

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

REGIANE PRISCILA RATTI

Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por
***Streptomyces tubercidicus*, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill**
(Lobeira) do Cerrado de São Carlos-SP

São Carlos

2009

REGIANE PRISCILA RATTI

**Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por
Streptomyces tubercidicus, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill
(Lobeira) do Cerrado de São Carlos-SP**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos

2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R237bp

Ratti, Regiane Priscila.

Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidicus*, endófito isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do cerrado de São Carlos-SP / Regiane Priscila Ratti. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

111 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Microbiologia industrial. 2. *Streptomyces*. 3. Microrganismos endófitos. 4. Antibióticos. 5. Cerrados. I. Título.

CDD: 660.62 (20^a)

REGIANE PRISCILA RATTI

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 11/12/2009

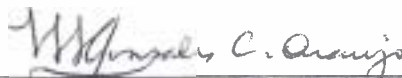
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos – DMP/UFSCar



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Universidade Federal de São Carlos – DEQ/UFSCar



Prof. Dra. Maria Lucia G. C. Araújo
IQ - UNESP



Prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa
EMBRAPA



Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Pós Doutorado – UFSCar/FAPESP

*“ Sem sonhos a vida não tem brilho,
Sem metas o sonho não têm alicerce e
Sem prioridades os sonhos não se tornam reais”*

Augusto Cury

*È com muito orgulho que dedico este trabalho aos meus grandes incentivadores,
Rogério e Diogo, com carinho e amor.*

*Ao meu esposo Rogério por acreditar em mim e pelo amor, incentivo e paciência
demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho.*

Ao meu filho Diogo, minha luz e fonte de inspiração nos momentos mais difíceis.

*A meus pais por me incentivarem a concluir mais esta etapa de minha vida! Á vocês só
tenho que agradecer, pela amizade, educação, alegria e amor que foram dedicados em
todos os dias de minha vida.*

Ao meu sobrinho, Vinícius pelos momentos de descontração e alegria.

A minha família sempre presente em todos os momentos importantes de minha vida.

À Deus, por mais essa oportunidade de aprender, crescer e vencer.

Agradecimentos

A pesquisa científica não é solitária, no decorrer deste trabalho fui orientada, inspirada e apoiada por diversas pessoas, às quais tenho muito que agradecer.

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, mais que orientadora; amiga, companheira, pela amizade, conselhos, sugestões e, principalmente por ter apostado e acreditado em meu potencial e capacidade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, por me conceder a oportunidade de trabalho, pelo apoio e confiança depositados em mim durante o curso.

As minhas queridas amigas de pós-graduação, Ana Candida, Nadja e Naira por todos os momentos felizes, difíceis e de mútua orientação.

Aos colegas do DMP Beto, Cidinha, Carla, Zélia e Ivete pelos momentos de descontração.

Ao técnico Amadeus, pelo apoio e ajuda nas análises de HPLC.

À Dra. Ana Cláudia Granato Malpass pela amizade e ajuda incondicional na purificação e identificação de substâncias bioativas.

As amigas Carol e Simone, pela ajuda na formatação dos gráficos.

Ao Prof. Dr. J. Daniel Dubreil, pela parceria e realização da identificação genotípica do microrganismo.

A FAPESP, pelo financiamento do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4).

A Universidade Federal de São Carlos, juntamente com a coordenação do curso de pós-graduação em Biotecnologia.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMO	16
SUMMARY	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1. Bioma Cerrado	26
3.1.1. Planta do bioma Cerrado: <i>Solanum lycocarpum</i>	28
3.2. Microrganismos endofíticos	30
3.3. Actinomicetos	33
3.4. <i>Streptomyces</i> spp.	34
3.4.1. <i>Streptomyces tubercidicus</i>	37
3.5. Metabólitos secundários bioativos	38
3.6. Separação e purificação de substâncias bioativas	40
3.6.1. Métodos cromatográficos para a identificação de substâncias bioativas	43

3.7.	Considerações gerais sobre os microrganismos indicadores	45
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1.	Amostras	47
4.1.1.	Desinfecção da amostra	47
4.2.	Isolamento e identificação fenotípica	47
4.3.	Identificação genotípica do endofítico	48
4.4.	Microrganismos, meios de cultura e condições de cultivo	49
4.5.	Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana	49
4.6.	Produção do extrato bruto	51
4.7.	Cinética de crescimento de <i>S. tubercidicus</i>	52
4.8.	Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana	53
4.9.	Tratamento térmico, enzimático e de variação no pH	54
4.10.	Estimativa da massa molar das substâncias antimicrobianas	56
4.11.	Avaliação da separação e purificação por HPLC	56
4.12.	Cromatografia em camada delgada (CCD)	57
4.13.	Técnicas cromatográficas	58
4.14.	Determinação estrutural das substâncias bioativas	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1.	Isolamento e identificação de endofítico produtor de substâncias bioativas	61
5.2.	Caracterização do potencial antagônico de <i>S. tubercidicus</i> RND-C	64
5.3.	Cinética de crescimento e quantificação da atividade antimicrobiana do extrato produzido por <i>S. tubercidicus</i> RND-C	71

5.4.	Estabilidade térmica, enzimática e variação no pH do extrato e estimativa da massa molar das substâncias bioativas	75
5.5.	Separação e purificação das moléculas bioativas contidas no extrato produzido por <i>S. tubercidicus</i> RNC-C por HPLC	80
5.6.	Cromatografia em camada delgada (CCD)	83
5.7.	Técnicas cromatográficas	85
5.8.	Determinação estrutural dos compostos bioativos	86
6.	CONCLUSÕES	93
7.	PERPECTIVAS FUTURAS	96
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: caldo Infusão Cérebro-Coração

¹³C: carbono 13

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CIM: Concentração Inibitória mínima

COSY: Correlation spectroscopy

DEQ: Departamento de Engenharia Química

EM: Espectrometria de Massas

G+C: Guanina + Citosina

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

HZ: Hertz

IAL: Instituto Adolfo Lutz

IQ: Instituto de Química

IV: infra-vermelho

MRSA: *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente.

NaCl: Cloreto de Sódio

PPM: partes por milhão

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA r: RNA ribossomal

St: *Streptomyces tubercidicus*

TMS: tetrametilsilano

TSB: caldo Soja Trypticase

UA: Unidades Arbitrárias

UV: ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos microrganismos indicadores46

Tabela 2: Aplicação de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto produzido por *S. tubercidicus* RND-C e efeitos na atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da tubercidina	38
Figura 2: Estrutura química de produtos naturais produzidos por microrganismos endofíticos (Guo <i>et al.</i> , 2008)	42
Figura 3: Representação esquemática do teste da sobrecamada aplicado para avaliar qualitativamente a produção de substâncias bioativas	51
Figura 4: Representação esquemática da produção do extrato bruto a partir do caldo de fermentação de <i>S. tubercidicus</i>	52
Figura 5: Representação esquemática da cinética de crescimento de <i>S. tubercidicus</i> em caldo ISP2 e caldo TSB	53
Figura 6: Representação esquemática para a determinação quantitativa da atividade antimicrobiana do extrato de <i>S. tubercidicus</i> contra microrganismos indicadores	54
Figura 7: Estrutura do Tetrametilsilano (TMS)	60
Figura 8: Características macroscópicas do endofítico isolado de <i>Solanum lycocarpum</i> em ágar ISP2. (A) Frente da placa; (B) Reverso	61
Figura 9: Bioatividade contra <i>C. albicans</i> ATCC 10231	65
Figura 10: Bioatividade contra <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	66
Figura 11: Bioatividade contra <i>E. coli</i> ATCC 25922	67
Figura 12: Bioatividade contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	68

Figura 13: Bioatividade contra <i>Shigella sonnei</i> ATCC 1578	69
Figura 14: Bioatividade contra <i>Serratia marcescens</i> IAL 1475	69
Figura 15: Bioatividade contra <i>S. aureus</i> ATCC 29213	70
Figura 16: Cinética de crescimento de <i>S. tubercidicus</i> RND-C e bioatividade do extrato contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	72
Figura 17: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de <i>S. tubercidicus</i> contra <i>C. albicans</i> , em caldo ISP2(A) e TSB (B)	73
Figura 18: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de <i>S. tubercidicus</i> contra <i>S. aureus</i> em caldo TSB (A) e ISP2 (B)	74
Figura 19: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de <i>S. tubercidicus</i> contra <i>E. coli</i> em caldo TSB (A) e ISP2 (B)	75
Figura 20: Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra <i>E. coli</i>	78
Figura 21: Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra <i>S. aureus</i>	79
Figura 22: Perfil de separação por HPLC do extrato concentrado produzido por <i>S. tubercidicus</i> RND-C	80
Figura 23: Bioatividade contra <i>S. aureus</i> dos picos eluídos e coletados através de HPLC	81
Figura 24: Bioatividade contra <i>E. coli</i> dos picos eluídos e coletados através de HPLC	81

Figura 25: CCD do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i> RND-C, reveladas com diversos reveladores para cromatografia em camada delgada	84
Figura 26: Representação esquemática da separação do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i> RND-C utilizando métodos cromatográficos	86
Figura 27: Espectro de RMN- ¹ H do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i>	87
Figura 28: Expansão do espectro de RMN- ¹ H (5,0-9,5 ppm) do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i>	88
Figura 29: Expansão do espectro de RMN- ¹ H (1,0-5,0 ppm) do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i>	88
Figura 30: Espectro de RMN- ¹ H da fração St. 2-B	89
Figura 31: Espectro de RMN- ¹ H da fração St. 4-B	90
Figura 32: Simulação do espectro de RMN- ¹ H da tubercidina utilizando-se o programa ACD Lab HNMR	91

RESUMO

RATTI, R. P. (2009). **Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidicus*, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos-SP.** 95f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

O aumento da incidência de doenças bacterianas, virais e fúngicas enfatiza a necessidade de investigar a produção microbiana de novos compostos bioativos. Microrganismos endofíticos que colonizam tecidos internos de plantas são relativamente pouco estudados como fontes potenciais de novos produtos naturais para a exploração médica e comercial. O gênero *Streptomyces* tem grande importância industrial devido à capacidade de produzir muitos metabólitos secundários, respondendo por 80% dos antibióticos utilizados atualmente. Com base neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar *Streptomyces* spp., endofítico de plantas do Cerrado, da região de São Carlos, SP, separando e purificando as substâncias bioativas produzidas pelo isolado.

O endofítico *Streptomyces tubercidicus* foi isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) relatando, pela primeira vez, o endofitismo da bactéria isolada a partir de vegetação de Cerrado de São Carlos.

A bioatividade de *S. tubercidicus* foi avaliada e os resultados obtidos ressaltam o potencial antagônico do endofítico isolado contra microrganismos de interesse em Saúde Pública, se constituindo em uma fonte promissora para a pesquisa de novos compostos bioativos.

O extrato bruto fresco produzido por *S. tubercidicus* RND-C apresentou potencial antimicrobiano máximo de 200 UA.mL⁻¹ contra *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após 48 h de cultivo;

As substâncias bioativas produzidas por *S. tubercidicus* foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos, enzimáticos e variação de pH para determinação da natureza dos compostos bioativos.

Após ter sido submetido a tratamento enzimático com amilase e pepsina, o extrato concentrado manteve-se bioativo, sugerindo a natureza lipídica e não-proteinácea das substâncias bioativas. Já o composto ativo contra *E. coli* sugere a presença de substância de natureza glicídica e lipídica, devido a resistência à ação da enzima invertase e lipase, respectivamente, sugerindo que as substâncias contidas no extrato bruto de *S. tubercidicus* RND-C contra *E.coli* pode ser um glicolípido.

O extrato concentrado manteve-se biologicamente ativo quando exposto a baixas (-20 e -80 °C) e elevadas (100 e 121 °C) temperaturas, sugerindo que os compostos bioativos produzidos não são sujeitos a degradação espontânea.

O extrato manteve-se ativo contra *E. coli* em condições de acidez (pH, 2,0 – 5,0) e também apresentou bioatividade em pH 7,0 e 8,0. Em condições de alta alcalinidade (pH 9,0) não detectou-se bioatividade. Já contra *S. aureus*, o extrato manteve-se ativo apenas na faixa de pH 7,0. Em condições de acidez e alcalinidade as substâncias bioativas produzidas por *S. tubercidicus* foram inativadas.

A massa molar dos compostos bioativos produzidos por *S. tubercidicus* RND-C foram estimadas em menor que 3,0 kDa. As moléculas bioativas contidas no extrato concentrado produzidas por *S. tubercidicus* RND-C foram purificadas por separação biomonitorada, sugerindo a presença de duas substâncias diferentes.

A avaliação da separação usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sugere a existência de duas substâncias diferentes produzidas por *S. tubercidicus*, sendo duas ativas contra *S. aureus* e a outra ativa contra *E.coli* e *S. aureus*.

Na separação por cromatografia em coluna pré-empacotada de fase reversa do tipo Sep-Pak, foram obtidas quatro frações (St. 1, St. 2, St. 3 e St. 4). As frações St. 2 e St. 4 apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias e foram purificadas separadamente por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 obtendo as frações St. 2-A; St. 2-B; St. 4-A e St. 4-B. A fração St. 2-B foi ativa contra *S. aureus*. Já a fração St. 4-B foi ativa contra *S. aureus* e *E. coli*. Estes resultados sugerem a presença de duas substâncias diferentes.

Este trabalho pretende contribuir para a compreensão das interações endófitos/plantas além de abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos de plantas. A investigação de novos compostos biologicamente ativos a partir de microrganismos traz importantes contribuições para a descoberta de novas drogas.

Palavras-chave: Endofítico, bioatividade, *Streptomyces* spp., purificação

SUMMARY

RATTI, R. P. (2009). **Bioprospection and purification of bioactives substances produced by *Streptomyces tubercidicus*, endophytic isolated of *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) the Brazilian tropical savannah of São Carlos-SP.** 95f. Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

The need for new and useful compounds to provide assistance and relief in all aspects of human condition is ever-growing. Drug resistance in bacteria, the appearance of life-threatening viruses, and the increase in the incidence of fungal infections in the world's population all underscore our inadequacy to cope with these medical problems. Endophytic microorganisms that colonize internal tissues of plants without causing any negative effects are relatively unstudied as potential sources of novel natural products for medical and commercial exploitation. The Streptomycetes provide nearly 80% of all the world's antibiotics produced.

The aim of this work was to investigate the Brazilian tropical savannah tree *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) in São Carlos, in order to isolate the endophytic microorganisms associated with the plant, separating and purifying the bioactives substances produced by the endophytic microorganism.

The bioactivity of *S. tubercidicus* against pathogenic microorganisms was analyzed. The obtained results point out the antagonistic potential of the endophytic isolated against microorganisms of interest in Public Health.

The brute extract fresh produced by *S. tubercidicus* RND-C it presented antimicrobial potential maximum of 200 UA.mL⁻¹ against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 after 48 h of cultivation;

The bioactive substances produced by *S. tubercidicus* were submitted to different thermal and enzymatic treatments and pH variation to be determined the nature of the bioactive compounds.

After it being submitted to enzymatic treatment with amylase and pepsin, the concentrated extract stayed bioactive, suggesting the lipidic and no-prothein nature of the bioactive substances. Already the active compounds against *E. coli* suggests the presence of a substance of glycidic and lipidic nature, due to resistance to the action of the enzyme invertase and lipase, respectively, suggesting that the substances contained in the brute extract of *S. tubercidicus* RND-C against *E.coli* can be a 'glycolipid.

The concentrated extract stayed active biologically when exposed to lower (-20 and -80 °C) and high (100 and 121 °C) temperatures, suggesting that the bioactive compounds produced are not subject to spontaneous degradation.

The extract stayed active against *E. coli* in acidity conditions (pH, 2,0 - 5,0) and it also presented bioactivity in pH 7,0 and 8,0. In conditions of high alkalinity (pH 9,0) bioactivity was not detected. Already against *S. aureus*, the extract stayed assets in the strip of pH 7,0. In conditions of acidity and alkalinity the bioactive substances produced by *S. tubercidicus* were inactivated.

The molar mass of the substances was esteemed in minor than 3,0KDa. The bioactive molecules contained in the concentrated extract produced by *S. tubercidicus* RNC-C were purified and separated by bio monitoring analyzes, suggesting the presence of two different substances.

The evaluation of the separation using a high performance liquid chromatography (HPLC), suggests the existence of two different substances produced by *S. tubercidicus*, one being active against *S. aureus* and the other one active against *E.coli* and *S. aureus*.

In the separation by using reverse-phase chromatography (Sep-Pak), were obtained four fractions (St. 1, St. 2, St. 3 and St. 4). The fractions St. 2 and St. 4 presented antimicrobial activity against bacteria and they were purified separately by Sephadex LH-20 Gel permeation chromatography obtaining the fractions St. 2-A; St. 2-B; St. 4-A and St. 4-B. The fractions St. 2-B was activity against *S. aureus*. Already the fractions St. 4-B was activity against *S. aureus* and *E. coli*. These results suggest the presence of two different substances.

This work intends to contribute for understanding the interactions of endophytic and plants besides opening new perspectives on the biotechnological potential of the endophitics microorganisms of plants. The investigation of new composed assets biologically starting from microorganisms brings important contributions for the discovery of new drugs.

Keywords: Endophytic, Bioactivity, purification and *Streptomyces* spp.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade da descoberta e utilização de compostos que proporcionem qualidade de vida em todos os aspectos da condição humana é preponderante. O uso indiscriminado de antibióticos pela população e pelos profissionais de saúde vem contribuindo para a seleção de bactérias altamente resistentes. A resistência a drogas e o aumento da incidência de doenças bacterianas, virais e fúngicas enfatiza a necessidade de investigar a produção microbiana de novos compostos bioativos.

Os microrganismos endofíticos foram descritos inicialmente no início do século XIX (BARY, 1866), porém somente nas últimas décadas despertou interesse dos cientistas em decorrência da capacidade de produção de substâncias de interesse biotecnológico (ARAÚJO *et al.*, 2002; STROBEL *et al.*, 1996; STROBEL & LONG, 1998).

Microrganismos endofíticos que colonizam tecidos internos de plantas sem causar efeitos negativos são relativamente pouco estudados como fontes potenciais de novos produtos naturais para a exploração médica e comercial. Algumas plantas endêmicas podem gerar produtos naturais bioativos associados com microrganismos endofíticos produtores das mesmas substâncias (KOBAYASHI & PALUMBO, 2000; ZINNIEL *et al.*, 2002).

Plantas do “cerrado” são espécies relevantes para a pesquisa de microrganismos endofíticos. Em solos do cerrado, a população natural de actinomicetos pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966). O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de mais de 80% dos antibióticos atualmente utilizados (CHALLIS & HOPWOOD, 2003).

As bactérias constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos na natureza. São organismos heterotróficos de grande importância biológica, principalmente devido à diversidade de estruturas químicas que podem ser isoladas em função do metabolismo secundário. Os fungos e os actinomicetos, respondem por mais de 50% dos metabólitos utilizados na indústria farmacêutica, na forma nativa ou como derivado (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003).

Os produtos naturais têm emergido como nova fonte de recursos, permitindo o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de enfermidades humanas (NEWMAN *et al.*, 2003). A investigação de novas estruturas e compostos biologicamente ativos a partir de microrganismos traz importantes contribuições para a descoberta de novas substâncias (LIU *et al.*, 2005).

Um grande número de princípios ativos são conhecidos e obtidos a partir da fermentação microbiana ou associação deste com processos químicos (DONADIO *et al.*, 2002). Dentro deste contexto, os microrganismos são utilizados em muitos processos industriais para a produção de diversos produtos biotecnológicos, como antibióticos, enzimas, vitaminas, polissacarídeos e pigmentos (DEMAIN, 1999).

A pesquisa por novos antibióticos é justificada sob alguns aspectos: i) Em muitos casos as propriedades dos antibióticos naturais não são ótimas para aplicação terapêutica; ii) Não estão disponíveis antibióticos adequados em muitos campos da medicina humana e agricultura; e iii) Desde o início da quimioterapia, o número de patógenos resistentes tem aumentado, problema este que afeta todas as classes de microrganismos, sendo que a única alternativa para este problema consiste na identificação e/ou síntese de novos antibióticos, dotados de estruturas inteiramente novas e efetivas (DESNOTTES, 1996).

2. OBJETIVOS

Com base no exposto, o presente trabalho tem como objetivos:

2.1. Objetivo geral

Realizar o isolamento de *Streptomyces* spp., a partir de plantas do Cerrado de São Carlos, SP, e verificar a bioatividade contra patógenos. Isolar e purificar compostos bioativos utilizando separação biomonitorada e caracterizar os compostos bioativos através de técnicas espectroscópicas.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Isolar *Streptomyces* spp. do interior de tecidos sadios de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira), vegetação de Cerrado da região de São Carlos - SP;
- ✓ Verificar a ocorrência de antagonismo frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes;
- ✓ Realizar a identificação fenotípica e genotípica do microrganismo endofítico selecionado;
- ✓ Avaliar a bioatividade do extrato contra os microrganismos citados anteriormente;
- ✓ Caracterizar o extrato produzido pela bactéria através de tratamentos térmicos, enzimáticos e variação de pH;
- ✓ Isolar e purificar compostos bioativos produzidos pelo endofítico utilizando-se separação biomonitorada;

- ✓ Determinar a estrutura dos compostos bioativos puros através de técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensional) e espectrométrica (Espectrometria de Massas).

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Bioma Cerrado

O Brasil possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado, este é considerado a segunda maior formação vegetal brasileira, ocupando 23% do território nacional (dois milhões de km²), estando localizado basicamente no planalto central e sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (RIBEIRO & WALTER, 1998; PROENÇA *et al.*, 2000).

