

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

**Caracterização química e avaliação de atividade biológica dos metabólitos de
actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L.**

Janaína Gonçalves da Silva Melo

Janaína Gonçalves da Silva Melo

**Caracterização química e avaliação de atividade biológica dos metabólitos de
actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área: Biologia Química para a Saúde

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Janete Magali de Araújo

RECIFE, 2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Melo, Janaína Gonçalves da Silva

Caracterização química e avaliação de atividade biológica dos metabólitos de actinobactéria endofítica isolada de *Momordica charantia* L. / Janaína Gonçalves da Silva Melo. – Recife: O Autor, 2013.

112 f.: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Coorientadora: Janete Magali de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices

1. Actinomycetales 2. Farmacologia I. Melo, Sebastião José de II. Araújo, Janete Magali de III. Título.

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-246



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

Recife, 05 de julho de 2013

Defesa de Tese de Doutorado defendida e _____, por decisão unânime em 05 de julho de 2013, e cuja banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura_____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura_____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr.Emérson Peter da Silva Falcão

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura_____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura_____

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra Telma Leda Gomes de Lemos

Universidade Federal do Ceará

Assinatura_____

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

ANÍSIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO
REITOR

SÍLVIO ROMERO MARQUES
VICE-REITOR

FRANCISCO DE SOUSA RAMOS
PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

MARIA EDUARDA LACERDA DE LARRAZÁBAL
DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES
VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA TERESA DOS SANTOS CORREIA
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

RANILSON DE SOUZA BEZERRA
VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Aos meus irmãos Josetenio e Janete Melo, por serem irmãos,
companheiros, parceiros e amigos. Por todo incentivo durante minha
formação.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, ao Centro de Ciências Biológicas – CCB e ao Departamento de Antibióticos – DANTI.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro à pesquisa.

Aos orientadores Prof. Dr. Sebastião José de Melo e Profa. Dra. Janete Magali de Araújo pela oportunidade de me proporcionar enveredar por uma linha de pesquisa nova, pela paciência em ensinar, pelos exemplos de conduta profissional e respeito.

Aos professores que estiveram envolvidos tanto na disponibilização de equipamentos quanto pelo conhecimento compartilhado: José Alexandre Shuller, Valmir Lima, Antônio Fernando Moraes de Oliveira, Suzene Isídio, Gardênia Militão, Teresinha Gonçalves, Leonor de Oliveira, Pérsio e em especial ao Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Adenilda.

Aos técnicos Fátima Regina, Sr. Orlando Silva e Luís Carlos pela amizade, atenção, auxílio e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos que fazem ou fizeram parte da equipe do Laboratório Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos durante o desenvolvimento do meu projeto: Luís Cláudio, Daniel, Elizianne, Érica, Diego Marques, Diogo Crateus, Anderson Barão, Milca Galêga, Aline Dayse, Talita, Carol, Ivana, Emerson Alves, Sandrine Arruda, Rodrigo Brayner, Glêzia, Gustavo, Karine, Rubênia, Camila, Ana Paula e Irailton.

Aos companheiros do Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) da Universidade Federal do Ceará: Profa. Dra. Telma Leda, Daniele, Thalissa, Patrícia, Cleane,

Juliana, André, Gisele, Leonardo, Anderson, Luciana Bertini, Luciana Gregório, Luís, Patrícia e Ricardo pela convivência saudável, colaboração, ensinamentos e apoio.

À equipe do Laboratório de Síntese e Produtos Naturais: Antônio, Gibson, Grace Kelly, Isla, Aline, Jéssica e Zenaíde, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas brincadeiras, companheirismo, amizade.

Às amigas e companheiras de todas as horas: Margareth Neta, Josélia Ayres, Jovita Braga, Laurimar Thomé, Apache Santiago, Juanize Matias, Amanda Costa, Vanda Monteiro, Libiara Bentes e Joselma Ferreira.

A Paulo Pedrosa, Flávia Morais e Helena Victor pela amizade, momentos de lazer, conselhos, por tudo.

Às tias Lúcia Duarte, Maria Verlene e Maria José Melo pelo carinho, atenção, apoio, força.

À minha família, minha mãe Antônia Tereza Melo (i.m.), meu pai José Gonçalves da Silva Melo, meus irmãos Josetenio e Janete Melo, aos amados sobrinhos Rafael e Júlia Melo, que apesar da distância sempre me apoiaram e por estarem comigo em mais esta conquista.

À Deus...

A todos minha eterna gratidão.

O valioso tempo dos maduros

"Contei meus anos e descobri que terei menos tempo para viver daqui para a frente do que já vivi até agora.

Tenho muito mais passado do que futuro.

Sinto-me como aquele menino que ganhou uma bacia de jabuticabas.
As primeiras, ele chupou displicente, mas percebendo que faltam poucas, rói o caroço.
Já não tenho tempo para lidar com mediocridades.

Não quero estar em reuniões onde desfilam egos inflados.

Inquieto-me com invejosos tentando destruir quem eles admiram, cobiçando seus lugares, talentos e sorte.
Já não tenho tempo para conversas intermináveis, para discutir assuntos inúteis sobre vidas alheias que nem fazem parte da minha.
Já não tenho tempo para administrar melindres de pessoas, que apesar da idade cronológica, são imaturos.

Detesto fazer acareação de desafetos que brigaram pelo majestoso cargo de secretário geral do coral.

As pessoas não debatem conteúdos, apenas os rótulos.
Meu tempo tornou-se escasso para debater rótulos, quero a essência, minha alma tem pressa...

Sem muitas jabuticabas na bacia, quero viver ao lado de gente humana, muito humana, que sabe rir de seus tropeços, não se encanta com triunfos, não se considera eleita antes da hora, não foge de sua mortalidade...

Só há que caminhar perto de coisas e pessoas de verdade.
O essencial faz a vida valer a pena.
E para mim, basta o essencial."

Mário de Andrade

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
Geral	3
Específicos	3
1. REVISÃO DA LITERATURA	4
1.1. Produtos naturais	4
1.2. Micro-organismos endofíticos	6
1.3. Características gerais de actinobactérias e sua importância	10
1.4. <i>Momordica charantia</i> L.	15
2. REFERÊNCIAS	19
Atividades biológicas de extratos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. endofítico de <i>Momordica charantia</i> L.	28
Resumo:	30
1. Introdução	31
2. Materiais e Métodos	33
2.1. Fermentação em Cultivo Submerso	33
2.2. Obtenção dos Extratos	33
2.3. Atividade Antimicrobiana	34
2.4. Atividade Citotóxica	34
2.5. Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos de Camundongos	35
2.6. Toxicidade Aguda em Camundongos	36
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Fermentação em Cultivo Submerso	36
3.2. Atividade Antimicrobiana	38
3.3. Atividade Citotóxica	40
3.4. Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos de Camundongos	42
3.5. Toxicidade Aguda em Camundongos	43
Agradecimentos	45
4. Referências	45
Avaliação química e bioatividade de compostos produzidos por actinobactéria de <i>Momordica charantia</i> L.	50
Resumo:	52
1. Introdução	53
2. Resultados e Discussão	55
2.1. Fracionamento	55
2.2. Prospecção das Classes de Compostos Orgânicos	56
2.3. Atividade Antimicrobiana (CMI)	56
2.4. Ensaio Citotóxico	58
3. Experimental	58
3.1. Micro-organismo	59
3.2. Fermentação	59
3.3. Extração e Fracionamento	59
3.4. Prospecção das Classes de Compostos Orgânicos	60
3.5. Micro-organismos Testes	60
3.6. Atividade Antimicrobiana	61

3.7. Atividade Citotóxica	61
4. Conclusão.....	62
Agradecimentos	62
5. Referências.....	63
Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos produzidos por <i>Streptomyces</i> sp. no controle de fitopatógenos.	65
Resumo:	67
1. Introdução	68
2. Materiais e Métodos.....	70
2.1. Micro-organismo Endofítico.....	70
2.2. Obtenção dos Extratos	70
2.3. Micro-organismos Teste	70
2.4. Atividade Antimicrobiana.....	71
3. Resultados e Discussão	71
3.1. Atividade Antimicrobiana.....	72
4. Conclusão.....	73
5. Referências.....	74
CONCLUSÕES	76
ANEXOS 1 - Meios de cultura	77
ANEXO 2 – Resumos em anais de congressos.....	78
ANEXO 3 – Normas do Periódico Research Microbiology	80
ANEXO 4 – Normas do Periódico Molecules	87
ANEXO 5 – Normas do Periódico Internacional Microbiology.....	91
ANEXO 6 – Resultados complementares.....	92
APÊNDICE 1 – Espectro de RMN do composto cristalino obtido das frações iniciais da cromatografia em coluna do extrato EBB (D ₂ O, 500 MHz).....	95
APÊNDICE 2 – Cromatogramas do CG-MS das sub-frações RR1 a RR11.	95
APÊNDICE 3 - Espectros de infravermelho das frações hexânica, diclorometano, acetônica e acetoetílica da cromatografia filtrante do extrato EBB.....	99
APÊNDICE 4 - Espectro de infravermelho do precipitado da fração metanólica pós-reação de acetilação.....	101
APÊNDICE 5 - Cromatograma da fração metanólica. Fase móvel: MeOH/H ₂ O (90:10), coluna analítica Phenomenex 00G-4252-EO Luna, partícula de 5µ, poro de 100 Å de diâmetro, fluxo 0,1 mL/min.....	101
APÊNDICE 6 - Atividade antioxidante dos extratos EBLM, EBB e fração metanólica (DPPH: 60 µmol.L ⁻¹ em MeOH).	102
APÊNDICE 7 – Espectros de RMN de ¹³ C e ¹ H.	103

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Estrutura química dos compostos taxol (Paclitaxel) e camptotecina isolados de fungos endofíticos.....	8
Figura 2.Ciclo de vida do gênero <i>Streptomyces</i> (Adaptado de FLARD; BUTTER, 2009).....	11
Figura 3. Distribuição dos antibióticos descobertos entre 1950-2000, de acordo com suas origens. (retirado de BÉRDY, 2005).	13
Figura 4. Compostos isolados de actinobactérias de origem marinha: a) Abissomicina, b) diazepinomicina, c) Salinosporamida A, d) Sporilide A e e) Sporilide B. (retirado de LAM, 2006).	14
Figura 5. Aspectos gerais de planta <i>Momordica charantia</i> L. (Melão-de-São-Caetano).....	16
Figura 6. Exemplos de compostos isolados de <i>Momordica charantia</i> L., A- momordicina e B-charantina. Fonte: KUMAR et al., 2010.	17

Artigo I

Figura 1: Os gráficos A e B- Halos de inibição (mm); C- Valores de pH, obtidos a partir dos diferentes meios de fermentação do <i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA 3345.....	37
---	----

Artigo II

Figura 1. Cromatograma da CLAE para fração F4, obtida após fracionamento do extrato metanólico da biomassa (EBB).....	55
---	----

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1. Novos compostos bioativos isolados de actinobactérias endofíticas. (Adaptado de Qin et. al., 2011)	5
Tabela 2. Alguns antibióticos de uso clínico isolados de espécies de <i>Streptomyces</i>	12
Tabela 3. Número aproximado de produtos naturais microbianos bioativos isolados até 2002 (adaptado de BÉRDY, 2005).	13

Artigo I

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (CMI) dos extratos da biomassa (EBB) e do líquido metabólico (EBLM) de <i>Streptomyces</i> sp UFPEDA 3345 em µg/mL	39
Tabela 2. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos EBLM e EBB em três linhagens tumorais testados na dose única de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.....	41
Tabela 3. Efeito do extrato metanólico da biomassa (2.000 mg/kg via oral) sobre o peso corporal de camundongos e o consumo de ração e água, 14 dias após única administração.....	43
Tabela 4. Efeito do extrato metanólico da biomassa (2.000 mg/kg via oral) sobre o peso dos órgãos de camundongos, 14 dias após única administração.....	44

Artigo II

Tabela 1. Prospecção das classes de compostos orgânicos por cromatografia em camada delgada do extrato metanólico da biomassa (EBB), fração F4 e subfração C1.....	56
Tabela 2. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para a fração F4 e subfração C1 em µg/mL.....	57

Tabela 3. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para a fração F4 e subfração C1 em $\mu\text{g/mL}$	58
Tabela 4. Condições cromatográficas da prospecção de classes de compostos orgânicos produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. UFPEDA 3345.....	60

Artigo III

Tabela 1. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos da biomassa (EBB) e do líquido metabólico (EBLM) de <i>Streptomyces</i> sp UFPEDA 3345 em $\mu\text{g/mL}$	72
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA - Batata Dextrose Ágar

C1 – Subfração C1

CCDA Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMF – Concentração Mínima Fungicida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CO₂ – Dióxido de Carbono

DMSO – Dimetilsulfóxido

EBB – Extrato Bruto Biomassa

EBLM – Extrato Bruto Líquido Metabólico

F4 – Fração F4

FDA - Food and Drug Administration

GC-MS – Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrometria de Massas

ISP2 – Internacional *Streptomyces* Project – Medium 2

ISP4 - Internacional *Streptomyces* Project – Medium 4

M1 - Meio para produção de Eurimicina

MeOH – Metanol

MPE - Meio para Produção de Eurimicina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPM – Rotação por minuto

UFC – Unidade Formadora de Colônias

RESUMO

Endofíticos são micro-organismos que colonizam o interior das plantas sem aparentemente causar danos ao seu hospedeiro, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes. Em geral produzem metabólitos secundários de interesse farmacológicos, como também aplicáveis no controle biológico de pragas e doenças. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade biológica e a caracterização química dos metabólitos secundários do *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 endofítico isolado de folhas de *Momordica charantia* L.. A fermentação em cultivo submerso desta linhagem apresentou como melhores condições para produção de metabólitos bioativos o meio M1 com 72 horas de cultivo em pH alcalino. Os extratos acetotílico do líquido metabólico (EBLM) e o metanólico da biomassa (EBB) foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade frente a células tumorais, à avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos, toxicidade aguda, determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e à prospecção química. O extrato metanólico da biomassa (EBB) foi cromatografado em coluna de sílica gel e a fração F4 foi analisada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) resultando na obtenção de três subfrações C1, C2 e C3. Para a atividade citotóxica frente às linhagens HT-29 (carcinoma de cólon), HEP-2 (carcinoma de laringe), NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e MCF-7 (carcinoma de mama) na dose única de 50 µg/mL, os extratos, frações e subfrações apresentaram percentual de inibição do crescimento celular entre 17 e 93%. Após a administração da dose de 2.000 mg/kg do extrato EBB em camundongos, não foram observados efeitos tóxicos, sinais visíveis de toxicidade sistêmica e morte dos animais. Quanto ao potencial hemolítico dos extratos, estes apresentaram concentração efetiva de $CE_{50} > 500$ µg/mL e não promoveram danos à membrana eritrocitária. As amostras apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bactéria álcool ácido resistente, fungo filamentoso, leveduras e fitopatógenos. O extrato EBLM apresentou valores de CMI menores para *B. subtilis* (15,62 µg/mL), *M. luteus* (7,8 µg/mL) e *M. smegmatis* (15,62 µg/mL) em comparação ao extrato EBB. A CMI para *A. niger*, *C. albicans* e *C. krusei* os valores variaram de 15,62 a 250 µg/mL. A fração F4 e a subfração C1 apresentaram valores de CMI iguais de 62,5 µg/mL para *C. albicans*, *A. niger* e *M. smegmatis*. Quanto aos valores de CMI dos extratos EBLM e EBB frente a fungos e bactérias fitopatogênicos variaram entre 15,62 a 500 µg/mL. A prospecção química demonstrou a presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, mono/sesquiterpenos, triterpenos e esteróides. Os resultados evidenciam que a linhagem endofítica *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 produz diferentes biomoléculas com diversas atividades biológicas.

Palavras-chave: Atividades biológicas; Endofítico; *Momordica charantia* L., *Streptomyces* sp.

ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that colonize the internal plant without apparent harm to their host, being found in plant tissues and organs such as leaves, branches and roots. They have the ability to produce secondary metabolites of pharmacological interest, but also applicable for the biological control of pests and diseases. The present study was aimed to investigate the biological activity and chemical characterization of secondary metabolites of endophytic actinobacteria *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 isolated from the leaves of *Momordica charantia* L.. The strain was incubated in conical flasks in the best condition selected for the production the bioactive metabolites in production was medium M1 for 72 hours of production in alkaline pH. The liquid extracts acetotílico metabolic (EBLM) and methanol from biomass (EBB) were subjected to the tests of cytotoxicity against tumor cells, the evaluation of the hemolytic potential in erythrocytes of mouse, acute toxicity, antimicrobial activity by determining the minimum inhibitory concentration (CMI) by microdilution plates of 96 wells and chemical prospecting. The methanolic extract of biomass was chromatographed on a silica gel column. The F4 fraction was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) resulting in the collection of three subfractions C1, C2 and C3. For the cytotoxic activity to the front lines HT-29 (colon carcinoma), HEp-2 (laryngeal carcinoma), NCI-H292 (lung carcinoma) and MCF-7 (breast carcinoma) single dose of 50 µg/mL , extracts, fractions and sub-fractions show the percentage of cell growth inhibition between 17 and 93%. Following administration of a dose of 2.000 mg/kg of the extract in mice EBB, no toxic effects were observed, visible signs of systemic toxicity and death of the animals. As for the hemolytic potential of the extracts, these showed effective concentration $EC_{50} > 500$ µg/mL and didn't cause damage to the membrane. Samples showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria alcohol acid-resistant, filamentous fungi, yeasts and phytopathogens. The extract EBLM presented MIC values lower for *B. subtilis* (15,62 µg/mL) *M. luteus* (7,8 µg/mL) and *M. smegmatis* (15,62 µg/mL) compared to the extract EBB. For CMI against *A. niger*, *C. albicans* and *C. krusei* the values were similar to assess the inhibitory effect ranging from 15,62 to 250 µg/mL. The F4 fraction and subfraction C1 showed MIC values equal to 62,5 µg/mL for *C. albicans*, *A. niger* and *M. smegmatis*. As for the MIC values of the extracts EBLM and EBB against pathogenic fungi and bacteria ranged from 15,62 to 500 µg/mL. The chemical prospecting demonstrated the presence of reducing sugars, phenolic compounds, mono/sesquiterpenes, triterpenes and steroids. The results shown demonstrate the ability of the strain endophytic *Streptomyces* sp. 3345 UFPEDA have to produce different biomolecules with various biological applications.

Keywords: Biological activities; endophytic; *Momordica charantia* L., *Streptomyces* sp.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta do micro-organismo ao amplo uso de antibióticos. Diversas razões justificam a busca constante por novos antibióticos como doenças infecciosas, altas taxas de resistência microbiana, o decréscimo no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) e a necessidade de agentes antimicrobianos que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso (DEMAIN, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). Os produtos naturais apresentam uma grande importância para a descoberta de novos antibióticos e várias pesquisas vêm mostrando que as plantas constituem um reservatório importante na busca por novas biomoléculas por abrigarem micro-organismos endofíticos (STROBEL, 2003; GUNATILAKA, 2006).

Endófitos são micro-organismos que habitam o interior das plantas sem aparentemente causar prejuízo ao seu hospedeiro, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al. 2002; SAIKKONEN et al. 2004). Estudos relatam que estes micro-organismos estão associados com a sanidade da planta que os hospeda em um equilíbrio perfeito através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários, conferindo algumas vantagens tais como: capacidade de produzir antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico, controle de insetos e animais herbívoros, produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos (controle biológico), aumento da tolerância a estresses abióticos e produção de fitohormônios. Estes micro-organismos também podem ser aplicados na biorremediação de solos contaminados e como vetores para introdução de genes nas plantas hospedeiras (SCHULZ et al., 2002; STROBEL et al., 2004; PIMENTEL et al., 2011).

Desde o isolamento do taxol (Paclitaxel) produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. uma ampla variedade de fungos endofíticos foram isolados de diferentes plantas (STIERLE et al., 1993). A planta *Artemisia annua* produz o composto artemisina que é utilizado no controle de fitopatógenos, como relatado por Liu (2001) que isolou deste vegetal fungos endofíticos produtores do mesmo composto. Recentemente os compostos vincristina e camptotecina, fármacos anticancerígenos usado na terapêutica de vários tipos de câncer, foram produzidos respectivamente pelos fungos endofíticos *Mycelia sterilia*, isolado de *Cataranthus roseus* e por *Entrophospora infrequens* endofítico de *Nothapodytes foetida* (YANG et al., 2004, PURI et al., 2005). Da cultura do fungo endofítico *Xylaria* sp., isolado da planta *Ginkgo biloba* L. foi extraído o composto 7-amino-4-metilcumarina com ação antimicrobiana frente a

vários patógenos (PIMENTEL et al., 2011). Substâncias anti-*Helicobacter pylori* foram extraídas de fungos endofíticos da planta medicinal *Cynodon dactylon* (LIN et al., 2005).

Estas pesquisas mostram a importância dos endofíticos principalmente fungos e actinobactérias, comumente isolados de várias espécies de plantas que são produtores de metabólitos bioativos.

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas, aeróbias, filamentosas, que apresentam um alto teor de guanina e citosina em seu DNA. Nos últimos anos, as actinobactérias endofíticas vêm sendo investigadas e mostram uma importância significativa na produção de uma variedade de metabólitos secundários que exibem inúmeras atividades biológicas (QIN et al., 2011). Bérdy (2005) observou que 45% das moléculas bioativas oriundas de micro-organismos foram isoladas de actinobactérias, dos quais 34% foram do gênero *Streptomyces* e 11% de outros gêneros raros como: *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* e *Streptosporangium*.

Momordica charantia L., conhecida popularmente com Melão-de-São-Caetano, é uma planta trepadeira originária da Ásia e África que se adaptou ao Brasil em razão do clima tropical (DERMARDEROSIAN; BEUTHER, 2005). Pertence à família Cucurbitaceae e apresenta diversas propriedades medicinais comprovadas cientificamente como antidiabética, antiviral, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunoestimulante, além de propriedade inseticida (RAMAN; LAU, 1996; BASCH et al., 2003; KUMAR et al., 2010).

Diante do exposto, este projeto teve como objetivo investigar a atividade biológica de actinobactéria endofítica isolada de folhas da planta medicinal *Momordica charantia* L., visando o isolamento e caracterização dos compostos bioativos, justificado pelo potencial que estes micro-organismos endofíticos apresentam como fonte promissora para produção de novas biomoléculas.

OBJETIVOS

Geral

Investigar as atividades biológicas dos metabólitos de actinobactéria endofítica isolada do Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.), bem como purificar e caracterizar as substâncias bioativas.

Específicos

- Reativar linhagem de actinobactéria endofítica *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 isolada de *Momordica charantia* L. depositada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco;
- Avaliar se os metabólitos secundários produzidos pelo endofítico apresentam atividade antimicrobiana;
- Otimizar o melhor meio de fermentação para produção dos metabólitos biativos;
- Fracionar os extratos que demonstrarem atividade biológica, identificando a(s) fração(s) bioativa(s);
- Isolar, purificar e caracterizar as substâncias bioativas dos extratos do líquido metabólico e da biomassa;
- Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica dos metabólitos referidos em células tumorais humanas e eritrócitos de camundongos;
- Investigar a toxicidade aguda do produto com melhor atividade no ensaio citotóxico;
- Comparar as substâncias isoladas dos extratos do líquido metabólico e da biomassa, com as substâncias de extratos das folhas de *Momordica charantia* L. encontradas na literatura.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. *Produtos naturais*

A propagação da resistência bacteriana torna-se uma ameaça à saúde humana contribuindo assim para a diminuição do valor terapêutico de muitos antimicrobianos usados na clínica médica. A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau de resistência adquirida, são propriedades bastante variáveis entre os micro-organismos. Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos antibióticos são de grande importância e essenciais para combater os patógenos resistentes (DEMAIN, 2006; HUANG et al., 2012). Há muito tempo os produtos naturais são utilizados no tratamento e prevenção de diversas doenças humanas. As fontes naturais continuam disponíveis oferecendo as melhores possibilidades de encontrar metabólitos bioativos de interesse terapêutico (HARVEY, 2008). Segundo Guimarães et al. (2010) fontes naturais pouco exploradas com interações ecológicas podem resultar em investigações que originam descobertas de compostos quimicamente diversos e biologicamente ativos sendo consideradas fontes promissoras para a busca de novos antibióticos.

Recentemente a literatura tem induzido um retorno à pesquisa em produtos naturais para a retomada do crescimento da produtividade pela indústria farmacêutica. Além disso, os produtos naturais apresentam uma ampla e complexa diversidade química, com propriedades similares aos fármacos de uso clínico (PUPO; GALLO, 2007). Newman e Cragg (2007) em um trabalho de revisão analisaram os fármacos introduzidos no mercado mundial de 1981 a 2006 e concluíram que 28% das novas substâncias químicas e 42% dos fármacos anticancerígenos eram originados de produtos naturais e seus derivados. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas. Além disso, um total de 13 fármacos derivados de produtos naturais foram aprovados para utilização clínica entre 2005 e 2007 (BUTLER, 2008).

Mais de 22.000 compostos biologicamente ativos de origem microbiana foram obtidos até o final de 2002 e destes 45% são produzidos por actinobactérias, 38% por fungos e 17% são originados de bactérias unicelulares (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Metabólitos secundários microbianos têm sido reconhecidos como um dos maiores reservatórios de diversidade química com potentes atividades biológicas (BUSH; MACIELAG, 2000).

Qin et al. (2011) revelaram que estudos recentes demonstraram o potencial de um grande número de actinobactérias endofíticas que produzem diversos compostos bioativos com atividades farmacológicas distintas (Tabela 1).

Tabela 1. Novos compostos bioativos isolados de actinobactérias endofíticas. (Adaptado de Qin et. al., 2011)

Endofíticos	Compostos Bioativos	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> . sp. MSU-2110	Coronamicinas	Antibiótico	Ezra et al. 2004
<i>Streptomyces</i> sp. CS	24-dimetil-bafilomicina A2	Antimicrobiano, antitumoral	Lu and Shen 2004
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Antimicina A18	Antifúngico	Yan et al. 2010
<i>Streptomyces</i> sp. ls9131	Dinactina dimérica e Nonactina dimérica	Antimicrobiano, Antitumoral	Zhao et al. 2005
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0556	Dimetilnovobiocinas	Antimicrobiano	Igarashi 2004
<i>Streptomyces laceyi</i>	Salaceínas A e B	Antitumoral	Kim et al. 2006
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> TP-A0451	Pterocidina	Antitumoral	Igarashi et al. 2006
<i>Streptomyces</i> sp. CS	Naftomicina K	Antitumoral	Lu and Shen 2007
<i>Streptomyces aureofaciens</i> CMUAc 130	5,7-dimetoxi-4-p-metoxilfenilcoumarina; 5,7-dimetoxi-4-fenilcoumarina	Antifúngico, antitumoral, anti-inflamatório	Taechowisan et al. 2005, 2007a, b
<i>Micromonospora lupine</i>	Lupinacidinas A and B	Antitumoral	Igarashi et al. 2007
<i>Streptomyces</i> sp. SUC1	Lansai B e C	Anticancer anti-inflamatório	Tuntiwachwuttikul et al. 2008; Taechowisan et al. 2009
<i>Streptomyces</i> sp. Hedaya48	Saadamicina	Antifúngico	El-Gendy e ELBondkly 2010
<i>Streptomyces</i> sp. MaB-QuH-8	Celastramicinas Ae B	Antimicrobiano	Pullen et al., 2002
<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0456	Cedarmicinas A e B	Antifúngicos	Igarashi, 2004
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30566	Kakadumicinas	Antibiótico	Castillo et al., 2003

Diversos agentes anticancerígenos com diferentes mecanismos de ação foram isolados de actinobactérias como os derivados antraquinônicos isolados de *Streptomyces* spp, merecendo destaque os compostos: daunorrubicina e seu análogo hidroxilado a doxorrubicina, o diterpenóide taxol e seu análogo docetaxel, bem como o alcalóide camptotecina e os análogos, que originaram inúmeros derivados atualmente presentes no mercado de fármacos oncológicos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010). Os peptídeos munumbicinas A-D isolados de *Streptomyces* sp. NRRL 30562 associado à *Kennedia nigriscans*, apresentaram atividade frente a diferentes bactérias resistentes à metilicina (CASTILLO et al., 2006).

Apesar do avanço com ensaios em larga escala (high-throughput screening - HTS), da química orgânica sintética e da química combinatória continuarem a desempenhar um papel importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos, os micro-organismos continuam sendo a fonte mais promissora para obtenção de novos antibióticos. Os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias se apresentam com um largo espectro de atividades biológicas, tais como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitário, imunossupressora, antitumoral, inseticidas, anti-inflamatórios, antioxidante, inibidor de enzima e outros (CLARDY et al., 2006; PRASHITH et al., 2010).

1.2. Micro-organismos endofíticos

O termo endofítico ou endófito é originado do grego *endo* + *phytón*, significando “dentro da planta”, podendo ser fungos, bactérias, e outros organismos (vírus e nematóides) que colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros (TAN; ZOU, 2001; OWEN; HUNDLEY, 2004). O crescimento nesse habitat envolve uma contínua interação metabólica entre o endófito e o hospedeiro, estas interações podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (BACON; WHITE, 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Os endófitos foram descritos pela primeira vez na segunda metade do século XIX, mas somente na década de 70 do século XX trabalhos revelaram que estes micro-organismos conferiam vantagens aos seus hospedeiros como: capacidade de produzir metabólitos primários e secundários de interesse farmacológico, produção de substâncias usadas como agentes inibidores de pragas e patógenos, podendo ainda serem utilizados como vetores para introdução de genes nas plantas (AZEVEDO et al., 2002; GIMENEZ et al., 2007). A transmissão do endófito pela planta pode ser transversal, através de zonas radiculares ou transmitidos pelas sementes e por transmissão horizontal quando micro-organismo do ar utiliza aberturas naturais como estômatos e hidatódios

presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (ZINNIEL et al., 2002; SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005).

Os endófitos habitam um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, podendo, assim, se tornar uma ferramenta poderosa no controle desses patógenos por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitismo ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência às doenças (AZEVEDO et al., 2002). As interações endófito/planta, ainda não são muito compreendidas, porém os metabólitos produzidos pelos endófitos podem apresentar capacidade de estimular o crescimento de plantas, seja através do auxílio durante a fixação do nitrogênio, da produção de fitohormônios, do antagonismo contra patógenos ou da resistência sistêmica (NETO et al., 2003; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008).

A população endofítica de uma determinada espécie é altamente variável e está sujeita às condições ambientais sob as quais o hospedeiro está crescendo bem como ao estado de saúde da planta (REITER et al., 2002). A relação dos endófitos com a produção de antibióticos está na presença de metabólitos secundários, que são produtos não essenciais para o crescimento e reprodução dos micro-organismos, mas que se acumulam no meio de cultura no final da fase exponencial de seu crescimento (DEMAIN, 1999).

Historicamente, de todos os micro-organismos endofíticos isolados, as actinobactérias e os fungos têm sido os maiores produtores de metabólitos secundários. Gunatilaka (2006) sugere ainda que os fungos sejam fundamentais à saúde e à prosperidade de muitos ecossistemas terrestres, sendo essenciais para a sustentabilidade e biodiversidade dos mesmos.

