Candida albicans*, sendo dois compostos bioativos puros isolados a partir dos extratos obtidos dessa fermentação (SAJID et al , 2011).

5.3.2 Fungos

Do total (9) de fungos bioativos em meio de cultura sólido, apenas o isolado PEF 6 proveniente do isolamento do período de verão apresentou-se bioativa no meio SAB líquido com 120 h de fermentação com média de halo de 37 mm apenas contra *C. albicans* UFPEDA 1007 (Figura 5.12) reduzindo seu espectro de ação observado nos resultados em meio de cultura sólido onde este isolado apresentou halo inibição variando de 15 a 22 mm para *S. aureus* UFPEDA 02, *E. faecalis* UFPEDA 138 e *C. albicans* UFPEDA 100, valendo salientar que apesar do halo de inibição apresentado contra *C. albicans* ter sido o menor, este apresentou desvio padrão igual a 0 , indicando adequada precisão do teste (Figura 5.8).

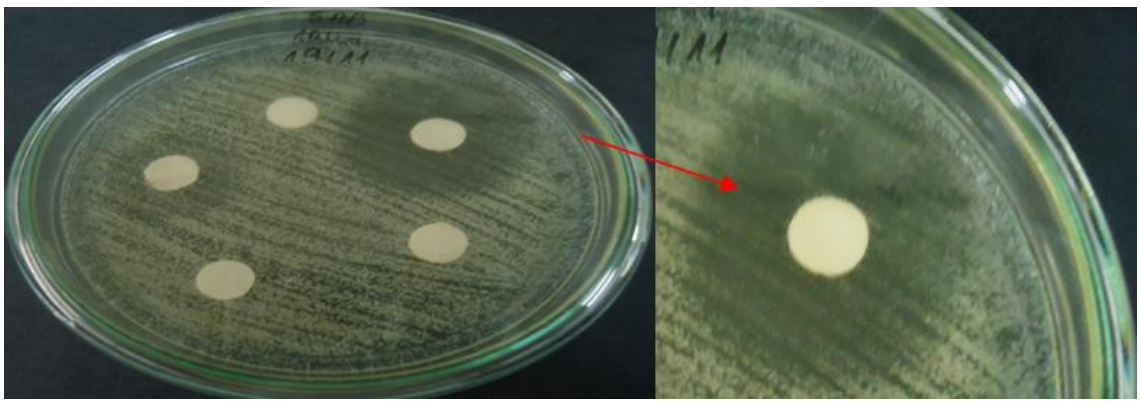

Figura 5.12. Halo de inibição do fungo endofítico PEF 6 contra *C. albicans* UFPEDA 1007.

Souza et al. (2004) isolaram 571 fungos endofíticos das plantas tóxicas da Amazônia (512) *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (59). Dentre esse total, 64 isolados de *P. longiflora e 15 de S. cogens* foram avaliados em processo fermentativo durante oito dias em meio de cultura BDA contra *Bacillus subtilis,*

Sthaphylococcus aureus, *Escherichia coli, Candida albicans, Trichoderma* sp. e *Aspergillus* flavus, e observaram que 24,05% dos endófitos testados inibiram o crescimento de um ou mais dos micro-organismos testes, exceto *Candida albicans* e *Trichoderma* sp. que não foram inibidos pelos metabólitos de nenhum dos isolados selecionadas.

Campos et al (2008) a partir de fungos endofíticos isolados da planta *Piptadenia adiantoides*, em cultivo líquido constatou que o endófito *Cochliobolus* sp. foi ativo contra *Leishmania amazonensis* , *Fusarium* sp. foi ativo contra 11 isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* e um isolado de *Candida albicans* e dois isolados de *Bipolaris* sp. apresentaram atividade biológica contra *L. amazonensis* e contra quatro isolados de *P. brasiliensis*, além de inibir a enzima tripanotiona redutase.

Ding et al. (2010) isolaram 26 espécies de fungos endofíticos do caule, folhas e frutos da Árvore da Vida (*Camptotheca acuminata*), que durante a fermentação, apresentaram atividade antibacteriana contra *Pseudomonas solanacearum* e *Ralstonia solanacearum* com halo de inibição variando de 9 a 24 mm.

Sadananda et al. (2011) isolaram 13 fungos endofíticos de diferentes partes de *Tabebuia argentea* (ipê amarelo) e avaliaram a atividade antimicrobiana através de alíquotas provenientes da fermentação em meio de cultura BDA, sendo o solvente acetato de etila utlizado para extração das moléculas bioativas contra diferentes isolados de bactérias e fungos patógenos, além de avaliarem a capacidade antioxidante. Do total foram selecionados dois isolados identificados como *Alternaria alternata* e *Aspergillus niger* devido a detecção de lapachol em seus extratos. Ambos os fungos endófitos, apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra as bactérias patógenas: *Klebsiella pneumonia, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Clavibacter michiganensis sub.* sp. *michiganensis* e contra os fungos patógenos : *Aspergillus flavus, A. niger, A. nidulans, A. flaviceps, Alternaria carthami, A. helianthi, Cercospora carthami, Fusarium solanum, F. oxysporum, F. verticiloides e Nigrospora oryzae.* Igualmente, os endófitos *A. alternata* e *A. niger* foram considerados excelentes fontes de obtenção de compostos com alto potencial antioxidativo.

5.4 Extração dos compostos bioativos

A extração dos compostos bioativos dos líquidos metabólicos provenientes dos bioprocessos das isolados de *Streptomyces* sp. PCA 3 e PCA 4, foi realizada do

líquido metabólico em pH 2,0, 7,0 e 9,0 utilizando os solventes orgânicos acetato de etila, clorofórmio e hexano para ambos os isolados. E para a extração dos compostos bioativos da biomassa foram utilizados os mesmos pHs e os solventes aquosos acetona, etanol e metanol.

Os resultados apresentados na extração do isolado *Streptomyces* sp. PCA 3, mostraram que no líquido metabólico esgotado (LME) nos diferentes solventes e pHs restaram moléculas bioativas mesmo após repetição do processo de extração em que a proporção do solvente em relação ao líquido metabólico original (LMO) foi aumentada. A média dos halos de inibição apresentados pelo LMO contra *B. subtilis* UFPEDA 86 e *S. aureus* UFPEDA 02 (micro-organismos testes) foi de 24 e 25 mm, respectivamente.

Na Figura 5.13 observa-se que os extratos de acetato de etila apresentaram atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* UFPEDA 86 *e S. aureus* UFPEDA 02 nos pHs 2 e 7 enquanto que os extratos de clorofórmio apresentaram atividade contra os mesmos micro-organismos testes nos pH 7 e 9, diferentemente do hexano que não extraiu moléculas bioativas do líquido metabólico. Diante da análise dos resultados, as melhores condições de extração foi a utilização do solvente acetato de etila, pH 7 para a extração dos compostos bioativos.

Os extratos obtidos da biomassa nos diferentes solventes (acetona, etanol e metanol) de *Streptomyces* sp. PCA3 não apresentaram atividade antimicrobiana indicando que todo antibiótico produzido foi excretado durante o bioprocesso.