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas, riquíssima flora com mais de 10000 espécies de plantas, com 4400 endêmicas dessa área (COUTINHO, 1978). A flora do Cerrado é de enorme riqueza, mas somente 1,5% de sua extensão é protegida por lei (KAPLAN *et al.*, 1994).

O Cerrado típico é constituído por árvores relativamente baixas, esparsas, disseminadas em meio a arbustos, subarbustos e uma vegetação baixa constituída, em geral, por gramíneas (GOTTLIEB & BORIN, 1994; GUARIM NETO *et al.*, 1994). Assim, o Cerrado contém basicamente dois estratos: um superior, formado por árvores e arbustos dotados de raízes profundas que lhes permitem atingir o lençol freático, situado entre 15 a 20 metros; e um inferior, composto por um tapete de gramíneas de aspecto rasteiro, com raízes pouco profundas, no qual a intensidade luminosa que as atinge é alta, em relação ao espaçamento (GUARIM NETO, 1996).

A típica vegetação que ocorre no Cerrado possui seus troncos tortuosos, de baixo porte, ramos retorcidos, cascas espessas e folhas grossas (PAGANO *et al.*,

1989; KAPLAN *et al.*, 1994; FRANCO & LÜTTGE, 2002). Os estudos efetuados consideram que a vegetação nativa do Cerrado não apresenta essa característica pela falta de água, pois, ali se encontra uma grande e densa rede hídrica, mas sim, devido a outros fatores edáficos (de solo), como o desequilíbrio no teor de micronutrientes, a exemplo do alumínio (FROST *et al.*, 1986).

Os solos do Cerrado, em sua maioria, têm boa drenagem, baixa fertilidade, alta acidez e teores elevados de Al^{3+} (HARIDASAN, 1992). O clima tropical estacional da região é marcado pelo período de *déficit* hídrico que pode chegar a sete meses (SILVA *et al.*, 2001). A baixa disponibilidade de alguns nutrientes minerais, alta irradiação solar e alta temperatura alteram o balanço de Carbono (C) das plantas e demanda grande investimento em estruturas subterrâneas e estratégias para superar condições estressantes (FRANCO & LÜTTGE, 2002; LARCHER, 2004).

Ainda há carência de estudos voltados para a identificação de plantas úteis do Cerrado, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. O desconhecimento de sua riqueza e possibilidades se agrava, em virtude da estimativa de que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado (RATTER *et al.*, 1997). É preciso considerar que os recursos naturais do cerrado, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações, entre estes, pode-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais.

Nos últimos vinte anos, no Brasil, país com a maior diversidade vegetal do mundo (PLOTKIN, 1991), o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (BRITO & BRITO, 1993). Isso mostra que em um país biologicamente tão rico, mas com ecossistemas tão ameaçados, pesquisas com plantas do Cerrado devem ser incentivadas.

3.1.1. Planta do bioma Cerrado: *Solanum lycocarpum*

Solanum lycocarpum A.St.-Hil. é uma Solanaceae de porte arbustivo amplamente distribuída em todo o cerrado brasileiro, cujo fruto constitui fonte alimentar durante todo o ano para mamíferos deste ambiente (DIETZ 1984, LORENZI 1998, DALPONTE & LIMA 1999), especialmente durante a estação seca quando a disponibilidade de outros frutos é escassa (DALPONTE & LIMA 1999).

Plantas que, ao longo do processo evolutivo, se estabeleceram em ambientes com disponibilidade de água restrita (plantas xeromórficas), desenvolveram adaptações anatômicas e fisiológicas, que integradas, resultaram no sucesso adaptativo às condições hostis que tais ambientes oferecem (EAMES & MCDANIELS 1947, FAHN & CUTLER 1992). Essas características em conjunto indicam que *S. lycocarpum* é uma espécie adaptada ao cerrado, ambiente onde as condições estressantes, principalmente em relação à falta de água, são observadas em determinadas épocas do ano (ELIAS *et al.*, 2003).

A espécie vegetal *Solanum lycocarpum* St. Hil. atinge até 4 m de altura, sendo muito ramosa e revestida de densos pêlos estrelados, ramos cilíndricos, lenhosos, fistulosos, um pouco tortuosos e folhas pecioladas (CORRÊA, 1984; CORRÊA *et al.*, 2000). As plantas podem apresentar de 40 a 100 frutos, cuja massa por fruto pode variar de 400 a 900g, com época de colheita de julho a janeiro (SILVA *et al.*, 1994). Acredita-se que seu nome popular se deve ao fato de se constituir um alimento preferido do lobo-guará. A “fruta de lobo”, quando verde, é constituída de polpa bastante firme de coloração branca, mas quando o fruto se torna totalmente maduro, a polpa passa a apresentar uma coloração amarelada, macia, adocicada e extremamente aromática, o que levou os sertanejos a se interessarem pelo fruto (OLIVEIRA JR, 2002).

Fatores bióticos e abióticos de estresse durante o crescimento das plantas promovem aumentos de produção de compostos secundários (CHAVES & ESCUDERO, 1999; INDERJIT & WEINER, 2001). A elevação na produção destes, induzida pelo estresse, também afeta a extensão e duração do efeito alelopático.

A produção de compostos secundários pode ser aumentada por diversos fatores ambientais como estresse hídrico, deficiência de nutrientes e temperatura (EINHELLIG, 1996) situações comumente encontradas no Cerrado.

Solanum lycocarpum St. A. Hil. é popularmente conhecida como “lobeira” (PROENÇA *et al.*, 2000) e é amplamente usada como planta medicinal, principalmente o “polvilho” de seu fruto no controle de diabetes e obesidade além de reduzir os níveis de colesterol e outras enfermidades (DALLI’AGNO & POSER, 2000). Evidências alelopáticas no gênero *Solanum* já foram identificadas para várias espécies (AIRES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2004) e alguns componentes já foram descritos, tais como flavonas, flavonóides e seus glicosídeos (SILVA *et al.*, 2003), bem como alguns alcalóides como Solamargina e Solasodina (GUNTNER *et al.*, 1997).

Os alcalóides presentes nas plantas deste gênero, tais como a solanina, solamargina e solasodina (MOTIDOME *et al.*, 1970), poderiam atuar como aleloquímicos, além de fenóis que são comumente encontrados nas folhas (GÜNTNER *et al.*, 1997).

Maitan (1998) isolou sete actinomicetos endofíticos da planta medicinal *Solanum lycocarpum*, no estado de Goiás. Alguns actinomicetos apresentaram atividade antibiótica e foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microlunatus* e *Luteococcus*.

O interesse por estudar *S. lycocarpum* se deve ao amplo emprego desta planta nas práticas caseiras da medicina popular e de sua abundância no bioma Cerrado. Além de poucos dados na literatura sobre a pesquisa de microrganismos endofíticos produtores de substâncias bioativas envolvendo esta espécie.

3.2. Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre endofíticos e patógenos de plantas. Definidos como assintomáticos permaneceram esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma série de evidências, começaram a chamar atenção. Nesta época verificou-se que microrganismos endofíticos possuíam propriedades de interesse, como por exemplo, conferir proteção à planta contra insetos e pragas (MELO & AZEVEDO, 1998). Atualmente sabe-se que os endofíticos podem produzir metabólitos secundários com potencial aplicação biotecnológica (STROBEL & DAISY, 2003).

Por definição, endofíticos são microrganismos, principalmente fungos e bactérias, que vivem no interior de plantas habitando de modo geral as partes aéreas como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano ao hospedeiro (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992; STROBEL & DAISY, 2003; WILSON, 1995). Os endofíticos também podem ser encontrados em raízes de plantas, uma das principais portas de entrada do microrganismo (MELO & AZEVEDO, 1998).

Muitos endofíticos são provenientes da rizosfera, entretanto alguns podem ser transmitidos através de semente. As bactérias endofíticas podem promover o crescimento da planta hospedeira e também agir como agentes biocontroladores. Os

endofíticos também podem ser beneficiados pela planta, pois as condições ambientais podem favorecer a produção de metabólitos secundários bioativos e esses podem ser aplicados comercialmente (RYAN *et al.*, 2008).

Bactérias endofíticas podem ser isoladas de superfícies de tecidos de plantas desinfetados ou extraídos do tecido interno da planta (HALLMANN *et al.*, 1997). Kobayashi & Palumbo (2000) realizaram uma revisão mostrando o isolamento de bactérias endofíticas Gram-positivas e Gram-negativas de vários tipos de tecidos de plantas. Dados apresentados nesta revisão mostraram que uma única espécie de planta pode albergar diferentes tipos de bactérias.

A presença de bactérias endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para muitas espécies cultivadas em diferentes estágios de crescimento. As comunidades endofíticas variam espacialmente na planta ou podem ser dependentes da interação com outras bactérias endofíticas ou patogênicas (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997).

Os endofíticos apresentam capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente, habitando de forma ativa o hospedeiro (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997; SALERMO *et al.*, 2000). A disseminação do microrganismo pode ocorrer por vários caminhos e o mais comum é através de feridas e aberturas naturais presentes na raiz (MELO & AZEVEDO, 1998). Também pode ocorrer entrada ativa de endofíticos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração dos mesmos (SPRENT & JAMES, 1995).

Provavelmente todas as plantas apresentam em seu interior microrganismos endofíticos. Alguns microrganismos são mais freqüentes em determinado tipo de planta, designados dominantes, em contraposição a outros mais raros, chamados de secundários (PEREIRA *et al.*, 1996).

Os principais ou mais freqüentes grupos de microrganismos endofíticos têm sido descritos em vários trabalhos nos últimos dez anos. Os fungos predominam em número de trabalhos citados na literatura científica, seguidos de bactérias, entre estes os actinomicetos (PETRINI, 1991; FISHER *et al.*, 1992; CHANWAYY, 1996; AZEVEDO, 1998; STROBEL, 2003).

As bactérias mais freqüentes nas plantas são pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Xanthomonas* (HALLMANN *et al.*, 1997).

Araújo *et al.* (2002) isolaram microrganismos endofíticos de plantas de *citrus*, observando maior abundância de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium* spp.

Adachi *et al.* (2002) isolaram dois microrganismos endofíticos de batata doce e estes foram identificados como *Pantoea agglomerans* e *Sphingomonas sanguinis*.

Ratti *et al.* (2008) isolaram endofítico de *Prunus* spp, e este apresentou atividade antagônica contra *Staphylococcus coagulase* positiva.

Endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas têm sido alvo de estudos referentes à pesquisa de novos fármacos. Pilleggi (2006) avaliou a atividade antimicrobiana do fungo *Phomopsis* spp., isolado endofiticamente de folhas de *Aspidosperma tomentosum*, o endofítico foi capaz de inibir bactérias, leveduras e fungos filamentosos, mostrando o potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

A exploração de nichos ecológicos, como por exemplo, as diversas espécies de plantas presentes no Cerrado podem fornecer o conhecimento da diversidade

microbiana endofítica e a produção de metabólitos secundários de importância biotecnológica.

3.3. Actinomicetos

Os actinomicetos compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C (KORN-WENDISCH & KUTZNER, 1992). Neste grupo estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, como: *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, que podem se reproduzir por fissão binária; *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, denominados actinomicetos nocardioformes. No outro extremo, está o grupo esporoactinomicetos, que engloba *Streptomyces*, *Actinoplanes* e *Microbispora* (KORN-WENDISCH & KUTZNER, 1992).

Actinomicetos são bactérias conhecidas por constituir grande parte da microbiota da rizosfera. Estes microrganismos são abundantes em solos, principalmente naqueles em que o teor de matéria orgânica é abundante (HEISEY & PUTNAM, 1986). Eles são importantes produtores de compostos bioativos e são também encontrados como endofíticos (AZEVEDO *et al.*, 2000).

As populações de actinomicetos na comunidade bacteriana dos solos tropicais têm recebido atenção especial, pelo seu potencial na produção de antibióticos, visto que 85% dos antibióticos conhecidos são produzidos por estes microrganismos (GOTTLIEB, 1973). Em solos de cerrado com vegetação nativa, a ocorrência das populações de actinomicetos na comunidade microbiana pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (COELHO & DROZDOWICZ, 1978).

Entre as bactérias, a ordem Actinomycetales é a única fonte de compostos bioativos comercialmente importante. Nos últimos anos, mais de 6000 antibióticos foram descobertos, e destes, 80% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*. Além dos antibióticos de uso clínico, veterinário e agroquímico, outros metabólitos secundários – enzimas, imunomoduladores, inibidores de enzimas, são produzidos também por *Streptomyces* spp. (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966; CHALLIS & HOPWOOD, 2003).

Araújo *et al.* (2000) obtiveram 53 endófitos do grupo dos actinomicetos a partir de folhas e raízes de milho. Os autores testaram a atividade antimicrobiana dos isolados contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, e constataram inibição frente a todos os microrganismos ensaiados, com exceção de *C. albicans*, que foi inibida apenas pelos isolados de *Streptomyces* spp.

Bascom-Slack *et al.* (2009), isolaram 14 espécies de actinomicetos de 300 amostras de plantas coletadas em uma floresta no Peru. Todos os isolados apresentaram atividade inibitória contra bactérias e fungos patogênicos.

Pela característica de crescimento lento, os actinomicetos foram negligenciados durante muito tempo, mas atualmente tem atraído a atenção por serem, reconhecidamente, os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial. A busca de outros metabólitos bioativos requer a descoberta de novos microrganismos, abundantes nos diversos ecossistemas e que necessitam primeiramente da exploração de diferentes nichos ecológicos.

3.4. *Streptomyces* spp.

O gênero *Streptomyces* pertence à família *Streptomycetaceae*, a qual engloba espécies pertencentes ao gênero *Actinomycetales*. Estes microrganismos podem ser

separados de acordo com as propriedades químicas e morfológicas apresentadas (GOODFELLOW & CROSS, 1984; WILLIAMS *et al.*, 1989; KORN-WENDISCH & KUTZNER, 1992).

Kozo (1995) classificou as espécies de *Streptomyces* em diferentes grupos de acordo com a análise da sequência dos aminoácidos N-terminal da proteína ribossomal AT-L30. O grupo I foi caracterizado por espécies que apresentam o aminoácido arginina (Arg) na posição 2; grupo II, cepas que contêm Arg e Valina (Val) na posição 2 e 5; grupo III, cepas contendo Glicina (Gln) e Val na posição 2 e 8; e grupo IV, cepas contendo Gln na posição 2. Este autor estabeleceu um dendograma mostrando seis “clusters”. O primeiro “cluster”, contendo os membros do grupo I e II com várias outras espécies; o segundo “cluster” contendo os membros dos grupos III e IV, bem como outras espécies; o terceiro “cluster” contendo *Streptomyces ramulosus* e *S. ochraceiscleroticus*; o quarto “cluster” contendo somente *S. rimosus*; o quinto “cluster” contendo *S. aurantiacus* e *S. tubercidicus*; e o sexto “cluster” contendo *S. albus* e *S. sulphureus*.

O gênero *Streptomyces* é conhecido pela capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos como antibióticos. (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966). Os compostos bioativos tem sido usados como imunossuppressores (FK-506, rapamycina, ascomycina), como compostos anticancerígenos (bleomycina, dactiomycina, doxorobicina, saturosporina), no tratamento de diabetes (acarbose) e como agentes antihelmínticos (ivermectina, milbemycina). Cerca de 12000 metabólitos secundários foram descritos em 1995, 55% são produzidos por estreptomicetos e 11% por outros actinomicetos (DEMAIN, 1999).

As bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* tem grande importância industrial, pela variada produção de metabólitos secundários, respondendo por 70%

dos antibióticos conhecidos. A produção de antibióticos está diretamente relacionada ao ciclo celular, que sofre influência de fatores, como variações nutricionais e fatores de regulação. A produção de antibiótico é cepa específica e não espécie específica (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966; DEMAIN, 1999; AZEVEDO *et al.*, 2000).

Streptomyces spp. está amplamente distribuído na natureza e seu nicho primário é o solo. Porém, ele pode também ocorrer em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição. No solo, a população de *Streptomyces* usualmente atinge 10^4 a 10^7 UFC/g de solo seco, ocorrendo principalmente na forma de esporos, mas também pode ser encontrado na forma de hifa vegetativa. Segundo Iwai & Takahashi (1992), 80% dos actinomicetos do solo ocorrem na camada mais superficial do solo (0-10 cm), diminuindo progressivamente com a profundidade.

Streptomyces possuem um alto conteúdo de G+C no genoma, entre 68 e 73%, observado também em seus plasmídeos e actinofagos (HUBBER *et al.*, 1987). Seu genoma pode variar de 6500 a 8200 Kb (KIESER *et al.*, 1992). Foi descoberto que o cromossomo de muitas espécies de *Streptomyces* são moléculas de DNA lineares, com extremos terminais invertidos repetidos e proteínas ligadas covalentemente ao extremo terminal 5' do cromossomo, onde podem atuar como *primers* da replicação (LIN *et al.*, 2009). Têm sido detectados plasmídeos naturais, circulares e lineares, com tamanhos entre 2 e 500 Kb, responsáveis por funções como conjugação, resistência e biossíntese de alguns antibióticos (GRAVIUS *et al.*, 1994; KINASHI, 1998).

Li *et al.* (2008) avaliaram a atividade antitumoral e antimicrobiana de actinomicetos isolados endofiticamente de plantas com propriedades medicinais provenientes da China. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que 31,7% dos *Streptomyces* endofíticos isolados apresentaram citotoxicidade contra células tumorais, 65,9% contra *Escherichia coli*, 24,4% contra *Staphylococcus aureus*, 31,7%

contra *Staphylococcus epidermidis*, 12,2% contra *Candida albicans*, e nenhum dos isolados apresentaram atividade contra *Klebsiella pneumoniae*.

No trabalho realizado por Albertton *et al.* (2006) a cepa de *Streptomyces viridosporus* T7A apresentou efeito inibitório sobre as bactérias patogênicas Gram-positivas, como *S. aureus*, porém não sobre bactérias Gram-negativas como *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Escherichia coli*.

Vieira *et al.* (2002) analisaram a atividade antimicrobiana de cepas de *Streptomyces* spp. isoladas do solo da Paraíba contra alguns microrganismos. Os microrganismos sensíveis foram *S. aureus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *T. rubrum* e *A. flavus*, enquanto *E. coli*, *P. aeruginosa* e *M. canis*, foram resistentes a todos os *Streptomyces* testados. Os halos de inibição variaram de 10 a 30 mm, com média de 20 mm de diâmetro.

3.4.1. *Streptomyces tubercidicus*

S. tubercidicus é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia e não apresenta mobilidade. Este microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1961 por Nakamura. Esta bactéria foi isolada do solo na cidade de Mobarra Chiba, Japão, e produz um antibiótico conhecido como tubercidina (NAKAMURA, 1961).

A tubercidina é um antibiótico ribonucleosídeo púrico que prontamente substitui a adenosina no sistema biológico, mas a sua incorporação ao DNA e ao RNA tem um efeito inibitório no metabolismo desses ácidos nucleicos.

Yoo *et al.* (1984) extraíram a tubercidina produzida por *S. tubercidicus* e detectaram a molécula através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os

autores utilizaram como solvente água e metanol (20/80) e a coluna C18 (Waters Associates). O composto foi detectado num comprimento de onda de 254nm.

Por ser um composto bioativo, a tubercidina foi patenteada pela empresa *Sigma aldrich* (patente 93747). Trabalhos realizados mostraram que a tubercidina apresenta atividade antitrypanosoma, antiviral, antifúngica e citotóxica. Este composto inibe vários processos metabólicos, incluindo a síntese do RNA, a síntese de ácidos nucléicos e síntese de proteínas (ANZAI *et al.*, 1957; NAKAMURA, 1961).

A tubercidina também é conhecida como 7-Deazaadenosine e sua fórmula molecular é $C_{11}H_{14}N_4O_4$. O peso molecular é de 266.25 Da. A estrutura molecular da tubercidina está ilustrada na Figura 1.

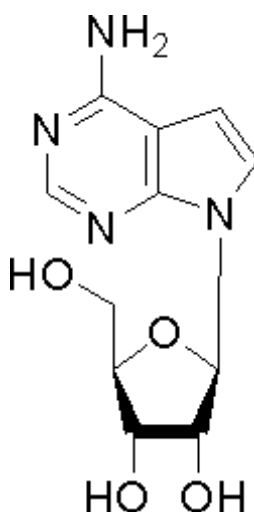


Figura 1: Estrutura molecular da tubercidina.

3.5. Metabólitos secundários bioativos

Aproximadamente 70% das substâncias bioativas conhecidas são sintetizadas por actinomicetos onde o gênero *Streptomyces* se caracteriza como excelente fonte de metabólitos secundários com uma ampla diversidade estrutural incluindo substâncias

antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antitumorais, moléculas com propriedades imunossupressoras, anti-hipertensivas e anti-hipercolesterolêmicas (FAULKNER, 2000; BUTLER, 2004; GULLO *et al.*, 2006; CHIN *et al.*, 2006).

De acordo com Williams *et al.* (1989) os metabólitos secundários produzidos por alguns microrganismos não são essenciais para o desenvolvimento e tendem a ser espécie-específicos. Apresentam uma grande variedade estrutural e de atividades biológicas, sendo formados através de rotas biossintéticas particulares, a partir de produtos do metabolismo primário.

Os metabólitos secundários são produzidos sob condições de “stress”, geralmente após a fase exponencial de crescimento, onde a maior parte dos nutrientes já foi degradada (DEMAIN, 1999).

Algumas espécies de plantas e microrganismos apresentam um metabolismo diferenciado capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com características bioquímicas e metabolismo próprio (SANTOS, 1999).