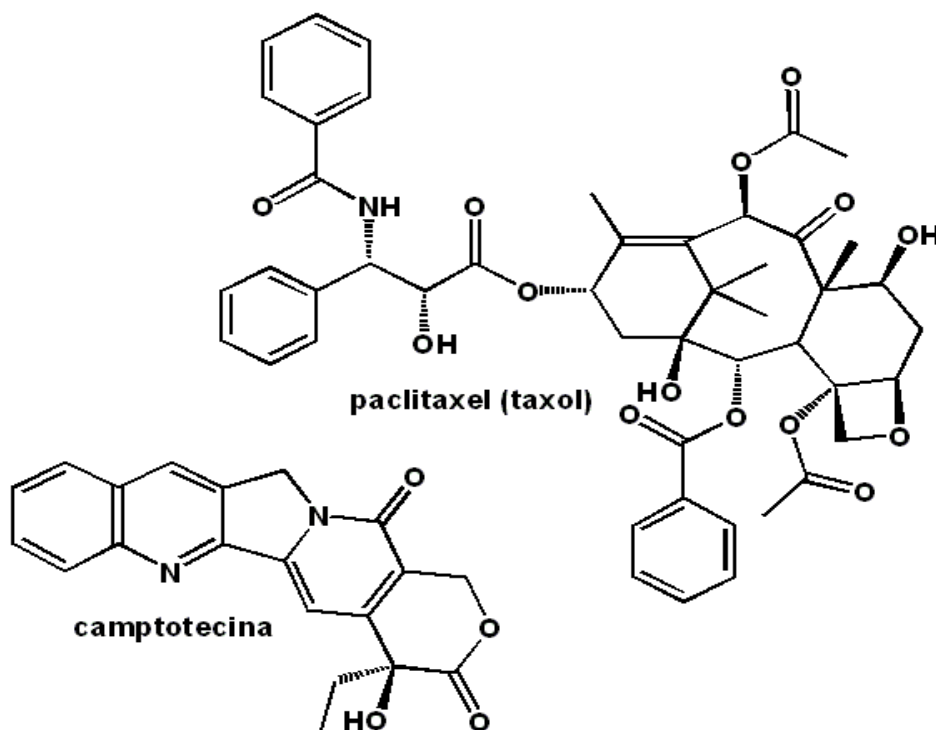
As bactérias endofíticas geralmente são encontradas nos espaços intercelulares, devido à presença de altos níveis de carboidratos, aminoácidos e nutrientes inorgânicos (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996; BACON; HINTON, 2006). O gênero bacteriano mais encontrado como endófito é o *Bacillus*, porém outros também já foram descritos como *Aeromonas*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Erwinia* (STURZ et al., 1997; ELVIRA-RECUENCO; VAN VUURDE, 2000).

Estudos relatam que os endófitos podem adquirir a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários idênticos aos produzidos pela planta hospedeira, provavelmente devido à recombinação genética ocorrida durante a fase evolutiva entre as espécies (ALY et al., 2010). Um exemplo bem conhecido é o produto utilizado em tratamentos de câncer de mama e útero, “taxol” (figura 1) produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* e pela planta da qual foi isolado, *Taxus brevifolia* (TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2003). O composto taxol é um diterpenóide e foi produzido por várias espécies de fungos endofíticos como *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis pauciseta*, *Aspergillus candidus*, *Phyllosticta spinarum*, *Phyllosticta citricarpa*, *Fusarium maire*, *Fusarium solani* (LACAVA et al., 2008).

Os endofíticos constituem uma fonte promissora proporcionando a descoberta de diversos metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides, quinonas, terpenóides, xantonas, esteróides e outros. Tais metabólitos encontram aplicações na agricultura, indústria farmacêutica e na indústria biotecnológica (KUSARI et al., 2012). O potencial destes micro-organismos como produtores de metabólitos secundários bioativos de diversas classes químicas tem sido relatado em vários trabalhos mostrando a sua importância (STROBEL, 2003; GUNATILAKA, 2006; BORGES et al., 2009).

Deshmukh e colaboradores (2009) isolaram o composto “Ergoflavin” do cultivo de fungo endofítico isolado da planta indiana *Mimusops elengi* (Sapotaceae), com atividade anticancerígena. A vincristina, fármaco anticancerígeno, foi isolado do endófito *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). Outro produto natural a camptotecina (Figura 1) e seus análogos (9-metoxicamptotecina e 10-hidroxicamptotecina), é um alcalóide com propriedades antitumorais que foi obtido de *Fusarium solani*, endófito da planta *Camptotheca acuminata* (UMA et al., 2008; KUSARI et al., 2009).

Figura 1. Estrutura química dos compostos taxol (Paclitaxel) e camptotecina isolados de fungos endofíticos.



Trametes hirsute, endofítico isolado de *Podophyllum hexandrum*, produz o composto podofilotoxina, precursor de diversos anticancerígenos semissintéticos (PURI et al., 2006). O

endófito *Pennicilium brasilianum* isolado da casca de raízes de *Melia azedarach* promoveu a biossíntese de fenilpropanóides, classe de metabólitos secundários de uso medicinal com propriedades: antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatórias e imunossupressoras (KORKINA, 2007; FILL et al., 2010). Estas descobertas científicas confirmam o grande potencial dos endófitos na produção de moléculas bioativas.

As actinobactérias endofíticas começam a despertar o interesse dos pesquisadores como fonte promissora para obtenção de novas biomoléculas, entre estas merece destaque o gênero *Streptomyces* por produzir metabólitos secundários com atividades biológicas diversificadas.

Vários gêneros de actinobactérias endofíticas como *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* e *Nocardia*, foram identificadas em isolamento de 12 plantas medicinais utilizadas na China. Das 280 linhagens isoladas, 41,1% apresentaram atividade citotóxica, 19,3% com atividade para *Candida albicans* e 10% foram ativos para *Staphylococcus aureus* (HUANG et al., 2012).

O composto lansai A-D com propriedades antifúngica e antitumoral, produzido pelo endófito *Streptomyces* sp. SUC1, isolado de *Ficus benjamina* (TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008). Igualmente Cheenpracha et al. (2011) isolaram três novas amidas: (fenatato de metila, actifenamida e 1-β-Dglucopiranosídeo-actinofenol), juntamente com outros 13 compostos de estruturas conhecidas do extrato de uma cultura de *Streptomyces* sp. H7372 apresentando atividade antimalárica e antimicrobiana para bactérias Gram-positivas. Os peptídeos com ação antibiótica nomeados de coronamicinas, foram produzidos pelo *Streptomyces* sp. MSU-2110, endofítico associado a *Monstera* sp., apresentou também atividade antimalárica (EZRA et al., 2004). A linhagem endofítica *Streptomyces* sp. CS de *Maytenus hookeri* produz o macrolídeo 24-dimetil-bafilomicina C₁ com atividade antimicrobiana e antitumoral (LU;SHEN, 2003).

O uso de estratégias de controle biológico de fitopatógenos, envolvendo endófitos vem crescendo cada vez mais e, com o acúmulo de informações a respeito da diversidade, modo de ação e biologia do endófito, pode-se vislumbrar um controle que minimize o uso de agentes químicos, ou mesmo, como único caminho para a redução da doença. Mejía et al. (2008) ao testarem *in vitro* fungos endofíticos isolados de tecidos sadios de *Theobroma cacao* frente a patógenos causadores de doença em plantações de cacau, verificaram antagonismo de 65% contra *Phytophthora palmivora*, 40% para *M. roreri* e 27% para *M. perniciosa*.

Para Lacava e colaboradores (2008) o incremento na bioprospecção de moléculas biologicamente ativas de micro-organismos endofíticos abre novas perspectivas e alternativas para contribuir com o desenvolvimento de novas tecnologias, métodos e estratégias nas áreas agrícola, médica e farmacêutica.

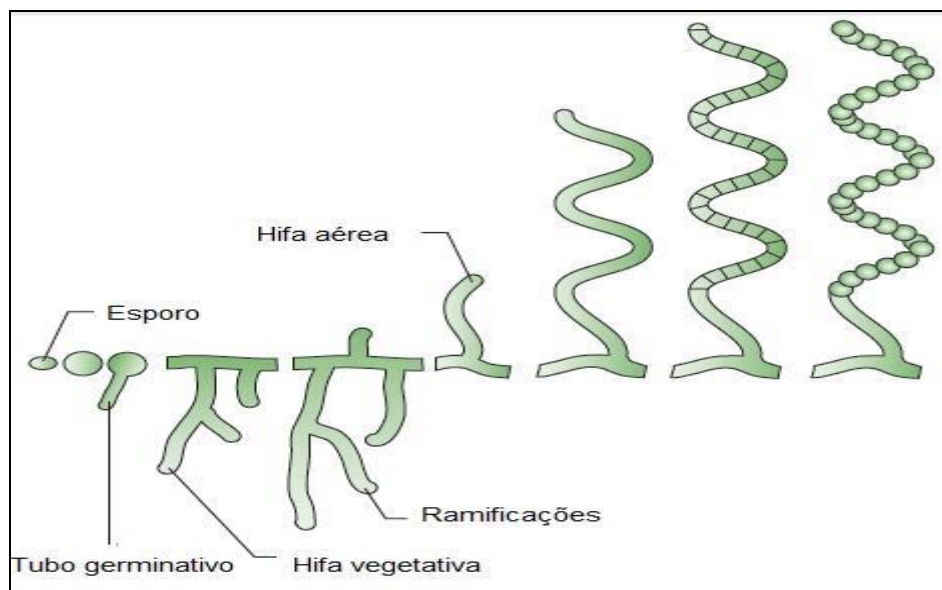
1.3. Características gerais de actinobactérias e sua importância

A palavra actinomiceto é derivada do grego “aktis” (traço) e “mykes” (fungo), sendo aplicada principalmente às bactérias que apresentam uma organização filamentosa, muitas vezes ramificada, formando micélio vegetativo e aéreo que origina a colônia. Por isto, foram primeiramente classificados como um grupo intermediário entre fungos e bactérias, mas a microscopia óptica e eletrônica mostrou que são bactérias filamentosas procarióticas (PANDEY, 2003). Possuem parede celular formada pelos isômeros do ácido diaminopimélico, ácido diamino lisina, ácido diamino ornitina ou ácido diaminobutírico (LECHEVAILIER; LECHEVAILIER, 1967).

A classe Actinobacteria é formada por bactérias Gram-positivas, aeróbias, filamentosas, apresentando um alto teor de guanina e citosina (G + C) em seu DNA, variando de 51% para o gênero *Corynebacterium* e mais de 70% para os gêneros *Streptomyces* e *Frankia*, porém com menos de 50% (G + C) observado no genoma do patógeno bacteriano *Tropheryma whippelii*. Exibem uma ampla variedade morfológica, como cocóide (ex. *Micrococcus*); bacilo cocóide (ex. *Arthrobacter*); filamentos fragmentados (ex. *Nocardia*) e podem ser altamente diferenciadas com filamentos ramificados (ex. *Streptomyces*). A maioria das espécies são aeróbias, podendo ser facultativas, microaerófilas ou anaeróbias (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983; LACAZ et al., 2002; VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias apresentam um ciclo de vida complexo, iniciando com a germinação do esporo, dando origem ao micélio que é formado por hifas ramificadas que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas (polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos) pela ação de enzimas extracelulares. Esse micélio vegetativo (hifas primárias) se desenvolve em micélio aéreo ou hifas secundárias, passam por diferenciações morfológicas que incluem septação e formação de esporos originando a colônia (Figura 2). Os esporos constituem a principal forma de multiplicação e são produzidos em grande número, contribuindo para a preservação da espécie. Mesmo não resistindo ao calor, resistem a dessecações, auxiliando na sobrevivência das espécies no período de estiagem (PADILLA, 1998; VENTURA et al., 2007; FLARD; BUTTER, 2009). As colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de 7 a 10 dias para desenvolver as hifas aéreas (HOPWOOD, 2007).

Figura 2. Ciclo de vida do gênero *Streptomyces* (Adaptado de FLARD; BUTTER, 2009)



Estes micro-organismos são amplamente distribuídos na natureza, ocorrem nos mais diversos habitats e são considerados uma fonte rica de produtos naturais bioativos com potencial aplicação na agricultura, indústria farmacêutica e biotecnológica. Dentre as diversas propriedades fisiológicas e metabólicas destes micro-organismos a que apresenta maior destaque é a produção de uma variedade de compostos biologicamente ativos, incluindo antibióticos, antitumorais, anti-inflamatórios, enzimas hidrolíticas e inibidores de enzimas (TIAN et al., 2004; RAJU et al., 2010; AL-ASKAR, 2012). Para Wang e colaboradores (1999) a população e a biodiversidade de actinobactérias em um ecossistema são determinadas por diversos fatores físicos, químicos e biológicos.

Segundo Anderson e Wellington (2001) a maioria dos metabólitos bioativos produzidos pelas actinobactérias são originados do gênero *Streptomyces*, que compreende o maior gênero da ordem Actinomycetales, pertencente à família Streptomycetaceae. O gênero *Streptomyces* é conhecido como uma das principais fontes para obtenção de metabólitos secundários de diversas classes químicas e atividades biológicas, tais como: agentes antitumorais, antiparasitários, herbicidas, imunomoduladores e principalmente antimicrobianos (RAJA; PRABAKARANA, 2011). São conhecidas mais de 500 espécies de *Streptomyces*, bactérias Gram-positivas que apresentam crescimento filamentosso formando ramificações e originando as colônias (EUZEBY, 2008). Igualmente aos fungos, muitas espécies de *Streptomyces* vivem como saprófitos no solo, embora possam ocorrer em uma grande diversidade de habitats. Estas bactérias filamentosas

ocorrem predominantemente no solo, o qual apresenta um odor característico de terra molhada decorrente da produção de uma série de metabólitos, denominados geosminas (sesquiterpenóides) (DREWS, 1999; MADIGAN et al., 2010).

Entre os anos de 1940 a 1960 durante a chamada “Era Dourada dos Antibióticos”, várias classes dos principais antibióticos usados na terapêutica foram descobertos através da seleção de produtos naturais microbianos, compreendendo os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, peptídeos entre outros (GUIMARÃES et al., 2010). Neste período cerca de 70-80% dos antibióticos descobertos eram produzidos por espécies de *Streptomyces* como pode ser observado na tabela 2.

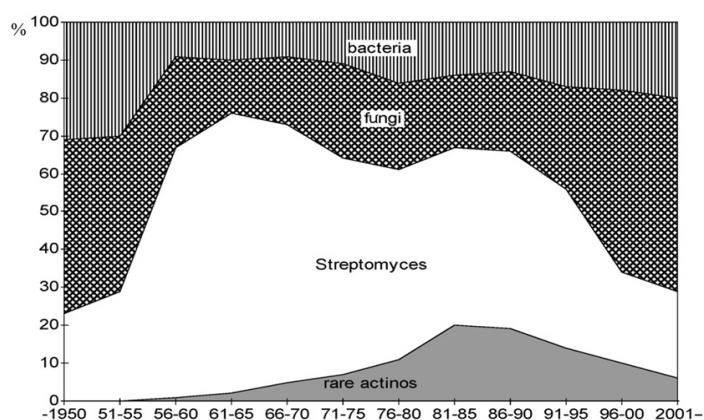
Tabela 2. Alguns antibióticos de uso clínico isolados de espécies de *Streptomyces*.

Micro-organismos	Antibiótico	Classe	Descoberta
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina	Aminoglicosídeo	1944
<i>Streptomyces Venezuela</i>	Cloranfenicol	Fenilpropanóide	1947
<i>Streptomyces erythreus</i>	Eritromicina	Macrolídeo	1952
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina	Polieno	1955
<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomicina	Glicopeptídeo	1959
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincomicina	Lincosamida	1960
<i>Streptomyces fradiae</i>	Fosfomicina	Fosfonato	1969

Com a descoberta em 1944 da estreptomicina isolada do *Streptomyces griseus*, pelo cientista Selman Waksman que revolucionou a terapêutica por sua ação contra bactérias Gram-negativas foi fundamental para a exploração em busca de outros micro-organismos produtores de novas substâncias bioativas (MAHAJAN; BALACHADRAN, 2012).

A figura 3 apresenta a distribuição dos antibióticos descobertos entre 1950-2000 segundo levantamento realizado por Bérdy (2005). Quarenta e cinco por cento do total de medicamentos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 e 2006 eram provenientes da indústria biotecnológica (NEWMAN; CRAGG, 2007). Do total de 22.500 compostos bioativos extraídos a partir de micro-organismos, 10.100 eram produzidos por actinobactérias, destes 7.630 eram provenientes de *Streptomyces* e 2.470 provenientes de outros grupos microbianos (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Figura 3. Distribuição dos antibióticos descobertos entre 1950-2000, de acordo com suas origens. (retirado de BÉRDY, 2005).



Neste contexto a pesquisa por novos antibióticos vem direcionando a exploração de habitats distintos como, por exemplo, os endofíticos, mostrando a ocorrência significativa de actinobactérias como produtoras de moléculas bioativas de grande importância biotecnológica, podendo ser comparadas a outros micro-organismos como bactérias e fungos (Tabela 3) (BÉRDY, 2005).

Tabela 3. Número aproximado de produtos naturais microbianos bioativos isolados até 2002 (adaptado de BÉRDY, 2005).

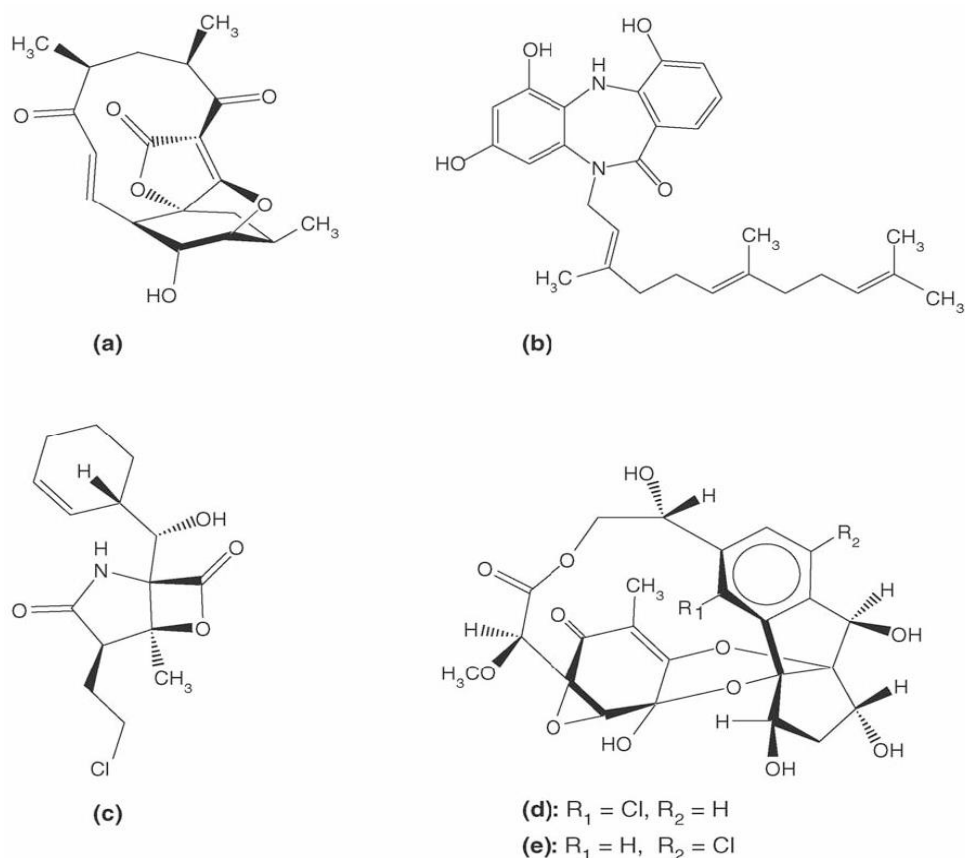
Fonte	Antibióticos	Total de metabólitos bioativos	Metabólitos usados na terapêutica	Metabólitos inativos
Bactérias	2.900	3.800	8-10	3.000-5.000
Actinobactérias	8.700	10.100	70-75	5.000-10.000
Fungos	4.900	8.600	13-15	2.000-15.000
Total	16.500	22.500	100	20.000-25.000

Inúmeras investigações mostram a elevada potencialidade das actinobactérias endofíticas na produção de novos metabólitos secundários bioativos. Kafur e Khan (2011) isolaram 38 actinobactérias endofíticas da planta *Catharanthes roseus*, que apresentavam atividade antimicrobiana frente à *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans* e outros fungos patogênicos. Dois novos compostos cedarmicinas A e B foram isolados do endófito *Streptomyces* sp. TP-A0456 com atividade antifúngica significativa (IGARASHI, 2004).

Retimicina, galtamicina B, saquaamicina Z e ribofuranosil-lumichrome foram produzidas por actinobactéria do gênero *Micromonospora* sp. Tu 6368, isolada de amostras de solo da Romênia, e apresentaram atividade citotóxica para várias linhagens de células tumorais humanas (ANTAL et al., 2005). Um novo derivado quinoliníco foi isolado da estirpe *Streptomyces* sp. neu50, com atividade citotóxica frente a linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) com IC_{50} de 29,3 $\mu\text{g/mL}$ em pesquisa realizada por Wang et al. (2011).

Habitats marinhos estão se destacando na busca por novas biomoléculas ativas, como relata Lam (2006) ao isolar actinobactérias de ambientes marinhos produtoras de diferentes compostos (Figura 4), com potencial para serem desenvolvidos como agentes terapêuticos. Apesar da diversidade abundante, é um nicho pouco explorado para a descoberta de novos metabólitos bioativos.

Figura 4. Compostos isolados de actinobactérias de origem marinha: a) Abissomicina, b) diazepinomicina, c) Salinosporamida A, d) Sporilide A e e) Sporilide B. (retirado de LAM, 2006).



Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação pelo FDA em 2003 do lipodepsipeptídeo natural daptomicina, isolada de *Streptomyces roseosporum*. O derivado semi-sintético glicopeptídeo dalbavancina encontra-se em fase de registro pelo FDA (FERNANDES, 2006).

O grande número de antibióticos e de outras classes de compostos já em uso na terapêutica clínica produzidos pelo gênero *Streptomyces* e a expectativa quanto à variedade de compostos bioativos que estes micro-organismos podem produzir, motiva a busca por substâncias inéditas no amplo grupo das actinobactérias, principalmente em gêneros menos explorados.

1.4. *Momordica charantia* L.

A família Cucurbitaceae é historicamente uma das mais importantes entre as plantas utilizadas para a produção de alimentos, fibras e fitoterápicos. Pertencente a esta família se destaca *Momordica charantia* L., uma planta trepadeira encontrada nos trópicos e subtrópicos sendo cultivada na Ásia, África, América do Sul e Índia (DERMARDEROSIAN; BEUTLER, 2005). Popularmente conhecida como Melão-de-São-Caetano, erva-de-são-vicente, melãozinho, fruta-de-cobra ou erva-de-lavadeira, pode ser encontrada em várias regiões do Brasil, especialmente no Nordeste (BATRAN et al., 2006). É uma planta daninha bastante freqüente em pomares, hortas, cafezais, cercas e terrenos baldios (LORENZI, 2000).

É uma espécie de valor ornamental, alimentar e medicinal. As partes da planta mais utilizadas pela medicina popular são principalmente as folhas e em menor escala os talos e os frutos. No Brasil é pouco consumido embora em países asiáticos seja consumido e produzido em larga escala na forma de conservas, recheados ou fritos.

Recentemente *M. charantia* L. passou a integrar a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS, 2009). A RENISUS é constituída por plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira.

O nome momordica deriva do latim e significa “mordida”, referindo-se às bordas irregulares das folhas, que aparentam estar mordidas. Apresentam flores amarelas e frutos oblongos com espinhos moles na superfície, assemelhando-se a um pequeno melão. Estes frutos são verdes quando novo e muda para uma tonalidade alaranjada quando maduro, abrindo-se espontaneamente expondo as sementes vermelhas e brilhosas (Figura 5A). A haste do fruto de comprimento de aproximadamente 2,5 cm é pilosa na extremidade terminal. As folhas são membranosas, lisas, pilosas e lobadas com cinco a sete lóbulos com aproximadamente 3-6 cm, gavinhas simples, longas,

delicadas e pubescentes (Figura 5B). As sementes são achatadas, oblongas, bidentadas na base e no ápice, coloração creme ou acinzentada. Todas as partes da planta, incluindo o fruto, possuem sabor amargo (DERMARDEROSIAN; BEUTLER, 2005; GROVER; YADAV, 2004).

Figura 5. Aspectos gerais de planta *Momordica charantia* L. (Melão-de-São-Caetano)

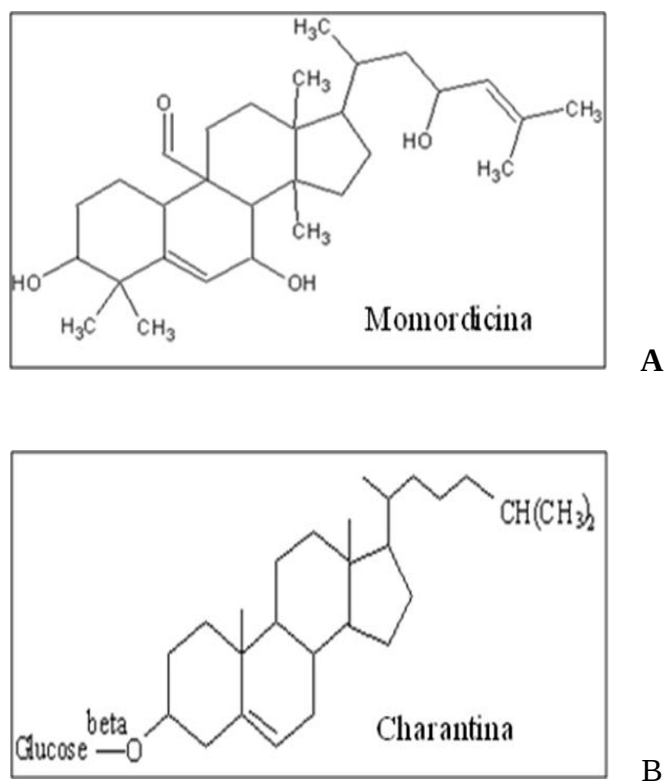


Apesar de abundante e muito usada na medicina popular, suas propriedades químicas e farmacológicas são pouco estudadas em nosso país. Esta espécie vem despertando interesse da comunidade científica mundial nos últimos anos com diversas publicações relacionadas a estudos farmacológicos e constituintes químicos (XIONG et al., 2009).

Estudos fitoquímicos relatam a presença de importantes classes de metabólitos biologicamente ativos que incluem glicosídeos, flavonóides, saponinas, alcalóides, óleos essenciais, triterpenos, esteróides e proteínas. Os frutos imaturos são fontes de vitamina C, fósforo e ferro (BRACA et al, 2008; ZHANG et al., 2009).

Diversas substâncias já foram isoladas de todas as partes da planta tais como: momorcharinas, momordenol, momordicilina, momordicinas (Figura 6A), momordicinina, momordina, momordolol, momorcharasídeos, charantina (Figura 6B), charina, criptoxantina, cucurbitinas, cucurbitanos, cucurbitacinas, cicloartenóis, diosgenina, eritrodiol, ácido láurico, ácido elaeostearico, ácido galacturônico, ácido gentísico, ácido oleanólico, ácido oléico, ácido oxálico, pentadecanos, peptídeos, gepsogenina, goiaglicosídeos, goiasaponinas e multiflorenol (HUSAIN et al., 1994; SENER, 1998; XIE et al., 1998; YUAN et al., 1999; MIURA, 2001; PARKASH et al., 2002; PITIPANAPONG et al., 2007).

Figura 6. Exemplos de compostos isolados de *Momordica charantia* L., A- momordicina e B- charantina. Fonte: KUMAR et al., 2010.



Momordica charantia L. é usado na medicina popular em vários países como Brasil, China, Colômbia, Haiti, Índia, México, Nicarágua, Panamá e Peru. Quanto as suas propriedades medicinais a planta é utilizada como: antimalárica, analgésica, hipoglicemiante, antimicrobiana, antihelmíntica, laxante, emenagoga, abortiva, anti-ulcerogênica, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e vermífuga (YESILADA et al., 1999; GROVER; YADAV, 2004; DANS et al., 2007; BRACA et al., 2008).

Extratos hidroalcoólicos das folhas desse vegetal demonstraram atividade antimicrobiana contra de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (PONZI et al., 2010). Esse mesmo extrato mostrou ação larvícida para *Liriomyza sativae* (LING et al., 2009) e atividade moluscicida frente à espécie *Biomphalaria glabrata* (RODRIGUES et al., 2010). A CMI dos extratos de *M. charantia* foram testados em associações com os antibióticos cefalexina e norfloxacino frente a cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente, isolados de origem humana e de animal (bovina) que apresentou um efeito sinérgico com valores entre 8 e 256 µg/mL (MAIA et al., 2008). Extratos alcoólicos dos frutos apresentaram atividades antiulcerogênica (ALAM et al., 2009) e ação antiinflamatória (LII, 2009).

Os triterpenóides classificados de momordicinas I e II apresentaram atividade antiviral e antihelmíntica (BELOIN et al., 2005). Duas proteínas conhecidas como α e β - momorcharinas presentes nas sementes, frutos e folhas, foram relatadas em pesquisas *in vitro* com atividade para o vírus HIV (KUMAR et al., 2010). Xiong et al. (2009) estudando estas proteínas, verificaram que elas induziram apoptose em linhagens de células prostáticas cancerosas *in vitro*, não evidenciando efeito em células normais.

Charantina é composto resultante da mistura de dois glicosídeos esteroidais, conhecido como polipeptídeo-P ou insulina-P, apresentando estrutura semelhante à insulina com apenas um aminoácido a mais (metionina). Isolado a partir do fruto, sementes e tecidos da planta têm sido bastante estudado por sua atividade hipoglicemiante (RAMAN e LAU, 1996). Ahmad et al. (2012) isolaram das sementes o polipeptídeo-K apresentando atividade hipoglicemiante superior ao polipeptídeo-P. Apesar da ação antidiabética de *M. charantia* L. está descrita em diversas pesquisas, o mecanismo de ação pelo qual ocorre o controle da glicemia ainda não foi totalmente elucidado (ABASCAL; YARNELL, 2005; TAN et al., 2008).

Em relação à toxicidade, *M. charantia* L. têm se demonstrado segura. Animais que experimentalmente receberam baixas doses durante dois meses não apresentaram nenhum sinal de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além de não acarretar alteração no consumo de alimentos, no ganho de peso ou nos parâmetros hematológicos (PLATEL et al., 1993; VIRDI et al., 2003). No entanto, altas doses dos extratos quando administradas por via intravenosa ou intraperitoneal tem demonstrado toxicidade levando a morte de animais.

2. REFERÊNCIAS

- ABASCAL, K.; YARNELL, N.D. Using bitter melon to treat diabetes. **Alternative e Complementary Therapies**, v. 11, n.4, p. 179-184, 2005.
- AHMAD, Z.; ZAMHURI, K.F.; YAACOB, A.; SIONG, C.H.; SELVARAJAH, M.; ISMAIL, A.; HAKIM, M.N. *In vitro* anti-diabetic activities and chemical analysis of polipeptide-K and oil isolated from seeds of *Momordica charantia* (Bitter Gourd). **Molecules**, v. 17, p. 9631-9640, 2012.
- AL-ASKAR, A.A. Microbiological studies on the *in vitro* inhibitory effect of *Streptomyces collinus albescens* against some phytopathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 13, p. 3277-3283, 2012.
- ALAM, S.; ASAD, M.; ASDAQ, S. M.; PRASAD, V. S. Antiulcer activity of methanolic extract of *Momordica charantia* L. in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 464-469, 2009.
- ALY, A.H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.
- ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, E. M. H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 51, p. 797-814, 2001.
- ANTAL, N.; FIEDLER, H.; STACKEBRANDT, E.; BEIL, W.; STROCH, K.; ZEECK, A. Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. TU6368. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 2, p. 95-102, 2005.
- AZEVEDO, J.L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. 2^a ed. Ed. EDUCS: Caxias do Sul, p. 246, 2002.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. S.S. Gnanamanickam (ed.), **Plant-Associated Bacteria**, p. 155–194, 2006.
- BACON, C.W.; JUNIOR, J.F.W. **Microbial endophytes**. New York : Marcel Dekker, p. 487, 2000.
- 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, n. 12, p. 1137-1163, 2009.
- BARREIRO, J.E.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 679-688, 2009.
- BASH, D.W.; GABARDI, S. ULBRICHT C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health and Systemic Pharmacology**, v. 65, p. 356-359, 2003.