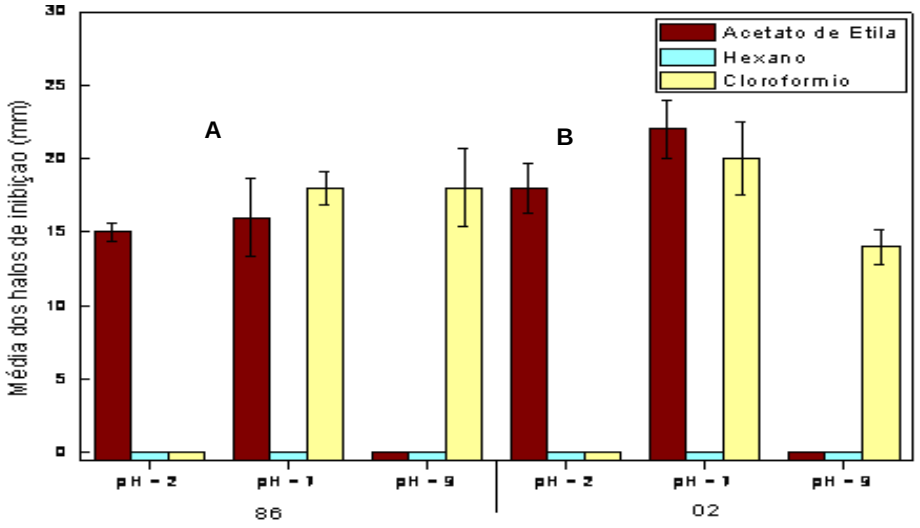

Figura 5.13. Média dos halos de inibição contra *B. subtilis* UFPEDA 86 (A) e *S. aureus* UFPEDA 02 (B) dos extratos dos solventes do liquido metabólico de *Streptomyces* sp. PCA 3 a partir de diferentes pHs.

Na extração dos compostos bioativos do isolado *Streptomyces* sp. PCA 4 também foram observadas moléculas bioativas no líquido metabólico esgotado (LME) porém em quantidades inferiores em relação ao isolado *Streptomyces* sp. PCA 3. A média dos halos de inibição apresentados pelo líquido metabólico original (LMO) contra *S. aureus* UFPEDA 02 e *M. luteus* UFPEDA 100 foi de 24 e 26 mm, respectivamente. Observa-se na Figura 5.14 que os extratos obtidos a partir dos solventes acetato de etila e clorofórmio nos pHs 7 e 9 apresentaram atividade antimicrobiana com média de halos de inibição entre 16 e 26 mm (acetato de etila) e 19 e 24 mm (clorofórmio) contra *M. luteus* UFPEDA 100 e *S. aureus* UFPEDA 02, sendo os maiores halos de inibição observados no pH 9. Neste isolado semelhantemente a *Streptomyces* sp. PCA 3 o solvente hexano não foi eficiente para extrair moléculas bioativas do líquido metabólico em nenhuma variação de pH (Figura 5.14).

Quanto à extração de compostos bioativos da biomassa do isolado *Streptomyces* sp. PCA 4 apresentaram atividade antimicrobiana contra *M. luteus* UFPEDA 100 e *S. aureus* UFPEDA 02 os extratos obtidos dos solventes acetona e metanol em apenas uma faixa de pH cada um, não sendo observada nenhuma atividade no extrato etanólico (Figura 5.15).

Diante da análise dos resultados, de maneira geral, sugeriu-se para extração do líquido metabólico pH 7 e solvente clorofórmio enquanto para a extração dos compostos bioativos da biomassa o solvente acetona e pH 2.

Para extração dos compostos bioativos do isolado do fungo PEF 6 optou-se pelo acetato de etila por ser um solvente de polaridade média e pelo pH 7, estando a variação nos meios de cultura utilizados e tempo de duração do bioprocesso. A média do halo de inibição do LMO contra *C. albicans* UFPEDA 1007 foi de 30 mm. Considerou-se a extração das moléculas bioativas bastante eficaz com o solvente utilizado, pois a média do halo de inibição em cinco dias (38 mm) foi alta, como pode ser observado na Figura 5.16.

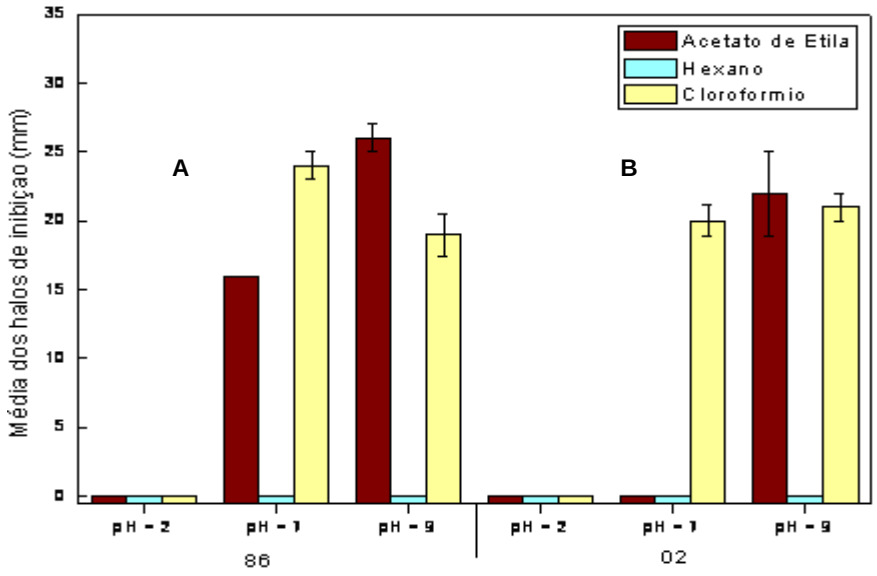

Figura 5.14. Média dos halos de inibição contra *M. luteus* UFPEDA 100 (A) e *S. aureus* UFPEDA 02 (B) dos extratos dos solventes do líquido metabólico de *Streptomyces* sp. PCA 4 em diferentes pHs.

