



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TESE DE DOUTORADO

Ivana Gláucia Barroso da Cunha

Potencial Biotecnológico de micro-organismos da rizosfera e endofíticos
isolados da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae.

Recife-PE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
TESE DE DOUTORADO

Potencial Biotecnológico de micro-organismos da rizosfera e endofíticos
isolados da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae.

Tese de Doutorado submetida no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas na subárea Produtos Naturais.

Prof^a Dr^a Dra Elba Lucia Cavalcanti de Amorim

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Dra Janete Magali e Araújo

CO-ORIENTADORA

Ivana Gláucia Barroso Da Cunha

DOUTORANDA

Recife-PE

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária:Mônica Uchôa, CRB4-1010

C972p Cunha, Ivana Gláucia Barroso da.
Potencial biotecnológico de micro-organismos da rizosfera e endofíticos isolados da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae / Ivana Gláucia Barroso da Cunha. – 2015.
167 f.: il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientador: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.
Inclui referências e apêndices.

1. Endófitos. 2. Rizosfera. 3. Biotecnologia. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-116)

IVANA GLÁUCIA BARROSO DA CUNHA

Potencial Biotecnológico de micro-organismos da rizosfera e endofíticos isolados DA planta *ipomoea pes-caprae* (L.) R. BR. CONVULVULACEAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 11/ 02/ 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Ivone Antônia de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Janete Magali de Araújo (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva (Examinador Externo)
University of Copenhagen

Prof.^a Dr.^a Leonor Alves de Oliveira da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a Dr^a Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr Antônio Rodolfo De Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr Dalci José Brondani

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a Dr^a Ana Cristina Lima Leite

Dedicatória

Aos meus pais que acreditam na educação como o único caminho para o crescimento do ser humano e como o único tesouro que levaremos para outra vida. Ao meu marido Júnior Grangeiro por sempre pelo incentivo e companheirismo nesta conquista.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela oportunidade de aprendizado intelectual e espiritual durante o tempo de desenvolvimento deste trabalho

Aos meus pais, irmão, cunhada e sobrinhos pelo apoio incondicional de sempre, mesmo estando distante fisicamente.

Ao meu marido, pela paciência, compreensão e por servir de motoristas todos os dias após os trabalhos cansativos do laboratório.

A professora Janete Magali, por um dia ter dito SIM. Atraves desta palavra obtive o título de mestre, em consequência outras oportunidades surgiram.

A professora Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim pela confiança e pela tranquilidade e paz ao término desta caminhada.

Ao meu amigo Luis Cláudio pelo apoio incondicional em todas as horas.

Aos meus amigos de trabalho Carol, Emerson e Iasmim que me ajudaram em vários experimentos até tarde da noite.

A Aline Dayse e Thalita Pedon pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

A professora Leonor pelo exemplo de trabalhos e pela oportunidade de aprendizado.

A Faculdade Pernambucana de Saúde pela compreensão nos dias que estive ausente para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos demais amigos que sempre ajudaram direta e indiretamente neste caminho.

Aos técnicos do Laboratório de Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos.

Epígrafe

“... Às vezes o Sim constrói, mas o Não constrói muito mais. Ele engrandece a gente, porque fortalece, nos dá coragem. O Não é importante...”

Tareco e Mariola- Petrúcio Amorim

RESUMO

A busca por novos metabólitos secundários de interesse biotecnológicos tem aumentado nos últimos anos. O objetivo foi isolar micro-organismos endofíticos e da rizosfera, avaliar o potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos e da rizosfera de *Ipomoea pes-caprae*. Os endófitos isolados foram inoculados em meio específico para bactérias, actinobactérias (ALA, Meio Completo, ISP₂) e fungos (BDA e Agar Sabouraud) à temperatura de 30°C. Para o isolamento das actinobactérias da rizosfera foi utilizado 10 g da amostra do solo rizosférico e este foi misturado a 90 mL de NaCl a 0,9%(m/v) a pH (5,6). Estes micro-organismos foram cultivados em meios de cultura ISP₂ e Czapeck Dox a 30 °C por 7 dias. Foi realizada atividade antimicrobiana de todos os micro-organismos isolados tanto endofítico como rizosféricos. Para a enzima L- asparaginase foi realizada análise qualitativa e cinética através de Fermentação Semi-Sólida com farinha de soja como substrato. Além da análise qualitativa da L-asparaginase foi verificada a presença de hidrolase (amilase, protease, celulase e lipase. A análise química do extrato metanólico do endófito *Streptomyces* sp, fungos e actinobactéria rizosférica *Nocardia* sp foi realizada utilizando a cromatografia de camada delgada (CCD). Das bactérias endofíticas foi avaliada sua capacidade de produção de Ácido Indol Acético. As frequências de endófitos isolados foram: fungos-folha 44.71% (55/123), fungos raízes 13% (16/123), bactérias-folhas 41.46% (51/123), bactérias raízes 1.62% (2/123), actinobactéria 0,81% (1/123). Da rizosfera foram isolados 81 actinobactérias. Na atividade antimicrobiana a maioria dos micro-organismos da rizosfera e endofíticos apresentou atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas. No extrato dos micro-organismos endofíticos e rizosférico como no extrato da planta foram verificadas a presença de composto monossesquiterpenos. A produção de L-asparaginase foi verificada nos micro-organismos endofíticos e nas actinobactérias rizosférica. Na cinética de produção de L-asparaginase pelo endófito *Streptomyces* sp, verificou-se que o melhor dia de produção foi de 10º dia (0,0702 U/mL de L-asparaginase). Com relação as hidrolase foi verificado a presença de amilase e protease na maioria dos endofíticos. Das 53 bactérias endofíticas isoladas, 8 linhagens são produtoras de ácido indol acético. Por tanto, a prospecção dos micro-organismos rizosféricos e endofíticos isolados da planta *I. pes-caprae* (L.) R. Br. é uma promissora fonte de substâncias de interesse biotecnológico.

Palavras chave: endófitos. rizosfera. biotecnologia.

ABSTRACT

The search for new secondary metabolites of biotechnological interest has stepped up in recent years. The aim of present study was to isolate endophytic and rhizosphere micro-organisms to evaluate the secondary metabolites produced by micro-organisms associated with the leaves, roots and rhizosphere of *Ipomoea pes-caprae*. The endophytes isolated were inoculated in media specific to actinobacteria, bacteria (ALA, full medium, ISP₂) and fungi (BDA and Agar Sabouraud) at a temperature of 30°C. The isolation of actinobacteria from the rhizosphere used 10 g of the rhizosphere soil sample mixed with 90 mL of NaCl at 0.9% (m/v) and pH 5.6. These micro-organisms were cultivated in ISP₂ and Czapeck Dox culture media at 30 °C for 7 days. Antimicrobial activity was analyzed. Qualitative analysis, 2³ experimental planning and kinetic analysis of the enzymatic activity of L-asparaginase was carried out using semi-solid fermentation with soya flour as a substrate. Chemical analysis of the methanolic extract of the endophyte *Streptomyces* sp, fungi and the rhizosphere actinobacteria *Nocardia* sp was conducted using thin layer chromatography (TLC). The capacity of the endophytic bacteria to produce indole acetic acid was measured. The frequencies for isolated endophytes were: fungi-leaves 44.71% (55/123), fungi-roots 13% (16/123), bacteria-leaves 41.46% (51/123), bacteria-roots 1.62% (2/123), and actinobacteria 0.81% (1/123). Eighty-one actinobacteria were isolated from the rhizosphere. Most of the rhizosphere and endophytic micro-organisms exhibited antimicrobial properties against Gram-positive bacteria. Mono-sesquiterpene compounds were found in the endophytic and rhizospheric micro-organisms and in the plant extract. Production of L-asparaginase was found in endophytic micro-organisms and in actinobacteria from the rhizosphere. 2³ experimental planning of the production of the L-asparaginase enzyme by the *Streptomyces* sp endophyte suggests that the lower the quantity of micro-organism inoculate, the concentration of L- asparagine and temperature, the better the production of the L-asparaginase enzyme. The kinetics of L-asparaginase production by the *Streptomyces* sp endophyte showed that the best day for production was the 10th (0.0702 U/mL of L-asparaginase). Of the 53 endophytic bacteria isolated, eight strains produced indole acetic acid. The prospection of rhizosphere and endophytic micro-organisms isolated from *I. pes-caprae* (L.) R. Br. is thus a promising source of substances of biotechnological interest.

Key-words: endophytes. rhizosphere. biotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Reação catalisada pela L-asparaginase (GULATI et al., 1997).....	36
Figura 2- Mecanismo proposto para a formação de acrilamida em alimentos (FENNEMA et al., 2010)	38
Figura 3- Esquema geral para obtenção da enzima L-asparaginase.....	42
Figura 4- <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br., Convolvulacea.....	44
Figura 5– Área de coleta das amostras <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br., Praia do Forte, Forte Orange, Itamaracá-Pernambuco.	50
Figura 6- <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br. depositada no herbário no Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA, Exsicata N° 85782.	51
Figura 7-Etapas do processo de desinfecção, isolamento, purificação e preservação dos micro-organismos endofíticos (CONTI, 2012).	52
Figura 8 – Esquema do Isolamento das actinobactérias da rizosfera <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br. ..	54
Figura 9- Esquema do ensaio antimicrobiano em “bloco de gelose”.	57
Figura 10- Esquema geral da sequencia da fermentação submersa do endófito <i>Streptomces sp</i>	59
Figura 11- Esquema da atividade antimicrobiana em disco.....	60
Figura 12- Esquema geral pra preparação da fermentação em Substrato Sólida.	61
Figura 13-Esquema geral da fermentação Substrato Sólido para produção de L-asparaginase..	68
Figura 14 - Isolamento e purificação dos endófitos de raiz e folhas <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br, fungo da raiz (A), fungo da folha (B), fungos das folhas (C), bactérias das folhas (D), bactéria da folha (E) e bactéria purificada (F) respectivamente.	72
Figura 15- Purificação dos micro-organismos endofíticos bactérias (G e H), levedura (I) e Actinobactéria (J) respectivamente.	73
Figura 16– Colônias de actinobactérias em placa no Meio Czapeck Dox Ágar – salino, amostra 2 diluição 10^{-3}	76
Figura 17- Relação das unidades formadoras de colônias de actinobacterias isoladas em diferentes meios de cultura ISP ₂ , ISP ₂ salino, Czapeck e Czapeck salino.	77
Figura 18- Característica macromorfológica do endófito <i>Streptomyces sp</i> isolado da folha <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br.....	79
Figura 19– Características micromorfológicas do endótifito SAB3F3 <i>Streptomyces sp</i> isolado da folha <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.....	79
Figura 20– Análise morfológica as bactérias endofíticas isoladas de folhas e raízes <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br.....	82

Figura 21- 3F3 identificado como <i>Aspergillus terreus</i> foi isolada da folha <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br	87
Figura 22- Halo de inibição $\pm$ (32.33 e 31.66) mm, dos endofíticos <i>A. terreus</i> 3F2/4A, 3F2/2B frente ao micro-organismo teste <i>S. aureus</i>	88
Figura 23 – Halo de inibição (mm) do endófito 2F4/4 com halo de inibição de $\pm$ 30.0 mm para o micro-organismo teste <i>E. coli</i>	92
Figura 24- Halo de inibição (mm) da atividade antimicrobiana dos micro-organismos da rizosfera <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br	94
Figura 25- Fermentação do endófito <i>Streptomyces</i> sp em dois Erlenmyer de 500 mL com meio sólido de arroz com 21 dia de crescimento.	97
Figura 26 - Caracterizações química dos extratos MeOH das biomassas dos micro-organismos A- <i>Nocardia</i> sp; B- <i>Streptomyces</i> sp, C*-1F1ISP2/3, D*- 3F2SAB/2-3, E*- 1R3ISP4/1, F*- 3F2SAB/4, G*- 3R3 SAB/5, H- extrato da folha da planta e P – padrão Timol com a detecção da presença de mono e sesquiterpenos. *Todos são extratos de fungos endofíticos.	99
Figura 27- Teste qualitativo dos fungos 1F1 e 3R3, endófito <i>Streptomyces</i> sp, <i>Nocardia</i> sp resultado positivo e A231 rizosférica resultado negativo.	107
Figura 28- Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 obtido para produção de L-asparaginase, foi definido um intervalo de confiança de 95%.	112
Figura 29- Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as concentrações de L-asparagina 0.3 e 0.4 M com a temperatura de 37°C e 45 °C.	113
Figura 30- Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as variáveis L-asparagina, inóculo e temperatura.	114
Figura 31 - Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as variáveis L-asparagina 0.3 e 0.4 e quantidade de inóculo 0.25 e 0.5 mL.	115
Figura 32 – Cinética de produção de L-asparaginase do Grupo 1 em fermentação com	118
Figura 33- Cinética de produção de L-asparaginase do Grupo 2 em fermentação com substrato solido de farinha de soja e inóculo.	119
Figura 34– Bactérias endofíticas selecionadas como produtoras de ácido indol acético.	121
Figura 35– Teste colorimétrico para a seleção de bactérias endofíticas produtoras de ácido indol acético.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Variação da concentração de acrilamida encontrada em alguns produtos alimentícios que contém estas substâncias em níveis elevados (FENNEMA et al., 2010)	39
Tabela 2- Ingestão diária de acrilamida estimada para médios e grandes consumidores com base no consumo médio nacional de alimentos no Brasil (Modificado ARISSETO e TOLEDO, 2008).	40
Tabela 3– Variáveis e valores utilizados no planejamento experimental.....	70
Tabela 4 – A frequências de endofíticos isolados das folhas e raízes de <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br	74
Tabela 5- Atividade antimicrobiana de micro-organismos endofíticos isolados <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br	90
Tabela 6 - Avaliação da caracterização química dos extratos MeOH dos micro-organismos em comparação com o extrato MeOH da folha de <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br	98
Tabela 7- Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos de <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br.	102
Tabela 8- Avaliação qualitativa da produção de L-asparaginase por actinobactérias isoladas da rizosfera e endofíticas de <i>I. pes-caprae</i> (L.) R. Br oriunda da praia do Forte Orange, Itamaracá – PE.	105
Tabela 9- Quantificação da produção de L-asparaginase em meio sólido de farinha de soja... ..	109
Tabela 10– Variável do planejamento experimental 2 ³ com o resultado das concentrações de L-asparaginase e proteína total (U/mL).	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários (GALLO et al., 2008) ..	25
Quadro 2– Actinobactérias do gênero <i>Nocardia</i> produtoras de metabólitos secundários (modificado LUO et al., 2014).	30
Quadro 3– Actinobactérias produtores de metabólitos secundários (PUPO et al. 2006).	32
Quadro 4- Relação das substâncias encontradas na <i>I. pes-caprae</i> (MEIRA et al, 2012 com modificações).	46
Quadro 5-Condições cromatográfica de prospecção química do extrato MeOH dos micro-organismos endofíticos e da rizosfera e <i>I. pes-caprae</i>	64
Quadro 6– Fontes de carbono e seus reveladores específicos utilizados nos teste de atividade enzimática.	65
Quadro 7- Análise morfológica e bioquímica das bactérias endofíticas isoladas de folhas e raízes <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br	83
Quadro 8– Fungos endofíticos isolados da folha <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br	86

LISTA DE SIGLAS

DNA – ácido desoxirribonucleico;

LA – Leucemia Aguda

LLA- Leucemia linfoblástica aguda

FS- Fermentação Submersa

FSS – Fermentação em Substrato Sólido

UFPEDA – Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Antibióticos

B.O.D. – Biologycal Oxygen Demand

MeOH – Metanol

M- Molar

Rpm – Rotação por minuto

AIA – Ácido Indol Acético

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1..INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Micro-organismos Endofíticos.....	20
2.1.2 Bactérias não filamentosas endofíticas.....	23
2.1.3 Fungo endofíticos.....	24
2.4 Enzimas - L-asparaginase.....	33
2.5 Planta Medicinal.....	43
3. OBJETIVOS	48
3.1 Geral.....	48
3.2 Específicos	48
4. METODOLOGIA	50
4.1 Coleta das amostras vegetais.....	50
4.2 Desinfecções superficiais para o isolamento dos micro-organismos endofíticos	51
4.3 Isolamentos de micro-organismos endofíticos	53
4.4 Isolamentos de actinobactérias rizosféricas	53
4.4 Preservações dos microrganismos isolados.....	55
4.5 Identificações dos micro-organismos isolados.....	55
4.5.1 Identificação de Actinobactéria.....	55
4.5.2 Identificação das bactérias endofíticas	56
4.6. Teste primário em “bloco de gelose”- Atividade Antimicrobiana dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos.....	57
4.7. Cultivo dos micro-organismos selecionados no teste de atividade antimicrobiana e preparação dos extratos	57
4.7.1. Fermentação submersa (FS) dos micro-organismos.....	57
4.7.2 Fermentação Substrato Sólido (FSS) do endófito <i>Streptomyces</i> sp	60

4.7.3. Fermentação Semi-Sólido (FSS) actinobactéria rizosfera <i>Nocardia</i> sp.....	62
4.9. Atividade enzimática.....	64
4.9.1 Análise qualitativa dos fungos endofíticos produtores de enzimas celulasas, protease, amilases e lipase.....	64
4.9.2 Análise qualitativa dos micro-organismos endofítico e rizosférico para produção de enzima L-asparaginase	67
4.9.3.1 Dosagem de proteínas	69
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	72
5.1 Isolamentos dos micro-organismos endofíticos	72
5.3 Identificações dos micro-organismos.....	78
5.2.1 a) Morfologia do endófito Actinobactéria.....	78
5.2.1 b) Morfologia da Actinobactéria rizosférica	80
5.2.2 Identificação das bactérias endofíticas	81
5.2.3 Identificação de fungos filamentos e leveduras.....	86
5.2.4 Atividade Antimicrobiana- Teste primário em “bloco de gelose”	88
5.3. Cultivo dos micro-organismos endófito <i>Streptomyces</i> sp para a Fermentação Submersa.....	96
5.4. Cultivo dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos para preparação dos extratos..	96
5.4.1 Fermentação em Substrato Sólido dos micro-organismos	96
5.5 Teste de atividade enzimática	101
5.5.2 Análise qualitativa dos micro-organismos endofítico e rizosférico para produção de enzima L-asparaginase e L-glutaminase	104
5.2.7 Seleção das bactérias produtoras de Ácido Indol acético.....	120
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	123
REFERÊNCIA	125
APÊNDICE	161

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da tecnologia farmacêutica, o homem moderno pode ser compreendido e diferenciado das demais épocas por seu consumo elevado de medicamentos (VEIGA JUNIOR, 2008) e este uso indiscriminado leva à seleção de micro-organismos resistentes, existindo assim, uma necessidade contínua e cíclica por novos produtos biotivos (CLARDY e WALSH, 2006; LUNA et al., 2010).

Desta forma, a grande diversidade microbiana nos diferentes ecossistemas está associada a um grande potencial biotecnológico, o que tem incentivado intensos estudos com micro-organismos com habitats distintos (CONTI, 2012)

Na natureza existe uma interação complexa entre o meio ambiente, os vegetais, insetos, micro-organismos e animais marinhos que resulta em moléculas úteis para sua sobrevivência, e que são de interesse biotecnológico por apresentarem uma variedade de atividades biológicas (PUPO et al., 2006).

Segundo Berdy (2005) os micro-organismos se destacam como um dos principais produtores de metabólitos secundários em decorrência da sua diversidade genética e metabólica que é amplificada pelos diversos nichos ecológicos. Dentre estes habitats os micro-organismos, podemos relatar os da rizosfera que possuem atividade de degradar os nutrientes, auxiliar no crescimento das plantas e combater patógenos das raízes (HOFLICH et al., 1994; ZELLES, 1999; QIN et al., 2012; ZHAO, 2010; GEVERS et al., 2012);

À medida que as raízes das plantas se desenvolvem no solo, elas são capazes de influenciar a comunidade microbiana por meio da liberação de exsudados, fazendo com que a rizosfera seja caracterizada por uma comunidade microbiana selecionada

produtora de varias substâncias com atividade antimicrobiana. (De ANGELIS et al. 2008).

Da mesma forma os micro-organismos endofíticos nas últimas décadas vêm se destacando como bons produtores de metabólitos secundários com ênfase para as substâncias bioativas como antibióticos e enzimas que apresentam um grande potencial biotecnológico de interesse para a indústria farmacêutica (LACAVA et al., 2014).

Várias são substâncias produzidas pelos micro-organismos da rizosfera e endofíticos como os antibióticos, hormônios de crescimento e enzimas. As enzimas são os produtos microbianos mais explorados na indústria, assim, podemos afirmar que a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas, sendo estas aplicadas tanto na produção de medicamentos e desenvolvimento de novos produtos, quanto em diagnóstico clínico, terapia e na indústria de alimentos (SAID e PIETRO, 2002). Como exemplo de enzima de interesse farmacêutico temos a L-asparaginase - a primeira enzima com atividade farmacológica antineoplásica para leucemia linfoblástica aguda, a qual pode ser produzida por uma variedade de micro-organismos (PETERSON e CIEGLER, 1969; DeJONG 1972; SAVITRI e AZMI, 2003; SARQUIS et al., 2004).

Dentre as bactérias, diversas espécies de actinobactérias são consideradas promissoras fontes para produção de L-asparaginase, como por exemplo: *Streptomyces griseus*, *Streptomyces karnatakensis*, *S. albidoflavus*, *S. gulbargensis* (KATTIMANI et al. 2009), *S. aurantiacus* (GUPTA et al. 2007), *S. aureofasculus*, *S. canus*, *S. olivoviridis* (SAHU et al., 2007), um *Streptomyces* sp marinho. PDK2 (NARAYANA et al., 2008) e *Nocardia* sp. (KAVITA e KIJAYALASKSHMI, 2012).

Além do interesse na terapia como antineoplásicos, a L- asparaginase também é importante para a indústria de alimentos, pois a acrilamida é considerada um produto tóxico nos alimentos, sendo considerado agente carcinogênico e genotóxico, desta forma, a enzima pode auxiliar no processamento do alimento antes cozimento ou da fritura, reduzindo a produção de acrilamida nos alimentos ricos de carboidratos e aminoácidos (ARISSETO e TOLETO, 2008; DHANAM e KANNAN, 2013).

Assim a associação entre plantas e micro-organismos é importante por que neste contexto, as plantas podem ser vistos como superorganismos que dependem, em parte, da sua microbiota para as funções e características específicas e em troca, plantas depositam fonte de carbono que é obtido pela reação de fotossíntese e este carbono é fixado em suas imediações, como por exemplo, na rizosfera (NELSON, 2004; FREY-KLETT et al, 2007; RAAIJMAKERS et al, 2009;. BERENDSEN et al, 2012; VORHOLT, 2012), alimentando, assim, a comunidade microbiana e influenciando na sua composição e atividades.

A relação entre planta e micro-organismos é ainda pouco estudada, por isso estudar a microbiota da planta é fundamental para se conhecer seus micro-organismos e verificar os potenciais biotecnológicos oferecidos por eles.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Micro-organismos Endofíticos

Os micro-organismos apresentam diferentes possibilidades de associação com vegetais superiores e são conhecidos como endofíticos, quando colonizam o tecido vegetal sadio de partes aéreas da planta, em algum estágio do seu ciclo de vida (PETRINI, 1991). Os endofíticos igualmente como os patógenos penetram na planta e colonizam sistematicamente o hospedeiro (HALLMANN, et al., 1997). A aplicabilidade do termo endofítico é referida principalmente para bactérias e fungos que vivem em associação mutualística sem causar danos à planta (TAN; ZOU, 2001; OWEN; HUNDLEY, 2004; JOHRI, 2006; GUANATILAKA, 2006).

A diferença entre endofíticos e fitopatógenos foi primeiro relatado por Bary em 1866 citado por Azevedo (1998) e anteriormente em 1904 surgiu uma das primeiras publicações por Freeman citado por Owen e Hundley (2004) descrevendo endofíticos em *Lolium temulentum*, uma erva daninha considerada problemática para a agricultura do trigo.

A transmissão do endófito pela planta pode ser transversal, primeiramente, através das zonas radiculares ou transmitidos pelas sementes. A transmissão horizontal ocorre quando micro-organismos do ar utilizam aberturas naturais como estômato e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (KOBAYASHI, 2000; BACON; WHITE, 2000; SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005a; JOHRI, 2006).

Os endófitos induzem o aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, além de promoverem a tolerância do hospedeiro às substâncias tóxicas presente no solo como, por exemplo, o alumínio (HALLMANN et al., 1997; TAN; ZOU, 2001).

Outros efeitos positivos têm sido atribuídos aos micro-organismos endofíticos, como a promoção de crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doença (VERMA et al., 2008), produção de sideróforos (MAYER et. al., 1997) e produção de antibióticos (STROBEL; DAISY, 2003).

Peters et al.(1998) concluíram que a interação do endófito com o hospedeiro, através de metabólitos secundários liberados em culturas de *callus* do hospedeiro, resulta em uma resposta positiva no crescimento do *callus* ou no aumento da biomassa, mostrando que a interação endófitos - hospedeiros não é mera coincidência causada por um oportunista acidental, mas o resultado de uma adaptação ao longo da evolução entre endófitos-planta, sinalizando especificidade nas relações.

Esses micro-organismos são relativamente pouco estudados e considerados como fontes de grande potencial de produtos naturais, contribuindo na descoberta de moléculas biologicamente ativas de diversas classes (STROBEL; DAISY, 2003).

2.1.1 Actinobactérias endofíticas

Dentre os endofíticos encontram-se as actinobactérias. São bactérias que possuem sua importância em processos biotecnológicos (THATOI et al, 2013).

Bérdy (2005) observou que 45% das moléculas bioativas oriundas de micro-organismos foram isoladas de actinobactérias, 34% do gênero *Streptomyces* e 11% de outros gêneros raros como: *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* e *Streptosporangium*.

As actinobactérias especialmente o gênero *Streptomyces* ocorrem em sua maioria no solo, mas vários estudos mostram a ocorrência destas bactérias como endofítico de plantas superiores (CASTILLO et al., 2006).

Estudos com *Streptomyces* endofíticos baseado em pesquisas etnobotânica

possibilitam que a cura por plantas medicinais usadas pelos povos nativos, pode indicar a presença de endófito com potencial produção de novas moléculas bioativas (STROBEL; DAISY, 2003). Segundo Zin et al. (2007), o endófito *Streptomyces* tem a possibilidade de produzir metabólitos bioativos que não deve ser tóxico ao seu hospedeiro como enfatizado por Castilo et al. (2002) que destacaram compostos ativos pelo endófito *Streptomyces sp.*

Shimizu et al. (2004) extraíram os antimicrobianos actinomicina X2 e fungicromina de *Streptomyces galbus*, endofítico isolado da planta que pertence ao gênero *Rhododendron*.

Outro exemplo de fármacos são ácido 6- alquilsalicílico, salaceinas A e B que são produzidos pelo endófito *Streptomyces laceyi* MS53, isolado da planta medicinal *Ricinus communis* L. (KIN et al., 2006).

Tuntiwachwuttikul et al. (2008) isolaram da raiz da planta medicinal *Ficus benjamina* o endófito *Streptomyces sp.* SUC1, que produz o composto bioativo Lansai A-D, que apresenta atividade antitumoral e antifúngica.

Verma et al. (2008), isolaram actinobactérias endofíticas, com atividade antagonista para fungos fitopatógenos e bactérias Gram-positivas e negativas, os quais foram isoladas da planta *Azadirachta indica* A. Juss.

Streptomyces sp (CS) isolado da planta *Maytenus hookeri* possui atividade antitumoral (LI, LU, SHEN, 2010).

Streptomyces albidoflavus isolado da planta *Bruguiera gymnorhiza* apresentou atividade antifúngica (LEI –LEI et al., 2010).

2.1.2 Bactérias não filamentosas endofíticas

As bactérias endofíticas além de serem produtoras de antibióticos possuem outras atividades, como controle biológico de pragas e doenças nas plantas, fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento das plantas (DOWNING et al., 2000; VERMA et al., 2008; DÖBEREINER; BODDEY, 1981), indução de resistência sistêmica (HALLMANN, 1997), produção de sideróforos (BURD et al., 1998; WENBO et al., 2001).

A promoção de crescimento da planta incluem aumentos na altura, na biomassa, do caule e da raiz e na formação de pelos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (PILLAY; NOWAK, 1997; STURTZ, 1995).

As bactérias endofíticas promovem o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (LEE et al., 2004; ZAKRAHOVA, 1999; KUKLINSKY-SOBRAI, 2004).

O ácido indol acético é uma auxina importante de ocorrência natural que provocam efeitos fisiológicos na planta, como aumento do crescimento apical (ZINNIEL et al., 2002). Este hormônio é comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento como *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillumbrasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (VESSEY, 2003).

Asghar et al. (2002); Khaliq et al. (2004) relatam que bactérias endofíticas são capazes de produzir grandes quantidades de auxinas “*in vitro*” que, quando inoculados em plantas, promovendo o aumento do crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle.

2.1.3 Fungo endofíticos

Além das bactérias e actinobactérias os fungos endofíticos são capazes de desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros variando de mutualismo a parasitismo (SCHARDL et al., 2004).

Os estudos de fungos endofíticos são de grande importância científica, por sua aplicabilidade em estudos na prospecção de novas substâncias como os novos antimicrobianos (Tabela 1), no controle de pragas, indicação de deficiências nutricionais de plantas, contribui como fonte de diversidade, variabilidade para os outros fungos, inibidores de enzimas e pigmentos, entre outras aplicações (VINING, 1986; PHOTITA et al., 2001; KUMARESAN; SURYANARYANAN, 2001; ARAÚJO et al., 2002; VILA-AIUB et al., 2003), (OTERO et al., 2002), GAMBOA, BAYAN, 2001).

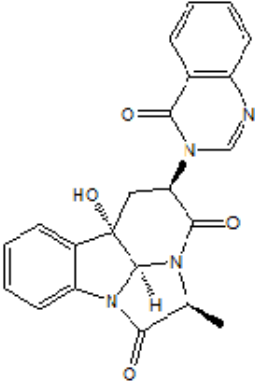
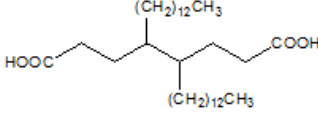
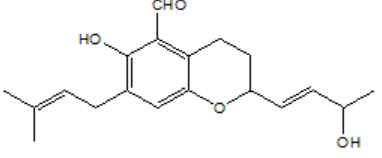
Além dos antimicrobianos, os fungos endofíticos constituem um grupo de micro-organismos com capacidade de produção de varias enzimas tais como: amilases, lípases, esterases, celulasas e proteases (STAMFORD et al., 1998; BASCOM-SLACK et al., 2009).

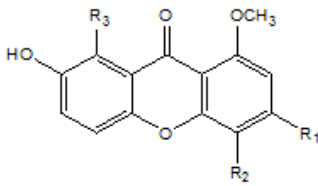
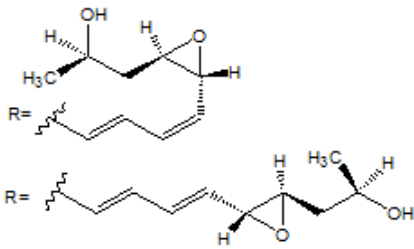
Além das enzimas, podemos citar outros metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos de regiões tropicais: ácido 3-hidroxipropiônico produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis phaseoli* que foi isolado de folhas de arvores da Guiana Francesa e o endófito *Melanconium betulinum* isolado *Betula pendula* and *B. pubescens*, ambos apresentaram atividade nematicida contra a planta-parasita *Meloidogyne incognita* , apresentando uma DL50 entre 12,5-15,0 µg / mL (SCHWARZ et al., 2004).

Os fungos endofíticos *Penicillium sp* e *P. janthinellum* isolados de *Melia azedarach* são bons produtores de novas substâncias químicas. *Penicillium sp* produz cinco novos meroterpenos (SANTOS; RODRIGUES-FO, 2002; SANTOS;

RODRIGUES-FO, 2003), e o endófito *P. janthinellum* produz um novo esteroide neociclocitrinol (MARINHO et. al., 2005a) e uma nova antraquinona, Jantinona (MARINHO et. al., 2005b), mostrando a grande importância de pesquisas com endofíticos, visando a obtenção de metabólitos bioativos.

Quadro 1– Fungos endofíticos produtores de metabólitos secundários (GALLO et al., 2008)

Planta	Endofítico	Composto	Referência
<i>Adenophora axiliflora</i>	<i>Chaetomium</i> sp. IFB-E015	 Chaetominine -Alcalóide	JIAO et al., 2006
<i>Argyrosomus argentatus</i>	<i>Myrothecium</i> sp.Z16	 4,5- ácido ditridecil octanodiol	LIU et al., 2006
<i>Polysiphonia urceolata</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	 Chaetopyranin	WANG et al., 2006

	<i>Xylaria</i> sp. FRR 5657	 $R_1=CH_2OH$; $R_2=R_3=H$ $R_1=CH_3$; $R_2=OH$; $R_3=COOH$ Xantonas	DAVIS e PIERENS, 2006.
<i>Ephedra fasciculata</i>	<i>Chaetomium chiversii</i>	 Isocumarinas	WIJERATNE et al., 2006

2.2 Solo e rizosfera

O solo é considerado um ambiente complexo que sofre variações ambientais e possui várias funções: fornece boa parte dos alimentos, participa do ciclo da água através de várias reações físico-químicas, além de servir de habitat para diversos micro-organismos (MELO e AZEVEDO, 2008).