BATRAN, S.A.E.S.E.; EL-GENGAIHI, S.E.; SHABRAWY, O.A.E. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 236–242, 2006.

BELOIN, N.; GBEASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON, J.; SOUSSAM, K.; KOUMAGLO, K.; ARNASON, J.T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 49-55, 2005.

BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BRACA, A.; SICILIANO, T.; D'ARRIGO, M.; GERMANO, M.P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. **Fitoterapia**, v.79, n.2, p.123-125, 2008.

BUSH, K.; MACIELAG, M. New approaches in the treatment of bacterial infections. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 433-439, 2000.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; MULLENBERG, K.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; FOLGIANO, V.; GALLO, M.; FERRACANE, R.; MANNINA, L.; VIEL, S.; CODDE, M.; ROBISON, R.; PORTER, H.; JENSEN, J. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL3052. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, p. 296–300, 2006.

CASTILLO, U.F.; HARPER, J.K.; STROBEL, G.A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVAR, D.; JENSEN, J.B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W.M.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 183-190, 2003.

CHEENPRACHA, S.; BORRIS, R.P.; TRAN, T.T.; JEE, J.M.; SEOW, H.F.; CHEAH, H.Y.; HO, C.C.; CHANG, L.C. Three new amides from *Streptomyces* sp. H7372 **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 223-229, 2011.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1541 – 1550, 2006.

COSTA-LOTUFO, L.V., MONTENEGRO, R.C., ALVES, A.P.N.N., MADEIRA, S.V.F., PESSOA, C., MORAES, M.E.A., MORAES, M.O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

DANS, A.M.; VILLARRUZ, M.V.; JIMENO, C.A.; JAVELOSA, M.A.; CHUA, J.; BAUTISTA, R.; VELEZ, G.G. The effect of *Momordica charantia* capsule preparation on glycemic control in type 2 diabetes mellitus needs further studies. **Journal Clinical Epidemiology**, v.60, n.6, p.554-559, 2007.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug Discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 33: 486-495, 2006.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.

DERMARDEROSIAN, A.; BEUTLER, J.A. The Review of Natural Products. 4 Ed. Ed. St. Louis, Missouri: **Factos & Comparisons**, 2005.

DESHMUKH, S.K.; MISHRA, P.D.; KULKAMI, A.A. et al. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784–789, 2009.

DREWS, G. Ferdinand Cohn: a promoter of modern microbiology. **Nova Acta Leopoldina**, v. 80, p. 13-43, 1999.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidente of endophytic bacteria in pea cultivars under fields conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

EZRA, D.; CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D.B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVAR, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp.. **Microbiology**, v.150, p. 785-793, 2004.

FERANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nature Biotechnology**, v.24, p. 1497 – 1503, 2006.

FILL, T.P.; SILVA, B.F.; RODRIGUES-FO, E. Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.3, p. 622-629, 2010.

FLARD, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 36-49, 2009.

GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZALEZ, C. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, v.11, p. 707-720, 2007.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, 1983.

GROVER, J.K.; YADAV, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 123–132, 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant – associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p.509-526, 2006.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HOPWOOD, D. A. **Streptomyces in Nature and medicine: the antibiotics makers**. Oxford University Press, New York, 2007.

HUANG, X.L.; ZHUANG, L.; LIN, H.P.; GOODFELLOW, M.; HONG, K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 41, p. 9855-9864, 2012.

HUSAIN, J.; TICKLE, I.J.; WOOD, S.P. Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. **FEBS Letters**, v. 342, p. 154–158, 1994.

IGARASHI, Y.; TRUJILLO, M.E.; MARTINEZ-MOLINA, E.; YANASE, S.; MIYAGA, S.; OBATA, T.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupine* sp. nov. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, v.17, n. 2, p. 3702-3705, 2007.

IGARASHI, Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. **Actinomycetologica**, v. 18, p. 63–66, 2004.

KAFUR, A.; KHAN, A.B. Isolation of endophytic actinomycetes from *Catharanthes roseus* (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 302-306, 2011.

KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n.1, p. 15-25, 2007.

KUMAR, D.S.; SHARATHNATH, K.V.; YOGESWARAN, P.; HARANI, A.; SUDHAKAR, K.; SUDHA, P.; BANJI, D. A medicinal potency of *Momordica charantia*. **International Journal of Pharmaceutica Sciences Review and Research**, v. 1, n.2, p. 95-100, 2010.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.

KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMTFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R. Eds. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Agrolivros, Guaíba. p. 209-228, 2008.

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.

LAM, K.S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 245-251, 2006.

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

LII, C. K.; CHEN, H.W.; YUN, W.T.; LIU, K.L. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 27-33, 2009.

LIN, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515-1519, 2005.

LING, B.; XIANG, Y.L.; WANG, G.C.; CHEN, S.H.; ZHANG, M.X. Antifeedant and antioviposition activities of *Momordica charantia* leaf ethanol extract against *Liriomyza sativae*. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, v. 20, n. 4, p. 836-42, 2009.

LIU, C.H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**. 88: 277-282, 2001.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 3º ed. 2000. p. 640,

LU, C.H.; SHEN, Y.M. A new macrolide antibiotics with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. CS, a commensal microbe of *Maytenus hookeri*. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 415–418, 2003.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP; P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Ed. 2010. Artmed. p. 459.

MAIA, R.R.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; JÚNIOR, J.P.S.; ALBUQUERQUE, A.C.L.; PEREIRA, L.F.; COSTA, M.R.C.; PEREIRA, A.V. Efeito antimicrobiano do extrato de *Momordica charantia* Linn isolado e em associação com antibióticos sobre *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 04, p. 12-17, 2008

MAHAJAN, G. B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes - A review. **Frontiers in Bioscience E4**, n.1, p. 240-253, 2012.

MARINHO, A.M.R.; FILHO, E.R.; MOITINHO, M.L.R.; Santos, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 280-283, 2005.

MEJÍA, L.C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; VAN BAEL, S.; ARNOLD, A.E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G.J.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.

MIURA, T.; ITOH, C.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; KAWAI, M.; PARK, S.R.; SUZUKI, I. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. **Journal of Nutrition Sciences Vitaminology**, v. 47, p. 340–344, 2001.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, 2003.

NEUMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v.70, p. 461-477, 2007.

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, p. 79-99, 2004.

PADILLA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: Melo microorganism by fully automated image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 9, p. 879-881, 1998.

PANDEY, B.; GHIMIRE, P.; AGRAWAL, V.P. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. **Academy of Science and Tecnology**, 2003.

PARKASH, A.; NG, T.B.; TSO, W.W. Purification and characterization of charantin, a napinlike ribosome-inactivating peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*) seeds. **Journal of Peptide Research**, v. 59, p. 197–202, 2002.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J. & Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Spring-Verlag, p. 179-197, 1991.

PIMENTEL, M.R.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v. 11, 2011.

PITIPANAPONG, J.; CHITPRASERT, S.; GOTO, M.; JIRATCHANYAKUL, W.; SASAKI, M.; SHOTPRUK, A. New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction. **Separation and Purification Techonology**, v. 52, n. 3, p. 416-422, 2007.

PONZI, E.A.C.; OLIVEIRA, T.L.; MORAIS, I.A.F.; JÚNIOR, J.J.S.; GERBI, M.M.; SOUZA, I.A.; PSIOTTANO, M.N.C.; XAVIER, H.S. Antimicrobial activity of the *Momordica charantia* L. extract. **Revista de Cirurgia eTraumatologia Buco-Maxilo-Facial**, v. 10, n. 1, p. 89-94, 2010.

PLATEL, K.; SHURPALEKAR, K.S.; SRINIVASAN, K. Influence of bitter gourd (*Momordica charantia*) on growth and blood constituents in albino rats. **Die Nahrung**, v. 37, p. 156-160, 1993.

PRASHITH KEKUDA, T. R.; SHOBHA, K.S.; ONKARAPPA, R. Fascinating diversity and potent biological activities of actinomycete metabolites. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p. 250-256, 2010.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D.D.; LOHMANN, S.; FRANC, S.D.C.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MOLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRAFE, U.; LEISTNER, E.

New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta**, v. 216, p. 162–16, 2002.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

PURI, S.C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMMA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R.K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

PURI, S.C.; VERMA, V.; AMMA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**. 68: 1717-1719, 2005.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 457-473, 2011.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and drugs-an overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n.2, p. 75-84, 2011.

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**, v.16, p.3194 – 3200, 2010.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v. 2, p. 349–362, 1996.

REITER, B. et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2261-2268, 2002.

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renisus.pdf>. DAF... MS fev/2009. Acessado em março de 2011.

RODRIGUES, K.A.F.; DIAS, C.N.; FLORÊNCIO, J.C.; VILANOVA, C.M.; GONÇALVES, J.R.S.; MORAES, D.F.C. Phytochemical prospection and molluscicidal activity of the leaves of *Momordica charantia* L. **Cadernos de Pesquisa**, v. 17, n. 2, p. 69-76, 2010.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1109-1114, 2008.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAGER, S.; AUST, H.J.; ROMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SENER, B.; TEMIZER, H. Biologically compounds of *Momordica charantia* L. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 516-521, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STURZ, A. et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility Soils**, v. 25, p. 13-19, 1997.

TAECHOWISAN, T.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S.; TAYLOR, W. C. Anti-inflammatory activity of 4-arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in murine macrophage RAW 264.7 Cells. **Immunological Investigations**, v. 36, n. 2, p. 203- 211, 2007.

TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; LIU, J. Anti-inflammatory activity of lansais from endophytic *Streptomyces* sp. SUC1 in LPS-induced RAW 264.7 cells. **Food and Agricultural Immunology**, v. 20, n. 1, p. 67-77, 2009.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAN, M.J.; YE, J.M.; TURNER, N.; HOHNEN-BEHRENS, C.; KE, C.Q.; TANG, C.P.; CHEN, T.; WEISS, H.C.; GESING, E.R.; ROWLAND, A.; JAMES, D.E.; YE, Y. Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. **Chemistry & Biology**, v.15, n.3, p.263-73, 2008.

TIAN, X.L.; CAO, L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q.G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q.; ZHOU, S.N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, n.3, p.303 – 309, 2004.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W.C. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC 1. **Tetrahedron**, v. 64, n. 32, p. 7583-7586, 2008.

UMA SHAANKER, R.; RAMESHA, B.T.; RAVIKANTH, G.; GUNAGA, R.; VASUDEVA, R.; GANESHAIAH, K.N. Chemical profiling of *N. nimmoniana* for camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system. **Bioactive Molecules and Medicinal Plants**, p. 197-213, 2008.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHARER, K.F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71 ,n.3, p.495-548, 2007.

VIRDI, J.; SIVAKAMI, S.; SHAHANI, S.; SUTHAR, A.C.; BANAVALLIKAR, M.M.; BIVANI, M.K. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 107-111, 2003.

WANG, X.J.; GONG, D.L.; WANG, J.; ZHANG, J.; LIU, C.; XIANG, W.S. A new quinoline derivative with cytotoxic activity from *Streptomyces* sp. Neau50. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v. 21, p. 2313-2315, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, Z.S.; RUAN, J.S.; WANG, Y.M.; ALI, S.M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 178-187, 1999.

XIE, H.; HUANG, S.; DENG, H.; WU, Z.; JI, A. Study on chemical components of *Momordica charantia*. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 21, p. 458-459, 1998.

XIONG, S. D.; Ribosome-inactivating proteins isolated from dietary bitter melon induce apoptosis and inhibit histone deacetylase-1 selectively in premalignant and malignant prostate cancer cells. **Internacional Journal of Cancer**, v. 125, n. 4, p. 774-782, 2009.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v. 35, p. 79-81, 2004.

YESILADA, E.; SEZIK, E.; HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in Turkey IX : folk medicine in north-west Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 199-206, 1999.

YUAN, Y.R.; HE, Y.N.; XIONG, J.P.; XIA, Z.X. Three-dimensional structure of betamomorcharin at 2.55 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 55, p. 1144-1151, 1999.

ZHANG, M.; HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R.; CHEN, P.; OVER, K.F. Effect of maturity stages and drying methods on the retention of selected nutrients and phytochemicals in Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) leaf. **Journal of Food Science**, v. 74, v.6, p. 441-448, 2009.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B.N.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

Atividades biológicas de extratos produzidos por *Streptomyces* sp. endofítico de *Momordica charantia* L.

Artigo I a ser submetido ao periódico **Research in Microbiology**



Atividades biológicas de extratos produzidos por *Streptomyces* sp. endofítico de *Momordica charantia* L.

Janaína Gonçalves da Silva Melo¹, Juanize Matias da Silva³, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Sandrine Maria de Arruda Lima¹, Gardênia Carmen Gadelha Militão², Teresinha Gonçalves da Silva¹, Janete Magali de Araújo¹, Sebastião José de Melo^{1*}.

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

² Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

*Autor para Correspondência: Sebastião José de Melo. Tel: + 55 81 2126 8346.

E-mail: melosebastiao@yahoo.com.br

Resumo:

Micro-organismos endofíticos vivem no interior dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. Dentre estes estão as actinobactérias do gênero *Streptomyces* que tem a capacidade de produzir diferentes tipos de biomoléculas ativas. Esta pesquisa teve por objetivo determinar atividades biológicas a partir de metabólitos secundários produzidos pelo *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 isolado de *Momordica charantia* L. Após a fermentação em diversos meios de cultura foram obtidos os extratos metanólico da biomassa (EBB) e o acetoetílico do líquido metabólico (EBLM). Os extratos apresentaram atividade antagônica com CMI variando de 7,81 a 1000 µg/mL para micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos, fungo filamentoso e leveduras. Frente às linhagens tumorais humanas HT-29, NCI-H292 e HEp-2 na dose única de 50 µg/mL, os extratos EBB e EBLM apresentaram atividade citotóxica com percentuais de inibição do crescimento celular (IC%) entre 30 e 93%, e não causaram lesão na membrana plasmática eritrocitária apresentando concentração efetiva $CE_{50} > 500$ µg/mL. Quanto à toxicidade aguda após administração do extrato EBB na dose de 2.000 mg/kg, não foi observado morte dos animais bem como alteração dos parâmetros hematológicos. Os resultados evidenciam o potencial em produzir diferentes metabólitos secundários com aplicações biológicas pela linhagem endofítica *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345.

Palavras-chaves: Endofítico; *Streptomyces* sp; *Momordica charantia* L.; atividade citotóxica; atividade antimicrobiana.

1. Introdução

A propagação da resistência a antibióticos por diversos patógenos, o aparecimento de doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o surgimento da gripe pelo vírus H1N1 e o crescente número de mortes causadas pelo câncer, reforça a necessidade da busca contínua por uma nova geração de antibióticos e antitumorais com mecanismos de ação diferente dos fármacos já existentes (Clardy et al., 2006; Guimarães et al., 2010; Huang et al., 2012).

As fontes naturais apresentam uma grande importância na busca por novas moléculas bioativas, oferecendo as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (Costa-Lotufo et al., 2010). Newman e Cragg (2007) analisaram a origem dos fármacos desenvolvidos e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 a 2006 e concluíram que 63% das novas entidades químicas apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Diante do exposto as plantas podem contribuir para a descoberta de novos antibióticos, constituindo um reservatório importante para os chamados micro-organismos endofíticos.

Endofíticos são fungos e bactérias que residem assintomaticamente no interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes. A presença destes micro-organismos está relacionada com a produção de diversos metabólitos secundários conferindo vantagens como: controle de insetos, produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos, aumento da tolerância a estresses abióticos, produção de fitohormônios e outros fatores de crescimento (Schulz et al., 2002; Strobel et al., 2004; Pimentel et al., 2011).

Entre as bactérias endofíticas, o gênero *Streptomyces* pertencente à família Actinomycetaceae, é conhecido como uma das principais fontes para obtenção de metabólitos secundários com atividade biológica diversificada (Wiyakrutta et al., 2004; Raja; Prabakarana, 2011). Este gênero é composto por bactérias Gram-positivas, filamentosas que se desenvolvem em vários ambientes (Ballav et al., 2012), possuem elevado teor (70%) de guanina e citosina (G + C) em seu DNA (Ventura et al., 2007) e sua diferenciação morfológica envolve a formação de uma camada de hifas dando origem a uma cadeia de esporos (Nett et al., 2009; Procópio et al., 2012).

Segundo Demain e Sanchez (2009) do total de 22.500 metabólitos bioativos extraídos a partir de micro-organismos cerca de 10.100 foram produzidos por actinobactérias, destes 7.630 são provenientes de *Streptomyces* correspondendo a antibióticos, agentes antitumorais, imunossuppressores, enzimas e outros.

Momordica charantia L., pertence à família Cucurbitaceae, conhecida popularmente como Melão-de-São-Caetano, é uma planta trepadeira de regiões tropical e subtropical sendo cultivada na Ásia, África, América do Sul e Índia (Dermarderosian e Beutler, 2005). Apresenta diversas propriedades medicinais como: antidiabética, antiviral, antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunoestimulante, inseticida (Raman e Lau, 1996; Basch et al., 2003). A planta contém compostos biologicamente ativos que incluem glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos essenciais, triterpenos, esteróides e proteínas. Seus frutos são fontes de vitamina C, fósforo e ferro (Zhang et al., 2009).

Esta pesquisa teve por objetivo investigar as atividades antimicrobiana, citotóxica, o potencial hemolítico e a toxicidade dos metabólitos secundários produzidos pelo *Streptomyces* sp. UFPEDA endofítico isolado de folhas da planta medicinal *Momordica charantia* L.

2. Materiais e Métodos

A linhagem endofítica *Streptomyces* sp UFPEDA 3345 foi isolada de folhas da planta *Momordica charantia* L. e encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos - UFPEDA do Departamento de Antibióticos. Foi semeada em placas de Petri com o meio ISP-4 ágar (International Streptomyces Project - Medium 4) e incubada em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) a 30 °C por 13 dias.

2.1. Fermentação em Cultivo Submerso

Blocos de gelose foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio líquido ISP-2 (extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, glicose 4 g, pH 7,2), e mantidos sob agitação a 180 rpm a 30 °C. Após 48 horas, este pré-inóculo (10% v/v) foi transferido para frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meios líquidos para fermentação ISP-2, M1 (glicose 10 g/L; farinha de soja 10 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; carbonato de cálcio 1 g/L, pH 7,0) e MPE (glicose 20 g/L; farinha de soja 20 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; carbonato de cálcio 2 g/L, pH 7,0) os quais foram mantidos sob as mesmas condições por 120 horas. A cada 24 horas, alíquotas do fermentado foram centrifugadas (10.000 rpm/2 min.) e realizada a atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em discos, utilizando-se *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 86.

2.2. Obtenção dos Extratos

O pré-inóculo obtido foi transferido (10%, v/v) para frascos de Erlenmeyer (1000 mL) com 500 mL do meio M1 e cultivados sob agitação durante 72 horas. O fermentado foi centrifugado a 10.000 rpm/ 2 minutos e o líquido metabólico extraído duas vezes com solvente acetato de etila na proporção de 1:2 (v/v). A massa celular foi extraída três vezes com metanol na proporção 1:2 (p/v). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C.

2.3. Atividade Antimicrobiana

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e da concentração mínima fungicida (CMF) dos extratos foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Os extratos foram testados em concentrações decrescentes variando de 1000 a 3,9 µg/mL.

Os micro-organismos testes utilizados pertencem à Coleção de Microrganismos-UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *S. aureus* UFPEDA 663, *S. aureus* ORSA UFPEDA 700, *S. aureus* ORSA UFPEDA 709, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Micrococcus luteus* UFPEDA 100, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Candida albicans* UFPEDA 1007, *Candida krusei* UFPEDA 1002, *Malassezia furfur* UFPEDA 1320, *Aspergillus niger* UFPEDA 2003 e *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71.

Suspensões de células de cada micro-organismo foram padronizadas na concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^7 UFC/mL para fungo filamentoso e leveduras. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungo filamento.

2.4. Atividade Citotóxica

As linhagens celulares testadas foram: HEP-2 (carcinoma epidermóide de laringe), NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e HT-29 (carcinoma de cólon) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro - Brasil. Estas foram cultivadas em DMEM (*Minimum Essencial Medium Eagle Modified Dulbecco's*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 nM de L-glutamina), incubadas a 37 °C com 5% de CO₂.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do método do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2-5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium] (Mosmann, 1983). Uma suspensão de cada linhagem (2×10^5 células/poço) foi distribuída em placas de 96 poços, incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, os extratos foram adicionados em cada poço na concentração única de 50 µg/mL, como controle positivo foi utilizado a doxorubicina (0,009 - 5 µg/mL). As placas foram incubadas por 72 horas, em seguida foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço, incubando-se as placas a 37 °C por 3 horas. As absorbâncias foram determinadas em leitor de placas MultisKan (540 nm) após dissolução do precipitado formado em DMSO. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança de 95% a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.0. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

2.5. Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos de Camundongos

O sangue foi coletado de camundongos Swiss (*Mus musculus*), previamente anestesiados, por punção cardíaca (n=3). Os eritrócitos foram lavados em solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10 mM) por centrifugação (3000 rpm/ 5 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em solução salina para se obter uma solução de eritrócitos a 2%. Estes experimentos foram realizados em multiplacas com 96 poços contendo: 100µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X- 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL da amostra a ser testada (2000 a 15,62 µg/mL) diluído em DMSO a 10 % foram plaqueados. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos foram adicionados em todos os poços. Após incubação por 1 hora sob agitação o sobrenadante foi analisado. A leitura óptica foi realizada em leitor automático de placas MultisKan (450 nm). Foram realizados três experimentos independentes.

A concentração efetiva que causa 50% de hemólise nos eritrócitos (CE_{50}) e respectivo intervalo de confiança de 95% foram determinados a partir de regressão não-linear utilizando o programa SigmaPlot versão 11.0.

2.6. Toxicidade Aguda em Camundongos

O teste de toxicidade aguda foi realizado conforme a OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), onde grupos de três camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas (25-30g) receberam por via oral uma única dose de 2.000 mg/kg (grupo tratado) do extrato metanólico da biomassa (EBB) ou solução salina contendo 5% de DMSO (grupo controle). Após a administração, os animais foram observados continuamente nas primeiras duas horas e depois a cada 24 horas durante 14 dias, para verificação de qualquer alteração comportamental, fisiológicas ou mortalidade. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático, que verificou o comprometimento quanto: ao estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo.

Foram observados o consumo de água, ração e peso dos animais. No final do estudo, os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de ketamina e xilazina para coleta do sangue por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA) e os parâmetros hematológicos foram determinados em analisador automático ABX micros 60-Horiba.

Os órgãos (fígado, rins e baço) foram analisados macroscopicamente, dissecados e pesados. O índice dos órgãos foi definido como a razão entre o peso do órgão (mg) e o peso corporal (g), foi utilizado para determinar se o extrato provocou alterações no tamanho dos órgãos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Fermentação em Cultivo Submerso

A fermentação foi realizada nos meios M1, MPE e ISP-2, avaliando os parâmetros meio de cultura, tempo, pH e atividade antimicrobiana através do teste de difusão em discos frente aos micro-organismos: *B. subtilis* UFPEDA 86 e *S. aureus* UFPEDA 02 (Fig. 1).

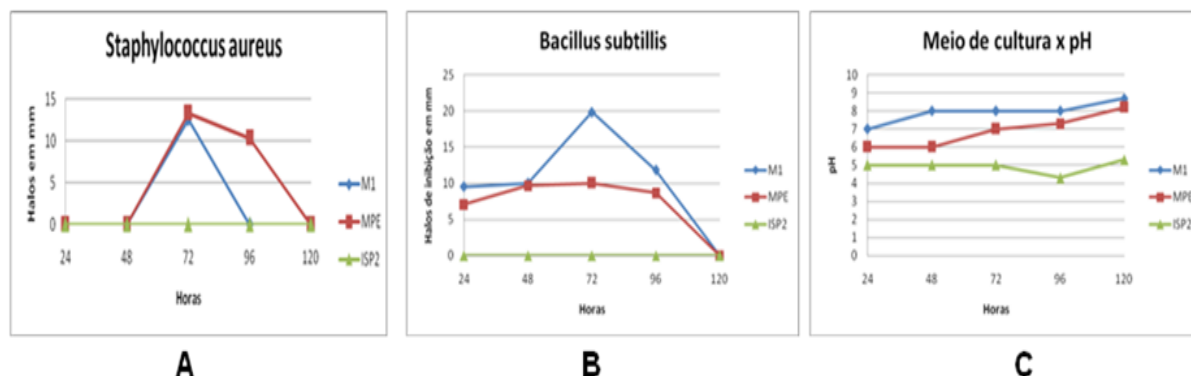


Figura 1: Os gráficos A e B- Halos de inibição (mm); C- Valores de pH, obtidos a partir dos diferentes meios de fermentação do *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345.

Após 72 horas de fermentação os maiores halos de inibição foram observados no meio M1 com pH 8,0. Não foi observada atividade antimicrobiana no meio ISP2 que apresentou pH 4,3-5,0. Para Takur et al. (2007) o crescimento celular não está relacionado com a produção de metabólitos secundários, o meio de cultura pode favorecer o crescimento da linhagem, mas não ocorre a produção dos metabólitos bioativos.

Valores de pH alcalinos são comparáveis entre algumas espécies de *Streptomyces* para produção de antimicrobianos contra bactérias, fungos e leveduras como relatado por Basilio et al. (2003).

Para o meio MPE os halos de inibição foram menores em comparação aos obtidos para meio M1. Estes meios possuem como fonte de carbono glicose e de nitrogênio a farinha de soja em diferentes percentuais, segundo Cunha et al. (2009) a baixa atividade antimicrobiana no meio de cultura pode estar relacionada com a alta concentração da fonte de carbono. A este respeito Zhu et al. (2007) ao estudarem os efeitos da concentração de glicose na biossíntese de avilamicina, produzida pelo *Streptomyces viridochromogenes*, observaram que elevadas concentrações da fonte

de carbono levou à ausência na produção de precursores antimicrobianos. Resultado semelhante foi obtido por Zhang et al. (2012) ao constatarem que aumentando a concentração de glicose no meio fermentativo suprimiu a biossíntese de substâncias ativas produzidas pelo *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. O excesso nutricional no metabolismo celular das actinobactérias é dirigido para a produção de massa celular em vez da produção de metabólitos secundários como enfatizado por Reddy et al. (2011).

Os resultados obtidos indicam a dependência da produção dos compostos antimicrobianos sobre os constituintes do meio de cultura. Kumar e Kannabiran (2010), Al-Askar e Conti et al. (2012), afirmam que na produção de metabólitos secundários, a interação entre metabolismo de crescimento e a biossíntese do produto pode ser extremamente influenciada pelas condições de cultivo oferecidas, portanto é necessário a otimização destas condições com relação à fonte de carbono e nitrogênio, sais, pH, temperatura e tempo de fermentação.

3.2. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana realizada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição mostrou que os extratos acetoetílico do líquido metabólico (EBLM) e metanólico da biomassa (EBB), apresentaram atividade inibitória em concentrações diferentes frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bactéria álcool ácido resistente, fungo filamentoso e leveduras (Tabela 1).

O extrato EBLM apresentou efeitos antagônicos menores para os micro-organismos *B. subtilis* (15,62 µg/mL), *M. luteus* (7,8 µg/mL) e *M. smegmatis* (15,62 µg/mL) em comparação aos valores obtidos para o extrato EBB. Para CMI frente a fungo filamentoso e leveduras, os extratos apresentaram valores semelhantes na avaliação do efeito inibitório, variando de 15,62 a 250 µg/mL.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana (CMI) dos extratos da biomassa (EBB) e do líquido metabólico (EBLM) de *Streptomyces* sp UFPEDA 3345 em µg/mL.

	EBB		EBLM		Padrão	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Micro-organismos	(µg/mL)					
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	125	500	500	>1000	0,015	0,030
<i>S. aureus</i> UFPEDA 663*	125	1000	500	>1000	0,250	1
<i>S. aureus</i> ORSA UFPEDA 700*	250	1000	500	>1000	256	512
<i>S. aureus</i> UFPEDA ORSA 709*	250	>1000	500	1000	256	512
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	500	>1000	15,62	31,25	<0,03	0,040
<i>M. luteus</i> UFPEDA 100	125	500	7,81	15,62	0,008	0,156
<i>E. faecalis</i> UFPEDA 138	500	1000	250	>1000	1	4
<i>E. coli</i> UFPEDA 224	250	1000	500	1000	0,031	0,063
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA 396	250	1000	250	1000	1	2
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 416	125	1000	125	500	1	4
<i>M. smegmatis</i> UFPEDA 71	125	1000	15,62	62,5	0,002	0,004
<i>C. krusei</i> UFPEDA 1002	250	500	250	1000	2	4
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	15,62	250	62,5	125	2	4
<i>M. furfur</i> UFPEDA 1320	125	500	125	250	2	8
<i>A. niger</i> UFPEDA 2003	250	1000	250	1000	2	4

* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da UFPE. CMI: Concentração Mínima Inibitória. CMB: Concentração Mínima Bactericida. Padrões: *S. aureus*, *S. aureus* 663, *S. aureus* 700, *S. aureus* 709 – Oxacilina; *B. subtilis*, *M. luteus* – Vancomicina; *E. faecalis* – Teicoplanina; *E. coli*, *K. pneumoniae* – Ciprofloxacina; *P. aeruginosa* – Polimixina B; *M. smegmatis* – Rifampicina; *C. krusei*, *C. albicans*, *M. furfur*, *A. niger* – Anfotericina B.

Os resultados corroboram com estudos realizados por Atta et al. (2012) ao isolar o antibiótico natamicina da fermentação do *Streptomyces lydicus* com atividade frente aos micro-organismos: *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*. Arasu et al. (2009) ao testar o extrato acetotílico do líquido metabólico produzido pelo *Streptomyces spp.* ERI-3 obteve valores de CMI para *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. albicans* de 1, 0,25 e 500 µg/mL, respectivamente. Valores maiores foram apresentados por extratos acetotílicos do líquido metabólico de várias actinobactérias isoladas do solo da região do Monte Everest, com CMI de 1000 µg/mL frente à *S. aureus* (Gurung et al., 2009).

A atividade antagônica frente a *C. albicans* está de acordo com dados reportados por Bachiega et al. (2005), Atta et al. (2011) e Oliveira et al. (2013) ao utilizarem extratos obtidos da fermentação de *Streptomyces* para determinação da ação inibitória.