A biossíntese dos metabólitos secundários ainda não está totalmente esclarecida, mas sugere-se que se trata de um metabolismo alternativo como forma de defesa do organismo a um ambiente hostil, de caráter evolutivo e como uma estratégia de sobrevivência (WILLIAMS *et al.*, 1989) e a síntese dos metabólitos depende de precursores e de um sistema enzimático adequado.

A regulação do metabolismo secundário está relacionada às fontes de carbono e nitrogênio e pode ainda controlar a biossíntese de aminoácidos (GRIFFIN, 1994). A

biossíntese de metabólitos secundários ocorre após o crescimento celular completo, numa fase que é denominada idiofase (FINDELSTEIN & BALL, 1992). Além disso, a produção dos compostos bioativos, através do metabolismo, está inter-relacionada com as condições de cultura, como período de incubação, pH do meio, nutrientes e temperatura. Tais parâmetros podem ser modificados para a otimização do processo de fermentação (ELIAS *et al.*, 2006), visando aumento de produtividade.

3.6. Separação e purificação de substâncias bioativas

A partir do século XVIII quando os químicos “despertaram” para a ciência moderna, as verdadeiras propriedades dos extratos obtidos da natureza geraram grande euforia, fazendo com que eles começassem a separar, purificar e finalmente analisar os componentes produzidos pelas células.

Métodos de separação foram desenvolvidos e aprimorados como os diferentes métodos cromatográficos (CCD, HPLC), cromatografia em papel, eletroforese, troca iônica, entre outros (TAJIKI *et al.*, 1997). A elucidação estrutural que era feita por degradação dos compostos em fragmentos menores de estruturas conhecidas, combinada à análise elementar, passou a ser mais precisa com o desenvolvimento das técnicas espectroscópicas, como o UV, IV, RMN, EM, entre outras, ocasionando um grande avanço na descoberta de novas substâncias ativas (KRIEGER & HOOK, 1991; ONAKA *et al.*, 2001; STEFANI & NASCIMENTO, 2007).

A obtenção de um produto puro a partir do extrato bruto pode ser um processo longo e caro. Podem-se obter quantidades mínimas do produto desejado e o mesmo pode ser instável, sendo importante que se utilizem diferentes técnicas de isolamento (LU *et al.*, 2009).

Geralmente os primeiros passos de uma purificação combinam alta capacidade com baixo poder de resolução e as técnicas clássicas incluem extração seletiva, filtração, centrifugação e cromatografia simples em colunas abertas (WARD, 1991; BACHIEGA *et al.*, 2005; STEFANI & NASCIMENTO, 2007).

Pode-se obter o extrato bruto a partir de caldo de cultivo. De acordo com Charcosset (2006), a utilização de membranas de microfiltração (0,45 a 0,22 µm) permite a remoção de células presentes no caldo. Uma das vantagens da utilização desta técnica de separação é a obtenção de altos valores de recuperação com elevados rendimentos. O processo de ultrafiltração é muito utilizado para a extração de macromoléculas que interferem nos processos subsequentes, incluindo adsorção e precipitação (CHARCOSSET, 2006).

Estudos recentes destacam o isolamento de vários compostos isolados de endofíticos, incluindo alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróis, dentre outros (GUO *et al.*, 2008). Até o momento os tipos de produtos naturais isolados de microrganismos endofíticos são antibióticos, anticancerígenos, enzimas e imunossupressores (GUO *et al.*, 2008).

Antibióticos são definidos como produtos naturais orgânicos de baixo peso molecular, produzidos por microrganismos, que são ativos em baixas concentrações contra microrganismos patogênicos. Estes compostos são os mais isolados de endofíticos. Os compostos 1-3 (Figura 2), foram obtidos de cultura de *Colletotrichum* sp., isolado de *Artemisia annua* e apresentaram atividade contra fungos e bactéria patogênicas humanas como também contra fungo patogênico de planta. Suas estruturas foram elucidadas através de uma combinação de métodos espectroscópicos (IV, RMN-¹H, ¹³C, EM) (LU *et al.*, 2000).

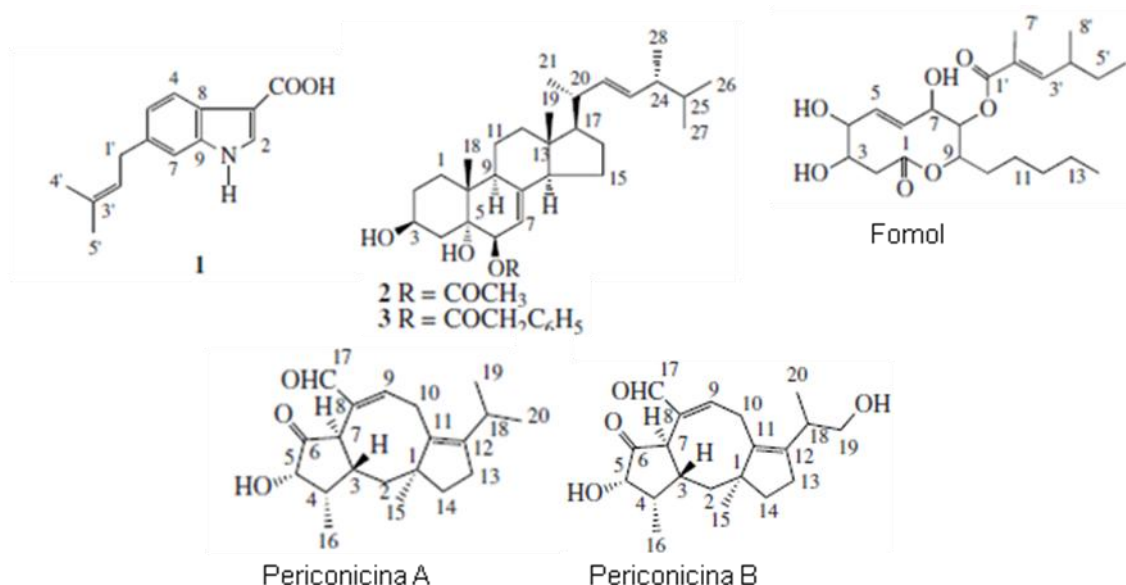


Figura 2: Estrutura química de Produtos Naturais produzidos por microrganismos endofíticos (GUO *et al.*, 2008).

A coronamicina, um peptídeo com atividade antibiótica, foi isolada de *Streptomyces* spp. verticilado. Esse endofítico foi obtido da planta *Monstera* spp., conhecido popularmente como “trepadeira”. A coronamicina é ativa contra fungos patogênicos, tais como *Cryptococcus neoformans*, além de apresentar atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* com IC₅₀ de 9,0 ng.ml⁻¹ (EZRA *et al.*, 2004).

Outro antibiótico conhecido como fomol (Figura 2) foi isolado da fermentação de um fungo da espécie *Phomopsis* obtido a partir da planta medicinal *Erythrina crista*. Este antibiótico é uma lactona policetídic e sua estrutura também foi elucidada através da combinação de métodos espectroscópicos (WEBER *et al.*, 2004).

As periconicinas A e B (Figura 2), dois diterpenos, foram isolados por fracionamento biomonitorado do fungo endofítico *Periconia* spp, obtido a partir de amostras de *Taxus cuspidata*, e apresentam atividade antibacteriana (KIM *et al.*, 2004). Recentemente, dois antibióticos, as pirrocidinas A e B, foram isoladas a partir da fermentação de sementes amarelas de *Acremonium zeae* (NRRL 13540), e

apresentaram importante atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* (WICKLOW *et al.*, 2005).

Castillo *et al.* (2006) estudando culturas de *Streptomyces* NRRL 30562 que apresentaram atividade antibiótica de amplo espectro, encontraram uma fração cujo espectro de Massas mostrava que os compostos apresentavam massas idênticas, mas tempos de retenção diferentes em HPLC.

3.6.1. Métodos cromatográficos para a identificação de substâncias bioativas

Entre os métodos modernos de separação e purificação de substâncias, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como por exemplo, a espectrometria de massas (CAZES, 2001).

A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em íntimo contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS *et al.*, 1990).

Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos. Os processos físicos são de desorção-adsorção (partição) e são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares, incluindo a formação

de pontes de hidrogênio. Quando se trata de um sólido, como por exemplo, a sílica, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a fase móvel, devido à presença de grupos ativos na superfície (COLLINS *et al.*, 1990; CAZES, 2001).

A desorção do soluto implica na volta deste à fase móvel. Este é o mecanismo mais comumente encontrado em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em Cromatografia Gás-Sólido (CGS), Cromatografia Líquido-Sólido (CLS) e Cromatografia Supercrítica com fase estacionária sólida (CSS).

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Esta técnica passou a ser amplamente utilizada a partir da década de 60 e hoje é praticamente indispensável em qualquer laboratório que envolva análises de substâncias orgânicas.

O grande desenvolvimento desta técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, tais como: fácil compreensão e execução, separações em curto espaço de tempo, reprodutibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra a ser analisada (CAZES, 2001).

Outra técnica que vem sendo amplamente utilizada para separação de substâncias é a cromatografia em coluna. Nesta técnica são usadas colunas “recheadas” com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida.

A cromatografia em coluna vem sendo utilizada principalmente para fins preparativos, devendo ser monitorada por cromatografia em camada delgada. A fase

móvel, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada (COLLINS *et al.*, 1990).

Com base no exposto, este trabalho visa desenvolver uma metodologia eficiente de separação, purificação e identificação de substâncias bioativas, contribuindo para o avanço da biotecnologia de produção de moléculas de interesse clínico sintetizadas por estreptomicetos endofíticos.

3.7. Considerações gerais sobre os microrganismos indicadores

Para o teste de bioatividade foram selecionados microrganismos que acarretam problemas à Saúde Pública, sendo que alguns estão envolvidos em surtos de infecções hospitalares. Na tabela 1, estão apresentadas algumas características dos microrganismos utilizados nesta pesquisa.

Tabela 1. Características dos microrganismos indicadores

Microrganismo	Características gerais	Doenças
<i>Candida albicans</i>	Fungos leveduriformes; Gram-positivos; microbiota normal	Candidíase; Infecções hospitalares (IH)
<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos Gram-positivos; anaeróbios facultativos; trato gastrointestinal	Endocardite; Bacteremia; Sepses neonatal; Infecção trato urinário
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos Gram-negativos; aeróbios e anaeróbios facultativos, trato gastrointestinal	Gastroenterite; Infecção urinária, Meningite; Septicemia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos Gram-negativos, aeróbios	Infecções hospitalares
<i>Shigella sonnei</i>	Bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos	Desintéria bacilar (diarréia hemorrágica)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram-positivos, agrupados em “cachos de uva”, aeróbios e anaeróbios facultativos; Microbiota normal	Infecções hospitalares; Osteomielites; Furúnculos, Abscessos; Artrite e infecção alimentar
<i>Serratia marcescens</i>	Bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos	Infecções hospitalares; Infecções do trato urinário; Infecções respiratórias

Fonte: Modificado de Koneman *et al*, 2001.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

As plantas foram coletadas em área com vegetação de Cerrado, localizado no *Campus* da UFSCar, na cidade de São Carlos - SP. Folhas e caules de *Solanum lycocarpum*, St. Hill popularmente conhecida como “lobeira”, foram coletadas, armazenadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas ao Laboratório de Ensino, Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia (Universidade Federal de São Carlos) para processamento, em um intervalo máximo de duas horas. Esta planta foi selecionada neste trabalho por ser uma espécie amplamente distribuída no bioma Cerrado e devido a suas propriedades medicinais.

4.1.1. Desinfecção da amostra

Para eliminação de microrganismos epifíticos foi realizada esterilização da superfície, com imersão seqüencial das folhas e caules em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 6 minutos, etanol 70% por 30 segundos e, finalmente, enxágüe em água destilada esterilizada (PEREIRA *et al.*, 1996).

4.2. Isolamento e identificação fenotípica

Após a desinfecção da amostra, 25g de folhas e caules foram homogeneizados com 225 mL de solução salina 0,85% e triturados no liquidificador. A solução obtida foi filtrada e a partir daí foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-7} em NaCl

0,85%. Alíquotas de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo ágar ISP2 e incubadas a 28°C por 10 dias.

As colônias típicas de *Streptomyces* spp. foram purificadas em ágar ISP2 inclinado, incubados a 28°C por 10 dias para posterior identificação. As colônias selecionadas foram avaliadas quanto às características morfológicas e culturais e identificadas bioquimicamente por meio de teste de catalase, coloração de Gram e produção de melanina.

4.3. Identificação genotípica do endofítico

O endofítico selecionado foi identificado pelo método de amplificação e seqüenciamento do RNA ribossomal 16S. A extração de DNA genômico total do isolado bacteriano foi realizada utilizando-se o mini kit QIAamp DNA (Qiagen). Para tanto, 5 µL da amostra contendo DNA modelo foi adicionada a 15 µL da mistura reacional (Qiagen Fast Cycling PCR Kit). Os *primers* universais utilizados foram 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') e 519R (5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'), homólogos às extremidades conservadas do gene RNAr 16S de bactérias.

Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando o kit comercial QIAquick PCR purification (Qiagen). Ambos os produtos de PCR purificados foram seqüenciados usando os mesmos *primers* com métodos de seqüenciamento padronizados (FMV Sequencing Laboratory, Bigdye terminator version 3.1, sequencer: AB1 310; Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

As seqüências parciais do gene RNAr 16S obtidas foram comparadas no NCBI GenBank usando-se como ferramenta o BLAST (National Center for Biotechnology

Information - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Estas análises foram realizadas pelo INRS – Institut Armand Frappier (Laval, Quebec, Canadá).

4.4. Microrganismos, Meios de Cultura e Condições de Cultivo

O meio de cultura utilizado para crescimento do microrganismo endofítico foi ISP2 (extrato de levedura 2,5 g; extrato de malte 10,0 g; glicose 6,0 g; ágar 20 g; água destilada 1000 mL; pH 7,0). O microrganismo endofítico foi submetido a crescimento em *slants* (48 - 72 horas / 28 °C) e armazenado a 4 °C. Para estocagem em longo prazo, foram preparados criotubos com cultura overnight adicionada de 15 % de glicerol e armazenados a -80 °C.

Além do meio ISP2 utilizou-se o caldo Trypticase Soja (TSB, Difco). O microrganismo endofítico foi submetido a crescimento neste caldo para reativação, verificação da cinética de crescimento bacteriano e produção de substâncias bioativas.

Foram utilizados como microrganismos indicadores cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Estes microrganismos foram cultivados em caldo Infusão cérebro-coração (BHI, Difco), incubados a 37 °C e estocadas em *slants* a 4 °C.

4.5. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana

O teste da sobrecamada (*Overlay Assay*) foi utilizado como bioensaio qualitativo para detectar a produção de compostos bioativos (ROSADO & SELDIN, 1993). Para

tanto, o microrganismo endofítico isolado foi diluído em solução salina (0,85%), 20 µL da diluição foram adicionadas simetricamente sob a superfície de placas contendo meio de cultura ISP2. As placas foram incubadas à 28° C por 10 dias. Após o crescimento, os microrganismos isolados foram inativados com clorofórmio; para tanto, 1 mL de clorofórmio foi adicionado a superfície interna da tampa de cada placa por 20 minutos. As placas foram deixadas semi-abertas para eliminação dos resíduos de clorofórmio por 30 minutos.

Como microrganismos indicadores foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Estas cepas foram reativadas em um tubo contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco). Após 24 h de incubação, 200 µL das culturas previamente reativadas foram adicionadas em um tubo contendo 10 mL de BHI semi-sólido. O tubo foi agitado e a solução depositada na superfície da placa contendo o microrganismo previamente inativado com clorofórmio. As placas foram incubadas a 37° C por 48 h para verificar a ocorrência de halos de inibição (Figura 3).

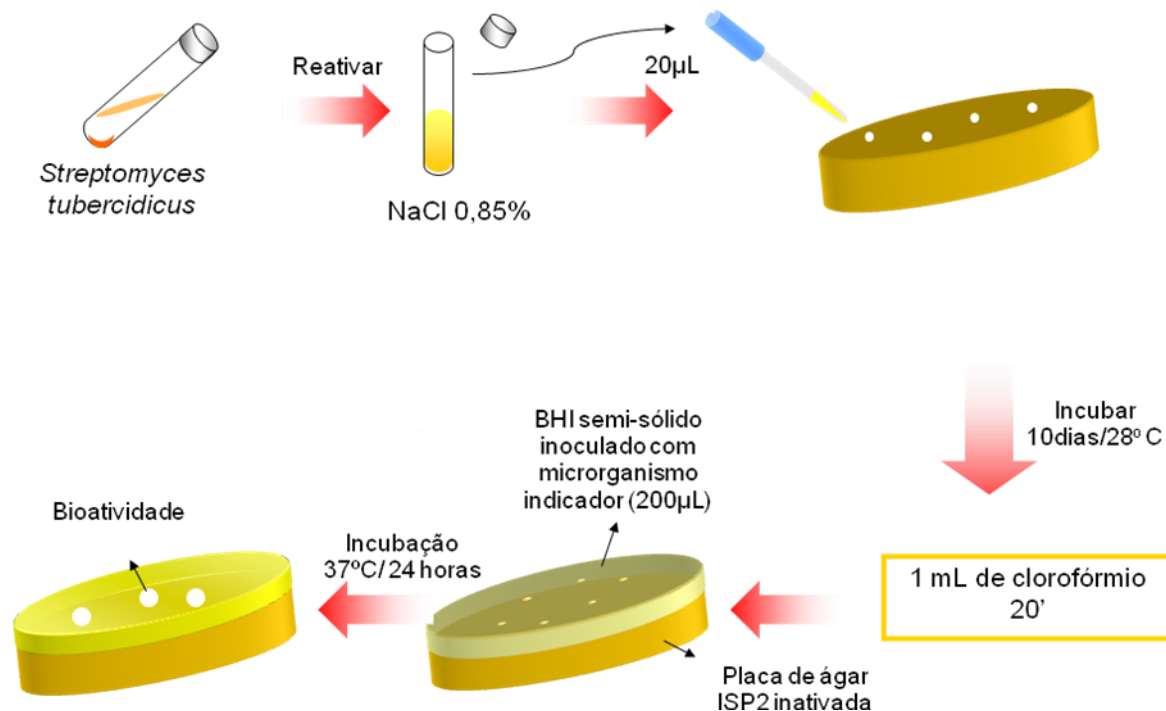


Figura 3: Representação esquemática do teste da sobrecamada aplicado para avaliar qualitativamente a produção de substâncias bioativas.

4.6. Produção do extrato bruto

A cepa de *Streptomyces tubercidicus* armazenada a -20° C em criotubo contendo glicerol a 10% como agente crioprotetor foi utilizada neste ensaio.

O meio de inóculo foi preparado transferindo-se 2 mL da solução de *S. tubercidius* contida no criotubo a -20° C, em um Erlenmeyer com capacidade de 200 mL contendo 20 mL de caldo soja tripticase (TSB, Difco). O cultivo foi mantido *overnight* a 28° C e 250 rpm em *shaker* orbital (Tecnal, TE-424).

Para a produção de substâncias bioativas, 20 mL do meio de inóculo foram transferidos para o meio de produção (Erlenmeyer de 1 L com 200 mL de caldo ISP2). O meio de produção foi incubado a 28° C e 250 rpm (GERHARDT *et al.*, 1994).

Após atingir a fase estacionária de crescimento, a cultura foi centrifugada (10000 rpm /15 minutos) (Eppendorf 5810R) e o sobrenadante *cell-free* foi filtrado em membrana de 0,22 μm para obtenção do extrato bruto (Figura 4).

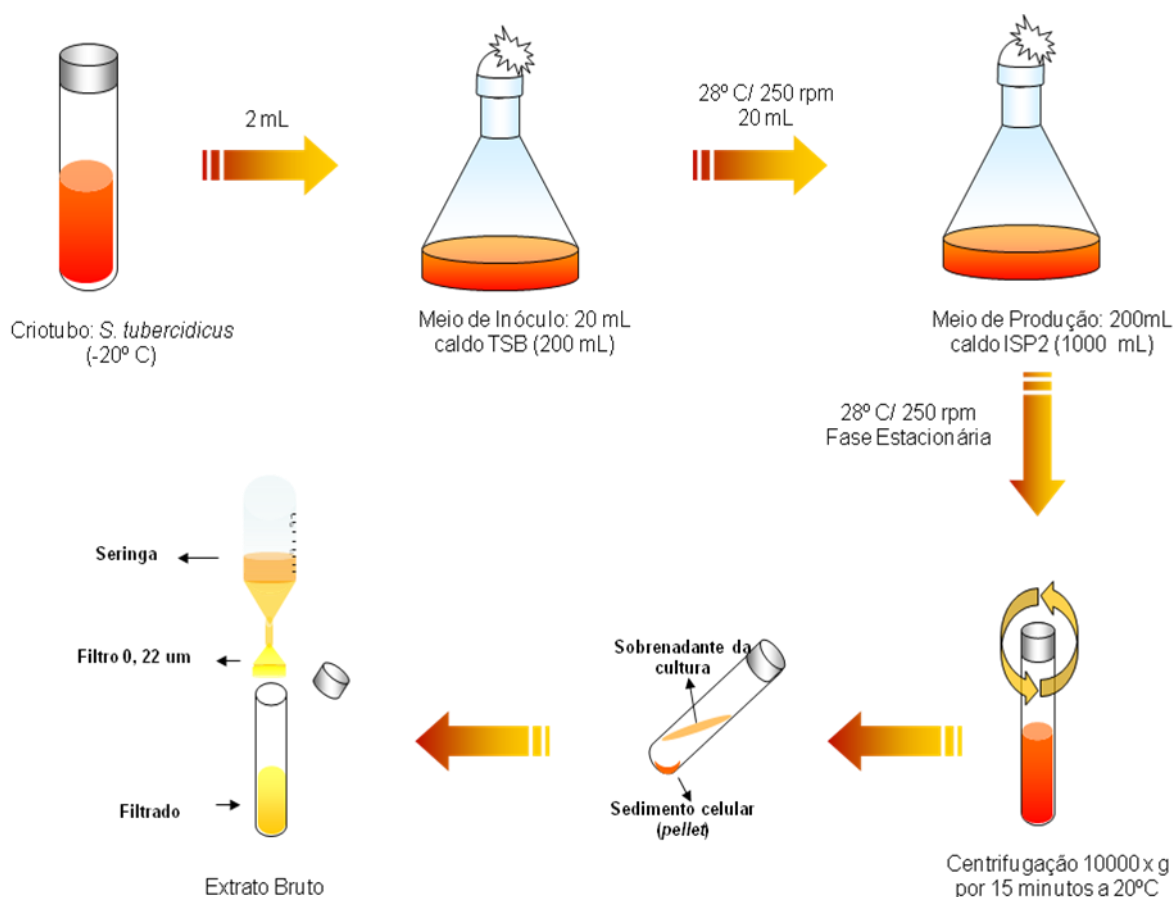


Figura 4: Representação esquemática da produção do extrato bruto a partir do caldo de fermentação de *S. tubercidicus*.