Os micro-organismos do solo constituem populações bastante numerosas em termos médios, as populações de bactérias, fungos e actinobactérias variam de 10^6-10^9 , 10^3-10^7 e 10^4-10^8 UFC g⁻¹ de solo, respectivamente (SIQUEIRA, 1988) e contribuem de forma eficaz na complexa estrutura do solo, auxiliam no crescimento das plantas atuando como competidores contra micro-organismos exógenos, patógenos e predadores (MELO e AZEVEDO, 2008; ALEF E NANNIPIERRI, 1995).

Dentre as bactérias existentes no solo, encontram-se as autotróficas, as heterotróficas, as aeróbias, as anaeróbias e, dependendo da temperatura do solo, as mesofílicas e, as termófilas e ainda possuem as bactérias fixadoras de nitrogênio, nitrificantes, e desnitrificantes, bactérias que degradam celulose, proteína, pectina, ácido butírico, e ureia (BLACK, 2002).

No solo existe uma região com a microbiota bastante variável, esta região chama-se rizosfera cuja definição é região do solo que sofre influência das raízes das plantas, sendo caracterizada como uma região de alta atividade microbiana (KENT e TRIPLETT, 2002).

Os micro-organismos rizosféricos possuem a capacidade de degradar os nutrientes, auxiliar no crescimento das plantas e combater patógenos das raízes (HOFLICH et al., 1994; ZELLES, 1999; QIN et al., 2010; ZHAO, 2010; GEVERS et al., 2012). Entre as espécies mais estudadas destacam-se *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, entre outras (HAYAT et al., 2010).

No entanto, a rizosfera também se mostra como um nicho favorável para Actinobactérias e tem-se observado que os gêneros comumente encontrados na rizosfera das plantas cultivadas são *Streptomyces* e *Nocardia* (SIQUEIRA; FRANCO, 1988; PEREIRA, et al., 1999a).

2.2.1 Actinobactéria rizosférica

Estudos ecológicos das populações de actinobactérias são de extrema importância, visto que esses micro-organismos formam esporos e conídios, permitindo a sua

sobrevivência em condições adversas (WILLIAMS, et al., 1972; VOBIS, 1997). Estes compostos bioativos são de elevado valor comercial, e, portanto, actinomicetos são regularmente pesquisados para a produção de compostos bioativos.

Silva (2009) relatou que o extrato bruto *Streptomyces gougerotii* isolado da rizosfera *Caesalpinia pyramidalis* apresentou Concentração Inibitória Mínima (CMI) de 0,97 µg/mL para *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) e *Bacillus subtilis*, enquanto o extrato bruto de acetato de etila apresentou CMI de 3,9 µg/mL para *S. aureus* e *S. aureus* MRSA.

A linhagem *Streptomyces griseoruber* isolada da rizosfera do solo Chines apresenta atividade antagonista para *Plasmodiophora brassicae* (WANG et al., 2012).

Além de metabólitos com atividade antagonista para outros patógenos e enzima, as actinobactérias produzem biomoléculas com atividade antineoplásicas e o gênero *Streptomyces* destaca-se como o principal produtor de antibióticos anticancerígenos exemplificados por bleomicina, mitomicina C, antraciclinas - daunorrubicina, dactinomina. (PUPO et al. 2006).

Além do gênero *Streptomyces*, temos o táxon *Nocardia* que apesar de sua patogenicidade para a saúde humana, os metabólitos do gênero *Nocardia* exibem uma variada atividade biológica: antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e imunossupressora (LUO et al., 2014). Como exemplos podem citar: brasilicardin B ($C_{44}H_{66}N_2O_{15}$), C ($C_{30}H_{51}NO_9$) e D ($C_{29}H_{49}NO_8$) são produzidos pela *N. brasiliensis* IFM 0406 e todos possuem atividade citotóxica e imunossupressora (KOMATSU et al., 2004); Nocabactin NA-a ($C_{38}H_{58}N_5O_{10}$) produzido por *N. farcinica* ATCC 3318 possui atividade citotóxica (RATLEDGE e SNOW, 1974; SAKAGAMI et al., 2005;

HOSHINO et al., 2011); TUBELACTOMICIN A ($C_{29}H_{42}O_6$) produzido por *N. vinacea* MK703-102F1 com atividade antibacteriana ácido-resistente (IGARASHI et al., 2000a,b; KINOSHITA et al., 2001). (Quandro 2).

Devido a diversidade de metabólitos produzidos por estes micro-organismos existe a necessidade de mais estudos para se conhecer e seu potencial biotecnológicos para as indústria.

2.3 Actinobactérias– sua importância industrial

A classe actinobacteria é formada por bactérias Gram-positivas, aeróbias em sua grande maioria e filogeneticamente apresentam um alto teor de guanina e citosina em seu DNA, podendo variar de 51% em espécies do gênero *Corynebacterium*, a mais de 70% em espécies dos gêneros *Streptomyces* e *Frankia*, porém com menos de 50% (C+G) foi observado em *Tropheryma whippelii* (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983; STACKEBRANDT et al. 1997; VENTURA et al. 2007).

Estudos ecológicos das populações de actinobactérias são de extrema importância, visto que esses micro-organismos formam esporos e conídios, permitindo a sua sobrevivência em condições adversas (WILLIAMS, et al., 1972; VOBIS, 1997).

Actinobacterias têm sido comercialmente exploradas para a produção de produtos farmacêuticos, nutraceuticos, enzimas, agentes antitumorais, inibidores de enzimas (HONG et al., 2009; THATOI et al, 2013).

Quadro 2– Actinobactérias do gênero *Nocardia* produtoras de metabólitos secundários (modificado LUO et al., 2014).

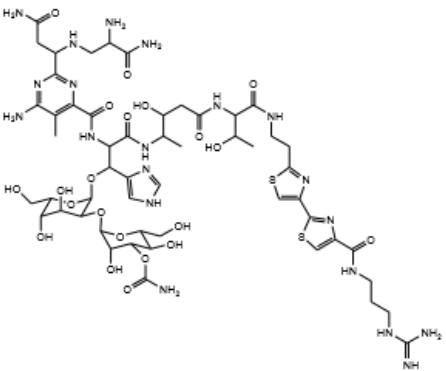
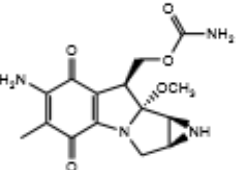
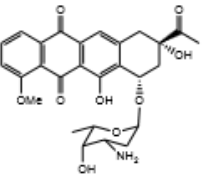
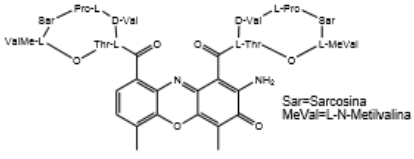
Composto	Micro-organismo	Atividade	Referência
Nocardicin A $C_{23}H_{24}N_4O_9$	<i>N. uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanensis</i> ATCC 21806	Antibacteriano para Gram- negativas	AOKI et al.(1976); HASHIMOTO et al.(1976); KURITA et al.(1976).
Nocobactin NA-b ($C_{40}H_{62}N_5O_{10}$)	<i>N. farcinina</i> ATCC 3318	Citotóxica	RATIEDGE e SNOW (1974); SAKAGAMI et al. (2005); HOSHINO et al. (2011)
Amamistatin A $C_{37}H_{55}N_5O_{11}$	<i>N. asteroides</i> SCRC- A2359	Antitumoral	SUENAGA et al. (1999); KOKUBO et al.(2000)
Ayamycin ($C_{14}H_{16}Cl_2NO_3$)	<i>Nocardia</i> sp ALAA2000	Antimicrobiano	EL-GENDY et al. (2008)
Transvalencin Z	<i>N. transvalensis</i> IFM 10065	Antibacteriano bactéria Gram- positiva	MUKAI et al. (2006)

Kavitha e Vijayalakshmi (2012) relatam que *Nocardia levis* MK-113 VL isoladas de solos lateríticos da região Guntur é produtora da enzima L-asparaginase.

A linhagem *Streptomyces griseoruber* isolada da rizosfera do solo Chines apresenta atividade antagonista para *Plasmodiophora brassicae* (WANG et al., 2012).

Além de metabólitos com atividade antagonista para outros patógenos e enzimas, as actinobactérias produzem biomoléculas com atividade antineoplásica e o gênero *Streptomyces* destaca-se como o principal produtor de antibióticos anticancerígenos exemplificados por bleomicina B₂ (a) *Streptomyces verticillus*, mitomicina C (b) *Streptomyces caespitosus*, antraciclina - daunorrubicina (c) *Streptomyces caeruleorubidus*, dactinomina (d) *Streptomyces parvulus*, ilustrados no Quadro 3 (PUPO et al. 2006).

Quadro 3– Actinobactérias produtoras de metabólitos secundários (PUPO et al. 2006).

Substâncias	Micro-organismo
a) Bleomicina B₂ 	<i>Streptomyces verticillus</i>
b) Mitomicina C 	<i>Streptomyces caespitosus</i>
c) Daunorrubicina 	<i>Streptomyces caeruleorubidis</i>
d) Dactinomicina  Sar=Sarcosina MeVal=L-N-Metilvalina	<i>Streptomyces caeruleorubidis</i>

A grande diversidade biológica do Brasil e a necessidade da busca por novas tecnologias farmacêutica através da biotecnologia com a produção de biofármacos por indústrias brasileiras podem incentivar estudos de novos micro-organismos em habitats diferentes para conhecer seus potenciais biotecnológicos, pois estes novos compostos podem trazer mais qualidade de vida e menor custo no tratamento (ZIMMER et al., 2009).

2.4 Enzimas - L-asparaginase

2.4.1 Histórico

A enzima L-asparaginase é um produto natural que possui um amplo espectro de ação como atividade antitumoral, podendo ser utilizada no tratamento da doença de Hodgkin's, linfomas de células-T, tumores NK, alguns subtipos de leucemias mielóides e de leucemia linfoblástica aguda (DUVAL et al., 2002).

O primeiro relato da atividade antitumoral da enzima foi verificado por Clementi (1922) que revelou a presença de L-asparaginase no soro de porcos da índia da Guiné. Em 1953 Kidd descreveu a regressão de linfomas transplantados em ratos após administração do soro de porcos da índia da Guiné. Broome em 1961, enquanto trabalhava no laboratório de Kidd (1953), comparou a descoberta de Kidd (1953) de regressão de crescimento de linfomas transplantados em ratos machos e fêmea, com a primeira observação de Clementi (1922), e conseguiu concluir que a atividade antitumoral no soro de porcos da índia da Guiné foi devida a presença da enzima L-asparaginase. Yellin e Wriston em 1966 realizaram a purificação parcial de duas formas de L-asparaginase a partir do soro de porcos da índia.

No entanto, a extração de L-asparaginase através do soro de porcos da Índia apresentava baixo rendimento, havendo a necessidade de se pesquisar novas fontes de obtenção desta enzima (NAGARETHINAM et al., 2012)

O primeiro relato de que a enzima L-asparaginase obtida em extrato de *E. coli* realizava uma reação de desaminação em substrato da L-asparagina foi realizado por Tsuji em 1957.

Mashburn e Wriston (1964) e Campbell e Mashburn (1969) relataram a purificação de L-asparaginase através do cultivo de *E. coli* e verificaram que a enzima produzida pela bactéria apresentava a mesma atividade antitumoral da enzima extraída do soro de porcos da Índia da Guiné.

Devido à facilidade de cultivo e obtenção da enzima em grande escala, os micro-organismos se tornaram excelentes produtores da enzima L-asparaginase, contudo as propriedades da enzima produzida irão depender das características de cada micro-organismo (NAGARETHINAM et al., 2012; AHMAD et al., 2012).

L-asparaginase produzida pela bactéria *E. coli* pode ser de dois tipos: tipo I e tipo II (Campbell, 1967). L-asparaginases do tipo I são expressas constitutivamente no citoplasma e catalisam a hidrólise de ambas L-asparaginase e L-Glutaminase, enquanto que L-asparaginase do tipo II são expressas sob condições anaeróbias no espaço periplasmático das membranas bacterianas e exibem uma especificidade mais elevada para a L – asparaginase (CEDAR e SCHAWARTZ, 1966; CAMPBELL, 1967).

L- asparaginases foram estudadas em microrganismos como *Escherichia coli* (BAGERT e RÖHM, 1989; HARMS et al., 1991), *Erwinia carotovora*

(KOTZIA e LABROU, 2005) e *Erwinia chrysanthemi* (AGHAIYPOUR et al., 2001), Khamna et al., (2009) relataram a produção de L-asparaginase pela acitnobactéria isolado da rizosfera de erva-cidreira (*Cymbopogon citratus*) e Kiranmayi et al., (2014) isolaram actinobacterias, produtoras de L-asparaginase, do mangue de Nizampatnam –Índia.

2.4.2 L-asparaginase no tratamento do câncer

a) Câncer – Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A mudança do perfil demográfico no Brasil aliada ao avanço da tecnologia e da industrialização vem proporcionando mudanças no estilo de vida das pessoas, reduzindo o número de óbitos por doenças negligenciadas, mas em contra partida aumenta o contato dos seres humanos com os fatores de risco que podem desencadear o câncer; estima-se se 5.050 casos novos de leucemia em homens e 4.320 em mulheres para o ano de 2014 (INCA, 2014).

O câncer é um processo patológico que começa quando uma célula é transformada por mutação genética do ácido desoxirribonucleico (DNA) celular; podendo infiltrar tecidos circunvizinhos e ganhar acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos, que as levam até outras partes do corpo, denominado de metástase (DOMINIC e REN, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; ROSAS et al., 2013).

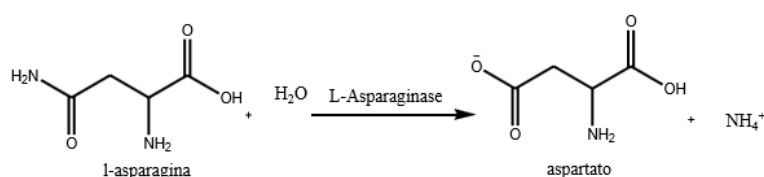
A leucemia é um câncer ligado ao sistema linfohematopoético caracterizado por uma proliferação das células hematológicas, expressando-se no sangue periférico (HENRY, 2013). As leucemias agudas (LA) caracterizam-se pela proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo (anaplasia) variável, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias e representam aproximadamente 30% das doenças malignas em pacientes com menos de 15 anos

de idade (SILVA et al., 2006). Por sua vez, a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) abarca cerca de 80% de todos os casos em crianças, o que a torna o câncer mais comum na faixa etária pediátrica. As principais manifestações clínicas das leucemias agudas decorrem do acúmulo das células anormais – blastos – na medula óssea, impedindo a produção das células normais, resultando na diminuição dos leucócitos maduros propiciando o aparecimento de infecções, bem como diminuição no número de hemácias provocando anemia, e a redução da contagem de plaquetas podendo ocasionar sangramentos e equimose e petéquias (OLIVEIRA et al., 2004). No entanto, nas últimas décadas, houve uma considerável progressão no tratamento destes casos com a utilização do biofármaco L-asparaginase (INCA, 2014).

b) Mecanismos de ação da L-asparaginase

Os tecidos normais sintetizam L-asparagina em quantidades suficiente para a síntese de proteínas. A maioria dos tecidos neoplásicos requer o seu fornecimento exógeno L - asparaginase hidrolisa a L - asparagina livre no sangue (Figura 1), ocorrendo a depleção de este aminoácido e que conduz selectivamente as células leucémicas à morte- apoptose assim impedindo a síntese de proteínas de neoplasias (RAMYA et al., 2010; NAGARETHINAM et al., 2012).

Figura 1- Reação catalisada pela L-asparaginase (GULATI et al., 1997).



2.4.3 L- asparaginase na indústria de alimentos

Os hábitos alimentares da população brasileira mudaram, e observa-se, com preocupação, o aumento do consumo das refeições feitas fora de casa, em sistemas do tipo fast food, e de alimentos industrializados (BLEIL, 1998; LANES, 2012).

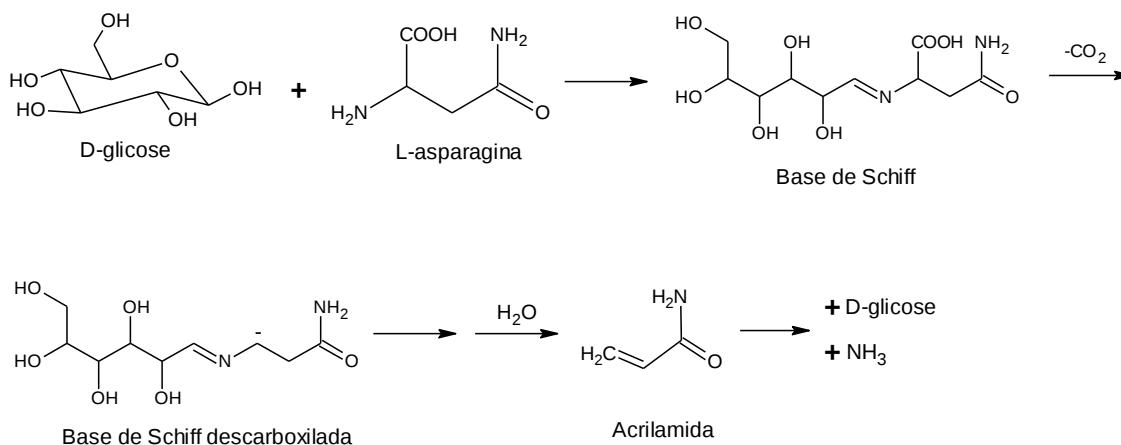
Antes de ser consumida, a maior parte dos alimentos sofre processamento térmico, o que garante à segurança microbiológica, a inativação de algumas enzimas, a degradação de substâncias tóxicas e, ainda, o desenvolvimento de substâncias responsáveis pelo aroma, cor e sabor, melhorando a sua palatabilidade (MINTZ, 2001; NITZKE e FREELAND-GRAVES, 2007).

Essas substâncias são características da Reação de Maillard (RM), que ocorre durante o processamento térmico ou no armazenamento prolongado de alimentos que contêm proteínas e açúcares redutores (NITZKE e FREELAND-GRAVES, 2007).

A reação de Maillard tem sido implicada na formação de acrilamida em muitos alimentos que foram aquecidos a altas temperaturas, durante o processo ou preparação.

A acrilamida deriva, principalmente, da reação de segunda ordem entre açúcares redutores (via carbonila) e o grupo α -amino da L-asparagina livre, e a reação necessita da presença dos dois substratos (figura 2) (NERI 2004; SHIBAO e BASTOS, 2011; FENNEMA et al., 2010).

Figura 2- Mecanismo proposto para a formação de acrilamida em alimentos (FENNEMA et al., 2010)



O nível de acrilamida tem sido observado em diversos alimentos que foram elaborados por frituras, panificação, puffing, assados ou outros tipos de processamentos a temperatura elevada (ARISSETO e TOLEDO , 2008).

Produtos com alta área de superfícies, como chips de batata, estão entre os alimentos processados em alta temperatura que exibem as maiores concentrações de acrilamida conforme os dados Center for food Safet and Applied Nutrition-EUA- Tabela1 (FENNEMA et al., 2010).

Tabela 1-Variação da concentração de acrilamida encontrada em alguns produtos alimentícios que contém estas substâncias em níveis elevados (FENNEMA et al., 2010)

Alimento	Acrilamida, ppb
Amêndoa tostada	236-457
Roscas	0-343
Pães	0-364
Cereais matinais (prontos para o consumo)	34-1.057
Café	3-374
Batatas fritas	20-1325

Fonte: (Center for food Safet and Applied Nutrition)

Para avaliar se a exposição à acrilamida, através dos alimentos, representa um risco para população, é necessário que estudos de estimativa de ingestão sejam conduzidos (BOON et al., 2005).

No Brasil Ariseto e Toledo (2008) realizaram um estudo para análise de estimativa preliminar de acrilamida com base no consumo médio nacional de alimentos e verificaram que o nível de acrilamida nos alimentos no Brasil são inferiores aos níveis reportados em países da Europa e América do Norte. A batata frita foi a mais importante fonte de exposição à acrilamida, seguida pelo café, farinha de mandioca torrada, biscoito salgado e pão francês (Tabela 2).

Tabela 2- Ingestão diária de acrilamida estimada para médios e grandes consumidores com base no consumo médio nacional de alimentos no Brasil (Modificado ARISSETO e TOLEDO, 2008).

Alimento	Número	Níveis de acrilamida (µg/kg)		Ingestão de acrilamida (µg/kg pc/dia)	
		Porção Mediana	Porção Máxima	Cenário 1	Cenário 2
Batata frita	7	264	2528	0,0800	0,7661
Batata chips	12	591	1999	0,0045	0,0153
Mandioca frita	3	<20	<20	0,0010	0,0010
Farinha de mandioca	3	30	81	0,0106	0,0287
Pão de queijo	3	<20	<20	0,0001	0,0001
Cereal Matinal	8	30	49	0,0005	0,0008
Biscoito salgado	7	116	361	0,0100	0,0113
Torrada	7	71	231	0,0003	0,0011
Farinha de rosca	2	<20	67	0,0000	0,0002
Pão francês	3	<20	<20	0,0056	0,0056
Pão (outros)	11	21	124	0,0002	0,0011
Café moído	3	174	202	0,0196	0,0228
Café solúvel	3	582	683	0,0034	0,0040
Cerveja	14	<20	<20	0,0021	0,0021

N= Número de amostras analisadas

Cenário 1- ingestão de 0,14 e 0,42 µg/kg pc/ dia

Cenário 2- ingestões correspondentes foram estimadas em 0,87 e 2,60 µg/kg pc/dia

A adição de L-asparaginase antes de cozer ou fritar os alimentos é uma estratégia para reduzir a acrilamida nos alimentos, nesta estratégia a asparagina é convertida em outro aminoácido comum, ácido aspártico, e amônio; como resultado, a asparagina deixa de fazer parte na reação de Maillard, e, por conseguinte, a formação de acrilamida é significativamente reduzida (DHANAM e KANNAN, 2013; FENNEMA et al., 2010).

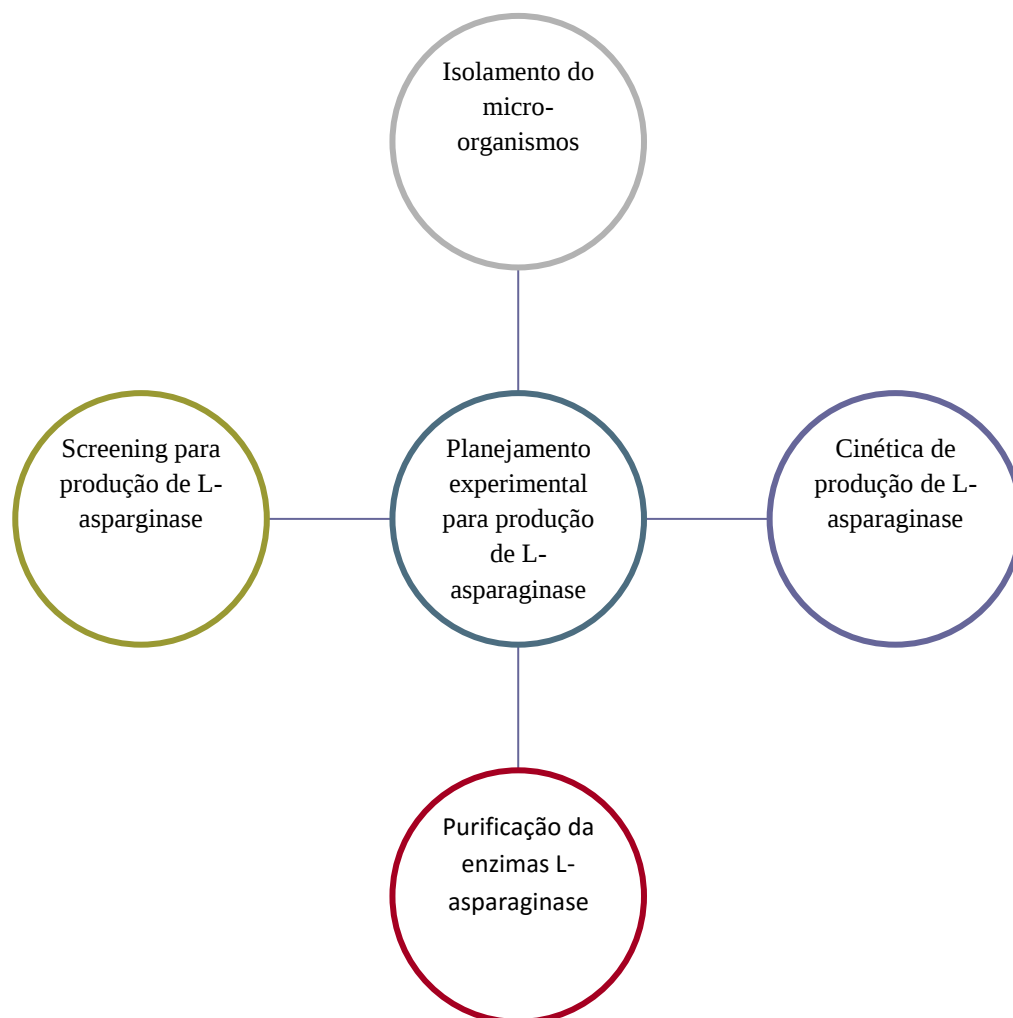
A enzima L-asparaginase pode ser utilizada como um auxiliar de processamento de alimentos, podendo eficazmente, reduzir o nível de acrilamida a 90 % em uma variedade de alimentos ricos em amido, sem alterar o sabor e aparência do produto final (DHANAM e KANNAN, 2013).

2.4.4 Busca por novas fontes de L-asparaginase

Diferente habitats são pesquisados para obtenção desses micro-organismos como, solo (SHUKLA et al., 2014), rizosfera (KHAMNA et al., 2009), endofíticos (CHOW e TING, 2014) e marinhos (SIVASANKAR et al., 2013) com interesse se obter L-asparaginase com menos efeitos colaterais quando purificadas para produção de biofármacos (NAGARETHINAM et al., 2012).

A produção desta enzima por micro-organismos vai depender do tipo de micro-organismo utilizado e das condições de produção (Fermentação submersa ou Fermentação em substrato sólido), como meio de cultura, temperatura e pH (AHMAD et al., 2012). A figura 3 ilustra a sequência de etapas para obtenção da enzima L-asparaginase.

Figura 3- Esquema geral para obtenção da enzima L-asparaginase



A enzima L-asparaginase pode ser produzida por fermentação submersa (SMF), utilizando fontes de carbono e nitrogênio diferente. Deshpande et al.(2014) estudaram a produção de L-asparaginase por *Streptomyces ginsengisoli* em fermentação submersa, e verificaram que a melhor produção ocorreu nas condições de pH 8.0 á 30° C, utilizando glicose como fonte de carbono ($2.52 \pm 0.26 \mu\text{mol/mL/min}$ de enzima) e a segunda alternativa como fonte de carbono foi o amido ($2.348 \pm 0.17 \mu\text{mol/mL/min}$ de enzima).

Amena et al. (2010) estudaram a produção da enzima L-asparaginase por *Streptomyces gulbargensis* utilizando extrato de amendoim enriquecido com maltose (0,5%) e L-asparagina (0,5%) e tiveram uma ótima produção em pH 8.5 a 40 ° C.

Outra opção de obtenção da enzima é através da fermentação em estado sólido (SSF), onde podem ser utilizadas outras fontes de carbono mais baratas, como resíduos agroindustriais, e diferentes da glicose, uma vez que a glicose pode causar catabolismo de repressão e inibição dos componentes envolvidos no transporte do lactato, no qual o lactato estimula a síntese de L-asparaginase (AHMAD et al., 2012).

Ghosh et al. (2013) otimizaram a produção da enzima L-asparaginase por *Serratia marcescens* (NCIM 2919) em fermentação sólida utilizando substrato de óleo de coco, onde foi observada uma produção de 5.75 U/gds.

Beauveria bassiana (MSS18/41), um fungo marinho, produziu L-asparaginase por fermentação sólida utilizando resíduo agroindustrial (farelo de trigo) tendo como produção máxima de enzima 90 U/gds (SWATHI et al. 2014).

Portanto, a produção de enzima L-asparaginase por micro-organismos é uma fonte promissora e com mais possibilidade de obter um processo menos oneroso, tendo como objetivo reduzir o custo desta enzima na produção industrial.

2.5 Planta Medicinal

Com o desenvolvimento da tecnologia farmacêutica, o homem moderno pode ser compreendido e diferenciado das demais épocas por seu consumo elevado de medicamentos (VEIGA JUNIOR, 2008).

No entanto, a grande oferta de medicamentos alopáticos, entretanto, não resolveu os problemas de saúde da maior parte da população. Portanto, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento onde plantas medicinais são os principais medicamentos (MENGUE et al., 2001; RITTER et al., 2002; MENDONÇA-FILHO; PEREIRA et al., 2004; VENDRUSCOLO et al., 2005; CARLINI et al., 2006; AGRA et al., 2007; BIAVATTI et al., 2007).

Apesar do interesse da indústria farmacêutica e de centros de pesquisas pela síntese orgânica de novos compostos, os produtos naturais, particularmente os derivados de plantas medicinais, ainda permanecem como uma importante fonte para a obtenção de novas drogas e estruturas químicas, que por processo de otimização tornam-se mais eficazes farmacologicamente (CALIXTO, 2000; NEWMAN et al., 2003; BUTLER, 2004; BALUNAS; KINGHORN, 2005).

2.5.1 *Ipomoea pés-caprae* e suas atividades biológicas e farmacológicas

I. pés-caprae é encontrada extensivamente sobre as dunas das praias em toda região litorânea brasileira, contribuindo para a proteção à mudança constante das areias, provocada pelo vento, têm caules estoloníferos subterrâneos Figura 4 (LIMA, 2007).

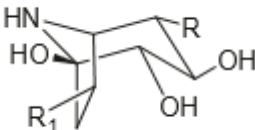
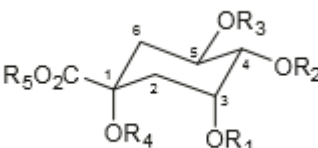
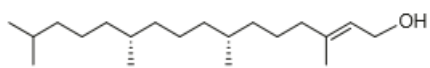
Figura 4-*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulacea.



O extrato metanólico da planta exibe efeito espasmolítico em preparações de músculo liso (EMENDORFER et al., 2005), confirmando os resultados obtidos anteriormente (PONGPRAYOON et al., 1989, 1991a, b, 1992).

Krogh et al.(1999); De Souza et al. (2000) validaram a propriedade analgésica da planta, confirmando que os flavonóides e terpenos são os principais princípios ativos. Barni et al., 2009 através de análises fitoquímicas verificaram que o teor de flavanóides totais é maior nas folhas seguido dos caules. Os ativos mais comuns encontrados nos estudos fitoquímicos e suas estruturas químicas nesta planta estão descritas no Quadro 04.

Quadro 4- Relação das substâncias encontradas na *I. pes-caprae* (MEIRA et al, 2012 com modificações).

Substância	Atividade	Referência
Calistegina B1 (1) Calistegina B2 (2)  1 R= H R₁= OH 2 R= OH R₁= H	Potente atividade inibitória da β-glicosidade nos lisossomos de ratos.	HARAGUCH et al., 2003
Pescaproside A (3)  3 R₁=R₂= cafeoil R₃=R₄=R₅= H	Fraca citotoxicidade em: células nasofaringe, colón, células escamosas da cervical e carcinomas ovarianos.	PEREDA MIRANDA et al., 2005
Ácido Isoclorogênico (8) 	Inibidor da collagenase e nocitoxicidade	TERAMACH et al., 2005

A planta *I. pes-caprae* é rica em metabólicos secundários com diferente atividades farmacológicas, por isso existe a necessidade de um estudo de

bioprospecção na região da rizosfera desta planta para conhecermos os possíveis metabólitos produzidos pelos micro-organismos da rizosfera.

Considerando os fatores acima mencionados e por não se ter relatos de pesquisas anteriores sobre o potencial biotecnológicos dos endofíticos da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., os micro-organismos endofíticos isolados trarão uma grande contribuição para a obtenção de novas substâncias.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Isolar, identificar os micro-organismos, avaliar as atividades antimicrobianas, pesquisar a atividade enzimática produzidas pelos micro-organismos endofíticos associados folhas e raízes e micro-organismos rizosféricos *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

3.2 Específicos

- Isolar actinobactérias, bactérias e fungos endofíticos de folhas e raízes *Ipomoea pes-caprae*, da praia de Itamaracá-PE.
- Isolar actinobactérias da rizosfera de *Ipomoea pes-caprae*, das áreas da praia de Itamaracá -PE.
- Realizar atividade antimicrobiana dos micro-organismos isolados (fungos actinobactérias endofíticos e actinobactérias rizosféricas contra diferentes isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes, leveduras e fungos filamentosos;
- Realizar a fermentação submersa (FS) e Fermentação em Substrato-Sólido (FSS) dos micro-organismos que obtiveram melhor resultado na atividades antimicrobiana.
- Realizar análise comparativa dos metabólitos secundários dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos com o extrato da planta.
- Verificar se os fungos endofíticos isolados de folhas e raízes *Ipomoea pes-caprae* são produtores de enzimas celulase, amilase, protease, lipase.