3.3. Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada conforme preconiza o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) (Skehan et al., 1990). Os resultados obtidos através do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos EBLM e EBB na concentração de 50µg/mL estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos EBLM e EBB frente a linhagens tumorais testados na dose única de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	Linhagens Celulares (IC%)		
	HEp-2	HT-29	NCI-H292
EBLM	93,0 ± 1,3	80,8 ± 0,3	86,78 ± 0,1
EBB	81,4 ± 0,6	88,4 ± 2,1	37,31 ± 5,8
Doxorrubicina	80,08 ± 0,5	-	85,67 ± 2,0

EBB: Extrato metanólico da biomassa; EBLM: Extrato acetoetílico do líquido metabólico. HEp-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe), NCI-H292 (células de carcinoma de pulmão) e HT-29 (células de carcinoma de cólon). Os dados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

Analisando os resultados dos ensaios separadamente, foi possível observar que os extratos obtidos por fermentação em cultivo submerso apresentaram atividade citotóxica com valores entre 37 e 93%. O extrato EBLM apresentou uma elevada citotoxicidade, com inibição de crescimento frente às três linhagens testadas com valores entre 80 e 93%. Para o extrato EBB a atividade citotóxica foi baixa frente à linhagem NCI-H292 (37%), enquanto para as demais linhagens o efeito citotóxico obtido foi considerado alto com inibição de crescimento de 80%.

Pesquisas recentes envolvem o estudo da citotoxicidade de compostos bioativos isolados de micro-organismo, em especial por actinobactérias como relatado por Ravikumar et al. (2012), extratos acetoetílico dos *Streptomyces* sp. ACT01 e ACT02 isolados de sedimentos marinhos com atividade citotóxica frente a duas linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), com valores de IC₅₀ entre 10,13 e 22,34 µg/mL. Estando de acordo com os dados apresentados por Shaaban et al. (2011) para as mesmas linhagens ao testar o composto landomicinas A-D, produzida pelo *Streptomyces cyanogenus*.

Resultados similares são reportados por diversos autores para substâncias isoladas a partir de fermentações de *Streptomyces* com atividade biológica antitumoral como: 24-dimetil-bafilomicina A2 produzida pelo endofítico *Streptomyces* sp. CS (Lu e Shen, 2004), pterocidina/*Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451 (Igarashi et al., 2006), resistoflavine/*Streptomyces chibaensis* AUBN₁/7 (Gorajana et al., 2007), lansai B e C / *Streptomyces* sp. SUC 1 (Tuntiwachwuttikul et al., 2008) e oligomicina A/*Streptomyces avermetilis* (Lin et al., 2009).

O ensaio citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade de uma amostra, mas não o mecanismo de ação (Berridge et al., 1996), a avaliação da citotoxicidade é passo importante no desenvolvimento de novos fármacos com indicação para a aplicação clínica (Saurav e Kannabiram, 2011). O câncer representa a segunda causa de morte da população mundial, mesmo diante de todo o arsenal de fármacos anticâncer disponíveis na terapêutica. A toxicidade dos agentes quimioterápicos afetam todos os tecidos normais, produzindo os conhecidos efeitos colaterais como nefrotoxicidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxico com mecanismos de ação diferentes.

3.4. Avaliação do Potencial Hemolítico em Eritrócitos de Camundongos

A avaliação do potencial hemolítico realizado para os extratos acetoetílico do líquido metabólico (EBLM) e metanólico da biomassa (EBB) visou avaliar o potencial da amostra em causar lesões na membrana plasmática das células, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Os extratos apresentaram concentração efetiva $CE_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$, não promovendo danos à membrana eritrocitária. Segundo Kalaivani et al. (2011) são considerados ativos (potencialmente lesivos à membrana) valores de $CE_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$.

A atividade citotóxica e avaliação do potencial hemolítico foram verificadas por Saurav e Kannabiran (2011) para substância [5(2,4-dimetilbenzil)pirrolidin-2-ona] isolada do *Streptomyces* VITSVK5 spp. que apresentou citotoxicidade para as linhagens HEP-2 (carcinoma de laringe) e Hep G2 (carcinoma hepatocelular) com valores de IC_{50} de 2,8 e 8,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, a substância em teste não causou hemólise na membrana eritrocitária.

A ausência da atividade hemolítica em eritrócitos sugere que a citotoxicidade dos extratos em estudo (EBLM e EBB) não está relacionada ao dano da membrana.

3.5. Toxicidade Aguda em Camundongos

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (protocolo número 23076.052281/2012- 40). A toxicidade aguda tem por objetivo determinar as reações adversas em curto prazo após administração de uma dose única ou doses múltiplas de um composto, bem como o binômio dose-efeito letal (Bastos et al., 2011).

As Tabelas 3 e 4 apresentam os dados obtidos no ensaio de toxicidade aguda (2.000 mg/kg por via oral) para o extrato metanólico da biomassa (EBB). O tratamento dos animais com o extrato metanólico da biomassa não resultou em morte dos mesmos bem como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratado e controle com relação ao peso corporal, peso dos órgãos, consumo de água e ração, o que sugere que as substâncias ativas não induziram a supressão do apetite.

Tabela 3. Efeito do extrato metanólico da biomassa (2.000 mg/kg via oral) sobre o peso corporal de camundongos e o consumo de ração e água, 14 dias após única administração.

Grupo	Peso animal (g)		Consumo Ração (g)	Consumo Água (mL)
	Inicial	Final		
Controle	22,7 ± 0,9	27,5 ± 1,1	6,3 ± 0,4	11,7 ± 1,3
Tratado	22,2 ± 1,4	28,5 ± 0,2	5,8 ± 0,5	12,6 ± 0,8

Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 animais.

Tabela 4. Efeito do extrato metanólico da biomassa (2.000 mg/kg via oral) sobre o peso dos órgãos dos camundongos, 14 dias após única administração.

Grupo	Índice dos órgãos (mg/g)		
	Baço	Fígado	Rim
Controle	0,165 ± 0,003	1,850 ± 0,010	0,195 ± 0,005
Tratado	0,169 ± 0,006	1,809 ± 0,027	0,186 ± 0,012

Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 animais.

Após a administração oral do extrato os animais não apresentaram efeitos tóxicos e nem sinais visíveis de toxicidade sistêmica. A análise hematológica não apresentou diferenças significativas com relação aos parâmetros analisados: leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócritos, plaquetas, hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). De acordo com as orientações da OCDE (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) para o teste de substâncias químicas, os resultados indicam que a amostra testada não provocou toxicidade aguda.

Dados idênticos foram observados após administração da dose 2.000 mg/kg do extrato metanólico com atividade antifúngica, produzido pelo *Streptomyces hygroscopicus* BS-112, concluindo que tais substâncias apresentavam uma baixa solubilidade e uma baixa toxicidade (Zhang et al., 2012).

Os endófitos são vistos como uma excelente fonte de produtos naturais para descoberta de uma variedade de substâncias bioativas com aplicações na medicina, indústrias e agricultura (Gunatilaka, 2006). Apesar de 60% dos medicamentos utilizados nos dias atuais terem sua origem relacionada a uma fonte natural, ainda existe um potencial extraordinário para serem descobertos de novos compostos em função da existência de um grande número de espécies disponíveis para investigação (Costa-Lotufo et al., 2010).

Os resultados deste trabalho mostraram que o endofítico *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 isolado de folhas da planta medicinal *Momordica charantia* L. têm potencial para produção de compostos bioativos, pesquisas futuras serão desenvolvidas com a finalidade de isolar as substâncias responsáveis por sua atividade antimicrobiana e citotóxica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

4. Referências

- Al-Askar, A.A., 2012. Microbiological studies on the *in vitro* inhibitory effect of *Streptomyces collinus albescens* against some phytopathogenic fungi. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 3277-3283.
- Arasu, M.V., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S., 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Mycol. Med.* 12, 22-28.
- Atta, H.M., Haroun, B.M., Khalifa, M.A., 2011. Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 247-255.
- Atta, H.M., El-Sayed, A.S., El-Desoukey, M.A., Hassan, M., El-Gazar, M., 2012. Biochemical studies on the natamicina antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: fermentation, extraction and biological activities. *J. Saudi Chem. Soc.*, 1-12.
- Bachiega, G.L., Vilegas, W., Ujikawa, K., 2005. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 26, 29-37.
- Ballav S., Dastager S.G., Kerkar, S., 2012. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. *Recent Res Sci Technol.* 4, 31-39.
- Basilio, A., Gonzalez, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Cabello, A., Gonzalez, A., 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.* 95, 814-823.

- Bastos, I.V.G.A., Silva, G.K.C., Rodrigues, G.C.R., Melo, C.M., Xavier, H.S., Souza, I.A., 2011. Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. Rev. Bras. Farm. 92, 219-222.
- Bash, D.W., Gabardi, S., Ulbricht, C., 2003. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. ASHP. 65, 356-359.
- Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D., Wang, R., 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. Biochemica. 4, 14-19.
- Clardy, J., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2006. New antibiotics from bacterial natural products. Nat. Biotechnol. 24, 1541 – 1550.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI.
- Conti, R., Cunha, I.G.B., Siqueira, V.M., Motta, C.M.S., Amorim, E.L.C., Araújo, J.M., 2012. Endophytic microorganisms from leaves of *Spermacoce verticillata* (L.): Diversity and antimicrobial activity. JAPS. 2, 017-022.
- Costa-Lotufo, L.V., Montenegro, R.C., Alves, A.P.N.N., Madeira, S.V.F., Pessoa, C., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O., 2010. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Rev. Virtual Quim. 2, 47-58.
- Cunha, I.G.B., Sobrinho, T.J.S., Silva, R.E.A., Amorim, E.L.C., Araújo, M.J., 2009. Influence of culture media on the production bioactive metabolites by endophytic *Streptomyces* sp. EBR49-UFPEA. Rev. Bras. Farm. 90, 120-123.
- Demain, A.L.; Sanchez, S., 2009. Microbial drug Discovery: 80 years of progress. J. Antibiot. 62, 5-16.
- Dermarderosian, A., Beutler, J.A., 2005. The Review of Natural Products. 4 Ed. Ed. St. Louis, Missouri: Factos & Comparisons.
- Gorajana, A., Venkatesan, M., Vinjamuri, S., Bapiraju, V.V.S.N.K., Peela, S., Juangam, P., Poluri, E., Zeeck, A., 2007. Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN 1/7. Microbiol. Res. 162, 322-327.
- Guimarães, D.O., Momesso, L. S., Pupo, M. T., 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Quim. Nova. 33, 667-679.
- Gunatilaka, A.A.L., 2006. Natural products from plant – associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. J. Nat. Prod. 69, 509-526.

- Gurung, T.D., Sherpa, C., Agrawal, V.P., Lekhak, B., 2009. Isolation and characterization of antibacterial actinomycetes from soil samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. Nep. JOL. 10, 173-182.
- Huang, X.L., Zhuang, L., Lin, H.P., Goodfellow, M., Hong, K., 2012. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous actinobacteria from tropical medicinal plants. AJB. 11, 9855-9864.
- Igarashi, Y., Miura, S., Fujita, T., Furumai, T., 2006. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. J. Antibiot. 59, 193–195.
- Kalaivani, T., Rajasekaran, C., Suthindhiran, K., Mathew, L., 2011. Free radical scavenging, cytotoxic and hemolytic activities from leaves of *Acacia nilotica* (L.) ex. Delile subsp. Indica (Benth.) Brenan. Evid-Based Complement. Alternat. Med., 1-8.
- Kumar, S., Kannabiran, K., 2010. Antifungal activity of *Streptomyces* VITSVK5 spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. J. Mycol Medic. 20, 101-107.
- Lin, X., Wen, Y., Li, M., Chen, Z., 2009. A new strain of *Streptomyces avermitilis* produces high yield of oligomycin A with potent anti-tumor activity on human cancer cell lines in vitro. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 839-845.
- Lu, C.H., Shen, Y.M., 2004. Two new macrolides produced by *Streptomyces* sp. CS. J. Antibiot. 57, 597–600.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55-63.
- Nett, M., Ikeda, H., Moore, B. S., 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. Nat. Prod. Rep. 26, 1362-1384.
- Neuman, D.J., Cragg, G.M., 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. J. Nat. Prod. 70, 461-477.
- Oliveira, T.L., Lima, E.O., Lianza, M.C.S., Fernandes, H.M.B., Filho, A.A.O., Souza, I.A., 2013. Atividade antifúngica de extratos isolados de *Streptomyces* spp. obtidos em solos paraibanos contra leveduras do gênero *Candida* spp. Biofar, Rev. Biol. Farm. 9, 34-41.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dionísio, A.P., Júnior, M.R.M., Pastore, G.M., 2011. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. Biotechnol. Res. Int., 1-11.
- Procópio, R.E.L., Silva, I.R., Martins, M.K., Azevedo, J.L., Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. Braz. J. Infect. Dis. 16, 466-471.
- Raja, A., Pravakarana, P., 2011. Actinomycetes and drugs-an overview. Am. J. Drug Discov. Dev. 1, 75-84.

- Raman, A., Lau, C., 1996. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*. 2, 349-362.
- Ravikumar, S., Fredimoses, M., Gnanadesigan, M., 2012. Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 92-96.
- Reddy, N.G., Ramakrishna, D.P.N., Rajagopal, S.V., 2011. Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites. *Egypt. J. Biol.* 13, 21-29.
- Shaaban, K.A., Srinivasan, S., Kumar, R., Damodaran, C., Rohr, J., 2011. Landomycins P-W, cytotoxic angucycline from *Streptomyces cyanogenus* S-136. *J. Nat. Prod.* 74, 2-11.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Aust, H.J., Römmert, A.K., Krohn, K., 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106, 996-1004.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bodesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 1107-1112.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J., 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67, 257-268.
- Takur, D., Yadav, A., Gogoi, B.K., Bora, T.C., 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Mycol. Med.* 17, 242-249.
- Tuntiwachwuttikul, P., Taechowisan, T., Wanbanjob, A., Thadaniti, S., Taylor, W.C., 2008. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp SUC1. *Tetrahedron*. 64, 7583-7686.
- Ventura, M., Canchaya, C., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., Sinderen, D., 2007. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71, 495-548.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V., 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microb. Biot.* 20, 265-272.
- Zhang, M., Hettiarachchy, N.S., Horax, R., Chen, P., Over, K.F., 2009. Effect of maturity stages and drying methods on the retention of selected nutrients and phytochemicals in Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) leaf. *J. Food Sci.* 74, 441-448.
- Zhang, N., Qin, Z., Duan, H., Xie, Y., Yu, J., Lu, C., Liu, X., 2012. Optimization of medium composition for production of antifungal active substance from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. *AJMR.* 6, 71-80.

Zhu, C., Lu, F.P., He, Y.N., Han, Z.L., Du, L.X., 2001. Regulation of avilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effects of glucose, ammonium ion, and inorganic phosphate. Appl. Microbial. Biotech. 73, 1031-1038.

Avaliação química e bioatividade de compostos produzidos por actinobactéria de *Momordica charantia* L.

Artigo II a ser submetido ao periódico Molecules



Avaliação química e bioatividade de compostos produzidos por actinobactéria de *Momordica charantia* L.

Janaína Gonçalves da Silva Melo¹, Valmir Félix de Lima⁵, Antônio Fernando Moraes de Oliveira², Gardênia Carmen Gadelha Militão³, Telma Leda Gomes de Lemos⁴, Teresinha Gonçalves da Silva¹, Janete Magali de Araújo¹, Sebastião José de Melo^{1*}.

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

² Departamento de Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

⁴ Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60451-970, CE, Brasil.

⁵ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

*Autor para Correspondência: Sebastião José de Melo. Tel: + 55 81 2126 8346.

E-mail: melosebastiao@yahoo.com.br

Resumo:

O extrato metanólico da biomassa obtido através da fermentação do *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 endofítico isolado de *Momordica charantia* L. foi fracionado através de cromatografia em coluna. As frações foram submetidas à prospecção de classes de compostos orgânicos e a determinação das atividades antimicrobiana através da concentração mínima inibitória e da atividade citotóxica pelo ensaio do MTT. Açúcares redutores, compostos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteróides estavam presentes nas amostras. A fração F4 e a subfração C1 apresentaram valores de CMI variando de 125 a 500 µg/mL para bactérias Gram-positivas e valores entre 62,5 a 125 µg/mL para fungo, leveduras e bactéria álcool ácido resistente. Uma atividade citotóxica considerada alta foi obtida para a fração F4 com 92,6% frente à linhagem HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe), as demais frações e a subfração C1 apresentaram uma inibição de crescimento celular entre 17 e 41% frente às linhagens testadas.

Palavras-chaves: *Momordica charantia* L.; *Streptomyces* sp.; classes de compostos orgânicos; atividade biológica.

1. Introdução

O uso de plantas com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana. No Brasil, as informações sobre plantas utilizadas com fins medicinais têm sua história ligada à cultura dos povos indígenas e dos africanos trazidos como escravos [1]. Os produtos naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico [2]. Os micro-organismos endofíticos habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro apresentam-se como uma fonte promissora na descoberta de novas biomoléculas [3].

Momordica charantia L. é uma planta trepadeira encontrada em países como Ásia, África, América do Sul e Índia. Pertencente à família Cucurbitaceae que historicamente é uma das mais importantes entre as plantas utilizadas para a produção de alimentos, fibras e fitoterápicos [4]. No Brasil é conhecida popularmente como Melão de São Caetano, melãozinho ou erva de lavadeira, planta daninha bastante freqüente em pomares, hortas, cafezais e terrenos baldios. Propriedades farmacológicas comprovadas cientificamente tais como: antimalárica, hipoglicemiante, antimicrobiana, antihelmíntica, anti-ulcerogênica, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante são descritas na literatura [5,6].

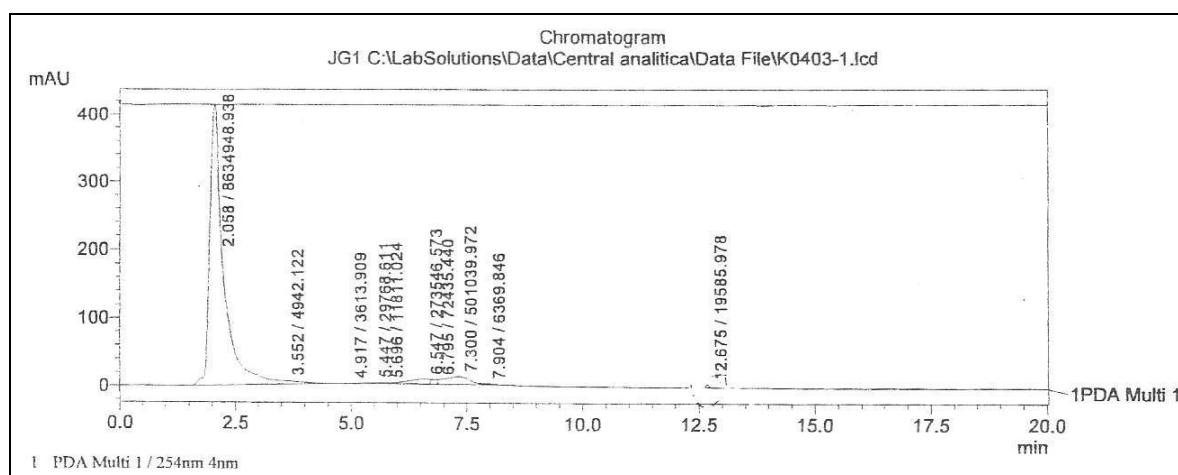
Constituintes químicos das classes de glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos essenciais, triterpenos, esteróides, proteínas, além de vitamina C, fósforo e ferro, foram encontrados em diversos extratos de *M. charantia* L. [7]. Inúmeras substâncias foram isoladas de diferentes partes deste vegetal como os triterpenos pentacíclicos (momordicina, momordicinina e momordicilina), alcoóis (momordol, momordenol, momordolol), ácidos (galacturônico, láurico, gentísico, oleanólico, oléico, oxálico), esteróide charantina, proteínas (α e β -momorcharinas) e polipeptídeos P e K com estrutura química semelhante à insulina humana [8-11].

O objetivo do presente estudo foi o fracionamento e análise preliminar dos constituintes químicos presentes no extrato metanólico da biomassa originado da fermentação de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 endofítico de *Momordica charantia* L., e suas atividades biológicas.

2. Resultados e Discussão

2.1. Fracionamento

A fim de se avaliar químico e biologicamente os metabólitos do extrato bruto da biomassa (EBB), da fração F4 e de substâncias puras obtidas de F4, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme cromatograma (Figura 1). O procedimento apesar de conduzir a um bom estágio de isolamento não permitiu a obtenção de material puro, portanto apresentando-se como subfrações. O cromatograma apresentou três picos majoritários denominados subfrações C1, C2 e C3 com respectivos tempos de retenção e área (%) (figura 1). A subfração C1 por ser a única a apresentar uma amplitude considerável, foi selecionada para o pretendido estudo de prospecção de classes de compostos orgânicos e avaliação de atividades biológicas.



Tempo de Retenção (min.)	Área (%)	Subfração
2.058	90,342	C1
6.547	2,862	C2
7.300	5,242	C3

Figura 1. Cromatograma da CLAE para fração F4, obtida após fracionamento do extrato metanólico da biomassa (EBB).

2.2. Prospecção das Classes de Compostos Orgânicos

A prospecção das classes de compostos orgânicos dos metabólitos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 em cromatografia em camada delgada para o extrato metanólico (EBB), fração F4 e subfração C1 apresentaram como resultados a presença de açúcares redutores, compostos fenólicos, mono/sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, conforme tabela 1. Nas condições cromatográficas empregadas não foram detectadas as presenças de alcalóides, iridoídes, proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e saponósidos.

Tabela 1. Prospecção das classes de compostos orgânicos por cromatografia em camada delgada do extrato metanólico da biomassa (EBB), fração F4 e subfração C1.

Classes	EBB	F4	C1
Açúcares Redutores	+	+	+
Alcalóides	-	-	-
Iridoídes	-	-	-
Mono/Sesquiterpenos	+	+	+
Compostos fenólicos	+	+	-
Proantocianidina	-	-	-
Saponósidos	-	-	-
Taninos Hidrolisáveis	-	-	-
Triterpenos/Esteróides	+	+	+

(+) Presença; (-) Ausência; EBB (Extrato Metanólico da Biomassa); F4 (Fração 4), C1 (Subfração C1)

2.3. Atividade Antimicrobiana (CMI)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração da amostra testada que inibiu o crescimento do micro-organismo utilizado no teste e a concentração

mínima bactericida (CMB) como a menor concentração da amostra que impediu o micro-organismo teste. Os resultados obtidos para os valores de CMI e CMB estão na tabela 2.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para a fração F4 e subfração C1 em µg/mL.

Micro-organismos	F4		C1		Padrão	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	(µg/mL)					
<i>S. aureus</i> UFPEDA 02	250	500	250	500	0,015	0,030
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 86	250	500	250	500	< 0,03	0,004
<i>M. luteus</i> UFPEDA 100	250	> 500	250	500	0,008	0,156
<i>K. pneumoniae</i> UFPEDA 396	125	500	125	500	1	2
<i>P. aeruginosa</i> UFPEDA 416	125	250	125	250	1	4
<i>C. krusei</i> UFPEDA 1002	125	500	125	500	2	4
<i>C. albicans</i> UFPEDA 1007	62,5	125	62,5	125	2	4
<i>A. niger</i> UFPEDA 2003	62,5	125	62,5	125	2	4
<i>M. smegmatis</i> UFPEDA 71	62,5	125	62,5	250	0,002	0,004

Padrão: *S. aureus* – Oxacilina; *B. subtilis* e *M. luteus* – Vancomicina; *K. pneumoniae* – Ciprofloxacino; *P. aeruginosa* – Polimixina B; *M. smegmatis* – Rifampicina; *C. albicans*, *C. krusei* e *A. niger* – Anfotericina B.

As amostras fração F4 e subfração C1 apresentaram atividade inibitória em concentrações semelhantes variando de 125 a >500 µg/mL para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Para CMI frente aos micro-organismos *C. albicans*, *A. niger* e *M. smegmatis*, as amostras testadas apresentaram um perfil de concentração mínima inibitória de 62,5 µg/mL e de concentração mínima bactericida de 125 e 250 µg/mL. De acordo com os resultados obtidos, os metabólitos bioativos presentes nas amostras demonstram uma susceptibilidade maior para fungo, levedura e bactéria álcool ácido resistente.

2.4. Ensaio Citotóxico

O resultado da atividade citotóxica das frações F4, F5, F6 e da subfração C1 frente a três linhagens tumorais humanas são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para a fração F4 e subfração C1 em µg/mL.

Amostras	Linhagens Celulares (IC%)		
	HEp-2	HT-29	MCF-7
Fração F4	92,6 ± 0,6	68,8 ± 2,5	30,8 ± 3,22
Fração F5	17,5 ± 2,3	24,4 ± 1,6	19,6 ± 1,31
Fração F6	23,2 ± 1,9	33,6 ± 3,9	39,8 ± 0,24
Subfração C1	22,9 ± 3,6	41,2 ± 8,4	-
Doxorrubicina	80,08 ± 0,5	-	62,2 ± 0,72

(-) Ausência de atividade. HEp-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe), HT-29 (células de carcinoma de cólon) e MCF-7 (células de carcinoma de mama). Os dados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

A fração F4 apresentou uma alta citotoxicidade frente à linhagem HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe) com inibição de crescimento de 92,6%, atividade moderada para a linhagem HT-29 (carcinoma de cólon, 68,8%) e baixa para MCF-7 (carcinoma de mama) com 30,8% de inibição. As demais frações apresentaram percentuais que variaram entre 17 a 39%. Para a subfração C1 os valores obtidos frente às linhagens HEp-2 e HT-29 foram 22,9 e 41,2%, respectivamente. Não foi observada nenhuma atividade citotóxica da subfração C1 para a linhagem MCF-7.

3. Experimental

3.1. *Micro-organismo*

A linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 foi isolada de folhas da planta medicinal *Momordica charantia* L. e encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos - UFPEDA do Departamento de Antibióticos.

3.2. *Fermentação*

O *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 foi cultivado em meio ISP-2 líquido (extrato de levedura 4 g, extrato de malte 10 g, glicose 4 g, pH 7,2), sob agitação de 180 rpm a 30 °C por 48 horas. Em seguida foram transferidos 50 mL do pré-inóculo para Fernembach com 500 mL do meio M1 (glicose 10 g/L; farinha de soja 10 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; carbonato de cálcio 1 g/L, pH 7,0). A fermentação foi conduzida em pH alcalino, durante 72 horas em shaker rotatório a 30°C.

3.3. *Extração e Fracionamento*

A fermentação total (4 L) foi submetida à centrifugação (10.000 rpm/2 minutos), a massa micelial (788,42 g) foi extraída com o solvente metanol. Após concentração da solução extrativa, em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a uma temperatura de 40 °C, obtiveram-se 14,8681g .do extrato metanólico da biomassa (EBB). Oito gramas do extrato metanólico da biomassa (EBB) foram cromatografados em coluna com sílica gel (0,063 – 0,2 mm/70 – 230 mesh ASTM) empacotada e eluída inicialmente com metanol, obtendo-se 16 frações (F1-F16), em seguida com metanol:água (1:1), obtendo-se 6 frações (F17-F22). As frações foram analisadas comparativamente por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando-se como eluente (ácido acético/ácido fórmico/acetato de etila/água (100:11:11:26), seguida da revelação dos compostos por pulverização com anisaldeído [12]. Ao final foram reunidas as frações cromatograficamente semelhantes.

A fração F4 (0,4131 g) foi submetida à uma análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna analítica C-18 [base sílica derivatizada com grupo octil – 4,6

mm/250, partícula de 10 μ , poro de 100 Å de diâmetro - NUCLEOSIL], fluxo 1,0 mL/min.: eluição no modo isocrático MeOH:H₂O (1;1), detector UV 254 nm.

3.4. *Prospecção das Classes de Compostos Orgânicos*

Aliquotas de 10 μ L das amostras (EBB, F4 e C1) foram aplicadas em cromatoplaças para a análise da presença das seguintes classes de compostos orgânicos: alcalóides, açúcares redutores, compostos fenólicos, iridóides, mono/sesquiterpenos, triterpenos/esteróides, proantocianidinas, taninos hidrolizáveis e saponósidos. Diversos sistemas eluentes e reveladores adequados foram utilizados conforme tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas da prospecção de classes de compostos orgânicos produzidas por *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345.

Classes	Eluente	Revelador	Referência
Alcalóides	A	Dragendorff	Wagner e Bladt, 1996
Açúcares redutores	A-B-T	TTZ	Metz, 1961 [13]
Iridóides	A	Vanilina	Harbone, 1998 [14]
Compostos fenólicos	A	UV – NEU	Wagner e Bladt, 1996
Proantocianidinas	A-A-A-A	Vanilina Clorídrica	Robertson, 1996 [15]
Taninos Hidrolisáveis	T-E-A	UV – NEU	Harbone, 1998
Mono/Sesquiterpenos	T-A (3%)	Vanilina Sulfúrica	Wagner e Bladt, 1996 Sharma e Dawra, 1991
Triterpenos/Esteróides	T-A (10%)	Liebermann-Burchard	[16]
Saponósidos	A	Anisaldeído	Wagner e Bladt, 1996

A: Ácido acético/ Ácido fórmico/ Acetato de etila/ Água (100:11:11:26); **T-E-A:** Tolueno/ Et₂O (1:1: Sat ACOH 10%); **T-A (3%):** Tolueno/ Acetato de etila (97:3); **T-A (10%):** Tolueno/ Acetato de etila (90:10) **A-B-T:** Acetona/ n-Butanol/ Tampão fosfato pH 5,0 (5:4:1); **NEU:** Solução 1% de difenilboriloxietilamina em MeOH; **UV:** Ultravioleta 365 nm; **TTZ:** Cloreto de trifeniltatrazólico (4% em MeOH).

3.5. *Micro-organismos Testes*

Três bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Micrococcus luteus* UFPEDA 100. Bactérias Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416. Fungo filamentoso: *Aspergillus niger* UFPEDA 2003 e leveduras: *Candida albicans* UFPEDA 1007 e *Candida krusei* UFPEDA 1002. Bactéria álcool ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71. Os micro-organismos utilizados pertencem à Coleção de Microrganismos-UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

3.6. Atividade Antimicrobiana

A concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) foram determinadas através da técnica de microdiluição em placas de 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* [17-18]. As amostras foram testadas em concentrações variando de 3,9 a 1000 µg/mL. Suspensões dos micro-organismos testes foram padronizadas pela turvação equivalente à 0,5 da escala de McFarland em água destilada estéril, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^7 UFC/mL para fungos filamentosos e leveduras. Após a inoculação as placas foram incubadas a 37 °C por 18-24 horas para bactérias e a 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungo filamento.

3.7. Atividade Citotóxica

A citotoxicidade das frações F4, F5, F6 e da subfração C1 foi determinada pelo método do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium] que tem a capacidade de analisar a viabilidade celular, sendo um método rápido e sensível [19]. As linhagens celulares HEp-2 (Carcinoma Epidermóide de Laringe), HT-29 (Carcinoma de Cólon) e MCF-7 (Carcinoma de mama) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, foram mantidas em DMEM (*Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100

U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 nM de L-glutamina. Uma suspensão de cada linhagem (2×10^5 células/poço) foi distribuída em microplacas de 96 poços, incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 24 horas. As amostras foram dissolvidas em DMSO e adicionadas em cada poço na concentração única de 50 µg/mL, como controle positivo foi utilizado doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida foi adicionado MTT (5 mg/mL), incubando-se as placas a 37 °C por 3 horas. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro de placa 540 nm após dissolução do precipitado em DMSO. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa Graph Pad Prism 5.0.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (de 50 a 75%) e com alta atividade (de 75 a 100%) [20].