4.7. Cinética de crescimento de *S. tubercidicus*

S. tubercidicus foi cultivado em dois meios de cultura diferentes, caldo TSB e ISP2. Para a quantificação do microrganismo presente nos meios de produção, alíquotas foram retiradas diariamente do caldo e submetidas a diluições decimais seriadas em NaCl 0,85%. 100 μL de cada diluição foram semeados com o auxílio de

uma alça de Drigalski esterilizada em placas de Petri contendo ágar ISP2. As placas foram incubadas a 28°C / 48 - 72 h. As quantificações foram conduzidas em triplicata e os resultados expressos em log UFC. mL⁻¹ (Figura 5).

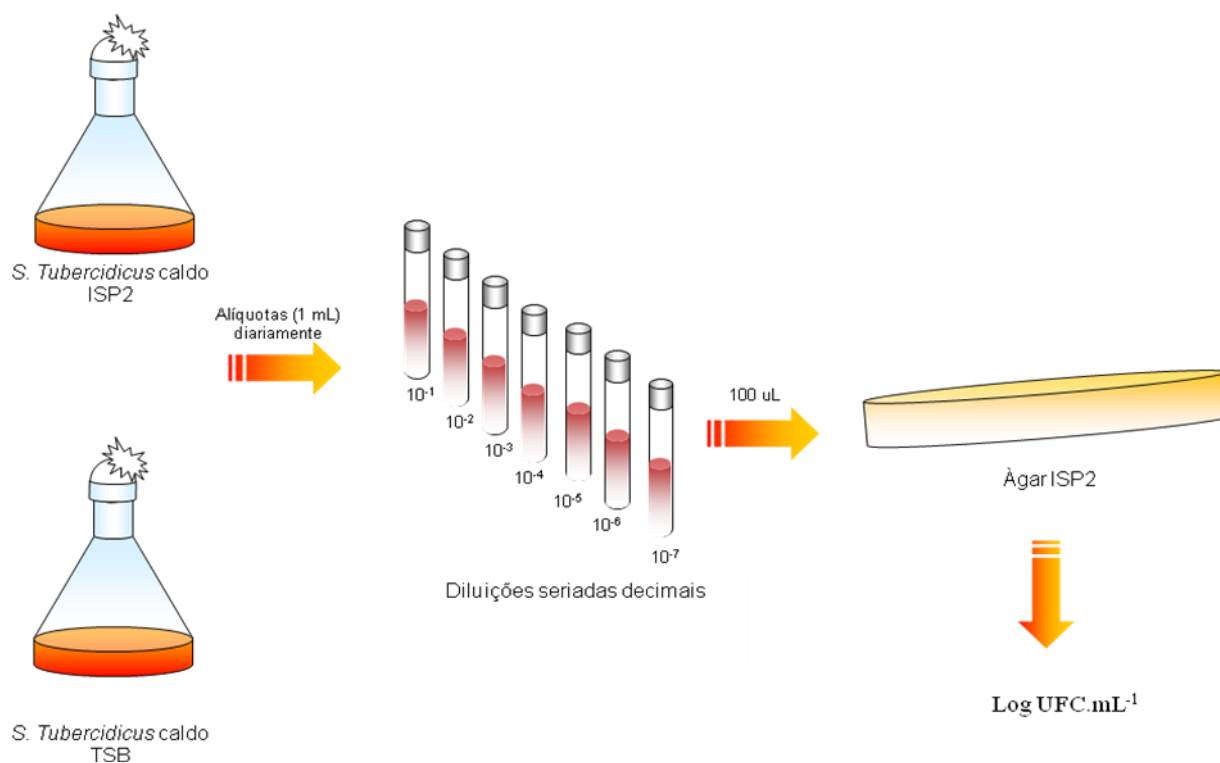


Figura 5: Representação esquemática da cinética de crescimento de *S. tuberculosis* em caldo ISP2 e caldo TSB

4.8. Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana

A quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar (*well diffusion assay*). Alíquotas de 100 µL do extrato bruto fresco, diluído duplo-serialmente, foram depositadas em orifícios de placas contendo ágar Müeller-Hinton, previamente semeadas com microrganismos indicadores (10⁶ células / mL). Neste ensaio foram utilizados como microrganismos indicadores as cepas de *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. As placas foram

incubadas a 37 °C *overnight* para verificação de halos de inibição. Os bioensaios foram avaliados em triplicata (Figura 6).

A atividade antimicrobiana foi expressa em Unidades Arbitrárias por mL (UA.mL⁻¹), sendo esta definida como a recíproca entre a diluição mais alta que apresente zona de inibição e que corresponda a 1 mL de sobrenadante não-diluído.

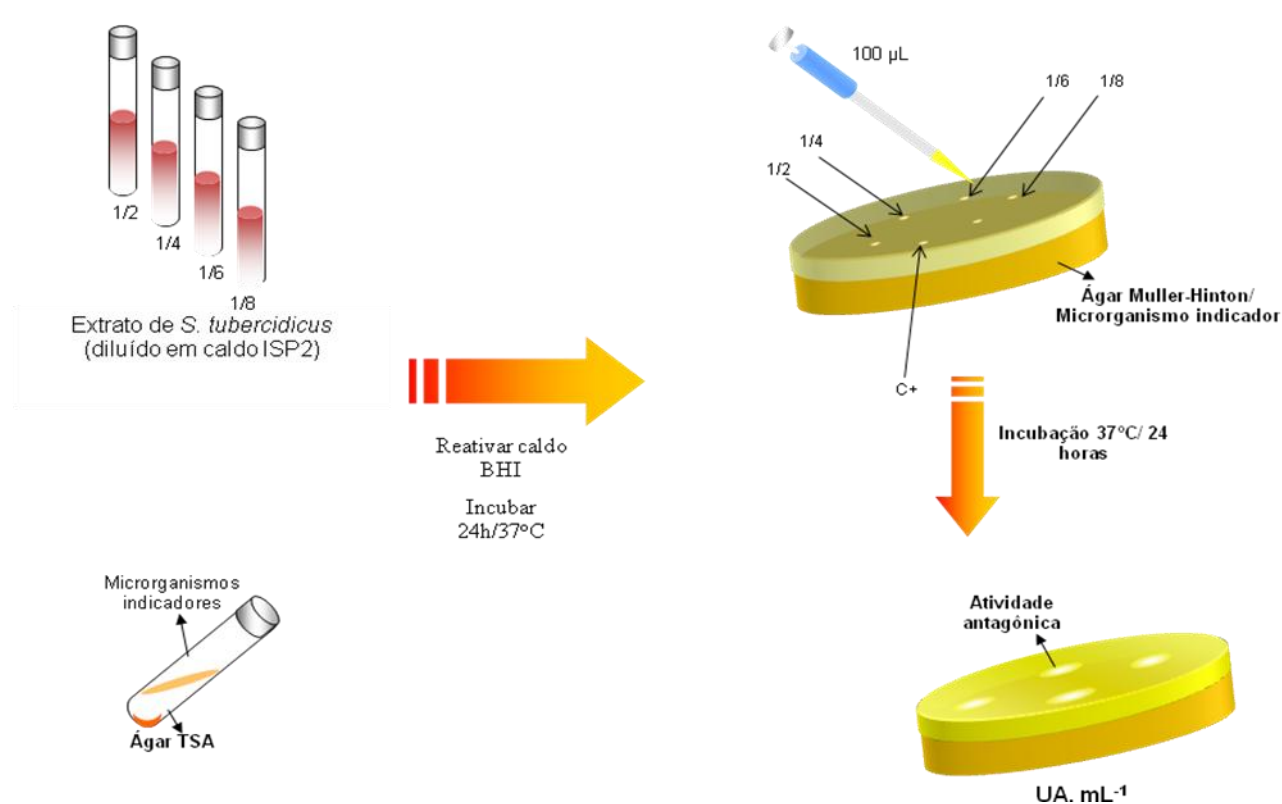


Figura 6: Representação esquemática para a determinação quantitativa da atividade antimicrobiana do extrato de *S. tuberculosis* contra microrganismos indicadores.

4.9. Tratamentos térmico, enzimático e de variação no pH

O extrato bruto obtido (descrito no item 4.6) foi submetido a diferentes testes para avaliar a natureza do composto bioativo produzido pelo endófito. Para realização

destes testes, 10 mL do extrato bruto foi concentrado numa proporção de 10 vezes em *speed-vac*.

A estabilidade térmica do extrato bruto foi analisada, para a realização deste teste, o extrato foi ressuspenso em 1 mL de água destilada esterilizada e exposto a diferentes tempos e temperaturas. As soluções foram incubadas a -80° C, -20° C, 28° C, 37° C por 6 horas; a 60° C, 70° C e 100° C por 1 hora e a 121° C por 15 minutos.

O extrato bruto concentrado foi submetido a tratamento com diferentes enzimas degradativas. Para tanto, o extrato foi ressuspenso em 1 mL de água destilada esterilizada, com o auxílio de ponteiros esterilizados foi retirado 100 µL do extrato e colocados em *ependorfs* contendo 1 mg das enzimas: Amilase (Sigma), Invertase (Novozymes), Pepsina (J. T. Baker), Lipase tipo II (Sigma) e Lipase tipo VII (Sigma). As preparações foram incubadas a 37 °C por 1 hora.

A bioatividade do extrato concentrado foi verificada em diferentes valores de pH. Alíquotas de 100 µL foram ajustadas em pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 com adição de HCl ou NaOH. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas; após este período o pH das alíquotas foi ajustado (pH 6,0) antes do bioensaio.

O bioensaio de difusão em ágar foi utilizado para determinar a atividade antimicrobiana antes e após os tratamentos descritos anteriormente. Após a incubação foi realizado o bioensaio, utilizando como microrganismos indicadores as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10. Estimativa da massa molar das substâncias antimicrobianas

O extrato bruto concentrado foi submetido à ultrafiltração em membranas Millipore® de 3,0; 3,5 e 10 kDa para estimar o peso molecular das substâncias bioativas. Para tanto, o extrato bruto concentrado em *speed-vac* (Thermo RVT 4104) foi ressuspenso em 1 mL de água destilada esterilizada, 200 µL do extrato foram adicionados em cada *eppendorf* e centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, as frações filtradas foram coletadas e submetidas ao bioensaio, utilizando como microrganismos indicadores as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213. Os testes foram realizados em triplicata.

4.11. Avaliação da separação e purificação por HPLC

Os extratos brutos obtidos foram analisados em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). As análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas utilizando-se coluna analítica de fase reversa (µBondpack C-18, 39 x 30 mm, 10 µm) em um cromatógrafo líquido (Waters 996), equipado com injetor e coletor automáticos e detector de arranjo de diodos (Waters 717).

A fase móvel consistiu em: água 95% Milli Q, pH 7.5 (solução A) e metanol 5%, pH 7,5 (solução B), com um fluxo de 2,0 mL.min⁻¹. O volume injetado foi de 200 µL. As amostras foram eluídas na coluna sob o gradiente linear de 0 a 100%, durante 60 minutos. A eluição foi monitorada em comprimento de onda de 200 a 500 nm e os picos, coletados manualmente, foram liofilizados em *speed-vac* e ressuspenso em 100 µL de água destilada, para os ensaios de atividade antimicrobiana. Os microrganismos indicadores utilizados foram *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213.

4.12. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Estas análises foram realizadas em colaboração com o Departamento de Engenharia Química (DEQ) – UFSCar. Foram realizados ensaios por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para avaliar a natureza dos compostos contidos nos extratos brutos de *S. tubercidicus* RND-C. Técnicas cromatográficas foram aplicadas para separar os compostos bioativos e avaliar o perfil de separação e purificação dos compostos.

Para tanto, foram utilizados diferentes sistemas eluentes e reveladores. Os sistemas eluentes testados foram misturas polares de solventes orgânicos e os reveladores utilizados foram:

- Luz ultravioleta (UV) Spectroline Model ENF- 260 C/F nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm;
- Solução de 0,2g de ninidrina em 100 mL de etanol P.A. (Merck), aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa à 120°C, utilizada na identificação de aminoácidos e amins primárias;
- Solução de 20% de ácido fosfomolibidico em etanol P.A. (Merck), aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa à 120°C, com capacidade para detectar substâncias redutoras, lipídeos e esteróides;
- Solução do reagente Dragendorff, para identificação qualitativa de alcalóides e/ou substâncias com heteroátomos contendo pares de elétrons livre (literatura Merck- Darmstadt).

4.13. Técnicas Cromatográficas

As técnicas cromatográficas empregadas na separação do extrato bruto de *Streptomyces tubercidicus* RND-C foram específicas para extratos polares.

Inicialmente, o extrato foi separado por cromatografia em coluna pré-empacotada de fase reversa do tipo Sep-Pak, onde a fase estacionária é derivatizada com grupos octadecila (C₁₈). Como fase móvel foi utilizado um sistema eluente composto por água e metanol. As frações obtidas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e antifúngica através de bioensaios.

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram purificadas separadamente por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 utilizando eluição isocrática com metanol. As frações obtidas a partir desta purificação também foram submetidas a bioensaios.

4.14. Determinação Estrutural das Substâncias Bioativas

Para a determinação estrutural das substâncias bioativas foram realizadas análises de RMN no Departamento de Química (DQ)- UFSCar.

A determinação estrutural dos compostos puros está sendo realizada com base nos espectros mono e bidimensionais de RMN. Foram determinados os espectros de RMN-¹H do extrato bruto de *S. tubercidicus* e os espectros RMN-¹H dos compostos puros.

A caracterização dos compostos bioativos puros deverá ser feita através da aquisição dos espectros de RMN mono e bidimensionais. Os dados obtidos através dos espectros de RMN ¹H e de ¹³C determinam o número exato de hidrogênios e carbonos presentes na molécula. Por sua vez, os espectros de RMN bidimensionais ¹H- ¹³C e ¹H-¹H correlacionam informações sobre os átomos da molécula. Desta forma, as

estruturas poderão ser elucidadas com base em informações obtidas conjuntamente por estas técnicas.

Aliada à essas técnicas deverá ser utilizada a espectrometria de Massas que fornece a fórmula estrutural da molécula, colaborando para a elucidação estrutural dos compostos isolados.

Para a aquisição dos espectros é necessário solubilizar a amostra em um solvente deuterado, isto é, sem hidrogênio para que este não interfira no experimento. Os solventes deuterados mais utilizados são: água deuterada (D_2O), metanol deuterado (CD_3OD) e dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$).

O núcleo de certos elementos e isótopos comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Têm esta propriedade alguns núcleos como o do hidrogênio comum e o do carbono 13 (^{13}C). Quando se coloca um composto contendo átomos de 1H ou de ^{13}C num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia num processo denominado *ressonância magnética*. A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantizada e produz um espectro característico. Esta absorção não ocorre a menos que a frequência da radiação e a intensidade do campo magnético tenham valores bem definidos. Os espectrômetros permitem medir a absorção de energia pelos núcleos de 1H e de ^{13}C , além do núcleo de alguns outros elementos.

Os deslocamentos químicos são medidos na escala horizontal do espectro, em Hertz (Hz), e normalmente expressos em partes por milhão (ppm). Quanto mais para esquerda se localiza o sinal, menor é o campo magnético sobre o núcleo. Estas posições são medidas em relação à absorção dos prótons de um composto de referência. Em geral, o composto de referência utilizado é o tetrametilsilano (TMS).

Neste contexto, a amostra cujo espectro esteja sendo levantado adiciona-se pequena quantidade de TMS e toma-se o sinal dos 12 prótons equivalentes do TMS como o ponto zero da escala (Figura 7).

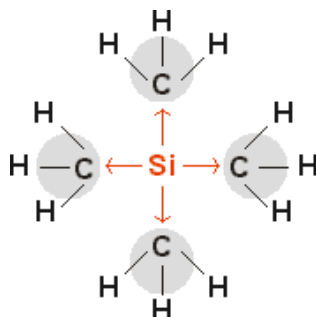


Figura 7: Estrutura do tetrametilsilano (TMS).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e identificação de endofítico produtor de substâncias bioativas

Foram coletadas folhas e caules da planta *Solanum lycocarpum*, St. Hill popularmente conhecida como “lobeira”, em área com vegetação de Cerrado na cidade de São Carlos–SP. Foi isolado um microrganismo com características fenotípicas similares às das bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* spp.

O endofítico foi submetido a estudos taxonômicos por meio de caracterização cultural, morfológica e fisiológica e apresentou positividade para a catalase e presença de pigmento melanóide.

As características culturais das colônias foram observadas após 20 dias de incubação em ágar ISP2 (Figura 8). As colônias apresentaram aspecto aveludado, forma circular, cor da frente cinza e o verso bege com centro marrom, borda clara, crescimento lento, margem irregular e odor característico de terra molhada devido à produção de geosmina produzida por bactérias pertencentes a este gênero.

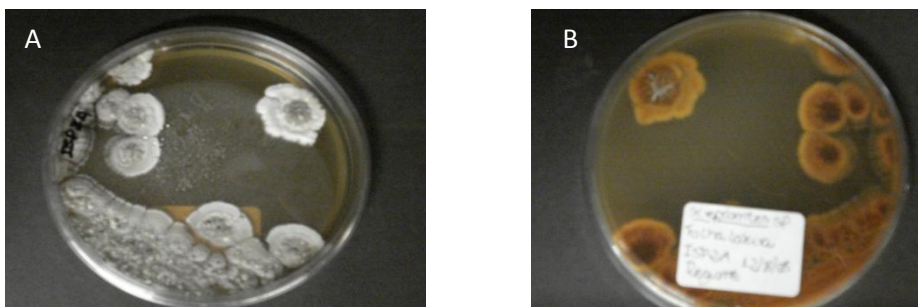


Figura 8: Características macroscópicas do endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* em ágar ISP2. (A) Frente da placa; (B) Reverso.

O microrganismo endofítico foi identificado genotipicamente, com 99% de homologia, como *Streptomyces tubercidicus* e foi denominado *Streptomyces tubercidicus* RND-C.

Há poucos trabalhos na literatura sobre o isolamento de *S. tubercidicus* e apenas quatro foram publicados em relação à produção de substâncias bioativas produzidas por esta bactéria (SMULSON & SUHADOLNIK, 1967; SHIMOTSU *et al.*, 1980; YOO *et al.*, 1998; KÓNYA *et al.*, 2008) Este estudo relata pela primeira vez o endofitismo da bactéria *S. tubercidicus* isolada da planta *Solanum lycocarpum* a partir da vegetação do Cerrado.

Assumpção e colaboradores (2009) isolaram e identificaram microrganismos endofíticos de sementes de soja avaliando o potencial dos isolados para aplicação biotecnológica. Estes autores conseguiram isolar 12 microrganismos, incluindo: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Streptomyces* e *Tsukamurella*. Os resultados obtidos por estes autores ressaltam que *Streptomyces* spp, pode ser encontrado como endofítico e isolado de uma variedade de plantas.

Os resultados obtidos por Assumpção *et al.* (2009) corroboram com os encontrados por Li *et al.* (2008) que isolaram actinomicetos endofíticos de plantas com propriedades medicinais na China. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que 31,7% dos *Streptomyces* endofíticos isolados apresentaram citotoxicidade contra células tumorais, 65,9% contra *Escherichia coli*, 24,4% contra *Staphylococcus aureus*, 31,7% contra *Staphylococcus epidermidis*, 12,2% contra *Candida albicans*, e nenhum dos isolados apresentaram atividade contra *Klebsiella pneumoniae*.

Souza *et al.* (2008), isolaram uma cepa de *Streptomyces* do solo do Cerrado brasileiro, esta cepa foi identificada através da análise da sequência do RNAr 16S e identificada como uma nova espécie que foi designada *Streptomyces lunalinharesii*. Os resultados obtidos por estes autores corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho mostrando que o bioma Cerrado alberga uma variedade de microrganismos com aplicação biotecnológica.

Wu e colaboradores (2009) isolaram 115 actinomicetos endofíticos de três plantas com propriedades medicinais: *Annonaceae squamosal*, *Camptotheca acuminata* e *Taxus chinensis*. O teste de bioatividade aplicado indicou que 72,4% dos actinomicetos isolados apresentaram bioatividade contra vários microrganismos indicadores analisados. Na identificação fenogenotípica, os resultados obtidos mostraram predomínio do gênero *Streptomyces* spp. Esses resultados indicam que actinomicetos endofíticos associados com plantas são uma fonte promissora para a pesquisa de novas drogas.