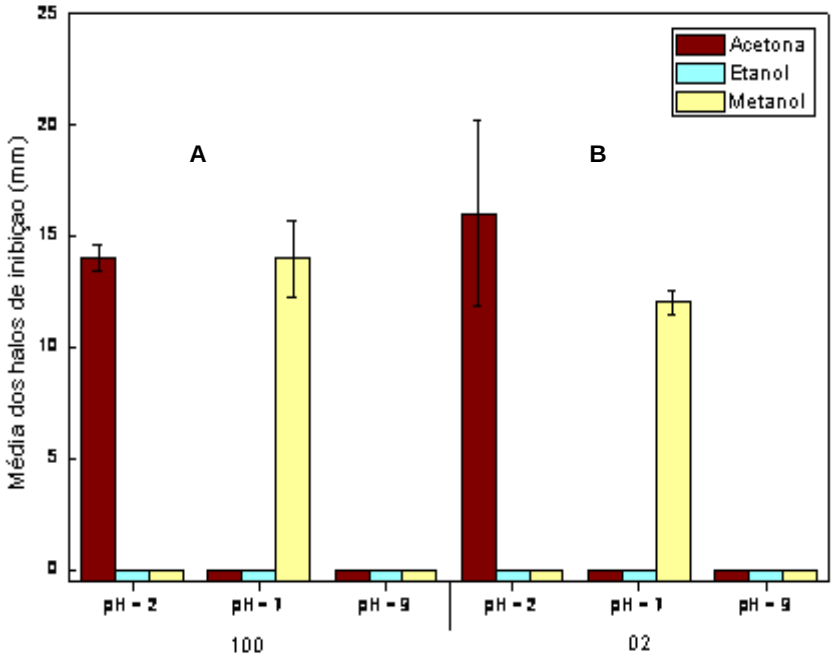

Figura 5.15. Média dos halos de inibição contra *M. luteus* UFPEDA 100 (A) e *S. aureus* UFPEDA 02 (B) dos extratos dos solventes em diferentes pHs da biomassa de *Streptomyces* sp. PCA 4.

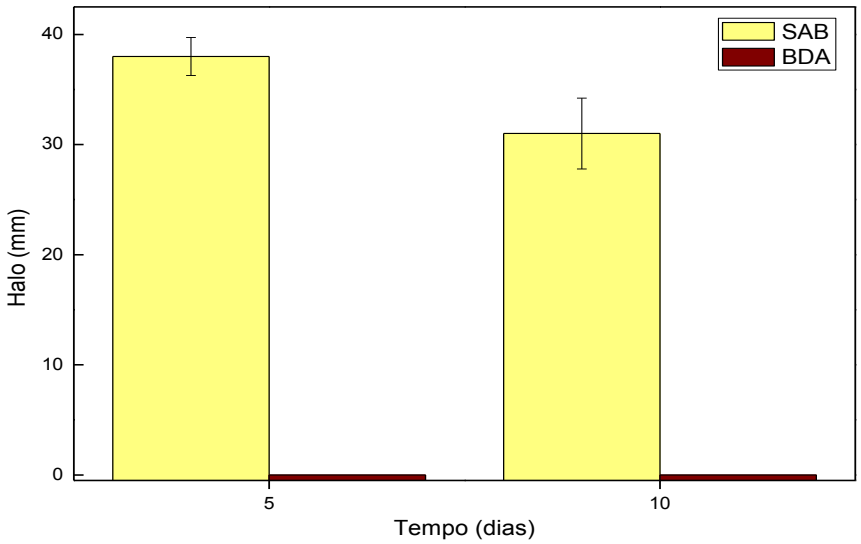

Figura 5.16. Média dos halos de inibição (mm) dos extratos do solvente acetato de etila do líquido metabólico do isolado do fungo PEF 6 contra *C. albicans* UFPEDA 1007.

Resultados similares foram observados por alguns autores, como Heck (2007) avaliou a produção de antimicrobianos provenientes de *Streptomyces* sp. onde utilizou 24 isolados do gênero onde 4 foram selecionados por apresentarem maiores halos de inibição contra *Staphylococcus aureus* MRSA. O meio de cultura que favoreceu a produção de antimicrobianos continha peptona e extrato de levedura. A melhor temperatura de produção foi de 37 °C e o pico de produção ocorreu no terceiro dia. Os solventes testados para extrair o composto produzido foram: álcool etílico, álcool metílico, acetato de etila e clorofórmio. O melhor sistema solvente testado foi clorofórmio, etanol e água, na proporção 8:5:1. Após análise em CCD, observou-se estrutura semelhante a da bleomicina.

Oliveira (2008) isolou 70 actinomicetos endofíticos de tomateiro (*Lycopersicon esculentun*) e realizaram atividade antimicrobiana contra 39 micro-organismos de importância clínica e 16 fitopatógenos. Dos 70 isolados, 88,6% apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um fitopatógeno e 87,1% inibiram os micro-organismos clinicamente importantes. No processo de fermentação, foram utilizados os meios de cultura liquido caldo SC, ISP2, meio Sahin e o meio de sais minerais com baixos nutrientes, nas temperaturas de 30, 35 e 40°C durante 10 dias de incubação. Do total de isolados bioativos, (2) *Streptomyces* spp. apresentaram amplo espectro de ação inibindo inclusive *Sthaphylococcus aureus* MRSA e

Salmonella enteretidis nos meios de cultura SC e ISP2 nas temperaturas de 30 e 35°C sendo a atividade antimicrobiana máxima observada no tempo de 120 horas de incubação.

Guimarães (2009) selecionou os fungos endofíticos *Glomerella cingulata* e *Guignardia mangiferae* isolados de folhas de *Viguiera arenaria*. O processo fermentativo foi realizado em diferentes meios líquidos: Czapek, extrato de malte e caldo batata-dextrose e meio sólido de arroz. *G. cingulata* foi investigado quanto à produção de tirosol, um metabólito secundário. Foi observado que a melhor condição para a produção do composto bioativo ocorreu no meio extrato de malte, durante seis dias de incubação a 30 °C, pH 5,0, sob agitação de 120 rpm sendo o etanol o solvente considerado como melhor extrator das moléculas bioativas.

Tonial et al (2010) realizou experimentos com fungos endófiticos isolados a partir das folhas da aroeira (*Schinus terebenthifolius*). O potencial de produção de compostos antimicrobianos dos endófitos foi avaliado através da fermentação sendo o solvente utilizado para extração dos metabólitos bioativos o metanol. O diâmetro dos halos de inibição mostraram os seguintes resultados: para *S. aureus:* 13 mm; *E. coli*: 9 mm e 10 mm e *P. aeruginosa*: 19 mm. Após análise química por cromatografia em camada delgada, os resultados sugerem que a atividade antimicrobiana dos endófitos testados pode estar vinculada à produção de alcalóides. Também foi detectada a presença de antraquinonas e terpenóides.

Silva (2010) cultivou o fungo endofítico *Dreschslera ravenelii* (SS33) isolado das folhas de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) sob diferentes condições fermentativas: meio de cultura liquido Czapek e caldo de batata sob agitação (120 RPM) incubação por 216 a 480 horas na temperatura de 30°C. Os solventes diclorometano e acetato de etila foram utilizados para tentativa de extração das moléculas bioativas dos líquidos metabólicos fermentados. Foram utilizados como micro-organismos testes: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Kocuria rhizophila* O extrato cultivado durante 480 horas no meio Czapek e extraído com o solvente diclorometano proporcionou melhores halos de inibição contra *S. aureus* e *K. rhizophila*.

Estes resultados mostram a importância da fase extrativa do antibiótico da fermentação para posteriormente realizar a purificação e caracterização química do metabólito bioativo.

5.5 Prospecção química comparativa do extrato das folhas de *T. avellanedae* com os extratos dos metabólitos dos endofíticos bioativos

Realizar prospecção química dos micro-organismos endofíticos isolados é de grande importância para conhecer os principais grupamentos químicos constituintes dos extratos do líquido metabólico dos endofíticos isolados, pois podem apresentar potencial biotecnológico além do farmacológico. Os resultados da prospecção química dos principais grupos químicos podem ser observados na Tabela 5.1.