4. Conclusão

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou que a linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 produziu metabólitos secundários com características inibitórias frente à micro-organismos patogênicos e a linhagens de células tumorais. Quimicamente apresentou as seguintes classes de compostos orgânicos: mono/sesquiterpenos, triterpenos, esteróides, compostos fenólicos e açúcares redutores.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

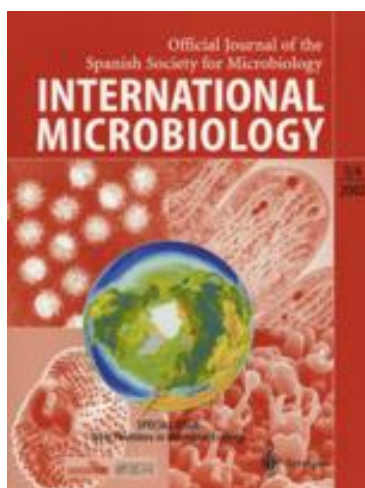
5. Referências

1. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 215 – 234.
2. Costa-Lotufo, L.V.; Montenegro, R.C.; Alves, A.P.N.N.; Madeira, S.V.F.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Virtual Quim.* **2010**, 2, 47-58.
3. Gimenez, C.; Cabrera, R.; Reina, M.; Gonzalez, C. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 707-720.
4. Dermarderosian, A.; Beutler, J.A.. *The Review of Natural Products*. 4 ed. St. Louis, Missouri: Factos & Comparisons, **2005**.
5. Braca, A.; Siciliano, T.; D'arrigo, M.; Germano, M.P. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. **2008**, 79, 123-125.
6. Kumar, D.S.; Sharathnath, K.V.; Yogeswaran, P.; Harani, A.; Sudhakar, K.; Sudha, P.; Banji, D. A medicinal potency of *Momordica charantia*. *IJPSR*. **2010**, 1, 2, 95-100.
7. Zhang, M.; Hettiarachchy, N.S.; Horax, R.; Chen, P.; Over, K.F. Effect of maturity stages and drying methods on the retention of selected nutrients and phytochemicals in Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) leaf. *J. Food Sci.* **2009**, 74, 6, 441-448.
8. Grover, J.K.; Yadav, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 93, 123–132.
9. Tan, M.J.; Ye, J.M.; Turner, N.; Hohnen-Behrens, C.; Ke, C.Q.; Tang, C.P.; Chen, T.; Weiss, H.C.; Gesing, E.R.; Rowland, A.; James, D.E.; Ye, Y. Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem. Biol.* **2008**, 15, 3, 263-273.
10. Miura, T.; Itoh, C.; Iwamoto, N.; Kato, M.; Kawai, M.; Park, S.R.; Suzuki, I. Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2001**, 47, 340–344.
11. Pitipanapong, J.; Chitprasert, S.; Goto, M.; Jiratchanyakul, W.; Sasaki, M.; Shotpruk, A. New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction. *Sep. Purif. Technol.* **2007**, 52, 3, 416-422.
12. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant drug analysis – Athin layer chromatography atlas*. Munich: Springer, 1996.
13. Metz, H. Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. *Naturwissenschaften*. **1961**, 48, 569-570.

14. Harbone, J. B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Nova York: Chapman and Hall, 1998.
15. Robertson, E.A.H.; Cartwright, R.A.; Oldschool, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. fraction and paper chromatography of water-soluble substances. *J. Sci. Food Agric.* **1956**, 8, 72-80.
16. Sharma, O.P.; Darwra, R.K. Thin layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. *J. Chromatogr.* **1991**, 567, 351-354.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi: Approved standard M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI. 2008.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI. 2010.
19. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55-63.
20. Fouche, G.; Cragg, G.M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N.; Maharaj, V.J.; Senabe, J. In vitro anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 119 (3), 455-461.

Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos produzidos por *Streptomyces* sp. no controle de fitopatógenos.

Artigo III a ser submetido ao periódico Internacional Microbiology



Avaliação do potencial antimicrobiano de extratos produzidos por *Streptomyces* sp. no controle de fitopatógenos.

Janaína Gonçalves da Silva Melo¹, Joselma Ferreira da Silva¹, Anderson José Paulo², Irailton Prazeres dos Santos³, Janete Magali de Araújo^{1*}, Sebastião José de Melo¹.

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, PE, Brasil.

² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

³ Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*Autor para Correspondência: Janaína G. da Silva Melo. Tel: + 55 81 9747 8010.

E-mail: bia_melo@yahoo.com.br

Resumo:

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico, sejam a partir plantas ou de micro-organismos. A necessidade de reduzir o consumo de agentes químicos como os fungicidas, em especial, daqueles que causam danos ao meio ambiente, às comunidades microbiológicas e ao próprio homem, têm levado ao aumento do interesse por estratégias de controle biológico. Uma alternativa a ser utilizada são os micro-organismos endofíticos, que são conhecidos por sua capacidade de sintetizar compostos biologicamente ativos. O *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 foi isolado de *Momordica charantia* L., planta medicinal que possui diversas propriedades farmacológicas comprovadas cientificamente. A atividade antimicrobiana dos extratos produzidos pela linhagem endofítica foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibitória, frente às cepas de bactérias e fungos fitopatogênicos. Os valores da CMI para os fungos variaram entre 125 a 500 µg/mL, enquanto para as bactérias a CMI apresentou valores entre 15,62 a 125 µg/mL.

Palavras-chaves: *Streptomyces* sp; atividade antimicrobiana; fitopatógenos.

1. Introdução

Os produtos naturais permanecem como a mais importante fonte para a descoberta de novas moléculas bioativas, sejam oriundos de plantas e/ou de micro-organismos. Têm sido crescentes as pesquisas em vários países vislumbrando a possibilidade de isolar substâncias menos tóxicas com potentes atividades farmacológicas, incluindo antibacteriana e antifúngica [4]. As substâncias antimicrobianas representam um dos maiores avanços dentro da microbiologia, pois são agentes que, efetivamente, condicionam os efeitos das espécies microbianas patogênicas, os quais são responsáveis pelas mais diversas patologias que podem afetar homem, animais e plantas [8].

Investigações e utilização de micro-organismos antagonistas a fitopatógenos, como agentes de controle biológico, constituem uma das principais alternativas de aplicação ao uso de métodos químicos no controle de fitodoenças [5,10,12].

Na agricultura são utilizados fungicidas químicos que causam severos efeitos negativos como o desenvolvimento de resistência dos patógenos, impactos ambientais, além de estarem associados a custos elevados [18,7]. O controle biológico pode ser realizado alterando as condições ambientais que possibilitam o aparecimento de pragas ou doenças utilizando micro-organismos com propriedades antagônicas aos patógenos [2].

Neste contexto, os micro-organismos endofíticos que habitam o interior dos tecidos e órgãos de diversas plantas sem causar danos a seu hospedeiro, proporcionam a produção de uma grande variedade de metabólitos bioativos oferecendo proteção para as plantas [14,15], e mostra que estas estratégias têm sido consideradas como uma ferramenta emergente no controle biológico. O uso combinado de controle biológico e químico utilizando micro-organismos endofíticos em associação com agentes químicos pode resultar em um efeito sinérgico sobre um ou vários agentes causadores de doenças e pragas [3].

Entre os micro-organismos endofíticos merece destaque o gênero *Streptomyces*, que compõem um importante grupo de actinobactérias conhecidas como um dos principais produtores de metabólitos secundários como: antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasíticos, além de várias enzimas [6].

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagônico dos extratos produzidos pelo *Streptomyces* sp. endofítico de *Momordica charantia* L. com atividade para bactérias e fungos fitopatogênicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. *Micro-organismo Endofítico*

A linhagem endofítica *Streptomyces* sp UFPEDA 3345 foi isolada de folhas da planta *Momordica charantia* L. e encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos - UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

2.2. *Obtenção dos Extratos*

A linhagem foi cultivada em placas de Petri com o meio ISP-4 ágar e incubada em estufa a 30 °C por 13 dias. Em seguida foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo o meio ISP-2 líquido sob agitação de 180 rpm a 30°C por 48 horas. Posteriormente foram transferidos 10% (v/v) do pré-inóculo para frascos de Erlenmeyer (500 mL) com 100 mL do meio M1 (glicose 10 g/L; farinha de soja 10 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; carbonato de cálcio 1 g/L, pH 7,0), cultivados sob as mesmas condições durante 72 horas. A fermentação foi conduzida à centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos, o líquido metabólico foi extraído com acetato de etila e a massa celular com metanol. Os respectivos extratos foram rotaevaporados sob pressão reduzida a 40 °C.

2.3. *Micro-organismos Teste*

Os fungos fitopatógenos utilizados foram: *Aspergillus flavus* (URM 6806), *Fusarium moniliforme* (URM 5411), *Fusarium oxysporum* (URM 6185), *Fusarium solani* (URM 6264), *Rhizopus stolonifer* (URM 6525) e *Verticillium leganii* (URM 6171) pertencentes à Coleção de Cultura Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. As bactérias foram: *Pectobacterium carotovorum* Subsp. *Carotovorum* (PCC), *Ralstonia solanacearum* (RSOL) e *Xantomonas campestris* Pv. *Viticola*

(XCV) cedidas pelo Laboratório de Fitossanidade do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.4. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços estéreis [9].

Foram distribuídos nos poços 100 µL de meio de cultura líquido (NYD para bactérias e BDA para fungos). De uma solução estoque das amostras a serem testadas na concentração de 2.000 µg/mL foi retirado 100 µL e adicionados nos poços, realizando o processo de microdiluição por transferência de 100 µL do primeiro poço para o seguinte e assim sucessivamente, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,8; 3,9 µg/mL).

Suspensões dos micro-organismos testes foram padronizadas na concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^7 UFC/mL para fungo filamentoso, correspondendo à turvação de 0,5 da escala de McFarland. Aliquotas de 10 µL dos inóculos correspondendo a cada cepa ensaiada foram adicionadas nos poços, exceto no correspondente ao controle de esterilidade do meio. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 48-72 horas para os fungos. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

A leitura e determinação da CIM dos extratos, sobre as cepas testes, foram realizadas através do método visual observando a formação ou não do aglomerado celular. Considerando assim a concentração mínima inibitória a menor concentração do produto em teste capaz de inibir o crescimento do micro-organismo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade Antimicrobiana

O potencial de inibição dos extratos do líquido metabólico (EBLM) e do metanólico da biomassa (EBB) frente a fungos e bactérias fitopatogênicas, obtidos no ensaio podem ser analisados na tabela 1.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana representada pelos valores da concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos da biomassa (EBB) e do líquido metabólico (EBLM) de *Streptomyces* sp UFPEDA 3345 em µg/mL.

Micro-organismos	EBLM	EBB
	CMI (µg/mL)	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> Subsp.		
<i>Carotovorum</i>	125	125
<i>Ralstonia solanacearum</i>	15,6	15,6
<i>Xantomonas campestris</i> Pv. <i>Vitacula</i>	62,5	125
<i>Aspergillus flavus</i>	125	250
<i>Fusarium moniliforme</i>	250	250
<i>Fusarium oxysporum</i>	250	125
<i>Fusarium solani</i>	125	250
<i>Rhizopus stolonifer</i>	125	500
<i>Verticillium leganii</i>	125	250

EBB: Extrato metanólico da biomassa; EBLM: Extrato acetoetílico do líquido metabólico. CMI: Concentração Mínima Inibitória.

De acordo com o observado as cepas de *Fusarium* foram inibidas por uma concentração variando de 125 a 250 µg/mL, enquanto *R. stolonifer*, *V. leganii* e *A. flavus* apresentaram valores de CMI iguais a 125 µg/mL para o extrato EBLM e valores de variando entre 250 e 500 µg/mL para o

extrato EBB. Frente à bactéria *P. carotovorum*, a CMI se deu à concentração de 125 µg/mL para ambos os extratos.

O extrato EBLM apresentou concentração de inibição de 62,5 µg/mL para *X. campestris*, enquanto o valor para extrato EBB foi de 125 µg/mL. Em condições *in vitro*, a efetividade antagonista dos extratos EBLM e EBB mostrou uma maior susceptibilidade para a cepa *R. solanacearum* com CMI de 15,625 µg/mL.

Os resultados corroboram com [1] que ao testarem a atividade antifúngica de metabólitos isolados da cultura de *Streptomyces lydicus*, obtiveram CMI de 31,25 µg/mL para *A. flavus* e *F. oxysporum*. Em estudo realizado por [4] linhagens de *Streptomyces* sp. foram ensaiadas frente a cepas de *Ralstonia solanacearum* apresentando resultados promissores. Resultados idênticos foram obtidos por [16] com extrato produzido por *Streptomyces viridis* MSL com inibição de crescimento para os micro-organismos fitopatogênicos: *X. campestris*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *V. alboatrum*.

Da cultura de *Streptomyces tanashiensis* A2D extraída com acetato de etila, foi isolada uma substância que parcialmente purificada mostrou atividade contra diversas espécies de agentes patogênicos, incluindo *F. moniliforme* com CMI de 100 µg/mL [13]. Dois compostos bottromicina A2 e dunaimicina D3S isolados do *Streptomyces bottropensis*, apresentaram atividade antagônica com valores de CMI entre 0,06 a 64 µg/mL para espécie de *X. oryzae* [11]. Recentemente, metabólitos secundários provenientes de *Streptomyces hygroscopicus* BS-112, apresentaram concentração mínima inibitória para *A. flavus* de 3,13 µg/mL e mínima fungicida de 6,25 µg/mL [17].

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos na pesquisa, pode-se concluir que os extratos acetoetílico do líquido metabólico (EBLM) e o metanólico da biomassa (EBB) foram eficazes com relação à

atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, possibilitando seu uso no controle de micro-organismos fitopatogênicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

5. Referências

1. Atta HM, El-Sayed AS, El-Desoukey MA, Hassan M, El-Gazar M (2012) Biochemical studies on the natamicina antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: fermentation, extraction and biological activities. Journal of Saudi Chemical Society. 1-12.
2. Azevedo JL, Serafini LA, Barros NM (2002) Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. 2ª ed. Ed. EDUCS: Caxias do Sul, pp 246.
3. Backman PA, Sikora RA (2008) Endophytes: an emerging tool for biological control. Biol. Control 46: 1-3.
4. Farias MAA, Lima EO, Pessanha TMAF, Silveira NFC, Souza AES (2009) Potencial antagônico de *Streptomyces* sp. no controle de fitopatógenos. Revista de Biologia e Farmácia 3: 124-129.
5. Igarashi M, Kinoshita N, Ikeda T, Kameda M, Hamada M, Takeuchi T (1997) Resoromicin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, Production, isolation and biological properties. The Journal of Antibiotics 50: 1020-1025.
6. Inbar E, Green SJ, Hadar Y, Minz D (2005) Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. Microb Ecol 50: 73-81.
7. Kumar D, Chand R, Prasad LC, Joshi AK (2007) A new technique for monoklonal culture of the most aggressive isolate in a given population of *Bipolaris sorokiniana*, cause of foliar spot blotch in wheat and barley. World J Microbiol Biotechnol 23: 1647-1651.

8. Lima EO (2002) Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica, p. 482-501. In: Yunes RA, Calixto JB Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó, Argros.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standard (2003) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved standard, 6th edn. NCCLS document M7-A6, Wayne.
10. Omura S, Enomoto Y, Shinose M, Takahashi Y, Iwai Y, Shiomi K (1999) Isolation and structure of a new antibiotic viridomycin F. produced by *Streptomyces* sp. K96-0188. The Journal of Antibiotics 52: 61-64.
11. Park SB, In-Ae L, Joo-Won S, Jeong-Gu K, Choong HL (2011) Screening and indentification of antimicrobial compounds from *Streptomyces bottropensis* suppressing rice bacterial blight. J Microbiol Biotechnol 21: 1236-1242.
12. Si D, Zhong D, Xu Q (2001) Two butylated aminoligosaccharides isolated from the culture filtrate of *Streptomyces luteogriseus*. Carboihydrate Research 355: 127-132.
13. Singh LS, Mazumder S, Bora TC (2009) Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. Journal de Mycologie Médicale 19: 225-233.
14. Strobel GA, Daisy B (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev. 67: 491-502.
15. Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural Product Reports 18: 448-459.
16. Vijayalakshmi M, Bindhu MRH (2011) Antimicrobial profile of *Streptomyces viridis* MSL isolated from laterite soils. Journal of Pharmacy Research 4: 2615-2618.
17. Zhang N, Qin Z, Duan H, Xie Y, Yu J, Lu C, Liu X (2012) Optimization of médium composition for production of antifungal active substance from *Streptomyces hygrosopicus* BS-112. African Journal of Microbiology Research. 6: 71-80.
18. Zhang Z, YUE, GY (1999) Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. Phytopathology 90: 384-389.

CONCLUSÕES

- ❖ As melhores condições para a produção dos metabólitos bioativos pela linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 3345 foram o cultivo submerso no meio de cultura M1 em pH alcalino, com 72 horas de fermentação;
- ❖ Os extratos acetoetílico do líquido metabólico (EBLM) e metanólico da biomassa (EBB) apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, bactéria álcool ácido-resistente, leveduras e fungos filamentosos fitopatogênicos;
- ❖ A concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos EBLM e EBB para bactérias e fungos fitopatogênicos apresentaram valores entre 15,62 a 500 µg/mL;
- ❖ A fração F4 e a subfração C1 apresentaram valores de CMI iguais de 62,5 µg/mL para *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Mycobacterium smegmatis*, enquanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas os valores variaram entre 125 a 500 µg/mL;
- ❖ A atividade citotóxica apresentou valores significativos para os extratos EBLM, EBB, frações F4-6 e para subfração C1 com percentual de inibição (IC%) variando entre 17 e 93% para as linhagens HEp-2, NCI-H292, MCF-7 e HT-29.
- ❖ Os extratos EBLM, EBB, as frações F4-6 e a subfração C1 não causaram danos à membrana eritrocitária de camundongos;
- ❖ Não foram observados efeitos tóxicos ou sinais visíveis de toxicidade sistêmica em camundongos para o extrato metanólico da biomassa (EBB), após a administração da dose de 2.000 mg/kg;
- ❖ A prospecção de compostos orgânicos mostrou a presença de açúcares redutores, mono/sesquiterpenos, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides no extrato acetoetílico, extrato metanólico, nas frações F4-6 e subfração C1;

ANEXOS 1 - Meios de cultura

ISP-2

Extrato de levedura 4g
 Extrato de malte 10g
 Glicose 4g
 Ágar 15g
 Água destilada..... 1000mL
 pH 7,2

ISP-4

Amido 20g
 K_2HPO_4 2g
 $CaCO_3$ 4g
 $NaCl$ 2g
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g
 $(NH_4)_2SO_4$ 2g
 Água destilada 1000mL
 pH 7,0 - 7,4

MPE

Farinha de soja 20g
 Glicose 20g
 $CaCO_3$ 2g
 $NaCl$ 5g
 Água destilada 1000mL
 pH 6,7 - 7,0

M1

Farinha de soja 10g
 Glicose 10g
 $CaCO_3$ 1g
 $NaCl$ 5g
 Água destilada 1000mL
 pH 7,0

ANEXO 2 – Resumos em anais de congressos





XXI ALAM

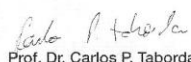
Congresso Latinoamericano
de Microbiologia

SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado AVALIAÇÃO "IN VITRO" DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO STREPTOMYCES SP UFPEDA 3345 com a autoria de: MELO, J.G.S., LIMA, S.M.A, SILVA, J.M, SILVA, G.R., ARAÚJO, J.M., MELO, S.J. foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

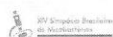

Prof. Dr. Carlos P. Taborda

Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia



Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Presidente do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia



Organização e realização



ANEXO 3 – Normas do Periódico Research Microbiology

Instructions for Authors

1. The contents of Research in Microbiology

Papers published in the journal include, but are not limited to, the following topics: Evolution, phylogeny, ecology and population dynamics, physiology and metabolism, regulation, genomics, mobile elements, viruses of prokaryotes, interactions between microbes, and beneficial or pathogenic interactions with other organisms.

The overriding criteria for publication are originality, high scientific quality, depth of analysis and up-to-date relevance. Papers should be written with a wide audience of microbiologists in mind. Purely descriptive papers, as well as those which do not report on significant advances in scientific research, are discouraged and may be rejected without review. Incomplete characterization of new bacterial strains, bacterial communities, enzymes or antimicrobial compounds, for instance, will not be considered. Papers dealing with methods and theoretical microbiology may be published if they are associated with significant novel approaches and/or results. Papers on host-pathogen interactions, virulence and disease fall within the scope of the journal only if they cover the biology of the microbes.

2. Types of papers

Currently, Research in Microbiology publishes the following types of papers:

- Original articles: which can be in two formats: full-length research papers or brief notes.
 - Reviews: generally they are commissioned, but unsolicited reviews may also be considered. In this case, authors should contact any of the review editors or the desk editor.
 - Meeting reports: brief descriptions of results and conclusions presented at conferences of interest to the readership. They are written by young researchers attending the conference, with a more senior coordinating author.
 - MicroScope: short, unconventional contributions by experienced scientists wishing to share their thoughts and express their opinions on matters related to their work, current “hot” topics, a bit of history, or future trends in Microbiology. Submissions are by invitation only.
 - Microprofile and MicroScope Focus: these sections are intended to introduce our editors (Microprofile) and to present the members and work of those groups that publish an article in the journal considered by the editors to be of particular relevance.
 - Letters to the Editor: although most of the contributions in this category are now covered by the MicroScope section, letters may be considered when a researcher wishes to comment on or respond to a published article. The Editor-in-chief should be contacted for these or other types of contributions (news, book reviews, obituaries, etc.).
-

3. How to submit a manuscript

Electronic submission of papers using on-line manuscript submission instructions is available at: <http://pasteur.fontismedia.com/res>

Submission implies that the paper reports original research, has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere and will not be published in whole or in part elsewhere (in the same or in another language). All submitted manuscripts are pre-screened at the Editorial desk for compliance with these guidelines and to assess their suitability for the journal. Manuscripts may be rejected at this stage, or sent back to authors for amendments.

Papers that pass this first screen are assigned to an editor, who is responsible for their acceptance, rejection or request for modification, after peer-review by experts and direct evaluation by the editor. Details on the areas of expertise of each editor are available on the journal website.

To expedite the process, reviewers are requested to send their comments within 15 days after accepting the task. The average time between submission and first decision is 35 days.

PLEASE NOTE:

English grammar, syntax and spelling must be carefully prepared and checked before submission of the paper. The authors are encouraged to include a cover letter for the Editor and to provide the names and e-mail addresses of 3 potential referees. A PDF version of the paper containing figures and tables is needed for the reviewing process. The authors should also provide their paper as a Word document and submit figures separately according to on-line submission instructions. In addition, if the submitted manuscript contains a reference to other related papers in press or considered for publication, PDFs of these papers should be added to the submission as supplementary information.

4. Paper length

- **Research paper:** abstract 200 words, main text (Introduction, Materials and methods, Results and Discussion) in the range of 4000-6000 words, about 40 references, and a combination of a total of 6 to 8 figures and tables.

- **Brief note:** abstract 100 words, main text 2000 words (may be divided into sections, each with a title), references up to 20, and a combination of a total of 3 figures and tables.

- **Review:** abstract 100 words, main text 4000-5000 words, with subheadings, references up to 70.

- **MicroScope:** no abstract, continuous text (up to 4000 words) that may be divided into sections. Up to 30 references. Figures and tables are welcome when appropriate but should be kept to a minimum.

Contact the editors for specific instructions for other types of contributions.

5. General format of papers

- Double-space (32 lines per page maximum) throughout (including references, figure legends and table footnotes).
- 2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.
- Font size of at least 12 points.
- Each page numbered top right (title page is 1).

- Lines numbered.
- Each new paragraph indented.
- Either American or English spelling, but not both.
- Do not use capital letters (except for first letter) in titles, author names, section headings.
- When referring to figures in the main text, figure is abbreviated to Fig., i.e., Fig. 1.
- When referring to tables, Arabic numerals are used, i.e., Table 2.

6. Organization of research papers and brief notes

Manuscript should be arranged in the following order (each item on a separate page):

a) Title page; b) Abstract + keywords; c) Introduction; d) Materials and methods; e) Results; f) Discussion; g) Acknowledgements; h) References; i) Legends to figures; j) Tables; k) Figures; l) Supplementary material for on-line submission

Abbreviations: A list of unusual abbreviations may appear below the keywords. In general, however, they must be defined in the text the first time they are used, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter, they are to be used throughout the paper.

Chapters for Introduction, Materials and methods, Results and Discussion are numbered in bold; subheadings are in italics; e.g.: 3. Results; then *3.1 Subheading*. Results and Discussion may be grouped together.

a) Title page

- Title: it should be informative and concise and not exceed 25 words. It should not contain non-standard acronyms or abbreviations nor be in capital letters.

- Authors' names: full first name of each author is followed by last name. Do not use capital letters; use commas to separate names; do not use "and" before name of last author. Each name should be followed by a superscript letter a, b, etc. to designate the affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction should be followed by an asterisk (*) after the superscript letter.

- Affiliations: give complete address (department and/or laboratory, college, university, and full postal address) of each institute at which the work was carried out, preceded by the appropriate superscript letter (a, b, etc.). Affiliations should follow the list of names, and each address should be given in a separate paragraph.

- The e-mail address of each author is given at the bottom of the title page. The e-mail address of the corresponding author is followed by the note "*Correspondence and reprints".

b) Abstract and keywords

The abstract is on page 2; it is accessible to a wide audience, summarizing the objectives and major conclusions and indicating the relevance of the work. Do not use references, footnotes or abbreviations in the abstract. The word “Abstract” is in bold.

Keywords: place them below the abstract; provide a list of at least three keywords existing in the MeSH thesaurus. They are in lower case letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and should express the precise content. Avoid repeating words from the title.

c) Introduction

The Introduction outlines the background of the study; it should not summarize results nor be an extensive review of the literature. Do not use subheadings in the Introduction.

d) Materials and methods

Avoid detailed description of standard procedures, procedures performed using commercial kits or procedures fully described in a former paper, unless the publication is not readily available (e.g., a PhD thesis or papers not published in English).

e) Results

f) Discussion

Discuss major findings. Avoid repeating parts of the Introduction and Results. Do not defend the main conclusions with unpublished data or with data from manuscripts in preparation.

g) Acknowledgements

Personal acknowledgements precede those of agencies and institutions; use only a single paragraph.

h) References

Unpublished work and personal communications are indicated as such in the text but not listed. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal) appear in the references list. The list of references at the end of the paper, in alphabetical order appears after the Acknowledgements. Verify that each reference has its counterpart in the list and vice-versa; incorrect or incomplete referencing will delay publication.

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; (Espinosa-Urgel, 2009)
2. Two authors: both authors' names and year of publication; (Vanechoutte and Fani, 2009)
3. Three or more authors: first author's name followed by et al., and the year of publication. (Vosahlikova et al., 2007)

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b; Archambaud et al., 2012; Fernández-Piñar et al., 2011; Yousef and Espinosa-Urgel, 2007). Kramer et al. (2000) have recently shown"

In the list of References:

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Follow the styles shown below:

Reference to a journal publication:

Davidovich, C., Belousoff, M., Yonath, A., 2009. The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery. *Res. Microbiol.* 160, 487-492.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B. , 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E- Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

i) Legends to figures

The text for figure titles and their corresponding legends starts on a separate page following the reference list.

j) Tables

Tables are consecutively numbered according to their order of appearance in the main text. Each table carries a short title at the top (Table 2, etc.) describing its content in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines between columns are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned and other columns are generally centered. Only the first letter of each heading is capitalized, and any units (Roman characters) appear in parentheses after or under the corresponding heading. Footnotes are collected under the table and referred to in the table by superscript letters (a, b, etc.).

k) Figures

Figures are numbered (Arabic numerals) consecutively by order of appearance in the main text (Fig. 1) and should be provided in a TIFF format. The lettering and the graph symbols (squares, triangles, circles, etc.) should have a finished printed size of at least 9 pt. Line art should have a resolution of approximately 1 000 dpi. Half-tone graphics (photographs or graphics with shades of gray) should have a resolution of 300 dpi. A figure that is a combination of both a half-tone and line art should have a resolution of at least 500 dpi. When necessary, indicate magnification by a scale bar. Visit <http://authors.elsevier.com/ArtworkInstructions.html?dc=AI1>

There is no charge for reproduction of black and white illustrations. Color figures are acceptable but will normally be charged to the author (except for commissioned papers). Consult with the publisher for current costs. It should be clearly stated when a figure must be published in color.

Make sure that all figures and tables are included at the end of the manuscript, even if originals are also submitted separately.

l) Supplementary material for on-line submission

Supplementary material in the form of tables or figures can be accepted for publication on line at the Editor's discretion.

7. Organization of reviews

Follow the above instructions for the general format, references and figures. The main text may be divided into sections with subheadings; it is recommended to end with a concluding section. The use of tables, charts, pictures and maps is strongly encouraged. Style used for Title, Abstract page, Tables, Figures and References follows the instructions above.

The Publications Office will forward instructions to invited authors for other types of contributions.

8. Conventions

Microorganisms: follow guidelines of the Nomenclature Committees, ICSP <http://www.the-icsp.org/> and ICTV. Genus and species are written in full the first time the name appears in the text; subsequently, use only the first letter of the genus, followed by the species (e.g. *Escherichia coli*, then *E. coli*). When proposing new names or a new combination of names for the organisms they describe, authors are invited to apply guidelines ICSP and IJSEM (Int J Syst Evol Microbiol 50, 2239-44 and 2247-49 and Int J Syst Evol Microbiol 52 1043-47 for new rules for species definition, or visit <http://intl-ij.sgmjournals.org/misc/ifora.shtml>), and to provide evidence that type strains are deposited in two recognized culture collections in two different countries. For genetic nomenclature of IS and transposons, visit <http://www-is.biotoul.fr> and <http://www.ucl.ac.uk/eastman/tn/>

Nucleotide sequences: they should be deposited in the NCBI or EMBL databases prior to submission. Their accession number should be provided in the submitted manuscript and the sequences should be made public prior to publication.

Microarray data: it is strongly recommended that data from microarray experiments be deposited in a public database such as GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). Otherwise, authors must ensure that all raw and processed data are available to the reviewers for evaluation.

Units of measurement: follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the units (e.g. 100 °C, 25 mg). Use small l for liter).

Genetic loci are italicized; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro/vivo/situ*, *via*, as well as abbreviations for expressions such as *cf.*, *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, appear in Roman type.

9. Revision

A paper sent back to the authors for revision should be returned to us within 2 months, together with a letter describing all modifications performed as well as answers to the reviewers' and editor's remarks, item by item; otherwise, it will be considered as a new submission. Authors

requiring additional time should contact the editor. The Publications Office may request additional modifications after acceptance of a paper if the length is excessive or if the format does not conform to instructions.

10. Proofs and reprints

Proofs are sent to the author responsible for correspondence. After careful correction, return them to the publisher within 48 h. If there is no response the article will be published as it appeared in the first proofs. Aside from typographical errors, no changes can be made in the references.

Elsevier provides either 25 free reprints of each article or the PDF version. To purchase additional reprints, fill in the order form, which accompanies the proofs and return it to the publisher together with the corrected proofs.

11. Copyright

As soon as the article is published, the author is considered to have transferred his or her rights to the publisher. Requests for reproduction should be sent to the Publisher:
<http://www.elsevier.com/locate/permissions>

ANEXO 4 – Normas do Periódico *Molecules*

Instructions for Authors

Submission of Manuscripts

Submission: Manuscripts should be submitted online at www.mdpi.com by registering and logging in to this website. Once you are registered, click here to go to the submission form.

Accepted File Formats:

MS Word: Manuscript prepared in MS Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in MS Word, the *Molecules* Microsoft Word template file must be used. Please do not insert any graphics (schemes, figures, etc.) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.