Verma *et al.* (2009) isolaram 55 actinomicetos endofíticos de vinte plantas, 60% dos isolados apresentaram atividade contra fungos e bactérias patogênicas. O gênero dominante foi *Streptomyces* totalizando 49,09% dos isolados.

Maitan (1998) isolou sete actinomicetos endofíticos da planta medicinal *Solanum lycocarpum*, no estado de Goiás. Alguns actinomicetos apresentaram atividade antibiótica e foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microlunatus* e *Luteococcus*. Na literatura foi encontrado somente este artigo relacionando o isolamento de endofítico a partir da planta *Solanum lycocarpum*. Estes resultados ressaltam que pesquisas com esta planta do Cerrado devem ser incentivadas, para a busca de novas substâncias com propriedades medicinais.

Liu *et al.* (2007) analisaram a atividade antimicrobiana e antitumoral de 155 actinomicetos isolados de plantas com propriedades medicinais na cidade de Xishuangbanna, localizada na China. Os resultados obtidos mostraram que 42% dos isolados exibiram antagonismo contra cepas patogênicas e 54,5% mostraram uma boa inibição das células tumorais. Esses resultados são superiores aos do actinomicetos isolados do solo, indicando um grande potencial para a exploração do isolamento de endofíticos. Foram isolados 6 compostos, ambos apresentaram atividade antimicrobiana e antitumoral. Estes compostos foram separados e purificados utilizando adsorção em resina, coluna de sílica gel e cromatografia sephadex. Baseado nos resultados obtidos por estes autores podemos perceber que os actinomicetos endofíticos são considerados fontes promissoras para o isolamento de novos compostos bioativos.

5.2. Caracterização do potencial antagônico de *S. tubercidicus* RND-C

A bioatividade de *S. tubercidicus* contra microrganismos patogênicos foi analisada em nosso trabalho, não havendo relatos na literatura sobre a ação antimicrobiana de *S. tubercidicus*. Os resultados obtidos demonstraram que a cepa de *S. tubercidicus* foi capaz de inibir cepas de bactérias e fungos envolvidos em surtos de infecções hospitalares.

A produção de metabólitos secundários produzidos pela cepa de *S. tubercidicus* foi demonstrada utilizando-se como microrganismos indicadores as cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Shigella sonnei* ATCC 1578 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

S. tubercidicus apresentou atividade contra *C. albicans*, e os resultados dos halos de inibição (19,4 mm) produzidos estão representados na Figura 9. *C. albicans* é um fungo leveduriforme que causa infecções principalmente em indivíduos imunocomprometidos (NUCCI *et al.*, 2002).



Figura 9: Bioatividade contra *C. albicans* ATCC 10231.

Nas últimas quatro décadas, numerosos relatos documentaram aumento da taxa de infecções por fungos em pacientes hospitalizados. Na grande maioria dos casos, o agente causal pertencia ao gênero *Candida*, seguido de *Aspergillus*, *Fusarium* e outros em menor frequência (GAMIS *et al.*, 1991; MORRISON *et al.*, 1994; NUCCI *et al.*, 2002).

Jain & Jain (2007) analisaram a bioatividade da cepa de *Streptomyces purpeofuscus* CM 1261. Os resultados obtidos demonstraram forte atividade antagônica contra quatro fungos causadores de doenças humanas, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton* spp. Estes resultados

ressaltam o potencial antagonico de *Streptomyces tubercidicus* contra *C. albicans*, obtido em nosso trabalho.

No presente trabalho *S. tubercidicus* produziu metabólitos secundários capazes de inibir a bactéria *Enterococcus faecalis* apresentando halos médios de inibição de 16 mm (Figura 10). O gênero *Enterococcus* é potencialmente causador de infecções, tais como endocardite e bacteremia, atingindo principalmente pacientes debilitados (CONDÉ-ESTEVEZ *et al.*, 2009).



Figura 10: Bioatividade contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Murakami *et al.* (2008) isolaram uma espécie de *Streptomyces* que apresentou bioatividade contra *S. aureus* e *E. faecalis* como CIM de 100 e 50 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os encontrados em nossa pesquisa, onde a cepa de *S. tubercidicus* também apresentou atividade antimicrobiana contra os dois microrganismos.

S. tubercidicus também apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli*, com halos médios de 40 mm (Figura 11). Esta bactéria é a principal responsável por

causar infecções do trato urinário e apresentam resistência aos antibióticos usados no tratamento, como as cefalosporinas de terceira geração (BORG *et al.*, 2009). Com base nestes resultados, a nossa pesquisa foi de grande valor na bioprospecção de novos compostos capazes de inibir *E. coli*.

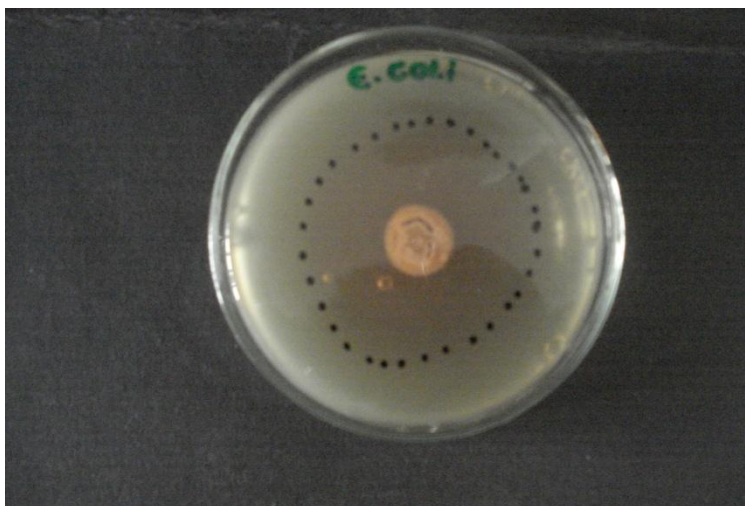


Figura 11: Bioatividade contra *E. coli* ATCC 25922.

A cepa de *S. tubercidicus* não foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* (Figura 12). *P. aeruginosa* é uma bactéria causadora de infecção hospitalar e atinge principalmente indivíduos transplantados (ZEGLEN *et al.*, 2009). Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho, plantas do Cerrado devem ser exploradas para isolar microrganismos capazes de inibir *P. aeruginosa*.



Figura 12: Bioatividade contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

No trabalho realizado por Albertton *et al.* (2006) a cepa de *Streptomyces viridosporus* T7A apresentou efeito inibitório sobre as cepas patogênicas Gram-positivas (*S. aureus*) porém não sobre bactérias Gram-negativas (*Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli*). Estes resultados são parcialmente semelhantes aos nossos, onde a cepa de *S. tubercidicus* não inibiu a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, mas foi capaz de inibir *E. coli*.

Xie *et al.* (2008) avaliaram a capacidade de dois novos antibióticos, sansamicina B e C, isolados de *Streptomyces* spp em inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos mostraram que os dois antibióticos exibiram atividade inibitória contra o microrganismo indicador, com concentração inibitória mínima (CIM) de 8,0 e 1,6 ug/mL, respectivamente.

A cepa de *S. tubercidicus* isolada em nosso trabalho também foi bioativa contra *Shigella sonnei* ATCC 1578 com halos médios de 18 mm (Figura 13) e *Serratia marcescens* IAL 1475 apresentando halos de 42 mm (Figura 14).



Figura 13: Bioatividade contra *Shigella sonnei* ATCC 1578.



Figura 14: Bioatividade contra *Serratia marcescens* IAL 1475.

Shigella spp é uma das principais causadoras de diarreia em crianças, sendo que *S. sonnei* é o sorogrupo mais envolvido (KARACAN *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Karacan *et al.* (2007), foi analisado a resistência da bactéria a vários antibióticos. Os resultados obtidos por estes autores mostraram que 90,4% são resistentes ao trimetropim-sulfametaxol. Nossos resultados corroboram na pesquisa de novas drogas para o tratamento de casos de disenteria ocasionado por *S. sonnei*.

Chowdhury *et al.* (2005) analisaram o efeito antimicrobiano de dois antibióticos JF-A e JF-B isolados de *Streptomyces* spp. As CIM(s)de JF-A e JFB- foram de 64 e 128 µg/mL contra *S. sonnei*, respectivamente.

Serratia marcescens é uma bactéria envolvida em surtos de infecções nosocomiais, sendo a principal responsável por casos de sepse neonatal em unidades de terapia intensiva (UTI) (ARSLAN *et al.*, 2009). O tratamento é difícil podendo levar muitos pacientes a óbito, por isso a pesquisa de novas drogas devem ser incentivadas.

Na figura 15 pode-se observar que o endofítico *S. tubercidicus* inibiu o crescimento de *S. aureus*, apresentado bioatividade de 35 mm. *S. aureus* é uma bactéria envolvida em surtos de infecção nosocomial e apresenta resistência aos antibióticos de amplo espectro de ação, como à metilina (RATTI & SOUSA, 2009).



Figura 15: Bioatividade contra *S. aureus* ATCC 29213.

No trabalho realizado por Malik *et al.* (2008), a proteína secretada por *Streptomyces fulvissimus* apresentou uma atividade significativa contra as cepas de *S. aureus* metilina-resistentes. Estes resultados são similares aos obtidos no presente trabalho, onde os metabólitos secundários produzidos pela cepa de *S. tubercidicus* inibiram a cepa de *S. aureus* apresentando grandes halos de 35 mm (Figura 15).

No trabalho realizado por Vieira *et al.* (2002), as cepas de *Streptomyces* spp. isoladas do solo da Paraíba demonstraram atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos testados. Os microrganismos sensíveis foram *S. aureus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *T. rubrum* e *A. flavus*, enquanto *E. coli*, *P. aeruginosa* e *M. canis*, foram resistentes a todos os metabólitos produzidos. Os halos de inibição variaram de 10 a 30 mm, com média de 20 mm de diâmetro. Na presente pesquisa detectou-se a formação de halos de inibição contra bactérias Gram-positivas, leveduras e *E. coli*, não ocorrendo inibição da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Os metabólitos secundários produzidos por *S. tubercidicus* isolado do Cerrado apresentaram um amplo espectro de ação contra os microrganismos analisados. Os resultados obtidos nesta pesquisa ressaltam o potencial antagônico do endofítico isolado contra microrganismos de interesse em Saúde Pública, se constituindo em uma fonte promissora para a pesquisa de novos compostos bioativos.

5.3. Cinética de crescimento e quantificação da atividade antimicrobiana do extrato produzido por *S. tubercidicus* RND-C

A cinética de crescimento de *S. tubercidicus* RND-C e a quantificação da bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus* foi demonstrado pela primeira vez no presente trabalho e não existem dados publicados na literatura.

Na figura 16 pode-se observar a relação entre a cinética de crescimento de *S. tubercidicus* e o início da produção de substâncias bioativas. A biocarga do inóculo foi quantificada na ordem de 10^6 UFC. mL⁻¹, e a maior contagem microbiana (log 7,88 UFC. mL⁻¹) foi verificada após 48 h de cultura, onde iniciou-se a produção de substâncias bioativas. Durante o cultivo, o valor de pH foi monitorado e manteve-se na faixa da neutralidade, variando de 6,0 – 7,0.

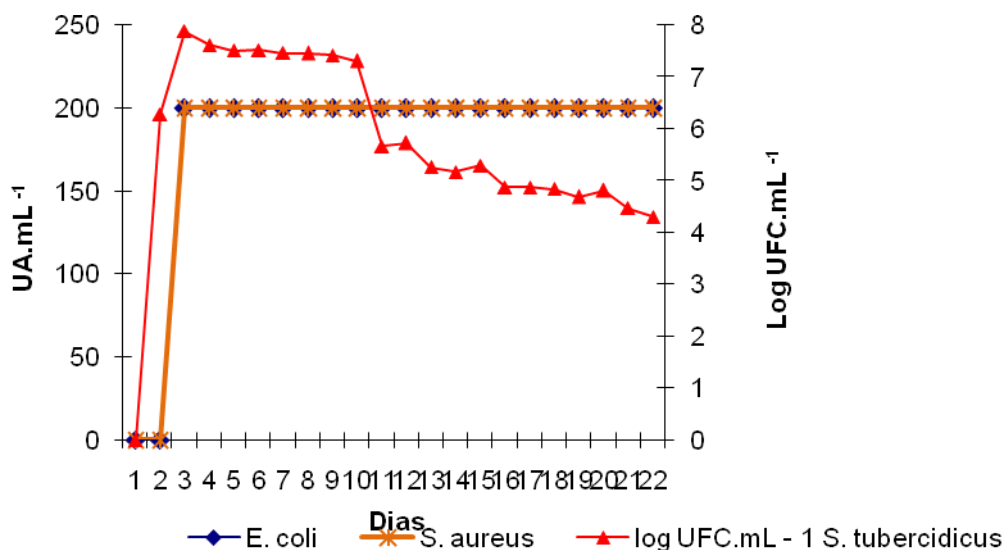


Figura 16: Cinética de crescimento de *S. tubercidicus* RND-C e bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus*.

O extrato bruto fresco apresentou potencial antimicrobiano máximo de 200 UA.mL⁻¹ para *E. coli* ATCC 25922 (48 horas da cultura) e *S. aureus* ATCC 25923 (48 horas da cultura) quando cultivado em caldo ISP2. O início da produção de substâncias bioativas correspondeu ao início da fase estacionária de crescimento de *S. tubercidicus* (Figura 16).

Na figura 16, pode-se observar também que o potencial antagônico do extrato manteve-se ativo por 21 dias consecutivos e após 10 dias de cultivo foi constatada uma diminuição no tamanho dos halos de inibição produzidos. Uma das hipóteses consideradas foi que no décimo dia, a cultura entrou na fase de declínio, ocorrendo uma redução no número de células de *S. tubercidicus* (log 5,66 UFC. mL⁻¹) coincidindo com a redução dos halos produzidos.

No trabalho realizado por Heck (2007) foram selecionados actinomicetos produtores de antibióticos. Para tanto, realizou-se uma triagem para detectar a atividade antimicrobiana. O isolado 2S foi selecionado apresentando os melhores resultados para a produção de substâncias bioativas. A produção de substâncias bioativas ocorreu no terceiro dia, após 72 h de cultivo. Os resultados obtidos por Heck (2007) diferem dos encontrados no presente trabalho, onde a produção de substâncias bioativas ocorreu no segundo dia de cultivo, após 48 h.

O extrato bruto de *S. tubercidicus* não apresentou bioatividade contra *C. albicans* ATCC 10231 (Figura 17). O teste foi realizado durante 5 dias consecutivos em triplicata em dois meios de cultura diferentes caldo ISP2 e TSB. Como não foi detectada bioatividade contra este microrganismo o teste foi interrompido. Isto pode ter ocorrido porque na avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana os halos apresentados foram menores (19,4 mm) quando comparados aos outros microrganismos testados, 40 mm para *E.coli* e 35 mm para *S.aureus*.

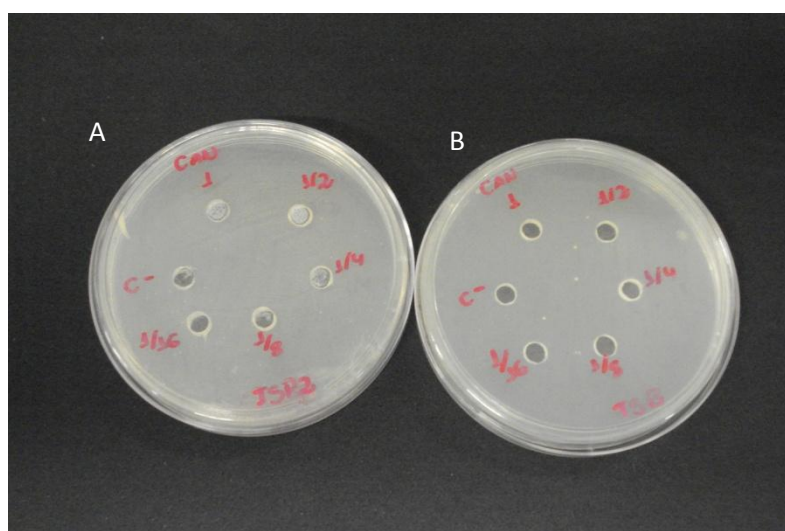


Figura 17: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de *S. tubercidicus* contra *C. albicans*, em caldo ISP2 (A) e TSB (B).

A bioatividade contra *S. aureus* foi verificada em dois meios de produção diferentes: ISP2 e caldo TSB e após 48 h de incubação (Figura 18). Os resultados obtidos mostraram que o caldo ISP2 foi o melhor meio para a produção de substâncias bioativas apresentando 200 UA. mL⁻¹. Já em caldo TSB o máximo produzido foi de 100 UA. mL⁻¹.

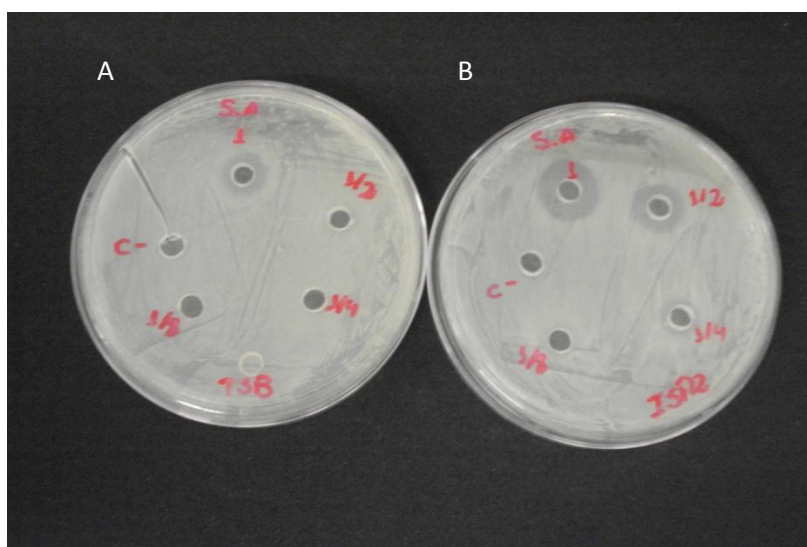


Figura 18: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de *S. tubercidicus* contra *S. aureus* em caldo TSB (A) e ISP2 (B).

A bioatividade do extrato de *S. tubercidicus* contra *E. coli* também foi avaliada em dois meios de produção distintos, TSB e ISP2. Na figura 19, pode-se observar que a produção de substâncias bioativas ocorreu nos dois meios de produção testados, mas no caldo ISP2 os halos produzidos foram maiores.

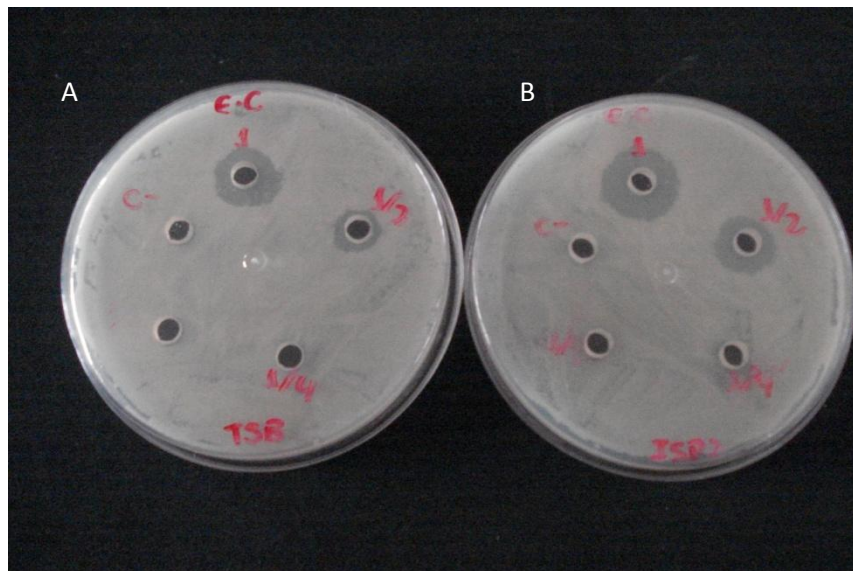


Figura 19: Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana de *S. tubercidicus* contra *E. coli* em caldo TSB (A) e ISP2 (B).

Trabalhando com *Paenibacillus polymyxa*, endofítico isolado de pêssego do Cerrado, nosso grupo detectou a bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus* (SERRANO et al., 2009). A bioatividade foi quantificada e expressa no valor de 800 UA. mL⁻¹, sendo este superior ao detectado no presente trabalho. Entretanto, em nosso trabalho a bioatividade se manteve constante durante os 21 dias, já no trabalho realizado por Serrano (2009), o extrato se manteve ativo durante 13 dias contra *E. coli* e no 9º dia o extrato se tornou inativo contra *S. aureus*.

5.4. Estabilidade térmica, enzimática e variação no pH do extrato e estimativa da massa molar das substâncias bioativas

A estabilidade térmica, enzimática, a variação no pH do extrato bruto concentrado e a estimativa da massa molar das substâncias bioativas foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicação de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto concentrado produzido por *S. tubercidicus* RND-C e efeitos na atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*.