- Verificar se os micro-organismos endofíticos e rizosféricos são produtores de L-asparaginase.
- Realizar teste quantitativo para escolher o melhor substrato para produção de enzima L-asparaginase por actinobactérias endofítica
- Realizar planejamento experimental e cinética de produção de L-asparaginase de actinobactéria por actinobactéria endofítica.
- Selecionar as bactérias endofíticas produtoras de ácido indol acético;

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras vegetais

As folhas, raízes e rizosfera *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br foram coletadas em janeiro e junho de 2011 a 7° 48' 38" latitude Sul, 34° 50'27" longitude na Praia do Forte, Forte Orange, Itamaracá-Pernambuco (Figura 5).

Figura 5– Área de coleta das amostras *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Praia do Forte, Forte Orange, Itamaracá-Pernambuco.



Foram coletadas aleatoriamente as folhas, raízes e rizosfera de três indivíduos saudáveis, este material botânico foi identificado e depositado no herbário do Instituto Agrônômico de Pernambuco- IPA, exsicata N° 85782 (Figura 6).

Figura 6- *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. depositada no herbário no Instituto Agrônômico de Pernambuco- IPA, Exsicata N° 85782.



Após a coleta as amostras foram conservadas individualmente em sacos plásticos esterilizados, previamente identificados e transportados em câmara com gelo para o Laboratório de Genética de Micro-organismos no Departamento de Antibióticos para o isolamento de micro-organismos endofíticos.

4.2 Desinfecções superficiais para o isolamento dos micro-organismos endofíticos

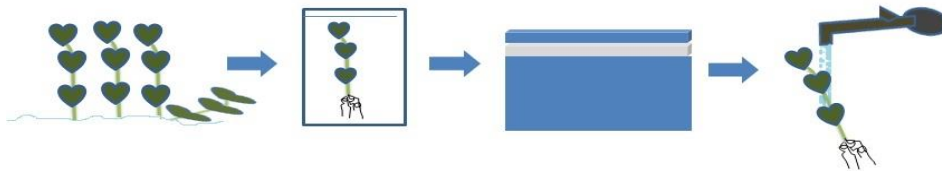
O material botânico foi processado no mesmo dia da coleta. Este foi lavado com água corrente. Em seguida, na cabine de fluxo laminar, as raízes e folhas de cada indivíduo foram desinfetados superficialmente fazendo-se uso da metodologia (PEREIRA, et al., 1993; ARAUJO, et al. (2002); UETANABARO (2004) como se segue abaixo (Figura 7):

- Incubar em álcool 70% v/v por 1 minuto;

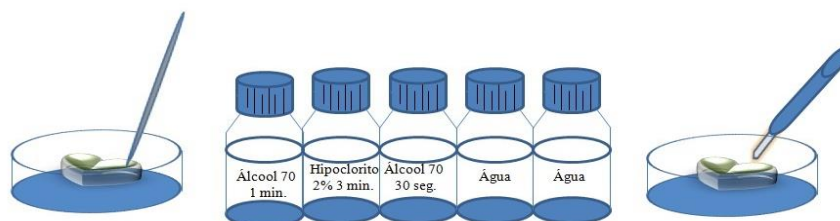
- Incubar em hipoclorito de sódio 2% v/v por 3 minutos;
- Incubar em álcool 70% v/v por 30 segundos;
- Enxaguar duas vezes em água destilada e esterilizada
- A ultima água de lavagem das raízes e das folhas de cada indivíduo será semeada em placa com meio de cultura

Figura 7-Etapas do processo de desinfecção, isolamento, purificação e preservação dos micro-organismos endofíticos (CONTI, 2012).

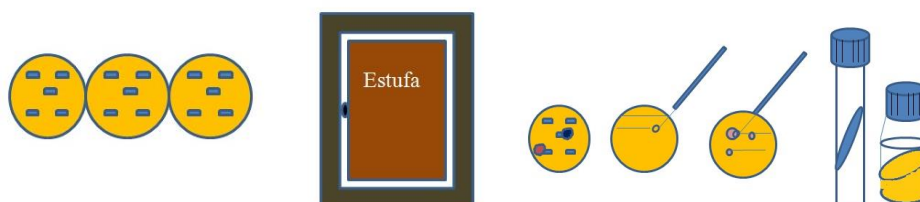
Coleta do material



Desinfecção do material vegetal



Isolamento, purificação e preservação.



4.3 Isolamentos de micro-organismos endofíticos

Os fragmentos de folhas e raízes foram inoculados em meio de cultura que foi preparado com água do mar artificial (MENEZES, et al. 2010). Para actinobactérias, bactérias os meios contendo nistatina na concentração de 100 µg/mL nos meios de cultura. ALA (Anexo I) e MC- Meio Completo (Anexo II), ISP-2, ISP-4 (Anexo III), e para fungos foi utilizado clorafenicol na concentração de 100 µg/mL nos meios de cultura BDA - batata-dextrose-Agar (anexo IV) e Agar Sabouraud (Anexo IV). Todos os fragmentos foram incubados à temperatura de 30°C.

Assim que as colônias dos endófitos foram surgindo nos fragmentos das folhas e raízes, estes foram transferidos para novas placas contendo os mesmos meios e submetidos a processo de purificação por estrias de esgotamento (MADIGAN et al.,2004).

A frequência dos micro-organismos endofíticos foi determinada segundo a metodologia descrita por Araújo, et al. (2002), onde

$$F = \frac{\text{N}^\circ \text{ de fragmentos}}{\text{N}^\circ \text{ total de fragmentos}} \times 100.$$

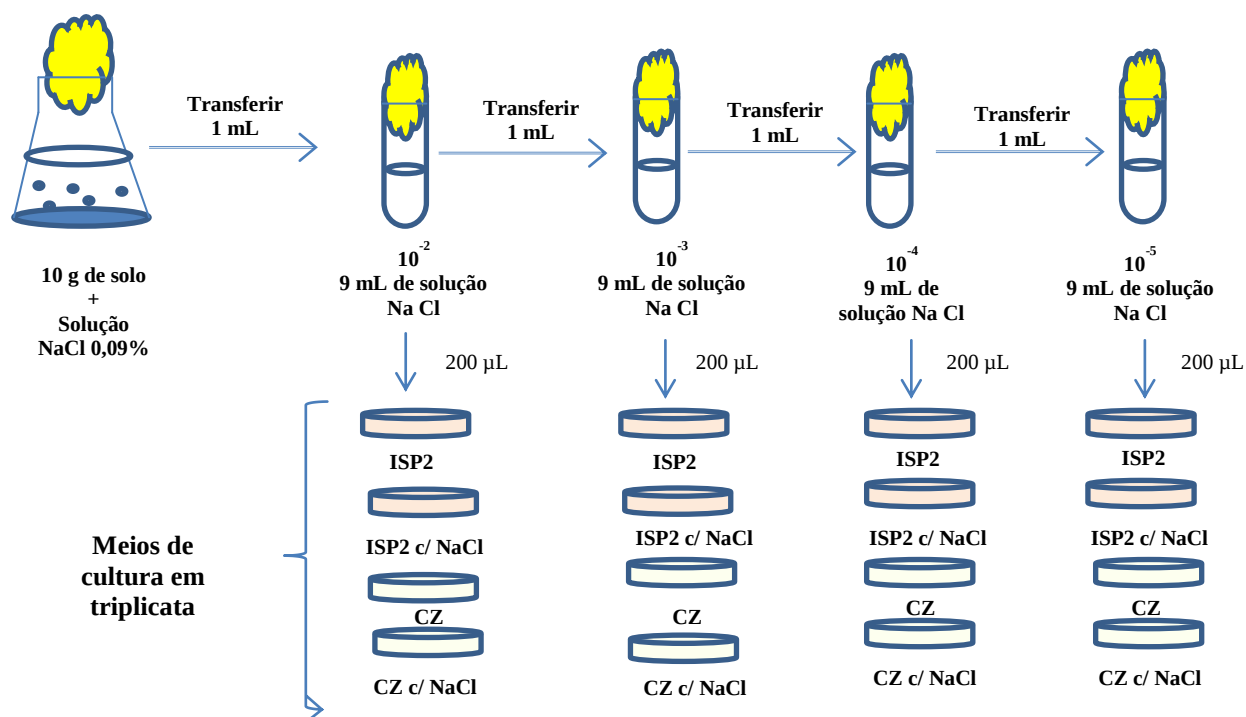
Nº total de fragmentos

4.4 Isolamentos de actinobactérias rizosféricas

A amostra de solo rizosférico (10 g) foi ressuspensa em 90 mL de NaCl a 0,9%(m/v), o pH (5,6), homogeneizada em vórtex por 20 minutos e incubada em Banho-maria a 50° C por 15 minutos (KOLM e SIQUEIRA, 1999; MARRONTI; GERMANI, 2011) Após este tempo a amostra foi submetida a diluições seriadas em

solução salina (até 10^{-5}) (KING et al., 1954), seguido da inoculação de 200 μ L das diluições de 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} na superfície de cada placa contendo 20 mL dos meios: Triptona Extrato de levedura -ISP₂ e meio Czapeck Dox (Cz) Ágar (sacarose 30.0 g, NaNO₃ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ x 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, Agar 15.0 g, H₂O 1000 mL, pH 6.6), acrescidos de antifúngico Ciclohexamida 50 μ g/mL. O teste foi realizado em triplicata para cada meio de cultura. Uma triplicata foi preparada com água destilada e outra o meio foi enriquecido com NaCl 0,3%. Após as inoculações, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C por sete dias Figura 8.

Figura 8 – Esquema do Isolamento das actinobactérias da rizosfera *I. pes-caprae* (L.) R. Br.



4.4 Preservações dos microrganismos isolados

Após a purificação, as linhagens de bactérias e actinobactérias foram transferidas para tubos de penicilina contendo meio ISP2 inclinado e cobertos com óleo mineral esterilizado, lacrados e armazenados a temperatura ambiente. Os fungos foram preservados no meio BDA seguindo a metodologia de Castelani (ARAÚJO, et al., 2002).

4.5 Identificações dos micro-organismos isolados

4.5.1 Identificação de Actinobactéria

A identificação taxonômica da actinobactéria endofítica e rizosférica foi realizada em nível de gênero através das observações macro e micromorfologia no Laboratório da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5.1.2 Morfologia da Actinobactéria endofítica e rizosférica

Para análise morfológica foi utilizada a metodologia descrita por Shirling e Gottlieb (1966). O micro-organismo foi cultivado em meio de cultura ISP-2 e incubado a 30°C por 21 dias. Lamínulas foram inseridas parcialmente no meio de cultura, em posição inclinada para o crescimento das hifas sobre suas superfícies. Após o período de incubação, foram observadas características como formação de pigmentação e micromorfologia, através do microscópio óptico, como a presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos ou a presença de esporângios.

4.5.2 Identificação das bactérias endofíticas

A identificação taxonômica das bactérias foi realizada no Laboratório da Coleção de Micro-organismo do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Foi realizado pela técnica da coloração de Gram seguido das provas bioquímicas segundo ANVISA (2004) e Koneman et al. (2008)

4.5.3 Identificação dos fungos filamentosos e leveduras endofíticos

A identificação taxonômica dos fungos endofíticos foi realizada através das observações macro e micromorfologia e das leveduras através de testes bioquímicos no Departamento de Micologia no Laboratório da Coleção de Fungos – URM, Universidade Federal de Pernambuco.

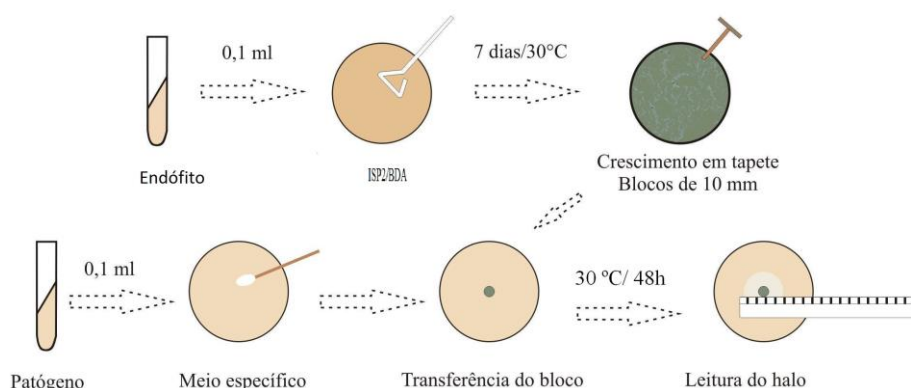
4.5.3.1 Morfologia dos fungos filamentosos endofíticos

Para análise morfológica dos endófitos foi utilizada a metodologia descrita por Shirling e Gottlieb (1966). Os micro-organismos foram cultivados com uma alça em agulha nos meios de cultura BDA, CZ (Anexo VI), CYA (Anexo VII) e MEA (Anexo VIII) e incubados a 30°C por 7 dias. Lamínulas foram adicionadas sobre os cultivos para observar o crescimento das hifas sobre suas superfícies. Após o período de incubação, foram observadas características como formação de pigmentação e micromorfologia, através do microscópio óptico, como a presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos.

4.6. Teste primário em “bloco de gelose”- Atividade Antimicrobiana dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com Ichikawa *et al.* (1971), utilizando os micro-organismos testes pertencentes ao acervo da Coleção de Microrganismos– UFPEDA. Os micro-organismos testes utilizados foram: *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Candida albicans* UFPEDA 1007. Para a rizosfera, além destes micro-organismos testes incluímos *Staphylococcus aureus* UFPEDA 705 Figura 9.

Figura 9- Esquema do ensaio antimicrobiano em “bloco de gelose”.



4.7. Cultivo dos micro-organismos selecionados no teste de atividade antimicrobiana e preparação dos extratos

4.7.1. Fermentação submersa (FS) dos micro-organismos

4.7.1 a) Pré-inóculo para fermentação do endófito *Streptomyces* sp

A linhagem do endófito foi cultivada por 48h (30°C a 180rpm) em tubos de ensaio para reativação em meio líquido e semeada em placas com o auxílio de um “swab” e incubada por 7 dias a 30°C. Em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100

mL de meio líquido ISP2 foram adicionados cinco “blocos de gelose” de 6mm de diâmetro e submetido a agitação por 48h (180rpm 30°C).

4.7.1 b) Fermentação Submersa do endófito *Streptomyces sp*

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 95 mL dos diferentes meios de cultura: ISP-2 e MPE, os quais foram inoculados com 10% do pré-inóculo, seguido da agitação a 180 rpm, durante 96 h Figura 10. A atividade antimicrobiana foi acompanhada a cada 24 horas (KIRBY e BAYER, 1996).

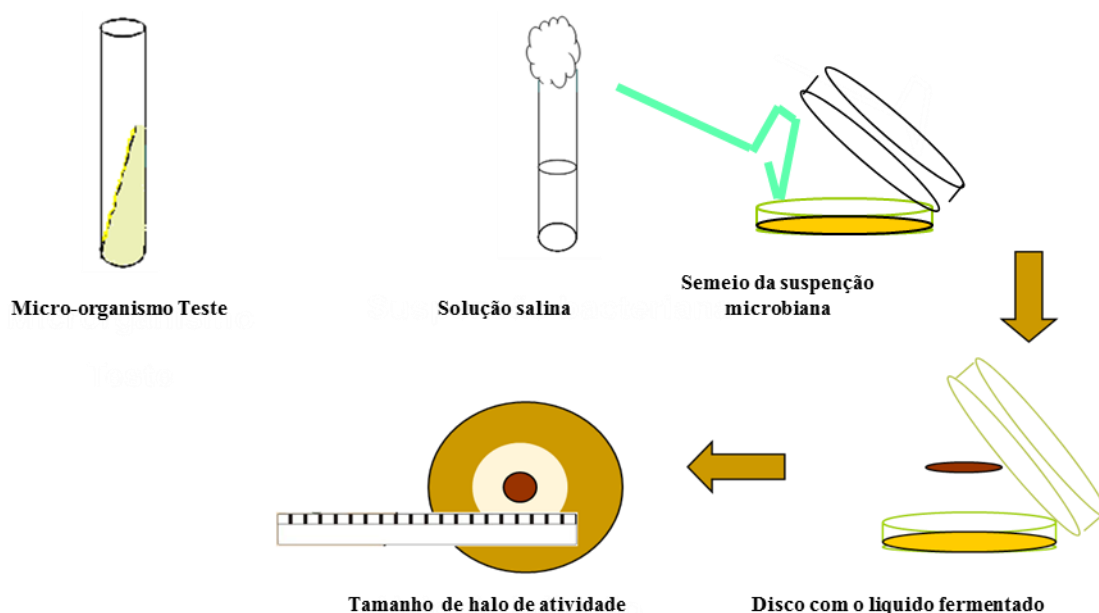
Figura 10- Esquema geral da sequencia da fermentação submersa do endófito *Streptomces sp*



4.7.1 c) Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana foi realizada através do teste de difusão em ágar (item 4.2.1.), a cada 24 horas, utilizando discos de papel de 8 mm contendo 50 μ L do líquido fermentado. As placas foram incubadas a 37° C, por 24 para *S. aureus* UFPEDA 02 - Figura 11 (KIRBY e BAYER, 1996).

Figura 11- Esquema da atividade antimicrobiana em disco



4.7.2 Fermentação Substrato Sólido (FSS) do endófito *Streptomyces* sp

4.7.2.(a) Pré-inoculo para fermentação em meio sólido

A linhagem do endófito foi cultivadas por 48h (30°C a 180rpm) em tubos de ensaio para reativação em meio líquido e semeados em placas com o auxílio de um “swab” e incubadas por 7 dias a 30°C. Em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido ISP2 foram adicionados 20 “blocos de gelose” de 6mm de diâmetro

e submetido a agitação por 48h (180rpm 30°C) Figura 12.

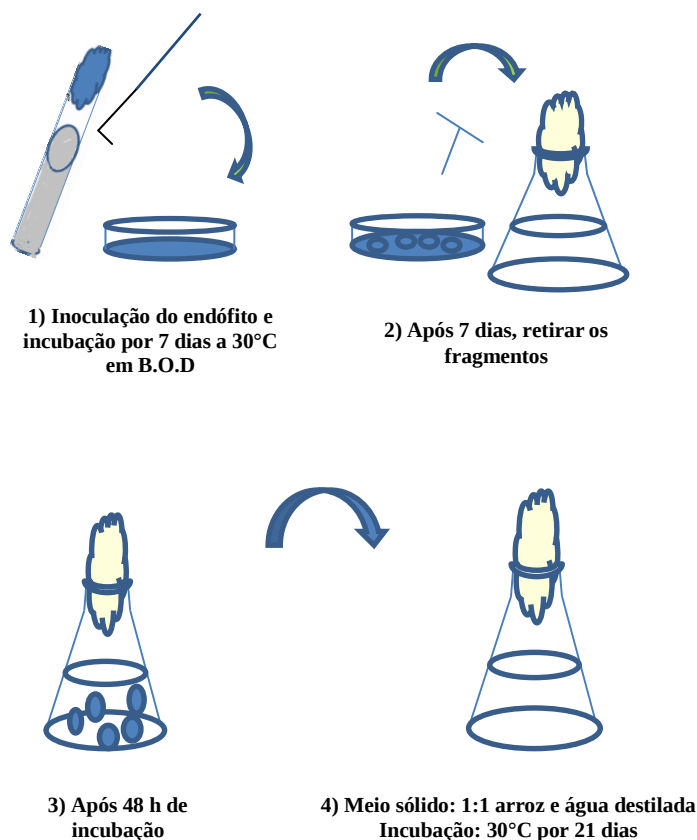
4.7.b) Preparação do meio de cultura com Substrato Sólido

Foram utilizados 25 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo o meio sólido de arroz (90g de arroz parboilizado e 90 mL de água). Estes foram autoclavados por 40 minutos.

4.7.2. c) Fermentação em Substrato-Sólido (FSS)

Em 24 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo o meio sólido de arroz foram adicionados os prés-inóculos (10mL) e incubados em B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 30°C por 21 dias Figura 12 Outro frasco contendo somente arroz também foi incubado nas mesmas condições.

Figura 12- Esquema geral pra preparação da fermentação em Substrato Sólida.



4.7.3. Fermentação Semi-Sólido (FSS) actinobactéria rizosfera *Nocardia* sp

4.7.3 a) Pré-inoculo para fermentação Semi-Sólido

Seguiu o mesmo procedimento do item 4.7.2.(a). A única diferença foi à utilização do meio de cultura Czapeck Dox Ágar (CZ) para o crescimento da actinobactéria.

4.7.3 b) Fermentação Substrato Sólido

Seguiu o mesmo procedimento dos itens 4.7.b e 4.7.2. b.

4.7.4 Fermentação Substrato Sólido (FSS) dos fungos endofíticos

4.7.4 a) Pré-inoculo para fermentação em meio sólido

Seguiu o mesmo procedimento do item 4.7.2.(a). A única diferença foi à utilização do meio de cultura Batata para o crescimento dos fungos.

4.7.4 b) Fermentação Substrato Sólido

Seguiu o mesmo procedimento dos itens 4.7.b e 4.7.2. b

4.8. Prospeção química dos extratos dos micro-organismos da Fermentação Substrato Sólida.

4.8.1. Obtenção dos extratos da fermentação em meio sólido

Foram adicionados aos cultivos dos micro-organismos da fermentação em Substrato Sólida 150 mL de metanol a frio. Após 24 h, o extrato foi filtrado a vácuo. Em seguida foram adicionados mais 100 mL de solvente a frio aos cultivos e filtrados novamente. Os filtrados foram concentrados em evaporador rotatório a 45°C até a secagem das amostras (Borges & Pupo, 2006)

4.8.2. Preparação do extrato da planta

Depois de seca à temperatura ambiente, a amostra foi reduzida a pequenos fragmentos e devidamente pesada. Após pesagem e cominuição das partes aéreas vegetais, um total de 5g da planta foi submetido ao processo de infusão metanólica, obtendo-se uma concentração de 0,1g/L (p/v).

4.8.3 Prospecção química do extrato MeOH dos micro-organismos

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) (Kieselgel 60, 0.2 mm, Merck), empregando-se sistemas e reveladores adequados a cada grupo de metabólitos apoiados nos estudos de Harborne (1998) e Wagner & Bladt (1996), com algumas modificações (Quadro 5).

Quadro 5-Condições cromatográfica de prospecção química do extrato MeOH dos micro-organismos endofíticos e da rizosfera e *I. pes-caprae*.

Metabólito	Fase Móvel	Revelador	Padrão	Referência
Triterpenos e Esteroides	Tolueno e acetato de etila	Lieberman-Burchard	β – sitosterol	SHARMA e DAWRA, 1991.
Monoterpenos e Sesquiterpenos	Tolueno e acetato de etila	H ₂ SO ₄ , Vanilina sulfúrica	Timol	WAGNER e BLADT, 1996.
Alcaloides	Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água	Dragendorff	Pilocarpina	WAGNER e BLADT, 1996.
Cumarina, flavanoides, fenilpropanoides e derivados cinâmicos	Acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água	NEU	Rutina	WAGNER e BLADT 1996

4.9. Atividade enzimática

4.9.1 Análise qualitativa dos fungos endofíticos produtores de enzimas celulasas, protease, amilases e lipase.

Os ensaios da atividade enzimática foram realizados de acordo com a metodologia de Neirotti; Azevedo (1988), Hankin et al.(1971), Wood et al. (1988), Anderson (1939) e Fernandes et al. (1999) para avaliação da produção de celulase,

amilase, protease, lipase e respectivamente.

Para o crescimento dos fungos, foram adicionados 15 mL de meio de cultura sólido em placa de Petri contendo fonte de carbono específica para cada hidrólise, e a visualização da atividade enzimática foi observada através de reveladores específicos (Quadro 6).

Quadro 6– Fontes de carbono e seus reveladores específicos utilizados nos teste de atividade enzimática.

Fonte de Carbono	Revelador	Enzimas	Referência
Carboximetilcelulose	Vermelho Congo	Celulose	NEIROTTI e AZEVEDO (1988)
Amido	Cristais de Iodo	Amilase	HANKIN et al. (1971)
Gelatina	Sol. Saturada de amônio	Protease	WOOD et al. (1988)
Tween 20	Refrigeração a 4°C	Lipase	ANDERSON (1939) e FERNANDES et al (2004).

Cada meio de cultura foi inoculado com fungos endofíticos de forma pontual, com o auxílio de uma alça de platina em forma de agulha e incubado a 30°C por 4 dias. Em seguida, foi realizada a revelação da atividade enzimática e medido o halo e degradação em milímetros com auxílio de uma régua. Para a quantificação da área total

de degradação foi utilizada a seguinte equação $S = \pi(d_h/2)^2 - \pi(d_c/2)^2$ onde:

S= Área da degradação;

d_h = diâmetro do halo;

d_c = diâmetro da colônia

$\pi = 3,14$

Após 3 dias de cultivo a 30°C, as placas de Petri para análise da atividade celulolítica foram colocadas em estufa a 45°C por 16 horas para inibição do crescimento dos fungos endofíticos e seleção de enzimas termoestáveis. A revelação foi realizada com solução de vermelho Congo (0, 025%) durante 30 minutos. O corante foi descartado e o excesso foi retirado pela adição de 1 mL de NaCl (0,5 M) e o halo de inibição foi observado como uma área alaranjada ao redor da colônia.

Para a visualização da atividade lipolítica, as placas com o cultivo das colônias, foram refrigeradas a 4° C por 48 horas e após este período foram visualizados cristais de cálcio ao redor da colônia, indicativo da presença de lipase.

As atividades amilolíticas, proteolítica foram avaliadas após 3 dias de cultivo a 30 °C. A revelação da atividade amilolítica foi realizada através da coloração com vapor de cristais de iodo, que conferem ao meio de cultura de coloração roxa, e o halo hidrolítico e visualizado como uma área incolor transparente circundando a colônia.

A atividade proteolítica foi revelada com a adição de 5 mL de solução saturada de sulfato de amônio, que proporciona ao meio de cultura cor branca – leitosa indicativo da presença de proteínas, enquanto a ação das enzimas proteolíticas foi visualizada como uma área transparente ao redor da colônia.

4.9.2 Análise qualitativa dos micro-organismos endofítico e rizosférico para produção de enzima L-asparaginase

O experimento foi realizado com o teste rápido em placa, para rastreio de L-asparaginase – in vitro - onde foi preparado o meio M-9 modificado produzido com g/L de $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6.0); KH_2PO_4 (3.0); NaCl (0.5); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.014); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5); Glicose (2.0); L-asparagina (5.0); Vermelho fenol (0.09) e ágar (17g/L) . Depois de vertido o meio de cultura nas placas, foi feita uma estria com as actinobactérias e as placas foram incubadas em estufa B.O.D. (Biological Oxygen Demand) durante 7 dias. No meio de cultura foi utilizado o corante vermelho de fenol como indicador da mudança de pH, ocasionada pela clivagem da L-asparagina em ácido aspártico de laranja para rosa (GULATI et al.,1997).

4.9.2.1 Análise qualitativa dos micro-organismos endofítico e rizosférico para produção de enzima L-glutaminase.

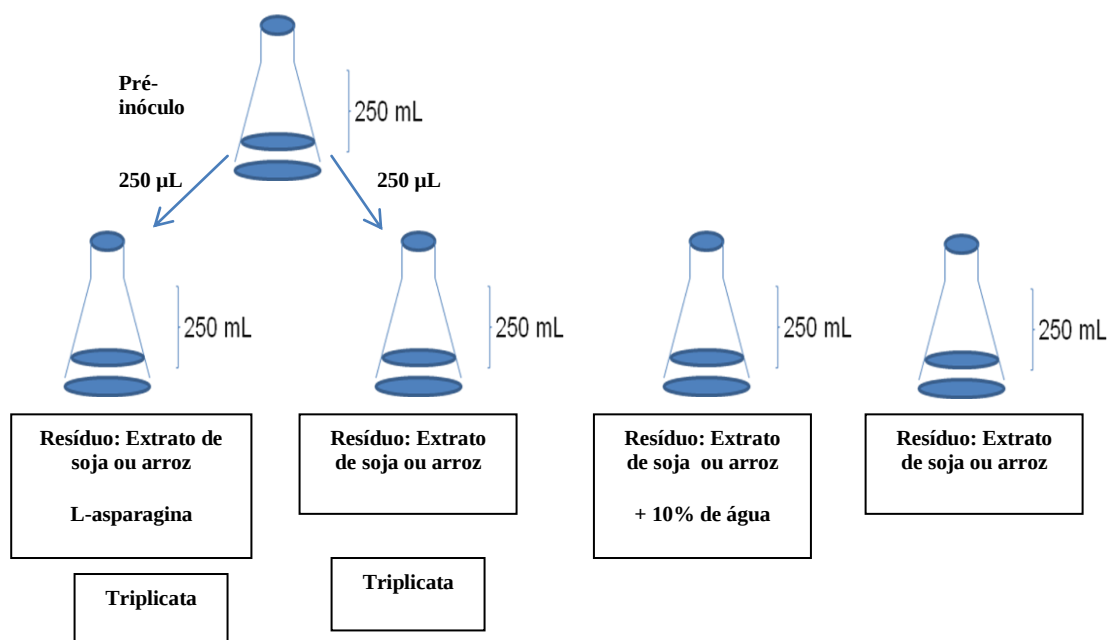
Para o ensaio de detecção de L-glutaminase, utilizou-se o meio Mínimo Glutamina Agar (MGA), descrito por Balagurunathan et al (2010) composto por: KCl (0,5 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); KH_2PO_4 (1,0 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L); NaCl (0,25); L-glutamina (10 g/L); vermelho fenol (0,012 g/L). A presença da atividade da enzima foi visualizada pela mudança na coloração do meio amarelado para a coloração rosa (BASHA et al., 2009).

4.9.3 Fermentação em Substrato Sólido para produção de L-asparaginase pelo endófito *Streptomyces* sp

A enzima bruta foi produzida por fermentação em Substrato Sólido utilizando dois tipos de substrato: farinha de soja e arroz.

Os meios de fermentação consistiu de 3.0 g de farinha de soja e 0.5 ml de Tampão fosfato de sódio dibásico 0,1M (pH 7,0) com solução de L-asparagina a 0,04M. Os frascos foram autoclavados durante 15 min a 121° C e pressão de 15 lb, e em seguida do arrefecimento foi inoculado com 250 microlitros do pré- inóculo da actinobactéria selecionada. Foram incubados a 37 ° C por 7 dias em repouso A fermentação com o substrato de farinha de arroz seguiu as mesmas especificações da fermentação acima descrita. Para ambas as fermentações, foram utilizadas dois controles. Um controle com substrato mais solução tampão de fostato de sódio dibásico (0,1 M) com L-asparagina 0,04M e outro controle contendo somente o substrato mais solução fostato de sódio dibásico 0,1M (Figura 13) (YASSER et al., 2002).

Figura 13-Esquema geral da fermentação Substrato Sólido para produção de L-asparaginase.



Para a determinação de L-asparaginase foi utilizado o método de Mashburn e Wriston (1964). Neste ensaio, a taxa de hidrólise de L-asparagina foi determinada pela medição do amoníaco liberado pela reação de Nessler.

Uma mistura de 400 microlitros de extracto de enzima, 400 microlitros solução tampão fostato de sódio dibássico 0,1M com 0,04M de L-asparagina. A amostra foi incubada durante 30 min a 37 ° C. A reação foi parada pela adição de 350 microlitros de 1,5 M de ácido tricloroacético. Depois centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos. 500 microlitros do sobrenadante foram diluídos com 2,25 mL com água destilada e tratou-se com 250 microlitros de Nessler reagente.

A reação de cor foi permitindo desenvolver durante 10 minutos e ler a absorvância em 450 nm com um espectrofotómetro. O amoníaco libertado foi calculado a partir de uma curva derivada com sulfato de amónio. Um unidade (UI) de L-asparaginase foi definida como que a quantidade de enzima que liberta 1 μ mole de amoníaco por minuto sob as condições do ensaio (DAVID K; DAVID G 1974).

4.9.3.1 Dosagem de proteínas

Método de Bradford (1976) é uma técnica utilizada para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante Comassie Brilliant Blue G- 250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

4.9.4 Planejamento experimental de L-asparaginase

Otimização da produção de L-asparaginase foi realizada utilizando o planejamento experimental 2³. Utilizando como variáveis a temperatura, concentração de L-asparagina e quantidade de inóculo (tabela 03). A determinação da enzima bruta L-asparaginase seguiu o item 4.9.3. Os dados experimentais foram processados empregando-se Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 3– Variáveis e valores utilizados no planejamento experimental

Variáveis	Nível (-1)	Nível (+1)
Temperatura	37°C	45°C
Conc. L-asparagina	0,03 M	0,04 M
Quantidade de inóculo	0,25 mL	0,5 mL

4.9.6. Cinética de produção de L-asparaginase

Os parâmetros de produção de L-asparaginase foram estabelecidos a partir do planejamento experimental. Os meios de fermentação consistiu de 3.0 g de farinha de soja, 0.25 ml de Tampão fosfato de sódio dibásico 0,1M (pH 7.0) com solução de L-asparagina a 0,03M. Os frascos foram autoclavados durante 15 min a 121° C e pressão de 15 lb, e em seguida do arrefecimento foi inoculado com 250 microlitros do pré-inóculo da actinobactéria selecionada. Foram incubados a 37 ° C por 10 dias em repouso. A cinética teve por objetivo determinar o melhor tempo de produção para a enzima bruta. A determinação da enzima bruta L-asparaginase seguiu o item 4.9.3.

