

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

TESE DE DOUTORADO

**Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *Moringa oleifera*
Lam. em três localidades do Estado de Pernambuco e avaliação dos
metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos**

IGOR FELIPE ANDRADE COSTA DE SOUZA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva

Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo

**Recife
2016**

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

**Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* Lam. em
três localidades do Estado de Pernambuco e avaliação dos metabólitos
secundários produzidos por esses micro-organismos**

IGOR FELIPE ANDRADE COSTA DE SOUZA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, PPGCB, da Universidade
Federal de Pernambuco, UFPE, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva

Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo

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

Souza, Igor Felipe Andrade de Costa

Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *Moringa oleifera* Lam. em três localidades do Estado de Pernambuco e avaliação dos metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos / Igor Felipe Andrade de Costa. – Recife: O Autor, 2016.

126 f.: il.

Orientador: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Patrícia Maria Guedes Paiva, Janete Magali de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referências

1. Bactérias 2. Plantas 3. Biotecnologia I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orient.) II. Paiva, Patrícia Guedes (coorient.) III. Araújo, Janete Magali (coorient.) IV. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-103

**Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* Lam. em
três localidades do Estado de Pernambuco e avaliação dos metabólitos
secundários produzidos por esses micro-organismos**

IGOR FELIPE ANDRADE COSTA DE SOUZA

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, PPGCB, da Universidade
Federal de Pernambuco, UFPE, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em: 26/02/2016

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

*À minha mãe e ao meu pai,
pelo apoio, incentivo, confiança, entendimento, disponibilidade e amor
para que eu pudesse conquistar mais esta vitória,
pois sendo (d)eles o que de melhor há em mim,
dedico este trabalho.*

Agradecimentos

A Deus, pelas maravilhas realizadas em minha vida, sempre me guiando e me protegendo e, que por Sua infinita bondade, me concedeu o Dom da vida por duas vezes. Agradeço pela abençoada família e amigos que tenho, por permitir a conclusão de mais essa etapa em minha vida e pelo início de uma nova, sempre tendo me servido como esperança de que o melhor sempre há de vir. Permitindo-me crer que 'tudo posso Naquele que me fortalece'. Obrigado Senhor!

À minha mãe, Maria de Fátima, modelo de mulher, mãe, esposa e amiga, e que num total desprendimento e enorme prova de amor, serviu de instrumento para que eu pudesse vir a viver não somente uma vez, mas sim duas. Tenho, assim, orgulho de ter sido gerado por ela. Obrigado pelo seu amor!

Ao meu pai, Paulo Roberto, por ter me proporcionado a educação, a moral, a ética e tudo de honroso que aprendi em minha caminhada até hoje. Sempre lutando e ensinado a lutar por aquilo que acreditamos ser o certo. Obrigado por tudo!

Ao meu irmão, Iury, pelos momentos de brincadeiras, confiança e aprendizados que passamos juntos em nossas vidas, criando laços fraternais que durarão eternamente. Obrigado, maninho!

À minha família, em geral, por ter sempre me mostrado que sozinho não somos nada. Obrigado pela unidade!

Aos professores que passaram em minha vida, mediando conhecimentos, abrindo portas e mostrando caminhos que me permitiram chegar até aqui. Acredito ser o fruto de vossa árdua, porém graciosa e encantadora, missão: ensinar! Aos mestres, com carinho!

À professora doutora Luana Cassandra que sempre acreditou que eu seria capaz, com responsabilidade e comprometimento, de alcançar a sua expectativa e realizar um bom trabalho 'na' ciência e 'pela' ciência. Agradeço a orientação científica, o carinho, o respeito, a confiança, o incentivo, a torcida e o exemplo de ser humana e cristã que levarei para sempre em minha vida! Abraços e bênçãos!

À professora doutora Janete Magali, por ter sido a primeira a acreditar na minha capacidade de trabalhar com os micro-organismos e, também, pela coorientação, disponibilidade, atenção e interesse que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Seu grande amor pelas actinobactérias me contagiou e, hoje, sou um fiel discípulo de seus conhecimentos e ensinamentos sobre esse mundo invisível aos nossos olhos. Obrigado pelo exemplo!

À professora doutora Patrícia Paiva, por sua coorientação e disponibilidade, contribuindo com o meu aprendizado durante todo o período do Mestrado e Doutorado. Obrigado pela atenção!

Às professoras doutoras Vera Lúcia, Norma Buarque, Marcia Vnusa e Gláucia Manoella, por terem aceitado fazer parte deste momento, que com suas contribuições ajudarão no aprimoramento final deste trabalho. Obrigado pela disponibilidade!

Ao 'anjo' Thiago Napoleão, pela total amizade, ajuda, disponibilidade, companheirismo e ensinamentos durante o Mestrado, que se estendeu ao Doutorado, sem nunca ter me negado um favor. Esses seis anos me fizeram acreditar e admirar a grandiosidade e a capacidade de generosidade que pode existir num ser humano, afinal você foi a maior prova disso. Sou feliz por tê-lo conhecido e levarei comigo a honra, o orgulho e a alegria de ser amigo deste ser iluminado. Obrigado por tudo!

As amigas, companheiras, irmãs, confidentes e "pau pra toda obra" Maria Cláudia e Rosilma, pelos momentos de paciência que tivemos que ter dentro do laboratório, pelas risadas sem fim, pelas fofocas compartilhadas, pelas "CR" recebidas juntos, pelas infinitas placas de Petri distribuídas, pelos meios de culturas feitos, autoclaves fiscalizados, materiais descontaminados e manutenção dos benditos micro-organismos. Sempre fazendo dos meus dias no laboratório mais leves e iluminados. Vocês foram especiais nessa minha caminhada rumo à conquista desse doutorado. Nunca duvidei da torcida de vocês e essa vitória é NOSSA! Obrigado, amigasss!

Ao coorientando que virou irmão, Vinícius Jackes. Ser iluminado que com seu jeito cativante e prestativo a todos conquista. Agradeço os momentos ímpares e singulares de extrema alegria e sorriso que dividimos nesse um ano e meio de convivência. Muito desse trabalho dedico a você. Sua ajuda foi fundamental. Acredito que no dicionário da vida dele não exista a palavra "NÃO", sempre disposto a ajudar e contribuir para o bem estar de todos. Pessoa que admiro pela essência, educação e gentileza peculiares a sua personalidade. Desejo só o seu sucesso. Abraço do seu "chefinho"!

Aos amigos especiais que conquistei durante a graduação, o Mestrado e Doutorado: Raiana Apolinário, Arthur Clark, André Cavalcanti, Raphael Douglas, Erica Fernandes, Felipe Rocha, Renata Ramos, Emmanuel Pontual, Lidiane Pereira, Nataly Santos, Luciana Luz, Kézia Moura, Livia Lais, Maiara Moura, Danielli Matias, Idila Araujo, Pérsio Alexandre, Camila Borba, Nelânia Baptista, Glêzia Renata, Bruna Cordeiro, Diana Duarte, Danielle Sá, Evelynne Solidônio, Erik Jonne, Maira Callou, Robson Cavalcanti, Raul Felipe, Livia Caroline, Erika Lima, Nataliane Marques e Raphael Ferrer, a todos vocês que me mostraram, em diferentes situações, que a máxima de que 'a união faz a força' é verdadeira. Apreendi muito com vocês, e levarei sempre o jeito e o sorriso especial de cada um. Obrigado por fazerem parte da minha história!

A todos aqueles que fazem e fizeram parte do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos, em especial a professora Kesia Xisto, por me receber carinhosamente em seu laboratório e permitir a execução de todo esse trabalho. Agradeço a confiança, o respeito, o incentivo, o cuidado e o carinho dispensados a mim nesses oito anos de intensa convivência diária. Obrigado pelo fraterno acolhimento e ensinamentos, querida professora!

Aos alunos de graduação, que de alguma maneira pude contribuir em suas respectivas trajetórias, colaborando para a realização e o sucesso de cada um. Tenham certeza que quem mais ganhou nessa troca fui eu em poder conhecer vocês, pessoas interessadas em fazer parte da ciência e que MUITO contribuíram na realização dessa Tese de Doutorado. Meu sincero e

forte abraço de agradecimento a cada um de vocês: Raissa Ximenes, Paula Burgos, Kalebe Silva, Guilhermy Victor, Silvio Marçal.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial a Luis Carlos pela ajuda e disponibilidade; e à secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Adenilda Lima, pelo interesse, preocupação, respeito, carinho e ajuda nessa caminhada durante o Mestrado e Doutorado. O meu sincero obrigado!

A todos os amigos e pessoas, que porventura eu tenha me esquecido de citar, por terem feito ou fazerem parte direta ou indiretamente da minha vida. Muito obrigado!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da Bolsa de Pós-Graduação.

A gratidão é o único tesouro dos humildes...
William Shakespeare

*Agir, eis a inteligência verdadeira.
Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga,
mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 <i>Moringa oleifera</i> Lamarck.....	19
2.1.1 Características Botânicas.....	20
2.1.2 O Cultivo de <i>M. oleifera</i>	22
2.1.3 A Multiplicidade de Usos da <i>M. oleifera</i>	23
2.1.3.1 A <i>M. oleifera</i> na Alimentação Humana e Animal.....	23
2.1.3.2 A <i>M. oleifera</i> na Medicina.....	26
2.1.3.3 A <i>M. oleifera</i> no Tratamento de Água e Efluentes e na Purificação de Alimentos.....	29
2.1.3.4 A <i>M. oleifera</i> como Inseticida.....	31
2.1.3.5 A <i>M. oleifera</i> com Outras Utilidades.....	31
2.1.4 A <i>M. oleifera</i> no Brasil.....	32
2.2 Micro-organismos Endofíticos.....	33
2.2.1 Micro-organismos Endofíticos x Micro-organismos Patogênicos.....	35
2.2.2 Entrada e Localização dos Micro-organismos Endofíticos nos Vegetais.....	36
2.2.3 Interações dos Micro-organismos Endofíticos com as Plantas Hospedeiras.....	38
2.2.4 Isolamento de Micro-organismos Endofíticos.....	38
2.2.5 Diversidade dos Micro-organismos Endofíticos...	40
2.2.5.1 A Utilização da Biologia Molecular como Aliada na Determinação da Diversidade de Micro-organismos Endofíticos.....	42
2.2.6 Importância Biotecnológica dos Micro-organismos Endofíticos.....	44
2.2.6.1 Importância dos Micro-organismos Endofíticos na Agricultura.....	44
2.2.6.1.1 Micro-organismos Endofíticos Promotores do Crescimento Vegetal.....	45
2.2.6.2 Micro-organismos Endofíticos como Agentes no Controle de Patógenos.....	47
2.2.6.3 Micro-organismos Endofíticos no Controle da Herbivoria por Insetos.....	49
2.2.6.4 Micro-organismos Endofíticos no Controle de Fitonematóides.....	50
2.2.6.5 Micro-organismos Endofíticos Produtores de Enzimas.....	51

2.2.6.6 Micro-organismos Endofíticos Produtores de Fármacos.....	51
2.3 As Actinobactérias.....	53
2.3.1 Taxonomia.....	55
2.3.2 Ciclo de Vida.....	57
2.3.3 Isolamento e Identificação de Actinobactérias.....	59
2.3.4 Importância Biotecnológica das Actinobactérias..	63
2.3.5 As Actinobactérias Endofíticas.....	64
2.4 Metabólitos Secundários.....	66
2.4.1 Importância do Estudo de Metabólitos Secundários de Origem Microbiana.....	67
2.4.2 Principais Produtores de Metabólitos Secundários Microbianos.....	68
2.4.3 Produção <i>In Vitro</i> de Metabólitos Secundários Microbianos.....	69
2.4.3.1 Avaliação da Bioatividade dos Metabólitos Secundários Microbianos.....	72
2.4.4 Aplicações dos Metabólitos Secundários de Micro-organismos Endofíticos.....	73
3. OBJETIVOS.....	78
3.1 Objetivo Geral.....	78
3.2 Objetivos Específicos.....	78
4. REFERÊNCIAS.....	79
Capítulo 1.....	116
Capítulo 2.....	124
Capítulo 3.....	138
Capítulo 4.....	158
5. CONCLUSÕES.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	-	Ácido Abscísico (Hormônio vegetal)
ACC	-	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (Enzima vegetal)
AIA	-	Ácido Indol-3-Acético (Hormônio vegetal)
CG	-	Citosina-Guanina
CVC	-	Clorose Variegada dos Citros
DGGE	-	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês, <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DQO	-	Demanda Química de Oxigênio
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENAM	-	Encontro Nacional de Moringa
FISH	-	hibridização fluorescente in situ (do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
HGT	-	Transferência Genética Horizontal (do inglês, <i>Horizontal Gene Transfer</i>)
HTS	-	Triagem robotizada de alto rendimento (do inglês, <i>High Throughput Screening</i>)
IC₅₀	-	Concentração de Inibição média
IRS	-	Indução de Resistência Sistêmica
L1, I2, L3 e L4	-	4 Estágios larvais
Lam.	-	Lamarck
Mb	-	Megabases
MRSA	-	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (do inglês, <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pH	-	potencial Hidrogeniônico
rpm	-	rotações por minuto
rRNA	-	Ácido Ribonucléico ribossomal (do inglês, <i>ribosomal Ribonucleic Acid</i>)
sp.	-	Espécie
spp.	-	Espécies
UFPE	-	Universidade Federal de Pernambuco
UI	-	Unidades Internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tronco único e de pequeno porte da <i>M. oleifera</i>	20
Figura 2 – Folha peciolada e composta da <i>M. oleifera</i>	21
Figura 3 – Flores brancas da <i>M. oleifera</i>	21
Figura 4 – Frutos e sementes de <i>M. oleifera</i> . Em “A”, observa-se vagens verdes; em “B”, vagens secas; e em “C”, as sementes da <i>M. oleifera</i>	22
Figura 5 – O polígono da seca corresponde a uma área de 895.254,40km ² , englobando os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Piauí, caracterizado pelo clima semiárido, chuvas irregulares e por um amplo quadro de subdesenvolvimento (SOARES, 2013).....	33
Figura 6 – A raiz, como porta de entrada mais comum, e as principais rotas de disseminação e localização dos micro-organismos no interior do vegetal...	37
Figura 7 – Emergência de micro-organismos endofíticos presentes nos fragmentos de folhas após incubação.....	40
Figura 8 – Fórmula molecular do taxol.....	52
Figura 9 – Semelhança existente entre a micromorfologia filamentosa dos fungos (em “A”, <i>Exserohilum rostratum</i>) e das actinobactérias (em “B”, <i>Nocardia</i> sp.).....	54
Figura 10 – Ciclo de vida do <i>Streptomyces</i> sp.	58
Figura 11 – Crescimento de actinobactéria em meio líquido. O tubo “A”, apresenta o meio Ágar Malte Levedura (ISP-2) estéril e límpido; o tubo “B” foi inoculado com <i>Staphylococcus aureus</i> , e após incubação, apresentou crescimento da bactéria em toda a extensão do meio; e o tubo “C”, com a actinobactéria, observa-se um sedimento algodonoso.....	61
Figura 12 – Micrografia do <i>Penicilium notatum</i> , primeiro micro-organismo, no qual se observou a produção de um metabólito secundário com atividade biológica.....	67
Figura 13 – Curva de crescimento bacteriano, em destaque o momento de maior biossíntese de metabólitos secundários.....	69
Figura 14 – Fórmulas químicas dos fármacos oriundos de metabólitos secundários. Penicilina G (A); cefalosporina C (B); ácido clavulônico (C); bleomicina B ₂ (D); mitomicina C (E); rapamicina (F); ciclosporina A (G); e ascomicina (H).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição nutricional de folhas frescas e secas da <i>M. oleifera</i> (em 100g de porção comestível).....	23
Tabela 2 – Análise comparativa de nutrientes presentes em folhas frescas e secas da <i>M. oleifera</i> e de outros alimentos.....	24
Tabela 3 – Composição química dos tipos de parede celular dos grupos mais representativos de actinobaactérias.....	55
Tabela 4 – Alguns compostos produzidos por actinobactérias endofíticas e suas respectivas atividade biológica.....	68

RESUMO

Moringa oleifera Lamarck é uma planta pertencente à Família das Moringaceae, caracterizada como uma planta arbórea. Os vegetais possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e manutenção. Sendo esses micro-organismos denominados de endofíticos. Destaca-se a presença das actinobactérias, como produtores de metabólitos bioativos. O presente trabalho teve por objetivo a bioprospecção, através do isolamento, da identificação e da avaliação de actinobactérias endofíticas isoladas de folhas da *M. oleifera*. As folhas foram coletadas no *campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco, no Jardim Botânico do Recife do Recife e na cidade de Caruaru no Estado de Pernambuco, Brasil. Sendo processadas no prazo de 24 horas, através da metodologia de desinfecção. O isolamento foi realizado por maceração. A observação macroscópica foi realizada através da observação de características das colônias. A caracterização micromorfológica foi realizada através da técnica de microcultivo em placa. Testes fenotípicos para classificação taxonômica foram realizados. A análise do potencial de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana foi realizada através de uma seleção primária em meio sólido, pela técnica do “Teste em Bloco de Gelose”. A actinobactéria endofítica selecionada no ensaio primário como melhor produtora do composto bioativo, foi cultivada em meios líquidos e testada contra micro-organismos testes. A Atividade antimicrobiana durante a fermentação foi avaliada através do teste de Difusão em Ágar. Foram isolados 33 actinobactérias endofíticas, sendo 21 (63,6%) linhagens provenientes das folhas coletadas da *M. oleifera* no Jardim Botânico do Recife; 8 (24,2%), no *campus* Recife da UFPE; e 4 (12,2%), na Cidade de Caruaru. A análise macroscópica verificou-se que não houve diversidade em relação aos aspectos observados. A análise microscópica permitiu inferir que em apenas 13 (39,4%) isolados foi possível determinar o gênero, sendo eles: *Streptomyces* e *Actinomadura*. Os ensaios fenotípicos foram inconclusivo diante da diversidade de gêneros pertencentes ao Filo Actinobacteria. Das 33 actinobactérias, 21(62,6%) apresentaram atividade inibitória sobre o fungo filamentoso. Apenas 5(15,2%) isolados apresentaram atividade sobre os micro-organismos testes Gram-negativos. Os micro-organismos testes Gram-positivos foram bastante sensíveis quando do teste de inibição, apresentando halos médio de até 35mm. A ação sobre o *Mycobacterium smegmatis* foi observada em representantes de todos os grupos isolados. Sobre as leveduras, observa-se que 5(12,2%) actinobactérias endofíticas apresentaram atividade insignificante frente a esses micro-organismos testes. No ensaio primário, não houve produção de compostos bioativos nos meios de cultivo: ISP-1, ISP-4, Meio Khanna, ALA, AVP, BDA, CAA, GAA, YCED, pelo *Strptomyces* sp. CC4. Através da análise estatística, observou-se que os meios K e MPE são os melhores estatisticamente. Durante o processo de extração do princípio ativo, observou-se que este encontra-se na biomassa, sendo o metanol o melhor solvente extrator. A análise qualitativa da atividade antimicrobiana demonstrou que as actinobactérias isoladas das folhas de *M. oleifera* possuem potencial biotecnológico na produção de compostos bioativos com ação farmacológica.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*; endofíticos; actinobactérias; *Streptomyces* sp.; atividade antimicrobiana; atividade enzimática; biotecnologia.

ABSTRACT

Moringa oleifera Lamarck is a plant belonging to the family of Moringaceae characterized as a woody plant. Plants have a characteristic microbiota that is important for your health and maintenance. And these micro-organisms called endophytes. There is the presence of actinomycetes as producers of bioactive metabolites. This study aimed to bioprospecting, through the isolation, identification and evaluation of endophytic actinomycetes isolated from leaves of *M. oleifera*. The leaves were collected in Recife *campus* of the Federal University of Pernambuco, in the Botanical Garden of Recife Recife and the city of Caruaru in Pernambuco State, Brazil. Being processed within 24 hours methodology by disinfection. The isolation was carried out by maceration. Macroscopic observation was performed by observing the characteristics of the colonies. The micromorphological characterization was performed by microculture plate technique. phenotypic tests for taxonomic classification were performed. The analysis of metabolites with antimicrobial activity production potential was performed by a primary selection in solid medium, the technique of "Test agar block." The endophytic actinobacteria selected in the primary test as the best producer of the bioactive compound, was cultured in liquid media and tested against microorganisms tests. The antimicrobial activity during fermentation was evaluated using the diffusion test in agar. 33 endophytic actinomycetes were isolated, 21 (63.6%) strains collected from the leaves of *M. oleifera* in the Botanical Garden of Recife; 8 (24.2%) in Recife UFPE campus; and 4 (12.2%) in the city of Caruaru. Macroscopic analysis showed that there was no diversity with respect to observed aspects. Microscopic analysis allowed to infer that in only 13(39.4%) isolates were unable to determine the genre, namely: *Streptomyces* and *Actinomadura*. Phenotypic tests were inconclusive given the diversity of genres belonging to the phylum Actinobacteria. Of the 33 actinomycetes, 21(62.6%) had inhibitory activity against the filamentous fungus. Only 5(15.2%) isolates showed activity against microorganisms Gram-negative tests. Microorganisms Gram-positive tests were sensitive enough when the inhibition test, showing halos average of up to 35mm. Action on *Mycobacterium smegmatis* was observed in representatives of all isolated groups. On the yeast, it is observed that 5(12.2%) endophytic actinomycetes showed negligible activity against these microorganisms tests. In the primary test, there was no production of bioactive compounds in culture media: ISP-1, ISP-4, Khanna, ALA, AVP, BDA, CAA, GAA, YCED by *Streptomyces* sp. CC4. The statistical analysis showed that media K and MPE are the best statistically. During the extraction process the active ingredient, it was observed that this is the biomass, methanol being the best extraction solvent. Qualitative analysis of antimicrobial activity showed that the isolated actinomycetes of *M. oleifera* leaves have biotechnological potential in the production of bioactive compounds with pharmacological action.

Keywords: *Moringa oleifera*; endophytic; actinomycetes; *Streptomyces* sp.; antimicrobial activity; enzymatic activity; biotechnology.