Tratamento	Bioatividade contra	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Nenhum (controle positivo)	+	+
Enzimático		
Amilase	+	+
Lipase (tipo II)	-	-
Lipase (tipo VII)	-	-
Invertase	-	+
Pepsina	+	+
Estabilidade térmica		
-80 e -20 °C (6 horas)	+	+
28 e 37 °C (6 horas)	+	+
60 e 70 °C (1 hora)	+	+
Varição no pH		
pH 2,0	+	-
pH 3,0	+	-
pH 4,0	+	-
pH 5,0	+	-
pH 6,0	-	-
pH 7,0	+	+
pH 8,0	+	-
pH 9,0	-	-
Ultrafiltração		
Membrana de 10 kDa	+	+
Membrana de 3,5 kDa	-	-
Membrana de 3,0 kDa	+	+

+: presença de halos; -: ausência de halos. Todos estes experimentos foram realizados em triplicata.

De acordo com dados apresentados na Tabela 2, as substâncias bioativas contra *E. coli* e *S. aureus* mantiveram potencial de atividade após tratamento com as enzimas degradativas, amilase e pepsina. Estes resultados sugerem que as substâncias bioativas produzidas por *S. tubercidicus* RND-C possuem natureza lípídica e não-proteinácea.

Já a substância ativa contra *E. coli* têm natureza glicídica e lípídica, devido a resistência à ação da enzima invertase e lipase, respectivamente. Os dados obtidos sugerem que as substâncias contidas no extrato bruto de *S. tubercidicus* RND-C contra *E.coli* pode ser um glicolipídio.

O extrato bruto de *S. tubercidicus* manteve-se ativo após ser submetido a diferentes temperaturas. Como pode ser visto na tabela 2 o extrato manteve sua estabilidade quando exposto a elevadas (100 e 115 °C) e baixas (-20 e -80 °C) temperaturas, sugerindo que os compostos bioativos produzidos não são sujeitos a degradação quando submetidos à variação térmica.

A bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus* foram detectadas nas frações retidas e eluídas em membranas de 10 e 3,0 kDa. Portanto, as moléculas bioativas contra os microrganismos avaliados foram estimadas com massa molar inferior a 3 kDa e inferior a 10 kDa, já que a bioatividade contra *S. aureus* e *E. coli* foi perdida quando o extrato foi ultrafiltrado em membrana de 3,5 kDa. Desta maneira, os compostos bioativos contra este microrganismo apresentam massa molar estimada em maior que 3,5 kDa e menor que 3,0 kDa. Estes resultados sugerem a ultrafiltração do extrato em membranas com pesos moleculares maiores que 3,5 kDa e menores que 10 kDa.

No trabalho realizado por Yoo *et al.* (1984) foi isolada uma substância produzida por *S. tubercidicus* com massa molar de 266,25 Da. Os resultados obtidos por estes

autores diferem do encontrados no presente trabalho, no qual foi isolado duas substâncias com massa molar estimada entre menor que 3,0 kDa e maior que 3,5 kDa.

Na figura 20 pode-se observar que o extrato foi ativo contra *E. coli* em condições de acidez (pH, 2,0 – 5,0) e também apresentou bioatividade em pH 7,0 e 8,0. De acordo com estes resultados, pode-se concluir que a bioatividade dos compostos presentes no extrato, contra *E.coli*, não foi influenciada em condições de acidez, enquanto que em condições de alta alcalinidade (pH 9,0) não detectou-se bioatividade.

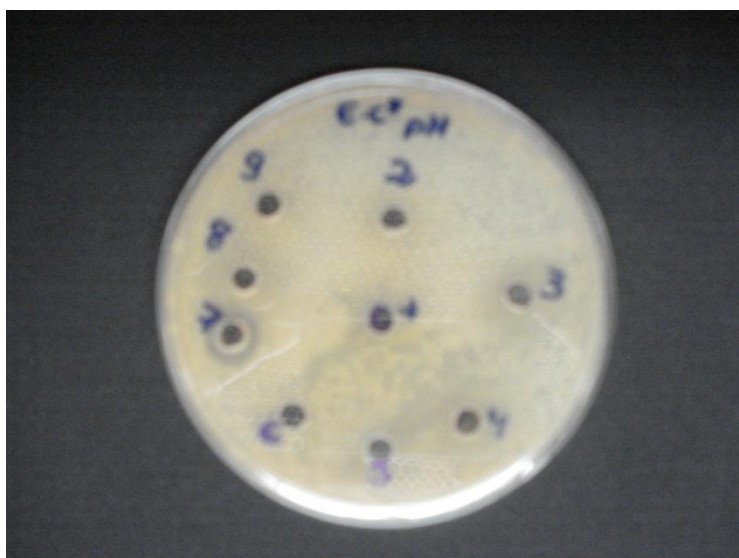


Figura 20: Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *E. coli*.

Na figura 21 pode-se observar que o extrato foi ativo contra *S. aureus* apenas na faixa de pH 7,0. Em condições de acidez e alcalinidade a substância bioativa produzida por *S. tubercidicus* foi inativada.

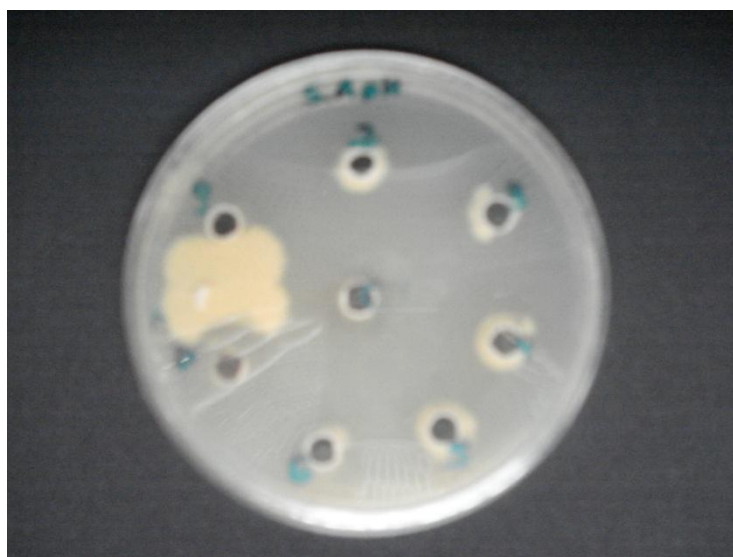


Figura 21: Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *S. aureus*.

Mander *et al.* (2009) purificaram uma fosfolipase extracelular de *Streptomyces tendae* utilizando métodos cromatográficos . O peso molecular do composto isolado foi estimado em 43 kDa. A estabilidade térmica e o pH da enzima foram detectados entre pH 8,0 e 10 e 60° C. Os resultados obtidos por estes autores diferem do presente trabalho, no qual os compostos isolados de *S. tubercidicus* mantiveram-se ativo após serem submetidos a diferentes temperaturas. A faixa de pH variou de 2,0-5,0 e de 7,0-8,0, ressaltando a estabilidade dos compostos em diferentes valores de pH.

Yoo *et al.* (1998) purificaram e caracterizaram a enzima GTP ciclohidrolase I a partir de *S. tubercidicus*. A massa molar desta enzima foi estimado em 58,000 Da. A temperatura e o pH ótimo foram detectados entre 40 – 42° C e variação no pH de 7,5-8,5. Já no nosso trabalho as substâncias bioativas mantiveram a atividade numa ampla faixa de temperatura de -80° C a 121° C e foram estáveis em condições de acidez e pH básico.

5.5. Separação e purificação das moléculas bioativas contidas no extrato produzido por *S. tubercidicus* RND-C por HPLC

As moléculas bioativas contidas no extrato concentrado produzidas por *S. tubercidicus* RND-C foram separadas e purificadas por HPLC. O perfil de separação está demonstrado na Figura 22. Os picos eluídos foram expressos em função do gradiente de concentração.

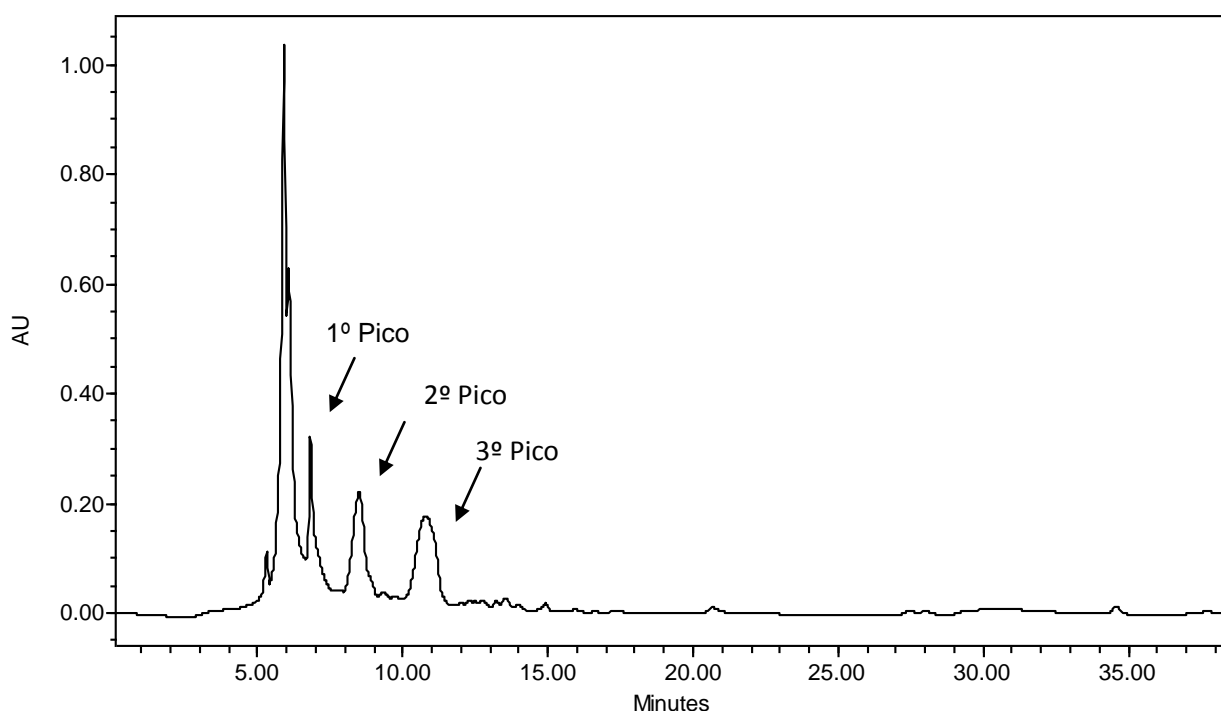


Figura 22: Perfil de separação por HPLC do extrato concentrado produzido por *S. tubercidicus* RND-C.

Os picos coletados foram bioensaiados contra *E. coli* e *S. aureus*. O 1º e o 2º pico apresentaram atividade contra *S. aureus*, sendo que a bioatividade do segundo pico foi maior como se pode observar na figura 23. Somente o 1º pico coletado apresentou atividade contra *E. coli* (Figura 24). Com base nestes dados, pode-se sugerir que existem duas substâncias diferentes produzidas por *S. tubercidicus*, sendo duas ativas contra *S. aureus* e a outra ativa contra *E. coli* e *S. aureus*.

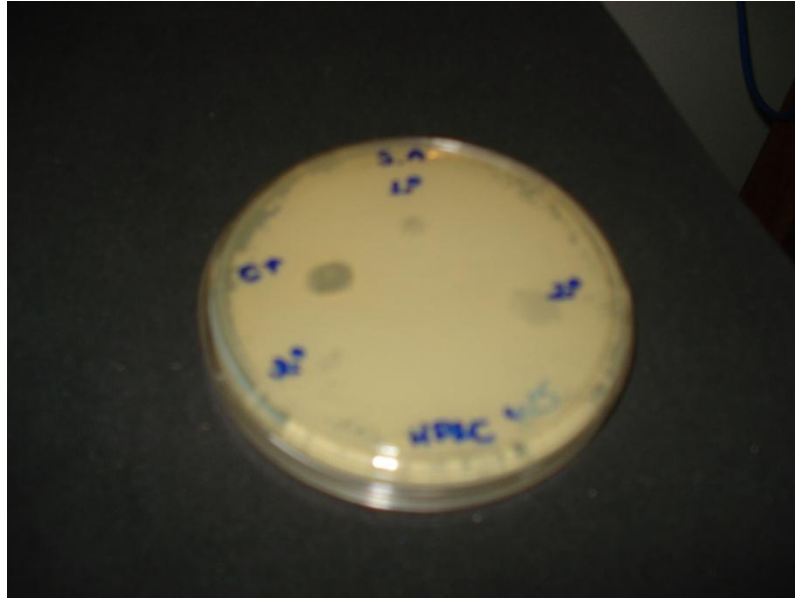


Figura 23: Bioatividade contra *S. aureus* dos picos eluídos e coletados através de HPLC.

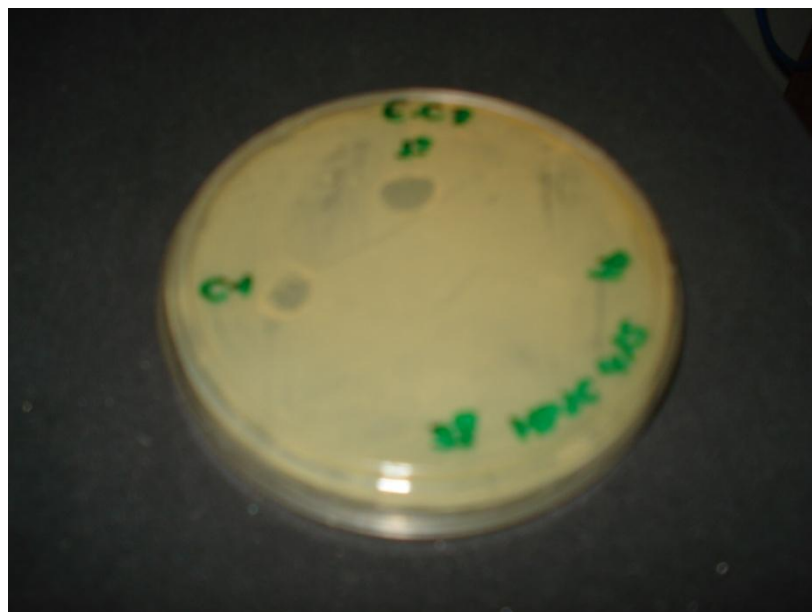


Figura 24: Bioatividade contra *E. coli* dos picos eluídos e coletados através de HPLC.

Sui *et al.* (2009) testaram a atividade antifúngica da cepa de *Streptomyces lydicus* A02, contra diversos fungos patogênicos. A substância bioativa foi isolada e purificada usando diferentes colunas cromatográficas (coluna de resina e sílica gel). A estrutura química do composto foi determinada por métodos espectroscópicos, incluindo espectrometria de massa, luz UV, luz infravermelho e ressonância magnética nuclear. O composto foi identificado como natamicina, apresentando massa molar de 665 Da.

Ji *et al.* (2009) isolaram 5 compostos diferentes a partir do caldo de fermentação de *Streptomyces qinlingensis*. Dois compostos isolados já foram descritos na literatura, como o ácido Streptotricina F e Streptotricina D. Os mesmos autores detectaram três novos compostos: ácido 12-carbomilstreptotrina E, 12-carbomilstreptotricina D e ácido N-acetil-streptotricina D. Os resultados mostraram que os compostos isolados possuem atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*. Os dados obtidos por estes autores corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde as substâncias isoladas e purificadas por HPLC apresentaram bioatividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

EI-Naggar (2007) isolou uma cepa de *Streptomyces* do solo do Egito, que de acordo com a sequência do rRNA 16S, foi identificado como *S. violaceusniger*. O extrato produzido pelo isolado apresentou atividade antibacteriana contra microrganismos Gram-positivos, similarmente aos dados obtidos no presente trabalho. As substâncias produzidas foram separadas por HPLC, usando as colunas de sílica-gel e a sephadex LH-20. No presente trabalho foi utilizada coluna C18.

Yoo *et al.* (1984) extraíram e detectaram uma molécula bioativa produzida por *S. tubercidicus*, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Os autores utilizaram como solventes água e metanol (20/80) e a coluna C18. O composto foi

detectado num comprimento de onda de 254 nm. Os dados obtidos por estes autores corroboram com os obtidos em nosso trabalho, no qual foram detectadas substâncias bioativas utilizando a mesma técnica cromatográfica e a coluna C18. O diferencial do presente trabalho é que foram aplicados outros métodos para a detecção de substâncias bioativas, como o ensaio qualitativo para a determinação da atividade antimicrobiana.

Os dados obtidos na presente pesquisa mostraram que foram detectados dois compostos diferentes no comprimento de onda de 254 nm produzidos por *S. tubercidicus*. Estes resultados sugerem o isolamento de substâncias diferentes das isoladas por Yoo *et al.* (1984), ressaltando a possibilidade de serem substâncias ainda não descritas na literatura científica vigente.

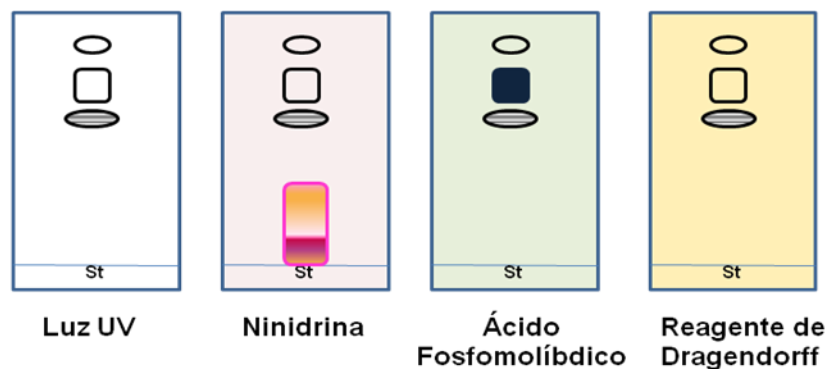
5.6. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para se avaliar a natureza dos compostos contidos nos extratos brutos de *S. tubercidicus* RND-C, e determinar a técnica cromatográfica mais adequada para separação dos compostos bioativos foram realizadas análises por CCD. O melhor sistema eluente testado foi o sistema Metanol/Diclorometano (7:3).

Desta forma, foram preparadas quatro placas de CCD contendo o extrato bruto de *S. tubercidicus*, eluídas com Metanol/Diclorometano (7:3) e reveladas como descrito na parte experimental.

A partir da Figura 25, observa-se a presença de compostos contendo considerável quantidade de aminoácidos polares (Placa revelada com Ninidrina). Observa-se a presença de três compostos de média polaridade. Dentre estes, o mais polar foi revelado apenas à luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Por sua vez, o

intermediário e o menos polar foram revelados à luz UV no comprimento de onda de 254 nm (placa revelada com Ácido Fosfomolibdico), tratando-se de um composto redutor (Figura 25).



LEGENDA:

○ Traço vazio – revela com a luz UV em 254 nm

◉ Traço cheio – revela com a luz UV em 365 nm

Figura 25: CCD do extrato bruto de *S. tubercidicu* RND-C, reveladas com diversos reveladores para cromatografia em camada delgada.

Heck (2007) selecionou actinomicetos produtores de antibióticos e otimizou a produção dos mesmos. Realizou-se uma triagem para detectar a atividade antimicrobiana de 24 isolados de actinomicetos. Esta triagem foi realizada contra 8 microrganismos alvo de interesse clínico e 10 isolados apresentaram alguma atividade antimicrobiana. Destes foram escolhidos 4 isolados que apresentaram as maiores zonas de inibição e com eles foram feitos novos ensaios de antibiose, inclusive contra *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) ATCC 33591. O composto antimicrobiano foi separado por cromatografia em camada delgada e análises espectroscópicas visando elucidar sua possível estrutura química. Essas análises

indicaram a presença de hidroxilas livres e um ciclo contendo nitrogênio, indicando estrutura semelhante à bleomicina. No presente trabalho utilizou-se CCD e foram detectados três compostos revelados no comprimento de onda de 254 nm.

5.7. Técnicas Cromatográficas

De acordo com os dados obtidos na CCD, as técnicas cromatográficas empregadas na separação do extrato bruto de *Streptomyces tubercidicus* RND-C foram específicas para extratos polares.

Inicialmente, o extrato foi separado por cromatografia em coluna pré-empacotada de fase reversa do tipo Sep-Pak. A partir dessa separação foram obtidas quatro frações (St. 1, St. 2, St. 3 e St. 4). Essas frações foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana e antifúngica através de bioensaios.

As frações St. 2 e St. 4 apresentaram atividade antimicrobiana somente contra bactérias e foram purificadas separadamente por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 utilizando eluição isocrática com metanol. As frações obtidas (St. 2-A; St. 2-B; St. 4-A e St. 4-B) foram submetidas a bioensaios (Figura 26).

As frações St. 2-A e St. 2-B apresentaram atividade contra *S. aureus*. Já as frações St. 4-A e St. 4-B foram ativas contra os dois microragnismos indicadores testados, *S. aureus* e *E. coli* (Figura 26). Os dados obtidos corroboram com os de HPLC onde foi notada a presença de duas substâncias distintas.