LaTeX: ensure to send a copy of your manuscript as a PDF file also, if you decided to use LaTeX. When preparing manuscripts in LaTeX, please use the MDPI LaTeX template files.

Coverletter: Check in your cover letter whether you supplied at least 5 referees. Check if the English corrections are done before submission.

Correct Identification of Components of Natural Products

The correct identification of the various components of extracts from natural sources is of key importance, and as publishers we are keenly aware of our responsibility to the scientific community in this area. Consequently, for papers on this topic, we have adopted the recommendations of the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavour Industry (IOFI), as published in *Flavour Fragr. J.* **2006**, 21, 185. These recommendations may be summarized as follows:

Any identification of a natural compound must pass scrutiny by the latest forms of available analytical techniques. This implies that its identity must be confirmed by at least two different methods, for example, comparison of chromatographic and spectroscopic data (including mass, IR and NMR spectra) with those of an authentic sample, either isolated or synthesized. For papers claiming the first discovery of a given compound from a natural source, the authors must provide full data obtained by their own measurements of both the unknown and an authentic sample, whose source must be fully documented. Authors should also consider very carefully potential sources of artifacts and contaminants resulting from any extraction procedure or sample handling.

Manuscript Preparation

Manuscripts should be prepared in English using a word processor. The MS Word template file should be used. MS Word for Macintosh or for Windows .doc or .rtf files are preferred. Manuscripts may be prepared with other software, provided that the full document (with figures, schemes and tables inserted into the text) is exported to a MS Word format for submission. Times or Times New Roman font is required. The font size is 12 pt and the line spacing "at least" 17 pt. Although our final output is in .pdf format, authors are asked to not send manuscripts in this format as editing them is much more difficult.

Special Notes regarding MS Word files:

Please do not insert any graphics (schemes, figures, etc.) into a movable frame which can superimpose the text and make the layout very difficult.

Most formatting codes will be removed or replaced on processing your article so there is no need to use excessive layout styling. In addition, options such as automatic word breaking, double columns, footnotes or automatic numbering should not be used. However, bold face, italic, subscripts, superscripts, etc. may be used for emphasis as needed. Authors from countries where right-to-left writing is used should ensure their manuscripts have Western style (left-to-right) formatting.

The standard style of *Molecules* should be followed. Prospective authors should consult any current issue of *Molecules* for examples of this style.

Authors' full mailing addresses, homepage addresses, phone and fax numbers, e-mail addresses and homepages can be included in the title page and these will be published in the manuscripts and the Table of Contents. The corresponding author should be clearly identified. It is the corresponding author's responsibility to ensure that all co-authors are aware of and approve of the contents of a submitted manuscript.

All authors who contributed significantly to the manuscript (including writing a section) should be listed on the first page of the manuscript, below the title of the article. Other parties, who provided only minor contributions, should be listed under Acknowledgments only. A minor contribution might be a discussion with the author, reading through the draft of the manuscript, or performing English corrections.

A brief (about 200 words) Abstract should be provided. The use in the Abstract of numbers to identify compounds should be avoided, unless these compounds are also identified by name.

A list of three to five keywords must be given, and placed after the Abstract. Keywords may be single words or very short sentences.

Although variations in accord with a manuscript's contents are permissible, in general all papers should have the following sections: Introduction, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgments (if applicable), Experimental and References (or References and Notes, if applicable).

Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color. Full color graphics will be published free of charge. Conference slides, video sequences, software, etc., can also be included and will be published as supplementary material.

Tables should be inserted into the main text, and numbers and titles supplied for all tables. All table columns should have an explanatory heading. To facilitate layout of large tables, smaller fonts may be used, but in no case should these be less than 10 pt. in size. Authors should use the Table option of MS Word to create tables, rather than tabs, as tab delimited columns are often difficult to format in .pdf for final output.

Figures and schemes should also be placed in numerical order in the appropriate place within the main text. Numbers, titles and legends should be provided for all schemes and figures. These should be prepared as a separate paragraph of the main text and placed in the main text before the figure or scheme.

Chemical structures and reaction schemes should be drawn using an appropriate software package designed for this purpose. As a guideline, these should be drawn to a scale such that all the details and text are clearly legible when placed in the manuscript (i.e. text should be no smaller than 8-9 pt.). To facilitate editing we recommend the use of any of the software packages widely available for this purpose: MDL® Isis/Draw, ACD/ChemSketch®, CS ChemDraw®, ChemWindow®, etc. Free versions of some of these products are available for personal or academic use from the respective publishers. If another less common structure drawing software is used, authors should ensure the figures are saved in a file format compatible with one of these products.

X-ray crystallographic data. To avoid publication of extensive compilations of crystallographic data and facilitate refereeing of manuscripts, *Molecules* has entered a data deposition scheme with the Cambridge Crystallographic Data Centre (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/>). Authors planning to include such results in their papers should contact the CCDC to deposit the crystallographic data and obtain the corresponding CCDC deposition number(s) before submitting their manuscripts to *Molecules* (for instructions on doing this, see: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/depositing.html>). The deposition number(s) (usually provided by the CCDC within 3 working days) should be included in the manuscript, along with the following text: "CCDC contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge

CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)". This text may be included in the General subsection of the Experimental or as a suitably referenced endnote.

Experimental data. *Molecules* is first and foremost a repository of synthetic procedures and data. The Experimental section should have an initial subsection labeled *General*, containing information on materials, methods, analytical instrumentation used, etc. To allow for correct abstracting of the manuscripts all compounds should be mentioned by correct chemical name, followed by any numerals used to refer to them in the paper. The use of the IUPAC nomenclature conventions is preferred, although alternate naming systems (for example CAS rules) may be used provided that a single consistent naming system is used throughout a manuscript. For authors perhaps unfamiliar with chemical nomenclature in English we recommend the use of compound naming software such as AutoNom. Full experimental details must be provided, or, in the case of many compounds prepared by a similar method, a representative typical procedure should be given. The general style used in the *Journal of Organic Chemistry* is preferred. Complete characterization data must be given for all new compounds. For papers mentioning large numbers of compounds a tabular format is acceptable. In case of compound libraries containing more than 100 compounds, preferably 20% of the whole library. For known compounds appropriate literature references must be given.

References. See the Reference Preparation Guide. References should be numbered according to the order in which they appear in the text.

Reference Preparation: References should preferably be prepared with EndNote®, ReferenceManager™ or a similar bibliography software package. If references are prepared manually they must be checked for integrity and correctness (you may use ISI Web of Knowledge, PubMed/MEDLINE or Google Scholar). The Editorial Office will charge additional CHF 10 per citation for which extensive corrections must be made.

Abstract/Table of Contents Graphic: Authors are encouraged to provide a graphical representation of the paper (in either JPEG, GIF, PNG or PDF format) to be used as a graphic of the paper, along with the abstract, on the Table of Contents. The graphic should not exceed 500 pixels width/height. As an example, authors may review the abstract graphic of following papers:

- <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/1/490>

- <http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/378>

Electronic Supplementary Information (ESI): Conference slides, video sequences, software, etc., can be included with the submission and published as supplementary material. Please read the information about Supplementary Material Deposit beneath.

Potential Conflicts of Interest

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section. It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflict of Interest" statement preceding the "Acknowledgments" and "References" sections at the end of the manuscript. Financial support for the study must be fully disclosed under "Acknowledgments" section.

Review / Referees

Authors should suggest at least five potential referees with the appropriate expertise, although the Editor will not necessarily approach them. Please provide as detailed contact information as possible (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should be experts in the field who can provide an objective report - they should not be current collaborators of the

authors nor have published with any of the authors of the manuscript within the last 5 years. Proposed referees should be from different institutions than the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential referees. Another possibility is to select referees from among the authors that you frequently cite in your paper.

English Corrections

This journal is published in English, so it is essential that for proper refereeing and quick publication all manuscripts are submitted in grammatically correct English. For this purpose we ask that non-native English speakers ensure their manuscripts are checked before submitting them for consideration. We suggest that for this purpose your manuscript be revised by an English speaking colleague before submission. Authors can also use the services of American Journal Experts (AJE) for this purpose. Authors of articles submitted to MDPI journals benefit of a one-time 10% discount on AJE's charges. Simply follow the above link to make use of the referral discount.

MDPI Publication Ethics Statement

Molecules is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). MDPI takes the responsibility to enforce a rigorous peer-review together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. MDPI takes such publishing ethics issues very seriously and our editors are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

CrossCheck/iThenticate

Molecules is a member of CrossCheck powered by iThenticate. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers, and billions of web content. Authors are encouraged to use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

[\[Return to top\]](#)

Supplementary Material Deposit

We wish to encourage the submission of supplementary data in electronic formats, so that important chemical, structural or scientific information is retained in full. Spectral data (NMR, IR, Raman, ESR, etc) can be submitted in JCAMP (.jdx) format.

3D coordinate structures (in pdb, mol, xyz or other common formats), if available, should also be submitted.

ANEXO 5 – Normas do Periódico Internacional Microbiology

INTERNATIONAL
MICROBIOLOGY

Instructions for authors

1 General Information

The journal publishes two kinds of papers: Articles and Complements. Articles are original research papers or critical reviews on a specific topic. They should not exceed 12 printed pages, including tables and figures. Complements are short papers dealing with microbiological subjects of broad interest: Editorials, Perspectives, Opinions, etc.

Manuscripts should be submitted in triplicate to the Editorial Office:

Editorial Office, International Microbiology,
Apartado 16009, E-08080 Barcelona, Spain.
Tel: +34-934482373, Fax: +34-933341079
E-mail: int.microbiol@telefonica.net
<http://www.IM.microbios.org>

■ **Manuscripts in electronic form.** Authors are to send the final version of their manuscript – after acceptance for publication – in electronic form. Please follow the special technical instructions as printed in this journal.

Manuscripts must be accompanied by the Copyright Transfer Statement (the form is regularly published in this journal).

■ Manuscripts should be submitted in final form. They should be prepared in accordance with the journal's accepted practice, form and content; manuscripts should be checked carefully to exclude the need for corrections in proof. Manuscripts should be typed double-spaced throughout on one side of the paper only and with wide margins. The author should mark in the margin where figures and tables are to be inserted.

2 Arrangement of Research articles

All pages must be numbered consecutively, starting with the title page.

■ The **title page** should comprise: title of paper, first name(s) and surname(s) of author(s), location(s), the address to which proofs are to be sent, and the fax number and e-mail address of the corresponding author.

■ The **Abstract** should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. Abstracts are used by information retrieval systems. The abstract should not exceed 200 words. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Immediately following the Abstract, up to five Keywords should be supplied; these will be used for indexing purposes.

■ The **Introduction** should be concise and define the scope of the work in relation to other work done in the same field. It should not give an exhaustive review of the literature.

■ **Materials and methods** should give sufficient detail to allow the experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications

of published procedures should be mentioned briefly. Subheadings should be used.

■ **Results** should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the author's experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature.

■ The **Discussion** should be confined to interpretation of the results (without repetition), also in light of the pertinent literature on the subject. When appropriate, the Results and Discussion sections can be combined.

■ **Acknowledgements** should be presented after the Discussion section. Personal acknowledgements should only be made with the permission of the person(s) named.

■ **References.** The list of references should include only works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Unpublished work in preparation, Ph.D. and Masters theses, etc., should be mentioned in the text only, in parentheses. Citations in the text should be by numbers in square brackets referring to an alphabetized list at the end of the paper. References should be in the following style:

1. Carr NG, Mann NH (1994) The oceanic cyanobacterial picoplankton. In: Bryant DA (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht, pp 27–48
2. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, Upper Saddle River
3. Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA, Lo S-C (1998) The *Arthromitus* stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1236–1241

Citation of articles that have appeared in electronic journals is allowed if access to them is unlimited and their URL is supplied.

3 Further information

■ **Abbreviations and units.** Abbreviations and symbols should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission. Information can be obtained at <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/>. Common abbreviations such as cDNA, NADH and PCR need not be defined. Non-standard abbreviation should be defined at first mention in the Abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter. SI units should be used throughout.

■ **Nomenclature of organisms.** Genus and species names must be in italics. Each genus should be written out in full in the title and at first mention in the text. Thereafter, the genus may be abbreviated, provided there is no danger of confusion with other genera discussed in the paper. Spelling should follow the instructions to authors of the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Nomenclature of protists

should follow the *Handbook of Protozoists* (Jones and Bartlett, Boston).

■ **Figures and tables.** These should be restricted to the minimum needed to clarify the text; a total number (F + T) of five is recommended. The quality of photographic prints should be such that good reproduction is ensured. On the back of each figure, the first author's name, the figure number and the top should be marked lightly in soft pencil. Legends must be typed in double-line spacing on a separate sheet and appended to the text. The size of photographs should not exceed the printing area (17.6 × 23.6 cm). For color illustrations the authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of € 485.00, US \$ 534.00 plus 16% VAT per article. Color pictures may be accepted for use on the cover of the issue in which the paper will appear.

Tables must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text at the end of the paper. Tables may be edited to permit more compact typesetting. The publisher reserves the right to reduce or enlarge figures and tables.

■ **Editorial charges.** If an accepted manuscript requires particularly heavy editorial work, authors may be requested to pay an editorial charge of Euro 180 per paper to the editorial office. The acceptance of a paper does, however, not depend on the author's ability to pay this charge. If the research was not funded, authors may send the Editor-in-Chief a written request for charges to be waived.

■ **Complements.** These papers serve to express or clarify the author's point of view on a microbiological topic of international relevance or to comment on a recently published article or book. These papers should not exceed 6 printed pages. References may be cited if necessary.

■ **Book reviews.** Reviews of recent books of special interest in the field of both prokaryotic and eukaryotic microbiology, and the history and sociology of microbiology are welcome. Please contact the Editorial Office for details.

■ **Proofs.** Proofreading is the responsibility of the author. Only typesetting errors should be corrected. The corrected page proofs must be returned by the date requested.



Springer

ANEXO 6 – Resultados complementares

1. Fracionamento do extrato metanólico da biomassa (EBB)

O extrato EBB (7,70 g) foi submetido à cromatografia em coluna com sílica gel (0,063 – 0,2 mm/70 – 230 mesh ASTM), empacotada e eluída com gradiente crescente de polaridade: acetona/metanol (6:4); (5:5); (3:7); (2:8); metanol; metanol:água (1:1) e por fim água (Figura 1). As frações foram analisadas comparativamente por cromatografia em camada delgada (CCDA) utilizando-se como eluente (ácido acético/ácido fórmico/acetato de etila/água (100:11:11:26), seguida da revelação dos compostos por pulverização com anisaldeído. Ao final foram reunidas as cromatograficamente semelhantes, sendo submetidas à evaporação à pressão reduzida, resultando em 26 frações (R1 – R26).

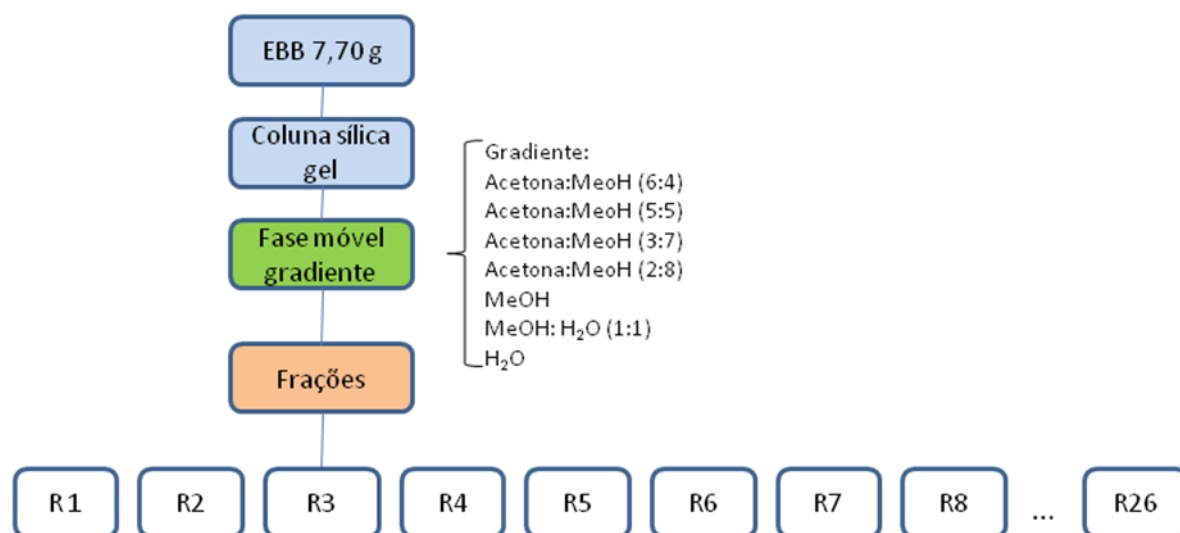


Figura 1. Fluxograma de fracionamento do extrato bruto metanólico da biomassa (EBB) e obtenção de frações.

Foi observado nas nove frações iniciais o aparecimento de cristais, os quais foram submetidos à purificação por tratamento com metanol e em seguida analisados por cromatografia em camada delgada. A fração metanólica resultante da purificação dos cristais referidos (FP) foi evaporada sob pressão reduzida obtendo-se 1,1873 g. A fração FP foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel (0,063 – 0,2 mm/70 – 230 mesh ASTM), e eluente acetato de etila/metanol (6,5:3,5), resultando em 11 sub-frações (RR1 - RR11) (Figura 2). As sub-frações foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas GC MS – QP 5050 SHIMADZU. Apresentando tempo total de corrida de

55 minutos, injeção de 1 µL, temperaturas do injetor e interfase fixadas em 280 °C, taxa de variação programada de 5-250 °C/2 minutos seguida por um aumento de 10 °C por minuto até atingir 280 °C/4 minutos, coluna VB5-30 m de comprimento com diâmetro de 0,25 mm, fluxo de gás Hélio, modo de injeção split, pressão interna da coluna de 48,9 KPa, fluxo da coluna de 1 mL/min, velocidade linear de 36,1 cm/s.

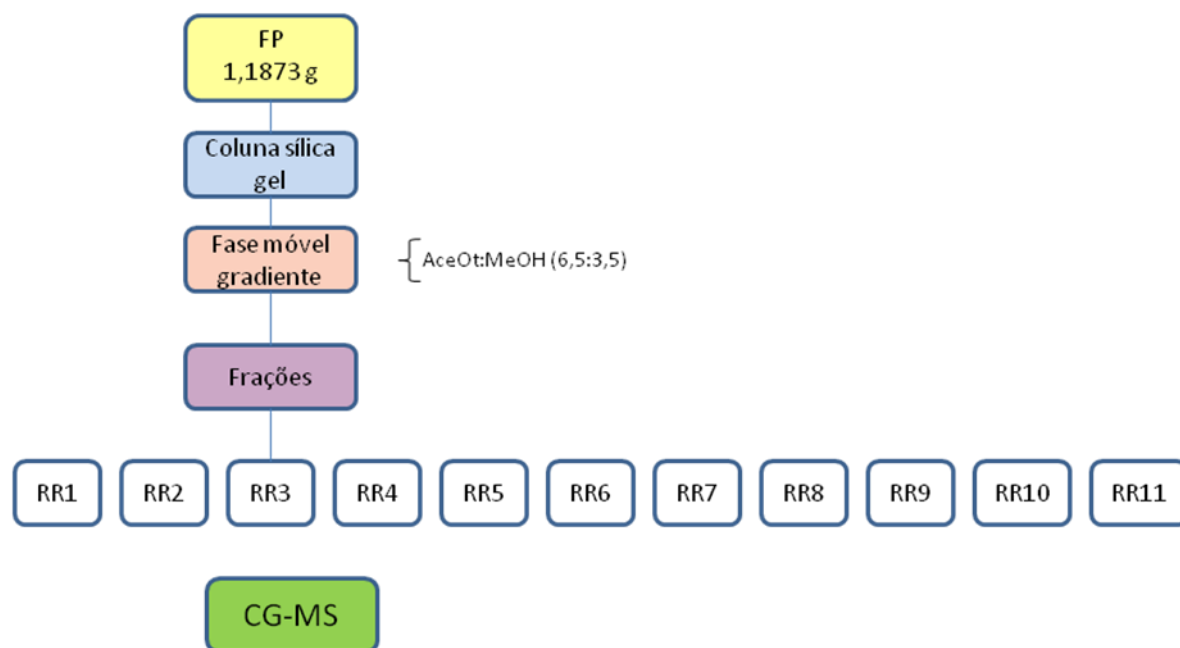


Figura 2. Fluxograma para obtenção das sub-frações da fração metanólica (FP).

Resultados

Das frações iniciais da cromatografia em coluna do extrato EBB, foi obtido um composto cristalino que demonstrou tratar-se de um sal conforme espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) (Apêndice 1).

As 11 sub-frações (RR1 - RR11) obtidas na segunda cromatografia em coluna para a fração FP foram analisadas individualmente por CG-MS (GC MS – QP 5050 SHIMADZU) e os seus respectivos cromatogramas encontram-se no apêndice 2.

2. Fracionamento e identificação de compostos presentes no extrato EBB

As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará – UFC.

O extrato EBB (5,5 g) foi submetido à cromatografia filtrante a vácuo, utilizando eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano (100 mL), diclorometano (100 mL), acetona (100 mL),

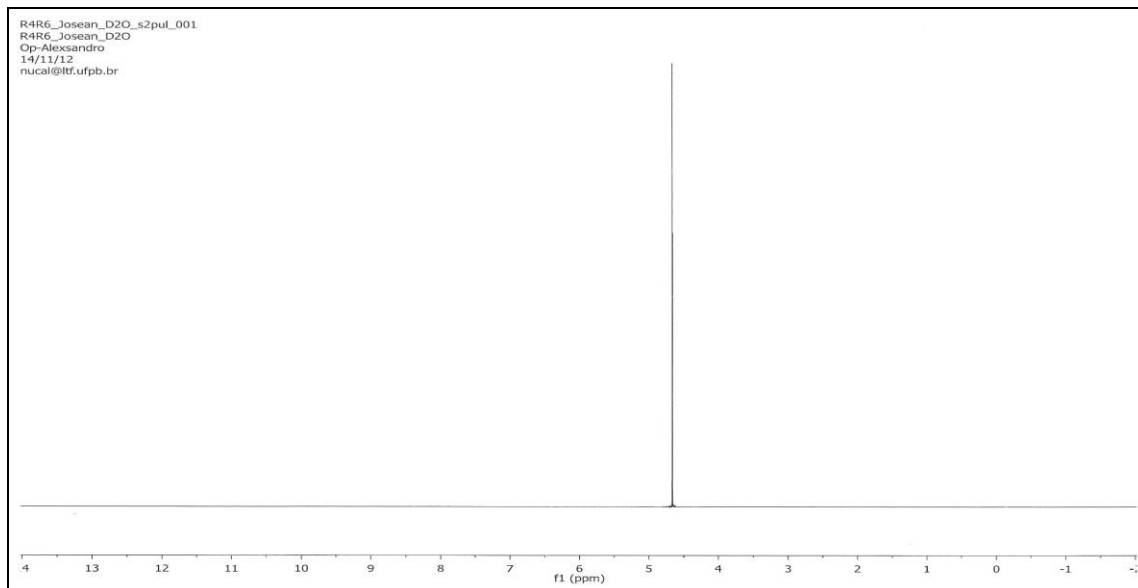
acetato de etila (200 mL), metanol (700 mL), metanol/água 1:1 (500 mL) e água (200 mL). As frações foram coletadas separadamente em erlenmeyer e concentradas em evaporador rotativo. As frações hexânica, diclorometano, acetônica e acetoetílica foram analisadas por infravermelho (Apêndice 3).

Após concentração da fração metanólica foi observado à presença de um precipitado (Ppt) insolúvel em metanol. Vinte miligramas deste precipitado (Ppt) foi submetido à reação de acetilação, adicionando-se 1,0 mL de anidrido acético; 0,5 mL de piridina e traços de DMAP (4-dimetilaminopiridina), mantidos sob agitação por 24 horas em balão. Posteriormente dissolveu-se o material em acetato de etila e particionou-se com uma solução saturada de sulfato de cobre 0,4 M, coletou-se a fase orgânica e adicionou-se sulfato de sódio anidro, em seguida concentrou-se a amostra em evaporador rotativo. O material acetilado apresentou um rendimento final de 32,7 mg, sendo então analisado por cromatografia em camada delgada e infravermelho (Apêndice 4).

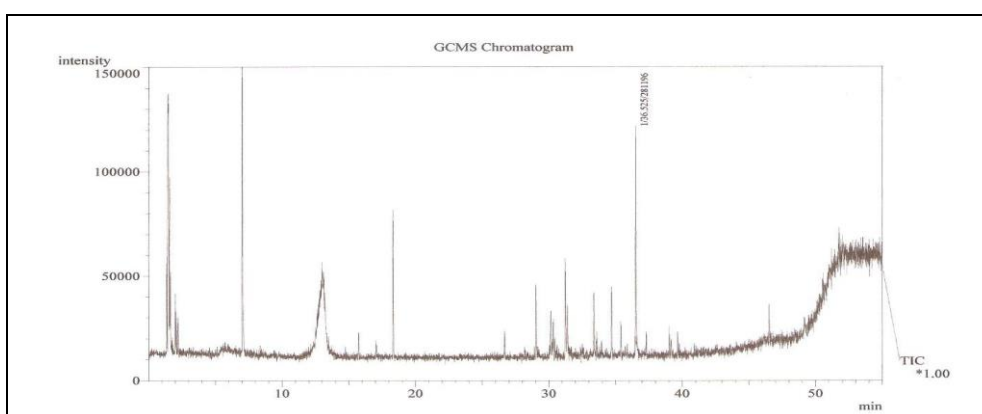
Realizou-se análise da fração metanólica (1,2 mg/3mL de metanol) através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna analítica C-18 (Phenomenex 00G-4252-EO Luna, partícula de 5 μ , poro de 100 Å de diâmetro), fluxo 0,1 mL/min., eluição no modo isocrático MeOH:H₂O (90;10), detector UV 254 nm, com alíquotas de 20 μ L em cada injeção, cromatograma no apêndice 5.

A fração metanólica apresentou como rendimento 2,317 gramas, deste total 430,0 mg foram fracionadas em coluna Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente metanol. A fração denominada G3 (42,4 mg) foi submetida a novo fracionamento em cromatografia em coluna usando-se como fase estacionária sílica flash e eluente metanol/acetato de etila (6:4), resultando em 30 subfrações. Ao final as subfrações cromatograficamente semelhantes foram reunidas. A subfração denominada Fa foi recromatografada em coluna com sílica gel (0,063 – 0,2 mm/70 – 230 mesh ASTM) e como eluentes inicialmente acetato de etila (50 mL) e em seguida metanol (50 mL). A reunião das frações cromatograficamente semelhantes resultou no isolamento de dois compostos denominados I1(F1-10) e I2 (F11-20). O composto I2 foi analisado apenas por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H unidimensional, por não apresentar quantidade suficiente e seus espectros encontram-se no apêndice 6.

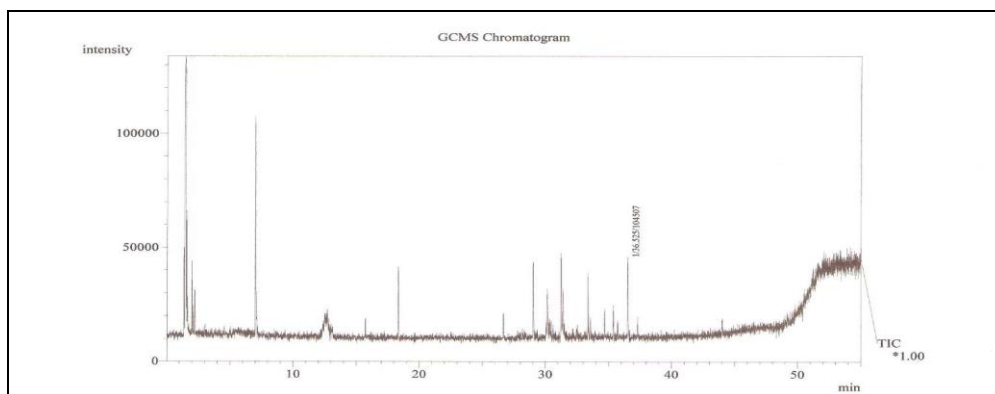
APÊNDICE 1 – Espectro de RMN do composto cristalino obtido das frações iniciais da cromatografia em coluna do extrato EBB (D₂O, 500 MHz).



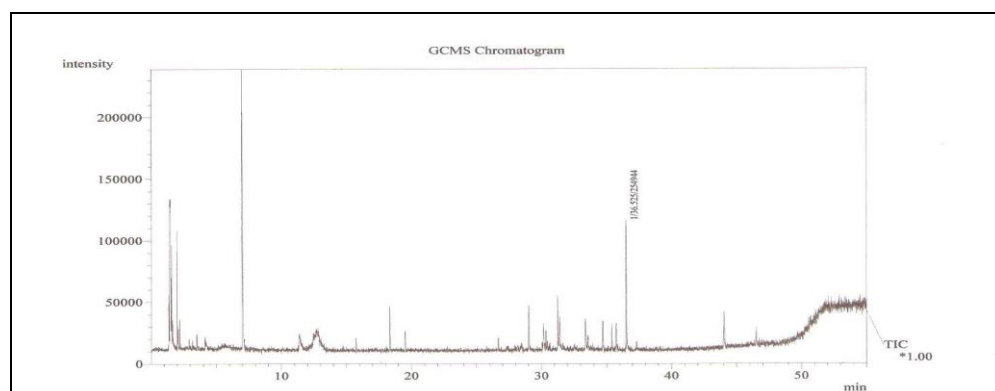
APÊNDICE 2 – Cromatogramas do CG-MS das sub-frações RR1 a RR11.