1. INTRODUÇÃO

Moringa oleifera Lamarck é uma planta pertencente à Família Moringaceae, caracterizada como uma planta arbórea, com longas vagens, sementes aladas, folhas grandes bipinadas e flores brancas perfumadas. É um vegetal tropical, nativo da Índia e encontrado em muitos países da África, Ásia e América do Sul. Pode alcançar 12m de altura, gerando flores e frutos em um ano depois de plantada; sendo possível múltiplas colheitas anuais de sementes. O seu elevado cultivo se deve à grande capacidade de adaptação a condições climáticas e a solos áridos, aliada à possibilidade de aproveitamento de todas as partes desse vegetal (PAIVA et al., 2011; AGRA-NETO et al., 2014).

A moringa apresenta excelente potencial para uso na alimentação humana, animal, indústria de cosméticos, tratamento de água, produção de biodiesel, na medicina, na indústria farmacológica, entre outros (PASSOS et al., 2012; YASMEEN et al., 2013).

Os vegetais possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e sobrevivência, sendo esses micro-organismos denominados de endofíticos, cujo significado dessa terminologia é 'dentro da planta' (do grego, *endon*, no interior de; *phyton*, planta). São considerados micro-organismos endofíticos, aqueles organismos que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de um vegetal, sem causar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros, podendo ser encontrados em folhas, sementes, ramos e raízes. A relação entre o endofítico e a planta é considerada não patogênica e os micro-organismos não são saprófitos, pois estão em associação com tecidos saudáveis. Eles se favorecem da proteção do vegetal e recebem nutrientes, com consequente produção de compostos químicos, como antibióticos e enzimas, que em determinadas condições protegem e auxiliam a planta (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007).

A diversidade genética da microbiota residente nos vegetais, com capacidade de prover compostos de estruturas diversificadas e diferentes bioatividades, apresenta-se como fonte potencial de aplicação para a produção em larga escala de produtos de alto valor agregado e como uma nova possibilidade de estudo, no que se refere às interações desses metabólitos com o ecossistema (JI et al., 2014).

Algumas bactérias, fungos e protozoários podem ser encontrados como organismos endofíticos. Contudo, destaca-se a presença das actinobactérias, visto que elas são um dos maiores produtores de metabólitos bioativos com aplicações na medicina e na indústria (POSADA & VEJA, 2005; NAIR & PADMAVATHY, 2014).

Os micro-organismos endofíticos constituem uma valiosa fonte para obtenção de novas biomoléculas com diferentes e variadas propriedades (FIRÁKOVA et al., 2007), sendo que muitas das espécies isoladas são reconhecidas como produtoras de metabólitos secundários com atividade biológica, os quais podem resultar em importantes e raros compostos, os quais são produzidos apenas pelas plantas hospedeiras (TURGEON & BUSHLEY, 2010).

A produção de metabólitos secundários pelos micro-organismos endofíticos é influenciada pelas condições ambientais, bem como pelo estado fisiológico do hospedeiro, sendo que alguns destes fatores são capazes de alterar as condições internas da planta, com consequente mudança do ambiente ao redor do endofítico, que para se adaptar a essa nova condição, pode produzir compostos que irão favorecer o processo de produção de substâncias bioativas (AZEVEDO et al., 2002; DAVIES, 2013).

É evidente a crescente dificuldade em isolar um composto com atividade antimicrobiana ainda desconhecida, porém a pesquisa por novos antibióticos continua, e antimicrobianos inéditos têm sido isolados e relatados na literatura mundial, a partir da fermentação de várias espécies de actinobactérias, principalmente as do gênero *Streptomyces* (SHIOMI et al., 2005; KUROSAWA et al., 2006; HAYAKAWA et al., 2007).

As actinobactérias endofíticas possuem a capacidade de produzir metabólitos secundários com estruturas e propriedades diferenciadas e que tem alta capacidade de inibição contra micro-organismos patogênicos (DAVITT et al, 2010). Outros compostos produzidos que possuem aplicações farmacológicas e industriais são as enzimas, agentes imunomoduladores e inibidores enzimáticos (NEVES, 2008).

Esses compostos que apresentam alta diversidade química, especificidade bioquímica e elevada afinidade quanto à ligação com receptores específicos (MOLINARI, 2009). Além disso, apresentam outras propriedades que denotam a sua importância na busca por novos compostos bioativos, como a complexidade e singularidade estrutural, associada ao amplo potencial biológico; são as principais

fontes de farmacóforos (KNIGHT et al., 2003); auxiliam na descoberta de novos mecanismos de ação de fármacos (URIZAR et al., 2002); e atuam como modelo no desenho de compostos sintéticos (KNIGHT et al., 2003).

Portanto, os micro-organismos apresentam-se como uma fonte promissora na busca de diversos metabólitos biologicamente ativos e têm gerado alguns dos mais importantes produtos para a indústria farmacêutica, com diversas aplicações, como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, inibidores enzimáticos, agentes estimulantes da mobilidade gástrica, fármacos hipocolesterolêmicos, inseticidas, herbicidas e antiparasitários, dentre outras (DEMAIN & SANCHEZ, 2009).

Portanto, a presente tese de doutorado teve por objetivo a bioprospecção, através do isolamento, da identificação e da avaliação do potencial biotecnológico, na produção de compostos bioativos, de actinobactérias endofíticas isoladas de folhas da *M. oleifera*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Moringa oleifera* Lamarck

A *M. oleifera* Lam. é uma espécie da família Moringaceae, a qual possui um único gênero (*Moringa*), com quatorze espécies arbóreas e arbustivas. Este vegetal é originário do Nordeste indiano, e amplamente cultivado nos trópicos de todo o mundo, com desenvolvimento em climas úmidos ou quentes, podendo sobreviver em solos pouco férteis e secos, sem grandes cuidados e por longos períodos de estiagem. Seu crescimento é rápido, seja a partir de suas sementes ou de enxertos, produzindo flores e frutos dentro de um ano de plantio (ANWAR et al., 2007; POPOOLA et al., 2013).

É conhecida popularmente por moringa, cedro, moringueiro, lírio branco, quiabo-de-quina, acácia-branca e árvore-rabanete-de-cavalo (RANGEL, 2009; AMAGLO et al., 2010; PASSO et al., 2012), dentre outras denominações, para alguns, é conhecida como “*drumstick*” ou “bastão de tambor” devido ao formato de seus frutos; “rabanete picante”, por conta do gosto de suas raízes. Em algumas partes do oeste da África, é conhecida como “a melhor amiga da mãe”, como uma indicação de que a população local conhece muito bem todo o seu valor nutritivo (RANGEL, 2009).

Quase todas as suas partes são utilizadas como alimentos, medicamentos e para fins industriais (KHALAFALLA et al., 2010), inclusive seu cultivo na Índia e na África se dá em áreas próximas a cozinha e quintais, o que possibilita o uso diário de suas folhas em sopas, molhos e saladas (RANGEL, 2009). O interesse pelo seu cultivo tem se estendido a países onde ela não é nativa (ODURO et al., 2008), devido às propriedades nutricionais, terapêuticas e profiláticas, além das alegações de aumento de produtividade na pecuária (MOYO et al., 2012; NOUMAN et al., 2014; YASSA & TOHAMY, 2014).

Historicamente, a planta já era utilizada no mundo antigo por romanos, gregos e egípcios com os mais diversos fins (PRABHU et al., 2011). Contudo, ela foi fortemente difundida durante a colonização inglesa nos continentes africano e asiático, durante o século XIX, quando os viajantes levaram suas sementes da Índia para a África Oriental, principalmente para o Sudão. As propriedades do óleo de

suas sementes aumentaram consideravelmente seu valor comercial, pois foi observado que poderia ser utilizado no mecanismo de precisão dos relógios, por manter a lubrificação mais eficiente devido ao fato de não secar. Durante a Primeira Guerra Mundial servia como um dos ingredientes na fabricação de sabão. No final do século XIX, foi introduzida na América Central (Guatemala) a partir do Haiti. O cultivo da *M. oleifera* se estende, atualmente, pela Ásia, África e Américas Central e do Sul (DAHOT, 1998).

No Brasil, a introdução da árvore limitou-se aos objetivos de ornamentação nos parques públicos. Todavia, apesar de ser exótica, já pode ser encontrada em diversas regiões do semiárido brasileiro, visto que consegue tolerar o estresse hídrico e é halofílica (ANWAR & BHANGER, 2003).

2.1.1 Características Botânicas

A moringa pertence à Sub-classe Dilleniidae, Classe das Magnoliophyta, Ordem Capparidales e Família Moringaceae (SOUSA, 2001).

Dentro das suas principais características botânicas, apresenta um tronco único, de pequeno porte, sendo bem menor no Brasil do que na Índia. Possui caule delgado (até 10cm), muitas vezes único, e copa aberta, em forma de sombrinha (Figura 1) (LORENZI & MATOS, 2002). O seu crescimento é bastante rápido (1,5cm por dia), podendo a planta atingir cerca de doze metros de altura. Apresenta uma casca espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara externamente e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelado, com presença de látex. Em sua medula central, há uma grande quantidade de mucilagem, rica em arabinose, galactose e ácido glucurônico (SILVA e KERR, 1999; CYSNE, 2006).



Figura 1 – Tronco único e de pequeno porte da *M. oleifera*
Fonte: O Autor

Suas folhas são verdes pálidas, decíduas, alternadas, pecioladas e compostas, como pode ser observada na Figura 2, podendo ou não apresentar estipula, mucilagem epidérmica, estômatos ou pêlos. Os folíolos laterais possuem formas elípticas enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que os laterais. Possuem, em seus mesófilos cristais de cálcio (SILVA e KERR,1999; CYSNE, 2006; MOYO et al., 2011).



Figura 2 – Folha peciolada e composta da *M. oleifera*
Fonte: O Autor

As flores (Figura 3) são diclamídeas, ou seja, o perianto dividiu-se em cálice e corola. São ainda monoclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa, as chamadas panículas. O androceu apresenta estaminóides e estames. O gineceu é sincárpico, tricarpelar, gamocarpelar, uniloculado, plurióvulado, com ovário súpero, e apresenta placentação parietal. A polinização é efetuada principalmente pelos insetos da Ordem Hymenoptera. Em lugares onde o índice pluviométrico é maior do que 600mm por ano, as árvores estão sempre floridas; caso contrário, a planta só se reproduz na estação chuvosa (CÁRCERES et al., 1991; ALHAKMANI et al., 2013).



Figura 3 – Flores brancas da *M. oleifera*
Fonte: O Autor

O fruto possui uma cor verde a marrom esverdeado, formato triangular e se quebra longitudinalmente em três partes quando seco, sendo deiscente (Figura 4A e 4B). É uma cápsula, têm aproximadamente de trinta a cento e vinte centímetros de

comprimento e 1,8cm de espessura. Os frutos contêm de 10 a 20 sementes oleaginosas, as quais são globóides, escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa, o núcleo é encoberto por uma concha sendo trialadas e medindo até 1cm de diâmetro (Figura 4C) (LORENZIL e MATOS, 2002; CYSNE, 2006; MENEGHEL et al., 2013.).



Figura 4 – Frutos e sementes de *M. oleifera*. Em “A”, observa-se vagens verdes; em “B”, vagens secas; e em “C”, as sementes da *M. oleifera*
Fonte: O Autor

A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rabanete. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelo. Tem odor pungente (SILVA e KERR,1999).

2.1.2 O Cultivo da *M. oleifera*

A moringa pode ser facilmente cultivada por sementes ou por estacas, crescendo rapidamente, mesmo em solos pobres, não necessitando de muito cuidado e sobrevivendo a longos períodos de seca. A taxa germinativa mais alta é obtida após a imersão da semente por 24 horas na água a temperatura ambiente e seu plantio, em viveiro, deve ser realizado imediatamente em seguida. As sementes podem ser plantadas diretamente no local definitivo ou em sementeiras. O vegetal requer poucos tratos culturais. Em condições favoráveis, uma única planta pode produzir de 50 a 70kg de frutos por ano. É uma das plantas mais úteis para as regiões semi-áridas (AHID NUNES et al., 2010).

A idade da árvore em sua primeira frutificação varia, porém em condições ideais de manejo, geralmente, ocorre durante o primeiro ano. Sua floração, normalmente, acontece ao final da estação úmida, com perda das folhas no período seco. Acredita-se que cada árvore consiga produzir de 1.000 até 1.600 vagens por ano. Pode-se classificar a produção anual de sementes como baixa, média e alta, sendo de 1.500 a 24.000 sementes/planta. Segundo Pritchard e colaboradores (2010), uma árvore pode produzir cerca de 2.000 sementes por ano. Em condições ideais de cultivo, a produção de sementes pode aumentar de 5 a 10 vezes.

Segundo Katayon e colaboradores (2006), o custo de cultivo para produção de 1kg de sementes da *M. oleifera* (aproximadamente 3.400 unidades) é de aproximadamente dois dólares. Como a espécie pode ser utilizada para múltiplos fins, como na alimentação, na indústria e na medicina, o custo da produção pode ser dividido entre esses diversos setores, o que viabilizaria a sua produção em larga escala. O cultivo da *M. oleifera* em regiões secas é muito vantajoso, uma vez que suas folhas podem ser colhidas quando nenhum outro vegetal verde apresenta-se disponível.

2.1.3 A Multiplicidade de Usos da *M. oleifera*

Considerada como uma das árvores mais úteis para o ser humano, praticamente todas as suas partes podem ser utilizadas para diversos fins. Essa versatilidade é notável, possuindo significativa importância econômica (MANGALE et al., 2012; PASSO et al., 2012).

2.1.3.1 A *M. oleifera* na Alimentação Humana e Animal

Esse vegetal é ideal para muitas comunidades indígenas e rurais em regiões carentes, sendo utilizada, sobretudo, em países em desenvolvimento, por proporcionar derivados de múltiplos usos. Têm alto teor proteico em sua folhagem e possui vagem semelhante às leguminosas (KASOLO et al., 2010; TEXEIRA et al., 2014). As folhas, flores e vagens frescas são usadas como legumes, e ainda como alimento para o gado (ANJORIN et al., 2010; NOUMAN et al., 2014). De acordo com Ferreira e colaboradores (2008), apresenta-se como uma alternativa promissora ao

consumo de leguminosas, como fonte de proteínas, de óleo e de compostos antioxidantes, além da baixa toxicidade de suas sementes e folhas.

O extrato de folhas de moringa é um produto rico em ácido ascórbico, caroteno, ferro (BEZERRA et al., 2004), vitamina A (SILVA & KERR, 1999), fitol, ácido hezadecanóico, timol (BARRETO et al., 2009), cálcio, potássio, proteínas (TEIXEIRA, 2012), polifenóis totais, quercetina, campferol, β -caroteno entre outros elementos (LAKO et al., 2007). Tais compostos caracterizam este produto como fonte alimentícia e também fitoterápica, por ser eficaz em tratamentos contra obesidade (GHASI et al., 2000).

Tabela 1 – Composição nutricional de folhas frescas e secas da *M. oleifera* (em 100g de porção comestível)

Nutrientes	Folhas Frescas	Folhas Secas
Proteína	6 700mg	27 100mg
Caroteno (Vit. A)	6,78mg	18,9mg
Vitamina C	220mg	17,3mg
Fibra	900mg	19 200mg
Cálcio	440mg	2,00mg
Cobre	0,07mg	0,57mg
Ferro	0,85mg	28,2mg
Magnésio	42mg	369mg
Fósforo	70mg	204mg
Potássio	259mg	1,32mg
Zinco	0,16mg	3,29mg

Cem gramas das folhas frescas da *M. oleifera* podem suprir as necessidades requeridas diárias (DRI, 2000) de cálcio, cerca de 80% das necessidades do ferro e metade das proteínas necessárias. Também, são consideradas importantes como suplementos de potássio, vitamina do complexo B e possuem todos os aminoácidos essenciais. Vinte gramas podem suprir a necessidade de uma criança em vitaminas A e C (MATHUR, 2005). Crianças desnutridas podem se beneficiar com o consumo adicional das folhas da *M. oleifera* em sua dieta. As altas concentrações de ferro, proteína e cobre e várias vitaminas e aminoácidos essenciais presentes, fazem delas um suplemento nutricional ideal. Uma colher (sopa) satisfaz em média 14% de proteínas, 40% de cálcio, 23% de ferro, e quase todas as vitaminas necessárias

para uma criança com idade entre 1 e 4 anos. Seis colheres (sopa) satisfazem as necessidades de cálcio e ferro de mulheres grávidas ou lactantes (RANGEL, 2009). A composição nutricional (Tabela 1) de folhas da *M. oleifera* foi descrita por Gopala (1994) e Moyo e colaboradores (2014).

As folhas têm sabor agradável, sendo ligeiramente picante, podendo ser consumidas cozidas em sopas e pratos variados. As folhas e hastes podem ser secas e usadas como condimento, polvilhando sobre os alimentos (HELVIOB, 2007).

Segundo Ahid Nunes e colaboradores (2010), na Indonésia, consome-se o arroz com sopa ou molho de folhas de moringa. Em Timor, as flores de moringa são fritas em óleo de coco, para serem consumidas com milho ou arroz. Nas Filipinas, folhas novas são transformadas em purê para alimentar crianças e, na Etiópia, as folhas temperadas e cozidas são utilizadas em mistura com batatas e tomates. O autor ainda diz que, no Brasil, sabe-se há pouquíssimo tempo que a moringa é comestível. A espécie está sendo vista como alternativa alimentar estratégica, e em algumas escolas, de regiões carentes, estão usando folhas desse vegetal na merenda escolar. A moringa ao longo dos últimos anos vem sendo incorporada em programas de combate a desnutrição (FERREIRA et al., 2008; MOYO et al., 2011; TEXEIRA et al., 2014).

Fuglie (2002) relata em seu estudo uma análise comparativa dos nutrientes de folhas da *M. oleifera* com os nutrientes de outros alimentos, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise comparativa de nutrientes presentes em folhas frescas e secas da *M. oleifera* e de outros alimentos

Folhas Frescas	Folhas Secas
4x a Vitamina A de cenouras	10x a Vitamina A de cenouras
7x a Vitamina C de laranjas	½ de Vitamina C de laranjas
4x o Cálcio do leite	17x o Cálcio do leite
3x o Potássio de bananas	18x o Potássio de bananas
¾ do Ferro do espinafre	25x o Ferro do espinafre
2x a Proteína de iogurte	9x a Proteína de iogurte

Quase todas as partes da planta são consumidas sendo as sementes conhecidas como um tipo de amendoim em Malawi. Em outros lugares do mundo as árvores da moringa são apreciadas pelos camponeses pela qualidade de suas vagens e folhas. A cultura da moringa é de grande importância comercial em toda a

Índia. Em especial no sul desse país, muitas variedades foram desenvolvidas com diferentes comprimentos de vagem e períodos de crescimento, sendo esses frutos vendidos nos mercados locais. As vagens verdes são cortadas em seções e enlatadas em salmoura para exportação para a Europa e Estados Unidos (JAHN et al., 1986). O óleo contido nas sementes tem alto valor alimentício e industrial. É conhecido como *Ben Oil*, sendo claro, doce, inodoro e resistente a rancificação.(MOFIJUR et al., 2014). De acordo com Machado e Carneiro (2000) as sementes são ricas em proteína (33,9%) e lipídeos (37,2%). Pereira e colaboradores (2010) encontraram um teor de ácido oléico maior que 78%, indicando que o óleo de moringa é um excelente antioxidante, além de ser comparado ao azeite de oliva. Eles ainda lembram que esse lipídeo é essencial para o metabolismo humano, desempenhando um papel fundamental na síntese de hormônios.

As flores são ricas em antioxidantes naturais como α - e γ -tocoferol e contêm aminoácidos, sacarose, D-glicose, além de serem ricas em íons potássio e cálcio (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2006).

Nos trópicos, as suas folhas são usadas como forragem na alimentação animal, chegando a ter 27% de proteína na matéria seca requeridos diariamente por esses animais (OLIVEIRA et al., 2009; NOUMAN et al., 2014).

2.1.3.2 A *M. oleifera* na Medicina

A planta é integralmente utilizada na medicina natural na Índia. Na Guatemala, várias partes desta árvore são usadas como anti-inflamatório e antiespasmódico. É utilizada, também, na Guiné, La Reunion, Madagascar, Guiana e Burma (KARADI et al., 2006). É consumida no sudoeste da Ásia, onde se acredita que apresente efeitos benéficos sobre a visão (LIU et al., 2007). Vários estudos têm indicado as mais diversas atividades farmacológicas para preparações de diferentes partes da moringa (KHALAFALLA et al., 2010; JAISWAL et al., 2013; SINGH et al., 2013; CHAROENSI, 2014; JUNG, 2014).

Extratos das folhas da *M. oleifera* tem aplicação como medicamento alternativo, principalmente por fatores econômicos e sociais (SINGH et al., 2013; JUNG, 2014), como: anti-inflamatório, antitumoral, analgésico, antimicrobiano, antiasmático, antianêmico, ativador do metabolismo, protetor do fígado, hipotensivo,

anti-espasmolítico, produtor de hormônios, promotor de crescimento de pêlo, hidratante, mobilizador de líquidos do corpo (homeostático), desintoxicante, fortalecedor de músculos e ossos, ativador do alerta mental, da memória e da capacidade de aprendizagem, redutor da viabilidade de células leucêmicas e de hepatocarcinoma (ANWAR, 2007; KHALAFALLA et al., 2010; AWODELE et al., 2012; MOYO et al., 2012; CHAROENSIN, 2014; JUNG, 2014). Apresentam ainda potencial hipoglicemiante e anti-diabético em modelos animais e a propriedade de modular a liberação de serotonina, por interação com receptores no trato intestinal em modelos de úlcera (DEBNATH et al., 2011; JAISWAL et al., 2013), inibidor do edema e da atividade diurética (CÁRCERES et al., 1992) e como agente hipocolesterolêmico em pacientes obesos (GHASI, 2000). Possuem efeito terapêutico na fase aguda da doença de Chagas em camundongos, por reduzir a parasitemia (OLIVEIRA, 2000) e, em ratos adultos, regulam o hipertireoidismo (TAHILIANI & KAR, 2000).

As folhas contêm um princípio dotado de atividade antimicrobiana, a pterigospermina, bem como os glicosídeos moringina, 4-(α -L-ramnosilori)-isotiocianato de benzila e 4-(α -L-ramnosilori)-fenil-acetonitrila. Estes componentes mostraram atividade antimicrobiana, principalmente contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phei*, *Serratia marcescens* e ainda, sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* e *Streptococcus* (CYSNE, 2006; MOYO et al., 2012).