4.10. Seleção de bactérias produtoras de Ácido Indol Acético (AIA)

4.10.1. Teste qualitativo

A seleção de bactérias produtoras de AIA foi realizada por um método colorimétrico e específico que caracteriza a produção do fitohormônio. Colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido TSA 10% (Anexo IX), suplementados com 5mM de L-triptofano estéril, incubados sob agitação (120rpm) a 28 °C, na ausência de luz, por 24 h. Após esta etapa, 500µL da cultura bacteriana foram acrescidas de 500µL do reagente de Salkowski (0,5 M de FeCl₃ + 7,9 M de H₂SO₄), incubadas por 30min a 28 °C, na ausência de luz. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o resultado positivo foi caracterizado pela formação de uma coloração rósea. Para tanto, foi utilizada como controle positivo a linhagem *Pantoea agglomerans* UFPEDA 774, (KUKLINSKY-SOBRAL et al.,2004).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Isolamentos dos micro-organismos endofíticos

Os meios de culturas ISP-2, ISP-4, ALA, MC, preparados com água do mar artificial, foram eficientes no isolamento de bactérias das folhas e raízes. Os meios de cultura BDA e Ágar Sabouraud dextrose preparados nas mesmas condições foram eficientes no isolamento de fungos filamentosos das raízes e folhas.

O desenvolvimento de colônias bacterianas e fúngicas emergindo dos fragmentos de folhas e raízes foram visualizadas a partir de 48 horas de isolamento até 21 dias de cultivo. À medida que as colônias surgiram, foram sendo isoladas e purificadas (Figura 14 e 15). A frequência dos micro-organismos isolados pode ser observada na tabela 02.

Figura 14 - Isolamento e purificação dos endófitos de raiz e folhas *I. pes-caprae* (L.) R. Br, fungo da raiz (A), fungo da folha (B), fungos das folhas (C), bactérias das folhas (D), bactéria da folha (E) e bactéria purificada (F) respectivamente.

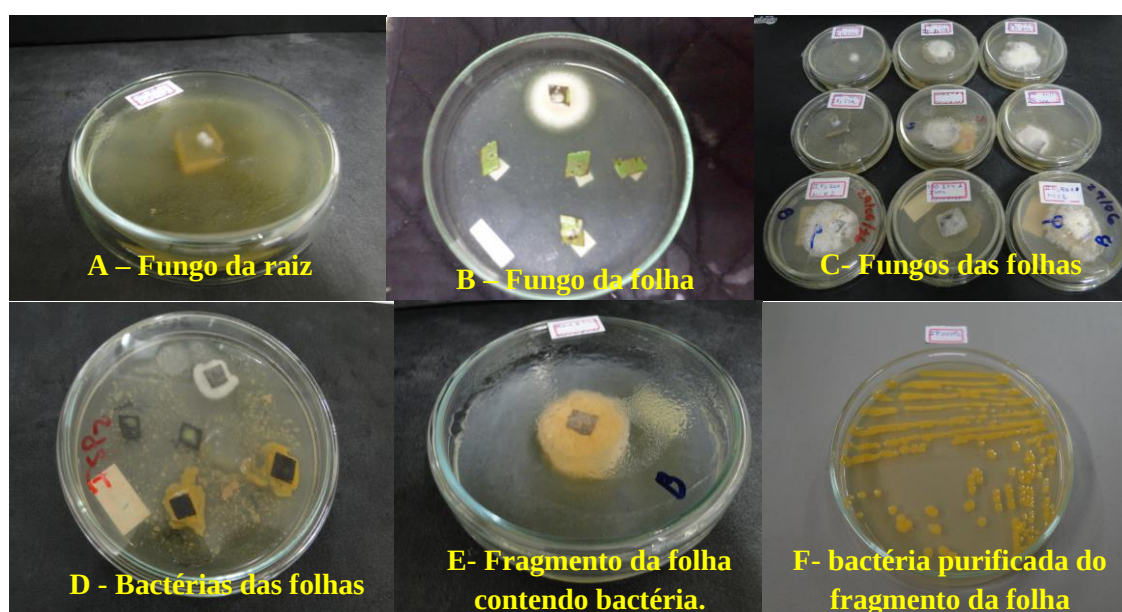


Figura 15- Purificação dos micro-organismos endofíticos bactérias (G e H), levedura (I) e Actinobactéria (J) respectivamente.



Das folhas e raízes de *I. pes-caprae* (L.) R. Br foram isolados um total de 123 micro-organismos. Os fungos foram os maiores representantes com 57,71% (71/123), seguidos pelas bactérias com 43,22% (53/123) e apenas 0,81% (1/123) de actinobactéria (Tabela 4).

Tabela 4 – A frequências de endofíticos isolados das folhas e raízes de *I. pes-caprae* (L.) R. Br

Frequência dos endofíticos %			
Micro-organismos	Folha	Raiz	Total
Actinobactéria	0,81 % (1/123)	NR*	0,81 % (1/123)
Bactérias	41.46% (51/123)	1.62% (2/123)	43,22% (53/123)
Fungos	44.71% (55/123)	13% (16/123)	57,71% (71/123)

*NR- Nenhum resultado

Como pode ser observado na tabela 04 no isolamento dos fragmentos das folhas, os fungos apresentaram a maior frequência de endofíticos isolados. Este fato foi relatado por Okane et al. (2001) que isolaram 296 fungos endofíticos das folhas de *Bruguiera gymnorhiza*. A frequência de micro-organismos isolados nas folhas foi maior do que na raiz tanto para fungos como para bactérias. Rezwana et al. (2010) estudando a comunidade de fungos endofíticos da planta medicinal *Withania somnifera*, obteve um total de 643 isolados dos quais 202 foram de folhas, 391 do caule e 50 da raiz.

A diversidade de fungos endofíticos também foi verificada no isolamento de 784 fungos a partir de 1.200 fragmentos de folhas de *Pinus taeda* (PIMENTEL et al., 2010).

Hilarino et al. (2011) isolaram 1110 colônias de fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia brevipes*.

Em relação à frequência de bactérias, Trevet e Hollis (1948); Jacobs (1985); Sturz (1995); Hinton e Bacon (1995); Palus et al. (1996), relatam que a constatação de bactérias endofíticas tem sido observadas em muitas espécies cultivadas e em diferentes

estágios de crescimento.

Segundo Hallmann et al. (1997), a penetração das bactérias endofíticas no tecido vegetal pode ser de forma ativa, através da degradação enzimática da parede celular da planta pelas enzimas celulolíticas e pectinolíticas. Logo após, elas se movimentam dentro da planta, atingindo os diversos órgãos e tecido (AZEVEDO, 1998).

Sturz et al (1997) isolaram 31 espécies de bactérias da planta *Trifolium pratense* L. Destes 14 gêneros foram isolados das raízes e de nódulos. Mas a maior diversidade de gênero foi encontrada nas folhas.

Os meios de cultura ISP-2 e ISP-4 preparados em água do mar artificial foram mais específicos para o crescimento de bactérias, dificultando o crescimento de actinobactérias.

A frequência de actinobactéria isolada da folha *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br foi baixa (0.81%). Esta baixa frequência de actinobactérias endofíticas foi observada no estudo de Tonial (2010), no qual isolou, das folhas da Aroeira - Vermelha, 48 fungos e três actinobactérias, assim verificou-se uma maior diversidade de fungos endofíticos na folha em relação à quantidade de bactérias e actinobactérias. Talvez estes valores estejam relacionados com o local da coleta onde o solo é salino.

Nóbrega, et al. (2004) relatam que a salinidade é caracterizada por um excesso de sais solúveis que provoca uma redução do potencial hídrico do solo, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas. Essa redução, associada com os efeitos tóxicos dos sais, interfere inicialmente no processo de absorção de água pelas sementes, influenciando também no desenvolvimento normal das plantas e sobre alguns processos biológicos, como a influência sobre a comunidade bacteriana associada às plantas.

5.2. Isolamentos de actinobactérias da rizosfera *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

Da rizosfera da planta *Ipomoea pes-caprae*, foi possível quantificar 212 unidades formadoras de colônia (UFC) provenientes das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Dessas 212 UFC, 81 foram isoladas (Figura 16). O meio de cultura Czapeck Dox Ágar foi o melhor meio de cultura para isolamento em todas as diluições (figura 17), pois apresentou o maior número de colônias ($41 \text{ UFC na diluição } 10^{-3} = 41 \times 10^3$). Destas 81 actinobactérias, apenas 29 apresentaram crescimento com micélio aéreo após o isolamento.

Figura 16– Colônias de actinobactérias em placa no Meio Czapeck Dox Ágar – salino, amostra 2 diluição 10^{-3} .

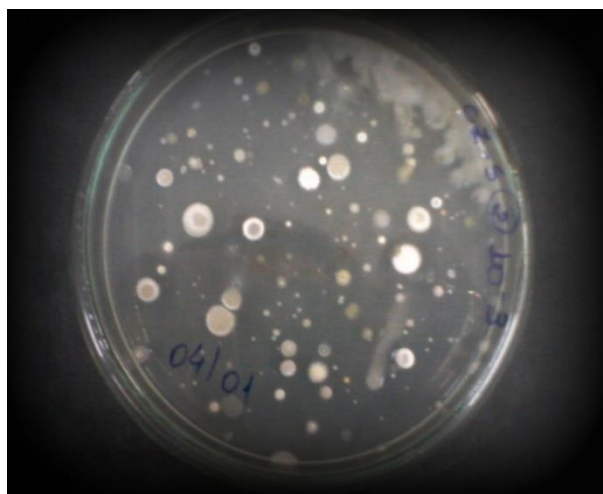
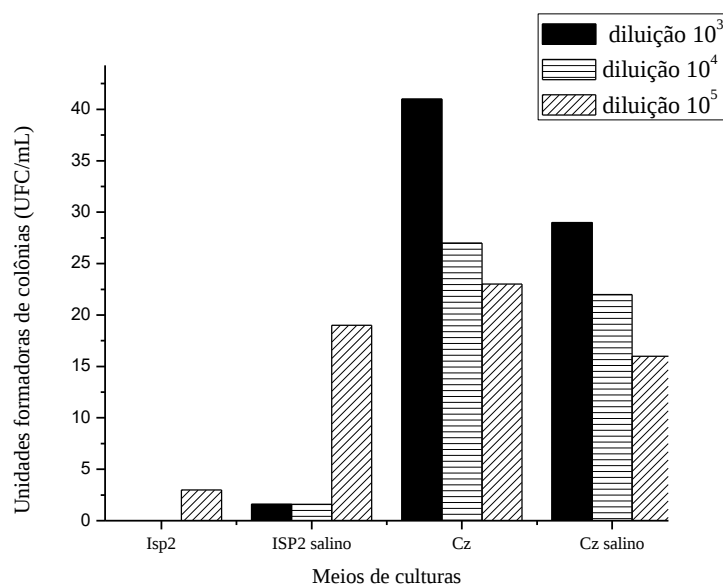


Figura 17- Relação das unidades formadoras de colônias de actinobactérias isoladas em diferentes meios de cultura ISP₂, ISP₂ salino, Czapeck e Czapeck salino.



A rizosfera é uma região do solo que é influenciada pelas raízes das plantas, sendo caracterizada por apresentar alta atividade microbiana (HILTNER, 1904, LIN et al., 2010).

Em nosso trabalho verificamos a presença de 212 UFC de actinobactérias na rizosfera da planta *I. pes-caprae*, mas somente 81 UFC foram isoladas, apresentando uma população que variou de 41×10^3 a 5×10^5 UFC por grama de solo.

A presença de actinobactérias também foi relatada por Qui et al. (2012), através da análise de amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos da planta medicinal *Rumex Patientia* de Jilin, China e por Ara et al. (2013), onde a população de actinobactérias variou de 22×10^3 a 168×10^3 UFC por grama de solo da rizosfera de várias plantas medicinais em Dhaka, Bangladesh.

O isolamento de actinobactérias do meio Czapeck Dox Ágar com NaCl 0,3%, em nosso trabalho corroboram com os resultados obtidos por Azuma (2011), que

identificou este mesmo gênero de actinobactérias em meios de cultura Czapeck Dox Ágar e Czapeck Dox Ágar salino na região entre-marés da Ilha do Mel – Paraná.

Apesar de essas actinobactérias serem do habitat de rizosfera de *Ipomoea pes-caprae*, uma planta de dunas de praia do litoral brasileiro (WASUWAT, 1970, LORENZI e MATOS, 2008), o maior número de isolados ocorreu em meio de cultura não salino, desta forma, sugere-se que estas actinobactérias sejam halotolerantes (CARRO et al., 2014).

A quantidade de actinobactérias isoladas da rizosfera foi significativamente maior em comparação com a quantidade de actinobactéria endofítica. Talvez fatores como temperatura, umidade e a radiação ultravioleta podem afetar a esporulação desses micro-organismos nas folhas e raízes (OKANE et al., 2001).

5.3 Identificações dos micro-organismos

5.2.1 a) Morfologia do endófito Actinobactéria

A identificação taxonômica, em nível de gênero, de actinobactéria isolada da folha foi através de observações macro e micromorfológicas. As características morfológicas das linhagens foram determinadas através da análise da cor e forma da cadeia de esporos e após 21 dias de cultivo no meio ISP-2.

O endófito SAB3F3 apresentou cor cinza claro em meio ISP-2 sem formação de pigmento (Figura 18). Em sua micromorfologia apresentou esporos espiralados (Figura 19) e esta característica indica que esta linhagem pertence ao gênero *Streptomyces*.

Figura 18- Característica macromorfológica do endófito *Streptomyces* sp isolado da folha *I. pes-caprae* (L.) R. Br

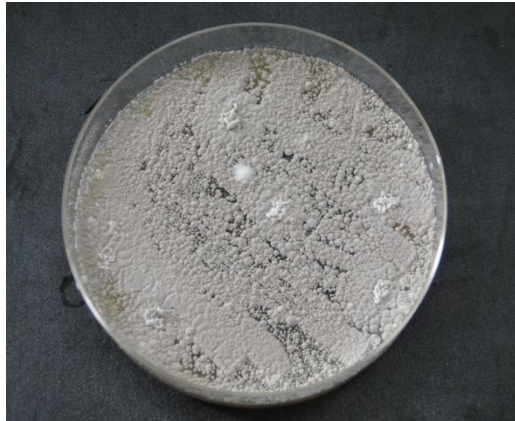
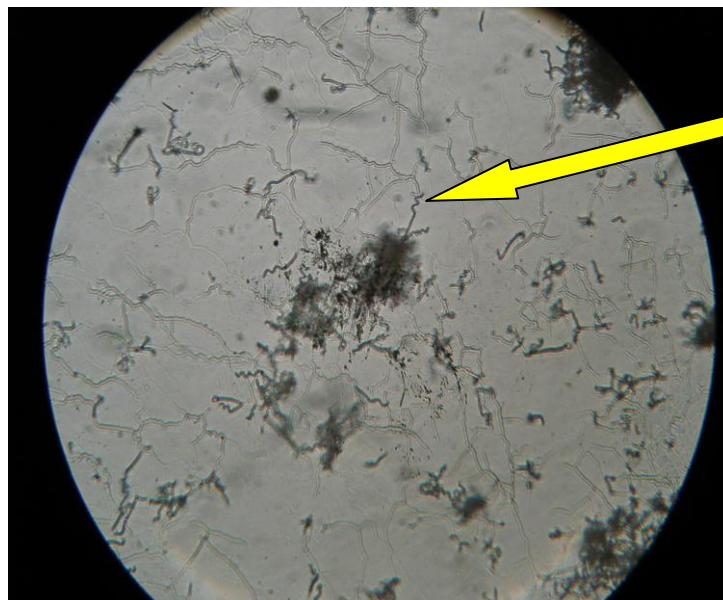


Figura 19– Características micromorfológicas do endófito SAB3F3 *Streptomyces* sp isolado da folha *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br



hifa espiralada

A presença deste gênero é importante para o desenvolvimento e a saúde da planta, pois suas atividades biológicas podem influenciar no crescimento da planta ou através da assimilação de nutrientes, ou pela produção de metabólitos secundários (SARDI et al., 1992).

Streptomyces sp tem sido reconhecido pela sua capacidade de interagir com as plantas superiores ou mesmo com outras populações microbianas, mediante a produção de antibióticos (GAVA et al., 1999; PEREIRA, 2003).

Reginatto (2008) isolou das folhas da bromélia *Vriesea friburgensis* dezesseis bactérias gram-positivas, entre estas foi isolado o endófito actinobactéria do gênero *Streptomyces sp*.

Favoretto, (2010) também isolou das plantas do cerrado *Butia capitata* var *capitata* e da *Miconia albicans*, endofíticos do Gênero *Streptomyces*.

Devido à diversidade da produção de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* são necessários estudos de bioprospecção para aplicação desses metabólitos na área médica e agrária (INBAR et al., 2005).

5.2.1 b) Morfologia da Actinobactéria rizosférica

A linhagem A94 apresentou cor branca em meio CZ sem formação de pigmento. Em sua micromorfologia apresentou filamento ramificado com esporos em cadeia e esta característica sugere que esta linhagem pertença ao Gênero– *Nocardia sp*.

São bactérias aeróbicas, Gram positivos pertencendo a família Nocardiaceae (GOODFELLOW et al., 2012; LUO et al., 2014) sendo distribuídos em habitat aquáticos e terrestres (KURUP and SANDHU, 1965; YAMAMURA et al., 2005; EL-GENDY et al., 2008). Por exemplo, Vaddavalli et al (2013) isolaram da rizosfera de *Callistemon citrinus* (Curtis)- Índia, uma nova actinobactéria *Nocardia bhagyanesis sp*.

nov; Zhang et al. (2010) isolaram gênero *Nocardia* do solo coletadas do planalto Qinghai-Tibet e Barros et al. (2003) isolaram do solo do cerrado *Nocardia cerradoensis*.

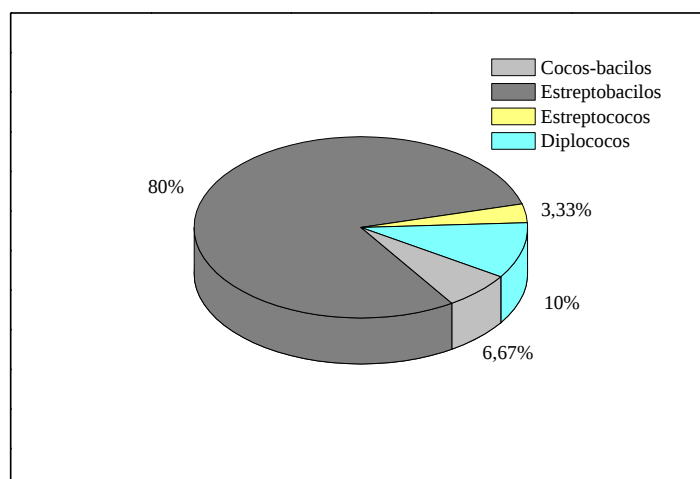
Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas com o gênero *Nocardia* e estimasse 4.455 publicações e 944 patentes (LUO et al., 2014). O aumento do número de pesquisar por este gênero se dá pelo número de metabólicos secundários produzidos e pela capacidade de degradar tanto compostos orgânicos complexos a partir de óleos como resíduos industriais que contaminam o meio ambiente. Por tanto estes fatores indicam que este gênero possui uma versatilidade metabólica de interesse industrial.

5.2.2 Identificação das bactérias endofíticas

Foram isoladas 53 bactérias de folhas e raízes. Como existia semelhança de cor, textura e forma das colônias entre elas, agrupamos a semelhantes e trabalhamos com 30 linhagens. Das 30 bactérias foram realizadas a identificação taxonômica através técnica da coloração de Gram e técnica KOH (POWERS 1995) e testes bioquímicos segundo (ANVISA 2004; KONEMAN 2008) Quadro 7. Em relação a morfologia foram observadas as seguintes características: 2 (6,66%) coco-bacilos, 24 (80%) estreptobacilos, 1(3,33%) estreptococos e 3 (10%) diplococos (Figura 20). Na coloração de Gram seguida do teste do KOH foi observado que 90% das bactérias selecionadas são Gram-positivas e somente 10% são Gram-negativas. A catalase foi positiva para as 30 linhagens e na produção de esporos, 24 linhagens foram positivas. Segundo o Manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA (2004) as linhagem que são Gram-positivas, catalase (+) e esporos (+) podem pertencer ao gênero *Bacillus*.

Além das características bioquímicas, as bactérias apresentavam bordar irregulares, opacas e de coloração esbranquiçada, reforçando assim a sugestão para o gênero *Bacillus*. No entanto, a identificação das bactérias só seria confirmada mediante análise biomolecular, que infelizmente não foi possível realizar.

Figura 20– Análise morfológica as bactérias endofíticas isoladas de folhas e raízes *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br



Quadro 7- Análise morfológica e bioquímica das bactérias endofíticas isoladas de folhas e raízes *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

			Teste									
Código	Bactérias	Morfologia	Gram	KOH	Catalase	Esporo	Meio TSI	Meio TSI	Meio SIM	Meio SIM	Oxidade	ágar sangue
							H2S	Pord. Gás	Indol	Motilidade		
1	2F5ISP2-3	cocos-bacilos	-	+	+	-	-	-				não hem.*
2	2F2ISP2-4	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem.
3	3F3ISP2	cocos-bacilos	-	+	+	-	-	-	-	-	-	não hem.
4	1F1ISP2-4	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
5	2F5ISP2-4	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-			-	não hem.
6	1F3ISP4-4	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-		não hem.
7	2f4isp2-2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-		não hem.
8	2f4isp4-4	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem.
9	2f4isp2-1 amarela	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
10	1f3isp2-5	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
11	3f2isp2	estreptobacilos	-	+	+	-	-	-				não hem.
12	2f5isp2-5	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-	+	não hem.
13	1f1isp2-2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
14	2f4isp2-1 branco	estreptobacilos	+	-	+	-	-	-	-	+	-	não hem.
15	1f3isp2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
16	ala5f2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem.
17	ala1f5	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.
18	ala3f1	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem.
19	ala3f2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem.

20	mc1f1-1	estreptobacilos	+	-	+	-	-	-	-	-		não hem
21	ala3f1-amarelo	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-				não hem
22	ala3f3 branco	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem
23	mc1f1-2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-	-	não hem
24	ala 1f4	estreptococos	+	-	+	-	-	-	-	+	+	não hem
25	mc1f5 rugosa	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-	+	não hem
26	mc1f5-gel	diplobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	-	não hem
27	mcifi-4	diplobacilos	+	-	+	+	-	-	-	-		não hem
28	ala3f3-a	diplobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	-	não hem
29	mc1f5-2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem
30	bda1f2	estreptobacilos	+	-	+	+	-	-	-	+	+	não hem

*não hem. Não foi observado hemólise no meio de cultura.

A presença de bactérias endofíticas foi verificada em vários estudos de outras plantas nos mais diferentes tipos de tecidos e órgãos permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica (ARAÚJO et al. 2002; POLLI et al., 2012). Este resultados corroboram com Silva et al. (2012) , que isolaram bactérias endofíticas das folhas e raízes na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida.

Entre as bactérias endofítico podemos citar: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter* e *Enterobacter cloacae*, entre outras (MARIANO et al., 2004).

O gênero *Bacillus* é muito estudado devido a sua importância no setor agroindustrial como controle biológico (NGUGIA et al., 2005; YAO et al., 2006), e este gênero se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos. Possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (LANNA FILHO et al., 2010).

Assim a presença do genero *Bacillus* em nosso trabalhos corrobora ao trabalhos semelhantes como Texeira et al. (2007) que isolaram 482 micro-organismos da mandioca e o gênero *Bacillus* apresentou a maior frequências de isolados, Ferreira (2008) isolou *Bacillus* endofíticos que colonizavam sementes e plântulas de Eucalyptos, Monnerat (2014) isolaram 15 linhagens de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão.

No entanto, a frequência dos tipos gêneros de bactérias a serem isolados vai depender da relação solo-planta e micro-organismo e o estudo desta interação é bastante complexo, porque vai depender das condições do habitat, salinidade, pH, temperatura,

clima (chuva, sol), condições e técnicas de isolamento e a própria microbiota da planta.

5.2.3 Identificação de fungos filamentosos e leveduras

A análise morfológica e micromorfológica de 8 endófitos (Quadro 8) foram realizadas. Na figura 21 pode-se observa a colônia do endófito 3F3 (*Aspergillus terreus*) em cultivo central no meio Saboraud.

Quadro 8– Fungos endofíticos isolados da folha *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

Código	Identificação – Fungos
3F3	<i>Aspergillus terreus</i>
3F2	<i>Aspergillus ochraceus</i>
1F5	<i>Nigrospora sphaerica</i>
1F2/1	<i>Penicillium aspergiloides</i>
3F2/4-A	<i>Aspergillus terreus</i>
3F2/2-A	<i>Aspergillus terreus</i>
1F4	<i>Aspergillus sp</i>
2F4	<i>Penicillium aspergiloides</i>

Figura 21- 3F3 identificado como *Aspergillus terreus* foi isolada da folha *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br



Na madeira de manguezal na Índia foram isolados 87 fungos e entre estes *Aspergillus* foi o gênero dominante (RAI et al.; 1981).

Segundo Fisher (1986), Fisher et al.(1991), Southcott e Johnson (1997) relatam que tem sido encontrado a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como endofíticos.

Jiun-Horng et al. (2010) isolaram fungos endofíticos da planta *Garcinia parviflora* e *G. mangostana*, onde foi observado a maior ocorrência dos gêneros *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Geomeralla*, *Guignardia*, *Hypocrea*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Xylariales*. Vários trabalhos mostram a ocorrência destes gêneros em várias plantas como relatados por Rodrigues (1994); Fisher et al. (1995); Southcott e Johnson (1997); Bayman et al. (1998); Beena et al. (2000); Cannon; Simmons (2002); Frohlich et al. (2000); Kumaresan et al. (2002).

5.2.4 Atividade Antimicrobiana- Teste primário em “bloco de gelose”

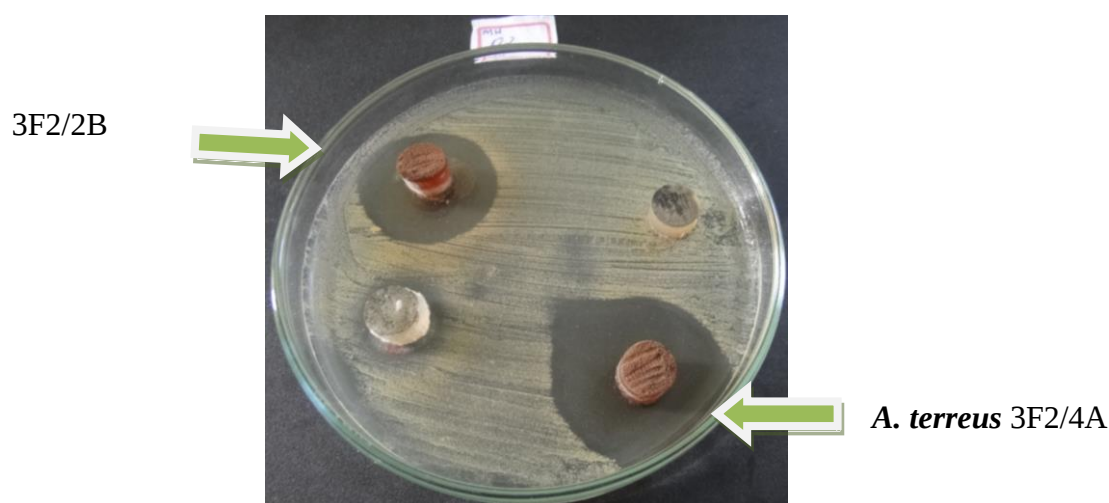
Para avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido foram utilizados os seguintes micro-organismos endofíticos: 01 actinobactéria e 69 fungos. Perfazendo um total de 70 micro-organismos endofíticos.

A atividade antimicrobiana foi diversificada, dos 69 fungos isolados de folhas e raiz, 22.53% apresentaram atividade antagonista para algum micro-organismo teste.

Os fungos endofíticos apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas (Tabela 05). Os endófitos 1F1/1, *Aspergillus terreus*, F2/4A e 3F2/2B apresentaram halo de inibição de $\pm$ (25.00, 15.33 e 14.33) mm para *E. coli* e de $\pm$ (27.66, 28.66, 25.33) mm para *E. faecalis* respectivamente.

Para o micro-organismo teste *S. aureus* os endofíticos *A. terreus* 3F2/4A, 3F2/2B e 3F3 apresentaram halo de inibição antimicrobiana de $\pm$ (32.33, 31.66, 30.00) mm respectivamente (Figura 22).

Figura 22- Halo de inibição $\pm$ (32.33 e 31.66) mm, dos endofíticos *A. terreus* 3F2/4A, 3F2/2B frente ao micro-organismo teste *S. aureus*.



Todos os endófitos testados apresentaram atividade contra *B. subtilis* com halo de inibição com média de $\pm 23,40$ mm.

O endófito 1F1/1 foi o único que apresentou halo de inibição de ± 15.5 mm para *C. albicans*.

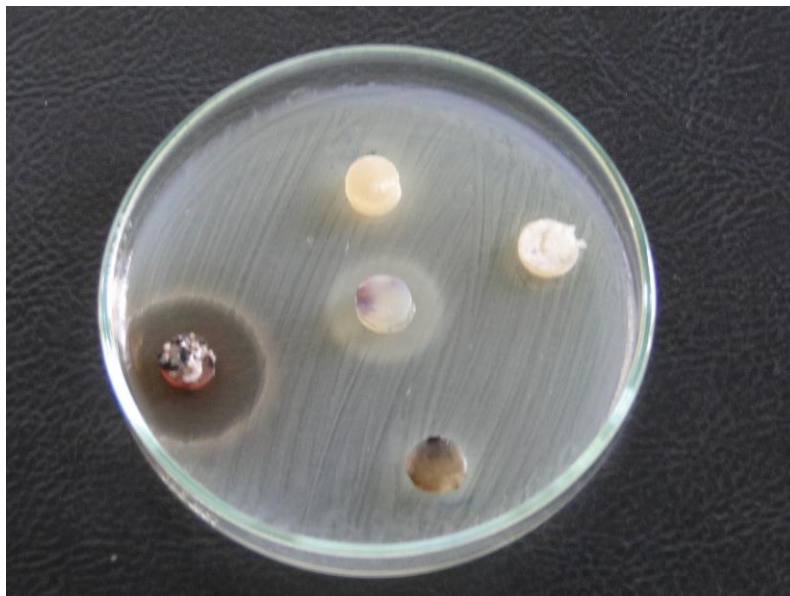
Destes endofíticos testados dez apresentaram halo de inibição para bactéria Gram-negativa *E. coli* nos valores variando de $\pm 23, 26, 29.33, 26.66, 25.33, 26.6, 30, 25, 15.33, 14.33$ mm respectivamente (Tabela 05, figura 23). Todos os fungos testados apresentaram atividade antimicrobiana para o micro-organismo teste *S. aureus*, no entanto, o endófito 2F4/4 apresentou o maior halo de inibição ± 30.0 mm tanto para *S. aureus* como *B. subtilis*.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana de micro-organismos endofíticos isolados *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br

Micro-organismos testes								
Endofíticos	<i>S.aureus</i> (D.P)		<i>B. subtilis</i> (D.P)		<i>E. faecalis</i> (D.P)		<i>E.coli</i> (D.P)	
1R3	±21,6	2.66	±26,3	2.19	0.0	0.0	±23	0.0
3F2/4	±20,6	2.79	±17,3	3.33	0.0	0.0	0	0.0
3F2/2-3	±23	0.0	±27,6	2.08	0.0	0.0	±26	0.0
2R5	±21,6	2.66	±13,3	4.33	0.0	0.0	0	0.0
2R5/1	±16,6	3.46	0	0.0	0.0	0.0	0	0.0
1F1/3	±22,3	2.58	±28	0.0	0.0	0.0	±29,3	1.96
1F3/3	±14	0.0	±15,6	3.68	0.0	0.0	0	0.0
3F2/3	±22,3	2.58	±27,3	2.11	0.0	0.0	±26,6	2.16

3F1/5	±24,6	2.34	±27,3	2.11	0.0	0.0	±25,3	2.27
3R3/5	±22	0.0	±27,6	2.08	0.0	0.0	±26,6	2.16
3F4/5	±15.6	3.68	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2F4/4	±30.0	0.0	±30.0	0.0	0.0	0.0	±30.0	0.0
<i>A. terreus</i> (BDA3F3)	±30.0	0.0	±20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ALA 1F1/1	0.0	0.0	±22.33	2.58	±27.66	5.52	±25.0	0.0
<i>A. terreus</i> (SAB3F2/4A)	±32.33	1.78	±26.0	0.0	±28.66	2.01	±15.33	3.57
<i>A. terreus</i> (SAB3F2/2A)	±31.66	1.82	±25.33	2.27	±25,33	2.27	±14.33	4.02
<i>Streptomyces</i> sp	±30.00	0.0	±20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Figura 23 – Halo de inibição (mm) do endófito 2F4/4 com halo de inibição de ± 30.0 mm para o micro-organismo teste *E. coli*.



Fenical e Jensen (1982) relatam que micro-organismos isolados de locais que apresentam salinidade, temperaturas altas maiores que do solo e água doce, provavelmente desenvolvem capacidade fisiológicas e metabólicas únicas que lhes permitem sobreviver em uma grande variedade de habitat e condições inóspitas, além de lhes conferir um potencial para a produção de metabólitos secundários.

Photita et al. (2001); Kumaresan; Suryanaryanan, (2001) relatam que pesquisas sobre fungos endofíticos, principalmente de regiões tropicais surgem como um potencial para a descoberta de novos produtos.