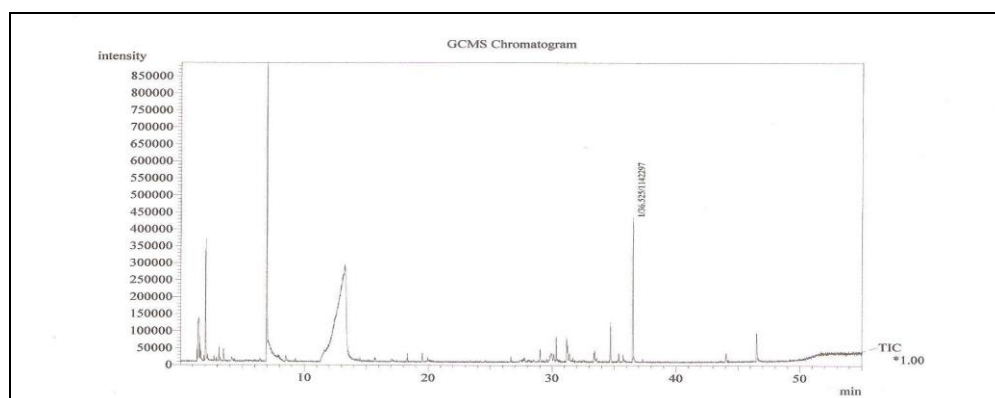
Cromatograma CG da subfração RR1



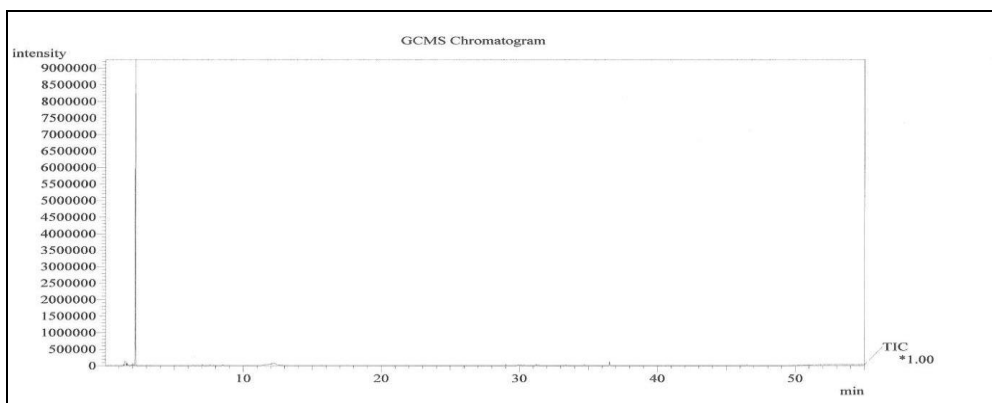
Cromatograma CG da subfração RR2



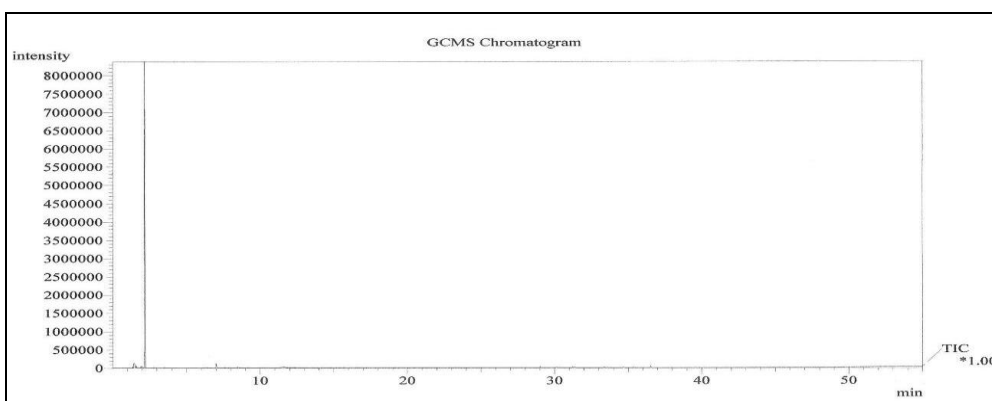
Cromatograma CG da subfração RR3



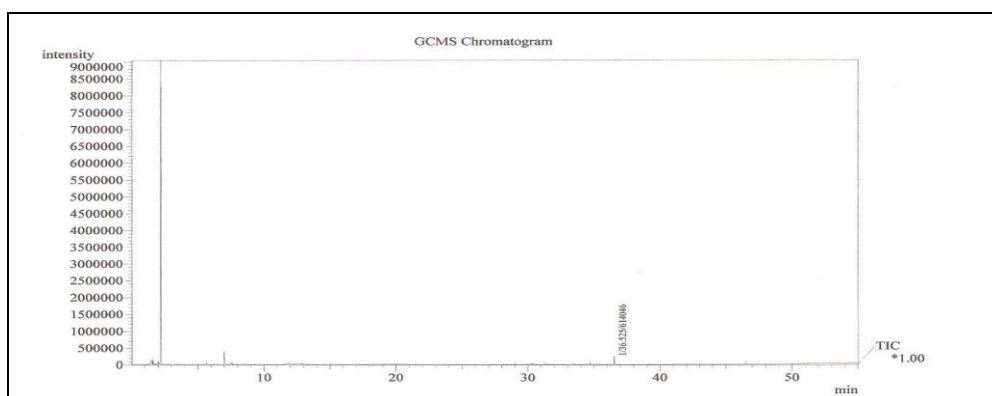
Cromatograma CG da subfração RR4



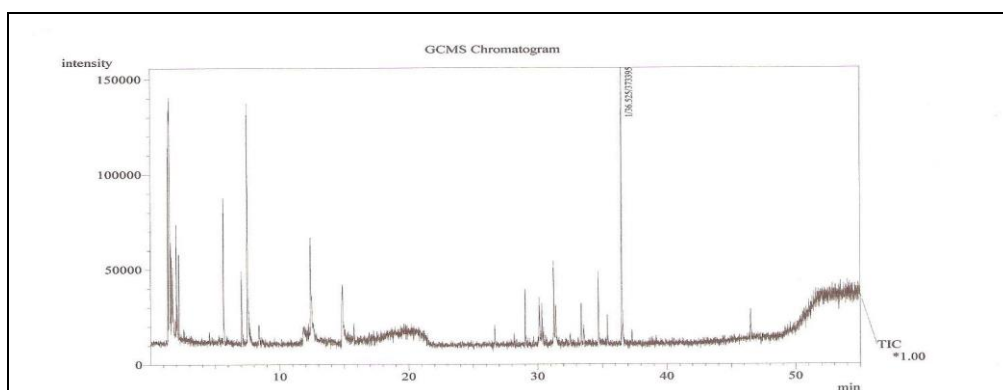
Cromatograma CG da subfração RR5



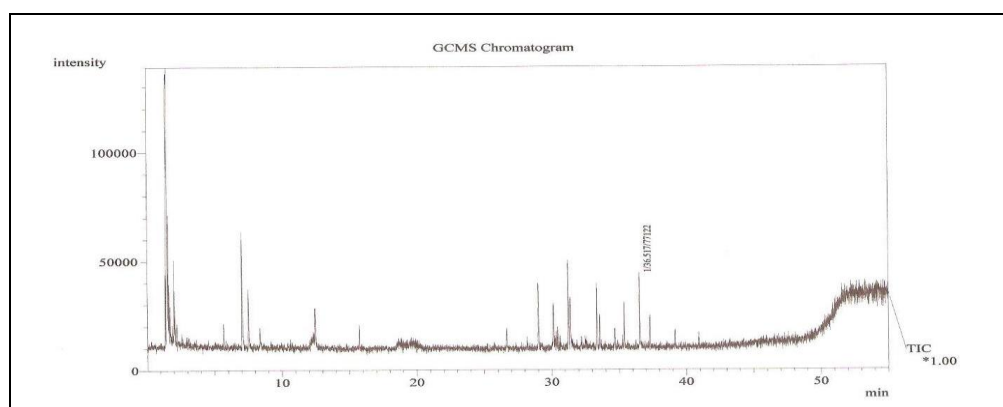
Cromatograma CG da subfração RR6



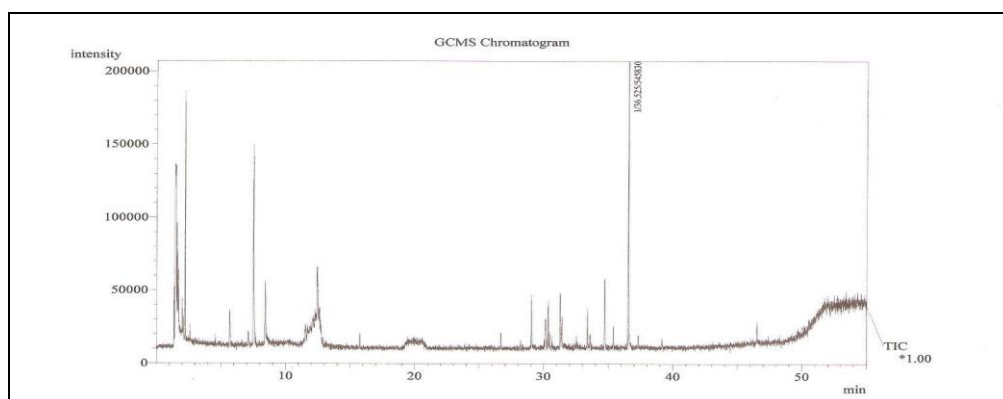
Cromatograma CG da subfração RR7



Cromatograma CG da subfração RR9

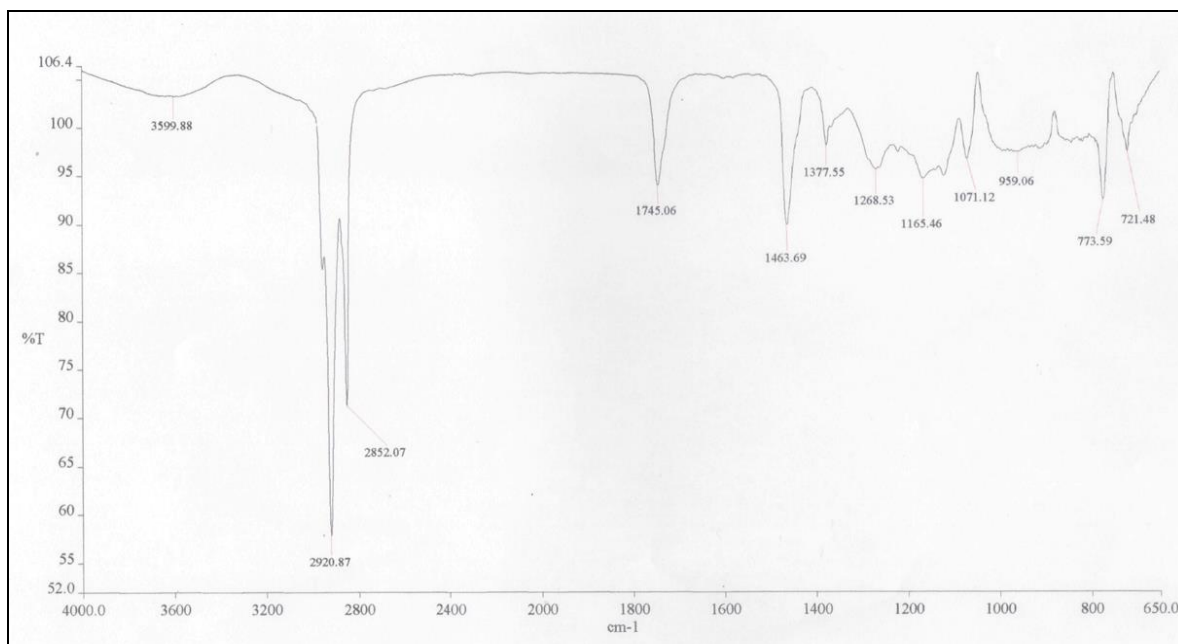


Cromatograma CG da subfração RR10

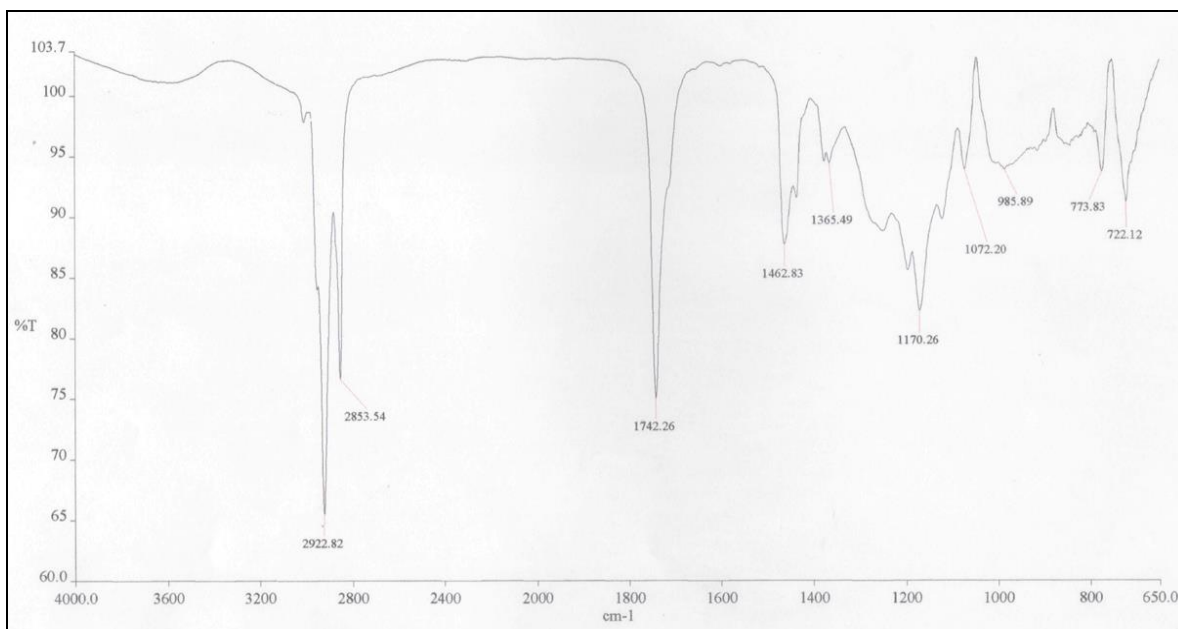


Cromatograma CG da subfração RR11

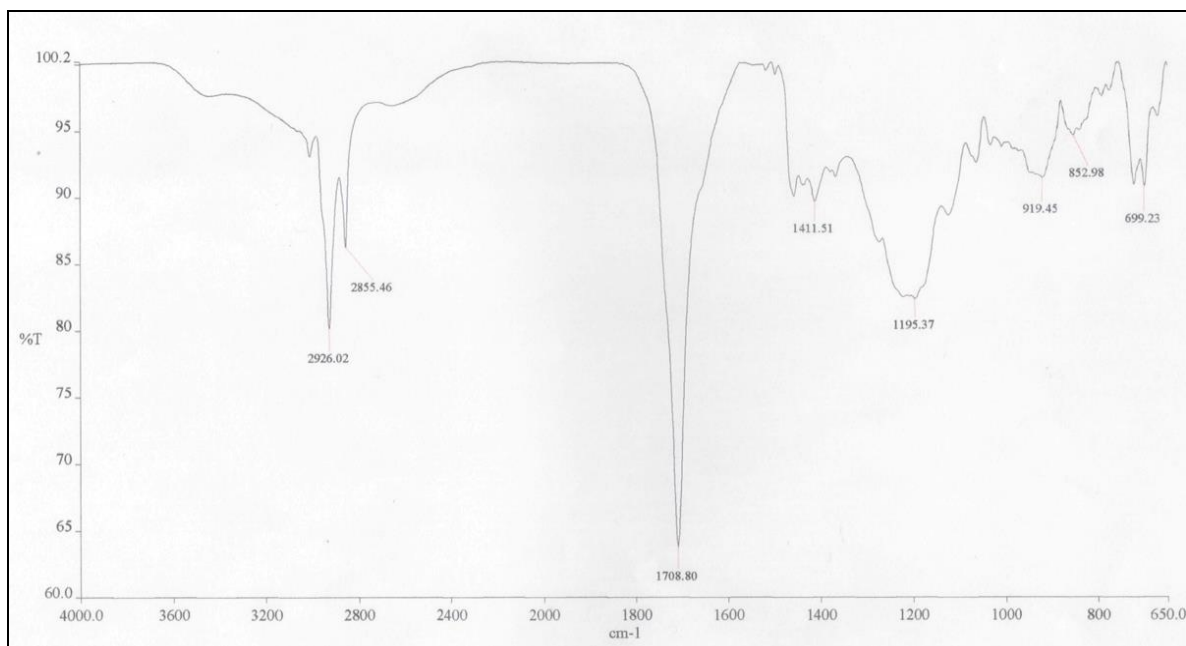
APÊNDICE 3 - Espectros de infravermelho das frações hexânica, diclorometano, acetônica e acetoetílica da cromatografia filtrante do extrato EBB.



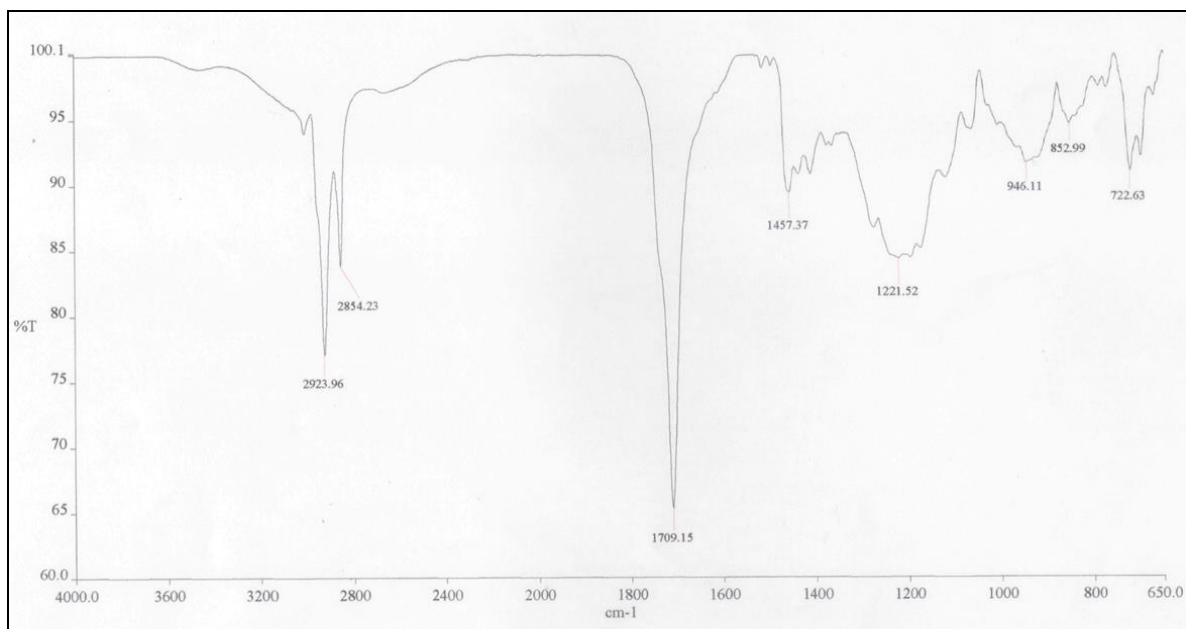
Espectro de infravermelho da fração hexânica da cromatografia filtrante do extrato EBB.



Espectro de infravermelho da fração diclorometano da cromatografia filtrante do extrato EBB.

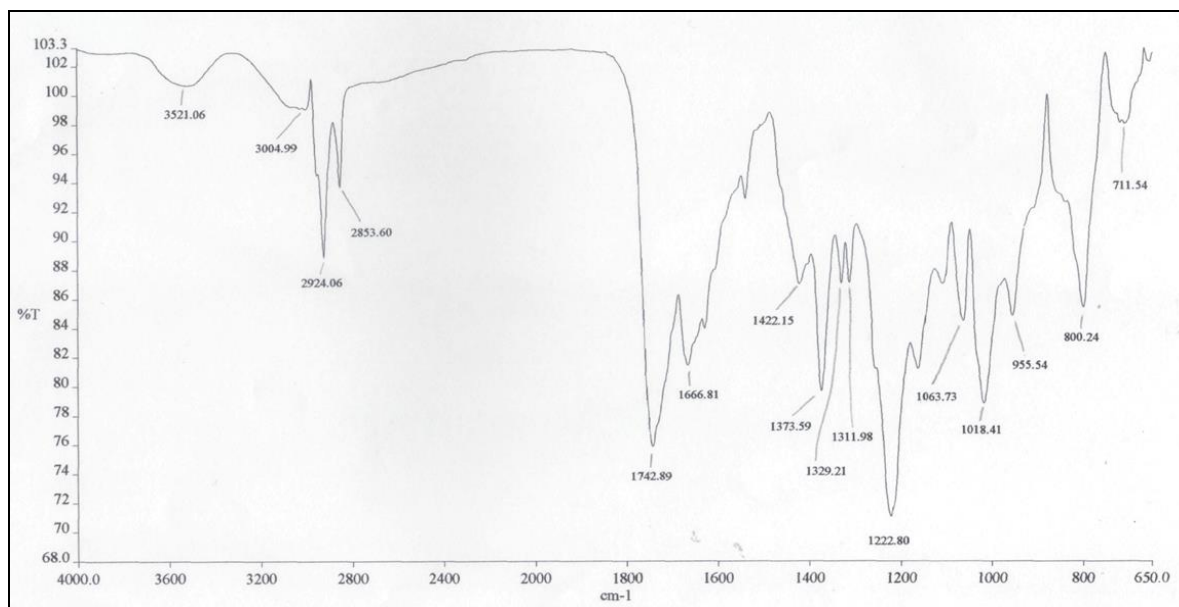


Espectro de infravermelho da fração acetônica da cromatografia filtrante do extrato EBB.

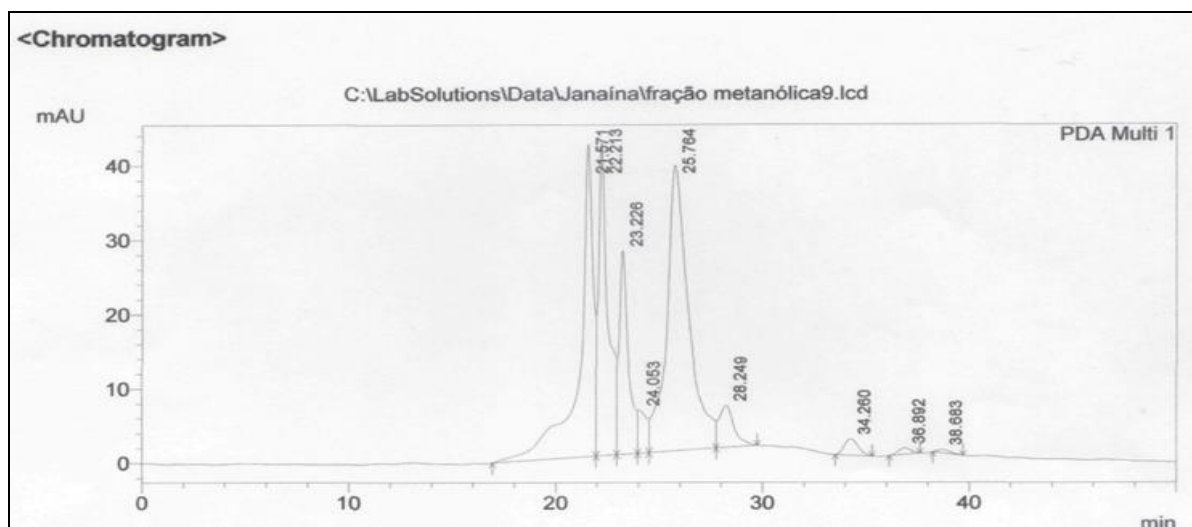


Espectro de infravermelho da fração acetônica da cromatografia filtrante do extrato EBB.

APÊNDICE 4 - Espectro de infravermelho do precipitado da fração metanólica pós-reação de acetilação.



APÊNDICE 5 - Cromatograma da fração metanólica. Fase móvel: MeOH/H₂O (90:10), coluna analítica Phenomenex 00G-4252-EO Luna, partícula de 5μ, poro de 100 Å de diâmetro, fluxo 0,1 mL/min.



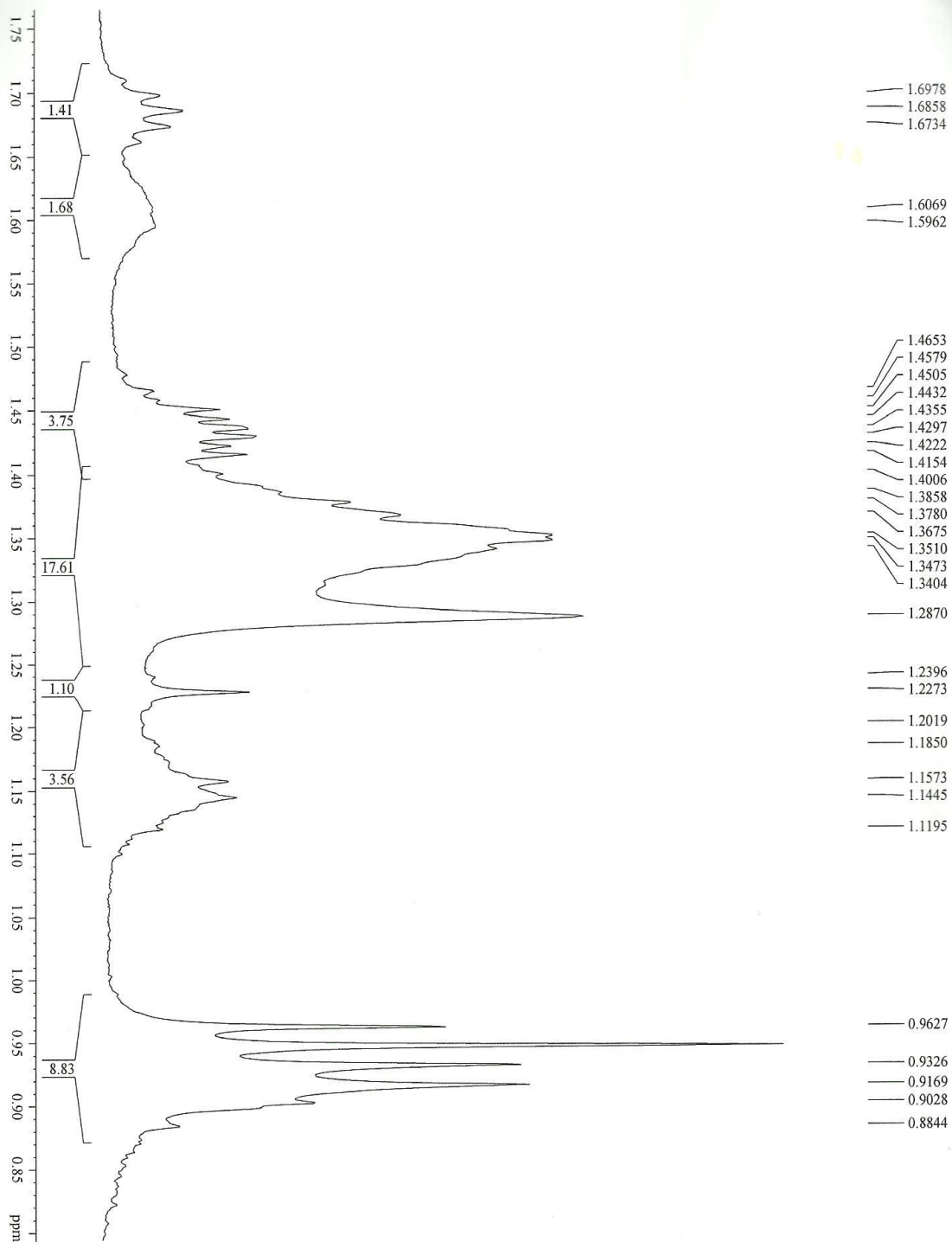
APÊNDICE 6 - Atividade antioxidante dos extratos EBLM, EBB e fração metanólica (DPPH: 60 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em MeOH).

Amostra/Conc	0,001mg/mL	0,005mg/mL	0,01mg/mL	0,05mg/mL	0,1mg/mL	1mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
EBB	1,47 %	3,99 %	5,41 %	9,45 %	11,77 %	89,60 %	0,54 $\pm$ 1,7.10 ⁻²
F MeOH	-	0,88 %	1,58 %	1,82 %	15,99 %	91,72 %	0,54 $\pm$ 4,4.10 ⁻²
EBLM	-	4,00 %	5,80 %	13,08 %	22,28 %	85,91 %	0,53 $\pm$ 6,2.10 ⁻²

Padrão/Conc.	0,001mg/mL	0,002mg/mL	0,004mg/mL	0,005mg/mL	0,1mg/mL	1mg/mL	IC ₅₀ (mg/mL)
TROLOX	24,5 %	41,8 %	51,8 %	86,5 %	99,8 %	99,9 %	2,6.10 ⁻³ $\pm$ 2,3.10 ⁻⁴
VITAM. C	3,25 %	17,8 %	19,0 %	19,3 %	92,8 %	99,8 %	4,3.10 ⁻² $\pm$ 1,9.10 ⁻²

APÊNDICE 7 – Espectros de RMN de ^{13}C e ^1H .