Em concordância com a medicina tradicional indiana, que emprega *M. oleifera* no tratamento de diabetes mellitus, o extrato aquoso das folhas reduziu os níveis de glicose no sangue, bem como a perda de proteínas e os níveis de açúcar na urina em ratos hiperglicêmicos (JAISWAL et al., 2009). Além disso, o extrato etanólico das folhas foi capaz de estimular tanto a imunidade humoral como a celular, de modo a reduzir a imunossupressão ocasionada por ciclofosfamida (GUPTA et al., 2010).

Rakesh e Singh (2011) investigaram a ação dos extratos etanólico e aquoso das folhas da *M. oleifera* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, obtendo como resultado a redução do edema nos tempos de 1, 3 e 5 horas após a indução da inflamação. Com a finalidade de obter maiores esclarecimentos acerca da toxicidade das preparações, ressalta-se, por exemplo, que o extrato aquoso das folhas na dose de 3.000 mg/kg ocasionou genotoxicidade, apesar de não acarretar

alterações graves em diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como na qualidade do esperma em ratos. Contudo, pode ocasionar ligeiro aumento de creatinina e ureia, evidenciando, desta forma, a necessidade de cautela no uso prolongado desta preparação (ASARE et al., 2012; AWODELE et al., 2012). Além disso, devido à ampla utilização das sementes para tratamento de água, bem como para fins medicinais, diversos estudos, quanto a sua toxicidade, estão sendo realizados (FERREIRA et al., 2007; KAVITHA et al., 2012).

Muangnoi e colaboradores (2012) investigaram a ação anti-inflamatória *in vitro* do extrato dos frutos da *M. oleífera* em macrófagos Raw 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo e observaram a redução dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, TNF- α e NO. A administração do extrato de sementes da moringa em ratos induzidos à fibrose hepática resultou na redução dos danos ao fígado e sintomas decorrentes da fibrose (HAMZA, 2010).

Diversos estudos relataram efeitos protetores de preparações das sementes da *M. oleífera* contra danos promovidos por produtos químicos. Hamza (2010) demonstrou que o extrato etanólico possui atividade hepatoprotetora em ratos tratados com tetracloreto de carbono. Também, observou-se a capacidade das sementes desta planta de reduzir a toxicidade induzida por fluoreto, bem como a toxicidade induzida por arsênico (RANJAN et al., 2009; GUPTA et al., 2010). De modo similar, o extrato hidro-etanólico do caule e das folhas da *M. oleífera* possuem efeito nefroprotetor contra o carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e o antibiótico gentamicina, respectivamente (PALIWAL et al., 2011; OUÉDRAOGO et al., 2011).

Observou-se no tratamento de queimaduras e ferimentos da pele, que a utilização de uma pomada feita com a massa branca do interior das sementes tornou a cicatrização mais rápida (EILERT et al., 1981). Vijay e Kumar (2012) demonstraram que a aplicação tópica do extrato aquoso da casca da *M. oleífera* ocasionou melhor cicatrização de feridas em ratos Wistar normais ou imunossuprimidos com dexametasona.

As flores são utilizadas para o tratamento de ascite, reumatismo, picadas venenosas e como estimulantes cardíacos (ANWAR et al., 2007; ALHAKMANI et al., 2013). As raízes da moringa são dotadas de atividade antiurolítica e a casca do tronco apresenta atividade hipoglicemiante (KARADI et al., 2006). São ricas em

antioxidantes naturais como α - e γ -tocoferol e contêm aminoácidos, sacarose, D-glicose, além de serem ricas em íons potássio e cálcio (SÁNCHEZ-MACHADO et al., 2006);

Segundo Pereira e colaboradores (2010), as raízes são consideradas estimulantes e diuréticas e os médicos, destas regiões onde a moringa é utilizada com função medicinal, prescrevem a raiz nas febres intermitentes, epilepsia, histeria, paralisia, reumatismo, hipertrofia do fígado e do baço (AHID NUNES et al., 2010).

Além disso, Georgewill e colaboradores (2010) observaram a redução do volume de fluído e do numero de células em ratos tratados com o extrato metanólico das raízes, no modelo do bolsão de ar induzido por carragenina. A utilização do extrato aquoso e alcoólico da raiz da *M. oleifera*, em ratos com urolitíase, mostrou ter atividade aniurolitíaca, pois reduziu significativamente o oxalato urinário elevado, bem como a deposição de pedras nos rins (KARADI et al., 2006).

2.1.3.3 A *M. oleifera* no Tratamento de Água e Efluentes e na Purificação de Alimentos

Nos países em desenvolvimento, as sementes da *M. oleifera* são amplamente utilizadas como coagulante natural para tratamento de água, principalmente em áreas rurais onde recursos hídricos adequados não estão disponíveis, contribuindo no controle dos surtos diarreicos, inclusive da cólera, visto que medidas sanitárias são difíceis de serem aplicadas, apresentando-se como um método barato, simples e de fácil acesso a população (ANWAR et al., 2007; UZAMA et al., 2011; MENEGHEL et al., 2013).

As proteínas das sementes de moringa são os agentes de maior importância no processo de clarificação da água. Essa proteína catiônica dimérica de alto peso molecular desestabiliza as partículas contidas na água e, através de um processo de neutralização e adsorção, floccula os colóides seguindo-se a sedimentação (NDABIGENGESERE et al., 1995), sendo capaz de eliminar a turvação, micro-partículas, fungos, vírus e bactérias. No processo de purificação, a carga bacteriana pode ser reduzida em até 97% em pouco tempo, como foi observado por Silva e Kerr (1999).

O uso de sementes trituradas de moringa para purificação da água a um custo de uma pequena fração do tratamento químico convencional é uma tentativa da mais alta importância, visto que possibilitaria a substituição de agentes coagulantes usados atualmente (sulfato de alumínio, por exemplo), muitas vezes prejudiciais à saúde humana e animal. Num projeto piloto para tratamento de água em Malawi, na África, foi constatado que, enquanto o alumínio é eficiente como coagulante em uma faixa restrita de pH da água, as sementes de moringa atuam independentemente do pH, constituindo numa vantagem adicional em regiões mais pobres, onde normalmente não é possível controlar efetivamente o pH antes da coagulação (BHUPATAWAT et al., 2007).

Segundo Folkard e colaboradores (1993), para a purificação da água, coloca-se o pó da semente sobre a superfície da água na proporção de 0,2g/L, mistura-se bem e, após um dia, a água estará pronta para uso doméstico.

A capacidade de adsorção e remoção de prata em soluções aquosas, por sementes trituradas, foi relatada por Araújo e colaboradores (2010) e por Meneghel e colaboradores (2013), apresentando como vantagens na sua utilização o baixo custo, elevadas eficiência e poder de adsorção, constituindo-se numa alternativa de relevância econômica e ambiental.

As sementes protegem animais contra o estresse oxidativo induzido pelo arsênico da biosfera, presente na água de beber e inalado e absorvido através da pele, além de removerem esse composto da água (GUPTA et al., 2005). Kumari e colaboradores (2006) e Meneghel e colaboradores (2006) estudaram a remoção do arsênico e do cádmio da água pelo processo de bioadsorção com as sementes descascadas, sendo uma tecnologia barata e segura para o meio ambiente.

Santos e colaboradores (2007), em trabalhos com efluentes da indústria têxtil, comprovaram que o extrato das sementes descascadas da *M. oleifera* mostrou-se capaz de competir com o sulfato de alumínio, em termos de remoção de turbidez e cor.

No tratamento de águas residuais, estudo combinando o extrato de moringa a 100mg/L com coagulante químico (alúmen) a 10mg/L demonstrou elevada remoção global (64%) na DQO (Demanda Química de Oxigênio) (BHUPATAWAT et al., 2007).

A utilização de sementes de moringa em leite bovino não pasteurizado, como purificador natural de alimentos, não mostrou resultados significativos na eliminação

de micro-organismos do grupo coliformes totais, coliformes fecais e micro-organismos aeróbios mesófilos totais. Contudo, houve redução de 55,17% de *Staphylococcus aureus* na amostra em que foi adicionada pasta de cotilédones de moringa. Com relação a bolores e leveduras, foram eliminados da amostra 98,18% (NETO et al., 2008). Segundo Jahn e colaboradores (1986), toxicologicamente não existem motivos para descartar o uso de sementes de moringa para a purificação de alimentos.

2.1.3.4 A *M. oleifera* como Inseticida

Alguns tecidos da moringa constituem potenciais fontes de inseticidas, tendo o extrato da casca apresentado ação larvicida e adulticida contra os mosquitos vetores da filariose *Culex gelidus* e *Culex quinquefasciatus* (KAMARAJ & RAHUMAN, 2010), enquanto que o extrato aquoso de flores de moringa, que contém inibidor de protease, induziu a mortalidade de larvas de *A. aegypti* no primeiro (L1), segundo (L2), terceiro (L3) e quarto (L4) estágios, sendo capaz de inibir a atividade de tripsina de larvas L4 em 98,6% após 5 horas de exposição (PONTUAL et al., 2012).

Extrato aquoso de sementes de moringa apresentou atividades larvicida e ovicida contra *A. aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Extrato metanólico das sementes promoveu mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensis*, vetor da malária (PRABHU et al., 2011).

2.1.3.5 A *M. oleifera* com Outras Utilidades

No meio ambiente, nos últimos anos, os efeitos alelopáticos de moringa têm sido amplamente estudado por vários pesquisadores (PHIRI & MBEWE, 2009; PHIRI, 2010; NOUMAN al., 2012; YASMEEN et al., 2013).

O extrato de folha de moringa é rico em aminoácidos, potássio, cálcio, ferro, ascorbato, zeatina (hormônio regulador de crescimento), apresentando potencial para promover o crescimento vegetal. O condicionamento osmótico com extrato obtido de moringa foi relatado por melhorar eficazmente a germinação e o crescimento de plântulas de milho e girassol (BASRA et al., 2011). Pesquisas

relataram que o extrato da folha da moringa aumentou significativamente o vigor de sementes e plântulas de trigo (AFZAL et al., 2008) e milho (BASRA et al., 2011). A pasta resultante da extração do óleo das sementes pode ser usada como um condicionador do solo e fertilizante (OLIVEIRA et. al, 2009).

Gerdes (1997) relata que a *M. oleifera* pode ser utilizada como cerca viva e quebra ventos. As flores podem ser utilizadas em saladas, e possuem propriedades melíferas sendo, portanto aproveitadas na apicultura e consideradas importante fonte de néctar para as abelhas (HELVIOB, 2007).

Além de proteínas, as sementes são ricas em óleo, que devido ao elevado percentual de ácido oléico (78%) apresenta um baixo teor de insaturações, o que tem reflexo direto e muito positivo em sua estabilização à oxidação, facilitando assim o transporte e armazenamento (FERREIRA et al., 2008; SANTANA et al., 2010). Esse óleo possui várias utilizações industriais, tais como na produção de óleo de cozinha, matéria-prima para produção de biodiesel, cosméticos, lubrificantes de máquinas, e combustível para lâmpadas, sendo muito utilizado na indústria de perfumaria devido a sua alta capacidade de retenção de odor (FERREIRA et al., 2008; MOFIJUR et al., 2014).

2.1.4 A *M. oleifera* no Brasil

No Brasil, esse vegetal é encontrado na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí e Ceará, onde foi introduzida por volta de 1950, sendo utilizada inicialmente apenas para ornamentação nos parques públicos. Sendo conhecida como lírio-branco, quiabo de quina ou, simplesmente, moringa (ROCHA e PEREIRA, 2009).

Atualmente, há no país um esforço no sentido de difundir a moringa como hortaliça rica em vitamina A, pois as suas folhas, com cerca de 23.000UI de vitamina A, sobressaem-se entre olerícolas consagradas como brócolis, cenoura, couve, espinafre e alface que possuem, respectivamente, 5.000; 3.700; 2.200; 1.900; 1.000UI de vitamina A, também, por apresentar baixo custo de produção e ser integralmente comestível (ROCHA e PEREIRA, 2009).

A moringa vem sendo cultivada e difundida em toda a área denominada “polígono da seca” (Figura 5), devido, principalmente, a sua utilização no tratamento

de água para uso doméstico, uma vez que seus efeitos coagulante e clarificador da água são muito conhecidos, dada a escassez de água potável nessa região. No Nordeste brasileiro seu cultivo tem se intensificado devido a essas e outras potencialidades, e a sua capacidade de adaptação corrobora para uma ampla margem de expansão do cultivo da moringa através de práticas agroflorestais em diversos ambientes do Brasil (GALLÃO et. al, 2006; LO MONACO et al., 2013).

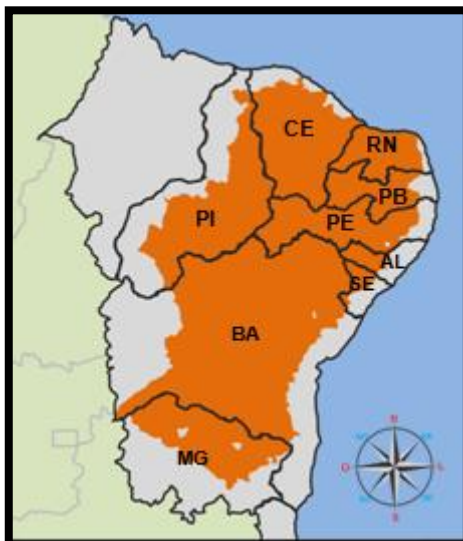


Figura 5 – O polígono da seca corresponde a uma área de 895.254,40km², englobando os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Piauí, caracterizado pelo clima semiárido, chuvas irregulares e por um amplo quadro de subdesenvolvimento (SOARES, 2013)

Na região Nordeste existem varias ações como a da Fundação Deusmar Queirós, no Ceará, que atua como mobilizadora na divulgação dos benefícios da *M. oleifera*, desde 2000, através do projeto "Moringa a Semente da Vida". Em Sergipe, a EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros, sediada em Aracaju, possui vários projetos de pesquisa para diversos usos da planta, seja como purificador de águas e esgotos até como matéria vegetal forrageira, para as criações animais. Com o objetivo de incentivar o desenvolvimento da cadeia produtiva e exploração agroindustrial da moringa na região semiárida brasileira, desde 2009, acontece o Encontro Nacional de Moringa – ENAM, para divulgação e fortalecimento desses projetos.

2.2 Micro-organismos Endofíticos

O termo endofítico, ao longo dos anos, sofreu várias modificações quanto ao seu significado. De acordo com a etimologia da palavra de origem grega, *endo*

significa “dentro” e *phyte* significa “planta”, entretanto seu significado foi bastante modificado conforme a necessidade e o interesse de cada autor na aplicação do termo (PEIXOTO NETO et al., 2002; NAIR & PADMAVATHY, 2014).

A primeira vez que os micro-organismos endofíticos foram mencionados data do início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro os diferenciou dos patógenos de plantas, sendo durante quase mais de um século deixados de lado, devido a pouco se conhecer sobre suas reais funções no interior dos vegetais e por não produzirem estruturas externas e visíveis em seus hospedeiros (AZEVEDO et al., 2007).

Contudo, no final da década de 70, do século XX, diversos estudos comprovaram que os micro-organismos endofíticos desempenhavam funções importantes e essenciais para a defesa dos seus hospedeiros, comprovando dessa maneira a hipótese da relação mutualística existente, visto que recebem nutrientes e proteção da planta e, em contrapartida, produzem compostos químicos como enzimas, alcalóides e antibióticos, entre outros, que em condições de estresse, oriundos de diversas causas, como falta de água, presença de substâncias tóxicas ou ataque de patógenos ou insetos pragas, protegem e auxiliam o vegetal. A partir daí surge um novo interesse das possíveis aplicações biotecnológicas desses micro-organismos, contribuindo num maior esclarecimento das relações existentes entre eles e a planta (AZEVEDO et al., 2007; XIAO et al., 2014).

Sendo assim, endofíticos são definidos como micro-organismos cultiváveis ou não, que vivem no interior de plantas, localizando-se, de modo geral, nas suas partes aéreas, como caules e folhas, também podendo ser encontrados em ramos e raízes, sem ocasionar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros. Possuem a capacidade de viver toda ou a maior parte dos seus ciclos de vida em íntima associação com a planta, sendo caracterizada esta associação como simbiose mutualística, pois proporcionam ao hospedeiro alguns benefícios, como o aumento da nutrição, a promoção do crescimento vegetal, a tolerância à seca e a resistência a algumas doenças e ao ataque de insetos e herbívoros. São representados, principalmente, por bactérias, actinobactérias e fungos, porém alguns protistas já foram isolados. Distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais. (SILVA

et al., 2006; AZEVEDO et al., 2007; ASSUMPCÃO et al., 2009; FAETH et al., 2010; TRIGIANO, 2010; SANTOS & VARAVALLO, 2011; IKEDA et al., 2013).

Os fungos micorrízicos e as bactérias que formam nódulos nas raízes de plantas também são considerados micro-organismos endofíticos, entretanto, estes são muito mais bem estudados e, por este motivo, são considerados separadamente dos que habitam, predominantemente, as partes aéreas dos vegetais. Portanto, redefinindo este conceito com a separação dos endofíticos em dois tipos: Tipo I, formado pelos micro-organismos que não produzem estruturas externas à planta; e o Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, incluindo, dessa maneira, os rizóbios e as micorrizas (MENDES & AZEVEDO, 2007).

As distinções entre endofíticos, epifíticos (colonizam a superfície dos vegetais) e patógenos são apenas de ordem didática, visto que muitos dos micro-organismos epifíticos podem, eventualmente, invadir o interior da planta, enquanto que os endofíticos, para penetrarem no hospedeiro têm que primeiramente se localizar na superfície da planta, sendo assim, semelhantes aos epifíticos. Ainda, certas condições e fases dos ciclos vitais de alguns patógenos podem favorecer a sua existência em harmonia com o hospedeiro, bem como, um micro-organismo endofítico, após desequilíbrios ambientais ou metabólicos da planta, pode causar danos ao vegetal. Dessa maneira, observa-se um gradiente nessas denominações e não distinções abruptas (PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.2.1 Micro-organismos Endofíticos x Micro-organismos Patogênicos

É difícil o estabelecimento de um limite definido entre micro-organismos endofíticos e patogênicos. Muitos dos endofíticos são relacionados com patógenos, e pode ser discutida a hipótese de que todos os patógenos tenham sido derivados de endofíticos e vice-versa (AZEVEDO, 1998).

Entretanto, alguns autores acreditam que os endofíticos são micro-organismos patogênicos, mas que estão em estado de latência. No entanto, o que decide se eles são inofensivos ou apresentarão características patogênicas seria o equilíbrio entre as demandas da invasão dos micro-organismos e a resposta da planta, sendo que uma vez desequilibradas, o endofítico pode se transformar em um patógeno (SUN et al., 2008). Há casos em que a mutação de um único gene

transformou um micro-organismo patogênico, o fungo *Colletotrichum magna*, em uma linhagem endofítica, demonstrando que a diferença entre esses dois grupos é bastante tênue (PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.2.2 Entrada e Localização dos Micro-organismos Endofíticos nos Vegetais

A entrada desses organismos nos vegetais pode ocorrer também por aberturas naturais ou artificiais, como: estômatos, hidatódios, aberturas causadas por insetos e fungos patogênicos, região de emissão de raízes secundárias, ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos nas raízes, oriundos do atrito destas com partículas do solo, entre outras (MUSSI-DIAS et al., 2012; KAEWKLA & FRANCO, 2013).

Todavia, as raízes se constituem na porta de entrada mais utilizada. Através da quimiotaxia, ou seja, um reconhecimento químico, ocorre a movimentação dos micro-organismos em direção às raízes das plantas. Primeiramente, ocorre uma adsorção reversível, e em seguida um ancoramento irreversível, controlado por proteínas extracelulares de origem microbiana. Esta etapa é comandada por sinais moleculares emitidos pelas raízes da planta hospedeira, e a sobrevivência dos micro-organismos estará na dependência de fatores bióticos e abióticos (DOBELAERE et al., 2003; LIU et al., 2013).

Após a penetração, eles se disseminam de maneira sistêmica para diversas partes da planta, alojando-se de forma ativa no apoplasto, vasos condutores e, em alguns casos, ocorre colonização intracelular. Sendo, portanto, encontrados colonizando folhas, ramos e raízes (Figura 6). Apesar de alguns estarem presentes em sementes, e após a germinação, colonizando outros tecidos das plantas, como geralmente ocorre nas gramíneas, eles não são transmitidos através destas (MUSSI-DIAS et al., 2012).

Os micro-organismos, para colonizar os tecidos de plantas, produzem enzimas hidrolíticas extracelulares, que contribuirão como mecanismos de resistência para superar as defesas do hospedeiro contra a invasão e/ou para obter nutrientes do solo (SUNITHA et al., 2013). Entre as enzimas destacam-se as pectinases, esterases, celulasas e lipases (PETRINI et al., 1992).

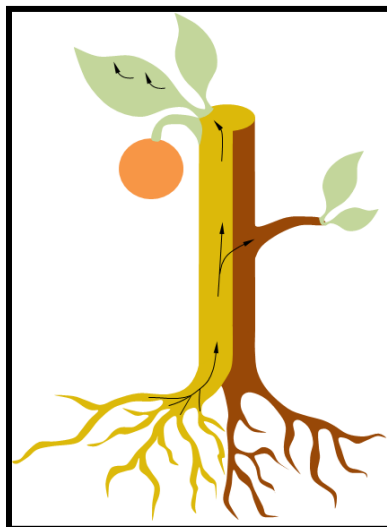


Figura 6 – A raiz, como porta de entrada mais comum, e as principais rotas de disseminação e localização dos micro-organismos no interior do vegetal, como pode ser observado pelas setas
Fonte: O Autor

Naqueles vegetais cultivados no campo, observou-se que há uma tendência de colonização das áreas basais dos hospedeiros e em menor frequência dos ramos e folhas (MENDES et al., 2007; KAEWKLA & FRANCO, 2013). Em um trabalho realizado por Reis Junior (2000), foi descrito o isolamento de *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasiliense*, *Azospirillum amazonense*, *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. em cana-de-açúcar, sendo a maioria dos isolados encontrados nas raízes, seguido dos colmos e de folhas. Embora a maioria das bactérias e fungos endofíticos tenha sido isolada de raízes e caule da planta hospedeira, alguns autores relatam a sua presença em sementes, desinfestadas superficialmente, de diversos vegetais (RUDGERS & CLAY, 2007; FERREIRA et al., 2008).