Vários exemplos sobre o potencial de alguns micro-organismos endofíticos vêm mostrando que, vários metabólitos de endofíticos, podem ter aplicações biotecnológicas diversas como enfatizado por Wiyakrutta et al. (2004).

Sun et al. (2011) obtiveram o metabólito Massarigenin D com atividade

antifúngica e citotóxica que foi produzido pelo fungo endofítico *Massrison* sp. isolado da planta *Rehmannia glutinosa*.

Sim et al. (2010) isolaram os endófitos *Fusarium equiseti* e *Guignardia vaccinii* da planta *Garcinia parvifolia*. O endófito *F. equiseti* apresentou atividade antimicrobiana para *Bacillus megaterium* e *G. vaccinni* apresentou atividade antimicrobiana para *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecalis*.

O endófito *Streptomyces* sp apresentou atividade antimicrobiana para bactérias Gram-positivas com halo de inibição de $\pm 30,00$ mm e ± 20 mm para os micro-organismos *S. aureus* e *B. subtilis* respectivamente (Tabela 03).

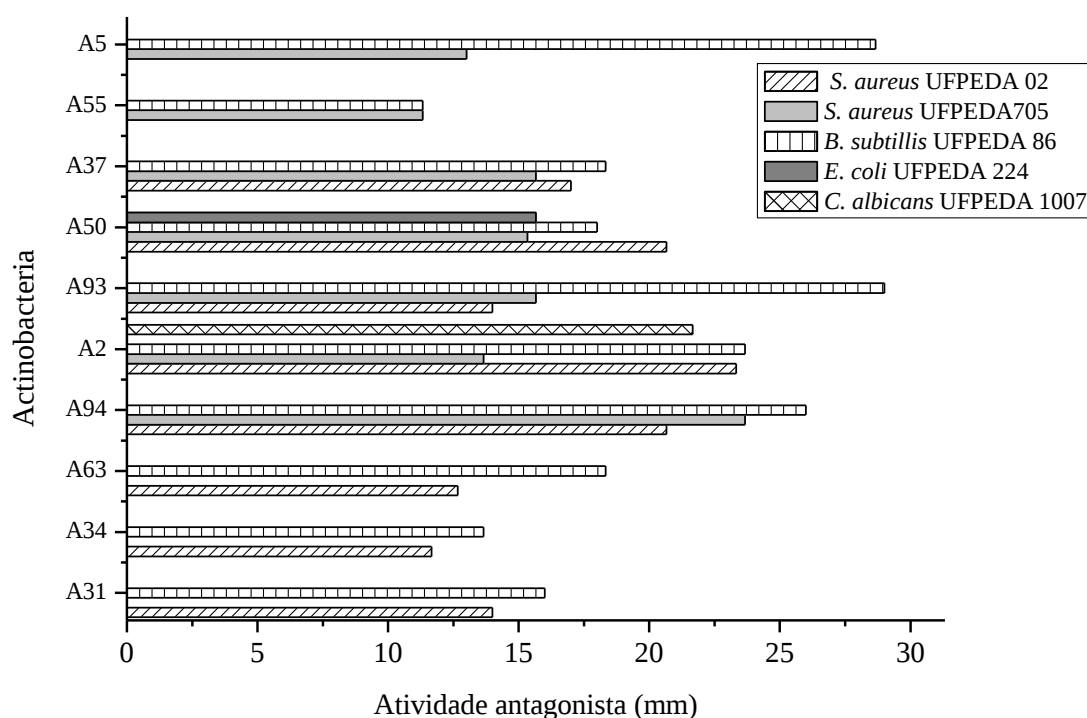
A atividade antimicrobiana do gênero é relatada em vários trabalhos ao longo da história. Por exemplo, em 1952 a eritromicina (macrolídeo) foi isolada pela primeira vez de *Streptomyces erytheus*, e a vancomicina (glicopeptídeo) foi isolado de *Streptomyces orientalis*. Em 2003 foi aprovado o daptomicina (lipodepsipeptídeo) que foi isolado de *Streptomyces roseosporus* (Von NUSSBAUM et al., 2006; PACE e YANG, 2006; BROTZ –OESTERHELT e BRUNNER, 2008).

Castillo et al. (2002) purificaram os peptídeos munumbicinas A-D, obtido do endófito *Streptomyces* isolado da planta *Kennedia nigriscans*, apresentando atividade frente a bactérias resistentes à metilina.

Vários antibióticos isolados de *Streptomyces* endofíticos apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas: Munumbicinas E4 e E5 de *Streptomyces* NRLL 3052 e Celastramina A de *Streptomyces* MaB-QuH-8 (PULLEN et al., 2002; CASTILLO et al., 2006)

As actinobactérias da rizosfera apresentaram atividade antimicrobiana semelhante ao endófito *Streptomyces* para bactérias Gram positivas *S. aureus* e *B. subtilis*. A diferença foi inclusão *S. aureus* UFPEDA 705 que obteve atividade antimicrobiana (variando de ± 15.00 as ± 23.00 mm) para bactéria Gram positiva, Gram-negativa *E. coli* UFPEDA 224 ($\pm 15,66$ mm) e para levedua *C. albicans* (± 21.66 mm) conforme a figura 24.

Figura 24- Halo de inibição (mm) da atividade antimicrobiana dos micro-organismos da rizosfera *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br



Após a purificação das linhagens de actinobactérias da rizosfera, apenas 29 apresentaram crescimento com hifas secundárias suficientes para a realização da atividade antimicrobiana. Das 29 actinobactérias testadas, a linhagem *Norcadia* sp (A94) apresentou atividade antagonista de 23.66 mm frente a bactéria *S. aureus* UFPEDA 705.

Atividade antimicrobiana semelhante foi relatada em estudo de *Streptomyces* (BT-408) isolado de sedimentos da Baía de Bengala em oceano da Índia, para avaliação de sua atividade contra *S. aureus* resistente a meticilina, os autores constataram que essa actinobactéria apresentou halo de atividade antimicrobiana de 20 mm (SUJATHA et al., 2005) e na pesquisa realizada com actinobactérias isoladas da região Visakhapatnam, após o processo de fermentação e isolamento dos compostos, a fração B01 apresentou atividade moderada para os micro-organismos *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *B. cereus* (RAO et al., 2012).

A busca por metabólitos secundários com atividade antagonista frente às espécies do gênero *Staphylococcus* é importante devido a sua versatilidade epidemiológica, padrões de resistência e por ser um indicador de elevada incidência de infecções hospitalares (RATTI e SOUSA, 2009; CARACIOLO et al., 2012) e esse problema se agrava quando se depara com a realidade de linhagens do gênero *Staphylococcus* multirresistentes (FESTUCCIA et al., 2013).

5.3. Cultivo dos micro-organismos endófito *Streptomyces* sp para a Fermentação Submersa

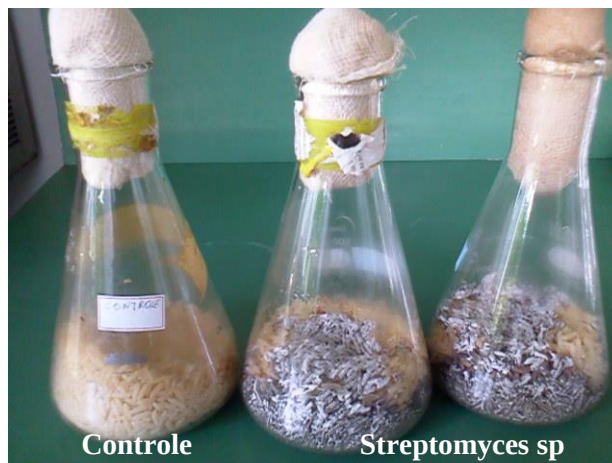
Realizamos a fermentação do endófito *Streptomyces* nos meios de cultura ISP2 e MPE, mas durante o tempo de fermentação de 96 h, o micro-organismo não apresentou produção do metabólito secundária que foi avaliada através do teste de atividade antimicrobiana (KIRBY E BAYER, 1996) utilizando micro-organismos teste *S. aureus* UFPEDA 02.

5.4. Cultivo dos micro-organismos endofíticos e rizoféricos para preparação dos extratos

5.4.1 Fermentação em Substrato Sólido dos micro-organismos

Segundo o resultado do teste de atividade antimicrobiana, os fungos endofíticos, endófito *Streptomyces* sp e actinobactéria rizofética *Nocardia* sp foram selecionado para o processo de fermentação em meio sólido de arroz. Todos os micro-organismos tiveram ótimo crescimento no meio de arroz (Figura 25). Desta fermentação foi obtido um extrato metanólico bruto dos endófitos e da *Nocardia* sp com o rendimento de 30g.

Figura 25- Fermentação do endófito *Streptomyces* sp em dois Erlenmyer de 500 mL com meio sólido de arroz com 21 dia de crescimento.



A Fermentação em substrato sólido há muito tempo tem sido utilizado, diferenciando da fermentação submersa por utilizar um substrato sólido, com o teor de humidade reduzido e produção de alto teor de metabólitos secundários (YANG e YUAN 1990; NIGAM e SINGH, 1994; MARTINS et al., 2011).

A FSS tem sido utilizada para a produção de alimentos, combustível, enzimas e também para a degradação do corante. Vários resíduos podem ser utilizados como substrato como, por exemplo: palha de trigo, casca de arroz e sabugo de milho (ROBINSON et al., 2000).

Kota e Sridhar (1998) melhoraram a produção da Cefamicina C (Ceph C) que é produzida por *Nocardia lactamdurans*, *Streptomyces cattleya* e *S. clavuligerus*, trocando o processo de produção da fermentação submersa (FS) para a FSS. Eles mostraram que Ceph C produzido por FSS produziu um antibiótico mais estável do que o produzido no FS. A fermentação ocorreu em substrato de trigo, com produção de Ceph C início no dia três e atingindo um valor máximo após dia cinco.

A demanda crescente na ciência a respeito de produção de antibióticos, com uma demanda global crescente e os casos de resistência aos antibióticos, levará um aumento na utilização da FSS devido o desenvolvimento de bioprocessos para a produção ou extração de compostos bioativos de fontes naturais e pela potencial aplicação destes compostos nos alimentos, na química e indústrias farmacêuticas.

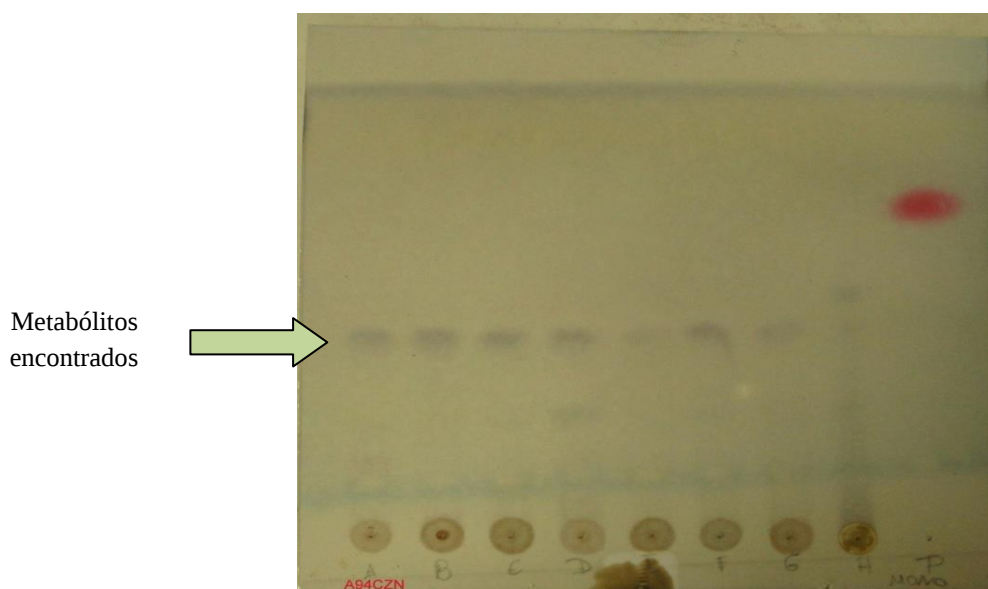
5.4.2 Caracterização química do extrato metanólico dos micro-organismos

Foram realizadas as caracterizações química dos extratos MeOH das biomassas dos micro-organismos selecionados para a fermentação, e do extrato MeOH das folhas de *I. pes-caprae*. Foi detectada a presença de mono e sesquiterpenos tanto no extrato dos micro-organismos como no extrato da planta. Os demais metabólitos secundários pesquisados não foram observados conforme a tabela 06 e figura 25.

Tabela 6 - Avaliação da caracterização química dos extratos MeOH dos micro-organismos em comparação com o extrato MeOH da folha de *I. pes-caprae* (L.) R. Br

Metabólito	Extrato dos Micro-organismos	Extrato planta
Triterpenos e Esteroides	Negativo	Negativo
Monoterpenos e Sesquiterpenos	Positivo	Positivo
Alcaloides	Negativo	Negativo
Cumarina, flavanoides, fenilpropanoides e derivados cinâmicos	Negativo	Positivo para Flavanoide.

Figura 26 - Caracterizações química dos extratos MeOH das biomassas dos micro-organismos A- *Nocardia* sp; B- *Streptomyces* sp, C*-1F1ISP2/3, D*- 3F2SAB/2-3, E*-1R3ISP4/1, F*- 3F2SAB/4, G*- 3R3 SAB/5, H- extrato da folha da planta e P – padrão Timol com a detecção da presença de mono e sesquiterpenos. *Todos são extratos de fungos endofíticos.



Na análise química dos extratos MeOH dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos verificamos a presença de mono e sesquiterpenos. A presença de sesquiterpenos e outros metabólicos secundários, no extrato da planta *I. pes-caprae* foi relatado por Pogprayoon (1991 ;1992). Apesar de a prospecção química ser geralmente realizada com extrato de partes diferentes da planta como folha e raiz; é importante considerar que na rizosfera existe uma relação inter e intraespecífica entre os micro-organismos e o meio ambiente que o influencia a produzir compostos semelhantes. (MELO e AZEVEDO, 2008, KENT e TRIPLETT, 2002, MORAIS et al., 2014).

Os terpenóides podem ser encontrados em varias espécies vegetais e micro-organismos, eles compõem a grande variedade de substâncias cuja origem biossintética deriva da combinação de duas unidades isoprênicas. A maioria dos terpenóides é formada nos cloroplastos pela via do 5-fosfato-1-Deoxi-D-Xilulose (Via DXPS) e as

enzimas monoterpeneo ciclases produzem monoterpênos cíclicos (monocíclicos e bicíclicos) através de um mecanismo de múltiplas etapas que envolvem um intermediário universal, o cátion mentil/ α -terpinil o qual pode ser transformado em diversos compostos classificados como pinanos, fenchanos, boranos, tujanos e caranos (DEWICK 2002).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos. Também possuem outras atividades biológicas como: atividades inibidoras do crescimento de células neoplásicas (SIANI et al, 1999; SAENS et al, 1996), antivirais - influenza e HIV (HAYASHI et al, 1995) e ações sobre o SNC, destacando-se suas atividades sedativa, ansiolítica, antinociceptiva, anticonvulsivante, pró-convulsivante e alucinógena (PASSOS et al., 2009).

Além destas atividades biológicas, esses compostos são utilizados como componentes de fragrâncias, cosméticos, produtos de limpeza, desinfetantes, aditivos de alimentos e em medicamentos devido ao aroma e propriedade antimicrobiana (AMARAL et al., 1998, SEO et al., 2008)

As atividades antimicrobianas em nosso trabalho corroboram com Toscan (2010) que avaliou a atividade antimicrobiana de diferentes terpenoides contra bactérias Gram positivas e Gram-negativas. Tanto os monoterpênos e sesquiterpenos estão associados a funções químicas como carbonetos e álcoois, e a atividade antimicrobiana dos monoterpênos está relacionada com ação deste sobre a membrana dos micro-organismos (TURINA et al., 2006, BAKKALI et al., 2008).

Estudos futuros dos metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos podem ser realizados, a fim de purificar e identificar o metabólito ativo responsável pela atividade antibacteriana.

5.5 Teste de atividade enzimática

5.5.1. Atividade enzimática de fungo endofíticos da enzimas protease, celulase, amilase e lipase

Os testes de atividade enzimática foram realizados em triplicata para os 71 fungos endofíticos e através destes resultados verificamos que 42.25% destes endofíticos apresentam atividade enzimática para protease, celulase, amilase e lipase, indicando o potencial destas culturas para a indústria farmacêutica.

Entre os endófitos testados, *Nigrospora sphaerica* apresentou área de degradação para amilase (610.53 mm), celulase (678.24 mm) e lipase (816.4 mm).

Os endófitos 5R5/1, 3F2/4, 1F4/2-15, 1F1/3 apresentaram área de degradação proteolítica nos valores de (1314.3, 1236.3, 1575.7, 1020.5) mm respectivamente e o endófito 3R3/5 apresentou área de degradação para amilase, protease e celulase nos valores de (1448.86, 854.1 e 1884) mm respectivamente (Tabela 07).

Tabela 7- Avaliação da atividade enzimática de fungos endofíticos de *I. pes-caprae* (L.) R. Br.

Fungos	Atividade Enzimática - área de degradação (mm)			
	Amilase	Protease	Celulase	Lipase
3R3/02	415,71	942	0.0	0.0
1R3/	1509,09	949	0.0	0.0
3F1/1	376,8	0.0	0.0	0.0
1R2/2	936,13	0.0	0.0	453,5
3R5/1	44	1314,3	0.0	0.0
3F2/4	0.0	1236,3	0.0	0.0
1F4/1	0.0	906,6	0.0	600
2F2/2 BRANCO	69,08	181,3	0.0	0.0
3F2/2-3	0.0	363,3	0.0	883,1
1F3/5	0.0	529,9	0.0	483,6
2R5/1	154,56	19	44	0.0
1F4/2	126,94	0.0	0.0	0.0
1F4/2 -15	0.0	1575,7	0.0	953,5
1F1 /3	0.0	1020,5	0.0	416,4
1F4/1- 5	0.0	883,12	0.0	317
1F5 /5	0.0	77	628	759,8
1F3 /3	0.0	14,34	442,94	581,5
3F2/3	471	0.0	0.0	433,9
2F5 /3 BRANCO	0.0	68,8	118,64	181,3
3F1 /5	915,08	412,1	0.0	0.0

3R3/5	1448,86	854,1	1884	0.0
3F4/5	129,52	0.0	883,12	157
3F3-2	105,97	0.0	139,34	435,67
3F3-3	0.0	0.0	267,94	14,91
3F3-4	0.0	0.0	348,48	628
3F3-5	0.0	0.0	606,89	686,87
<i>N. sphaerica</i>	610,53	0.0	678,24	816,4
<i>A. Ochraceus</i>	18,84	0.0	56,52	93,41
<i>A. terreus</i>	138,16	0.0	104,28	181,33
<i>A. terreus</i>	241,78	0.0	222,88	113,16

Os endófitos isolados apresentaram uma boa área de degradação para as enzimas acima, talvez pela utilização dos meios de cultura com água do mar artificial tenha favorecido o metabolismo destes fungos promovendo mais produção de metabólitos secundários *in vitro*.

Jaitly (1987); Jones; Alias (1997) relatam que a sobrevivência e adaptação microbiota é influenciada por vários fatores como pH, salinidade, temperatura, quantidade de água e que segundo Fenical e Jensen (1993) este habitat inóspito pode favoreça a produção de metabólitos secundários de interesse para biotecnologia.

A produção de diversas hidrolases produzidas por fungos é citada por Pandey e cols (2000a), citado por Azevedo e Esposito (2004) onde celulases, proteases, poligalacturonases, lipases e amilases foram obtidas por fermentação em meio sólido utilizando vários fungos filamentosos: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Thermomyces*, *Humicola*, *Mucor* e *Rhizopus* entre outros.

Nossos resultados corroboram com Silva et al.(2006) que relatam atividade

enzimáticas nos fungos endofíticos isolados de *Annona* spp. e Taveres et al. (2012) que isolaram fungos de folhas sadias de *Morinda citrifolia* L., entre os isolados, o gênero *Aspergillus* foram expressivos na atividade enzimática para amilases N34 (29 mm $\pm$ 2,8), N35 (29,5 mm $\pm$ 5,7) e N42 (29 mm $\pm$ 8,1).

A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares é importante, pois estas enzimas são capazes de degradar o amido sendo utilizada nas indústrias de detergentes, têxtil, papel, pães e cerveja (WIT, 1989).

As enzimas proteolíticas são conhecidas como biocatalizadores que alteram reações químicas e devido a isso são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentícia, farmacêutica, química e de diagnóstico (PIMENTEL, 2001)

Outra enzima com aplicação industrial é a lipase. Estas apresentam diversas aplicações industriais: geração de cosméticos e perfumarias, onde são empregadas na produção de emulsificantes, aromas, surfactantes e emolientes, além de auxiliar no tratamento de efluentes gordurosos e na indústria de combustíveis (LEAL et al., 2002).

Cuzzi et al. (2011) isolaram fungos endofíticos produtores de enzimas extracelulares (amilase, protease e lipase).

Por tanto, o potencial destes microrganismos para a área industrial, farmacêutica e biotecnológica são importante devido seu retorno econômico no mercado industrial.

5.5.2 Análise qualitativa dos micro-organismos endofítico e rizosférico para produção de enzima L-asparaginase e L-glutaminase

A análise qualitativa da L-asparaginase foi realizada em meio sólido utilizando como padrão a linhagem *E. coli* UFPEDA 224. Nesta análise, escolhemos os fungos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana, as actinobactérias da rizosfera e o endófito *Streptomyces* sp. A maioria das actinobactérias apresentou resultado positivo

para produção de L-asparaginase, no entanto apenas quatro linhagens de fungos endofíticos (3R5, 1F4, 3R3 e 1F1) apresentaram atividade (Quadro 8) e figura 27.

Todos os micro-organismos que mostraram atividade para L-asparaginase, também apresentaram atividade para L-Glutaminase. Desta forma podemos sugerir que enzima produzida por estes micro-organismos seja L-asparaginases do tipo I que catalisam a hidrólise de tanto L-asparaginase como L-Glutaminase.

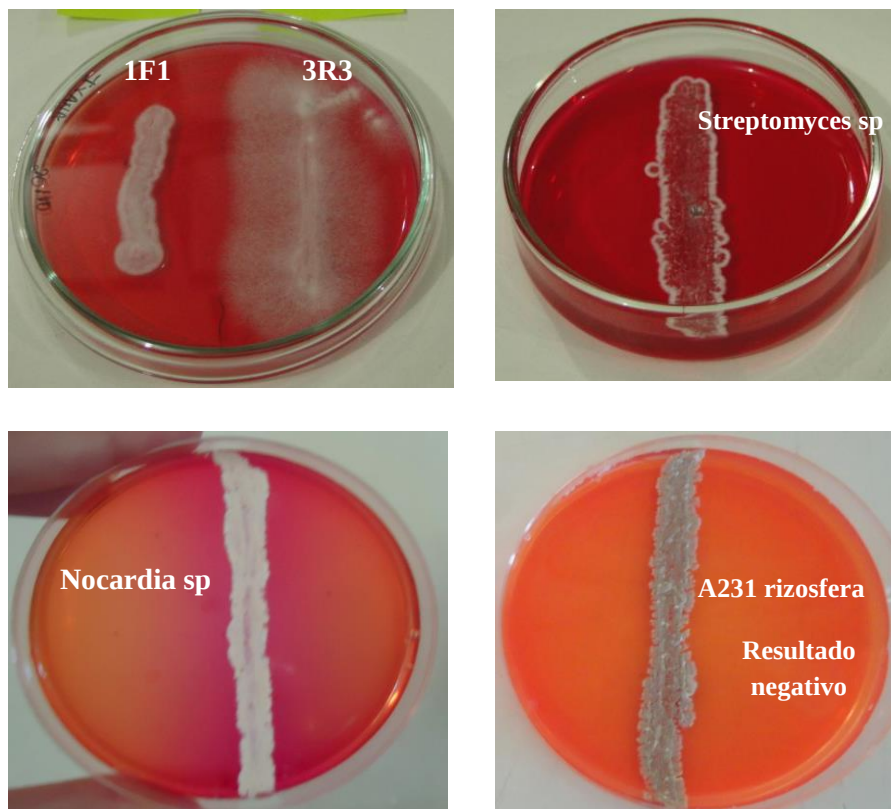
Tabela 8- Avaliação qualitativa da produção de L-asparaginase por actinobactérias isoladas da rizosfera e endofíticas de *I. pes-caprae* (L.) R. Br oriunda da praia do Forte Orange, Itamaracá – PE.

Actinobactérias	Teste qualitativo para L-asparaginase
<i>Escherichia coli</i> (Padrão)	+++
A31 (rizosfera)	+++
A34 (rizosfera)	+++
A63(rizosfera)	+++
A94* (rizosfera)	+++
A2 (rizosfera)	+++
A93 (rizosfera)	ND
A50 (rizosfera)	+++
A37 (rizosfera)	+++
A55 (rizosfera)	+++
A5 (rizosfera)	+++
A65 (rizosfera)	ND
A122 (rizosfera)	+++
A202 (rizosfera)	+++
A120 (rizosfera)	++

(rizosfera)	+++
A119 (rizosfera)	ND
A180 (rizosfera)	++
A101 (rizosfera)	++
A222 (rizosfera)	+++
A210 (rizosfera)	ND
A207 (rizosfera)	++
A209 (rizosfera)	ND
A196 (rizosfera)	+++
A231 (rizosfera)	ND
A114 (rizosfera)	+++
A5.5 (rizosfera)	+++
A201 (rizosfera)	++
A118 (rizosfera)	+
Streptomyces sp	+++
endofítico	
3R5	+++
1F4	+++
3R3	+++
1F1	+++

ND = Não degradou; + = Baixo nível de degradação de L-asparagina em 48h; ++ = Médio nível de degradação da L-asparagina em 48h; +++ = Alto nível de degradação de L-asparagina em 48h. **Nocardia* sp

Figura 27- Teste qualitativo dos fungos 1F1 e 3R3, endófito *Streptomyces* sp, *Nocardia* sp resultado positivo e A231 rizosférica resultado negativo.



Resultados semelhantes ao nosso trabalho foram relatados por Sutthinam et al.(2009) isolaram actinobactérias de 16 amostras de rizosferas de planta medicinal tailandesa, de 445 isolados, 30 deles apresentaram produção dessa enzima. Em outro estudo se verificou a produção de enzima L-asparaginase de diferentes estirpes de *Escherichia coli* isoladas de águas residuais, uma das bactérias que mais produzem essa enzima, do total de 35 isolados, apenas 10 (28%) delas apresentaram produção de *L. asparaginase* (Richa et al., 2011) e em outra pesquisa foram testados 10 isolados de actinobactérias marinhas da Índia, apenas três deles apresentaram produção da enzima (BASHA et al., 2009).

L-asparaginase é uma enzima que possui atividade farmacológica antineoplásica para leucemia linfoblástica aguda e pode ser produzida por uma variedade de micro-organismos como bactérias, actinobactéria e fungos (PETERSON e CIEGLER, 1969, DEJONG, 1972; SARQUIS et al., 2004. No entanto, há uma necessidade da busca por micro-organismos com sorologia diferente *E. coli* e *Erwinia carotovora*, pois a administração prolongada da enzima produzida por estas bactérias produzem um anticorpo correspondente nos tecido resultando em choque anafilático e podem causar a inibição farmacológica da enzima (MASHBURN e WRISTON, 1964; CORNEA et al., 2002, RICHA et al., 2011).

5.5.4 Fermentação em Substrato Sólido

Na fermentação com o substrato de farinha de arroz não foi possível a determinação da concentração de L-asparaginase por espectrofotômetro. No entanto, na fermentação utilizando farinha de soja foi possível determinar a concentração de L-asparaginase através da equação da reta em micromol de amônia: $y = 0,9897x - 0,0033$ com R^2 0.9997. Uma unidade (UI) de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que liberta 1 μ mole de amoníaco por minuto sob as condições do ensaio. A proteína total também foi determinada pelo método colorimétrico de Método de Bradford utilizando a equação da reta $y = 12.15X + 0,0013$ onde $x = [\text{mg/mL}]$ e depois esta unidade foi convertida para U/mL (Tabela 09).

Tabela 9- Quantificação da produção de L-asparaginase em meio sólido de farinha de soja.

Condições do experimento	L-asparagina U/mL	Proteína Total U/mL
Soja+inc.+asp.	0,03725	0,3599
Soja+inc.	0,03	0,2915
Soja+água+asp	0,00595	0,0977
Soja +agua	0,003125	0,07183
Inc.=inóculo; asp.= L-asparagina		

5.5.4 Planejamento experimental de L-asparaginase

Para realizar a otimização da produção da enzima L-asparaginase escolhemos endofítica *Spreptomyces* sp porque seguiria a linha de pesquisa do Laboratório de Genética e não trabalhamos com a *Nocardia* sp. pelo histórico de patogenicidade do gênero.

Os parâmetros experimentais selecionados para o planejamento fatorial 2^3 foram aplicados à produção de L- asparaginase. O planejamento fatorial foi desenvolvido nos níveis máximo e mínimo com as variáveis temperaturas, inóculo, L-aspragina (Tabela

01). A resposta foi avaliada após a execução dos experimentos e a significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi analisada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e com base nos gráficos de Pareto (Tabela 10 e Figura 28). As informações obtidas após a construção de superfícies de resposta, como ilustrado na Figura 29, 30, 31 e (Apêndice I) também foram utilizadas na interpretação dos resultados.

Os valores encontrados da concentração de L-asparaginase nas condições experimentais estão representados na tabela 08. A maior concentração de L-sparaginase foi de 0.077 U/mL no experimento 2 e a menor concentração no experimento 6.

Tabela 10– Variável do planejamento experimental 2^3 com o resultado das concentrações de L-asparaginase e proteína total (U/mL).

Exp.	Temperatura	Asp.	Inóculo	L-asparaginase U/mL	Proteína total U/mL
1	37°C	0,03 M	0,25 mL	0,0425	0,4106
2	45°C	0,03 M	0,25 mL	0,0777	0,7439
3	37°C	0,04 M	0,25 mL	0,0343	0,3314
4	45°C	0,04 M	0,25 mL	0,0405	0,3913
5	37°C	0,03 M	0,5 mL	0,0284	0,2743
6	45°C	0,03 M	0,5 mL	0,0243	0,2347
7	37°C	0,04 M	0,5 mL	0,0332	0,3207
8	45° C	0,04 M	0,5 mL	0,0352	0,34

Figura 28- Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 obtido para produção de L-asparaginase, foi definido um intervalo de confiança de 95%.

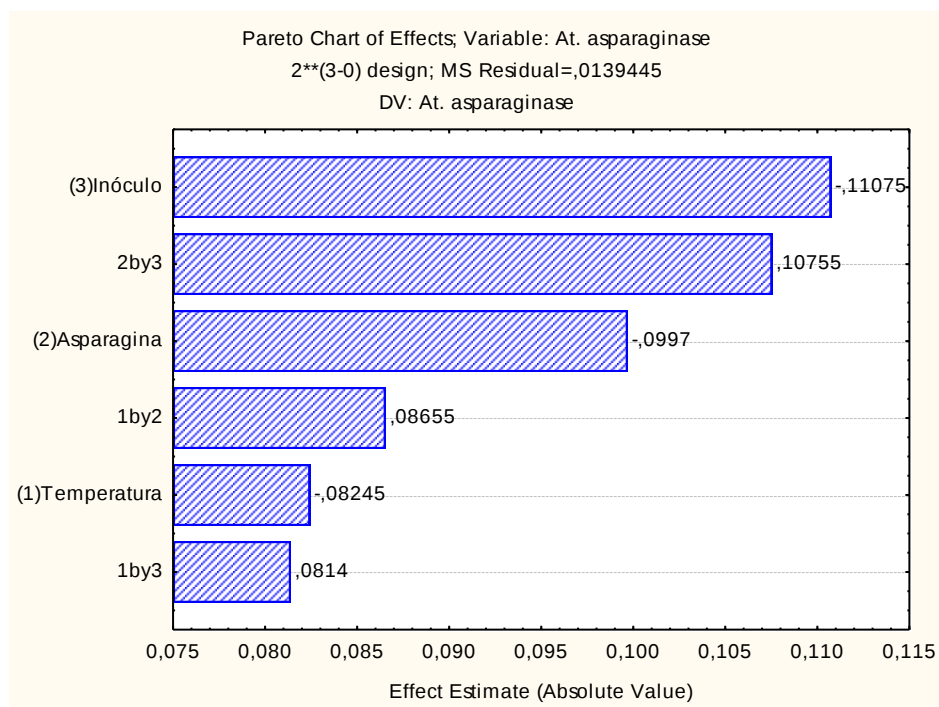


Figura 29- Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as concentrações de L-asparagina 0.3 e 0.4 M com a temperatura de 37°C e 45 °C.