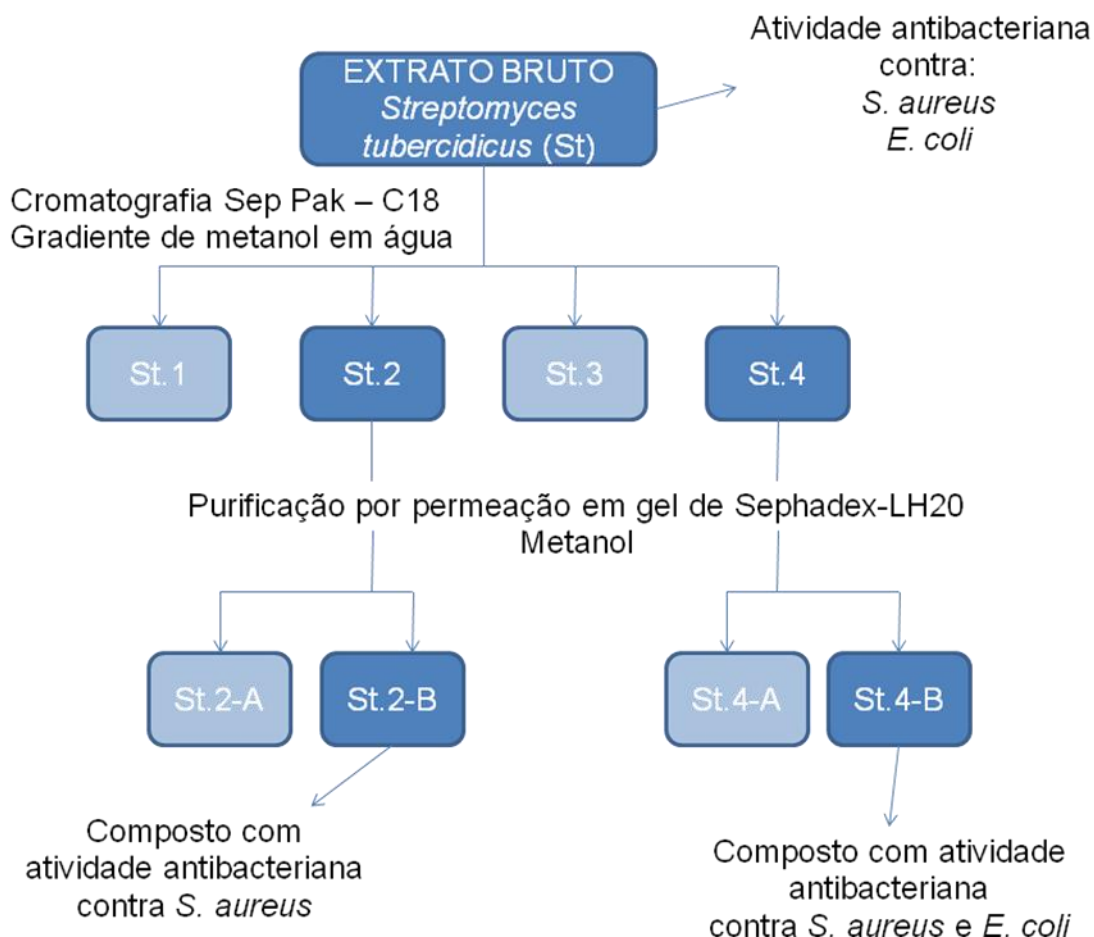


Figura 26: Representação esquemática da separação do extrato bruto de *S. tubercidicus* RND-C utilizando métodos cromatográficos.

5.8. Determinação Estrutural dos Compostos Bioativos

A determinação estrutural dos compostos puros está sendo realizada com base nos espectros mono e bidimensionais de RMN. Até o momento, foram determinados os espectros de RMN-¹H do extrato bruto de *S. tubercidicus* e os espectros RMN-¹H dos compostos puros (Figura 27).

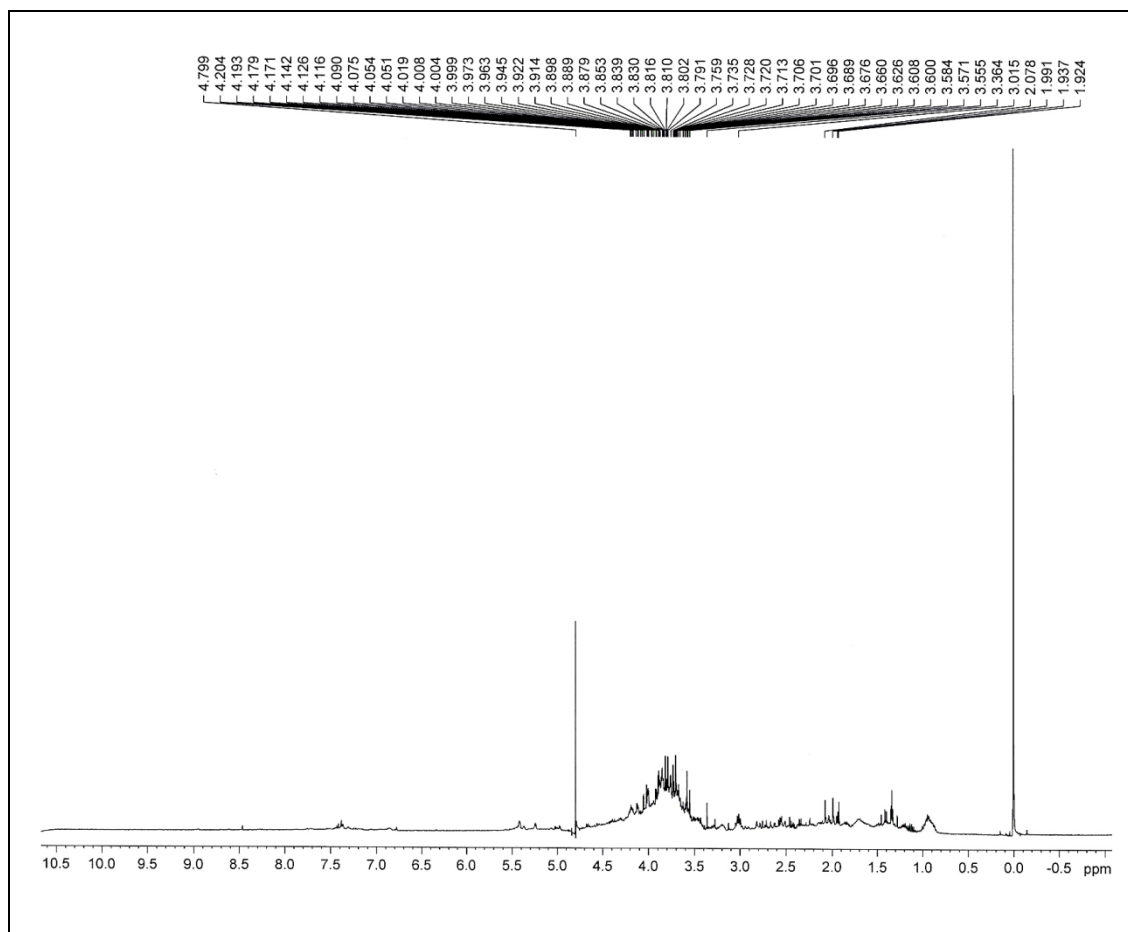


Figura 27: Espectro de RMN-¹H do extrato bruto de *S. tubercidicus*.

A partir do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do extrato bruto de *S. tubercidicus* (Figuras 28 e 29), observa-se:

- sinais de hidrogênios característicos de aminoácidos entre δ 1,3-2,0 ppm;
- sinais de hidrogênios característicos de açúcar entre δ 3,5-4,2 ppm;
- sinais de hidrogênios ligados a carbono em dupla ligação entre δ 5,0-5,5 ppm;
- sinais de hidrogênios ligados a grupos aromáticos entre δ 7,0-7,5 ppm;
- dois sinais em δ 8,48 e δ 8,98 ppm característicos de hidrogênio vizinho de heteroátomos em anel.

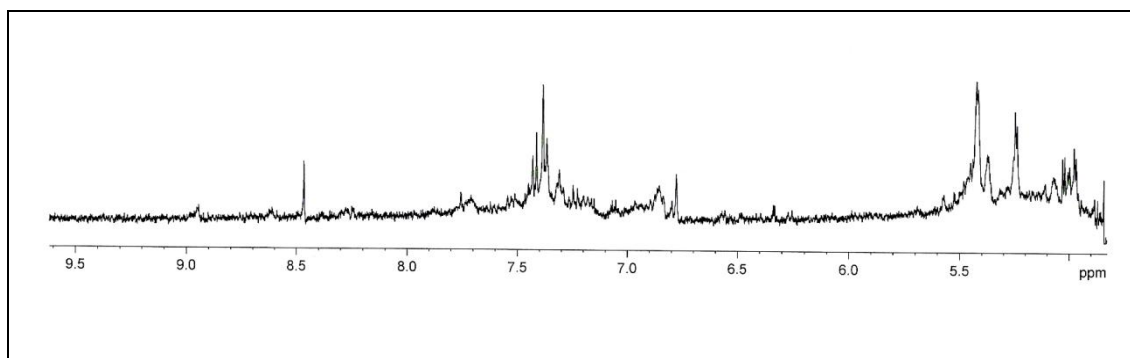


Figura 28: Expansão do espectro de RMN-¹H (5,0-9,5 ppm) do extrato bruto de *S. tubercidicus*.

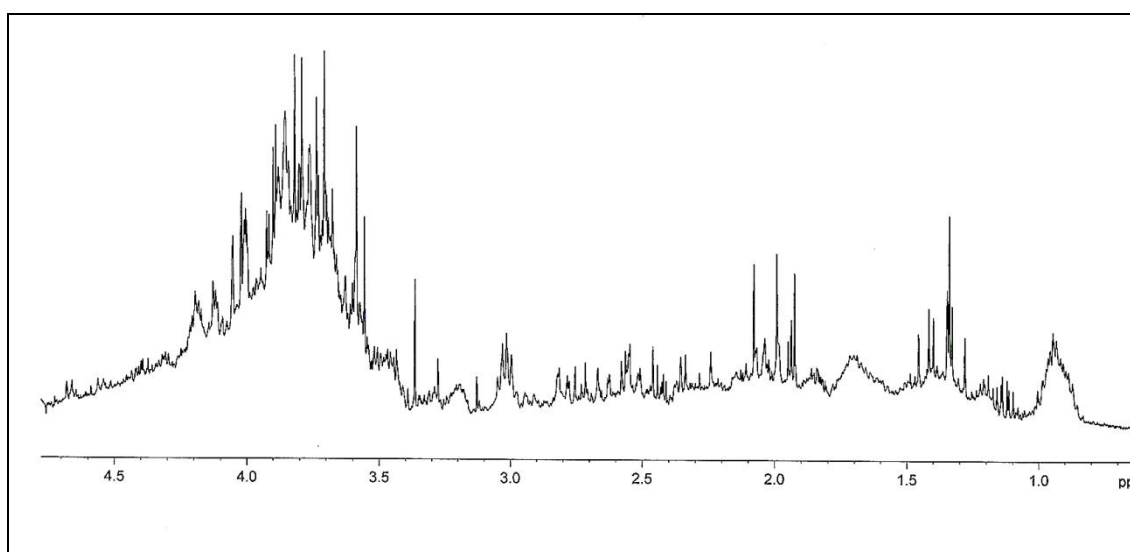


Figura 29: Expansão do espectro de RMN-¹H (1,0-5,0 ppm) do extrato bruto de *S. tubercidicus*.

Já nos espectros de RMN-¹H dos compostos puros observa-se grande definição no padrão dos sinais e alto grau de pureza. Através do espectro de RMN-¹H da fração St.2-B observa-se na Figura 30:

- vários sinais de hidrogênios característicos de alifáticos entre δ 0,5-2,0 ppm;
- um sinal característico de hidrogênios de grupo metoxila (OCH₃) em δ 3,21 ppm;
- sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos em dupla ligação entre δ 5.5-6.0ppm;

- três sinais característicos de hidrogênio vizinho de heteroátomos em anel entre δ 8,0-8,5 ppm.

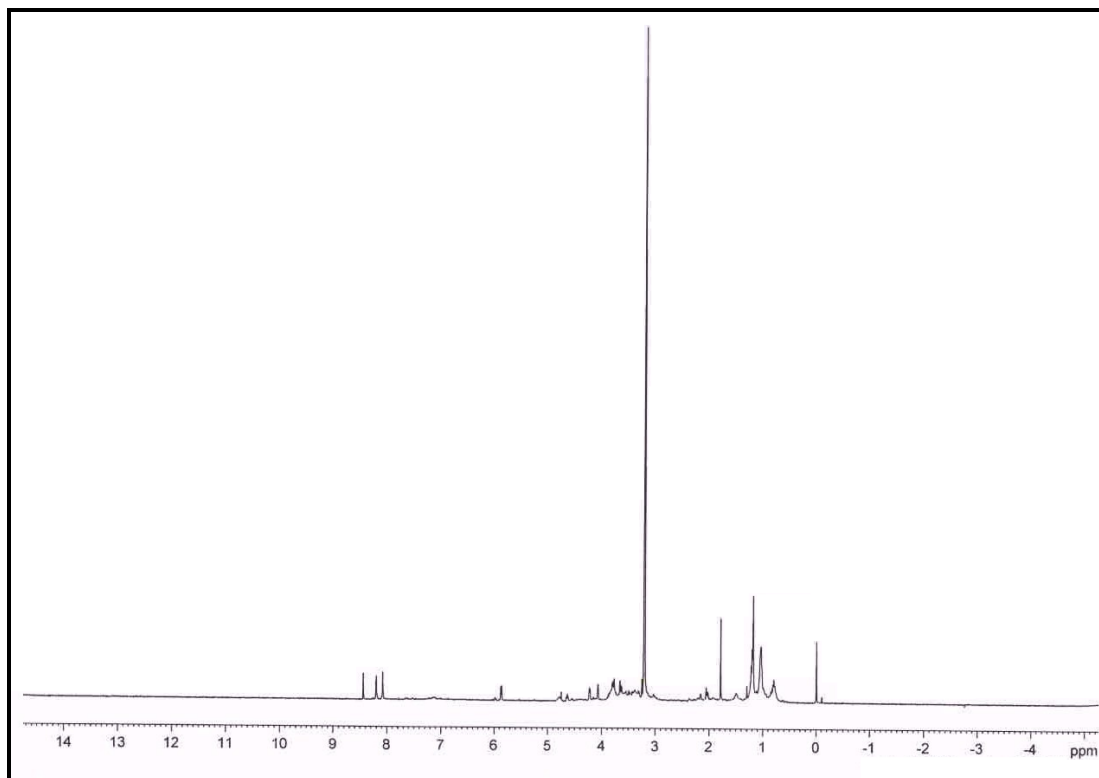


Figura 30: Espectro de RMN-¹H da fração St.2-B.

A partir do espectro de RMN-¹H da fração St.4-B observa-se na Figura 31:

- sinais característicos de hidrogênios metilênicos (CH₂) entre δ 1,0-2,0 ppm;
- um sinal característico de hidrogênios de grupo metoxila (OCH₃) em δ ~ 3,5 ppm;
- um multipletto entre δ 4,0-4,5 ppm, característico de hidrogênios ligados a carbonos funcionalizados;
- um dupletto característico de hidrogênios ligados a carbonos em dupla ligação entre δ 5,5-6,0 ppm;
- um sinal característico de hidrogênios aromáticos em δ ~ 7,2 ppm;
- sinais característicos de hidrogênios vizinho de heteroátomos em anel em δ ~ 8,2 ppm.

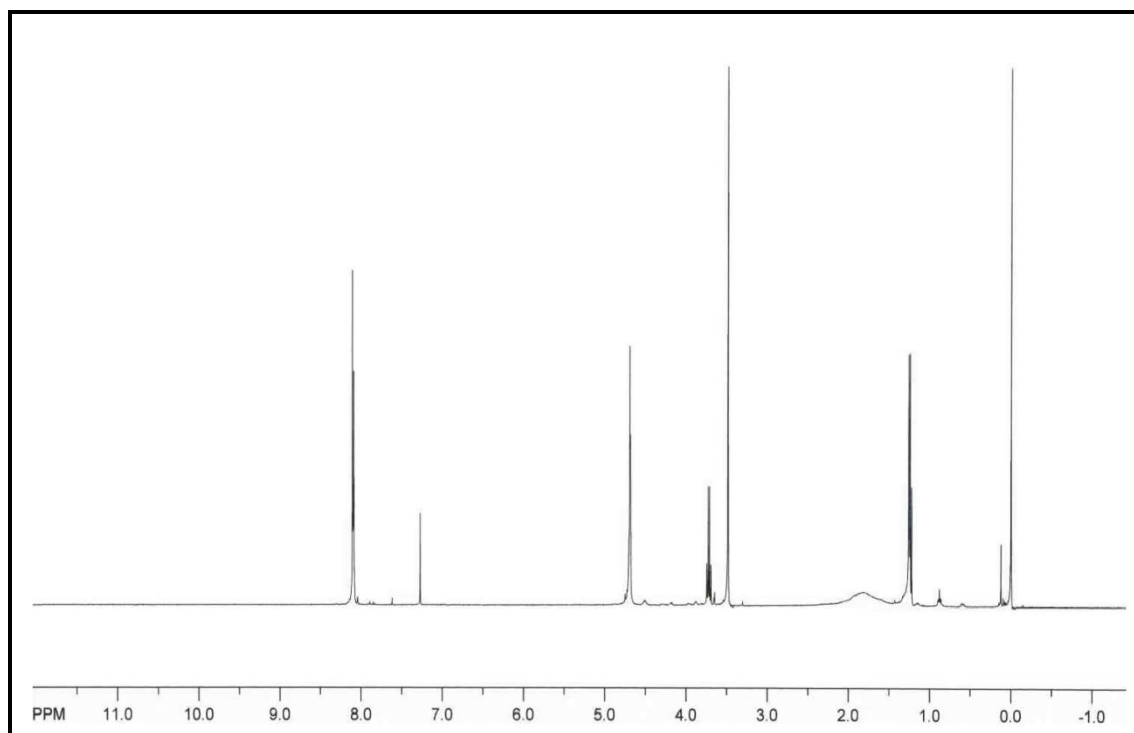
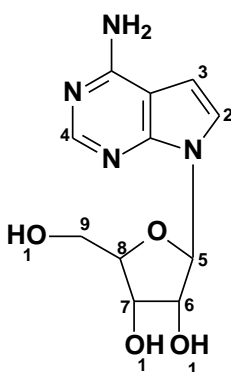


Figura 31: Espectro de RMN-¹H da fração St.4-B.

Como até o momento, na literatura, o único composto isolado de *Streptomyces tubercidicus* foi a tubercidina, foi realizada uma simulação do espectro de RMN-¹H deste composto para comparar com os espectros dos compostos isolados. A simulação do espectro de RMN-¹H da tubercidina foi realizada utilizando-se o programa ACD Lab HNMR. Abaixo tem-se a estrutura da tubercidina numerada e em seguida a simulação de seu espectro de RMN-¹H com os deslocamentos químicos de cada núcleo de hidrogênio descrito.



Estrutura da tubercidina.

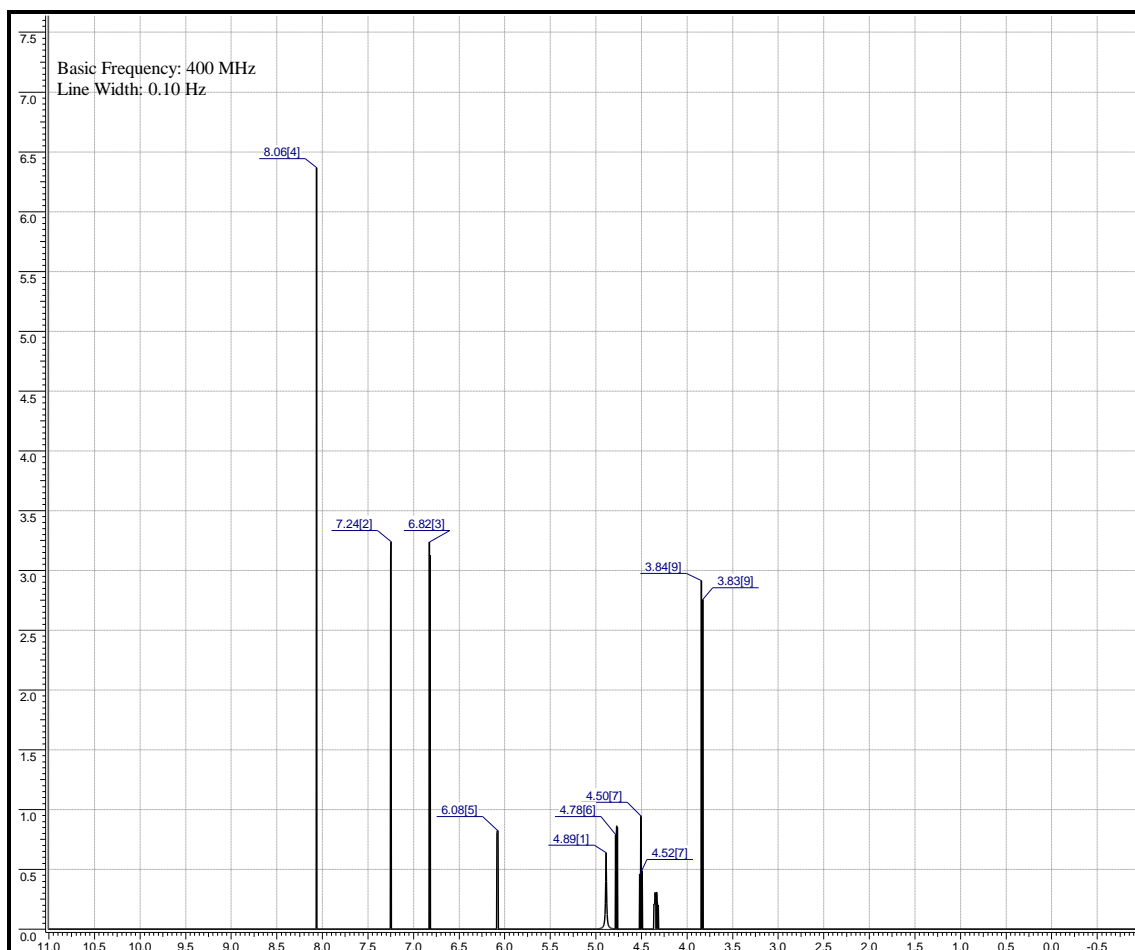


Figura 32: Simulação do espectro de RMN-¹H da tubercidina utilizando-se o programa ACD Lab HNMR.