As colonizações dos diversos tecidos e órgãos vegetais foram comprovadas por James e colaboradores (2002) ao encontrar a espécie *Herbaspirillum seropedicae* em coleóptilos, raízes laterais e junções destas com a principal, em espaços intercelulares da raiz, aerênquima e células corticais, com pequena entrada no estelo e no tecido vascular, sendo encontradas colônias no xilema, folhas e caules de arroz.

2.2.3 Interações dos Micro-organismos Endofíticos com as Plantas Hospedeiras

É sabido que entre os vegetais e os micro-organismos pode haver o estabelecimento de três tipos de relações. Essas interações são conhecidas como simbióticas, patogênicas e associativas. As plantas desenvolveram e continuam a desenvolver diversos e complexos mecanismos de adaptação no meio ambiente, os quais só seriam possíveis graças à interação com os endofíticos. A coexistência entre os vegetais e os micro-organismos, é considerada um microecossistema complexo, onde diferentes nichos ecológicos podem ser explorados, seja pelos epifíticos ou endofíticos (COSTA et al., 2010).

Como resultado da interação simbiótica entre plantas e bactérias diazotróficas pode ser observado diversos mecanismos, como a indução da expressão de genes responsáveis pelo crescimento dos pêlos radiculares, a mudanças nos níveis de fitormônios e na absorção de nutrientes, a indução da extrusão de prótons, auxiliando a fotossíntese ou através da excreção de substâncias pelas bactérias, dentre elas as auxinas, as citocininas e as giberelinas, que atuam no desenvolvimento da cultura (PEDRINHO, 2009).

2.2.4 Isolamento de Micro-organismos Endofíticos

Havendo a coexistência dos endofíticos com os epifíticos e patogênicos, o isolamento dos mesmos deve ser feito a partir do interior de tecidos e órgãos sadios. Porém, em alguns casos, raros micro-organismos de origem epifítica e patogênica podem ser isolados juntamente com uma grande quantidade de endofíticos. Sendo assim, a quantificação das espécies ou gêneros dos micro-organismos isolados é um procedimento auxiliar na distinção entre os endofíticos e não-endofíticos (PEREIRA et al., 2003; GAGNE-BOURGUE et al., 2013).

No isolamento, alguns pontos devem ser considerados, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e, principalmente, a época da coleta. Esses fatores influenciam no número e tipo de micro-organismos isolados. São necessárias várias coletas e repetições para distinguir os endofíticos reais daqueles que são

epifíticos, que, porventura, possam ser isolados, e dos contaminantes. É a recorrência de uma espécie de isolado que o caracteriza como um micro-organismo endofítico (ARAÚJO et al., 2005; IKEDA et al., 2013; KAEWKLA & FRANCO, 2013).

Para o isolamento *in vitro* é necessário o controle das contaminações externas, as quais estão associadas a cuidados básicos como: esterilização adequada dos equipamentos, meios de cultura e do material vegetal e técnicas básicas de assepsia do manipulador e do ambiente (PEREIRA et al., 2003).

O processo mais comum envolve a lavagem de folhas, caules e outros órgãos vegetais com etanol 70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% e novamente tratamento com etanol 70% ou água esterilizada. Os tempos de tratamento e a própria concentração de hipoclorito de sódio podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado. Recomendam-se testes preliminares para que se possam determinar as melhores concentrações e tempos de tratamento, objetivando eliminar os epifíticos sem destruir os endofíticos. Tecidos muito frágeis, como, por exemplo, as folhas jovens, devem ser tratadas em baixas concentrações e por pequeno tempo. Porém, materiais mais adultos, provenientes do campo, devem ser tratados com concentrações maiores e por tempos mais prolongados. A seiva, coletada assepticamente, pode servir para o isolamento de endofíticos (SOUZA et al., 2006; CÂMARA, 2010).

Posteriormente, realiza-se a transferência dos fragmentos ou suspensões de células para meios apropriados. No isolamento de fungos, utilizam-se placas de Petri com meios de cultura como o Sabouraud, Batata-Dextrose-Ágar ou outros e recomenda-se adicionar antibióticos para impedir o crescimento de bactérias. No isolamento de bactérias, os meios Ágar Nutriente, o LB (Luria-Bertani), entre outros, são utilizados, pode-se adicionar fungicidas para impedir o desenvolvimento de fungos. Quando há o interesse para o isolamento de determinado grupo de micro-organismos, como as bactérias fixadoras de nitrogênio, actinobactérias e outros, podem ser utilizados meios seletivos (ARAÚJO et al., 2005).

A temperatura e o tempo de incubação das placas de Petri variam de acordo com as finalidades e o tipo de micro-organismos que se deseja obter com o isolamento. Em um meio de cultura não seletivo, um tempo de incubação muito pequeno não permitirá a emergência daqueles de crescimento lento. Entretanto, um tempo excessivo poderá permitir grande crescimento de endofíticos mais agressivos,

que irão se sobrepor àqueles de desenvolvimento mais demorado e limitado a uma pequena área do meio de cultura. É interessante salientar que alguns desses micro-organismos crescem mal ou mesmo não crescem na ausência do hospedeiro ou de partes dele, dificultando, dessa maneira, o processo de isolamento. (ARAÚJO et al., 2005; SOUZA et al., 2006; CÂMARA, 2010). A Figura 7 mostra a emergência de alguns micro-organismos endofíticos.

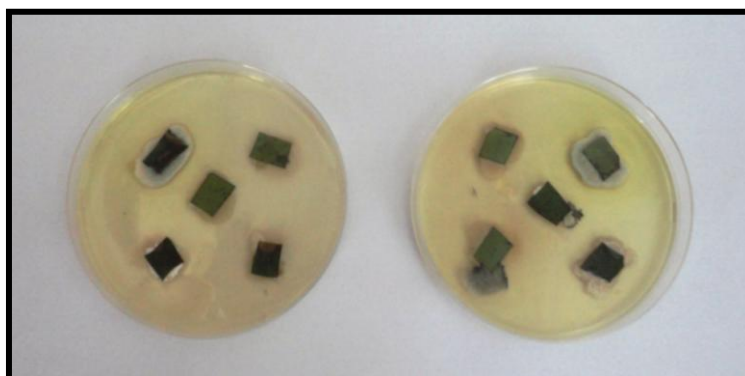


Figura 7 – Emergência de micro-organismos endofíticos presentes nos fragmentos de folhas após incubação
Fonte: O Autor

Uma estimativa a respeito do número de micro-organismos endofíticos pode ser obtida através de testes quantitativos, onde são feitas suspensões aquosas ou em salina, a partir de tecidos previamente tratados e esmagados. Pode-se ter, assim, uma estimativa do número de micro-organismos por grama de tecido vegetal (ARAÚJO et al., 2005).

Uma cuidadosa purificação se faz necessária dos micro-organismos isolados, seguido de manutenção através de método apropriado para preservação, para posterior classificação, identificação e avaliação (AZEVEDO, 1991).

2.2.5 Diversidade dos Micro-organismos Endofíticos

Consideram-se os micro-organismos como uma grande fonte de diversidade genética, porém pouco compreendida e explorada (PROSSER et al., 2007). Quanto aos micro-organismos endofíticos, acredita-se que das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes no planeta, cada indivíduo contenha um ou mais micro-organismos endofíticos (RYAN et al., 2008).

Acredita-se que cada espécie de vegetal possua uma microbiota ainda não classificada e com propriedades ainda desconhecidas, mas de imenso interesse

aplicado e que atua de modo importante para a sanidade e manutenção de vegetal. Outro ponto a ser destacado é que os micro-organismos endofíticos podem servir de vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico nas plantas, através de ferramentas da Biologia Molecular (PEIXOTO NETO et al., 2004).

Araújo e colaboradores (2001) isolaram os seguintes gêneros e espécies de bactérias e actinobactérias endofíticas: *Alcaligenes* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium* spp. (incluindo *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum*, *M. radiotolerans* e *M. zatmanii*), *Norcadia* sp., *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces* sp. e *Xanthomonas campestris*, de *Citrus sinensis*. Milani (2009) ressalta que das bactérias rizosféricas o gênero mais isolado é o *Azospirillum*, já em relação as endofíticas, algumas das mais observadas e estudadas pertencem ao gênero *Gluconacetobacter*, com ocorrência na cana-de-açúcar.

Há um imenso interesse científico nos micro-organismos endofíticos, devido a possibilidade de descoberta de novas espécies. Bussaban e colaboradores (2003) descobriram três novas espécies de *Pyricularia* (*P. kookicola*, *P. longuspora*, *P. variabilis*) como endofíticos de duas espécies de gengibre selvagem, na Tailândia; Zhang e colaboradores (2007) isolaram *Trichoderma taxi* como micro-organismo endofítico de *Taxus mairei* de uma reserva natural na China; uma nova espécie de Hyphomycete, a *Corynespora subcylindrica*, foi isolada por Siqueira e colaboradores (2008), como endofítico de *Lippia sidoides*, planta medicinal do Brasil.

A biodiversidade dos fungos endofíticos é composta por representantes de diversos filos, como: Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomerulomycota e Dothideomycete (ARNOLD, 2007) e por vários gêneros como *Arthrobotrys*, *Dendrophora*, *Diatrypella*, *Oudemansiella*, *Mucor*, *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium*, *Phoma*, *Bipolaris*, *Petriella*, *Phanerochaete*, *Collethotrichum* e seu anamorfo *Glomerella* (VIEIRA, 2008), e também *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, dentre vários outros (ALMEIDA et al., 2005).

Mussin-Dias e colaboradores (2012) relataram a grande diversidade de fungos endofíticos isolados de diferentes espécies de plantas medicinais, como os dos gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Pestalotia*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Nigrospora* e *Glomerella*. Almeida e colaboradores (2005) determinaram a microbiota

fúngica endofítica dos ápices caulinares de pupunheiras sadias cultivadas *in vitro* sendo constituída por: *Fusarium oxysporum*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*; já a microbiota *in vivo*, por: *Fusarium* sp., *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria gaisen*, *Neotyphodium* sp. e *Epicoccum nigrum*.

O conhecimento a respeito da extensão e carácter da diversidade microbiana tem sido restrito, devido as limitações dos estudos, àqueles cultiváveis. Acredita-se que mais de 99% dos micro-organismos presentes na natureza não são cultivados utilizando-se técnicas convencionais (STROBEL et al., 2004). Contudo, apesar das técnicas dependentes de cultivo não serem tão eficientes, representam um método prático e rotineiro até então conhecido e utilizado para a obtenção dos endofíticos a serem utilizados e estudados quanto ao seu potencial biotecnológico. Porém, nos últimos anos, tem havido maior interesse no desenvolvimento de metodologias que possibilitem não só o estudo de espécies cultiváveis, como também as não cultiváveis, nesse sentido destaca-se as ferramentas da Biologia Molecular (RYAN et al., 2008).

2.2.5.1 A Utilização da Biologia Molecular como Aliada na Determinação da Diversidade dos Micro-organismos Endofíticos

É sabido que a fração de diversidade dos grupos microbianos conhecidos e descritos representa uma pequena porção daquela existente na natureza. Contudo, a evolução da Biologia Molecular aplicada ao estudo do meio ambiente contribui, de modo significativo, no conhecimento dessa diversidade (BONATELLI, 2012).

Os endofíticos podem ser estudados por meio de técnicas de sequenciamento, a partir dos micro-organismos cultiváveis, sendo uma metodologia rotineira, porém de limitada aplicação, sendo influenciada por muitos fatores e subestimam a diversidade microbiana (ANDREOTE et al., 2009). A clonagem e o sequenciamento de genes 16S rRNA, o qual é considerado uma das moléculas mais importante para o estudo de filogenia e ecologia microbiana, a partir de PCR com *primers* universais de comunidades microbianas não cultiváveis, indicam que a diversidade de micro-organismos endofíticos é muito maior do que se pensava antigamente (TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008).

O gene 16S rRNA pode ser usado, também, para a detecção de bactérias por meio da técnica de FISH, que consiste na utilização de sondas de oligonucleotídeos, geralmente com 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, complementares às regiões deste gene (AKARSUBASI et al., 2005). A técnica de *fingerprint* genético, chamada de *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis* (DGGE), é amplamente utilizada para descrições e comparações de diferentes comunidades de micro-organismos utilizando um mesmo gene. Essa metodologia distingue produtos de PCR com número similares de nucleotídeos, baseando-se em suas diferenças de composição (Porcentagem de CG) permitindo a análise de diversidade de bactérias cultiváveis e não cultiváveis (WEST et al., 2010).

Lacava e colaboradores (2006) caracterizaram a comunidade bacteriana endofítica de plantas saudáveis e afetadas pela clorose variegada dos citros, por meio de isolamento em meio de cultura e pela técnica do DGGE e a detecção de *Methylobacterium mesophilicum* e *Xylella fastidiosa* por meio de PCR específico. Pelo DGGE foi possível detectar *X. fastidiosa*, bem como *Klebsiella* sp. e *Acinetobacter* sp. como endofíticos de citros. Também foi observado a presença de *Curtobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Bacillus* spp. Ao se utilizar *primers* específicos, *Methylobacterium mesophilicum* e *X. fastidiosa* foram identificadas.

Técnicas mais robustas e com grande poder de amostragem têm sido utilizadas para se estudar a diversidade de micro-organismos endofíticos, como o pirosequenciamento, o qual consiste em adicionar, em cada ciclo, uma espécie de nucleotídeo, seguida da adição de substrato (luciferin, adenosina 5'-fosfosulfato) que geram luz onde houver incorporação de nucleotídeo, por último a apirase remove os nucleotídeos que não foram incorporados e outro ciclo pode ser iniciado (SCHENDURE, 2008).

A tecnologia do DNA recombinante favorece o conhecimento a respeito da interação entre o endofítico e a planta, por permitir a expressão de genes marcadores nos micro-organismos endofíticos de interesse, contribuindo na sua detecção no hospedeiro e permitindo o monitoramento destes organismos na planta e no meio ambiente. É possível, dessa maneira, estudar a dinâmica de colonização do endofítico, favorecendo o uso deste no controle biológico (PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.2.6 Importância Biotecnológica dos Micro-organismos Endofíticos

Os micro-organismos endofíticos, além de exercerem diversas funções nos vegetais em que habitam, facilitando a interação da planta com o meio ambiente, são considerados importantes na agricultura e na indústria, em especial na farmacêutica e de defensivos agrícolas. A produção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, antibióticos, antitumorais, hormônios, imunossupressores, antiparasíticos, entre outras pelos endofíticos tem acarretado num interesse industrial e biotecnológico, tornando-os cerne de grandes pesquisas científicas (GANDADEVI & MUTHUMARY, 2009; SREEKANTH et al., 2009; VISALAKCHI & MUTHUMARY, 2010; SANTOS & VARAVALLO, 2011; ZANARDI et al., 2012; XIONG et al., 2013; BRADER et al., 2014).

2.2.6.1 Importância dos Micro-organismos Endofíticos na Agricultura

A utilização de endofíticos na agricultura tem aumentado nos últimos anos, pois atuam tanto na promoção do crescimento do vegetal como no controle biológico de pragas e doenças que acometem as plantas. Entre outras utilidades, observa-se o favorecimento do aumento da tolerância do vegetal à seca e promoção à fixação não simbiótica de nitrogênio atmosférico, constituindo-se em alternativas viáveis para os sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentáveis (GUO et al., 2006; GANGADEVI & MUTHUMARY, 2008; SREEKANTH et al., 2009; SANTOS & VARAVALLO, 2011; AFZAL et al., 2014).

Micro-organismos endofíticos podem atuar induzindo ou mediando a tolerância a estresses abióticos, como salinidade, seca, inundações, temperaturas muito altas ou baixas, deficiência de nutrientes e metais tóxicos. Substâncias osmotolerantes, como, por exemplo, glicina-betaína, podem ser produzidas pelos endofíticos e atuam sinergicamente com outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando na tolerância à seca (DIMKPA et al., 2009). A produção de prolina pode ser estimulada nas plantas, em presença de bactérias endofíticas, em resposta a estresses bióticos e abióticos, a qual pode mediar o

ajuste osmótico, e proteger membranas e proteínas contra efeitos adversos do aumento da concentração de íons inorgânicos (GROVER et al., 2011).

Os micro-organismos endofíticos possuem grande potencial no processo de fitorremediação de solos e na fertilidade destes, através da solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (RYAN et al., 2008). Um estudo com 30 bactérias diazotróficas, endofíticas de raiz e da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar seca foi realizado por Santos (2012), sendo observado que 27 destes isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. A cana-de-açúcar apresenta-se como grande extratora de nutrientes do solo, principalmente de fósforo.

São inegáveis as vantagens conferidas pelos micro-organismos endofíticos à planta hospedeira, contudo no que concerne o aspecto econômico podem resultar em grandes prejuízos para pecuaristas, visto que ocasionam intoxicação em ruminantes, afetando negativamente o seu desempenho, inclusive levando a óbito estes animais. Os prejuízos, também, já foram observados na bovinocultura e ovinocultura devido à produção de compostos tóxicos pelos endofíticos para estes animais. Entretanto, os benefícios, oriundos desta associação entre micro-organismos endofíticos e os vegetais, são bem maiores quando comparado aos prejuízos, tornando-se uma importante alternativa para a agricultura, tanto para a cultura de alimento quanto para culturas não alimentares (RYAN et al., 2008).

2.2.6.1.1 Micro-organismos Endofíticos Promotores do Crescimento Vegetal

Surge como uma alternativa para a agricultura moderna a utilização de micro-organismos endofíticos promotores de crescimento vegetal, visando enfrentar o desafio de promover o incremento da produção de culturas, gerando sustentabilidade (LUZ et al., 2006).

A microbiota endofítica envolvida na promoção do crescimento vegetal pode atuar de duas maneiras, as quais podem ser divididas em: direta e indireta. A forma direta corresponde à produção de fitormônios ou substâncias análogas destes reguladores do crescimento, os quais são capazes de estimular o crescimento e desenvolvimento da planta. Quando o processo é indireto, o crescimento é

favorecido pela diminuição da comunidade de micro-organismos patogênicos ou deletérios às plantas, ou seja, atuam no controle biológico (SILVA et al., 2006)

Porém, outro fator contribuinte no estímulo do crescimento vegetal é a capacidade que algumas bactérias endofíticas possuem de favorecer o aumento da absorção de nutrientes minerais e água, melhorando a disponibilidade destes (BARRETTI et al., 2008; DIMKPA et al., 2009).

A produção de fitormônios, como ácido indol acético (AIA), citocininas, giberelinas e ácido abscísico (ABA) por endofíticos pode alterar o padrão e o crescimento das plantas, interferindo no seu desenvolvimento (TSAVKELOVA et al., 2006). O etileno, produzido em condições de estresse, afeta o crescimento radicular e, conseqüentemente, da parte aérea. Bactérias endofíticas que possuem a enzima aminociclopropano-1-carboxilase deaminase (ACC deaminase) podem regular a produção desse composto sendo vantajoso para o crescimento vegetal (SALEEM et al., 2007). Vários estudos comprovaram a ação promotora de crescimento, através de micro-organismos endofíticos, em diversas culturas vegetais, como no alface, tomate e pepino (SILVA, 2004; BARRETTI et al., 2008; BARRETTI et al., 2009), batata (FROMMEL et al., 1991; STURZ, 1995), milho, arroz e algodão (HALLMANN et al., 1997).

As bactérias endofíticas dos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, entre outros, têm sido frequentemente descritas como promotoras do crescimento vegetal. Os fungos endofíticos também podem promover esse desenvolvimento, como a espécie bastante estudada *Piriformospora indica*, um basidiomiceto que coloniza de forma endofítica raízes de inúmeros vegetais (PEIXOTO NETO et al., 2002).

As bactérias diazotróficas, devido a sua capacidade de converter nitrogênio atmosférico em amônia, a qual pode ser utilizada pela planta, são consideradas, também, promotoras de crescimento vegetal (DOBBELAERE et al., 2003).

Rodrigues e colaboradores (2006) relataram a presença de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus* e *Burkholderia* colonizando o solo, as raízes e os caules de plantas de arroz irrigado. Entre estes, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado, pois estimula a síntese de fitormônios e realiza a fixação biológica do nitrogênio, podendo atuar ainda como agente de

controle biológico de doenças (SILVA et al., 2011). A inoculação de *Azospirillum* em condições de casa de vegetação resultou em incremento da produtividade do arroz irrigado em mais de 10% (RODRIGUES et al., 2008) e, em condições de campo, o aumento foi da ordem de 20% (PEDRAZA et al., 2009).

2.2.6.2 Micro-organismos Endofíticos como Agentes no Controle de Patógenos

Os micro-organismos endofíticos são potenciais agente de controle biológico pelo fato deles possuírem, igualmente aos patógenos, a capacidade de invadir a planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo alterar as condições fisiológicas e morfológicas do vegetal (ANDREOTE et al., 2006; SANTOS & VARAVALLO, 2011).

O endofítico pode parasitar células do patógeno, impedindo o surgimento da sintomatologia. Geralmente, neste tipo de parasitismo estão envolvidas enzimas líticas, como quitinases e proteases, que destroem o patógeno, porém, se faz necessário para isso a interação entre ambos. Mesmo com a atração química entre os micro-organismos, o contato entre eles ocorre ao acaso, o que dificulta o controle biológico, pois podem estar colonizando regiões distintas do vegetal. Nesse sentido é interessante a seleção do micro-organismo endofítico que colonize o mesmo nicho ecológico do patógeno, que seja mais competitivo e que o iniba de forma mais eficiente (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Os micro-organismos endofíticos utilizados em pesquisas para biocontrole podem ser selvagens, ou seja, já possuírem em seu genoma os genes que codificam ações de controle biológico ou serem geneticamente modificados, através da introdução de genes exógenos. Os primeiros micro-organismos endofíticos a serem utilizados no controle biológico foram os fungos (AZEVEDO et al., 2000). Entretanto, muitas bactérias estão sendo estudadas. A espécie bacteriana mais utilizada como antagonista a patógenos é *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2001). Além dessa, bactérias da Família Pseudomonaceae e do gênero *Nostoc* são utilizadas como agentes no controle biológico (BERGSMAN-VLAMI et al., 2005; RAJKUMAR et al., 2005).

O mecanismo mais importante utilizado no controle biológico se refere a uma indução de resistência sistêmica (IRS). Nesse mecanismo, a penetração ativa do micro-organismo endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal. Estas modificações fisiológicas e morfológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, ocasionando maior dificuldade na entrada do patógeno e no seu desenvolvimento (RYAN et al., 2008).