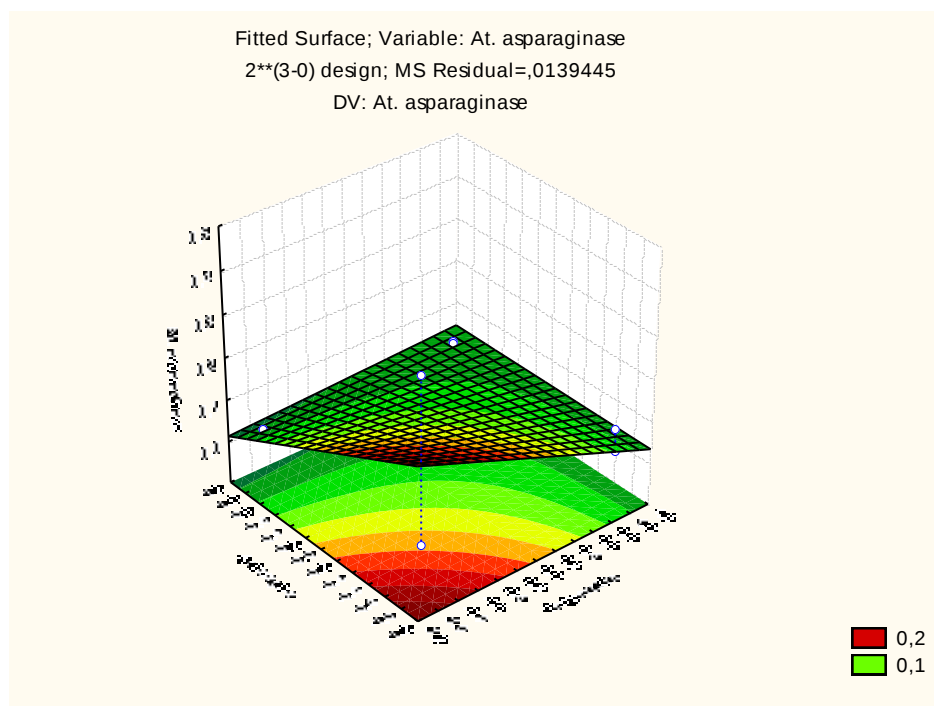


Figura 30- Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as variáveis L-asparagina, inóculo e temperatura.

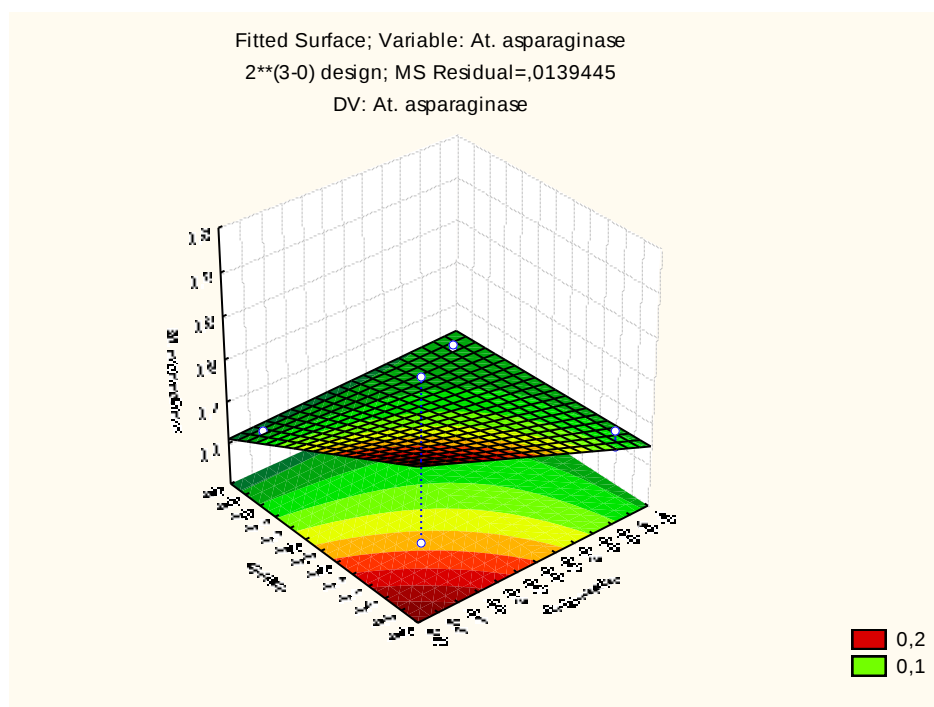
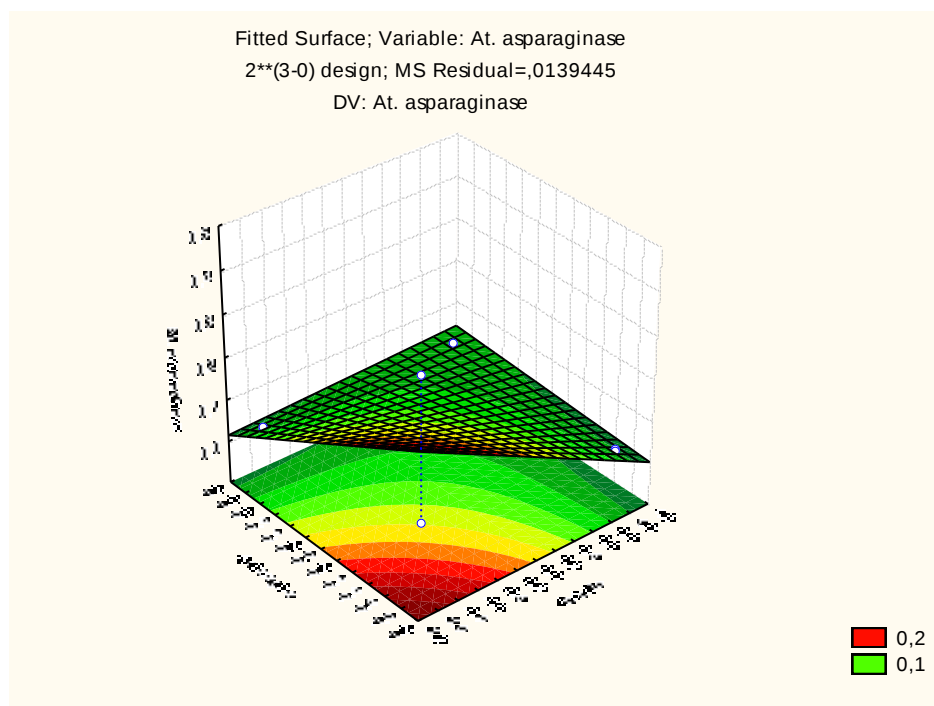


Figura 31 - Superfície de resposta do planejamento experimental 2^3 obtido para a concentração de L-asáraginase, analisando a interação entre as variáveis L-asparagina 0.3 e 0.4 e quantidade de inóculo 0.25 e 0.5 mL.



Os gráficos de Pareto e as superfícies de resposta foram construídos a partir dos valores das variáveis após aplicação do planejamento fatorial 2^3 na fermentação de substrato sólido a base de farinha de soja. Segundo a análise de variância e pelos gráficos de Pareto, tem-se que a variável temperatura não foi significativa para as outras variáveis. No entanto observa-se no gráfico de superfície que quanto menor a temperatura melhor a interação com as outras variáveis.

No entanto, as condições de fermentação dependem da fisiologia do micro-organismo produtor. Basha et al. (2009) analisaram a produção de L-asparaginase em actinobactérias marinhas através da fermentação sólida com substrato de farinha de soja

conseguindo a melhor produção em temperatura de 50°C e Amena et al. (2010) realizou a otimização da produção de L-asparaginase por *Streptomyces gulbargensis*, obtendo produção máxima da enzima na temperatura de 40°C.

Com relação na concentração de L-asparagina, nossos resultados corroboram com Thenmozhi et al. (2011), que analisaram a produção de L-asparaginase por *Bacillus cereus* através de otimização estatística, obtendo maior produção de L-asparaginase utilizando uma concentração de 0.03M de L-asparagina.

Rajamanickam et al. (2011) obtiveram a melhor produção de L-asparaginase por *Streptomyces parvulus* isoladas de mangue através otimização estatística e análise de gráficos de superfície com a concentração de 0.003M de L-asparagina.

A variável quantidade de inóculo apesar de não ser significativa segundo a análise de Pareto e gráfico de superfícies, podemos observar na tabela 08, figura 30 e 31, quanto menor a quantidade de inóculo, melhor será a produção de L-asparaginase.

O resultado da concentração de inóculo com menor valor significativo foi observado nos estudos Rajamanickam et al. (2011), concluindo que a concentração do inóculo não interferiu estatisticamente nas outras variáveis analisadas. No entanto, Umidade inicial é um parâmetro muito importante na fermentação em estado sólido, um alto nível de humidade pode diminuir a produção da enzima como pode aumentar a possibilidade de contaminação (GHOSH et al., 2013).

A interação entre as variáveis temperaturas, concentração de L-asparagina e quantidade de inóculo também não foram significativas. Isto significa que segundo a análise da ANOVA, os valores das variáveis não interferem estatisticamente na produção de L-asparaginase.

Portanto, como este planejamento experimental é o modelo mais simples com variáveis com ponto máximo e mínimos, futuros trabalhos de planejamento experimentais podem ser realizados para analisar quais as possíveis variáveis que interferem na produção de L-asparaginase em fermentação de substrato sólido.

5.5.5 Cinética de produção de L-asparaginase

Apesar dos resultados dos gráficos de Pareto de superfícies de resposta não apresentarem resultado significativo segundo a ANOVA, realizamos os ensaios de cinética de produção de L-asparaginase pelo endófito *Streptomyces sp.*

Figura 32 – Cinética de produção de L-asparaginase do Grupo 1 em fermentação com substrato solido de farinha de soja, L-asparaginas e inóculo.

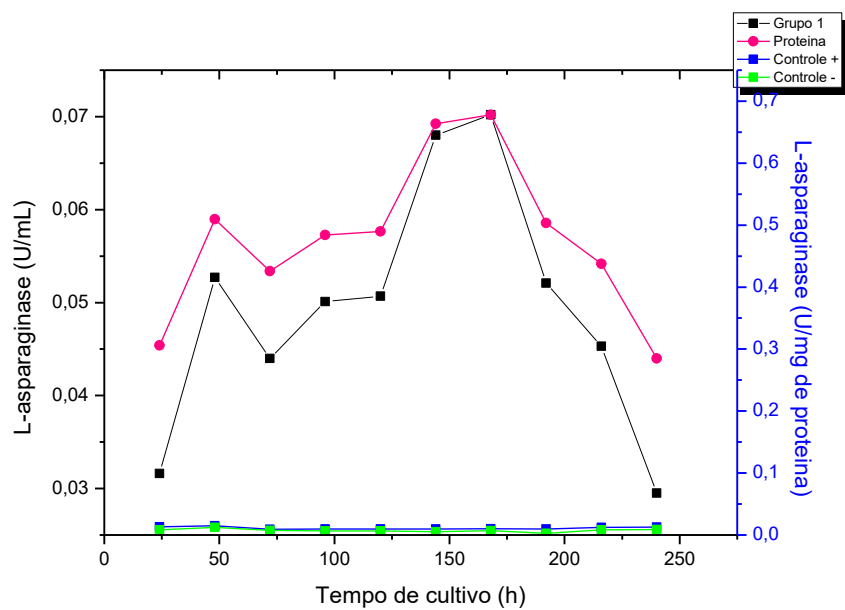
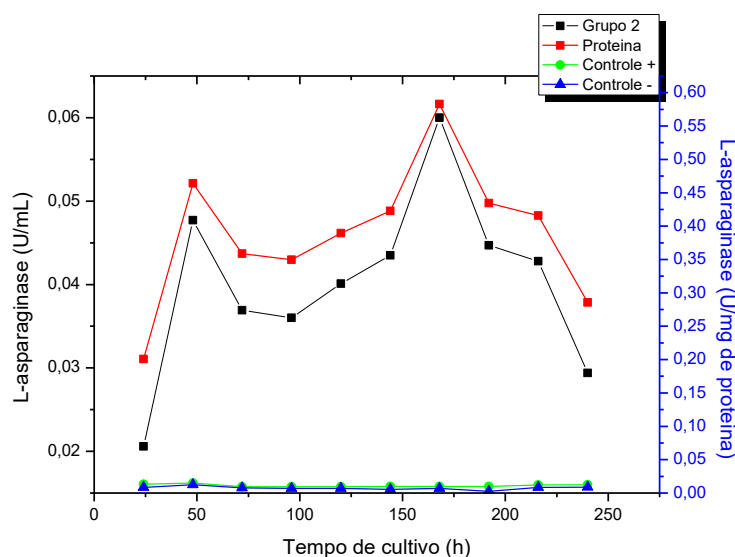


Figura 33- Cinética de produção de L-asparaginase do Grupo 2 em fermentação com substrato solido de farinha de soja e inóculo.



Através das figuras 32 e 33, podemos comparar a produção de L-asparaginase dos dois grupos estudados. O grupo 1 contém um indutor (L-asparagina 0.03M), o grupo 2 sem indutor. Observamos que a produção da enzima iniciou-se nas primeiras 24 horas atingindo pico de produção com 50 h (0,05275 U/mL no grupo 1 e 0,04775 U/mL no grupo 2), após este tempo ocorreu redução na produção.

A partir de 120 h foi observado o crescimento de produção de enzima, atingindo pico máxima com 168 h -7dias (0,0702 U/mL no grupo 1 e 0,06 U/mL no grupo 2).

Foi observada uma diferença entre os grupos teste 1 e 2. No gráfico 32 do grupo 1 existe um patamar de produção entre 144h e 168 h. Podemos sugerir uma maior estabilidade na produção da enzima com a utilização de um indutor (L-asparagina 0.03M).

Santosh et al. (2014) verificou a produção de 4.32 IU/mL de L-asparinase por *E. coli* K-12 em fermentação sólida utilizando farelo de trigo suplementado com extrato de levedura 1.25% (p/p) e solução de L-asparagina a 0.75% p/v, 80% de umidade, incubado a 35°C por 24h.

Para produção máxima de L-asparaginase por *Pseudomonas stutzeri* PIMS6, Narendra et al. (2014) utilizaram resíduo agrícola (alimentação de gado) em pH 8.0, suplementada com 1% de glicose, 1% de sulafato de amônia, com 5% de inóculo a 37°C por 96h, assim obtiveram uma concentração de 47.9 IU/gds de enzima.

A utilização da fermentação com substrato sólido é uma técnica eficaz com rendimento do produto às vezes maior do que a fermentação submersa, oferecendo também outras vantagens como: menor risco de contaminação, facilidade de cultivo e extração. Portanto, é uma metodologia que aliada a modelos estatísticos podem trazer excelentes resultados e rapidez na produção de biomoléculas de interesse industrial.

5.2.7 Seleção das bactérias produtoras de Ácido Indol acético

Em nosso trabalho foram isoladas 53 bactérias endofíticas, destes isolados selecionamos 30 linhagens para verificar a produção de ácido indol acético. Esta análise qualitativa foi realizada através o teste colorimétrico (SARWAR; KREMER,1995).

Das bactérias endofíticas isoladas foram selecionadas como bactérias produtoras de ácido indol acético IIF5ISP2-3, IIF2ISP2-4, IIF3ISP2, 1F1ISP2-4, IIF4ISP4-4, IIF4ISP2-1 amarela, 1F3ISP2-5, IIF5ISP2-5, esta mudança de coloração ocorre devido ao processo de oxidação. Sugere-se que todas estas linhagens pertencam ao gênero *Bacillus* sp (figura 34 e 35).

Figura 34– Bactérias endofíticas selecionadas como produtoras de ácido indol acético.

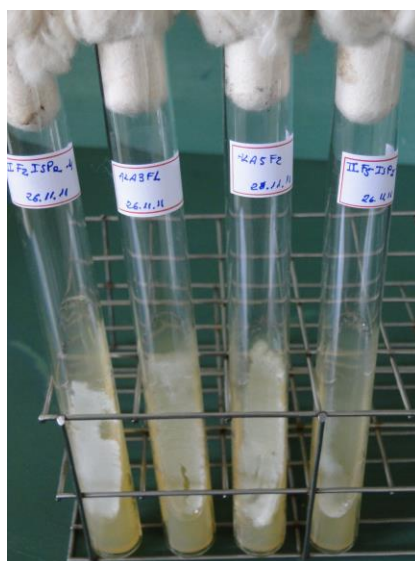
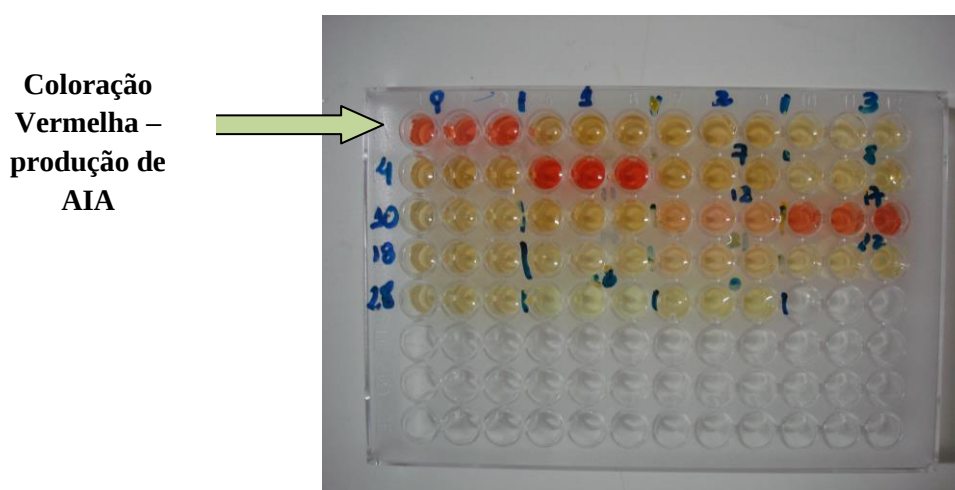


Figura 35– Teste colorimétrico para a seleção de bactérias endofíticas produtoras de ácido indol acético.



As bactérias promotoras de crescimento de plantas fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. As principais são bactérias promotoras de crescimento são encontradas entre as

Pseudomonas spp. não fluorescentes e fluorescentes; espécies de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia*, entre outras (MARIANO et al., 2004).

As bactérias endofíticas podem contribuir para o crescimento vegetal através da produção de ácido indol acético (AIA) (RAMAMOORTHY et al., 2001).

O ácido 3-indolacético (AIA) é um hormônio vegetal do grupo das auxinas geralmente produzido por bactérias promotoras de crescimento como *Aeromonas veronas*, *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (VESSEY, 2003; TSAVKELOVA et al., 2007).

Existem vários trabalhos que relatam a produção de AIA por bactérias entre estes podemos citar: Araújo et al. (2010) verificaram que sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas tiveram a velocidade de germinação aumentada e Andrade et al. (2012) relataram que 87,6% das bactérias endofíticas isoladas de bananeiras foram capazes de produzir ácido indol acético na presença de triptofano no meio de cultura.

Outro resultado similar foi observado por Marques e Uesugi (2013), que isolaram bactérias de diferentes tipos de solos, verificaram que estirpes dos gêneros *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp. foram capazes de aumentar a massa de matéria seca, tanto de raízes quanto de parte aérea dessa planta.

A produção de ácido indol acético pelas bactérias endofíticas isoladas da planta *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. estão em desenvolvimento e precisam ser mais bem avaliadas.

6. CONCLUSÃO E PESPECTIVAS

Podemos sugerir através das nossas condições experimentais, que a microbiota endofítica da planta *I. pes-caprae* (L.) R. Br é composta na maioria por fungos e bactérias. Nas nossas condições de experimento, a frequência de actinobactéria endofíticas foi baixa em e em relação à quantidade de actinobactérias isoladas da rizosfera da planta. Nos estudos de caracterização química observamos que os micro-organismos endofíticos e da rizosfera não possuem o mesmo metabólito secundários majoritário da planta (flavonoide). No entanto, a maioria dos micro-organismos é capaz de produzir a enzima L-asparaginase. Esta enzima é de interesse tanto para indústria de medicamento quanto de alimento, porque é utilizada no tratamento de leucemia linfoide como na redução de acrilamida nos alimentos que possuem moléculas redutoras. A otimização de L-asparaginase por planejamento fatorial precisa realizar novos estudos reavaliando as variáveis aqui estudadas. Além da enzima L-asparaginase são produzidas outras enzimas de interesse comercial produzidas pelos fungos endofíticos como amilase e protease.

Em relação às bactérias endofíticas foi verificada em nosso trabalho a importância no setor de agronegócios pela produção de ácido indol acético.

Por tanto, o estudo a microbiota da planta e rizosfera é importante na busca de metabólitos secundários com aplicação na indústria medicamentos, alimentos e na agricultura.

Como perspectiva para este trabalho podemos sugerir:

- ✓ Realizar novos experimentos de planejamento experimental incluindo ponto central

- ✓ Realizar uma nova cinética a partir dos resultados obtidos no planejamento experimental;
- ✓ Purificar a enzima L-asparaginase produzida pelo endófito *Streptomyces* sp.
- ✓ Calcular K_m da enzima para verificar se ela pode futuramente ser um biofármaco
- ✓ Realizar atividade antitumoral com a enzima purificada.

REFERÊNCIA

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-Asparaginase. *Biochem.* 40 (19): 5655–5664, 2001.

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140, 2007.

AHMAD, N.; PANDIT, N. P.; MAHESHWARI, S. K. L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell. *Int. J. Biosci.* Vol. 2, No. 4, p. 1-11, 2012.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Londres: Academic Press, 1995. 576 p.

AMARAL, J.A.; EKINS, A.; RICHARDS, S.R.; KNOWLES, R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacterial in pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.*; 64:520-525, 1998.

AMENA, S.; VISHALAKSHI, N.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A.; LINGAPPA, K. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *streptomyces gulbargensis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 173-178, 2010.

ANDERSON J.A. Ber. IIIrd Int. Mikrobiol. Kongress, 3:726, 1939.

ANDRADE, P. A.M.; SOBRA, J. K.; FREIRE, F.J.; SILVA, M. O.; COSTA, D. P.; BARBOSA, M. V.; SILVA, M. C. B. Produção de Ácido Indol Acético e Resistência à Salinidade por Bactérias endofíticas do Gênero *Methylobacterium*. Acesso: WWW.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0289-2.pdf as 23:00 21/01/2012.

ANDRADE, L. F. Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-anã: fixação de nitrogênio, solubilização fosfato de cálcio e produção de ácido indol acético. 2012, 82p. Dissertação (Pós-Graduação em Produção Vegetal no semi-árido. Universidade de Montes Claros, Jaúna, BA, 2012.

AOKI, H.; SAKAI, H.; KOHSAKA, M.; KONOMI, T.; HOSODA, J.; KUBOCHI, Y.; et al. Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery isolation and characterization. J. Antibiot. 29:492-500, 1976.

ARA I.; BAKIN, M.A.; HOZZEIN, W.N.; KUDO T. Population morphological and chemotaxonomical characterization of diverse rare actinomycets in the mangrove and medicinal plant rhizosphere. African Journal Microbiology Research.7(16): 1480-1488, 2013.

ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic Bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. Canadian Journal Microbiology, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2000.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr, W.; van ELSAS, J. D.; van VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology, 68 (10): 4906-4914, 2002.

ARAÚJO, A. E. da SILVA.; ROSSETTO, C. A. V.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Germinação e vigor de sementes de arroz inoculadas com bactérias diazotróficas. Ciênc. agrotec. 34 (4), 2010.

ARISSETO, A.P.; TOLEDO, C.M.F. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. Rev. Bras. Toxicol. 21(1): 9-14, 2008.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. Biology and Fertility of Soils, v. 35, p. 231 – 237, 2002.

AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In: Melo, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, P. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Editora da Universidade de Caxias do Sul – EDUCS, p. 510, 2004.

AZEVEDO, J.L. MACCHERONI Jr., W. PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Eletronic Journal of Biotechnology*. 3 (1): 40-65, 2000.

AZUMA, M.V.P. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da Região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. p. 93, 2011. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BAGERT, U.; RÖHM, K.H. On the role of histidine and tyrosine residues in *E. coli* asparaginase; chemical modification and nuclear magnetic resonance studies. *Biochem. Biophys. Acta*. 999: 36-41, 1989.

BALTZ, R. H. Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance: follow the decline and fall? *SIM News*. 55: 186-196, 2005.

BALUNAS, M. J. KINGHORN, A.D. Drug Discovery from medicinal plants. *Life Science*, 78(5): 431-441, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46:446-475, 2008.

BARBOSA, M. V.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K.; SILVA, M. O.; COSTA, D. P.; SILVA, M. C. B.; ANDRADE, P. A. M. Seleção de bactérias produtoras de auxina associadas à cana-de-açúcar. Acesso: WWW.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0234-1.pdf as 23:00 21/01/2012.

BARNI, S. T.; FILHO, V. C.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(4): 865-870, Out./Dez. 2009.

BARROS, E. V. et al. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Reading. 53(1):29-33, 2013.

BASCOM-SLACK, C.A.; MA, C.; MOORE, E.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J.S. et al. Multiple novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. *Microb Ecol*. 58(2):374–83, 2009.

BASHA, N.S.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase from Marine Actinomycetes by Solidstate and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Trop. J. Pharm. Res*. 8 (4):

353-360, 2009.

BAYMAN, P.; SANDOVAL-ANGULO, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, D. J. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycological Research*, v. 8, n. 102, p. 944-948, 1998.

BEENA, K. R., ANANDA, K.; SRIDHAR, K. R. Fungal endophytes of three sand dune plant species of west coast of India. *Sydowia*, v. 1, n. 52, p. 1-9, 2000.

BERDY, j. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58(1): 1-26, 2005.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17: 478–486, 2012.

BHADURY, P. MOHAMMAD, B.T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potencial as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33(5): 325- 337, 2006.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn* 17: 640-653, 2007.

BLACK, J. G. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.

BLEIL, S.I. O Padrão Alimentar Ocidental: considerações sobre a mudança de hábitos no Brasil. *Cardenos em debate*. 6:25, 1998.

BOON, P.E.; de MUL, A.; van der VOET, H.; van DONKERSGOED, G.; BRETTE, M.; van KLAVEREN, J.D. Calculations of dietary exposure to acrylamide. *Mut Res*.580:143-155, 2005.

BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, No. 5, 929-934, 2006.

BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J.; *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 9900.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste especialmente do Ceará, coleção Mossoroense – Volume CCCXV, 4º Edição, Editora Universitária Rio Grande do Norte, 540 páginas, 1953.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa-2014. Incidência de Câncer no Brasil. Instituto nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.
<http://inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acesso em: 15 de out. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Detecção e Identificação de Bactérias de importância Médica, módulo 4. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) http://anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004>. Acesso em 10 de julho de 2012.

Bradford, M. Analytical Biochemistry. 72, 248-254, 1976.

BREHMER, J. S. Estudo de extrato de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de ehrlich. 2005, 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A.; Curr. Opin. Pharmacol., 8, 564, 2008

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in Seedlings. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. Journal of Natural products. 67(12): 2141-2153, 2004.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. Natural products- the future scaffolds for novel antibiotics? Biotechnological Pharmacology. 71(7):919-929, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). Braz J Med Biol Res 33:179-189, 2000.

CAMPBELL, H.A. Two Asparaginase from *Escherichia coli* B, their separation, purification and antitumor property. Biochem. 6: 721-30, 1967.

CAMPBELL, H.A.; MASHBURN, L. L-asparaginase EC-2 from *Escherichia coli* some substrate specificity characteristics. Biochem. 8(9):3768-75, 1969.

CARACIOLO, F.B.; MACIEL, M.A.V.; SANTOS, J.B.; RABELO, M.A.; MAGALHÃES, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecções de pele e tecidos moles de pacientes ambulatoriais de um hospital universitário em Recife - PE, Brasil. *An Bras Dermatol.* 87(6): 857-61. 2012

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn* 16: 690-695, 2006.

CARRO, L.; PUKALL, R.; SPROTTER, C.; KROPPESTEDT, R.M.; TRUJILLO, M.E. *Micromonospora halotolerans* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a *Pisum sativum* plant. *Antonie leeuwenhoek*;103:1245–1254, 2013.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TEPLow, D.B.; STEVENS, D. & YAVER, D. Mununbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *FEMS Microbiol, Lett.* 255: 296-300, 2006.

CASTILLO, U. F. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology, spencers wood*, v. 148, p. 2675- 2685, 2002.

CANNON, P. F. & SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*, v. 2, n. 94, p. 210-220, 2002.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J.H. Localization of the two L- asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 242: 3753-54, 1967.

CLARY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature.* 432(7019): 829-837, 2004.

CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de l'asparagine chez les differentes especes animals et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme. *Arch. Int. Physiol.* 19: 369, 1922.

CONTI, R. Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola e biossintético. 2012. 236 f. Tese (Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2012.

COUTO, W. J.; BRANCO, J. N. R.; ALMEIDA, D.; CARVALHO, A. C.; VICK, R.; TELES, C. A.; AGUIAR, L. F.; BUFFOLO, E. Transplante cardíaco e infecção. Rev Bras Cir Cardiovasc. 16(2): 141-51, 2001

CHOW, Y. Y.; TING, A. S.Y. Endophytic L -asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. Journal of Advanced Research, 2014

CORNEA, C.P.; LUPESCU, I.; VATAFU, I.; CARAIANI, T.; SAVOIU, V.G.; CAMPEANU, Ghp. GREBENISAN, I.; NEGULESCU, Gh.P.; CONSTANTINESCU, D. Production of L-asparaginase II by Recombinant *Escherichia coli* cells. Roum. Biotech. Lett.; 7(3):717-722, 2002.

Cuzzi,C.; Link, S.; Vilani, A.; Onofrel, S. B.G. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). Sci. Technol.04(02):47 – 57, 2011.

DAVIS, R. A.; PIERENS, G. K. ^1H and ^{13}C NMR assignments for two new xanthenes from the endophytic fungus *Xylaria* sp. FRR 5657. *Magn. Res. Chem.* 44:966-968, 2006.

DAVID, K.; DAVID, G. L-Asparaginase Production by the rumen anaerobe *Vibrio succinogenes*. J Appl Microbiol. 27:206-209, 1974

DHANAM, J.G.; KANNAN, S. L-asparaginase- Types, Perspectives and Applications. Adv. Biotechnol. 13(51): 1-5, 2013.

DeANGELIS, K. M.; Brodie, E. L.; DeSANTIS, T.Z.; ANDERSEN G.L.; LINDOW, S.E.; FIRESTONE, M.K. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. The ISME Journal 3(2): 168-178, 2008.

DEWICK, Paul. M.: The Mevalonate And Deoxyxylulose Phosphate Pathways: Terpenoids And Steroids In: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, John Wiley & Sons, Ltd 2^a edition , Chichester ,West Sussex, England, 2002. 507p

DeJong, P. J. L-asparaginase production by *Streptomyces griseus*. Appl. Microbiol. 23(6): 1163– 64, 1972.

DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on Optimization of Growth Parameters for L-Asparaginase Production by *Streptomyces ginsengisoli*. *The Scientific World Journal*, 2014.

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 18(1): 26-31, 2000.

de SOUZA, M.M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *J Ethnopharmacol*. 69(1):85-90, 2000.

DÖBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with gramineae. *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Gibson, A. H; Newton, W.E. (eds), Canberra: Aust.Acad.Sci., p. 305-312, 1981.

DOMINIC, G.;REN, A. A natural Liquid Cartilage Extract brings new hope for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Townsend Letter for doctor & Patients*. 246: 74, 2004.

DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J.A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens* *chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:2804-2810. 2000.

DUVAL, M. Comparison of *Escherichia coli* - asparaginase with *Erwinia* - asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: Results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood*, 99, 8, 2734-2739, 2002.

EL-GENDY, M.M.; HAWAS, U.W.; JASPARS, M. Novel bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. *ALAA* 2000. *J. Antibiot*. 61:379-386, 2008.

EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V.F.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; CARDOZA. A.M. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *J. Pharm. Pharm. Sci*. 8: 63-68, 2005.

ERZA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CNONDRON, A. M.; TELOW, D. B.; SEARS, JOSEPH, S. MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER. Coronamycins, peptide

antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU – 2110) endophytic on *Monstera* sp. Microbiology, 150: 785 – 793, 2004.

EYBERGER, A. L., DONDAPATI, R. AND PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* 69:1121-1124, 2006

FAVORETTO, N. B. produção de substâncias bioativas por micro-organismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos-SP. 2010, 39 f. Dissertação Universidade Federal de São Carlos. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2010.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. 4º Ed. Artmed, 2010.

FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Marine micro-organisms: a new biomedical resources, marine biotechnology, v.1: pharmaceutical and bioactive natural products (D.H. Attaway and O. R. Zahorsky eds.) plenum press., New York, p. 419- 458, 1993.

FERNANDES, M. L. M. et al. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 30: 43-49, 2004.

FERREIRA, A. Interações entre bactérias endofíticas e do rizoplane com *Eucalyptus*. 2008. 77 p. Dissertação de Mestrado (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), Piracicaba, 2008.

FESTUCCIAL, J.M.Z.; ANDRADE, D. de.; BERALDO, C.C.; SHIMURA, C.M.N.; Watanabe, E. *Staphylococcus aureus* e a atividade *in vitro* da clorexidina. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013;34(3):411-415

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; WEBSTER, J. Aquatic hyphomycetes and other fungi in living aquatic and terrestrial roots of *Alnus glutinosa*. *Mycological Research*, v. 5, n. 95, p. 543-547, 1991.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 1, n. 86, p. 153-193, 1986.

FISHER, P. J.; PETRINI, L. E.; SUTTON, B. C.; PETRINI, O. A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) from Ecuador. Nova Hedwigia, v. 3-4, n. 60, p. 589-594, 1995.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 176: 22 –36, 2007.

FRÖHLICH, J., HYDE, K. D. & PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. Mycological Research, v. 10, n. 104, p. 1202-1212, 2000.