Guimarães (2009) considera a pesquisa com micro-organismos endofíticos necessária para desenvolvimento de novos fármacos tendo em vista que os mesmos são prolíficos produtores de novas substâncias bioativas adivindas da relação com seu hospedeiro. E que tal fato, proporciona uma maior diversidade química aos metabólitos produzidos.

Tabela 5.1. Prospecção química dos grupos químicos dos extratos de folhas de *T. avellanedae* e de seus isolados endofíticos bioativos.

Isolados	Quinonas	Triterpenos	Esteróides	Saponinas	Compostos fenólicos	Taninos	Alcalóides
Extrato da planta	-	+	+	-	+	-	-
*PEF 6	-	+	-	-	+	-	-
**PCA 3	-	-	-	-	+	-	+
***PCA 4	-	+	+	-	+	-	+

*Fungo endofítico PEF 6

***Streptomyces* sp. PCA 3

*** *Streptomyces* sp. PCA 4

+ : presença; - : ausência

Fonte: FERREIRA, 2012.

Na cromatografia em camada delgada (CCD) através do calculo do fator de retenção (Rf) de cada padrão, foram detectados os triterpenos ß-amirina (extratos da planta e líquido metabólico e biomassa do isolado *Streptomyces spp.* PCA 4) e ácido ursólico (extrato da planta) além do esteróide ß-sitosterol detectado nos extrato da planta e *Streptomyces* sp. PCA 4 (Figura 5.17). Enquanto que o isolado *Streptomyces* sp. PCA 3 apresentou apenas a presença de compostos

representantes do grupo químico flavonóides e alcalóides. Na corrida cromatográfica do isolado PEF 6 foram detectados o triterpeno ß-amirina (Figura 5.18) e o composto fenólico flavonóide (Figura 5.19).

Diante dos resultados citados, observou-se maior similaridade entre o extrato das folhas de *T. avellanedae* com o isolado de *Streptomyces* sp. PCA 4. Contrariamente a estes resultados, Tonial et al (2010) não observou similaridade entre os compostos bioativos detectados dos extratos das actinobactérias e fungos endofíticos isolados de folhas de *Schinus terebenthifolius* (aroeira) em sua pesquisa.

De *S. malachitofuscus*, bioativo contra *Mucor miehei* e *Candida albicans*, por uma série de técnicas cromatográficas foram identificados os compostos ácido fenilacético e indolil-3-ácido láctico através de espectrometria de massa(MS) e análise por RMN (SAJID et al , 2011).

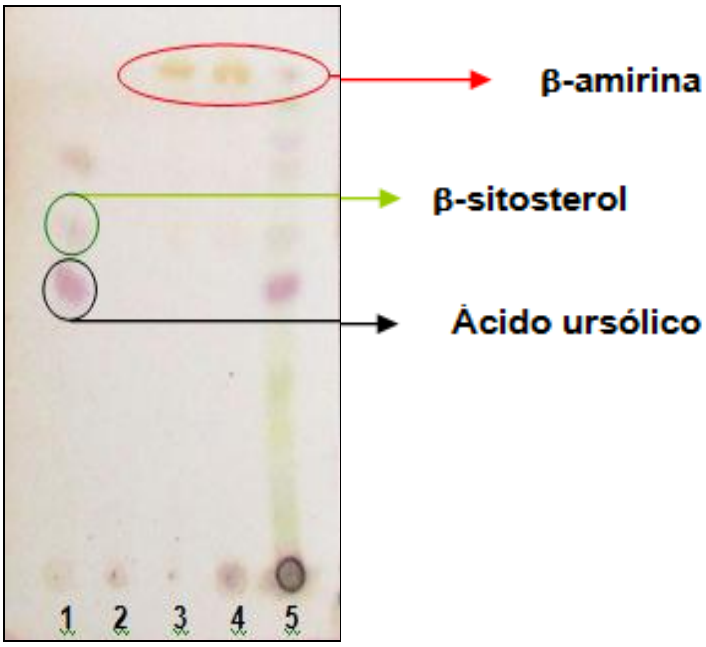

Figura 5.17. Cromatografia em camada delgada dos extratos de *T. avellanedae* e *Streptomyces* spp. para detecção de triterpenos e esteróides. (1) padrão, (2) extrato de PCA 3, (3) extrato de PCA 4, (4) extrato da biomassa de PCA 4, (5)extrato das folhas de *T. avellanedae*.

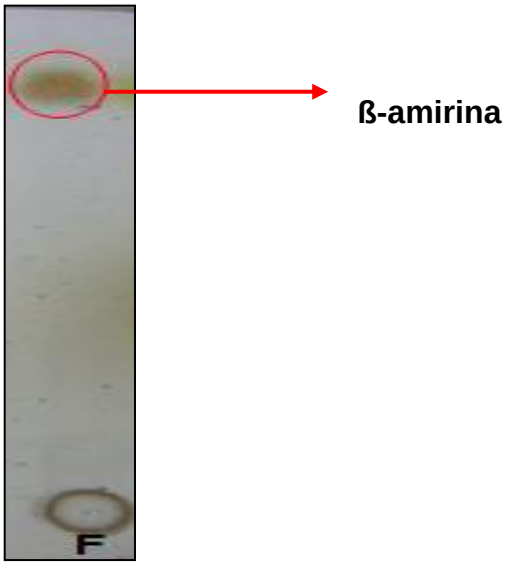

Figura 5.18. Cromatografia em camada delgada do extrato do fungo PEF 6 para detecção de triterpeno.

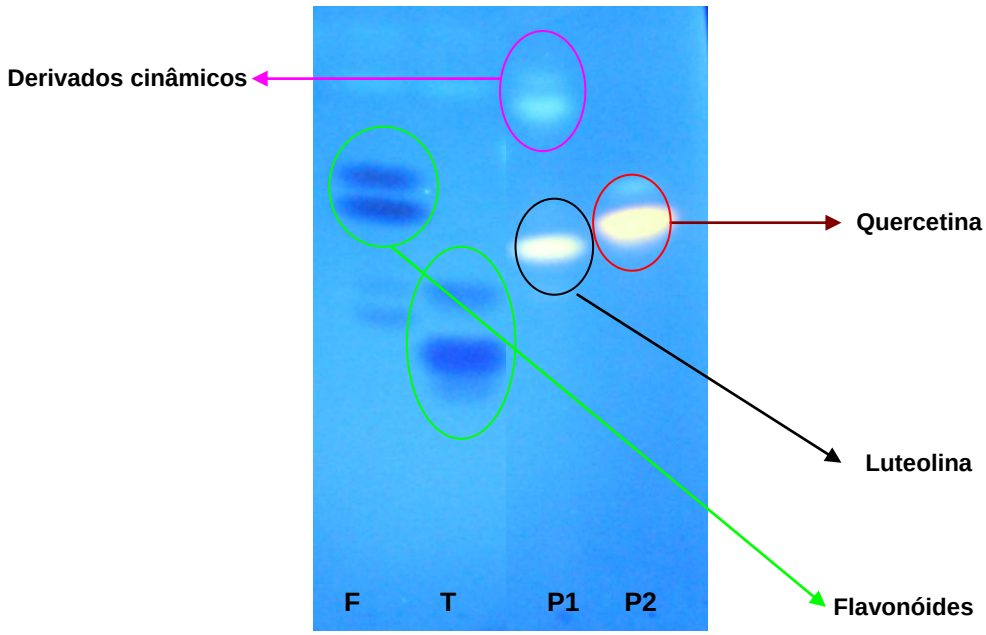

Figura 5.19. Cromatografia em camada delgada para detecção de flavonóides e derivados do extrato do líquido metabólico do fungo PEF 6 (F) e no extrato de *T. avellanedae* (T).