As plantas de propagação *in vitro* ou via sementes podem apresentar vantagens em relação a outras espécies de propagação vegetativa, visto que o endofítico poderia ser aplicado diretamente na cultura *in vitro* ou na semente, possibilitando a colonização da planta sem competição com outros micro-organismos, facilitando a aplicação prática dessa estratégia. Linhagens avirulentas ou hipovirulentas do patógeno, também, têm sido utilizadas para a IRS, devido à colonização na planta não causar doenças, mas são reconhecidas pela planta que ativa o seu sistema de defesa, impedindo o estabelecimento do patógeno (RYAN et al., 2008).

Várias pesquisas visando à aplicação de micro-organismos endofíticos no controle biológico de doenças de origem bacteriana ou fúngica têm sido realizadas, com consequente obtenção de resultados promissores. Contudo, muitos estudos ainda devem ser realizados para comprovar essa ação. São inegáveis os esforços realizados para a reprodução em campo dos resultados obtidos dentro dos laboratórios, avaliando-se a influência de fatores externos, como as condições climáticas específicas de cada região e a interação com outras espécies vegetais presentes no mesmo local, dentre outras variáveis. É necessário, ainda, determinar o modo de ação e a quantidade de endofíticos que deve ser aplicada e as melhores formas de entrada no hospedeiro (BARRETTI et al., 2009; ROCHA et al., 2009; CUZZI et al., 2011; SANTOS & VARAVALLO, 2011; PADHI et al., 2013).

Barretti e colaboradores (2009) estudaram 40 bactérias endofíticas isoladas de plantas sadias de tomateiro quanto à sua capacidade de atuar como agentes de biocontrole sobre doenças bacterianas e fúngicas desse vegetal. O estudo foi realizado em casa de vegetação, utilizando-se *Pseudomonas syringae* e *Alternaria solani*, como patógenos testes; baseado no número de lesões por planta, quatro

bactérias isoladas foram selecionadas como potenciais agentes no controle biológico, sendo identificadas como *Acinetobacter johnsonii*, *Serratia marcescens*, *Sinorhizobium* sp. e *Bacillus megaterium*.

Com o intuito de avaliar a capacidade de biocontrole de alguns endofíticos sobre o agente causador da vassoura-de-bruxa do cacau, o fungo *Crinipellis perniciosal*, foi realizado o teste com a comunidade de fungos endofíticos isolados de plantas do cacau resistentes e suscetíveis à doença. Esses micro-organismos foram isolados, identificados e avaliados *in vitro* e *in vivo* quanto à habilidade em inibir o patógeno. A espécie *Gliocladium catenulatum* reduziu a incidência da enfermidade em 70% (RUBINI et al., 2005).

Estudos realizados nas últimas décadas do século passado já apontavam a capacidade de micro-organismos atuarem no biocontrole de doenças fúngicas, onde as bactérias endofíticas mostraram-se eficientes contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (CHEN et al., 1995) e *Rhizoctonia solani* em algodão (PLEBAN et al., 1995); *Sclerotium rolfsii* em feijão (PLEBAN et al., 1995); *Pythium myriotylum*, *R. solani*, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* em arroz (MUKHOPADHYAY et al., 1996), entre outros. Já em relação às doenças causadas por bactérias, foram eficientes contra *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* em arroz (POON et al., 1977); *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (BUREN et al., 1993) e *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (STURZ & MATHESON, 1996) em batata e *X. campestris* pv. *campestris* em repolho (ASSIS et al., 1998).

2.2.6.3 Micro-organismos Endofíticos no Controle da Herbivoria por Insetos

A interação entre os micro-organismos endofíticos e os insetos é complexa e exige vários estudos, pois já foi comprovado que um inseto é capaz de reconhecer a região onde se encontra o endofítico e, assim, evitá-la. Do ponto de vista evolutivo, para os endofíticos presentes em tecidos vegetais, a herbivoria pode impedir a sua sobrevivência e disseminação (OKI et al., 2009).

Estudos demonstraram que a produção de compostos pelos endofíticos que reduzem a herbivoria podem atuar diminuindo a atratividade da planta ou aumentando a susceptibilidade do inseto à defesa do vegetal ou inibindo o

desenvolvimento desse animal. Pode, também, ocorrer a produção de substâncias tóxicas, pela planta, contra herbívoros, as quais são estimuladas devido à presença de enzimas ou outro composto produzidos pelos micro-organismos endofíticos, que atuando sobre determinados genes estimulam a produção de determinados produtos úteis na luta do vegetal contra a herbivoria. Estes estudos foram realizados em gramíneas, principalmente, dos gêneros *Lolium* e *Festuca* em associação com o fungo *Neotyphodium*, o qual diminui a incidência de insetos de diferentes ordens como afídios, coleópteros, hemípteros e lepidópteros (AZEVEDO et al., 2000; PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.2.6.4 Micro-organismos Endofíticos no Controle de Fitonematóides

Vários são os motivos que conduzem as pesquisas no intuito de se desenvolver métodos alternativos para o controle de fitonematóides, tais como os problemas ambientais causados pelo uso contínuo ou inadequado de nematicidas, provocando até intoxicação ao homem e aumento do custo de produção. Maior interesse é observado em pesquisas visando à ação de inimigos naturais, com o intuito do biocontrole; nesse contexto se apresentam as bactérias e fungos endofíticos, com destaque para as rizobactérias (CAMPOS et al., 1998; SIDDIQUI et al., 2003; NAVES et al., 2004).

Os alcaloides produzidos pelo fungo endofítico no hospedeiro podem apresentar atividade nematicida. Em alguns casos, a proteção contra praga é realizada de maneira indireta, pois o metabólito produzido retarda o desenvolvimento da larva, e este aumento do tempo de desenvolvimento acarreta a sua morte (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Naves e colaboradores (2004) estudaram a capacidade *in vitro* de bactérias endofíticas, isoladas a partir do sistema radicular de diferentes espécies de plantas, atuarem na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estádios de *Meloidogyne javanica*, que ataca diversas hortaliças de importância econômica, como a batata. Os autores observaram que sete, dos quarentas isolados, imobilizaram juvenis em 24 horas, não havendo a recuperação da mobilidade após serem transferidos para a água, acarretando porcentagens de mortalidade

semelhantes às induzidas pelo nematicida aldicarbe, utilizado como controle. Os mesmos isolados também inibiram a eclosão dos juvenis e dois isolados provocaram a morte de 90% dos juvenis após 48 horas de exposição.

2.2.6.5 Micro-organismos Endofíticos Produtores de Enzimas

Enzimas produzidas por micro-organismos endofíticos apresentam potencial de aplicação biotecnológica em diversos campos, como no processamento de alimentos, na fabricação de detergentes, de tecidos e de produtos farmacêuticos, na terapia médica e na Biologia Molecular (CARRIM et al., 2006; SUNITHA et al., 2013).

Carrim e colaboradores (2006) isolaram e identificaram dez espécies de bactérias endofíticas de *Jacaranda decurrens* e todas apresentaram atividade enzimática, com maior predominância de atividade proteolítica e amilolítica, seguida das atividades lipolítica e esterásica. Cuzzi e colaboradores (2011) realizaram a avaliação da capacidade da produção de enzimas extracelulares de 11 espécies de fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* e observaram que sete apresentaram atividade lipolítica; em relação à atividade amilolítica, apenas um fungo foi negativo; e seis apresentaram a produção de enzimas proteolíticas.

2.2.6.6 Micro-organismos Endofíticos Produtores de Fármacos

Stierle e colaboradores, em 1993, despertaram, na comunidade científica, o interesse a respeito do potencial farmacológico presente nos micro-organismos endofíticos, pois ficou comprovado que um fungo endofítico, o *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, é capaz de produzir um complexo diterpenóide, o taxol, cuja fórmula molecular está presente na Figura 8, o qual é um antitumoral de alto valor agregado no mercado internacional. Outros trabalhos posteriores demonstraram que o fungo *Pestalotiopsis microspora*, isolado da *Taxus wallachiana*, também produz o taxol (TURGEON & BUSHLEY, 2010).

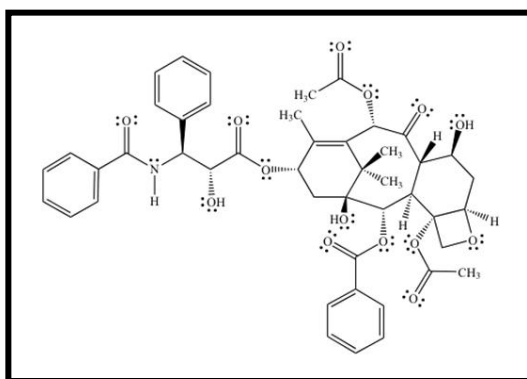


Figura 8 – Fórmula molecular do taxol

Esse antitumoral é isolado dos vegetais hospedeiros desses micro-organismos endofíticos. Com a descoberta de que os fungos também seriam capazes de produzi-lo é que se vislumbrou uma nova alternativa, possivelmente mais eficiente e menos dispendiosa para a produção deste fármaco. Uma possível análise de similaridade entre os genes envolvidos na rota da biossíntese do taxol pode mostrar se houve ocorrência na transferência de genes da planta para o fungo ou vice-versa (MUSSI-DIAS et al., 2012; SHWETA et al., 2013).

Portanto, é extremamente importante a descoberta de fontes de micro-organismos endofíticos produtores de compostos bioativos de alto valor agregado, os quais são produzidos em quantidades reduzidas pelas espécies vegetais. Os endofíticos apresentam-se como uma alternativa importante para garantir a manutenção da produção de substâncias farmacológicas e a preservação dessas árvores. Diversos estudos visando avaliar a atividade biológica de micro-organismos endofíticos, no intuito de se obter novos compostos bioativos, vêm sendo realizados e resultados interessantes e de aplicabilidade têm sido encontrados (FERNANDES et al., 2009; MELO et al., 2009; DING et al., 2010; LV et al., 2010; RAMOS et al., 2010; ROSA et al., 2010; KUMAR et al., 2013).

A utilização indiscriminada de antibióticos e fungicidas favoreceu o surgimento de micro-organismos multi-resistentes, tantos aqueles que acometem humanos como animais e plantas. Portanto, a descoberta de novos agentes antibacterianos e antifúngicos produzidos por bactérias e fungos endofíticos, principalmente em países de grande biodiversidade, contribuem para que pesquisas relacionadas a compostos bioativos adquiram importância e relevância para a indústria farmacológica, visto a

possibilidade de descoberta de novos compostos que poderão, além de combater doenças, gerar dividendos para o país (RODRIGUES et al., 2000).

Dentre os micro-organismos que acumulam substâncias antifúngicas, os fungos e as leveduras destacam-se pela quantidade de produtos farmacêuticos produzidos de utilização na medicina. Portanto, os fungos endofíticos se mostram como uma boa alternativa para a produção de novos compostos antimicrobianos (FERNANDES et al., 2009). Por exemplo, cita-se a produção de criptocandina, um lipopeptídeo antimicótico, produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis quercina* (STROBEL et al., 1999).

2.3 As Actinobactérias

Anteriormente, as actinobactérias eram chamados de *actinomicetos*, denominação de origem grega, onde *aktis*, significa “raio” e *mykes*, fungo, ou seja, “crescimento radial como fungo”. Sendo, portanto, primeiramente classificadas como um grupo intermediário entre fungos e bactérias. Posteriormente, com investigações com microscopia eletrônica e estudos citológicos, foi demonstrado que são bactérias filamentosas procarióticas (PANDEY, 2003).

Dessa maneira, o Filo Actinobacteria é formado por micro-organismos unicelulares procariontes Gram-positivos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou aneróbios (HOPWOOD et al., 2000). Apresentam crescimento ramificado, muito característico do crescimento fúngico e a maioria possui uma morfologia filamentosa com a capacidade de formar agregados filiformes, devido à formação de hifas com diâmetro entre 0,5 a 1,0 μm , se assemelhando aos filamentos dos fungos, como mostra a Figura 9. O diâmetro das actinobactérias varia entre 0,5 e 2,0 μm (geralmente, menor que 1,0 μm), sendo a maioria de vida livre ou saprofítica (KONEMAN et al., 2008).

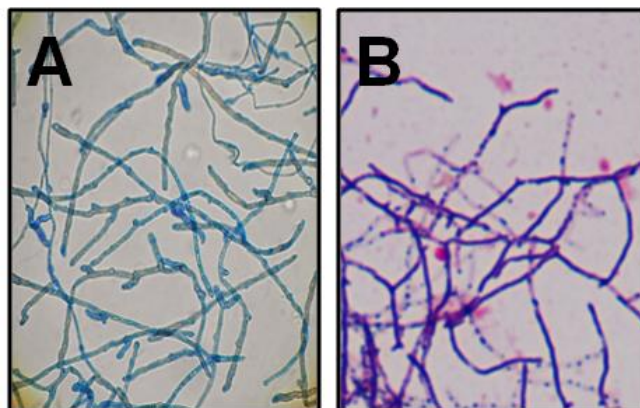


Figura 9 – Semelhança existente entre a micromorfologia filamentosa dos fungos (em “A”, *Exserohilum rostratum*) e das actinobactérias (em “B”, *Nocardia* sp.)

Fonte: O Autor

Podem ser autotróficas, heterotróficas, quimiotróficas ou fototróficas, porém, em sua maioria, são quimio-organotróficas e crescem em pH neutro, porém existem algumas que são acidófilas ou alcalófilas. Existem aquelas que são halófilas (KONEMAN et al., 2008; GOODFELLOW, 2012). A maioria das actinobactérias são mesófilas e a temperatura ótima para seu crescimento está entre 25 °C e 30 °C. Em temperaturas inferiores a 5 °C, o crescimento é praticamente nulo, e a temperaturas superiores a 55 °C, observa-se algumas espécies termofílicas, pertencentes ao gênero *Streptomyces*, *Thermonospora* e *Thermoactinomyces*; contudo, esta alta temperatura pode ser letal caso o micro-organismo não esteja em um ambiente úmido (STANLEY, 1994).

As actinobactérias menos evoluídas tem um desenvolvimento micelial incompleto, o qual ocorre apenas durante o crescimento ativo, entretanto aquelas mais desenvolvidas apresentam dois tipos de micélios, o micélio no substrato, os rizóides; e aqueles fora do substrato, os micélios aéreos. Quando da presença de esporos, estes últimos se encontram na extremidade (FRANCO, 2008).

A parede celular é formada por peptidoglicano, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, ácidos teicóicos, entre outros. Apresentam uma porcentagem de guanina-citosina (GC) entre 63 a 75%, constituindo-se como grupo de bactérias com maior porcentagem desse par de bases nitrogenadas, com genomas que variam entre 2,5 Mb a 9,7Mb (VENTURA et al., 2007).

Macroscopicamente, irão apresentar, em placas de Petri, colônias secas e não cremosas, as quais podem ser lisas ou com aspecto rugoso, duras, coriáceas e com intensa aderência ao meio de cultura e recobertas por uma fina película, o micélio aéreo ou reprodutivo, sendo esta uma característica peculiar. Podem apresentar diferentes colorações, como branco, rosa, laranja, verde, cinza, parda, entre outras (KONEMAN et al., 2008; GOODFELLOW, 2012).

As actinobactérias apresentam um odor característico de “terra úmida”, a qual se deve a compostos voláteis sintetizados pelo seu metabolismo secundário, como a geosmina. Além disso, possuem uma atividade metabólica alta, produzindo terpenóides, pigmentos e enzimas extracelulares com as quais degradam a matéria orgânica de origem vegetal e animal. São capazes de produzir metabólitos secundários, dentre os quais estão diversos compostos de importância econômica (EVANGELISTA & MORENO, 2007).

Esses micro-organismos apresentam distribuição cosmopolita, sendo encontrados em: plantas, principalmente, de folhas e raízes (ZHAO et al., 2011); solo, sendo este o habitat mais comum, abundante na rizosfera, região do solo influenciada pelas raízes da planta (MEHRAVAR et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 2010); areia de praia (SUZUKI et al., 1994); deserto (NOROVSUREN et al., 2007); mangue (YU et al., 2010); pasto (LEE & HWANG, 2002); insetos (KALTENPOTH et al., 2005); sistemas e organismos marinhos (REYMA & VIJAYAKUMAR, 2008); incluindo habitats extremos, como sedimentos marinhos (PATHOM-AREE et al., 2006), geleira (REDDY et al., 2009) e solos desérticos hiper-áridos (OKORO et al., 2009). Outros são patógenos de plantas e animais, simbioses, comensais ou habitantes do trato gastrointestinal de alguns animais (GOODFELLOW & FIEDLER, 2010).

2.3.1 Taxonomia

Até um tempo atrás não se conheciam características moleculares, bioquímicas ou fisiológicas que pudessem distinguir espécies de micro-organismos pertencentes ao Filo Actinobacteria do grupo das demais bactérias. Atualmente, por meio da análise genômica, proteínas específicas deste grupo puderam ser identificadas. Essas proteínas contribuem para definir e circunscrever o Filo

Actinobacteria e subgrupos dentro dele, fornecendo informações úteis sobre a inter-relação entre os subgrupos (GAO et al., 2006).

Waksman propôs o sistema de classificação das actinobactérias baseado na morfologia e no quimiotipo da parede celular (WAKSMAN & HENRICI, 1943). Contudo, dentre as ferramentas utilizadas para classificar os gêneros dentro do grupo das actinobactérias, a filogenia baseada em 16S rRNA é a mais comum (EMBLEY, 1994).

A composição da parede celular das actinobactérias varia muito segundo o grupo. Existe quatro tipos principais de parede celular, segundo a Tabela 3 (PRESCOTT, 2002).

Tabela 3 – Composição química dos tipos de parede celular dos grupos mais representativos de actinobactérias

Grupos representativos	Tipos de parede celular	Isômero do ácido diamino-pimérico	Glicina na ponte interpeptídica	Açúcares característicos
<i>Nocardioide</i> , <i>Streptomyces</i>	I	L,L	+	NA
<i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Actinoplanes</i>	II	Meso	+	NA
<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>	III	Meso	-	NA
<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>	IV	Meso	-	Arabinose, galactose

NA – Não aplicável, ou não há detecção de nenhum açúcar diferencial

Essa caracterização segue a composição e a estrutura do peptidoglicano, através da localização do isômero do ácido diaminopimérico (DAP) da cadeia lateral do tetrapeptídeo, da presença da glicina na pontes interpeptídeos e do tipo de açúcar contido no peptidoglicano (PRESCOTT, 2002).

Os principais gêneros de actinobactérias e os principais constituintes detectados em suas paredes celulares são: *Streptomyces* (L-DAP, glicina), *Micromonospora* (Meso-DAP, glicina; hidrox-DAP pode estar presente), *Actinomadura* (Meso-DAP), *Nocardia*, *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (*tipodiphtheriae*) (Meso-DAP, arabinose e galactose), *Actinomyces* (lisina e ornitina), *Rothia* (lisina e ácido aspártico), *Oerskovia* (lisina, galactose e ácido aspártico), *Agromyces* (DAB - 2,4-ácido diaminobutírico e glicina) e *Mycoplana* (Meso-DAP - 2-

6-ácido diaminopimélico) e numerosos aminoácidos). Em todos os gêneros foi observado a presença de alanina, ácido glutâmico, ácido murâmico e glucosamina (GOODFELLOW et al, 1976). Hecht e Causey (1976) caracterizaram a parede celular de actinobactérias dos gêneros: *Oerskovia* (Lisina, ácido aspártico, galactose), *Rhodococcus* (arabinose e galactose), *Nocardiosis* e *Thermoactinomyces*, *Geodermatophilus* (galactose), *Dermatophilus* e *Microbispora* (Meso-DAP - ácido diaminopimélico), *Nocardiosis* (L-DAP e glicina). Estes autores também evidenciaram a presença de ácido aspártico na parede celular de actinobactérias do gênero *Actinomyces*.

É considerado um dos maiores Filos no Domínio Bacteria; infere-se isso a partir do padrão de ramificação filogenético do gene 16S rRNA dos micro-organismos pertencentes (LUDWING & KLENK, 2005). A separação do Filo de outros táxons do Domínio Bacteria é ratificada por inserções/deleções em algumas proteínas, pela presença de uma grande inserção no gene 23S rRNA (GAO et al., 2006) e por distintos arranjos de genes (KUNUSAWA, 2007).

A Ordem Actinomycetales é constituída por 63 gêneros (EZZIYYANI et al., 2004). Sendo, geralmente, divididos em dois grupos, os “actinomicetos nocardioformes”, que apresentam micélio rudimentar seguido de fragmentação; e o grupo “esporoactinomicetos” que exibem uma rede de micélio aéreo bem desenvolvido com esporos. Neste último grupo encontram-se os gêneros *Streptomyces*, *Actinoplanes* e *Microbispora*, entre outros (OLANO et al., 2011).

Os dados mais recentes a respeito da classificação taxonômica do Filo Actinobacteria, presente no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2012*, engloba cinco classes, 19 ordens, 50 famílias e 221 gêneros, sendo Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Rubrobacteria e Thermoleophilia as classes constituintes (GOODFELLOW, 2012).

2.3.2 Ciclo de Vida

O ciclo de vida destes micro-organismos varia de acordo com as condições de nutrientes, ou seja, sob boas condições exibem micélios septados multicelulares semelhantes aos fungos; por outro lado, em condições limitantes, desenvolvem micélios vegetativos (GIL et al., 2009; AMBARWATI et al., 2012).

As actinobactérias apresentam um ciclo de vida complexo, o qual se inicia com a germinação do esporo, originando o micélio vegetativo, formando hifas ramificadas que penetram no substrato, sendo responsável pela sustentação e adsorção de nutrientes, metabolizando as fontes orgânicas (polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos) através de enzimas extracelulares. O micélio vegetativo ou hifas primárias, origina o micélio aéreo ou as hifas secundárias, as quais se projetam na superfície do substrato, constituindo o micélio reprodutivo, passando por diferenciações morfológicas, que podem incluir septação e formação de esporos. Estes são formados em consequência da diminuição de nutrientes, onde a maioria é termossensível, mas suportam bem a dessecação e, por isso, têm importância na adaptação (GIL et al., 2009; AMBARWATI et al., 2012), auxiliando na sobrevivência das espécies durante a época de estiagem (VENTURA et al., 2007). O ciclo de vida de actinobactérias do gênero *Streptomyces* pode ser observada na Figura 10.