GANGADEVI, V. ; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. – Mycologia Balcanica 5: 1-4.2008.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Natural Products from Endophytic Fungi. In: Ratul Saikai; Rajib L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org.). Microbial Biotechnology. New Delhi: New India Publishing Agency, v. p. 139-168, 2008.

GAMBOA, M. A.; BAYAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a timber tree (*Guarea guidonia* : meliaceae). Biotropica, v. 33, n. 2, p. 352-360, 2001.

GAVA, C. A. T. PEREIRA, J.C.; NEVES, M. C. P. Effecto of *Streptomyces* inoculation on seed germination and growth in tomato. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 71, p. 3-11, 1999.

GEVERS, D.; KNIGHT, R.; PETROSINO, J.F.; HUANG, K.; McGUIRE, A.L.; et al. The human microbiome project: a community resource for the healthy human microbiome. PLoS Biol 10:(8) 1001377, (2012).

GHOSH, S.; MURTHY, S.; GOVINDASAMY, S.; CHANDRASEKARAN, M. Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. Sustainable Chemical Processes. 1:9, 2013.

GOODFELLOW, M.; and WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol. 37: 189-216, 1983.

GOODFELLOW, M.; KAMPFER, P.; BUSSE, H.J.; TRUJILLO, M.E.; SUZUKI, K.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. Volume Five, New York, USA: Springer.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. A Rapid Plate Assay for Screening L-asparaginase Producing Micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 23-26, 1997.

GULLO, V. P.; McALPINE, J.; LAM, K.S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*. 33(7): 523-531, 2006

GUANATILAKA, A. A. L. Natural products from plant – associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*. 69(3): 509 – 526, 2006.

GUNASEKARAN, S.; MCDONALD L.; MANAVATHU, M.; MANAVATHU. E.; GUNASEKARAN, M. Effect of culture medium on growth and L- asparaginase production in *Nocardia asteroides*. *Biomed. Lett.* 52:197-201, 1995.

GUPTA, N.; MISHRA, S.; BASAK U.C. Occurrence of *Streptomyces aurantiacus* in mangroves of Bhitarkanika Malays. *J. Microbiol.* 3(2):7-14, 2007.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytic in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 845-914, 1997.

HANKIN, L.; ZUCKER, M. AND SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. *Applied of Microbiology* , 22 , 205-209, 1971.

HARBORNE, A. J. *Phytochemical methods A guide to modern techniques of plants analysis*. 3 ed. 302p. 1998.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S.L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y.; KATO, A.; WATSON, A.A.; NASH, R.J.; MOLYNEUX, R.J.; ASANO, N. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *J Agric Food Chem* 51: 4995-5000, 2003.

HARMS, E.; WEHNER, A.; JENNINGS, M.P.; PUGH, K.J.; BEACHAM, I.R.; RÖHM, K.H. Construction of expression systems for *Escherichia coli* asparaginase II and two-step purification of the recombinant enzyme from periplasmic extracts. *Protein Expr Purif.* 2(2-3): 144-150, 1991.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; GARY A. STROBEL#, G. A.; PORCO, JR., J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. L.; ELIZABETH M. HEIDER, E. M.; AND GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, 59(14): 2471-2476, 2003.

HARVERY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*.5: 294-300, 2000.

HARVERY, A. L. Natural Products in Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HASHIMOTO, M.; KOMORI, T.; KAMIYA, T. Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. II. Structure determination of nocardicins A and B. *J. Antibiot.* 29: 890-901, 1976.

HAYASHI, K.; KAMIYA, M.; HAYASHI, T. Virucidal effects of the steam distillate Houttynia Cordata and its components on HSV-1, Influenza V virus and HIV. *Planta Medica*.61:237-241, 1994.

HAYAT, R.; ALI, A.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60: 579 – 598. 2010.

HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 21º ed .São Paulo: 1664, 2013.

HILARINO, M.P.A.; SILVEIRA, F.A.O.S.; OKI, Y.; RODRIGUES, L.; SANTOS, J. C.; JUNIOR, A.C.; FERNANDES, G.W.; CARLOS AUGUSTO ROSA, C.A. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Bot. Bras.* 25(4), 2011.

HILTNER, L.; Über Neuere Erfahrungen and Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter Besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb Deutsch Landwirt Ges.*; 98:59–78, 1904.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. Enterobacter cloacae is on endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, v. 129, p. 117-125, 1995.

HOFFLICH, G.; WIEHE, W.; KUHN, G. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganism. *Experientia* 50: 897-905, 1994.

HONG, K.; GAO, A.H.; XIE, Q.Y.; GAO, H.; ZHUANG, L.; LIN, H.P.; YU, H.P.; LI, J.; YAO, X.C.; GOODFELLOW, M.; RUAN, J.S. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs* 7:24–44, 2009.

HOSHIO, Y.; CHIBA, K.; ISHIO, K.; FUKAI, T.; IGARASHI, Y.; YAZAWA, K.; et al. Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*. *J. Bacteriol.* 193:441-448, 2011.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the Agar piece method and prototroph method. *Folia Microbiologica*. 31: 163-167, 2001.

IGARASHI, M.; NAKAMURA, H.; NAGANAWA, H.; TAKEUCHI, T. Tubelactomicin A, a novel 16-membered lactone antibiotic, from *Nocardia* sp. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* 53:1102-1107, 2000a.

IGARASHI, M.; HAYASHI, C.; HOMMA, Y.; HATTORI, S.; KINOSHITA, N.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. Tubelactomicin A, a novel 16-membered lactone antibiotic, from *Nocardia* sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* 53: 1096-1101, 2000b.

INBAR, E. et al. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. *Microbial Ecology*. V.50: 71-81, 2005.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacterial within Sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, v. 63, p. 1262-1265, 1985.

JAITLEY, A.K.; RAI, J.N. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangrove swamps. *Mycologia*, 6 (74): 1021 – 1022, 1982.

JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangrove soils in India. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, n. 28, p. 137-143, 1987.

SANTOSH K. J.; MAMTA K.; HARE R. S.; VINOD K. N.; and AMBRI SH S. V. Optimization of Solid State Production of Antileukemic Enzyme (L – Asparaginase)

by *E. coli* K - 12 using Taguchi DoE and Three Phase based Recovery.
Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 3 (9): 446- 453, 2014.

JIAO, R.H.; XU, S.; LIU, J. Y.; GE, H.M.; DING, H.; XU, C.; ZHU, H. L.; TAN, R. X.
Chaetominine, a Cytotoxic Alkaloid Produced by Endophytic *Chaetomium* sp. IFB-
E015. Org. Lett.8 (25): 5709–5712, 2006.

JIUN-HORNG, S.; KHOO, CHAI-HOON; LEE, LEARN-HAN E CHEAH, YOKE-
KQUEEN. Molecular Diversity of fungal endophytes isolated from *Garcinia*
mangostana e *Garcinia parvifolia*. Journal Microbiology Biotechnology, 20(4), 651-
658, 2010.

JOHRI, B. N. Endophytes to the rescue of plants! Currents Science. 90 (10): 1315 –
1316, 2006.

JONES, E.B.G.; ALIAS, S.A. 1997. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: Biodiversity
of Tropical Microfungi 6: 71 – 92.

KATTIMANI, L.; AMENA, S.; NANDAREDDY, V.; MUJUGOND, P.
Immobilization of *Streptomyces gulbargensis* in polyurethane foam: A promising
technique for L-asparaginase production. Iran J. Biotechnol. 7(4):199-204, 2009.

KAVITHA, A.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M.; VENKATESWARLU Y.
Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL_113. Lett. Appl.
Microbiol. 49(4):484-90, 2009

KAVITHA, A.; KIJAYALASKSHMI. A study on L-Asparaginase of *Nocardi levis*
MK-VL_113. Scientific World Journal. 2012:1-5, 2012.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil
and rhizosphere ecosystems. Annual Review of Microbiology v. 56, p. 211–236, 2002.

KHALIQ, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting
rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied
Microbiology, n. 96, p. 473 – 480, 2004.

KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. L-Asparaginase production by
actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Int.J. Integr.
Biol 6(1): 22-26, 2009.

KHAN, R.; SHAHZAD, S.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, S. A.; AHMAD, A.
Communities of endophyti fungi in medicinal plant *Withania somnifera* Pak. J. Bot., 42
(2): 1281- 1287, 2010.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J. Exp. Med.* 98: 565-82, 1953.

KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HAPWOOD, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*. Ed. The John Innes Foundation. p. 612, 2000.

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

KNIGHT, V.; SANGLIER, J-J.; DiTULLIO, D. BRACCILI, S. BONNER, P.; WATERS, J. HUGHES, D.; ZHANG, L.; Diversitying microbial natural products for drug discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62(5-6): 446-458, 2003.

KIM, N.; SHIN, J. C.; HWANG, B. Y.; KIM, B. S. Cytotoxic 6-Alkylsalicylic Acids from the Endophytic *Streptomyces laceyi*. *J. Antibiotic*. 59(12): 797-800, 2006.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. ***Journal of Laboratory and Clinical Medicine***. v.44, p.301-307, 1954.

KINOSHITA, N.; HOMMA, Y.; IGARASHI, M.; IKENO, S.; HORI, M.; HAMADA, M. *Nocardia vinacea* sp. *Actinomycetologica*. 15:1-5, 2001.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *In*: BACON, C.V.; WHITE Jr.; J>F (Ed) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, 199-233p. 2000.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3): 206-220, 2005.

KOLM, H. E.; SIQUEIRA, A. Variação de bactérias em decorrência da dragagem do canal de acesso ao Porto de Paranaguá, Paraná. Pontal do Sul: CEM. *In*:Relatório final das atividades de pesquisa do laboratório de microbiologia marinha do Centro de Estudo do Mar da UFPR, 1999.

KOMATSU, K.; TSUDA, M.; SHIRO, M.; TANAKA, Y.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Brasilicardins B-D, new tricyclic terpenoids from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 5545-5551, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENBERGER, P.C.; WINN, Jr., W.C. Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6ª ed. 2008.

KOTA, K.; and SRIDHAR, P. Solid-state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production. *Process Biochem.* 34: 325–328, 1999.

KOTZIA, Ga.; LABROU, Ne. Cloning, expression and characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *J. Biotechnol.* 119: 309-23, 2005.

KROG, R., KROTH, R., BERTI, C., MADEIRA, A. O., SOUZA, M.M., CECHINEL FILHO, DELLE-MONACHE, F., YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. *Br.Pharmazie*, v. 54, p.464-466, 1999.

KROG, R.; KROTH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A. O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL FILHO, DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Análise da composição química das partes aéreas de *Ipomoea pes-caprae* (CONVOLVULACEAE). XV Simpósio de plantas Medicinais do Brasil, Água de Lindóia, SP de 14 a 17 de outubro de 1998.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUKOBO, S.; SUENAGA, K.; SHIOHARA, C.; TSUJI, T.; UEMURA, D. Structures of amamistatins A and B, novel growth inhibitors of human tumor cell lines from *Nocardia asteroides*. *Tetrahedron.* 56:6435:6440, 2000.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. *Mycology Research*, v. 105, n. 11, p. 1388-1391, 2001.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S.; JOHNSON, J. A. Ecology of mangrove endophytes. In: *Fungi of Marine Environments*. Ed. K. D. Hyde. *Fungal Diversity Research Series* 9, Hong Kong. cap. 10, 2002.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6: 1244-1251, 2004.

KURITA, M.; JOMO, K.; KOMORI, T.; MIYAIRI, N.; AOKI, H.; KUGE, S. Isolation and characterization of nocardicin B. J. Antibiot. 29:1243-1245, 1976.

KURUP, P.V. and SANHU, R.S. Isolation of *Nocardia caviae* from soil and its pathogenicity for laboratory animals. J. Bacteriol. 90:822-823, 1965.

KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. Journal of Natural Products. 71, 159-162.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI Jr. AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacterial from citrus plants and the phytopathogenic bacterial *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus- variegated chlorosis. Letters in Applied Microbiology. 30(1):55-59, 2004.

Lanna Filho, R.; Ferro, H.M.; de Pinho, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 4 (2): 14, 2010

LANES, D.V.C.; SANTOS, M.E.T.S.; SILVA, E.F.S.J.; LANES, K.G.; PUNTEL, L.R.; FOLMER, V. Estratégias lúcidas para a construção de hábitos alimentares saudáveis na educação infantil. Ver. Ciênc. & Ideias. 4 (1), 2012.

LI, Y.; SONG, Y. C.; LIU, J. Y.; MA, Y. M.; AND TAN, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21:553–558, 2005.

LI, J. LU C.H.; SHEN, Y.M. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp C.S. J. antibiot. 63(10): 595-9, 2010.

LIMA, D. A. Estudos Fitogeográficos De Pernambuco. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. 4:243-274, 2007

LEAL, M. C. Hydrolytic enzymes as adjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 19, p.175-180, 2002

LEE S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter* 88 *diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. J Bacteriol, v. 186, n. 16, p. 5384-91, 2004.

LEI-LEI, Y.; NING-NING, H.; YU-QIN, Z.; LI-YAN, Y.; JIE, C.; YU-ZHEN, W.; QIU-PING, L.; LING, T.; GUANG-HUI, Z.; SU-E, Y.; CUI-XIA, J.; XIN-DE, Z.; QI, H.; XUGELA, H.; QIONG-BO H.; ZHOU, L.; SHAO-WEI, L.; ZHI-ZHEN, Z.; QI-YANG, H.; SHU-YI, S.; and CHENG-HANG, S. Antimycin A₁₈ produced by an

endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant. The Journal of Antibiotics, 63: 259–261, 2010.

LIN, Y.T.; LIN, C.P.; CHAW, S.M.; WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; CHIU, C.Y. Bacterial community of verywet and acidic subalpine forest and fire-induced grassland soils. *Plant Soil*. 332(1–2):417–427, 2010.

LIU, J.Y.; HUANG, L.L.; YE, Y.H.; ZOU, W.X.; GUO, Z.J.; TAN, R.X. Antifungal and new metabolites of *Myrothecium* sp. Z16, a fungus associated with white croaker *Argyrosomus argentatus*. *J.Appl. Microbiol.* 100(1):195-202, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas, 2 edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum,, 544 páginas, 2008.

LUNA, C.M; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L.; GOTUZZO, E. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz. J. Infect. Dis.*, 14(2): 119-127, 2010.

LUO, Q.; HIESSL, S.; STEINBUCHER, A. Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environmental Microbiology*. 16(1): 29-48, 2014.

MADGAM, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10º ED. 2004. Prentice Hall. 608p.

MADEIRA, A. O.; BERTI, C.; CECHINEL FILHO, KROG, R.; YUNES, R.A.; SOUZA, M. M. Efeito antinociceptivo do extrato, frações e compostos puros obtidos das partes de *Ipomoea pes-caprae*. In: XV Simpósio de plantas Medicinais do Brasil, Água de Lindóia, SP de 14 a 17 de outubro de 1998.

MARQUES, E.; AQUILES, K. R.; BLUM, L. E. B. UESUGI, C.H. Bactérias extremófilas facultativas melhorando a germinabilidade de sementes de *Eucalyptus urophylla* S.T. blake. *Rev. Árvore* .38 (3), 2014.

MARIANO, R.de Lima, R.; DA SILVEIRA, E.B.; DE ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004

MARINHO, A. M. R., RODRIGUES-FILHO, E., FERREIRA, A. G.; SANTOS, L. S. Steroid epimers produced by *Penicillium janthinellum*, a fungus isolated from fruits *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 1342-1346, 2005a.

MARINHO, A. M. R., RODRIGUES-FILHO, E., MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 280-283, 2005b.

MARRONI, I. V.; GERMANI, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 6, p. 159-167, 2011.

MASHBURN, L.; WRISTON, J.C. Tumor inhibitory effects of L-asparaginase from *Escherchia coli*. *Arch Biochem. Biophys.* 105:450-2, 1964.

MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G. M.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* .29(3): 365–373, 2011.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2ª Ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MEYER, J.M.; STINTZI, A.; DE VOS, D.; CORNELIS, P.; TAPPE, R.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H. Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, v. 43, p. 35-43, 1997.

MENDONÇA, R.F.W.; MENEZES, F.S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande-RJ. *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl): 55-58, 2003.

MENGUE, S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. *Rev Bras Farmacogn* 11: 21-35, 2001.

MÉNDEZ, A. M.; PALACIOS, C. J. R.; CUEVOS, L. Z. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *Medunab*. 8(1): 37-42, 2005

MENEZES, C.A.; BONUGLI-SANTOSA, R. C.; MIQUELETTA, P. B.; PASSARINIA, M. R.Z.; SILVA, C. H.D.; JUSTO, M. R.; LEALA, R.R.; FANTINATTI-GARBOGGINIA, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCKB, R. G.S.; SETTEA, L.D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research* 165: 466—482, 2010.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, v. 173, p. 337-342, 1995.

MINTZ, S.W. Comida e antropologia. Uma breve revisão. *Rev. Bras. de Ci. Soc.* 16(47):12, 2001.

MONNERAT, R.; dos SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A. C.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos>> Acesso em: 09/jan/2015.

MORAIS, J.F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S.A.; POMPHILE, J.A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. *Rev. Uningá*. 17(1): 27-34. 2014.

MUKAI, A.; FUKAI, T.; MATSUMOTO, Y.; ISHIKAWA, J.; HOSHINO, Y.; YAZAWA, K.; et al. Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *J. Antibiot.* 59:366-369, 2006.

NAGARETHINAM, S.; NAGAPPA, A. N.; UDUPA, N.; VENKATA RAO J.; MEENASHI VANATHI, B. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. *Asian Journal of Medical Research*. 1(4): 159-168, 2012.

NARAYANA, K.J.P.; KUMAR, K.G.; VIJAYALAKSHMI, M. Lasparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Ind. J. Microbiol.* 48:331- 336, 2008.

NARENDRA, E. T.; CHAUDARY, M.; ATHIRA R N, AHMED, S. T.; SHANKAR K. G.; SIDDALINGESHWARA K.G and PRAMOD T. Studies on L-asparaginase production from *Pseudomonas stutzeri* strain through solid state fermentation from various agroresidues. *International Journal of Comprehensive Research in Biological Sciences*. 1(1), 2014.

NASCIMENTO, G. G. F. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacterial. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31(2): 247-256, 2000.

NEIROTTI, E. & AZEVEDO, J.L. Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulasas em *Humicola* sp. Revista de Microbiologia 19:78-81, 1988.

NELSON, E.B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. Annu Rev Phytopathol 42: 271–309, 2004.

NERI, C.C. de V. Acrilamida em Alimentos: Formação Endógena e Risco à Saúde. 2004, 63f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos, Interação com plantas e potencial biotecnológico. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 29 : 63, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over the period 1981 - 2002. Journal of Natural Products. 66(7): 1022 – 1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Products reports. 17(3):215-234, 2000.

NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SABELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. Biological Control.33:32-38, 2005.

NIGAM, P. ; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. Journal Basic Microbiology, v.34, n.6, p.405-423, 1994.

NITZKE, S.; FREELAND-GRAVES, J. Position of the American Dietetic Association: total diet approach to communicating food and nutrition information. J Am Diet Assoc.107(7):1224-32, 2007.

NÓBREGA, R. S. A. et al;. tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro* ; *Ciência. Agrotecnica*, 28: 899-905, 2004.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A. & ITO, T. Assemblages of endophytic fungi on *Bruguiera gymnorhiza* in the Shiira River Basin, Iriomote Is. IFO Research Communications, n. 20, p. 41-49, 2001.

OLIVEIRA, B.M.; DINIZ, M.S.; VIANA, M.B. Leucemias agudas na infância. Rev Med. 14 (1): 33-9, 2004.

ORTHOLAND, J-Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Current Opinion in Chemical Biology. 8(3): 271-280, 2004.

OTERO, J. T. et al. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia-like* fungi from tropical orchids. American Journal of Botany, v. 89, n. 11, p. 1852-1858, 2002.

OWEN, N.L; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesis inside plants. Science Progress. 87(2): 79-99, 2004.

PACE, J. L: YANG, G.; Biochem. Pharmacol, 71, 968, 2006.

PALUS, J. A.; BORNEMAN, J. LUDDEN, P. W.; TRIPLETT, E. W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. Plant and Soil, v. 186, p. 135-142, 1996.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem., 31:135-152, 2000a.
Patrick, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16; PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, 1995, cap. 10.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; et. al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) Rev Bras Farmacogn.19(1A):140-149, 2009.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DÍEZ MATAS, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZÁLEZ DEL VAL, A.; GONZÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity Mycological Research, v. 6; n. 102, p. 755-761, 1998.

PEREDA-MIRANDA, R.; BAH, M. Biodynamic constituents in the mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. Curr Top Med Chem 3: 111-131, 2003.

PEREIRA, J. C. Interações entre as populações de Actinomicetos e outros organismos da rizosfera. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000, 15p, 2003.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. A influência do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, R.C.; OLIVEIRA, M.T.R.; LEMOS, G.C.S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl.1): 37-40, 2004.

PETERS, S.; AUST, H. J.; DRAEGER, S. A.; SCHULZ, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant *calli*. *Mycologia*, 90: 360-367, 1998.

PETERSON, R.E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by various bacteria. *Appl. Microbiol.* 17(6):929-30, 1969.

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

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, D. Endophyte fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycology Research*, v. 105, n. 12 p. 1508-1513, 2001

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 354-361, 1997.

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa Phytopathologica* 36(1):85-88, 2010.

PINTO, A. C., *Química Nova*, 18, 608, 1995.

POLLI, A.; das NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *Rev. Saúde e Biol.* 7(2):82-89, 2012.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; SANDBERG, F.; WASUWAT, S. Inhibitory effect of extract of *Ipomoea pes-caprae* on guinea-pig ileal smooth muscle. *Acta Pharm Nordica* 1: 41-44, 1989.

PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Med* 57: 515-518, 1991a.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; WASUWAT, S. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprae* (L). *R. Br. J Ethnopharmacol* 35: 65-69, 1991b.

PONGPRAYOON, U.; WASUWAT, S.; SUNTHORNPALIN, P. 1992. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica*, v. 58, n. 1, p. 19-21.

POWERS, E. M. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol* 61, 3756±3758, 1995

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Taft, C. A. Ed. Research Signpost, Kerala., p. 51-78, 2006.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BANBERG, D.D.V.; LOHMANN, S.; FRANÇA, S. de 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*. *Plant*. 216: 162-167, 2002.

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

PURI, S.C., VERMA, V., AMNA, T., QAZI, G. N. AND SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* 68: 1717-1719, 2005.

QI, X.; WANG, E.; XING, M.; ZHAO, W.; CHEN, X. Rhizosphere and non-rizosphere bacterial communit composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. *World J. Biotechnol.* 28: 2257-2265, 2012.

Qin, J.; Li, R.; Raes, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65, 2010.

RAAIJMAKERS, J.M.; PAULITZ, T.C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321: 341–361, 2009.

RAI, J. N.; GARG, K. L. & JAITLEY, A. K. Saprophytic fungi isolated from woods in mangrove swamps and their wood-decaying capability. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, n. 22, p. 65-74, 1981.

RAJAMANICKAM, U.S.H.A.; KRISHNASWAMI, K. M.; CHIDAMBARAM, K. V. and MUTHUSAMY, P. Screening of Actinomycetes from Mangrove Ecosystem for L-asparaginase Activity and Optimization by Response Surface Methodology . *Polish Journal of Microbiology*.60(3): 213–221, 2011.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 20: 1-11. (2001).

RAMYA, L.N.; DOBLE, M.; REKHA, V.P.B.; PULICHERLA, K.K. L- Asparaginase as Potent Anti-leukemic Agent and Its Significance of Having Reduced Glutaminase Side Activity for Better treatment of Acute Lymphoblastic Leukaemia, *Appl Biochem Biotechnol*. 12010- 012-9755, 2010.

RAO, K.V.; KUMAR, K.S.; RAO, D.B.; RAO, R. Isolation and characterization of antagonistic actinobacteria from mangrove soil. *J Biochem Tech*.3(4):361-365, 2012.

RATLEDGE, C.; SNOW, G.A. isolation and structure of nocobactin NA, a lipid-soluble iron-binding compound from *Nocardia asteroides*. *Biochem. J.* 139: 407-413, 1974.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev Ciên Farm Básica Apl.* 30(2):137-43, 2009.

REGINATTO, T.S.C. Diversidade da bactérias associadas a bromélias do parque estadual de itapuã/ RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008, 71 f. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre – Rio Grande do Sul, março de 2008.

- REZWANA K.; SALEEM S.; M. IQBAL C.; SHAKEEL A. K.; AQEEL A. Communities of endophytic fungi in medicinal Plant *withania somnifer*A. *Pak. J. Bot.*, 42(2): 1281-1287, 2010.
- RICHA J.; ZAIDI, K.U.; VERMA, Y.; SAXENA, P. L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *People's J. Sci. Res.*5(1):29-35. 2011.
- RITTER, M.R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E.P.; MENTH, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 12: 51-62.
- RIZZO, T. VARSAVKY, E. HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coaridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides*. *Toxicon*, v. 35, n.5, p. 753-757, 1997.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Sólid-fermentation: a promising microbiol. Technology for secondary metabolite production. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 55:284-289, 2001.
- RODRIGUES, A. A. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. 2009, Dissertação de mestrado em microbiologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás.
- RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, v. 3, n. 86, p. 376-385 1994.
- ROGERS, K.L.; GRICE, I.D.; GRIFFITHS, L.R. 2000. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 4, p. 355-363.
- ROSAS, M.S.L.; SILVA, B.N.M.; PINTO, R.G.M.P.; SILVA, B.V.; Da SILVA, A.R.; GUERRA, L.R.; SOARES, G.C.M.T.; CASTRO, H.C.; LIONEIA, V.O.F. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. *Rev. Virtual Quím.* 5(2): 243-65, 2013.
- SAENS, M.T.; GARCIA, M.D.; de la PUERTA, R., Cytostatic activity of some essential oils against HEP-2 cells. *Il Farmaco*, Rome.51(7):539-540, 1996.

SAHU, M.K.; SIVAKUMAR, K.; POORANI, E.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from esturine fishes. J. Environ. Biol. 28:465-474, 2007.

SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Editora Eventos, Rio de Janeiro, 2002, p.121.

SAIKKONEN, K. WÄLI, P.; M. FAETH, S. H. Evolution of Endophyte – plant symbioses. TRENDS in Plant Science. 9(6): 275 – 280, 2004.

SAKAGAMI, H.; ISHIHARA, M.; HOSHINO, Y.; ISHIKAWA, J.; MIKAMI, Y.; FUKAI, T. Cytotoxicity of nocobactins NA-a, NA-b and their ferric complexes assessed by semiempirical molecular orbital method. In Vivo. 19:277-282, 2005.

SANTOS R.M.G.; RODRIGUES-Fo E.; ROCHA, W.C.; TEXEIRA, M.F.S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. World J. Microbiol Biotechnol. 19:767-770. DOI 10.1023/A: 1026000731189, 2003.

SANTOS, R. M. G AND RODRIGUES Fo, E.). Meroterpenes from *Penicillium* sp. found in association with *Melia azedarach*. Phytochemistry 61: 907-912, 2002

SARDI P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONORI, G. E.; MERLI, S. Isolation of endophytic Streptomyces strain from surfaces sterilized roots. Applied Environmental of Microbiology, v. 58, p. 2691-2693, 1992.

SARQUIS, M.I de MOURA.; OLIVEIRA, E.M.M.; SANTOS, A.S.; da COSTA, G.L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 99(5): 489-92, 2004.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Letters in Applied Microbiology.20(5): 282-285. 1995.

SAVITRI, N.A.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. Ind. J. Biotechnol. 2:184-194, 2003.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 315-340, 2004.

SCHWARZ, M., KÖPCKE, B., WEBER, R. W. S, STERNER, O. AND ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* 65: 2239-2245, 2004.

SEO, K.A.; KIM, H.; KU, H.Y.; AHN, H.J.; PARK, S.J.; BAE, S.R.; SHIN, J.G.; LIU, K.H. The monoterpenoids citral and geraniol are moderate inhibitors of CYP2B6 hydroxylase activity. *Chem-Biol. Interact.* 174:141-146, 2008.

SHARMA, O.P.; DARWRA, R.K. Thin layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. *Journal of Chromatography*. 567: 351-354, 1991.

SHIBAO, J.; BASTOS, D.H.M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. *Rev. Nutr.* 24(6):895-904, 2011.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 16, p. 313-340, 1966.

SHIMIZU, M.; · IGARASHI, Y.; · FURUMAI, T.; ONAKA H.; KUNOH H. Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. *J Gen Plant Pathol.*, 70:66–68, 2004.

SHUKLA, D.; SHRIVASTAV, V.K.; JANA. A.M.; SHRIVASTAV, A. Exploration of the potential L-asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). *Int.J.Curr.Microbiol.App. Sci*)3(5): 665- 672, 2014.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; et. al. Evaluation Of Antiinflammatory-Related Activity Of Essential Oils From The Leaves And Resin Of Species Of *Protium*. *J, Ethnopharm.* 66:57-69, 1999.

SILVA, L.B.; SANTOS, F.A.R.; GASSON, P.; CUTLER, D. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. v. 23, n.2, p. 436-445, 2009.

SILVA, R. L. DE O.; LUZ, J. S.; DA SILVEIRA, E. B.; E CAVALCANTE, U. M. T Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção

do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) Acta bot. bras. 20(3): 649-655. 2006.

SILVA, G.C.; PILGER, D.A.; CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. J. Bras. Patol. Med. Lab.42(2):77-84, 2006.

SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; JUNIOR, M. A. L.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; da Costa.; D.P.; Cadete, L.L. R. Isolamento e Prospecção de Bactérias Endofíticas e Epifíticas na Cana-de-Açúcar em Áreas Com e sem Cupinicida. Bras. Ci. Solo, 36:1113-1121, 2012.

SIM, JIUN-HORNG, CHAI-HOON KHOO, LEARN-HAN LEE, AND YOKE-KQUEEN CHEAH. Molecular Diversity of Fungal Endophytes Isolated from *arcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. Journal Microbiology and Biotechnology. 20(4), 651–658, 2010.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. Biotecnologia do solo. Fundamentos e perspectivas. Brasília: Ministério da Educação, Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1988. 235 p.

SIVASANKAR, P.; SUGESH, S.; VIJAYANAND, P.; SIVAKUMAR, K.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; MAYAVU, P. African Journal of Microbiology Research. Vol. 7(31): 4015 – 4021, 2013.

SOUTHCOTT, K. A. AND JOHNSON, J. A. Isolation of endophytes from two species of palm, from Bermuda. Canadian Journal of Microbiology, n. 43, p. 789-792, 1997.

SOUZA, M.M., MADEIRA, A., BERTI, C., KROG, R., YUNES, R.A., CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. J. Ethnopharmacol, v. 69, pag. 85-90, 2000

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; and WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. Int J Syst Bacteriol 47: 479–491, 1997.

STAMFORD, T. L. M.; ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P., Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupe (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). Ciênc. Tecnol. Aliment, 18, 382-385, 1998.

STIELE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces*

andreane an endophytic fungus of pacific yew. Science, 260: 214-216,1993.

STOWE E YAMAKI com o isolamento do ácido giberélico da cultura de *Gibberela fugikuroi*,1957.

STROBEL, G.A.; HESS W. M. FORDE, SIDHU R. S.; YANG X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology. V. 17, p. 417-423, 1996.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbiol Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67(4): 491 – 502, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. Journal of Natural Products. 67(2): 257 – 268, 2004.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and Bioative Products. Critical Rewiews in Biotechnology. 22(4): 315 – 333, 2002.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. Drug Discovery Today, 5 (2):39-41, 2000.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.. Endophytic bacteria of red clover as agents of allelopathic clover-maize syndromes. Soil Biol. Biochem. 28:583-588 1996.

STURZ, A. H.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots stems and foliage and their influence on host growth. Biology and Fertility of Soils, v. 25, p. 13-19, 1997.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. Plant and soil, v. 175, p. 257-263, 1995.

SUENAGA, K.; KOKUBO, S.; SHINOHARA, C.; TSUJI, T.; UEMURA, D. Structure of amamistatins A and B, novel growth inhibitors of human tumor cell lines from an actinomycete. Tetrahedron Lett. 40: 1945-1948.

SUJATHA, P.; BAPI, R.K.; RAMANA, T. Studies on a new marine Streptomycete BT-

408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 160:119–126, 2005.

SURYANARAYANAN, T. S. & KUMARESAN, V & JOHNSON. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology*, n. 44, p. 1003-1006, 1998.

SUN, ZHEN-LIANG; ZHANG. M.; ZHANG, JI-FA; FENG, J. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massaria* sp. *Phytomedicine*, 2011.

SWATHI, N.; KAMALAKUMARI, P.V.; GIRIJA SANKAR, G.; PRABHAKAR, T. Production of L-asparaginase by solid state fermentation using marine fungus. *BMR Biochem.* 1(1):1-9, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Quim. Nova*, Vol. 31(7), 1807-1813, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports.* 18(4): 448-459, 2001.

TAVARES, A. C. D.; da FONSECA, J. S. da FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F. B.; SOUZA, A. T. R.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. *Biochemistry and Biotechnology Reports.* 1(2):1-6, 2012.

TERAMACHI, F.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; HAYASHI, M. KOMIYAMA, K. ISHIBASHI, M. Collagenase Inhibitory Quinic Acid Esters from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 794-796, 2005.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F. COSTA, F. E. C.; HARA KAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 42 (1): 43-49, 2007.