Wang et al. (2011) detectaram no líquido metabólico de fungo endofitico (*P. Oxalicum*) isolado de *Curcuma wenyujin* ß-sitosterol.Resultado similar foi observado como o fungo endofiticos PEF 6 isolado de *T. avellanedae* nesta pesquisa.

Na análise de extratos foliares de *Aloe arborescens* Cardoso et al. (2010) observaram que não há relação entre os teores de quinonas e flavonóides e a atividade antimicrobiana o que sugere que os resultados apresentados nessa presente pesquisa seja devido aos triterpenos e esteróides.

O ß-sitosterol teve seu potencial como anti-inflamatório comprovado através da elucidação de seu mecanismo de ação em que foram utilizadas células do sistema imune em pesquisa realizada por Valério e Awad (2011). Pinto et al. (2008) constataram atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica dos triterpeno α, ß-amirina extraídos de *Protium heptaphylum* (planta nativa do cerrado brasileiro) no processo de periodontite aguda *in vivo* (ratos).

Similarmente, Melo et al. (2011) investigando a ação dos triterpenos α, ß-amirina extraídos de *Protium heptaphylum*, comprovaram pela primeira vez em análise *in vivo* (ratos) que o triterpeno ß-amirina possui poder de melhorar a pancreatite aguda induzida agindo como um agente anti-inflamatório e antioxidante.

Vale salientar que, o fato do princípio bioativo mais estudado (lapachol) e principal objeto desta pesquisa, não estar presente não anula o potencial apresentado pelos compostos bioativos dos endofíticos isolados, pois estes possuem potenciais farmacológicos evidentes. Além, de outros potenciais biotecnológicos que não o farmacêutico, pois já foi constatada, por exemplo, a eficácia dos triterpenos pentaciclicos no controle biológico de pragas em plantas (COLOMA, 2011).

6 CONCLUSÕES

- O tempo ideal de imersão em hipoclorito de sódio (2,6%) no processo de desinfestação foi de dois minutos para o isolamento de micro-organismos endofíticos

- Os melhores meios de cultura sólidos para o isolamento de actinobactérias, bactérias e fungos endofíticos de folhas de *T. avellanedae* foram, respectivamente, ALA, ISP2 e SAB, sendo o inverno o período que houve maior frequência de endófitos.

- Todas as actinobactérias isoladas são do gênero *Streptomyces*.

- Os isolados *Streptomyce*s sp. PCA 3, *Streptomyce*s sp. PCA 4 e o isolado fúngico PEF 6 apresentam potencial farmacológico devido aos princípios ativos β-amirina e β-sitosterol, porém outros estudos são necessários para comprovar o potencial dos mesmos.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar pesquisas futuras para otimização das condições de cultivo da fermentação dos isolados bioativos objetivando aumentar o rendimento dos antibióticos produzidos.

- Realizar a identificação dos fungos isolados.

- Identificar os isolados de *Streptomyces* spp. e fungo PEF 6 a nível de espécie utilizando técnicas de Biologia Molecular.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras: Conhecimentos Populares e Científicos.** Hemus, São Paulo, 341 p., 1993.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1163p, 1998.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, PT. **Manual de isolamento de micro-organismos Endofíticos.** Piracicaba, 86 p, 2002.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, PT. **Manual de isolamento de micro-organismos Endofíticos.** Piracicaba, 86 p, 2002.

ASSUNÇÃO, I.P. et al. Análise isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporiodes,* agente da antracnose foliar da cebola. **Summa Phytopthologica**, Piracicaba, v. 25, n. 4, p. 293-298, 1999.

ATHAYDE, A.C.L. et al. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia,** Pernambuco, v. 21, 12-15p, 2001.

AZEVEDO, J.L. Micro-organismos endofíticos. In:MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. ed. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA. p. 117 – 137, 1998.

AZEVEDO, J.L. Micro-organismos endofíticos. In: MELO, I.S.;AZEVEDO,J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA. p. 117- 137, 1999.

AZEVEDO, J. L.; et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology.** Universidad Católica de Valparaíso – Chile, vol. 3, n.1, Issue of April 15, 2000.

AZUMA, M. V. P. **Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil**. Dissertação de Mestrado (Microbiologia), Curitiba, UFPR, 2011.

BACON, C.A.; HINTON, D.M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: HURST, C.J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**, Washington: American Society for Microbiology, p. 413 – 421, 1997.

BALTIMORE, W.; WIKINS, Bergey's Manual. **Manual of Systematic Bacteriology**, vol.2, 9 ª edição, p.1121-1125, 1986.

BASCOM-SLACK, C.A ET AL**. Active** *Streptomyces* spp. **Isolated from Rainforest Plants.** Microb Ecol (2009) 58:374–383 DOI 10.1007/s00248-009-9494-z

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotics suscebility test by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology,** v.45, p.493-496, 1966.

BARY, A. de. **Morphologie Physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten.** Vol. II.Holmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 1866.

BELOQUI, A.; D'MARIA, P.D.; GOLYSHIN, P.N.; FERRER, M. Recent trend in industrial microbiology.Current opinion in Microbiology, 2008, Elsevier Ltd.,**11** : 240-248.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. J Antibiot 58:1–26. 2005.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BOYLE, C.; GÖTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interaction III Local *vs.* systemic colonization. **Symbiosis**, v. 31, p. 259-281, 2001.

BRENNER D. J.; KRIEG N. R.; STALEY J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.**Vol.2. 2 Ed. Editora Springer, 2004.

BRITO, A.R.M.S.; BRITO, A.A.S. Forty years of brasilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacol**. v. 49, n. 2, p. 53-67, 1993.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CABRAL, D.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. The internal mycoflora of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. **Mycological Research**, v. 97, p. 367-376. 1993.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. 78:1:98-106, 2008.

CALLERY, P.; GANNETT, P. Cancer and cancer chemotherapy. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye´s Principles of Medicinal Chemistry**, 5. ed.; Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 924-951, 2002.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; TELES RABELLO, A. L.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. **Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae),** v. 2, p. e348, 2008.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBINSON, R.; CONDRON, N.A.M.; TEPLOW, D.B.; STEVENS, D.; YAVER,D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans* **Microbiology**, v. 148,p. 2675-2685, 2002.