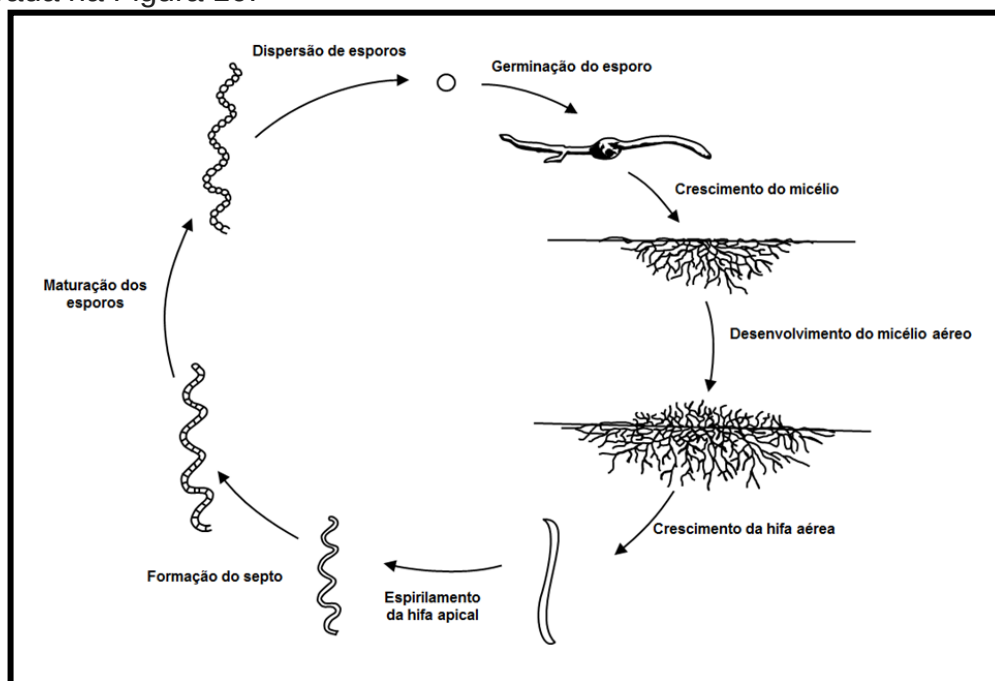


Figura 10 – Ciclo de vida do *Streptomyces*

Fonte: O Autor

A maioria dos gêneros se reproduz pela formação de esporos, os quais podem variar de zoósporos móveis a propágulos especializados (GAO & GUPTA, 2005). Dentro deste grupo de actinobactérias, estão os esporoactinomicetos, que formam esporos em regiões específicas do micélio aéreo. Esses são produzidos em

grande quantidade, onde cada um tem potencial germinativo. Em *Streptomyces* é característico artrósporos; em *Thermoactinomyces*, endósporos; em *Micromonospora*, aleuriósporos; em *Actinoplanaceae*, *Geodermatophilus*, *Kitasatoa* e *Oerskovia*, zoósporos móveis (VENTURA et al., 2007).

Contudo, os gêneros *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium* se reproduzem por fissão binária, enquanto que os gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, conhecidos como actinobactérias nocardioformes, apresentam micélio rudimentar que se fragmenta em elementos cocóides, originando um novo micélio (FLARD & BUTTNER, 2009).

Os pigmentos e metabólitos secundários são produzidos na fase da formação de esporos, devido à ativação do metabolismo secundário (CUNHA et al., 2009; MAHAJAN & BALACHANDRAN, 2012; YAGUE et al., 2013), os quais se acumulam, *in vitro*, durante o processo fermentativo. A técnica de fermentação se faz necessária para a obtenção dos compostos bioativos. Esta metodologia consiste no cultivo do micro-organismo em condições especiais e necessárias para a produção máxima do metabólito desejado, podendo ocorrer em meios líquidos ou sólidos, porém aquelas que ocorrem em meios líquidos são as mais utilizadas pela indústria (OKAFOR, 2007).

O controle de temperatura e pH, nos quais há uma produtividade ótima do metabólito, são fatores importantes que devem ser estabelecidos. É interessante salientar que, a variação na produção dos compostos depende tanto dos fatores ambientais quanto da genética do micro-organismo, sendo essa variação aparentemente causada pela baixa especificidade das enzimas envolvidas no metabolismo secundário, visto que erros no processamento destas substâncias não seriam letais para o micro-organismo (OKAFOR, 2007).

2.3.3 Isolamento e Identificação de Actinobactérias

A distribuição das espécies e diversidade biológica do Filo Actinobacteria são bastantes influenciados por alguns fatores ambientais, como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, atuando no desenvolvimento e proliferação das actinobactérias (ZHAO et al., 2011).

O método de cultivo em placa, utilizado para o estudo dos micro-organismos, apresenta-se como sendo eficiente para analisar as características morfológicas das actinobactérias, como a presença, forma e cor dos micélios e esporos, bem como a característica das colônias, podendo ser usado para classificar quanto à família e gênero, sendo bastante importante a escolha dos meios de cultura adequados, visando as diferenças no desenvolvimento devido aos aspectos nutricionais e à dinâmica das populações envolvidas no ambiente (GIL et al., 2009; ZHAO et al., 2011).

A maioria das actinobactérias cresce em meios de cultura como o Ágar Triptona Soja, Ágar Sangue, Ágar infusão Cérebro e Coração. Por não produzirem mucopolissacarídeos, como outras bactérias, apresentam colônias secas e não cremosas. Contudo, para diferenciação e desenvolvimento de esporos e/ou pigmentos, faz-se necessário meios de culturas suplementados com quitina coloidal, aveia, amido com sais inorgânicos, água com determinados polissacarídeos e como fonte de carbono, extrato de levedura ou peptona. Por exemplo, algumas colônias de espécies de *Streptomyces* crescem como colônias duras brilhantes e pálidas em Ágar Nutritivo; em meio com aveia ou de amido com sais inorgânicos podem crescer colônias amarelas brilhantes com micélio aéreo pulverulento branco (BERGEY et al., 2000).

O crescimento das colônias de actinobactérias em meio sólido pode ser visualizado em 3 a 4 dias de incubação, porém para o desenvolvimento do micélio aéreo maduro com esporos pode demorar de 7 a 14 dias. Algumas linhagens de crescimento lento, o desenvolvimento da colônia podem demorar até 1 mês de incubação. Porém, o crescimento em meios líquidos estacionários se restringe à formação de uma película na superfície ou um sedimento algodinoso deixando o meio líquido transparente, como pode ser visto na Figura 11. Portanto, recomenda-se uma agitação a uma velocidade entre 200 a 250 rpm para permitir uma melhor aeração. Diferentemente das bactérias não filamentosas, as actinobactérias podem crescer formando *pellets* ou agrupamentos de filamentos em meios líquidos (PRESCOTT, 2002).

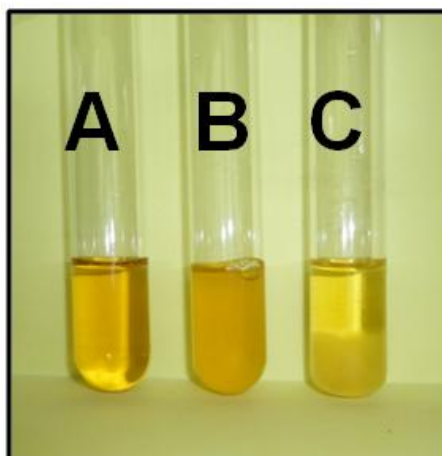


Figura 11 – Crescimento de actinobactéria em meio líquido. O tubo “A”, apresenta o meio Ágar Malte Levedura (ISP-2) estéril e límpido; o tubo “B” foi inoculado com *Staphylococcus aureus*, e após incubação, apresentou crescimento da bactéria em toda a extensão do meio; e o tubo “C”, com a actinobactéria, observa-se um sedimento algodonoso

Fonte: O Autor

Numa análise microscópica, a morfologia das actinobactérias varia conforme o gênero, por exemplo, em *Arthrobacter* e *Rhodococcus* forma de cocobacilo; *Micrococcus*, cocóide; *Nocardia*, fragmentação de hifas e *Streptomyces*, altamente diferenciadas em micélio ramificado (LETEK et al., 2012). Em relação aos esporos, observa-se tipo, número e arranjo da cadeia: em *Micromonospora* e *Thermomonospora*, os esporos são reunidos; em *Microbispora*, em pares longitudinais; *Streptomyces*, esporos em cadeia espiral, retas ou verticiladas; em *Actinoplanes* e *Streptosporangio*, esporos dentro de um esporângio. O uso do microscópio eletrônico traz algumas informações adicionais sobre a superfície dos esporos, se é lisa, enrugada, espinhosa ou felpuda (BULL, 2004).

Juntamente com o cultivo, pode-se realizar uma caracterização bioquímica, nutricional e fisiológica no intuito de auxiliar na classificação taxonômica. Para tanto algumas provas podem ser realizadas, como a utilização de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resistência a antibióticos, testes de degradação de substratos, teste de crescimento em diferentes condições e testes bioquímicos, como prova da catalase e proteólise (WILLIAMS et al., 1983; LECHEVALIER, 1989).

Porém, a análise macro e micromorfológica, aliada a outros testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos, não são suficientes para distinção das

actinobactérias de outros grupos de bactérias Gram-positivas, nem para uma adequada classificação quanto à espécie. Sendo assim, a análise das características genotípicas, através de técnicas de Biologia Molecular, apresenta-se como uma alternativa bastante eficaz para classificar, identificar e determinar a relação filogenética dentro do grupo das actinobactérias (COOK & MEYERS, 2003).

Um método bastante utilizado é a análise através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (STACKEBRANDT et al., 1997). As subunidades 16S e 23S do rRNA são moléculas razoavelmente grandes e, por conseguinte, contêm informações suficientes para permitir comparações significativas. É fato que o 16S rRNA é mais manejável que o 23S em experimentos e portanto, é utilizado mais extensamente nos estudos filogenéticos (MADIGAN et al., 1998).

A sequência de nucleotídeos do 16S rRNA está altamente conservada em algumas regiões e as taxas de mutações são relativamente baixas. Um grande número de sequências estão disponíveis nas bases de dados, facilitando a identificação de regiões com sequências únicas por meio de alinhamentos, com consequente determinação da espécie (ROSADO et al., 1997). Além das sequências altamente conservadas, o gene 16S rRNA possui regiões muito variáveis, as quais possibilitam a medição da relações filogenéticas próximas ou distantes, permitindo determinar o Domínio, Divisão, Família, Classe, Ordem, gênero e espécie dos micro-organismos analisados (PENNY & HALDEMAN, 1997).

Os gêneros apresentam diversidade quanto ao isolamento a partir de diferentes habitats, colonizando o solo (*Streptomyces* spp.); presentes no trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.); e alguns patógenos de animais, plantas e humanos, com destaque as espécies de interesse médico, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Nocardia asteroides*, *Tropheryma whipplei*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Propionibacterium acnes*, os agentes causadores da tuberculose, hanseníase, nocardiose (infecção pulmonar grave em pacientes imunodeficientes), doença de Whipplei, difteria e acne, respectivamente (LETEK et al., 2012).

2.3.4 Importância Biotecnológica das Actinobactérias

A partir do momento que o primeiro antibiótico foi isolado a partir do gênero *Streptomyces*, na década de 40 do século passado, as actinobactérias ganharam destaque na produção de compostos ativos (BRITO-CUNHA et al., 2013; XIONG et al., 2013; SU et al., 2014; WU et al., 2014). É sabido que, esses micro-organismos detêm um metabolismo extremamente rico e diversificado, produzindo metabólitos secundários de extraordinária variedade química, os quais atraem as atenções do ramo da biotecnologia (PRASHITH et al., 2010; BALLAV et al., 2012; SOARES et al., 2012), com aplicações na medicina humana, animal e na agricultura (JANSO & CARTER, 2010). Os gêneros mais estudados e representativos quanto a esse potencial são: *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces* (SATOQUE, 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

O uso de modernas técnicas de Biologia Molecular, entre elas a metagenômica, surge como estratégia na expansão do conhecimento sobre metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias. Esta técnica permite que o DNA de toda a comunidade microbiana presente num ambiente possa ser extraído, incluindo os micro-organismos não cultiváveis em laboratório. Os fragmentos de DNA extraídos podem ser expressos em hospedeiros cultiváveis, como a *Escherichia coli*. Sendo assim, os metabólitos codificados pelos fragmentos da metagenoma podem ser produzidos, avaliados quanto à atividade antimicrobiana e identificados (PUPO & GALLO, 2007). A partir da expressão de genes de vias de biossíntese de metagenoma de solo foram descobertos os antibióticos turbomycina A e B (GILLESPIE et al., 2002) e um antibiótico da classe das indirubinas (OSBURNE et al., 2002).

Os produtos oriundos de actinobactérias incluem os antibióticos, antifúngicos, enzimas extracelulares (quitinases, peroxidases, glucanases), inibidores enzimáticos, neurotransmissores, terpenóides, pigmentos, antitumorais, promotores do crescimento vegetal, pesticidas, entre outros (EZZIYYANI et al., 2004; FRANCO-CORREA et al., 2010; KOMATSU et al., 2013).

Dentre os 45% (7.600) dos compostos com atividades biológicas que são oriundos das actinobactérias filamentosas, aproximadamente 80% são produzidos por *Streptomyces* sp., caracterizando esse gênero como um dos mais importantes

na produção de compostos bioativos. Mesmo com essa diversidade metabólica, acredita-se que apenas cerca de 10% do número total de produtos naturais que podem ser sintetizados por estes organismos foram descobertos (DEMAIN & SANCHEZ, 2009; RAJU et al., 2010; WATVE et al., 2010).

Várias são os compostos bioativos produzidos industrialmente pelas actinobactérias, os antibacterianos, como as penicilinas, as cefalosporinas e vários macrolídeos; os agentes antifúngicos, como a anfotericina B e nistatina; os imunossupressores, como FK-506, rapamicina, ascomicina; os quimioterápicos, como bleomicina, dactinomicina, doxorubicina, estaurosporina; os herbicidas, como a fosfinotricina; no tratamento de diabetes, como a acarbose; e os agentes anti-helmínticos, como avermectina e milbemicina (RODRIGUES, 2006).

2.3.5 As Actinobactérias Endofíticas

Algumas das associações entre actinobactérias e plantas são bem caracterizadas, dentro da Ordem Actinomycetales, onde há exemplos de espécies fitopatogênicas, simbióticas e endofíticas. Em relação às actinobactérias endofíticas, os tecidos de vegetais superiores têm sido explorados como um importante nicho. A biodiversidade de actinobactérias endofíticas é enorme e já foram isoladas de diferentes tecidos internos de uma variedade de vegetais, como trigo, arroz, batata, cenoura, tomate e frutas cítricas (COOMBS et al., 2003; SURETTE et al., 2003; SESSITSCH et al., 2004; TIAN et al., 2007; VELAZQUEZ et al., 2008), e de diferentes espécies de árvores lenhosas, samambaias e musgos (TAECHOWISAN et al., 2003; ZIN et al., 2007; YUAN et al., 2008; ZHAO et al., 2010).

A primeira actinobactéria isolada de tecidos internos de vegetais pertence ao gênero *Frankia*, um micro-organismo fixador de nitrogênio de leguminosas (PROVOROV, 2002). Entretanto, os gêneros de actinobactérias mais relatados na literatura mundial com maior frequência nos tecidos vegetais são *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* e *Nocardioide*s (CONN & FRANCO, 2004; CAO et al., 2004; CAO et al., 2005).

No trabalho realizado por Silva e colaboradores (1995), verificou-se a presença de 53 actinobactérias endofíticas, das quais 22 foram isoladas das folhas e 31 das raízes de milho (*Zea mays* L.) cultivado no *Campus* da UFPE. O gênero mais

frequente foi o *Microbispora* com 62% dos isolados, seguido dos gêneros *Streptomyces* e *Streptosporangium*. Coombs e Franco (2003) isolaram e identificaram actinobactérias a partir de plantas de trigo saudáveis do sul da Austrália. A identificação foi realizada através do 16S rRNA e o sequenciamento dos 49 isolados mostraram que estes pertencem aos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Nocardioideis*.

Taechowisan e colaboradores (2003), de 26 espécies de plantas medicinais da Tailândia, isolaram 330 amostras pertencentes a quatro gêneros: *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* e *Micromonospora*. Tan e colaboradores (2006) isolaram 619 actinobactérias de diferentes culturas de tomate, os quais foram classificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Lee e colaboradores (2008) isolaram 81 actinobactérias endofíticas de raízes de couve chinesa e foram identificados 8 gêneros, sendo o *Microbispora* o mais comum, seguido de *Streptomyces* e *Micromonospora*.

Entre as centenas de actinobactérias endofíticas do gênero *Streptomyces* descritas, poucas espécies são consideradas patogênicas a plantas (TARKKA & HAMPP, 2008). As espécies *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* e *S. ipomoeae* são agentes da sarna comum em batata e em outras culturas relacionadas (LORIA et al., 1997). A patogenicidade foi relatada com a presença de uma ilha de patogenicidade conservada e transmissível nos seus genomas (HEALY et al., 2000).

Muitas actinobactérias endofíticas podem atuar melhorando o rendimento das culturas por meio da proteção do seu hospedeiro contra patógenos. Portanto, a presença endofítica de *Streptomyces* sp. pode representar um importante fator no desenvolvimento e manutenção da saúde do vegetal, bem como atuar no crescimento das plantas, através da assimilação de nutrientes e na produção de metabólitos secundários (SÁNCHEZ-YÁÑES et al., 2007; HWANG et al., 2014; MANIVASAGAN et al., 2014).

Teixeira e colaboradores (2007) isolaram actinobactérias endofíticas em plantas de mandioca com capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e potencial para promover o crescimento da planta. Os micro-organismos endofíticos de raízes podem atuar, também, nos processos de compostagens, devido à capacidade de produzir enzimas capazes de degradar moléculas complexas e

recalcitrantes, especialmente celulose, lignocelulose, xilanase e lignina. Taechowisan e colaboradores (2003) relataram a atividade antifúngica de *Streptomyces* sp. endofíticos isolados de várias plantas, contra dois fungos fitopatogênicos, o *Colletotrichum musae* e o *Fusarium oxysporum*.

Outros compostos bioativos foram obtidos de actinobactérias endofíticas, como as anguciclinas, com atividade contra *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenesi* (MARUNA et al., 2010); os compostos ativos irumamicina, X-14952b e 17-hidroxi-venturicidina A, os quais são todos extraídos do mesmo isolado de *Streptomyces* sp. (FGUIRA et al., 2005); os macrolídeos, 11-O-Monometil e 11,11-O-Dimetilelaiophilins, ativos contra bactérias Gram-positivas e alguns fungos (RITZAU et al., 1998); e o 8-hidroxiquinolina com atividade contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (NARAYANA et al., 2008).

A kakadumicina, um antibiótico de amplo espectro e com ação também sobre o *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, foi produzido pelo isolado de *Streptomyces* sp. (NRRL 30566), endofítico de *Grevillea pteridifolia* (BIEBER et al., 1998). As munumbicinas, antimicrobianos peptídicos produzidas por *Streptomyces* sp. NRRL 30562, obtido da planta medicinal *Kennedia nigriscans*, possuem um amplo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivas, como *Bacillus anthracis* e *Mycobacterium tuberculosis* multiresistente. A munumbicina B mostrou-se ativa, também contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA – “Methicillin-resistant” *Staphylococcus aureus*) e contra *Plasmodium falciparum* (CASTILLO et al., 2002).

El-Shatoury e colaboradores (2009) isolaram 63 actinobactérias do molusco marinho *Donas trunculus anatinus* e observaram que 95% possuíam atividade antimicrobiana, com destaque para a atividade biocida contra *Salmonella typhimurium* e amostras clínicas de *Streptococcus* sp. Dentre os isolados, a linhagem *Streptomyces* 23-2B apresentou alta atividade antitumoral para o carcinoma de Ehrlich, além de baixa toxicidade.

2.4 Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários são compostos não essenciais ao crescimento e desenvolvimento normal dos organismos, porém desempenham funções de adaptação, atuando como compostos de defesa ou como moléculas de sinalização

em interações ecológicas (FREIRE et al., 2014). Nas primeiras décadas do século XX, o surgimento de alguns medicamentos marcou a história da humanidade. Entre outros, pode ser mencionada a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928, um poderoso metabólito secundário, com atividade antibiótica, produzido por *Penicillium notatum* (Figura 12) (CALIXTO & SIQUEIRA JR., 2008).

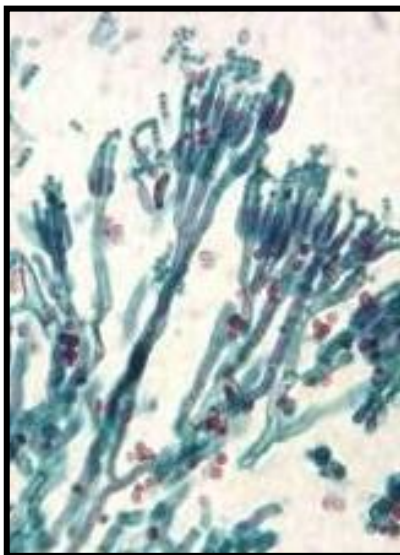


Figura 12 – Micrografia do *Penicillium notatum*, primeiro micro-organismo, no qual se observou a produção de um metabólito secundário com atividade biológica

Com esse marco, surgia uma nova era antibiótica, conduzida por metabólitos secundários isolados de micro-organismos, com ação seletiva sobre bactérias e fungos patogênicos. A partir dessa época, diversos medicamentos surgiram como as penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, entre outros (DEMAIN, 2006). Concomitantemente, com a busca por novos antibióticos, pesquisas foram e têm sido realizadas no intuito de procurar metabólitos secundários com outras atividades biológicas, tais como inibidores de atividade enzimática, substâncias promotoras de crescimento vegetal, herbicidas, inseticidas, antitumorais e imunossupressores (CRAGG & NEWMAN, 2013; FREIRE et al., 2014).

2.4.1 Importância do Estudo de Metabólitos Secundários de Origem Microbiana

Os produtos naturais originados de micro-organismos representam uma apreciável fonte de estruturas químicas únicas, as quais foram otimizadas durante a evolução e produzidas por comunicação e em resposta a mudanças no habitat

microbiano, incluindo o estresse ambiental. Sendo assim, esses compostos possuem importância no processo de descoberta de fármacos e outras substâncias de interesse na biotecnologia. O potencial biotecnológico dos micro-organismos, através dos metabólitos secundários, constituem os principais produtos de interesse econômico para a indústria, agricultura e a medicina (GROSS, 2009; HERTWECK, 2009; NEWMAN & CRAGG, 2012).