THENMOZHI, C.; SANKAR, R.; KARUPPIAH, V.; SAMPATHKUMAR, P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: optimization by response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 486-491, 2011.

THATOI, H.; BEHERA, C. B.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Ann Microbiol.* 63:1–19, 2013.

TONIAL, F. Atividade antimicrobiana de endofíticos e de extratos foliares de *Schinus turebenthifolius* Raddi (Aroeira). P.138, 2010. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TOSCAN, C.M. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia em Caxias do Sul), 2010, 69p. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, UCS, Caxias do Sul, 2010.

TREVET, I. W.; HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology*, v. 38, p. 960-967, 1948. Apud CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bacterias endofíticas de raiz de milho (*Zea mays*. L.) e potencial para a promoção de crescimento. Tese de doutorado, 2005, 132 f. Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em genética e evolução, São Carlos- SP, 2005.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV, A.I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*.162(1): 69-76. 2007.

TSUJI, Y. Studies on the amidase IV. Supplemental studies on the amidase action of bacterial. *Japan. Arch. Internal. Med.* 4:222-224, 1957.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A- D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp SUC1. *Tetrahedron* 64 7583 -7586. 2008.

TURINA, A.; Del V, NOLAN, M.V.; ZYGADLO, JÁ, PERILLO, M.A. Natural terpenes: Self-assembly and membrane parttioning. *Biophys. Chem.*122: 101-113, 2006

UETANABARO, A. P. T. Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch.) K. Shun. 2004. 130 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VADDAVALLI, R.; PEDDI, S.; KOTHAGAUNI, S.Y.; LINGA, V.R. *Nocardia bhagyanesis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the rhizosphere of *Callistemon citrinus* (Curtis), India. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Mar;105(3):443-50, 2014.

VARELLA, L.; V, CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFFO, L. V.; MORAES, M. O.; PUPOLI, M. T. Atividades antitumoral e antibacteriana de *Streptomyces* sp. e *S.platensis*, endofíticos isolados de *Tithonia diversifolia*. 25º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, 2011

VERMA, V. C.; GOND S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. A. N.; GANGE, A. C. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. *Microb Ecol*, 2008.

VEIGA J, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 308-313, Abr./Jun. 2008.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, v.255, p.571-586., 2003.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev BrasFarmacogn* 15: 361-372, 2005.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F; VAN SINDEREN, D. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71:495-548, 2007.

VILA-AIUB, M. M.; MARTINEZ-GHERSA, M. A.; GHERSA, C. M. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities. *Evolutionary Ecology*, v. 17, p. 441-456, 2003.

VINING, L.C. Secondary metabolism In: REHM, H.J.; REED, G.(Ed). *Biotechnology*. Weinheim: VCH. v.4, p 21-29, 1986.

VOBIS, G. Morphology of actinomycetes. In: MIYADOH, S. *Atlas of actinomycetes*. Japan: Asakura, p. 180-191, 1997.

von NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 5072.

VORHOLT, J.A. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828–840, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis – Thin layer chromatography atlas. Munich: Springer, 1996, 384 p.

WANG, J.; HUANG, Y.; LIN, S.; LIU, F.; SONG, Q.; PENG, Y. ZHAO, L. A strain of *Streptomyces griseoruber* isolated from rhizosphere soil of Chinese cabbage as antagonist to *Plasmodiophora brassicae*. *Ann. Microbiol.* 62: 247-253, 2012.

WANG, S.; LI, X.M.; TEUSCHER, F.; LI, D.L.; DIESEL, A.; EBEL, R.; PROKSCH, P.; WANG, B.G.; Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *J. Nat. Prod.* 69(11):1622-5, 2006.

WASUWAT, S. Extract of *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison. *Nature* 225: 758-759, 1970

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 35, p. 137-144, 2001.

WIJERATNE, E. M. K.; PARANAGAMA P. A.; GUNATILAKA, A. A. L. Five new isocoumarins from Sonoran desert plant-associated fungal strains *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *Tetrahedron* 62: 8439–8446, 2006.

WILLIAMS, S. T. et al. Studies on the ecology of Actinomycetes in soil. II - The pH requirements of actinomycetes from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 3, n. 1, p. 187-195, 1972.

WIT J. N. Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *J. Dairy Sci.* 81: 597-608, 1998.

WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 265-272, 2004.

WOOD, T.M and BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. In: WOOD, W.A. and KELLOGG, S.T. *Methods in enzymology*. Academic Press., London. v.160. p.87-112.

YAMAMURA, H.; HAYAKAWA, M.; NAKAGAWA, T.; TAMURA, T.; KOHNO, T.; KOMATSU, F.; LIMURA, Y. *Nocardia takedensis* sp nov., isolated from moat sediment and scumming activated sludge. Int. Syst. Evol. Microbiol. 55:433-436, 2005.

YANG, S. S., YUAN, S.S. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of sweet potato residue. World Journal of Microbiology and Biotechnology . v. 6, p. 236 – 244, 1990.

YAO, A.; BOCHOW, H.; KARIMOV, S.; BOTUROV, U.; SANGINBOY, S.; SHARIPOV, A. EFFECT OF FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. Archives of Phytopathology and Plant Protection.39: 323-328, 2006.

YASSER, R.; ABDEL-FATTAH, ZAKIA A. L-Asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. Prospects in Biochem:38:115-122, 2002.

YELLIN, T.O.; WRISTON, J.C. Purification and properties of guinea pig serum L-asparaginase. Biochem. 5:1605-12, 1966.

YOKO, T.; OMURA, S. Isolation of new actinomycetes strains for screening of new bioactive compounds. J. Gen. Appl. Microbiol. 219: 141-159, 2003.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. Eur. J. Biochem., v. 259, n. 3, p. 572-6, 1999.

ZANDONAI, R. H. Análise da atividade linfoproliferativa de células esplênicas murinas frente a extrato de seis plantas medicinais da flora caratinense. 2007, 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

ZHAO, L. The tale of our other genome. Nature 465: 879–880, 2010.

ZHANG, Y. et al. Diversity of culturable actinobacterial from Qinghai-Tibet plateau, China. Antonie van Leeuwenhoek, Daordrecht. 98(3):213-223, 2010.

ZELLES L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: A review, Biol. Fertil. Soils 29: 11-129, 1999.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 10 n. 14: 123-137, 2009.

ZIN, N.M.; SARMIN, N.M.; GHADIN, N.; BASRI, D.F.; SIDIK, N.K.; HESS, W.M.; STROBEL, G. A. Bioactive endophytic Streptomycetes from the Malay Peninsula. FEMS Microbiol Lett 274:83–88, 2007.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; 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, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ZOU, W. X.; MENG, J.C.; LU H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG T.Y. AND TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongólica*. J. Nat. Prod. 63 p. 1529, 2000.

APÊNDICE

academicJournals

Vol. 8(52), pp. 4020-4026, 24 December, 2014
 DOI: 10.5897/AJMR2014.71161
 Article Number: 5F046A749644
 ISSN 1996-0808
 Copyright © 2014
 Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/AJMR>

African Journal of Microbiology Research

Full Length Research Paper

Biotechnological potential of actinobacteria isolated from rhizosphere of the medicinal plant, *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

Ivana Gláucia Barroso Cunha^{1,2}, Aline Dayse da Silva¹, Alex Lucena de Vasconcelos², Karina Perrelli Randau², Luis Cláudio Nascimento da Silva^{1,2*}, Janete Magali de Araújo² and Elba Lúcia Cavalcanti Amorim²

¹FPS-Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, PE-Brasil.

²UFPE-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE-Brasil.

Received 30 September, 2014; Accepted 2 December, 2014

The aim of the present study was to evaluate the antimicrobial activity and the production of L-asparaginase by actinobacteria isolated from the rhizosphere of the medicinal plant, *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., and to conduct a comparative chemical characterization of the methanolic extract from leaves and the most active micro-organism. After isolation, the antimicrobial activity of actinobacteria from rhizosphere were evaluated against *Candida albicans* UFPEDA 1007, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 and clinically isolated *S. aureus* UFPEDA 705. The chemical characterization was conducted by thin layer chromatography for the following groups: triterpenes, steroids, mono- and sesquiterpenes, alkaloids, saponin, coumarin, flavonoids, phenylpropanoids, cinnamic acid derivatives. Finally, a qualitative assay was carried out to evaluate the production of L-asparaginase. Among all isolated actinobacteria, the strain *Nocardia* sp. A94 was the most active against Gram positive bacteria, including the clinical isolate (inhibition diameter zone of 23 mm). Additionally, mono/sesquiterpene groups were detected in its methanolic extract, as well in the extract from *I. pes-caprae*. On the other hand, the production of the L-asparaginase was confirmed in 55.17% of tested actinobacteria. The results show the biotechnological potential of actinobacteria from the rhizosphere of *I. pes-caprae* as producers of antimicrobial compounds and L-asparaginase, both activities can be explored for pharmaceutical, cosmetic and food industries.

Key words: Actinobacteria, monoterpene, *Nocardia* sp., rhizosphere, L-asparaginase

INTRODUCTION

Brazil is home to 20% of the world's biodiversity and is a varied source of bioactive materials in various fields (Azuma, 2002; Silva et al., 2013a). The rhizosphere is a region distinct from the soil, in which there is a diverse and complex interaction between soil, roots and organisms (Ambardar and Vakhlu, 2013). Through this relation, micro-organisms find the substrates necessary

for their proliferation and each plant root exudates has a selective effect on its surrounding microbial population (Hartmann et al., 2009). Medicinal plants may thus host a diverse range of micro-organisms that produce bioactive substances, such as antibiotics, anti-tumor agents, immunosuppressants and enzymes (Li et al., 2008; Zhu et al., 2009).

Rhizospheric micro-organisms include actinobacteria, which make up a considerable proportion of the micro-organisms in the soil (10^4 to 10^6 spores per gram of earth) and display a great variety of morphologies (Raju et al., 2010). This group of bacteria is especially important due its capacity to produce bioactive compounds, especially antimicrobials (Bérdy, 2005). Another example is the production of the L-asparaginase enzyme, which converts L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia and it has been used as chemotherapy drug to treat acute lymphoblastic leukemia (Dejong, 1972, Sarquis et al., 2004).

The medicinal plant *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) is commonly known as 'morning glory' and it is native to the restingas of sandy dunes on the coast of Africa, Asia and Brazil (Wasuwat, 1970; Lorenzi and Matos, 2002). Its use in folk medicine comes from the habits of the Australian aborigines who used to heat the leaves and apply them on boils (Wasuwat, 1970). The microbial environment of the rhizosphere soil habitat of *I. pes-caprae* has not been the subject of much research and it is therefore interesting to attempt characterization and identification of the micro-organisms present in this rhizosphere and their biotechnological applications.

The aim of this present study was to evaluate the antimicrobial activity and the production of L-asparaginase by actinobacteria isolated from the rhizosphere of *I. pes-caprae*, and to conduct a comparative chemical characterization of the methanolic extract from leaves and the most active micro-organism (*Nocardia* sp. A94).

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

The rhizosphere and leaves of *I. pes-caprae* were collected in January 2012 on Forte Orange Beach, in the city of Itamaracá (7°48'38"S, 34°50'27"W), in the Brazilian State of Pernambuco. A sample of *I. pes-caprae* (leaves and stem) was deposited in the herbarium of the Agronomic Institute of Pernambuco (Instituto Agrônomico de Pernambuco, Brazil; voucher number 85782) and the remaining leaves were washed and subsequently divided up and prepared for the extraction process.

Isolation of Actinobacteria

A sample (10 g) of soil was mixed with 90 mL of 0.9% (w/v) NaCl. The pH (5.6) of this solution was measured and it was agitated mechanically for 20 min and then heated in a water bath to 50°C (Marroni and Germani, 2011). Portions (1 mL) of soil suspensions were transferred to 9 mL of sterile water (diluted 10^{-1}) and subsequently diluted to 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} (King et al., 1954). Shortly thereafter, 200 µL of the dilutions was inoculated in Petri dishes containing 20 mL of culture medium: Tryptone yeast extract -

ISP₂ (Pridham and Gottlieb, 1948) and Czapek Dox (CD) Agar medium (sucrose 30.0 g, NaNO₃ 3.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ x 7H₂O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, Agar 15.0 g, H₂O 1000 mL, pH 6.6), with added antifungal agent Cyclohexamide 50 µg/mL. The test was carried out in triplicate for each culture medium. One triplicate was prepared with distilled water and in another the medium was enriched with 0.3% NaCl, producing saline Czapek Dox Agar medium. After inoculation, the dishes were incubated in a bacteriological dryer at 37°C for seven days.

Antimicrobial assays

Primary test of antimicrobial activity: "Gelose block"

The test of antimicrobial activity was carried out in accordance with Ichikawa et al. (1971), using micro-organisms from the UFPEDA collection: *Candida albicans* UFPEDA 1007, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 (ATCC 6633), *Escherichia coli* UFPEDA 224 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 (ATCC 6538) and the clinical isolate *S. aureus* UFPEDA 705.

Semi-solid fermentation of Actinobacteria

The strain which showed the best antimicrobial activity was identified by macro- and micro morphological analysis using the technique described by Shirling and Gottlieb (1966). This strain (*Nocardia* sp. A94) was submitted to semi-solid fermentation using sterile parboiled rice as substrate (Marinho et al., 2005). Twenty small plugs of ISP-2 medium containing aerial mycelium of the *Nocardia* sp. A94 strain were transferred to the twenty-one 500 mL Erlenmeyer flasks containing the solid rice medium (90 g of parboiled rice and 90 mL of distilled water with 0.3% NaCl) and incubated in B.O.D. at 30°C for 21 days (Borges and Pupo, 2006).

Then, cold methanol (150 mL) was added to the cultures of *Nocardia* sp. A94. After 24 h, the extract was filtered in a vacuum. Then a further 100 mL of cold solvent was added to the cultures and they were filtered again. The filtrates were concentrated in a rotary evaporator at 45°C (Borges and Pupo, 2006).

Preparation of plant extract

After drying at room temperature for one week, the sample (leaves) was reduced to small fragments. A total of 5 g of dried leaves was submitted to methanolic extraction for 24 h and filtered with Whatman no.1 paper. The solvent was then removed under reduced pressure in a rotary evaporator at 45°C.

Chemical prospection

The extracts obtained were analyzed using thin layer chromatography (TLC) (Kieselgel 60, 0.2 mm, Merck), with adequate systems and markers for each metabolite group (Harborne; 1998, Wagner and Bladt. 1996) (Table 1).

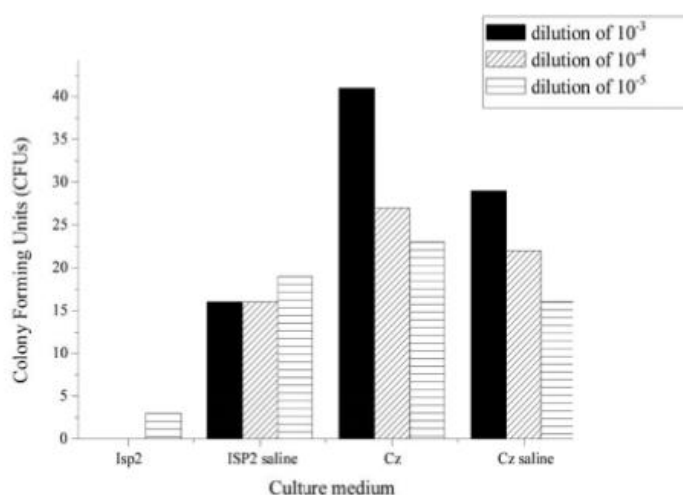
Qualitative test of production of antitumor L-asparaginase enzyme

The experiment was carried out using the rapid plate test to track

*Corresponding author. E-mail: luisclaudionsilva@yahoo.com.br.

Table 1. Chromatographic conditions of chemical prospection of methanolic extracts of *Nocardia* sp. A94 and *I. pes-caprae*.

Metabolite	Mobile phase	Marker	Standard	Reference
Triterpenes and steroids	Toluene and ethyl acetate	Lieberman-Burchard	β - sitosterol	Sharma and Dawra, 1991
Monoterpenes and sesquiterpenes	Toluene and ethyl acetate	H ₂ SO ₄ , Sulfuric Vanillin	Thymol	Wagner and Bladt, 1996
Alkaloids	Ethyl acetate, formic acid, acetic acid and water	Dragendorff	Pilocarpine	Wagner and Bladt, 1996
Coumarin, flavonoids, phenylpropanoids and cinnamic derivatives	Ethyl acetate, acetic acid, formic acid and water	NEU	Rutin	Wagner and Bladt, 1996

**Figure 1.** Report of colony forming units of isolated actinobacteria in different culture media ISP₂, ISP₂ saline, Czapek and saline Czapek.

for *in vitro* L-asparaginase production where a modified M-9 medium was prepared, produced with g/L of: NaHPO₄·2H₂O (6.0); KH₂PO₄ (3.0); NaCl (0.5); CaCl₂·2H₂O (0.014); MgSO₄·7H₂O (0.5); glucose (2.0); L-asparagine (5.0); 0.25% ethanolic solution of phenol red (0.09) and agar (17). Phenol red coloring was used in the culture medium as an indicator of changes in pH caused by cleavage of L-asparagine into aspartic acid, changing the color from orange to pink (Gulati et al., 1997). The actinobacteria were incubated at 30°C in a Biological Oxygen Demand (BOD) dryer for seven days.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and antimicrobial activity of Actinobacteria strains

It was possible to quantify 212 colony forming units (CFUs) in the rhizosphere of *I. pes-caprae* at dilutions of

10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} . Of these, 81 were isolated. Czapek Dox Agar culture medium was the best for isolating colonies at all dilutions (Figure 1), with the highest number of colonies (41 at a dilution of 10^{-3} = 41×10^3) as shown in Figure 1. Of these 81 actinobacteria, only 29 grew with aerial mycelium after isolation.

The rhizosphere is a region of the soil that is influenced by the roots of plants and is characterized by a high level of microbial activity (Hartmann et al., 2009; Lin et al., 2010). The presence of actinobacteria has also been reported for rhizosphere of some medicinal plants such as *Rumex patientia* (Qi et al., 2012), *Crocus sativus* (Hainan and Vakhlu, 2012) and some Bangladesh medicinal plants (Ara et al., 2013). For example, a huge population of actinobacteria (168×10^3 CFU per gram of soil) were found in these Bangladesh medicinal plants. Similarity, a total of 400 strains of actinobacteria was

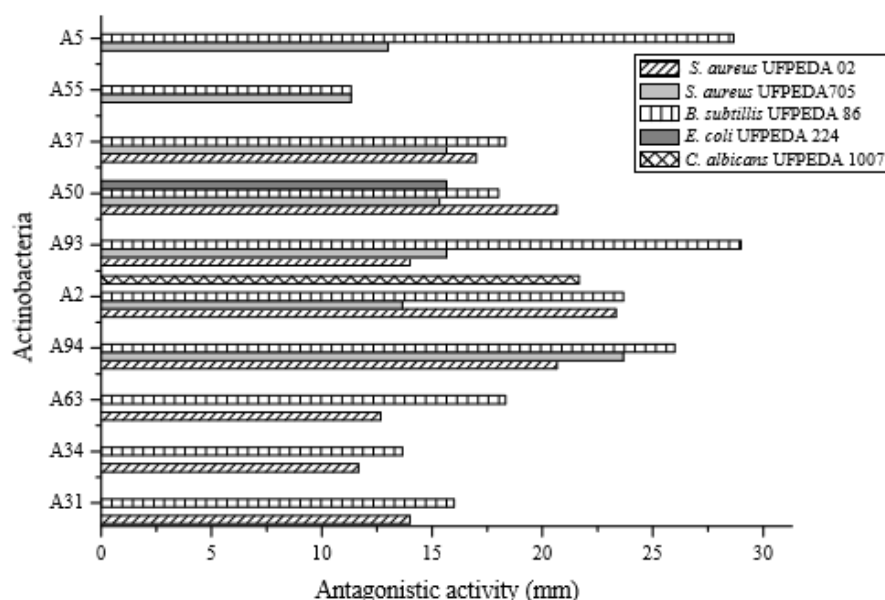


Figure 2. Antimicrobial activity of actinobacteria from rhizosphere of *I. pes-caprae* (Forte Orange, Itamaracá-PE, Brazil).

isolated from 12 soil samples of medicinal plant collected from tropical botanical garden in Danzhou city (Xiaolong et al., 2012).

Although these actinobacteria are from the habitat of the rhizosphere of *I. pes-caprae*, a plant found in dunes on the Brazilian coast (Wasuwat, 1970; Lorenzi and Matos, 2002), the highest number of isolates were found in a non-saline culture medium, suggesting that these actinobacteria are halotolerant (Carro et al., 2013). After purification of strains of actinobacteria from the rhizosphere, only 29 grew with a sufficient number of secondary hyphae to have antimicrobial properties. Sixty-two percent presented activity against at least one test micro-organism. The A2, A50 and A94 actinobacteria, identified as species of the *Nocardia* genus, presented antibacterial activity with inhibition diameter zone (IDZ) of 23.33, 20.66 and 20.66 mm for *S. aureus* UFPEDA 02; 13.66, 23.66 and 15.33 mm for *S. aureus* UFPEDA 705; and 23.66, 18.00 and 26.00 mm against *B. subtilis* UFPEDA 86, as shown in Figure 2. The A2 strain was the only one that presented antifungal activity against *C. albicans* (21.66 mm).

Similar antimicrobial activity was reported in a study of *Streptomyces* (BT-408) isolated from the sediment of the Bay of Bengal in the Indian Ocean, aiming to evaluate its activity against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). The authors reported that this actinobacteria presented a IDZ of 20 mm (Sujatha et al., 2005) and a study of actinobacteria isolated from the Visakhapatnam region found that, after fermentation and isolation of compounds, the B01 fraction presented moderate activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and

B. cereus (Rao et al., 2012).

The search for secondary metabolites that are active against species of the genus *Staphylococcus* is important, especially to combat *S. aureus* (Da Silva et al., 2013a, b), owing to its high incidence in both hospital and community acquired infections, linked to its patterns of resistance and factor virulence expression (Gould et al., 2012). This problem is compounded when faced with multi-resistant strains of the *S. aureus* (Davis et al., 2013).

Identification and chemical characterization of methanolic extract of strain A-94

Amongst all tested bacteria (29), the strain A-94 showed the best antimicrobial activity against Gram-positive pathogens, especially *S. aureus*; therefore, the strain A-94 was selected to be partially identified and chemical characterized. The microculture technique identified the A-94 strain at the genus level as *Nocardia*. The strain A-94 exhibited well-developed vegetative hyphae with irregular branches penetrating the agar and bearing white aerial sparse hyphae. At a late stage of their growth, the filaments fragment into rod-shaped elements characteristic of the family Nocardiaceae and the genus *Nocardia* (Hoshino et al., 2004).

A chemical characterization was conducted for the MeOH extract of the biomass of *Nocardia* sp., and the MeOH extract of *I. pes-caprae*. Mono- and sesquiterpenes were found both in the extract of the micro-organism and that of the plant. The other

Table 2. Evaluation of chemical characterization of MeOH extracts of *Nocardia* sp. when compared with MeOH extracts of *I. pes-caprae*.

Metabolite	<i>Nocardia</i> sp. extract	Plant extract
Triterpenes and steroids	Negative	Negative
Monoterpenes and sesquiterpenes	Positive	Positive
Alkaloids	Negative	Negative
Coumarin, flavonoids, phenylpropanoids e and cinnamic derivatives	Negative	Positive (flavonoid)

Table 3. Evaluation of production of L-asparaginase by actinobacteria isolated from the rhizosphere of *I. pes-caprae* oriunda from Forte Orange Beach, Itamaracá - PE.

Actinobacteria	Qualitative Test	Actinobacteria	Qualitative Test
A31	+++	A208	+++
A34	+++	A119	ND
A63	+++	A180	++
*A94	+++	A101	++
A2	+++	A222	+++
A93	ND	A210	ND
A50	+++	A207	++
A37	+++	A209	ND
A55	+++	A196	+++
A5	+++	A231	ND
A65	ND	A114	+++
A122	+++	A5.5	+++
A202	+++	A201	++
A120	++	A118	+
UFPEDA 224	+++	UFPEDA 224	+++

ND = Not degraded; + = low level of degradation of L-asparagine in 48 h; ++ = medium level of degradation of L-asparagine in 48 h; +++ = high level of degradation of L-asparagine in 48 h. **Nocardia* sp. A9.

secondary metabolites under study were not found, as shown in Table 2. The presence of sesquiterpenes and other secondary metabolites in the extract of *I. pes-caprae* has previously been reported (Pongprayoon, 1991, 1992). Both monoterpenes and sesquiterpenes are associated with antibacterial, antifungal and antitumor activity (Schwab, Fuchs and Huang, 2013). These compounds are used as components in fragrances, cosmetics, cleaning products, disinfectants, food additives and medicines, owing to their pleasant smell and antimicrobial properties (Schwab, Fuchs and Huang, 2013). Although chemical prospecting is generally carried out with extracts from different parts of the plant, such as leaves and roots, it is important to bear in mind that, in the rhizosphere, there are inter- and intra-species relations between micro-organisms and the environment, which causes it to produce similar compounds (Kent and Triplett, 2002).

Qualitative test of production of L-asparaginase enzyme

Additionally, a qualitative evaluation of the L-asparaginase

production was performed with all strains isolated from rhizosphere of *I. pes-caprae*. The result was recorded as positive according to a change of color in the M-9 medium. The coloration is the result of degradation of the asparagine in the growth medium caused by the breakdown of L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia, which changes the color from orange to pink (Amena et al., 2010). In the screening, 55.17% of strains tested presented an area of degradation of asparagine similar to the positive control, *E. coli* UFPEDA 224, and 20.68 % presented an area of degradation with weaker coloration in comparison with the positive control (Table 3).

L-asparaginase is an enzyme that possesses antineoplastic properties against acute lymphoblastic leukemia and can be produced by a variety of micro-organisms, such as bacteria, actinobacteria and fungi (Dejong, 1972; Moura et al., 2004). *E. coli* and *Erwinia chrysanthemi* are two well-known producers of L-asparaginase, nevertheless, there is a need to search for micro-organisms able to produce high amounts of L-asparaginase, with more therapeutic efficacy and, if

possible, with fewer side effects (Nagarethinam et al., 2012). It is established that preparations from each kind of species differ on their pharmacological properties (therapeutic efficacy, bioavailability and induction of side effects) structural characteristics and physico-chemical kinetics (Labrou et al., 2010). In fact, different habitats have been explored to obtain these micro-organisms as soil (Shukla et al., 2014), marine (Basha et al., 2009), leaves (endophytic) (Chow and Ting, 2014) and rhizosphere (Khamna et al., 2009). For example, actinobacteria strains isolated from 16 samples of rhizosphere of medicinal plants from Thailand and, of 445 isolated, 30 were found to produce this enzyme (Khamna et al., 2009).

Conclusion

The present study suggests that the micro-organisms present in the rhizosphere of *I. pes-caprae* possess biotechnological properties since they are producers of antimicrobial compounds and L-asparaginase. Both activities are of interest to different industries such as pharmaceutical, food, cosmetic and cleaning industries. Further studies on the molecular characterization of each active isolate and purification of the bioactive compounds are in progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express gratitude to Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS) for the financial support granted to Aline Dayse da Silva. The authors are also grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE) for the financial support for this study.

REFERENCES

- Ambardar S, Vakhlu J (2013). Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:2271-2279.
- Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar M, Dayanand A, Lingappa K (2010). Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Braz. J. Microbiol.* 41:173-178.
- Ara I, Bakin MA, Hozzein WN, Kudo T (2013). Population morphological and chemotaxonomical characterization of diverse rare actinomycetes in the mangrove and medicinal plant rhizosphere. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7:1480-1488.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

- Basha NS, Rekha R, Komala M, Ruby S (2009). Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from Marine Actinomycetes by Solidstate and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Trop. J. Pharm. Res.* 8: 353-360.
- Bérty J (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58:1-26.
- Borges WS, Pupo MT (2006). Novel Anthraquinone Derivatives Produced by *Phoma sorghina*, an Endophyte Found in Association with the Medicinal Plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 17:929-934.
- Carro L, Pukall R, Sproer C, Kroppenstedt RM, Trujillo ME (2013). *Micromonospora halotolerans* sp. nov., isolated from the rhizosphere of a *Pisum sativum* plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 103:1245-1254.
- Chow YY, Ting ASY (2014). Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J. Adv. Res. in press.*
- Da Silva LCN, Miranda RCM, Gomes B, Macedo AJ, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS (2013b). Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Ptyrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants. Res.* 7: 2358-2364.
- Da Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS (2013a). Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 27: 1492-1496.
- Davis MF, Peterson AE, Julian KG, Greene WH, Price LB, Nelson K, Whitener CJ, Silbergeld EK (2013). Household Risk Factors for Colonization with Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS one* 8: e54733.
- DeJong PJ (1972). L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 23:1163-1164.
- Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G (2012). New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int. J. Antimicrob.*
- Hoshino Y, Mukai A, Yazawa K, Uno J, Ishikawa J, Ando A, Fukai T, Mukami Y (2004). Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* 57:797-802.
- Ichikawa T, Date M, Ishikura T, Ozaki A (1971). Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiol.* 16: 218-224.
- Kent AD, Triplett EW (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Ann. Rev. Microbiol.* 56:211-236.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S (2009). L-asparaginase production by actinomycetes isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *Int. J. Integr. Biol.* 6:22-26.
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
- Labrou NE, Papageorgiou AC, Avramis VI (2010). Structure-function relationships and clinical applications of L-asparaginases. *Curr. Med. Chem.* 17:2183-2195.
- Li J, Zhao GZ, Chen HH, Wang HB, Qin S, Zhu WY, Xu LH, Jiang CL, Li WJ (2008). Antitumor and antimicrobial activities of endophytic *Streptomyces* from pharmaceutical plants in rain-forest. *Lett. Appl. Microbiol.* 47: 574-580.
- Lin YT, Lin CP, Chaw SM, Whitman WB, Coleman DC, Chiu CY (2010). Bacterial community of verywet and acidic subalpine forest and fire-induced grassland soils. *Plant Soil* 332:417-427.
- Lorenzi H, Matos FJA (2002). Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas, 2 edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Marinho AMR, Filho ER, Moitinho MLR, Santo LS (2005). Biologically Agents 39:96-104.
- Gulati R, Saxena RK, Gupta R (1997). A Rapid Plate Assay for Screening L-asparaginase Producing Micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:23-26.
- Harborne JB (1998). Phytochemical methods: A guide to modern technique of plant analysis, Chapman and Hall, London.
- Hartmann A, Schmid M, van Tuinen D, Berg G (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* 321: 235-257.

- active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. J. Braz. Chem. Soc. 16:280-283.
- Marroni IV, Germani JC (2011). Efficiency of rhizobacteria *Bacillus* spp. in the control of *Macrophomina phaseolina* *in vitro* agent of stem rot of castor bean (*Ricinus communis* L.). Rev. Bras. Agroecol. 6:159-167.
- Moura, S.M.I.; Oliveira, E.M.M.; Santos, A.S. and da Costa G.L. (2004): Production of L-asparaginase by filamentous fungi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99:489-492.
- Nagarethinam S, Nagappa AN, Udupa N, Rao VJ (2012). Microbial L-Asparaginase and its future prospects. Asian J. Med. Res. 1:159-168.
- Pongprayoon U, Baekstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin I (1991). Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta Med. 57:515-518.
- Pongprayoon U, Baekstrom P, Jacobsson U, Lindstrom M, Bohlin I (1992). Antiparasitic activity of beta-damascone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. Planta Med. 58:19-21.
- Qi X, Wang E, Xing M, Zhao W, Chen X (2012). Rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. World J. Biotechnol. 28:2257-2265.
- Raju A, Piggott AM, Conte M, Tnimov Z, Alexandrov K, Capon RJ (2010). Nocardiopsins: New FKBP12-binding Macrolide Polyketides from an Australian marine-derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. Chem. Eur. J. 16:3194-3200.
- Rao KV, Kumar KS, Rao DB, Rao R (2012). Isolation and characterization of antagonistic actinobacteria from mangrove soil. J. Biochem. Technol. 3:361-365.
- Schwab, W.; Fuchs, C. and Huang, F.C. (2013). Transformation of terpenes into fine chemicals. Eur. J. Lipid. Sci. Tech. 115:3-8.
- Sharma OP, Darvra RK (1991). Thin layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. J. Chromatogr. A 567:351-354.
- Shirling EB, Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340.
- Shukla D, Shrivastav VK, Jana AM, Shrivastav A (2014). Exploration of the potential L - asparaginase producing bacteria from the soil of Gwalior (India). Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3: 665-672.
- Sujatha P, Bapi RK, Ramana T (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing Polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Res. 160:119126.
- Wagner H, Bladt S (1996). Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas. Munich: Springer. p. 384.
- Wasuwat S (1970). Extract of *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison. Nature 225: 758-759.
- Xiaolong H, Jiliang C, Jianping L, Haipeng L, Ling Z, Jia L, Kui H (2012). Isolation, identification and bioactivity of rhizosphere actinobacteria from tropical medicinal plants. Biotechnol. Bull. 2:121-127.
- Zhu N, Zhao P, Shen Y (2009). Selective isolation and ansamycin-targeted screenings of commensal actinomycetes from the "maytansinoids-producing" arboreal *Trewia nudiflora*. Curr. Microbiol. 58:87-94.