CARDOSO, F. L.; MURAKAMI, C.; MAYWORM, M. A. S., MARQUES, L. M. 2010. **Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de** *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. vol.20, n.1, pp. 35-40.

CARVALHO, J. E.; Fitoterápicos: alimentos ou medicamentos? **Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas.** Campinas. SP, 2001.

CARVALHO, P.E.R**. Espécies arbóreas brasileiras.** Colombo: Embrapa Florestas, vol.1, 2003.

COLOMA, A.G.; BALBOA, C.L.; SANTANA, O.; REINA, M.; FRAGA, B.M. **Triterpene-based plant defenses.** Phytochem Rev. (2011) 10:245-260.

CONTI, R. **Diversidade e Atividade Antimicrobiana de Microrganismos Endofíticos da Planta Medicinal Borreria verticillata (L.).** 1v. 59p. Mestrado. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. 2007.

CORDELL, G.A. **Pharmacognosy - New roots for and old science**. In: Rahman AU, Basha F. Bioactive natural products . Amsterdan: Elsevier, 1993.

COSTA, L. E. O. ; QUEIROZ, M. V. ; BORGES, A. C. ; MORAES, C. A. ; ARAUJO, E. F. **. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*).** Brazilian Journal of Microbiology (Impresso), 2012.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplasic agentes from natural sources. **Cancer Invest**, *17:* 153-163, 1999.

CUNHA, I.G.B.; SOBRINHO, T.J.S.P.; SILVA, R.E.A.; AMORIM, E.L.C.; ARAUJO, J.M. **Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do**

endófito *Streptomyces* **sp. EBR49-A UFPEDA.** Rev. Bras. Farm., 90 (2) : 120-123, 2009.

DAMASCENO, J. C. A.; SOARES, A. C. F.; JESUS, J. C. **Actinobactérias no biocontrole de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood em mudas de quiabeiro**. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Fortaleza/CE. 2011.

D'ALBUQUERQUE, I.L. **Termorreação da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona.** Revista do Instituto de Antibióticos. Recife/UFPE. 8 (1/2): 73 – 87. dez 1968.

DEMAIN, A. L., Why do microorganisms produce antimicrobials? In: HUNTER, P.A.; DARBY, G.K.; RUSSELL, N. J. (eds.). **Fifty Years of Antimicrobials: Past, Prospective and Future Trends.** Cambridge: University Press, p. 205-228, 1995.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business. The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DEMAIN, A. L.; DIJKHUIZEN, L. Ecology and industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 237-239, 2006.

DEVARAJU, R.; SATISH, S. **Endophytic Mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic** *Fusarium* sp. ASIAN, J.EXP.BIOL.SCI. Vol. 2 (1):75:79, 2011.

DING, T.; JIANG, T.; ZHOU, J.; XU, L.; GAO, Z. M. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genetics and Molecular Research**. 9(4)-2104-2112, 2010.

DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSOM, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry Ac7 and *Serratia marcescens* chiA gene in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 66, p. 2804-2810, 2000.

EL-GENDY MMA, EL-BONDKLY AMA. 2010. **Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic** *Streptomyces* **sp. Hedaya48.** J Ind Microbiol Biotechnol 37(8):831–841

ESTEVES, D.; SOARES, N.R.; SANTOS., M.P.; OKI,Y.; FERNANDES, G.W. **Fungos endofíticos como mediadores na relação entre** *Baccharis dracunculifolia* **e herbívoros no Parque Nacional da serra do cipó, MG**. In: Anais do VII Congresso de Ecologia do Brasil, 23-27 de Set. de 2007. Caxumbu, MG. 2p.

FAVORETTO, N. B. ; PIZA, A. C. M. T. ; RATTI, R. P. ; SERRANO, N. F. G. ; HOKKA, C. O. ; SOUSA, C. P. . Bioprospecção de Substâncias Antimicrobianas de Microrganismos Endofíticos do Cerrado de São Carlos, SP. In: I Simpósio sobre o Bioma do Cerrado, 2008, Brasília, DF. Publicado nos Anais em CD Room.

FIEDLER, H.; BRUNTNER, C.; PUDER, C.; MIHM, F. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. **Antonie van Leeuwenhoek.** Vol. 87, p. 37-42, 2005.

FRANÇA, S. C. **Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, p.499-525, 2001.

FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2, p. 201-8, 2008.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, p. 139-168, 2008.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus Bartalinia robillardoides Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World J. Microbiol. Biotechnol**., 24(5): 717-724, 2007.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proc. Nat. Acad. Sci.** USA, 101: 10107-10112, 2004.

GENTRY, A.H. **Flora Neotropica: Bignoniaceae - Part II (tribe Tecomeae).** ***Flora Neotropica Monograph***, v.25, n.2, p.1-130, 1992.

GONG; L.J.; GUO, S.X. **Endophytic fungi from** *Dracaena cambodiana* **and** *Aquiliaria sinensis* **and their antimicrobial activity.** African Journal of Biotchnnology, v. 8 (5), pp. 731-736, 6 March, 2009.

GONZALES, I.; SACIDO, A.A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: **Evatoatino af their diversity and detection of biosynthetic gene sequence.** FEMS Microbiology Ecology, Oxford, England, v 54, p.401 – 415, 2005.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v.27,p. 189-216, 1983.

GRANDIS, A.; ALEIXO, A.M.;DÉDALO, M.F.M.; RUGIERRO, A.C.Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de Paud'arco (*Tabebuia avellanedae*) e suas frações. Anais da 58 [a]. Reunião anual da SBPC – Florianópolis, SC – jul./2006.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed. Florianópolis/Porto alegre: UFSC/UFRS, p.13-26, 2001.

GUIMARÃES, D.O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de** *Asteraceae* **e ensaio antibiótico no modelo de infecção em**

Caenorhabditis elegans. 186f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HAMBURGER M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the links between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry 12*: 3864-3874, 1991.

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Isolado 2S.** Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; XING, J.; CORKE, H.; MEI SUN, M. A potential; antioxidant resource: endophytic from medicinal plants. **Econ. Bot**., 61(1):14-30, 2007.

HUFFORD, D. J. Folk medicine and health culture in contemporary society. **Prim Care.** 24(4):723-741, 1997.

HUSSAIN et al. **Lapachol:** an overview. **Special Issue Reviews and Accounts.** USA, ISSN 1424-6376, p. 145-171, 2007.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T. OZAKI, A. Improvemente of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and prototroph method. **Folia Microbiológica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

KENNY, E.; MUSKIN, P. R.; BROWN, R.; GERBARG, P. L. What the general psychiatrist should know about herbal medicine. **Curr Psychiatry Rep.** 3(3):226-234, 2001.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte of parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. São Paulo: MEDSI, Cap. 15, p. 795-865, cap. 11, p. 551-588, 2001.

LACAZ, C. S. ; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C. ; HEINS-VACCARI, E. M. ; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LANCINI, G.; LORENZETTI,R. **Biotechnology of Antibiotics and other Bioactive Microbial Metabolites.** New York: Plenum,1993.