Os micro-organismos quando comparados com produtores naturais, como plantas e animais, são considerados fontes mais facilmente renováveis e reprodutíveis de substâncias químicas. Mais de 130 fármacos comerciais em uso corrente são de origem microbiana. Além disso, 67 derivados de compostos microbianos estão em diferentes fases do desenvolvimento clínico nas áreas de antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais, anti-inflamatórios, antineoplásicos, neurológicos, cardiovasculares, doenças metabólicas e imunológicas (LAM, 2007).

A bioprospecção de endofíticos, tem mostrado que estes micro-organismos se destacam na produção de metabólitos secundários, onde 51% dos metabólitos bioativos isolados tratavam de compostos inéditos, enquanto que, das substâncias isoladas da microbiota do solo somente 38% eram novas (SCHULZ et al., 2005).

2.4.2 Principais Produtores de Metabólitos Secundários Microbianos

Até meados da primeira década desse milênio, já haviam sido descritos mais de 22.000 compostos bioativos desenvolvidos a partir de metabólitos secundários de micro-organismos. Entre eles estavam incluídos antibióticos produzidos, por actinobactérias (45%), fungos (38%) e bactérias unicelulares (17%), principalmente por *Pseudomonas* e *Bacillus* (DEMAIN & SANCHEZ, 2009; FREIRE et al., 2014).

As actinobactérias apresentam-se como as principais fontes de novos compostos bioativos (LU, 2009). Algumas espécies do gênero *Streptomyces* são capazes de produzir mais de 180 diferentes metabólitos secundários. Além dos antibióticos produzidos industrialmente, vários compostos comercializados, como agentes imunossupressores, quimioterápicos, herbicidas e vermífugos, entre outras substâncias farmacologicamente ativas, são produzidos por actinobactérias (CRUZ et al., 2015). Estudos demonstraram o potencial de um grande número de

actinobactérias endofíticas de produzem diversos compostos biologicamente ativos com atividades farmacológicas distintas (Tabela 4).

Tabela 4 – Alguns compostos produzidos por actinobactérias endofíticas e suas respectivas atividade biológica

Compostos Bioativos	Actinobactérias Endofíticas	Função	Referência
Celastramicinas A e B	<i>Streptomyces</i> sp. MaB-QuH-8	Antimicrobiana	Pullen et al. (2002)
Kakadumicinas	<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30566	Antibiótica	Castillo et al. (2003)
Cedarmicinas A e B	<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0456	Antifúngica	Igarashi (2004)
Coronamicinas	<i>Streptomyces</i> sp. MSU-2120	Antibiótica	Ezra et al. (2004)
Dinactina dimérica e Nonactina dimérica	<i>Streptomyces</i> sp. Is9131	Antimicrobiana e antitumoral	Zhao et al. (2005)
Naftomicina K	<i>Streptomyces</i> sp. CS	Antitumoral	Lu & Shen (2007)
Saadamicina	<i>Streptomyces</i> sp. Hedaya48	Antifúngica	El-Gendy & El-Bondkly (2010)

2.4.3 Produção *In Vitro* de Metabólitos Secundários Microbianos

Em geral, a biossíntese de metabólitos secundários é ativada na fase final do crescimento logarítmico ou já na fase estacionária da fermentação, como destacado na Figura 13, quando a divisão celular e a produção de biomassa ocorrem em níveis muito baixos (ROBINSON et al., 2001).

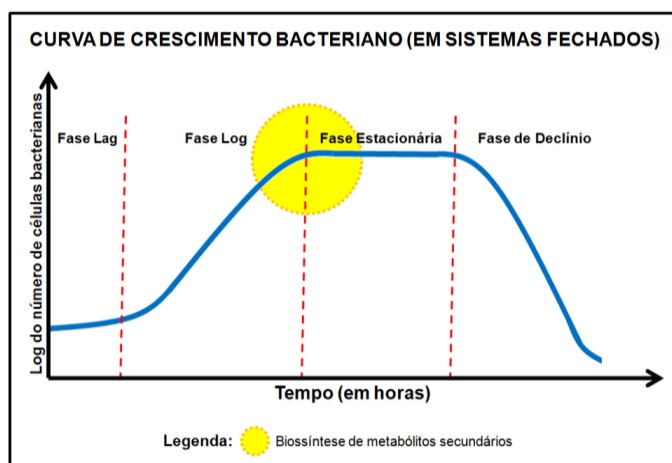


Figura 13 – Curva de crescimento bacteriano, em destaque o momento de maior biossíntese de metabólitos secundários
Fonte: O Autor

O crescimento dos micro-organismos pode ocorrer em fase sólida (usualmente ágar suplementado com nutrientes específicos) ou líquida, esta última podendo ou não ser submetida à aeração. O uso de fermentadores específicos é desejável, devido à obtenção da reprodutibilidade do processo fermentativo. Novas técnicas, como a fermentação em estado (ou suporte) sólido têm surgido, visando promover um crescimento microbiano mais rápido e uma produção diferenciada de metabólitos secundários (ASAGBRA et al., 2005).

Neste método, emprega-se um substrato natural como fonte de carbono, em presença de uma quantidade mínima de água. Substratos sintéticos, como polímeros, com suplementação nutricional, sozinhos ou misturados a substratos naturais, também têm sido usados, desde que o material sintético seja inerte frente ao micro-organismo alvo do processo fermentativo. A fermentação em estado sólido para a produção de antibióticos tem sido considerada muito vantajosa, com um aumento do rendimento e com o período fermentativo mais curto em relação a procedimentos paralelos realizados em culturas submersas (MIZUMOTO et al., 2006).

Observando as condições utilizadas para a produção de antibióticos por micro-organismos, parece consensual que meios de cultura de constituição complexa são mais adequados do que aqueles de constituição quimicamente definida (TAKAHASHI & LUCAS, 2008). A capacidade biossintética do micro-organismo e as condições de fermentação influenciam a produção de metabólitos secundários quali e quantitativamente. Consequentemente, a manipulação de parâmetros envolvidos no processo fermentativo pode alterar a expressão e a diversidade dos compostos produzidos (TAKAHASHI & LUCA, 2008; SCHERLACH & HERTWECK, 2009; MOUSA & RAIZADA, 2013). Ou seja, variando a composição do meio de cultura, a aeração, a temperatura, ou, até mesmo, a forma do recipiente de cultivo, pode-se chegar à descoberta de novos produtos naturais (BADER et al., 2010).

Uma produção sustentável de metabólitos secundários está sendo estudada por inúmeros pesquisadores, em diferentes países (KUSARI et al., 2012). Uma hipótese mais aceitável para a capacidade dos micro-organismos, em especial os endofíticos, na produção dos metabólitos secundários é a existência, nos seus genomas, de “*gene clusters*”, sendo este um grupo de genes permanentemente

alinhados, e que são coletivamente responsáveis em um processo multivariado na biossíntese (SWAMINATHAN et al., 2009; OSBOURN, 2010).

Intensas pesquisas das rotas metabólicas desses “*gene clusters*” possibilitarão um constante desenvolvimento de tecnologia com o intuito de realizar a transferência de *clusters* entre organismos. A transferência genética horizontal (HGT, do inglês, *Horizontal Gene Transfer*) da planta para o micro-organismo é extremamente rara, principalmente em angiospermas, contudo, esse fenômeno foi comprovado recentemente em pelo menos nove casos (RICHARDS et al., 2011; RENNER & BELLOT, 2012). Alguns autores redesenharam as rotas de biossíntese de metabólitos secundários de vários micro-organismos, incorporando-as à bactéria *Escherichia coli* (procariótico) e à levedura *Saccharomyces cerevisiae* (eucariótico), sendo estes micro-organismos caracterizados como fábricas biológicas. Muito embora essa metodologia necessite ainda de aperfeiçoamento, principalmente em relação a alguns metabólitos, ela poderá representar a solução desejável na produção de importantes compostos bioativos úteis para a humanidade (IMMETHUM et al., 2013).

Entretanto, a alta taxa de redescoberta de metabólitos secundários é um problema crônico na química de produtos naturais, evidenciando que novas abordagens são necessárias, no intuito de aumentar a probabilidade de encontrar estruturas biologicamente ativas inéditas. Pesquisas envolvendo sequenciamento genético têm revelado o grande potencial biossintético ainda não explorado que os micro-organismos apresentam. Isso pode ser ilustrado pelos genes que muitas vezes não são expressos devido ao uso de meios de cultivo inapropriados (GROSS, 2009; SCHERLACH & HERTWECK, 2009; ZERIKLY & CHALLIS, 2009).

Entre as novas abordagens visando à busca de compostos bioativos a partir de micro-organismos, destacam-se o cultivo simultâneo de microrganismos (co-culturas), o remodelamento epigenético da biossíntese através de agentes químicos, o estudo sobre moléculas sinalizadoras ou “*quorum-sensing*” e o uso de métodos genômicos para acessar e manipular as vias biossintéticas (SHERLACH & HERTEWECK, 2009).

A utilização de co-culturas pode gerar um estímulo para a comunicação química entre as diferentes espécies, o que pode ampliar a diversidade química produzida em comparação com culturas individuais. Tem sido proposto, também,

que processos epigenéticos exerçam importantes funções regulatórias silenciadoras em *clusters* de genes biossintéticos, principalmente em policetídeo sintetases e peptídeo sintetases não ribossomais. Evidente que a manipulação destas vias com agentes químicos, principalmente inibidores de histona desacetilase, tem levado a um remodelamento de vias biossintéticas e à produção de novos produtos naturais em fungos, como relatou Henrikson e colaboradores, em 2009.

Existem diversas metodologias de extração para a obtenção dos metabólitos secundários bioativos, as quais visam separar compostos de acordo com a polaridade, utilizando o próprio meio onde ocorreu a fermentação (SOUZA et al., 2004) e solventes como metanol (SILVA et al., 2002), clorofórmio, etanol e acetona (CUNHA et al., 2009). Após o procedimento de extração, os metabólitos são concentrados e sua atividade biológica testada, havendo positividade, o composto será identificado e verificada a sua toxicidade, podendo ser utilizado na forma de fármacos ou de outros produtos com alguma aplicabilidade (WENZEL et al., 2013).

2.4.3.1 Avaliação da Bioatividade dos Metabólitos Secundários Microbianos

Para avaliação das possíveis aplicações biotecnológicas dos metabólitos secundários, o isolamento e a identificação de espécies de micro-organismos endofíticos são as primeiras etapas para que se possa, posteriormente, contribuir com a descoberta de novas moléculas com atividade biológica (WENZEL et al., 2013).

A bioprospecção de metabólitos com atividade biológica precisa ser melhorada, utilizando novas tecnologias e alternativas como a engenharia genética; biossíntese mutacional; triagem de alta produtividade, além da identificação mais rápida de moléculas, de forma que seja viável economicamente (BOGGS & MILLER, 2004; GULLO & HUGHES, 2005; SAMIULLA et al., 2005).

Visando a urgência na terapêutica de algumas doenças, estudos a partir dos metabólitos secundários microbianos estão sendo conduzidos sob novas perspectivas, especialmente com inovações metodológicas. Os ensaios em larga escala tornaram-se cada vez mais difundidos. O rápido progresso no estudo do

genoma humano proporcionou fácil acesso para uma grande variedade de alvos moleculares relacionados a várias doenças não infecciosas (BERDY, 2005).

A utilização de testes biológicos mais robustos e confiáveis é um aspecto importante para o sucesso na busca de novos fármacos. Atualmente, ensaios *HTS* (do inglês, *high throughput screening*) realizam, de forma rápida e automatizada, o experimentos de milhares de substâncias químicas em ensaios biológicos preditivos de eficácia clínica, onde os resultados permitem aos pesquisadores selecionar, a partir de amplas bibliotecas químicas, compostos que possuam bioatividade em determinadas vias metabólicas ou que interagem com alvos moleculares específicos. Substâncias identificadas como promissoras nesses ensaios *HTS* seguem para testes subsequentes, tendo por objetivo confirmar e avaliar os dados obtidos nas primeiras triagens. Trata-se do ponto de partida para a descoberta de novos fármacos. Esses ensaios são realizados por equipamentos automatizados, comumente conhecidos como robotizados, que permitem triagens *in vitro* e *in vivo* de grandes coleções de compostos (GUIMARÃES et al., 2009).

2.4.4 Aplicações dos Metabólitos Secundários de Micro-organismos Endofíticos

Os metabólitos secundários possuem elevada importância para a farmacologia e biotecnologia, devido a sua diversidade e complexidade estrutural, visto que poderão ser utilizados como modelos para síntese e semi-síntese de moléculas com atividade biológica de amplo espectro e com baixa toxicidade (KOEHN & CARTER, 2005; GULLO et al., 2006; MOUSA et al., 2013).

Portanto, a busca por novos produtos com atividade biológica é, atualmente, um dos principais impulsionadores do progresso e fonte de soluções técnicas para os problemas atuais e futuros da sociedade. Devido à diversidade de micro-organismos e de sua capacidade de produção de metabólitos secundários bioativos, estes compostos apresentam-se como uma alternativa com ampla possibilidade de aplicações (SANTOS et al., 2011; NEWMAN & CRAGG, 2012; HWANG et al., 2014).

Os metabólitos secundários produzidos por micro-organismos endofíticos, em especial as actinobactérias endofíticas, têm sido empregados em vários campos, incluindo a agricultura, a veterinária e a indústria farmacêutica, devido ao largo

espectro de atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, imunossupressora, antitumoral, inseticidas, anti-inflamatórias, antioxidante, inibidora de enzima e outras (PRASHITH et al., 2010).

Desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, surgiram vários fármacos importantes, originários de metabólitos secundários de micro-organismos, incluindo os antibióticos antibacterianos (cefalosporinas, ácido clavulânico, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, carbapeninas e monobactamas, tetraciclinas, lincosaminas, macrolídeos e peptídios cíclicos e estreptograminas) (PUPO et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2009; CRUZ et al., 2015), os antitumorais (antraciclinas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas, daunomicina e mitramicina) (KLIESLICH, 1986; PUPO et al., 2006), agentes hipoclorestolêmicos (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A, rapamicina, tracolimus e ácido micofenólico), anti-inflamatório (ascomicina), hemolíticos e vasodilatadores (MANN, 2002; KOEHN & CARTER, 2005; NICOLAOU et al., 2009; CRUZ et al., 2015). A Figura 14 apresenta a estrutura química de alguns metabólitos secundários comercializados como fármacos.

De actinobactérias foram isolados diversos agentes anticancerígenos, com diferentes mecanismos de ação, como os derivados antraquinônicos, isolados de *Streptomyces* spp, merecendo destaque os compostos: daunorrubicina e seu análogo hidroxilado, a doxorubicina; o diterpenóide taxol e seu análogo docetaxel; bem como o alcalóide camptotecina e os análogos, que originaram inúmeros derivados atualmente presentes no mercado de fármacos oncológicos (BARREIRO & BOLZANI, 2009; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

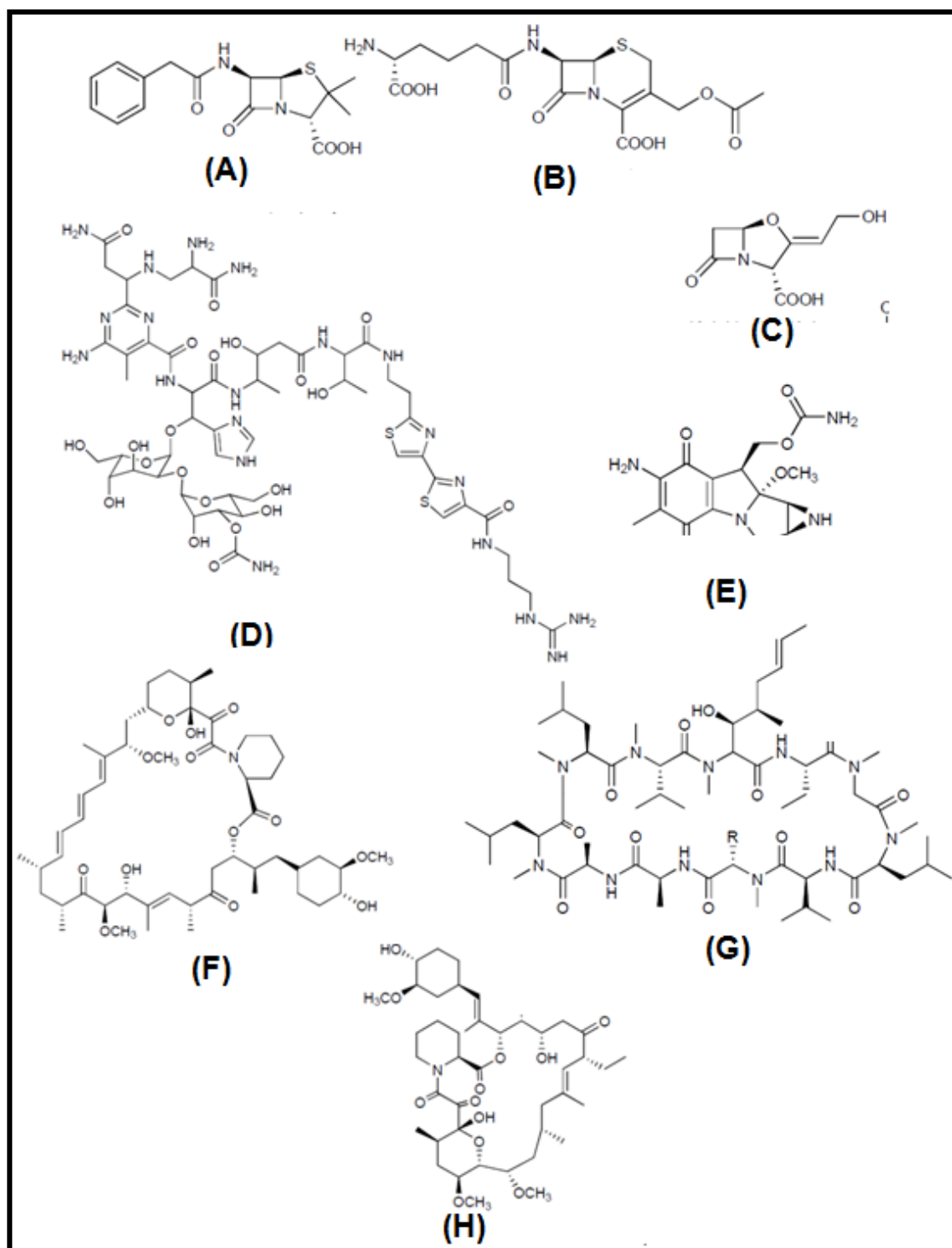


Figura 14 – Fórmulas químicas dos fármacos oriundos de metabólitos secundários. Penicilina G (A); cefalosporina C (B); ácido clavulônico (C); bleomicina B₂ (D); mitomicina C (E); rapamicina (F); ciclosporina A (G); e ascomicina (H)

Pandhare e Deshpande (2002) demonstraram a produção de inibidores de protease alcalina por *Streptomyces* sp.. Este fato é bastante importante, pois estas proteínas são essenciais para o ciclo de vida de muitos organismos fitopatogênicos. Sendo assim, as actinobactérias inibidoras de proteases apresentam um grande potencial no uso de biocontrole em plantas.

Novos compostos com atividade biológica foram obtidos de actinobactérias isoladas de vegetais, entre eles: o herbicidina H, um metabólito de *Streptomyces* sp. SANK63997 isolado de folhas de *Setaria viridis* var. *pachystachys*; e o sulfoximina g-glutalmetionina, isolada de *Microbispora* sp., endofítica de *Carex kobomugi*, esses dois metabólitos agem como inibidores do crescimento de plantas, ou seja, são herbicidas (HASEGAWA et al., 2006). Fistupirona, um metabolito de *Streptomyces* sp. isolado de *Allium fistulosum*, inibe a infecção de couve chinesa por *Alternaria brassicola*. Ácidos pterídicos que induzem a formação de raízes adventícias no feijão, foram isolados do caldo de cultura de *Streptomyces hygroscopicus*, endofítico de *Pteridium aquilinum*. O metabólito 6-prenilindol isolado do caldo de cultura de *Streptomyces* sp. TP-A0595 mostrou atividade antifúngica contra os patógenos de plantas, *Alternaria brassicola* e *Fusarium oxysporum* (IGARASHI, 2004).

Minuto e colaboradores. (2006) verificaram que *Streptomyces* sp., isolado da rizosfera de tomate, suprimem o tombamento de transplantes de tomate causado por *Rhizoctonia solani*, em condições de casa de vegetação. Yuan e Crawford (1995) demonstraram, em seus estudos, que *Streptomyces lydicus* possui forte antagonismo contra vários fungos patogênicos. Nestes estudos, os autores observaram que todos os fungos patogênicos de raízes testados foram moderadamente ou muito sensíveis aos metabólitos antifúngicos liberados pelo *S. lydicus* no ágar. Este microrganismo causou morte local ou no mínimo prolongou a inibição do crescimento de *P. ultimum* e *Aphanomyces euteiches*. Esta espécie de actinobactérias também demonstrou capacidade para parasitar hifas de *Fusarium solani*.

Da planta medicinal *Kennedia nigricans*, nativa da Austrália, foram isolados 24 micro-organismos endofíticos do gênero *Streptomyces*, com destaque para *Streptomyces* sp. 114c-NRRL 30562, que produz o antibiótico mumumbicina com elevada atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, esta atividade foi de 4,5 ng/mL, enquanto a cloroquina, antibiótico padrão, a atividade para *M. tuberculosis* é

de 7,0 ng/mL. Da *Grevillea pteridofilia*, planta do norte da Austrália, foi isolado o *Streptomyces* sp. NRRL 30566 que produz o antibiótico kakadumicina, com elevada atividade para *Plasmodium falciparum*, cuja IC₅₀ é de 7,0 ng/mL (CASTILLO et. al., 2002; CASTILLO et al., 2006).