F I1-20 (JANAINA/TELMA) (RMN 1H/MEOD) OPER. Regivaldo 18-04-13



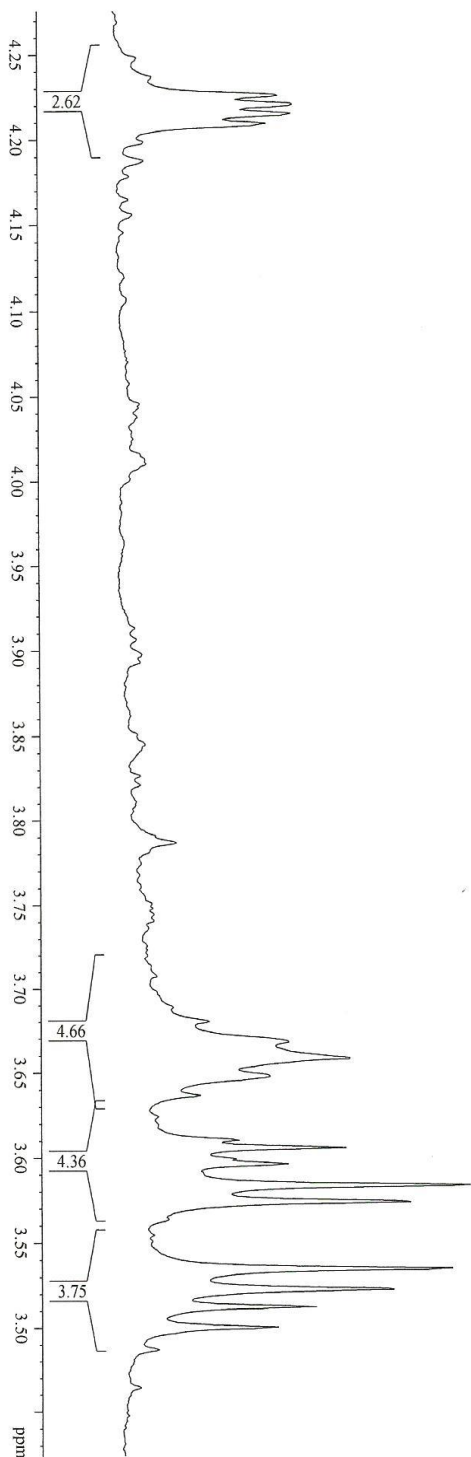
Current Data Parameters
 NAME F I1-20
 EXPNO 1
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130418
 Time 15:41
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H-4BB
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 8
 DS 0
 SWH 12019.230 Hz
 FIDRES 0.183399 Hz
 AQ 2.7263477 sec
 RG 90.5
 DW 41.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 299.8 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1
 CHANNEL f1
 NUC1 1H
 P1 9.70 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 499.773982 MHz
 F2 - Processing parameters
 SF 499.770058 MHz
 SI 32768
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

F 11-20 (JANAINA/TELMA) (RMN 1H/MEOD) OPER. Regivaldo 18-04-13

4.2257
4.2205
4.2150
4.2092

3.6804
3.6681
3.6586
3.6482
3.6369
3.6106
3.6062
3.5993
3.5965
3.5838
3.5741

3.5347
3.5227
3.5123
3.5003



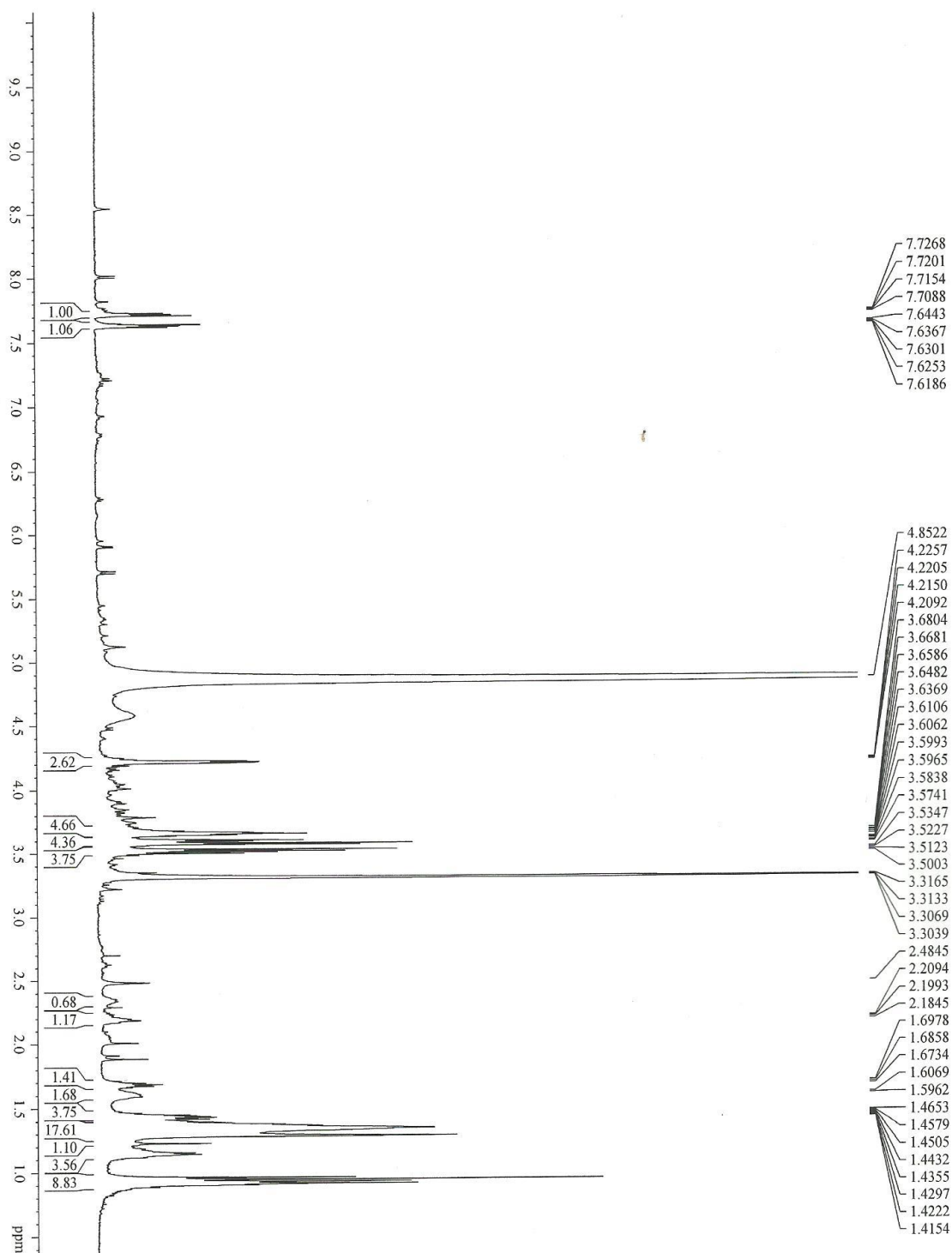
Current Data Parameters
NAME F11-20
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130418
Time 15:41
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
PULPROG zg
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 8
DS 0
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.183399 Hz
AQ 2.7263477 sec
RG 90.3
DW 41.600 usec
DE 6.00 usec
TE 299.8 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.70 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 499.773982 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 499.770058 MHz
WDW no
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

F 11-20 (JANAINA/TELMA) (RMN 1H/MEOD) OPER. Regivaldo 18-04-13



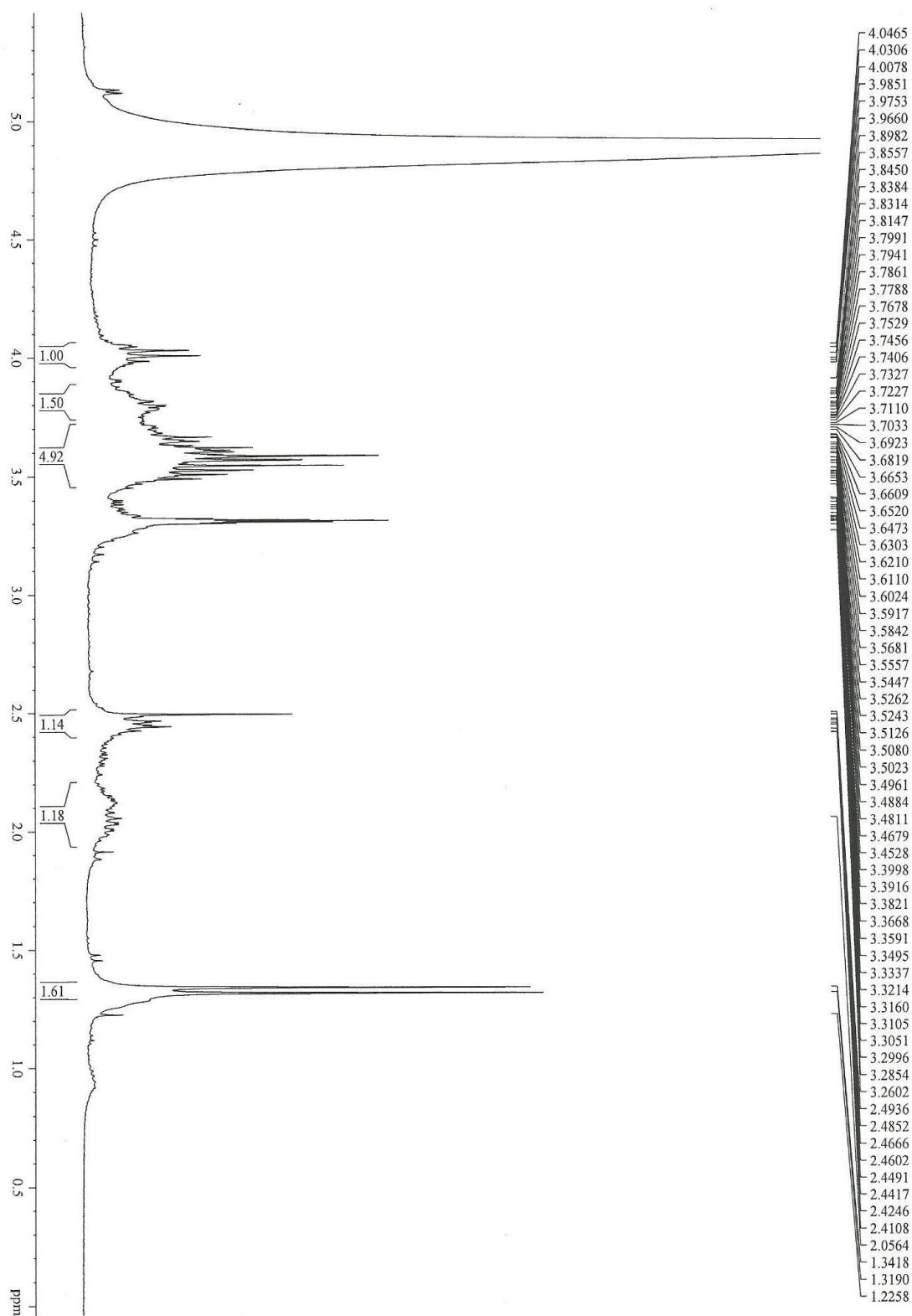
Current Data Parameters
 NAME F11-20
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130418
 Time 15:41
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 8
 DS 0
 SWH 12019.230 Hz
 FIDRES 0.183399 Hz
 AQ 2.7263477 sec
 RG 90.5
 DW 41.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 299.8 K
 D1 1.00000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 9.70 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 499.7739982 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 499.7700058 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

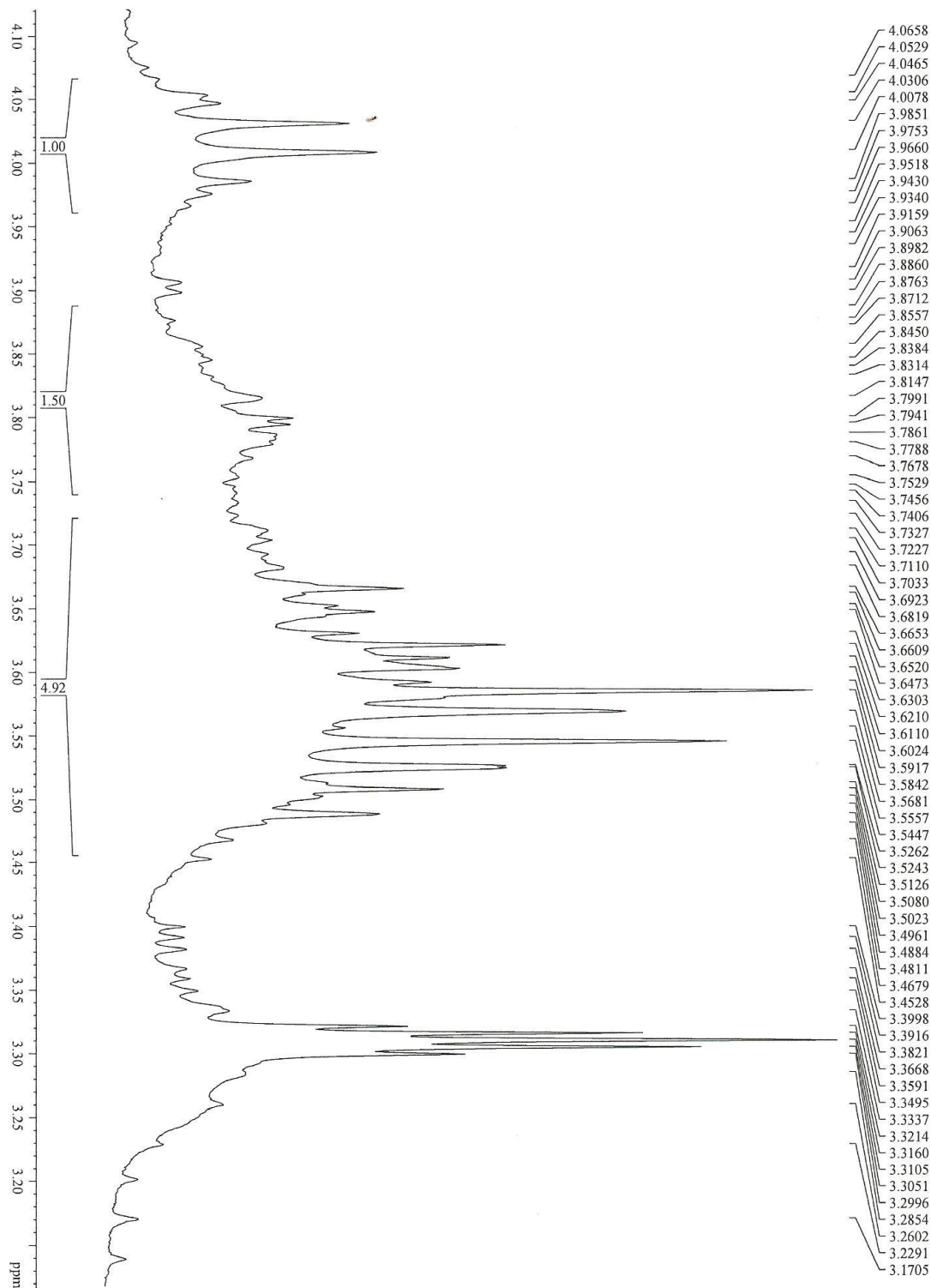
F-35-60 [Telma/Jamaina - LBPN/UFQ] [RMN 1H, MeOH] Operator Ricardo



Current Data Parameters
NAME: F-35-60
EXPNO: 1
PROCNO: 1
Date_: 20130615
Time: 11:26
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13C/
PULPROG: zg
TD: 65536
SOLVENT: 32 MeOD
NS: 0
DS: 0
SWH: 7183.908 Hz
FIDRES: 0.109618 Hz
AQ: 4.5613546 sec
RG: 327.5
DV: 65.600 usec
DE: 10.00 usec
TE: 300.0 K
D1: 1.00000000 sec
TD0: 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 1H
P1: 10.25 usec
PL1: 0.00 dB
SFO1: 300.1324010 MHz
F2 - Processing parameters
SI: 32768
WDW: 300.130046 MHz
SSB: 0
LB: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00

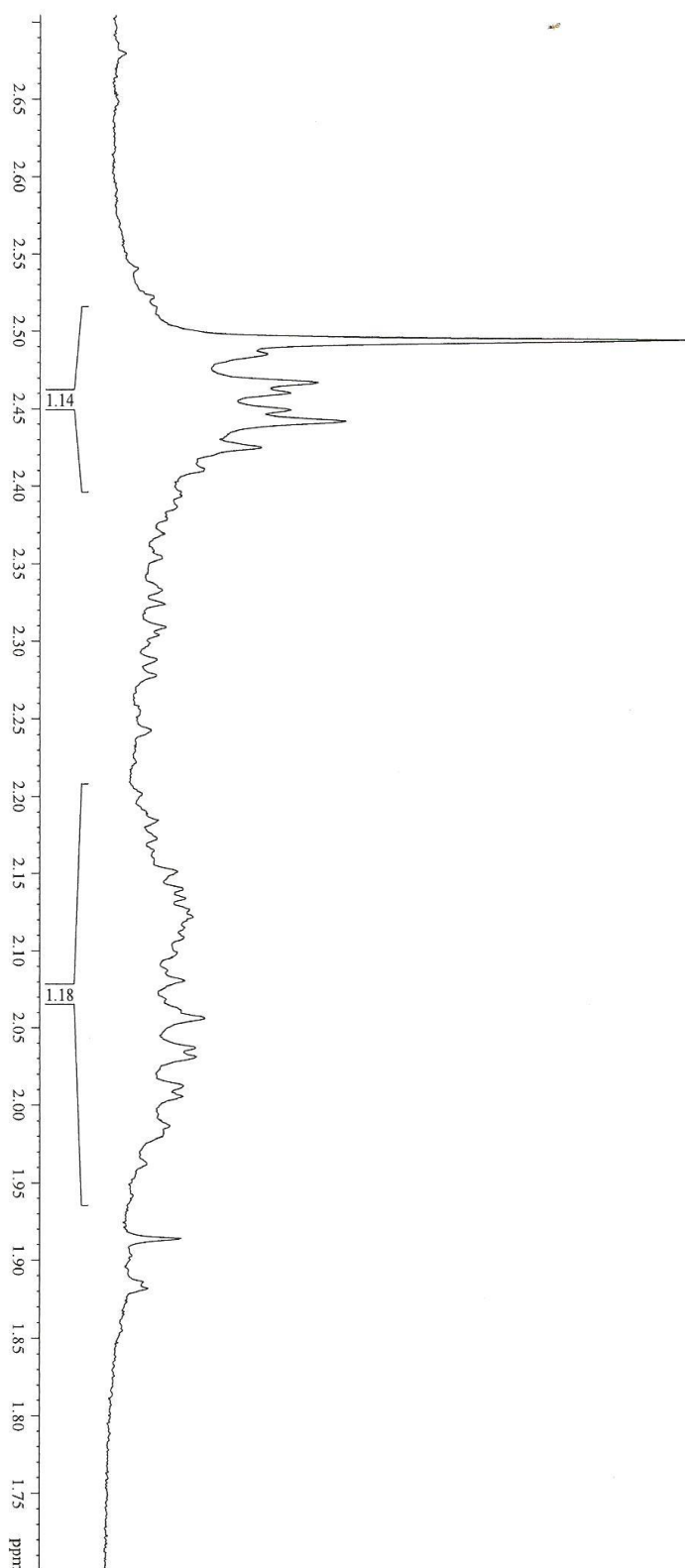
F-35-60 (Telma/Janaina - LBP/N/UFQ) [RMN 1H, MeOH] Operator Ricardo



Current Data Parameters
 Name: F-35-60
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 Date_: 20150615
 Time: 11:56:15
 F2 - Acquisition Parameters
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm Dual 13C/
 PULPROG: zgpg30
 SOLVENT: MeOH
 NS: 32
 DS: 0
 SWH: 7183.908 Hz
 FIDRES: 0.00181 Hz
 AQ: 4.501556 sec
 RG: 37
 DW: 69.600 usec
 DE: 10.00 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 1.6000000 sec
 TD0: 1
 CHANNEL f1
 NUC1: 1H
 P1: 10.25 usec
 PL1: 3.00 dB
 SFO1: 300.1324010 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 300.1300046 MHz
 WDW: no
 SSB: 0
 LB: 0.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

F-35-60 (Telma/Janaina - LBPN/JFC) [RMN 1H, MeOH] Operator Ricardo

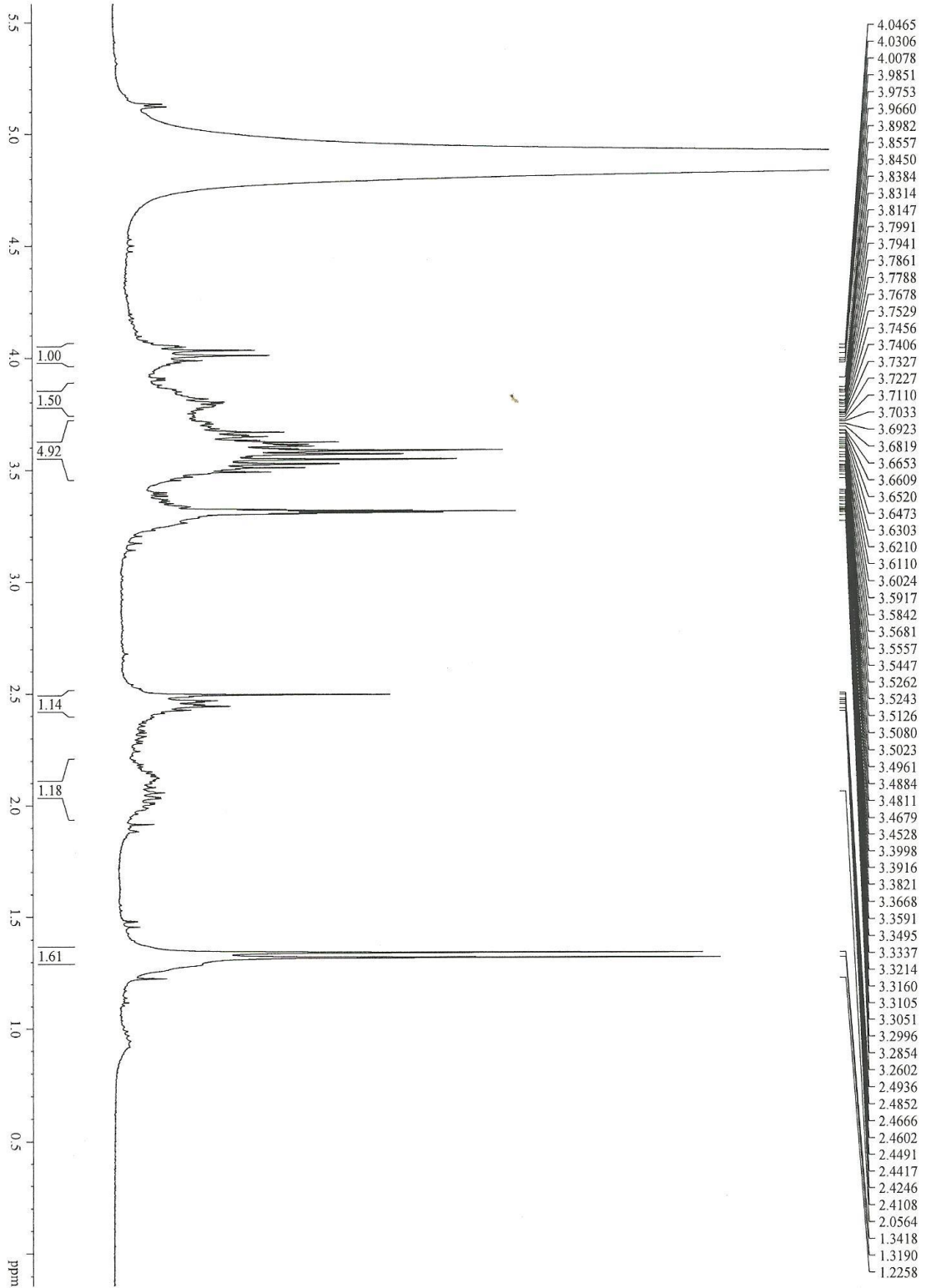
2.5217
 2.4936
 2.4852
 2.4666
 2.4602
 2.4491
 2.4417
 2.4246
 2.4108
 2.3935
 2.3869
 2.3695
 2.3537
 2.3331
 2.3244
 2.3092
 2.3042
 2.2987
 2.2880
 2.2779
 2.2426
 2.1845
 2.1726
 2.1647
 2.1512
 2.1397
 2.1341
 2.1220
 2.1153
 2.1088
 2.0989
 2.0810
 2.0564
 2.0369
 2.0312
 2.0123
 2.0058
 1.9872
 1.9142
 1.8821



Current Data Parameters
 Name: F-35-60
 EXPNO: 1
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ : 2011126
 Time : 11:26
 INSTRUM: spect
 PROBHD: 5 mm Dual 13C/
 PULPROG: zgpg30
 SOLVENT: MeOD
 NS: 32
 DS: 0
 SWH: 7183.928 Hz
 FWHZ: 0.1329314 Hz
 AQ: 4.5613556 sec
 RG: 57
 DW: 65.600 usec
 DE: 19.000 usec
 TE: 300.2 K
 D1: 1.00000000 sec
 TDO: 1
 CHANNEL f1
 NUC1: 13C
 P1: 10.25 usec
 PL1: 3.00 dB
 SFO1: 300.1324010 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 300.1300046 MHz
 WDW: no
 SSB: 0
 LB: 0.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.00

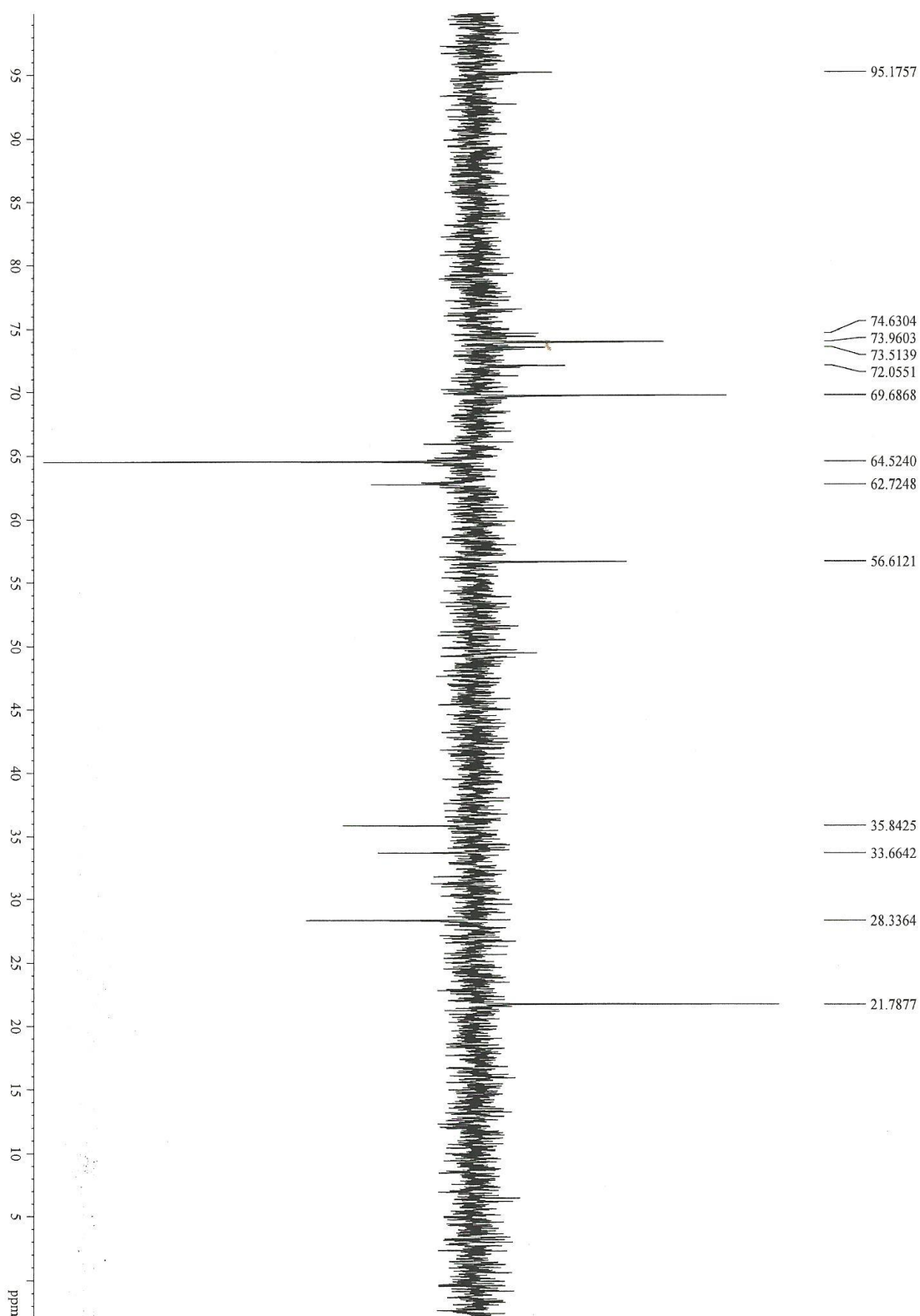
MeOD

F-35-60 (Telma/Jamaina - LBP/UFV) [RMN 1H, 400 MHz] Operator Ricardo

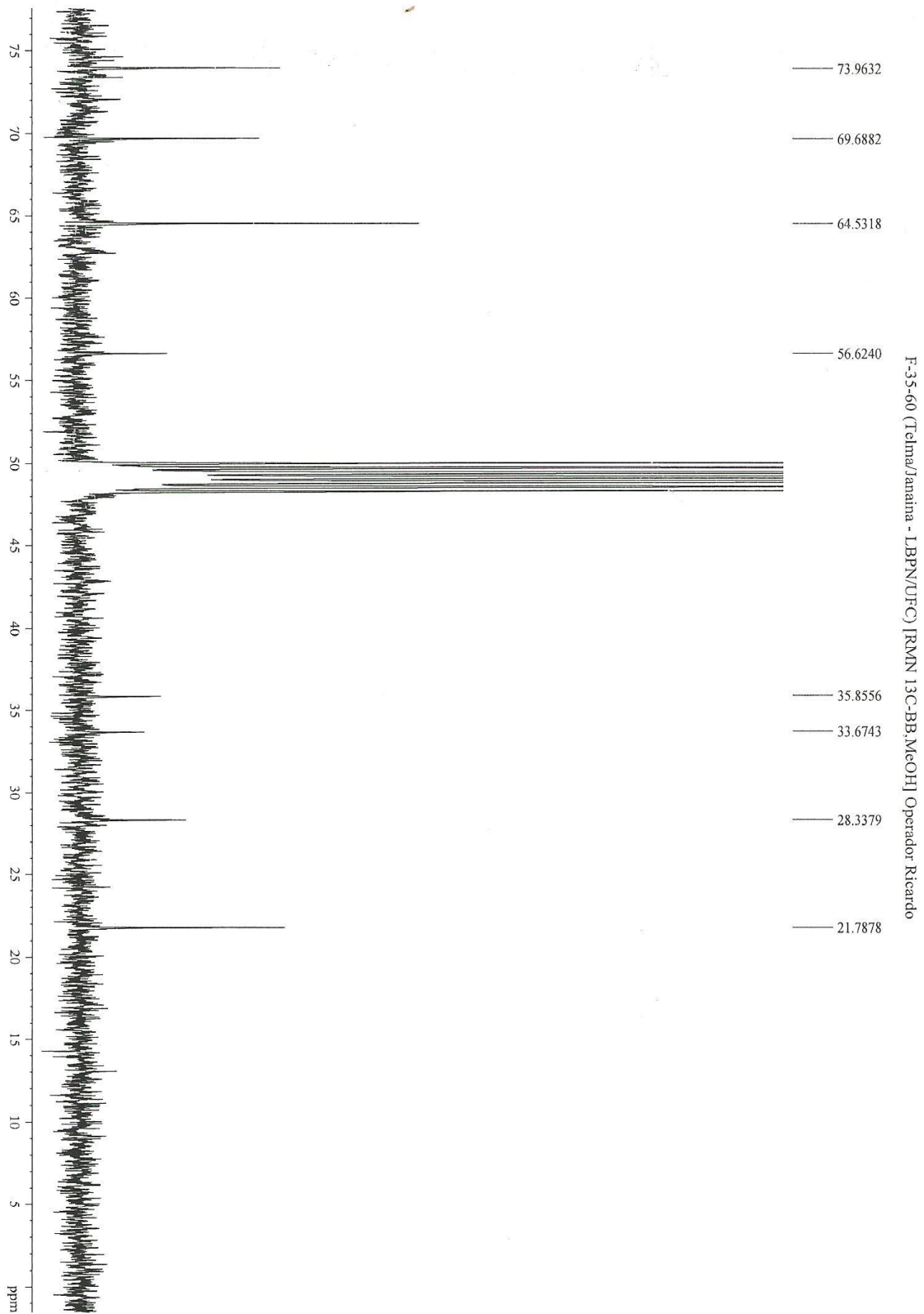


Current Data Parameters
NAME: Patricia F-35-60
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ Time: 20130615 11:26
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm Dual 13C/
PULPROG: zgpg30
TD: 65536
SOLVENT: MeOD
NS: 32
DS: 4
SWH: 7183.908 Hz
FIDRES: 0.109618 Hz
AQ: 4.5613556 sec
RG: 57
SD: 3.6000 usec
DE: 10.00 usec
TE: 300.0 K
D1: 1.00000000 sec
TD0: 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 1H
P1: 10.25 usec
PL1: 3.00 dB
SFO1: 300.1324010 MHz
F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 300.1300046 MHz
WDW: no
SSB: 0
LB: 0.00 Hz
GB: 0
PC: 1.00

F-35-60 (Tehma/anaína - LBPN/UFC) [RMN 1H, MeOH] Operador: Ricardo



Current Data Parameters
 NAME: Patricia F 35-60
 EXPNO: 3
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20130615
 Time: 13.58
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 TD: 65536
 SOLVENT: MeOD
 NS: 1024
 DS: 4
 SWH: 17985.611 Hz
 FIDRES: 0.274439 Hz
 AQ: 1.8219508 sec
 RG: 16384
 RW: 17.000 usec
 DE: 11.000 usec
 TE: 300.0 K
 CNST2: 145.0000000 sec
 D1: 1.00000000 sec
 d2: 0.00334828 sec
 DELTA: 0.00000000 sec
 TDO: 1
 CHANNEL F1
 NUC1: 1H
 P1: 11.50 usec
 P2: 23.00 usec
 PL1: 3.00 dB
 SFO1: 75.4752953 MHz
 CHANNEL F2
 CPGPRG2: waltz16
 NUC2: 1H
 P3: 12.00 usec
 P4: 24.00 usec
 P5: 8.00 usec
 PL2: 3.00 dB
 PL12: 19.48 dB
 SFO2: 300.1312005 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI: 32768
 SF: 75.467626 MHz
 WDW: EM
 SSB: 0
 LB: 1.00 Hz
 GB: 0
 PC: 1.40



Current Data Parameters
NAME Patricia F 35-60
EXPNO 2
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130615
Time 11:32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 2048
DS 0
SWH 17985.611 Hz
FIDRES 0.274439 Hz
RG 1.32768
AQ 32.768
DWT 27.800 usec
DE 10.00 usec
TE 300.0 K
D1 1.000000 sec
d11 0.0300000 sec
DELTA 0.89999998 sec
TD0 1
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 11.50 usec
PL1 3.00 dB
SFO1 75.4752953 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPRPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 19.48 dB
PL12 19.48 dB
PL13 19.48 dB
SFO2 300.1312005 MHz
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 75.4676326 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40