LAM,K.S. News aspects of natural products in drug discovery, **Trends in Microbiology,** v15, n. 6, p. 279 – 289, 2007.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance-the problem intensifies. *Adv. Drug. Deliv. Rev*., **57**, 1446-1450, 2005.

LI, J.Y.; G. STROBEL, R. SIDHU, W.M. HESS, E.J. FORD. Endophytic taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. Microbiology – Uk **142**: 2223-2226, 1996.

LIN, Q.; LIU, Y. A new marine microorganism strain L0804: taxonomy and characterization of active compounds from its metabolites. **World Journal Microbiology Biotechnology**. Vol.26. p. 1549-1556, 2010.

LIMA, O.G.D.; D'ALBUQUERQUE, I.L.; MACHADO, M.P.; SILVA, PINTO, G.P. **Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do Lapachol**. Separata dos anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco. 14 (1/2): 129-135, 1956.

LIMA, V.T. **Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos e da rizosfera de melão-de-são-caetano (*Mormodica charantia* L.).** Rev. Biol. Neotrop. 3(2): 185-186. 2006.

LONGHI, R.A. Livro das árvores; árvores e arvoretas do Sul. 2.ed., Porto Alegre: L&PM, 176p, 1995.

LORENZI, H. Árvores brasileiras (Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil). Volume 1. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S. BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine Streptomyces sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology.** 2009.

LUZ, W.C. Rhizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4. n 2, p. 1-49,1996.

MAGALHÃES, W.C.S.; MISSAGIA, R.V.; COSTA, F.A. F.; COSTA, M.C.M. **Diversidade de fungos em candeia** *Eremanthus erythropappus*, (DC.) MacLeish. Cerne, Lavras, v.14, n. 3, p.267-273, jul./set., 2008.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MELO, C.M.; MORAES, T.C.; TOMÉ, A.R.; RAO, V.S.; SANTOS, F. A**. Anti-inflammatory effect of α, ß-amirin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice.** Inflamm. Res. (2011) 60:673-681.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE DO BRASIL. Instrução Normativa N 06, de 23 de Setembro de 2008. In: Anexo I: **Lista oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção.** 3-23, 2008. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/documentos/lista-de-especies-ameacadas-de-extincao Acesso em: 21 de novembro de 2010.

MIRANDA, F.G.G.; VILLAR, J.C.; ALVES,I.A.N.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R. **Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of** *Tabebuia avellanedae* **bark aqueous extract**. B.M.C. Pharmacol., v. 1, n.1, p. 6-15, 2001.

MOLINARI, G. **Natural Products in Drug Discovery: Present Status and Perspectives. Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**. V. 655, p. 13:- 27, 2009.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 105-111, 2001.

MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J. COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. Toxicology Applied Pharmacol.ogy, 17: 01 – 11. 1970.

MOTTA, M.G.; LAGO, A.L.; OLIVEIRA, C. **Isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos de mamona** (*Ricinus communis* L.). UNIVERSIDADE TUIUTI DO PARANÁ, XIV Seminário de Pesquisa e IX Seminário de Iniciação Científica: integração da Pesquisa com o Ensino e a Extensão, 3 a 5 nov., 2010.

MUNDT, J.O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. Applied and Environmentam Microbiology. V.32,p. 694-698, 1976.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Micro-organismos Endofiticos – Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, vol. 29, N^{o} 5, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. ***J. Nat.Prod.***, **70**, 461-477, 2007.

Oliveira, M.F.; Germano, M.; Van der Sand, S. T. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Endofíticos de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*).** In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre. IX Salão de Iniciação Científica, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Legal status of traditional medicine and complementary/alternative medicine**. Geneva: World Health Organization; 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Traditional medicine**: definitions. Disponível em: <http://www.who. int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>. Acessado em: 15 de mar. 2012.

PABLOSMENDEZ, A.; RAVIGLIONE, M. C.; LASZLO, A.; BIKIN, N.; RIEDER, H. L.; BUSTREO, F.; COHN, D. L.; LAMBREGTS-van WEEZENBEEK, C. S.; KIM, S. J.; CHAULET, P.; NUNN, P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance. **N. Engl. J. Med**., 338: 1641-1649, 1997.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P. D. **Biochemical techniques for filamentous fungi.** Wallingford: CAB International, 125p, 1994.

PEREIRA, E. M., et al. *Tabebuia avellanedae* activit against methicillin-resistant staphylococcal strains , cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 5:5, 1-7. 2006.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi from stylosantes: a preliminary report. **Mycologia**. 85: 362-364, 1993.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, 56: 237-243, 2001.

PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos de** *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. **por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.** Tese de doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.141, 2006.

PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A**. Fungos endofíticos em folhas de Erva Mate** (*Ilex paraguariensis* A. St – Hil). Floresta, Curitiba, PR, v. 36, n.1, 123-128p, 2006.

PINTO, H.S.A.; PINTO, L.M.S.; CUNHA, G.M.A.; CHAVES, M.H.;SANTOS,, F.A..; RAO, V.S.; 2008. **Anti-inflammatory effect of α, ß-amyrin, a pentacyclic triterpene from** *Protium heptaphyllum* **in rat model of acute periodontitis.** Inflammopharmacology 16, 48-52.

RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, Nocardiopsis sp. **Chemistry European Journal**. Vol. 16, p.3194 – 3200, 2010.

RAMOS, H. P. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 60 p., 2008.

RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; SAID, M. T. P. S**.**Antimicrobial Activity from Endophytic Fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse***. Brazilian Archives of Biology And Technology**,Vol.53, n. 3: pp. 629-632, May-June 2010.

RANDALL, H.T.; CARROLL, K.C.; TANG, Y.W.; WOLK, .D.M. Diagnostic microbiology of the immunocompromised host. 1a Edição. American Society for microbiology, ASM Press, Washigton, 2009.

RAO, K.V.; MCBRIDE, T.J. OLESON, J.J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor Agent. Cancer Research. 28: 1952– 1954. Oct. 1968.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, *39*: 603-613, 2001.

RAVIGLIONE, M. C.; SNIDER, D. E.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **J. Am. Med. Assoc**., 273: 220-226, 1995.

RIBEIRO, J.; BOYCE, M.J.; ZANCANARO, Q.P. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* aureus (MRSA) among patients visiting the emergency roon at a tertiary hospital in Brazil. **Journal Brazilian of Infectious Diseases**, (9)52-5, 2005.

RODRIGUEZ, R.L. **Frequência de fungos endofíticos associados à** *Vellozia compacta* **Mart. Ex. Schult.f. (***Velloziaceae***) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins.** Dissertação (Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais) Universidade Federal de Ouro Preto, 70p. , 2010.

SACRAMENTO, H.T. Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 5.; 2001. Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2000.

SADANANDA, T. S.; NIRUPAMA, R.; CHAITHRA, K.; GOVINDAPPA, M.; CHANDRAPPA, C. P.; RAGHAVENDRA B., VINAY. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plants Research**. Vol. 5(16), p. 3643-3652, 2011.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology Evolution Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAJID, I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. 2011. I**dentification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the** *Streptomyces malachitofuscus* **ctf9** Brazilian Journal of Microbiology.