Como se pode observar na Figura 32, comparando-se o espectro simulado da tubercidina e os espectros dos compostos isolados de *S. tubercidicus*, provavelmente, estes compostos isolados também devem ser nucleosídeos, porém não se trata da tubercidina. Esta constatação foi baseada na observação dos espectros de ambos os compostos isolados de um sinal de hidrogênios característicos de grupo metoxila (em δ 3,21ppm para a fração St.2-B e $\delta \sim 3,5$ ppm para a fração St.4-B). Além disso, existe um padrão de sinais entre $\delta \sim 0,5$ -2,0 ppm nos espectros de ambas as frações que não é visualizado no espectro da tubercidina. Desta forma, com base no espectro de RMN-¹H dos compostos isolados, pode-se prever que os compostos isolados, possivelmente, sejam derivados da tubercidina.

A estrutura dos compostos isolados será determinada a partir dos espectros de RMN- ^1H , ^{13}C , HSQC que descreve a correlação direta entre ^1H - ^{13}C . Assim pode-se determinar, a qual carbono está (ao) ligado (s) o (s) núcleo (s) de hidrogênio (s), HMBC que descreve a correlação a longa distância entre ^1H - ^{13}C . Pode-se também determinar as vizinhanças dos núcleos de hidrogênio e COSY que descrevem a correlação entre ^1H - ^1H , característica que determina as vizinhanças dos núcleos de hidrogênio, corroborando com o HMBC. Finalmente será realizada análise por espectrometria de Massas de Alta Resolução, que elucidará a massa molar e a fórmula molecular dos compostos analisados. Desta forma, as estruturas serão determinadas sem ambigüidade.

6. CONCLUSÕES

Na realização do estudo bioprospectivo de microrganismos endofíticos produtores de substâncias bioativas, utilizando plantas do Cerrado, foi isolada uma bactéria, a partir de folhas e caule de *Solanum lycocarpum*, apresentando bioatividade contra microrganismos de importância em saúde pública;

O endofítico isolado foi identificado através de análises fenotípicas e genotípicas como *Streptomyces tubercidicus* e denominado RND-C;

Este estudo relata, pela primeira vez, a associação endofítica da bactéria *S. tubercidicus* RND-C, com folhas de *Solanum lycocarpum*, vegetação de Cerrado de São Carlos, SP;

O extrato bruto fresco produzido por *S. tubercidicus* RND-C apresentou potencial antimicrobiano máximo de 200 UA.mL⁻¹ contra *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 após 48 h de cultivo;

Após ter sido submetido a tratamento enzimático com amilase e pepsina, o extrato concentrado manteve-se bioativo, sugerindo a natureza lipídica e não-proteinácea das substâncias bioativas;

O composto ativo contra *E. coli* sugere a presença de substância de natureza glicídica e lipídica, devido a resistência à ação da enzima invertase e lipase, respectivamente, sugerindo que as substâncias contidas no extrato bruto de *S. tubercidicus* RND-C contra *E.coli* pode ser um glicolipídio.

O extrato concentrado manteve-se biologicamente ativo quando exposto a baixas (-20 e -80 °C) e elevadas (100 e 121 °C) temperaturas, sugerindo que os compostos bioativos produzidos não são sujeitos a degradação espontânea;

O extrato manteve-se ativo contra *E. coli* em condições de acidez (pH, 2,0 – 5,0) e também apresentou bioatividade em pH 7,0 e 8,0. Em condições de alta alcalinidade (pH 9,0) não detectou-se bioatividade;

O extrato manteve-se ativo contra *S. aureus* apenas na faixa de pH 7,0. Em condições de acidez e alcalinidade a substância bioativa produzida por *S. tubercidicus* foi inativada;

A massa molar dos compostos bioativos produzidos por *S. tubercidicus* RND-C foram estimadas em menor que 3,0 kDa.

Através da separação biomonitorada foi possível separar as substâncias bioativas contidas no extrato produzido por *S. tubercidicus* RND-C;

A separação usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sugere a existência de duas substâncias diferentes produzidas por *S. tubercidicus*, sendo duas ativas contra *S. aureus* e a outra ativa contra *E.coli* e *S. aureus*;

Na separação por cromatografia em camada delgada (CCD) foram obtidos três compostos de média polaridade revelados no comprimento de onda de 254 nm;

Na separação por cromatografia em coluna pré-empacotada de fase reversa do tipo Sep-Pak, foram obtidas quatro frações (St. 1, St. 2, St. 3 e St. 4). As frações St. 2 e St. 4 apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias;

As frações St. 2 e St. 4 foram purificadas separadamente por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 obtendo as frações St. 2-A; St. 2-B; St. 4-A e St. 4-B. A fração St. 2-B foi ativa contra *S. aureus*. Já a fração St. 4-B foi ativa contra *S. aureus* e *E. coli*. Estes resultados sugerem a presença de duas substâncias diferentes;

O estudo prosseguirá na determinação da estrutura dos compostos bioativos puros através de técnicas espectroscópicas (Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensional) e espectrométrica (Espectrometria de Massas).

7.PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados experimentais dessa pesquisa foi possível propor novos trabalhos, descritos a seguir:

7.1. Melhoramento genético da cepa de *Streptomyces tubercidicus* RND-C, visando aumentar a bioatividade;

7.2. Avaliar as composições de meios de cultura para aumentar a produção de substâncias bioativas;

7.3. Testar a bioatividade de *S. tubercidicus* contra outros microrganismos envolvidos em surtos de infecções hospitalares, incluindo fungos, bactérias e protozoários.

7.4. Testar a bioatividade de *S. tubercidicus* contra células cancerígenas;

7.5. Testar e aplicar os compostos produzidos e isolados de *S. tubercidicus* em indústrias alimentícias, agricultura, produção de enzimas, dentre outras.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K.; NAKATANI, M.; MOCHIDA, H. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p. 889-895, 2002.

AIRES, S.T.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas e frutos de *Solanum lycocarpum* St. A. Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) em solo sob três temperaturas. **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, p. 339-344, 2005.

ALBERTON, L. R. et al. Evaluation of the potential applicability of *Streptomyces viridosporus* T7 A crude fermentation extract in veterinary medicine. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 9, n.1, p. 41-47, 2006.

ANZAI, K.; NAKAMURA, G.; SUZUKI, S. A new antibiotic, tubercidin. **Journal of Antibiotics**, v. 10, p. 201-204, 1957.

ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, 2002. 86 p.

ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in Citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ARSLAN, U. et al. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. **Pediatrics International**, v. 1, p. 209-217, 2009.

ASSUMPÇÃO, L. C. et al. Diversity and biotechnological potential of endophytic bacterial community of soybean seeds . **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology** (on line), v. 3, p. 5 -10, 2000.

BACHIEGA, G. L., VILEGAS, W., UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n.1, p. 29-37, 2005.

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, 1866. 316 p.

BASCOM-SLACK, C. A. et al. Multipli, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. **Microbial Ecology**, v. 15, p. 24-35, 2009.

BORG, M. A. et al. Antibiotic consumption as a driver for resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* within a developing region. **American Journal of Infection Control**, v. 8, p. 37-42, 2009.

BRITO, A. R. M.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

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

CASTILLO, U. F. et al. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. **Fems Microbiology Letters**, v. 255, p. 296-300, 2006.

CAZES, J. **Encyclopedia of chromatography**. Editora Marcel Dekker, 2001. 927 p.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.

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

CHARCOSSET, C., Membrane process in biotechnology: an overview. **Biotechnology advances**, v. 24, p. 482-492, 2006.

CHAVES, N.; ESCUDERO, J. C. Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. In: **Principles and Practices in Plant Ecology: Phytochemicals Interactions** (eds.). CRC Press, 1999. p. 267-285.

CHIN, Y. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n.2, p. 13-17, 2006.

CHOWDHURY, R, et al. Antibiotic principles from a *Streptomyces* species and their sub-acute toxicity studies on hepatic, renal and haemopoietic system of rats. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 3, p. 1-7, 2005.

COELHO, R. R. R.; DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. **Révue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, v. 15, p. 459-473, 1978.

COLLINS, H. C.; BRAGA, L. G.; BONATO, S. P. **Introdução à métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. 279 p.

CONDE-ESTÉVEZ, D. et al. Differentiating clinical characteristics in bacteriemia caused by *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 7, p. 37-43, 2009.

CORRÊA, A. D. et al. Determinação de alguns constituintes químicos de interesse nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). **Ciências agrotécnicas**, Lavras, v. 24, n.1, p. 130-135, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. 6v.

COUTINHO, L. M. O conceito do Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, p. 17-23, 1978.

DAI, C.C. et al. A New Scene-Based Non-Uniformity Correction Algorithm for Infrared Focal Plane Array. **Journal of Nanjing Forestry University**, v. 30, p. 79-83, 2006.

DALLI'AGNO, R.; POSER, G.L.V. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 337-341, 2000.

DALPONTE, J. C.; LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora) em um cerrado do Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 325-332, 1999.

DIETZ, J.M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 392, p.1-51, 1984.

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

DESNOTTES, J.F. New targets and strategies for the development of antibacterial agents. **Tibtech**, v.14, p.134-140, 1996.

DONADIO, S. et al. Microbial Technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 187-198, 2002.

EAMES, A.J.; MACDANIELS, L.H. **An introduction to plant anatomy**. 2nd ed. McGraw-Hill, 1947. 135 p.

EINHELLING, F.A. Interaction involving allelopathy in crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, p. 886-893, 1996.

ELIAS, B.C. et al. influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierckx. **Microbiological Research**, v. 103, p. 67-80, 2006.

ELIAS, S. R. M. et al. Leaf anatomy in young plants of *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 3-8, 2003.

EL-NAGGAR, M. Y. Kosinostatin, a major secondary metabolite isolated from the culture filtrate of *Streptomyces violaceusniger* strain HAL64. **Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 262-267, 2007.

EZRA, D. et al. **Archives of Microbiology**, 2004, 150, 785–793.

FAHN, A.; CUTLER, D. **Xerophytes**. Gebruder Borntraeger, 1992. 48 p.

FAULKNER, D. J. **Marine pharmacology**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 77, p. 135-145, 2000.

FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of Filamentous Fungi: technology and products**. Butterworth-Heinemann, 1992. 520p.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v. 122, p. 2999-305, 1992.

FRANCO, A.C.; LÜTTGE, U. Midday depression in savanna trees: Coordinated adjustments in photochemical, efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. **Oecologia**, v. 131, p. 356-365, 2002.

FROST, P. et al. Responses of savannas to stress and disturbance. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 1-82, 1986.

GAMIS, A. S. et al. Disseminated infection with *Fusarium* in recipients of bone marrow transplants. **Review Infect Disease**, v. 13, p. 1077-88, 1991.

GERHARDT, P. et al. **Methods for general and molecular microbiology**. In ASM publication, Washington, D.C., 1994. 791 p.

GOODFELLOW, M.; CROSS, T. Classification. In: GOODFELLOW, M., MORDARSKI, M., WILLIAMS, S. T. (Ed.). **The biology of actinomycetes**. Academic Press, London. 1984. p. 7-164.

GOTTLIEB, D. General consideration and implications of the actinomycetales. In: SYKES, G., SKINNER, F. A. (Eds). **Actinomycetales: Characteristics and practical importance**. London: Academic Press, 1973. p. 1-10.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 66, n. 1, p. 205-210, 1994.

GRAVIUS, B. et al. The 387 Kb linear plasmid pPZG101 of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. **Microbiology**, v. 140, n.9, p. 2271-7, 1994.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology**. John Wiley & Sons, 1994. 458p.

GUARIM NETO, G. 1996. **Plantas medicinais do Estado do Mato Grosso**. ABEAS, 1996. 110 p.

GUARIM NETO, G.; GUARIM, V. L. M. S.; PRANCE, G. T. Structure and floristic composition of the trees of an area of Cerrado near Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Kew Bull**, n. 49, n. 3, p.499-509, 1994.

GULLO, V. P. et al. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 523-531, 2006.

GÜNTNER, C. et al. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1651-1659, 1997.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-1423, 2008.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895 -914, 1997.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMENN, K. **Phytochemistry**, v. 30, 1991. p. 3864.

HARIDASAN, M. Observations on soils, foliar nutrient concentration and floristic composition of Cerrado and cerrado communities in central Brazil. In: FURLEY, P.A.; PROCTOR, J.; RATTER, J.A., (Ed.). **Nature and dynamics of forest-savanna boundaries**. London: Chapman & Hall, 1992. p.171-184.

HECK, M. G. Production of antimicrobial compounds produced by the metabolism of *Streptomyces* sp. strain 2S. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/14342>, 2007.

HEISEY, R. M.; PUTNAM, A. R. Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Natural Products**, v.49, n. 5, p. 859-65, 1986.

HOPWOOD, D. A. Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. **Microbiology**, v. 145, p. 2183–2202, 1999.

HUBER, M.; HUTTER, R.; LERCH, K. The promoter of the *Streptomyces glaucescens* mel operon. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 19, p. 8106, 1987.

INDERJIT; WEINER, J. Plant allelochemical interference or soil chemical ecology?. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. v. 4, n. 1, p. 3-12, 2001.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. (Ed.). **The search bioactive compounds from microorganism**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 281-302.

JAIN, P. K.; JAIN, P. C. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS1322. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 2, p. 203-206, 2007.

Jl, Z. et al. Isolation, structure elucidation and antibacterial activities of streptothricin acids. **Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 5, p.233-237, 2009.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 66, n. 1, p. 50-55, 1994.

KARACAN, C. et al. Evaluation of shigellosis in a Turkish children's hospital. **Pediatrics International**, v. 49, n. 5, p. 589-592, 2007.

KIESER, T. M. J. et al. (Ed.). **Practical Streptomyces genetics**. England: John Innes Centre, 2000. 200 p.

KIM, S. et al. Percinicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 448-450, 2004.

KINASHI, H. Dynamic structural changes of the linear chromosomes of *Streptomyces* and the origin and evolution of chromosomes. **Tanpakushitsu kakusan koso**, v. 43, n. 11, p. 1453-60, 1998.

KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plants roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 1219-1232, 1992.

KOBAYASHI, D. Y; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura. In: BACON, C. W., WHITE, J. F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 199-233.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Medsi, 2001, 1465 p.

KÓNYA, A. et al. Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. **Research in Microbiology**, v. 163, n. 6, p. 624-32, 2008.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M., HARDER, W., SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes**, New York: Springer, 1992. p. 921-995.

KRIEGER, T. J.; HOOK, V. Y. Purification and characterization of a novel thiol protease involved in processing the enkephalin precursor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n.13, p. 8376-83, 1991.

KOZO, O. A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 507-514, 1995.

LACHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, RiMa, 2004. 531p.

LI, J. et al. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 574-80, 2008.

LIN Y. R. et al. *Streptomyces* telomeres contain a promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 3, p. 773-81, 2009.

LIU, N. et al. Bioactivity of endophytic actinomycetes from medicinal plants and secondary metabolites from strain D62. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.47, n. 5, p. 823-827, 2007.

LIU, W. et al. Penicillones A and B, two novel polyketides with tricyclo undecane skeleton, from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. **Tetrahedron Letters**, n. 46, p. 4993-4996, 2005.

LORENZI, H. 1998. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Plantarum, 1998. 302 p.

LU, Y. et al. Characterization and identification of a novel marine *Streptomyces* sp. produced antibacterial substance. **Marine Biotechnology**, v. 5, p. 25-31, 2009.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67–73, 2000.

MAITAN, V. R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Dissertação (Mestrado). Goiás/GO: Universidade Federal de Goiás. 1998.

MALIK, H. et al. Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Indian journal of experimental biology**, v. 46, n. 4, p. 254-257, 2008.

MANDER, P. et al. A novel Ca²⁺-dependent phospholipase D from *Streptomyces tendae*, possessing only hydrolytic activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 10, p. 1461-7, 2009.

MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. In: **Microrganismos Endofíticos**, Embrapa, 1998. 488p.

MORRISON, V.A.; HAAKE, R. J.; WEISDORF, D. J. Non-*Candida* fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. **American Journal of Medicine**, v. 96, p. 497-503, 1994.

MOTIDOME, M.; LEEKNING, M. E.; GOTTLIEB, O. R. A química das Solanaceas brasileiras I. A presença de solamargina e de solasodina no juá e na lobeira. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 375-376, 1970.

MURAKAMI, R. et al. A-94964, a novel inhibitor of bacterial translocase I, produced by *Streptomyces* sp. SANK 60404. I. Taxonomy, isolation and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 9, p. 537-544, 2008.

NAKAMURA, G. Studies on antibiotic actinomycetes. II. On *Streptomyces* producing a new antibiotic tubercidin, **Journal of Antibiotics**, v. 14, p. 90-93, 1961.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

NUCCI, M. et al. Nosocomial outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with contamination of hospitalar water. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 1475-80, 2002.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. **Alterações pós-colheita da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Lavras/MG: Universidade Federal de Lavras. 2002.

ONAKA, H. et al. Goadsporin, a chemical substance wich promotes secondary metabolism and morfogenesis in Streptomyces. I. Purification and characterization. **Journal of Antibiotics**, v. 54, n. 12, p. 1036-44, 2001.

PAGANO, S. N.; CESAR, O.; LEITÃO-FILHO, H. F. Composição florística do estrato arbustivo-arbóreo da vegetação de cerrado da área de proteção ambiental (APA) de Corumbataí - Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 49, n. 1, p. 37-48, 1989.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos**. Embrapa – CNPAB, 1996. 20p.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H., HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 197.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. Tese (Doutorado em Ciências biológicas). Paraná: Universidade Federal do Paraná. 2006.

PLOTKIN, M. J. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. Cambridge University Press, 1991. p. 5364.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, A. P. **Flores e frutos do cerrado**. Editora Universidade de Brasília, 2000. 226p.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMON, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 577-583, 1997.

OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Effect of *Solanum lycocarpum* fruit extract on sesame seed germination and seedling growth. **Journal of allelopathy**, v. 13, n. 2, p. 201- 210, 2004.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009.

RATTI, R. P. et al. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian Tropical Savannah plants against *Staphylococcus* coagulase positive strain. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease**, v. 14, n. 2, p. 294-302, 2008.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa, 1998. p. 87-166.

ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 90, p. 521-528, 1993.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMs Microbiol Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SALERMO, M. I.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **New Phytopathology**, v. 146, p. 317-324, 2000.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES C. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFRGS, 1999. p. 333-364.

SERRANO, N. F. G. **Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endofítico isolado de *Prunus* spp.** Dissertação (Mestrado). São Carlos/ SP: Universidade Federal de São Carlos, 2009.

SHIMOTSU, H.; TAKAHASHI, H.; SAITO, H. A new site-specific endonuclease Stul from *Streptomyces tubercidicus*. **Gene**, v. 11, n. 4, p. 219-25, 1980.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.

SILVA, D.B. et al. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológica, 2001. 179p.

SILVA, J.A. et al. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 166p.

SMULSON, M. E.; SUHADOLNIK, R. J. The biosynthesis of the 7-deazaadenine ribonucleoside, tubercidin, by *Streptomyces tubercidicus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 12, p. 2872-6, 1967.

SOUZA, R. F. et al. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2774-2778, 2008.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SPRENT, J. I., JAMES, E. K. N-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRICK, I., DEL GALLO, M., VANDERLEYDEN, J., DE ZAMAROCZY, M. (Ed.). **Azospirillum VII and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 15-29.

STEFANI, R.; NASCIMENTO, G. B. D. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas com auxílio de computador: evoluções recentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1347-1356, 2007.

STROBEL, G. A. et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Microbiology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society for Microbiology**, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 67, p. 491-502, 2003.

SUI, Q. et al. Extraction and structural identification of the antifungal metabolite of *Streptomyces lydicus* A02. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 25, n. 6, 840-846, 2009.

TAJIKI, T. et al. Novel amino acid metabolite produced by *Streptomyces* sp.: I. Taxonomy, isolation, and structural elucidation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 1007-10, 1997.

VERMA, V. C. et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 749-756, 2009.

VIEIRA, K. V. M. et al. Propriedades antimicrobianas de *Streptomyces* isolados de solos do Estado da Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 6, n. 3, p. 249-258, 2002.

XIE, Y. et al. Sansanmycins B and C, new components of sansanmycins. **Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 4, p. 237-240, 2008.

WARD, O. P. Biochemical separation. In: REINHOLD, V. N. **Bioprocessing**, New York, 1991. P. 55-72.

WEBER, D. et al. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli*. **Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 559–563, 2004.

WICKLOW, D.T. et al. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, n. 5, p. 610-618, 2005.

WILLIAMS, D. H. et al. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. **Journal of Natural Products**, v. 52, n.6, p.1189-1208, 1989.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **OIKOS**, v. 73, p. 274-276, 1995.

WU, Y. et al. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. **Current Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 475-482, 2009.

YOO, J. C. et al. Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from *Streptomyces tubercidicus*, a producer of tubercidin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 6, p. 692-7, 1998.

YOO, J. C.; YUNG, C. H.; SOON, W. H. Quantitative Analysis of Tubercidin in *Streptomyces tubercidicus* Cultures by High Pressure Liquid Chromatography . **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 7, n.1, p. 151-158, 1984.

YOO, J. C. et al. Purification and characterization of GTP cyclohydrolase I from *Streptomyces tubercidicus*, a producer of tubercidin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 21, n. 6, p. 692-697, 1998.

ZEGLEN, S. et al. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* colonizations/infections in lung transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 41, n. 8, p. 3222-3224, 2009.

ZINNIEL, D. K. et al. 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.