SALES, S.M.; CRISPIM, S.M.A. **Densidades de Árvores listadas como ameaçadas de Extinção na Bacia do Alto Paraguai.** In: comunicado técnico 54, EMBRAPA, Corumbá – MS. ISSN 1517-4875, 2006.

SALAMONI, S. P. ; MANN, M. B. ; CAMPOS, F.S. ; FRANCO, A.C. ; GERMANI, J. C. ; VAN DER SAND, S. T.**Preliminary characterization of some *Streptomyces***

species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. World Journal of Microbiology and Biotechnology (Online), v. 26, p. 1847-1856, 2010.

SANGLIER, J.J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T. novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633-642, 1993.

SANTOS, I.P.; SILVA, A.P.S.; SILVA, L.C.N.; ARAÚJO, J.M.; CAVALCANTI, M. S.; LIMA. V.L.M. **Atividade Antibacteriana do fungo endofítico** Colletotrichum Gloeosporioides **isolados da planta** *Indigofera suffruticosa* Mill. 62ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o progresso da Ciência, UFRN/ RN, jul. de 2010.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. bras. plantas med.** vol.13, n.4, pp. 486-491, 2011.

SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M.A. **Aplicação de micro-organismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, londrina, v.32, n.2.p. 199-212, jul./dez. (2011).

SARDI, P. et al. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied Environmental Microbiology**, Washington,p. 2691-2693,1992.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in Forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 75-89, 2007.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. **Revista Química Nova**, *v*ol. 26, N^{o} 3, 407-416, 2003.

SILVA, E.O. **Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico** *Drechslera ravenelii.* Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Faramacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 119 f., 2010.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, Vol. 6, n. 2, 2010.

SOARES, E. C. L.; PEREIRA, C. L. D.; COSTA, E. P.; ARAUJO, J. M. *Streptomyces* sp. UFPEDA 968 endofítico isolado de *Eugenia uniflora* L. com atividade para *Staphylococcus aureus* multirresistentes. In: II congresso Latino Americano de Resistência Microbiana; IX Sul Encontro de Controle de Infecção, 2011, Gramado - RS. II congresso latino americano de resistência microbiana, 2011.

SOUZA, A.Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia:** *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amaz.*, vol.34, n.2, pp. 185-195, 2004.

SOUZA, V.A.B. Perspectivas do melhoramento de espécies nativas do nordeste brasileiro. In: BARROS, R.; MICHEREFF, S.J**. Proteção de plantas na agricultura sustentável.** Recife: Imprensa universitária da UFRPE, p. 71 – 100, 2001.

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. **Production and characterization of a thermostable α-amilase from** *Nocardiospis* **sp. endophyte of yam beam.** Bioresource Technology, 76:137-141, 2001.

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. **Production and characterization of a thermostable glucoamylase from** *Streptosporagium* **sp. endophyte of maize leaves.** Bioresource Technology, 83:105-109, 2002.

STROBEL, G.A. **Endophytes as sources of bioactives products**. Microbes and Infection, 2003.

STROBEL, G., DAISY, B. CASTILOO, U. HARPER, JAMES.Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products,** v. 67: p. 257-268, 2004.
STROBEL, G.A., FORD, E., LI, J.Y., SEARS, J., SIDHU, R.S. & HESS, W.M. Seimatoantherium tepuiense gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. **Applied Microbiology,** 22: 426-433, 1999.

TAECHOWISAN, T, CHUNHUA, L.U., SJEM Y. LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces auereofaciens* CMUA Ac 130 and their antifungal activity; **Microbiology,** 151 1691-1695, 2005.

TOMASINO, S. F et al. Field Performance of *Clavibacter xyli* subsp. Cynodontis Expressing the Insecticidal Protein Gene cry A (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in fiel corn. **Biological Control**, v.3, p. 442-448, 1995.

TAKAHASHI, J.A, CASTRO, M.C.M, SOUZA, G.G; LUCAS, E.M.F, BRACARENSE, A.A.P, ABREU, L.M, MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.; FLOREANO, M.B.; OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhymurium* , *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale /Journal Medical Micology** , v. 18, n.4, p.198-204, 2008.

TAN, R.X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Reports**, 18: 448-459, 2001.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesq. Agropec. Bras.** 42(1):43-49., 2007.

TOMASINO, S. F et al. Field Performance of *Clavibacter xyli* subsp. Cynodontis Expressing the Insecticidal Protein Gene cry A (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in fiel corn. **Biological Control**, v.3, p. 442-448, 1995.

TONIAL, F. ; MAIA, B.H.L.N.S. ; VICENTE, V.A. ; STRINGARI, D. ; GOMES-FIGUEIREDO, J.A. ; GALLIi-TERASAWA, L.V. ; KAVA-CORDEIRO, V. ; GLIENKE, C. . **Extração de compostos com atividade antimicrobiana de fungos endofíticos utilizando meios sólidos e líquidos.** In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.

TREJO-STRADA, S.R.; PASZCYNSKI, A.; CRAWFORD, D.L. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent Streptomyces violaceusniger YCED9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p. 81-90, 1998.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Efeito de pesticidas sobre a microfolora da parte aérea de plantas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L (Eds). **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 440p, 1977.

VARGAS, R. M. G.; BELLO-BELLO, D. C.; PRADA-SALCEDO, L. D.; RODRÍGUEZ-BOCANEGRA, M. X.; GÓMEZ-MÉNDEZ, L. D.; FRANCO-CORREA, M. Actinomicetos mineralizadores de fosfato involucrados em la interacción radical de *Glomus* sp.-Trébol Blanco. **Agronomía mesoamericana**. 22(2):317-327. 2011.

VALÉRIO, M.; AWAD, A.B. **β-Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A. 1 murine macrophages**. *International Immunopharmacology*, *Volume 11, Issue 8*, *August 2011*, *Pages 1012-1017*.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N.; GANGE, A.C. **Endophytic Actinomycetes from** *Azadirachta indica* **A. juss.:Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity.** Microl. Ecol., 57: 149-756, 2009.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde,** São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VIEIRA, P.D.S.; SILVA, F.G.; SILVA, W.N.P.; CAVALCANTI, P.A.; LIMA, D.**Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de** *Ixora coccínea* L. **em Pernambuco, Brasil**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v.10, n.1, p.1-4, jan/mar 2012.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacol**, 51, p.239-254, 1996.

WANG, Y.; WU, X.; YANG, X.; LI, X. **Studies on identification and secondary metabolites of endophytic fungi strain E8 from Curcuma wenyujin.** Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2011 Mar; 36(6):770-4.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.

ZHANG; LIXIN; DEMAIN, A. L. Natural products, drug discovery and therapeutic medicine. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9-10, p. 747, 2006.

ZHANG, X.; REN, K.; ZHANG, L. Screening and preliminary identification of medicinal plants endophytic actinomycetes used for inhibiting penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biology**. 4(2), 2012.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTRÖM, K..; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. Actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Curr Microbiol**. 62:182-190, 2011.