A cletramicina, produzida por *Streptomyces hygrosopicus* TPA0326, apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Cerdamicina A, isolada do caldo de cultura de *Streptomyces* sp. TP-A0556, um isolado de *Cryptomeria japonica*, apresentou atividade antifúngica contra *Candida glabrata* (IGARASHI, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar actinobactérias endofíticas de folhas da *M. oleifera* oriundas de três localidades do Estado de Pernambuco e avaliar os metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar micro-organismos endofíticos das folhas da *M. oleifera*;
- Determinar as porcentagens dos diferentes grupos de micro-organismos endofíticos;
- Correlacionar essas porcentagens com fatores ambientais, correspondentes às três localidades de coleta das folhas;
- Caracterizar, através de provas bioquímicas, os gêneros e espécies de actinobactérias endofíticas;
- Avaliar a atividade enzimática;
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Produzir metabólitos secundários através da fermentação;
- Extrair e avaliar a atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos.

4. REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.
- AFZAL, I.; RAUF, S.; BASRA, S.M.A.; MURTAZA, G. Halopriming improves vigor, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. **Plant Soil and Environment**, v. 54, p. 382–388, 2008.
- AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v. 17, p. 232-242, 2014.
- AGRA-NETO, A. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; SANTOS, N. D. L.; LUZ, L. A.; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-SANTOS, M. A. V.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of **Moringa oleifera** lectins on survival and enzyme activities of **Aedes aegypti** larvae susceptible and resistant to organophosphate. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 175-184, 2014.
- AHID NUNES, T.; C; BARROS, H.D.; BARBOSA, C.R.M.; BARBOSA, F.M.; FILGUEIRA, P.P.A., PANNIRSELVAM, P.V. Tecnologia de Moringa oleifera como alimento funcional para saúde humana e animal. In: **ENCONTRO NACIONAL DE MORINGA**, 2, 2010. Aracajú, SE, Anais... 2010.
- AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; KIRDAR, B.; OZ, N. A.; ORHON, D.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; INCE, B. K. Effect of wastewater composition on archeal population diversity. **Water Research**, v. 39, p. 1576-1584, 2005.
- ALHAKMANI, F.; KUMAR, S.; KHAN, S. A. Estimation of total phenolic content, **in-vitro** antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of **Moringa oleifera**. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n.8, p. 623-627, 2013.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Endophytic fungi in shoot tip of the peijibaye cultivated *in vivo* and *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n. 5, p. 467-470, 2005
- ALTIDAG, M.; SAHIN, M.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; GULERYUZ, M.; DONMEZ, M. F.; SAHIN, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholdria* and *Pseudomonas* application under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Biological Control**, v. 38, p. 369-372, 2006.
- AMAGLO, N.K.; BENNETT, R.N.; CURTO, R.B.; ROSA, E.A.S.; TURCO, V.; GIUFFRIDA, A.; CURTO, A.; CREA, F.; TIMPO, G.M. Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1047-1054, 2010.
- AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E. Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceous fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1446-1450, 2010.

AMBARWATI, A.; SEMBIRING, L.; SOEGHIHARDJO, C. J. Antibiotic produced by *streptomyces* associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n. 1, p. 52-57, 2012.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.

ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; GAI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 145-180, 2006.

ANJORIN, T.S; IKOKOH, P., OKOLO, S. Mineral composition of *Moringa oleifera* leaves, pods and seeds from two regions in Abuja, Nigeria. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, p. 431-434, 2010.

ANWAR, F. S.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A-H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO, C. S. T.; MELO, E. I.; ALVES, V. N.; COELHO, N. M. M. *Moringa oleifera* Lam. Seeds as a Natural Solid Adsorbent for Removal of Ag I in Aqueous Solutions. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1727-1732, 2010.

ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCONI, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de micro-organismos endofíticos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', 2005. 85 p.

ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARUNPANICHLERT, J.; RUKACHAISIRIKUL,V.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; TEWTRAKUL, S.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1033-1036, 2010.

ASAGBRA, A. E.; SANNI, A. I.; OYEWOLE, O. B. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. **World Journal of Microbiology**, v. 21, p. 107-114, 2005,

ASARE, G. A.; GYAN, B.; BUGYEI, K.; ADJEI, S.; MAHAMA, R.; ADDO, P.; OTUNYARKO, L.; WIREDU, E. K.; NYARKO, A. Toxicity potentials of the

nutraceutical Moringa oleifera at supra-supplementation levels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 265-272, 2012.

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 216-220, 1998.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LAÇAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

ATHAYDE, A. C. L.; FERREIRA, U. L.; LIMA, E. A. L. A. Fungos entomopatogênicos. **Biotecnologia**, v. 21, p. 12-15, 2001.

AWODELE, O.; OREAGBA, I. A.; ODOMA, S.; SILVA, J. A. T.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of Moringa oleifera Lam. (Moringaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 330-336, 2012.

AZEVEDO, J. L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (coord.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, p. 237-251, 1991.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANCULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (ed.). Fungi: multifaceted microbes. **New Delhi: Anamaya Publishers**, p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariuna, p. 445-461. 1998.

AZEVEDO, J.L. **Genética de Micro-organismos**. Editora Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 1998. 536 p.

AZEVEDO, J. L.; BARROS, N. M.; SERAFINI, L. A. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 324-332, 2001.

BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIC, M. K.; BAJPAI, R.; STAHL, U. Relevance of microbial co-coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371-38, 2010.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.

BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012.

BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 827-833, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARRETO, M. B.; FREITAS, J. V. B.; SILVEIRA, E. R.; BEZERRA, A. M. E.; NUNES, E. P.; GRAMOSA, N. V. Constituintes químicos voláteis e não-voláteis de *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, p. 893-897, 2009.

BARRETTI, P. B.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SOUZA, J. T. Screening of endophytic bacteria isolated from tomato plants as potencial biocontrol agents and growth promotion. **Ciência Agrotecnológica**, v. 33, p. 2038-2044, 2009.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, A. A. A. ; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, J. T. Increased nutritional efficiency of tomato plants inoculated with growth-promoting endophytic. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1541-1548, 2008.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência e Agrotecnológica**, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

BASRA, S.M.A.; IFTIKHAR, M.N.; AFZAL, I. Potential of moringa (*Moringa oleifera*) leaf extract as priming agent for hybrid maize seeds. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 1006–1010, 2011.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BERGEY, J.; HENDRICKS, D.; HOLT, J. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ªed. Editorial Lippincott. Williams & Wilkins Co. Philadelphia 2000. 787 p.

BERGSMA-VLAMI, M; PRINS, M. E.; STAATS, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 993-1003, 2005.

BEZERRA, A. M. E.; MEDEIROS F. S.; FREITAS, J. B. S; TEÓFILO, E. M. Avaliação da Qualidade das Sementes de Moringa Oleifera Lam. durante o Armazenamento. **Ciência Agrotecnológica**, v. 28, n. 6, p. 1240-1246, 2004.

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 295-299, 2004.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G.K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 477-482, 2007.

BIEBER B, NÜSKE J, RITZAU M, GRÄFE U. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 381-382, 1998.

BISHWORJIT, N.; SINGH, T. B. Populations of aerobic nitrogen fixers, phosphate solubilizing bacteria and actinomycetes in rice soil of Manipur. **Environment and Ecology**, v. 30, p. 1066-1069, 2012.

BOGGS, A. F.; MILLER, G.H. Antibacterial drug discovery: is small pharma the solution? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 4, p. 32-36, 2004.

BONATELLI, M. L. Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle de antracnose. 2012. 83 f. **Dissertação** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2012.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B. TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRITO-CUNHA, C. C. Q.; CAMPOS, I. T. N.; FARIA, F. P.; BATAUS, L. A. M. Screening and xylanase production by *Streptomyces* sp. Grown on lignocellulosic wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 598-608, 2013.

BROOKS, D. D.; CHAN, R.; STARKS, E. R.; GRAYSTON, S. J.; JONES, M. D. Ectomycorrhizal hyphae structure components of the soil bacterial community for decreased phosphatase production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 245–255, 2011.

BULL, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1 ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004. 496 p.

BUREN, A. M. VAN; ANDRE, C.; ISHIMARU, C. A. Biological control of the bacterial ring rot pathogen by endophytic bacteria isolated from potato. **Phytopathology**, v. 83, p. 1406-1416, 1993.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; HYDE, K. D.; MCKENZIE, E. H. C. Three new species of *Pyricularia* are isolated as zingiberaceous endophytes from Thailand. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 519–524, 2003.

BUSTI, E.; MONCIARDINI, P.; CAVALETTI, L.; BAMONTE, R.; LAZZARINI, A.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Antibiotic-producing ability by representatives of a Newly Discovered lineage of Actinomycetes. **Microbiology**, v. 152, p. 675-683, 2006.

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

CÁCERES, A.; FREIRE, V.; GIRÓN, L.M.; A VILÉS, O.; PACHECO, G. *Moringa oleifera* (Moringaceae): ethnobotanical studies in Guatemala. **Economic Botany**, v. 45, n. 4, p. 522-523, 1992.

CÁCERES, A.; SARAIVA, A.; RIZZO, S.; ZABALA, L.; DE LEON, E.; NAVE, F. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2. Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diurectic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 233-237, 1992.

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

CAMARA, T. R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C. Microrganismos assintomáticos do cultivo in vitro: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E (Ed.). Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 1, p. 221-260, 2010.

CAMPOS, V.P., SOUZA, J.T. & SOUZA, R.M. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 6, p. 285-327, 1998.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 147-152, 2005.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters applied Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 425-430, 2004.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353-359, 2006.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.,

STEVENS, D.; YAYER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CASTILLO, U.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAYER, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M.; TELOW, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.

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

CHAROENSIN, S. Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 7, p. 318-325, 2014.

CHEN, C.; BAUSK, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZKÁBANA, R.; KLOPPER, J. W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, v. 5, p. 83-91, 1995.

CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAU, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 34, p. 121-128, 2000.

CHOI, E. J.; KWON, E. J.; HAM, J.; YANG, H. O. 6-Hydroxymethyl-1-phenazine-carboxamide and 1,6-phenazinedimethanol from a marine bacterium, *Brevibacterium* sp. KMD 003, associated with marine purple vase sponge. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 11, p. 621-624, 2009.

COELHO, J. S.; SANTOS, N.D.L.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; FERREIRA, R.S.; ZINGALI, R.B.; COELHO, L.C.B B.; LEITE, S.P.; NAVARRO, D.M.A.F.; PAIVA, P.M.G. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934-938, 2009.

COOK, A. E.; MEYERS, P. R. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1907–1915, 2003.

COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. Isolation and identification of actinobacteria isolated from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5303–5308, 2003.

COSTA, M. G. C.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) Contaminações

microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. **Embrapa Informação Tecnológica**, v. 1, p. 17-89, 2010.

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

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, P. L. R.; GIAROLA, L. R.; MORAES, S. S.; SILVA, D. E. S. G.; MARCON, J.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; OLIVEIRA, L. G. Triagem metabólica por PKS e NRPS em actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata*. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 333-341, 2015.

CUNHA, I. G. B.; SOBRINHO, T. J. S. T.; SILVA, R. E. A.; AMORIN, E. L. C.; ARAÚJO, J. M. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120-123, 2009.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Global Science and Technology**, v. 04, n. 02, p.47–57, 2011.

CYSNE, J. R. B. Propagação in vitro de *Moringa oleifera* L. 2006. 81 f. **Dissertação** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

DAHOT, M. U. Vitamin contents of the flowers and seeds of *Moringa oleifera* L. **Journal of Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 21-24, 1998.

DAVIES, J. Specialized microbial metabolites: functions and origins. **The Journal of Antibiotics**, v. 66, 361-364, 2013.

DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability. **New Phytologist**, v. 188, p. 24-834, 2010.

DEBNATH, S.; BISWAS, D.; RAY, K.; GUHA, D. *Moringa oleifera* induced potentiation of serotonin release by 5-HT₃ receptors in experimental ulcer model. **Phytomedicine**, v. 11, p. 91-95, 2011.

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

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

DIETARY REFERENCE INTAKE (DRI) Washington, DC: The National Academy of Sciences, 2000.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 1682–1694, 2009.

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

DOBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

EILERT, U.; WOLTERS, B.; NAHRSTEDT, A. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*. **Journal Medicinal Plant Reserch**. v. 42, p. 55-61, 1981.

EL-GENDY, M. M.; EL-BONDKLY, A. M. Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamycin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 831-41, 2010.

ELIAS, B. C.; SAID, S.; DE ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of cultura conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v. 161, p. 273-280, 2006.

EL-SHATOORY, S. A.; EL-SHENAWY, N. S.; IBRAIN, M.; EL-SALAM, A. Antimicrobial, antitumor and in vivo cytotoxicity of actinomycetes inhabiting marine shellfish. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1547-1555, 2009.

EMBLEY, T. M.; STACKENBRANDT, E. the molecular phylogeny and systematic of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 257-289, 1994.

EVANGELISTA, M. Z.; MORENO, E. A. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. **Bio Tecnología**, v. 11, n. 3, p. 37-50, 2007.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A.; TELOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAYER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 785-793, 2004.

FAETH, S. H.; HAYES, C. J.; GARDNER, D. R. Asexual endophytes in a native grass: tradeoffs in mortality, growth, reproduction, and alkaloid production. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 496-504, 2010.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1, n. 5, 2005.

FERNANDES, M. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T. A.; ALENCAR, S. M.; LIMA, M. A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 677-685, 2009.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, p. 8-14, 2008.

FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, D. F.; FERREIRA, J. M.; MARTINS, A. R.; QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. **Pesquisa Médica**, v. 1, n. 4, p. 45-53, 2007.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, A. F. S.; SÁ R. A.; CARNEIRODA-CUNHA, M. M. C.; MORAIS, R. A.; SILVA-LUCCA, M. L. V. OLIVA, L. C. B.B. COELHO; PAIVA P. M. G. Coagulant and antibacterial activities of the watersoluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 186-192, 2011.

FGUIRA, L.F.B.; FOTSO, S.; AMEUR-MEHDI, R.B.; MELLOULI, L.; LAATSCH, H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 341–347, 2005.

FIRÁKOVÁ; ŠTURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Versita**, v. 62, n. 3, p. 251—257, 2007.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. A Darwinian view of metabolismo: molecular properties determine fitness. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 719-726, 2009.

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

FOLKARD, G. K.; SUTHERLAND, J. P.; GRANT, W. D. Natural coagulants at pilot scale. In: Pickford, J. (ed). Water, Environment and Management: Proc. of the 18th

SOUZA, I. F. A. C. Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*...

WEDC Conference, Kathmandu, Nepal. **Loughborough University Press**, p. 51-54, 1993.

FRANÇA, I. S. X.; SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRANCO, M. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de Micorrizas. 2008. 261 f. **Tesis Doctoral**. Universidad Granada – Facultad de Ciencias, Granada. 2008.

FRANCO-CORREA, M.; QUINTANA, A.; DUQUE, C. SUAREZ, C.; RODRÍGUEZ, M.; BAREA, J. Evaluation of actinomycetes strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 209-217. 2010.

FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Ciências Agrárias/Microbiologia**, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.

FROMMEL, M. I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v. 96, p. 928-936, 1991.

FUGLIE, L.J. **The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics**. Church World Service, Dakar. 2002. 172 p.

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K. A.; SEGUIN, P. RANI, M. SAMSON, R. JABAJI, S. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n.3, p. 836-853, 2013.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 106-109, 2006.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycologia Balcanica**, v. 5, p. 1–4, 2008.

GAO, B. PARAMANATHAN, R.; GUPTA, R. Signature proteins that are distinctive characteristics of actinobacteria and their subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 1, p. 69-91, 2006.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Conserved indels in proteins sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 90, p. 24012412, 2005.

GARBEVA, P.; OVERBEEK, L. S.; VAN VUURDE, W.; VAN ELSAS, J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel

electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA-based PCR fragments. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 369–383, 2001.

GEORGEWILL, O. A.; GEORGEWILL, U. O. NWANKWOALA, R. N. P. A Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* Lam extract in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 2, p. 133-135, 2010.

GERDES, G. **Como limpar e tratar água suja com sementes da moringa.** ESPLAR - Centro de Pesquisa e Assessoria, Fortaleza. 1997. 18 p. (Boletim Técnico).

GHASI, S.; NWOBODO, E.; OFILI, J. O. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high fat diet fed wistar rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 21-25, 2000.

GIL, S. V.; PASTOR, S.; MARCH, G. J. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. **Microbiological Research**, v. 164, p. 196-205, 2009.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M.R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics Turbomycin A and B from metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4301-4306, 2002.

GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **Springer**, p. 33-2028, 2012

GOODFELLOW, M.; BROWNELL, G. H.; SERRANO, J. A.; **The biology of the Nocardiae.** Academic Press: New York. 1976. 226 p.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H. P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, p. 119-142, 2010.

GOPALAN, C. **Micronutrient malnutrition in SAARC.** Boletín del NFI. India, 1994. 4 p.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 267-277, 2009.

GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, p. 281-286, 2005.

GULLO, V. P.; MCALPINE, J.; LAM, K.S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 523-531, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

GUO, B. H.; WANG, Y. C.; ZHOU, X. W.; HU, K.; TAN, F.; MIAO, Z. Q.; TANG, K. X. An endophytic Taxolproducing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 875-877, 2006.

GUPTA, A.; GAUTAM, M. K.; SINGH, R. K.; KUMAR, M. V.; RAO, C. V.; GOEL, R. K.; ANUPURBA, S. Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam. Extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 11, p. 1157-1160, 2010.

GUPTA, R.; KANNAN, G. M.; SHARMA, M.; FLORA, S. J. S. Therapeutic effects of *Moringa oleifera* on arsenic-induced toxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 456-464, 2005.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 345-355, 2010.

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

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480 - 484, 2007.

HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNDR, H. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. **Actinomycetologica**, v. 20, n. 2, p. 72-81, 2006.

HAYAKAWA, Y.; SHIRASAKI, S.; SHIBA, S.; KAWASAKI, T.; MATSUO, Y.; ADACHI, K.; SHIZURI, Y. Piericidins C7 and C8, New Cytotoxic Antibiotics Produced by a Marine *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 3, p. 196-200, 2007.

HECTH, S. T.; CAUSEY, W. A. Rapid method for the detection and identificatin of mycolic acids in aerobic actinomycetes related bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.4, p. 284-287, 1976.

HELVIOB. *Moringa oleifera*, El Maná Verde del Trópico, cultivo, comercialización. 2007. Disponível em: <<http://helviobh.googlepages.com/morig>>

aoleifera>. Acesso em: out. 2010.

HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JOYNER, P. M.; CICHEWICZ, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 435-438, 2009.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.

HOPWOOD, D. *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 468-471, 2003.

HWANG, K-S.; KIM, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. O.; LEE, S. Y.; Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 255-268, 2014.

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

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C. STEFFENS, M.B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

IMMETHUN, C. M.; HOYNES-O'CONNOR, A. G.; BALASSY, A.; MOON, T. S. Microbial production of isoprenoids enabled by synthetic biology. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 8-15, 2013.

JAHN S.A.A.; MUSNAD H. A.; BURGSTALLER H. The tree that purifies water: Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. **Unasylva**, v. 38, p.23-28, 1986.

JAISWAL, D.; RAI, P. K.; METHA, S.; CHATTERJI, S.; SHUKLA, S.; RAI, D. K.; SHARMA, G.; SHARMA, B.; KHAIR, S.WATAL, G. Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 6, p. 426-432, 2013.

JAMES, E. K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **The American Phytopathological Society**, v. 15, p. 894-906, 2002.

JANSO, J. E.; CARTER, G. T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p.4377-4386, 2010

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, n.1, p. 83-98, 2014.

JONATHAN, E.L.; BARKER, K.R.; ABDEL-ALIM, F.F.; VRAIN, T.C.; DICKSON, D.W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, v. 30, p. 231-240, 2000.

JUNG, I. L. Soluble Extract from **Moringa oleifera** leaves with a new anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-7, 2014.

KAEWKLA, O.; FRANCO, C. M. M. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. **Microbial ecology**, v.65, n.2, p. 384-393, 2013.

KALTENPOTH, M.; GOTTLER, W.; HERZNER, G.; STROHM, E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. **Current Biology**, v. 15, n. 5, p. 475-479, 2005.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A. Larvicidal and adulticidal potential of medicinal plant extracts from south India against vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 948-953, 2010.

KARADI, R. V.; GADGE, N. B.; ALAGAWADI, K. R. & SAVADI, R. V. Effect of *Moringa oleifera* Lam. root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 306-311, 2006.

KASOLO, J. N.; BIMENYA, G. S.; OJOK, L.; OCHIENG, J.; OGWAL-OKENG, J. W. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 9, p.753-757, 2010.

KATAYON, S.; MEGAT MOHD NOOR, M. J.; ASMA, M.; ABDUL GHAN, L. A.; THAMER, A. M.; AZNI, I.; AHMAD, J.; KHOR, B. C.; SULEYMAN, A. M. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1455-1460, 2006.

KAVITHA, C.; RAMESH, M.; KUMARAN, S. S.; LAKSHMI, S. A. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7-8, p. 681-687, 2012.

KENNY, E.; MUSKIN, P. R.; BROWN, R.; GERBARG, P. L. What the general psychiatrist should know about herbal medicine. **Current Psychiatry Reports**, v.3, n. 3, p. 226-234, 2001.

KHALAFALLA, M. M.; ABDELLATEF, E.; DAFALLA, H. M.; NASSRALLAH, A.; ABOULENEIN, K. M.; LIGHTFOOT, D. A.; EL-DEEB, F. E.; EL-SHEMY, H. A. Active principle from *Moringaoleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 49, p. 8467-8471, 2010.

KLIESLICH, K. Production of drugs by microbial biosynthesis and biotransformation. Possibilities, limits and future developments (1st communication). **Arzneimittelforschung**, v. 36, n. 4, p.774-778, 1986.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DITULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5, p. 446-458, 2003.

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

KOMATSU, M.; KOMATSU, K.; KOIWAI, H.; YAMADA, Y.; KOZONE, I.; IZUMIKAWA, M.; HASHIMOTO, J.; TAKAGI, M.; OMURA, S.; SHIN-YA, K.; CANE, D. E.; IKEDA, H. Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. **ACS Synthetic Biology**, v.2, n. 7, p. 384-396, 2013.

KONEMANN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C.; **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica. 2008. 1760 p.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

KUMAR U.; SINGH A.; SILVA T. K. Isolation and screening of endophytic actinomycetes from different parts of *Embllica officinalis*. **Annals of Biological**, v. 2, n. 4, p. 423-434, 2011.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOHANAN, P. R.; AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of Vinblastine and Vincristine from endophytic fungus **Fusarium oxysporum** isolated from **Catharanthus roseus**. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1-7, 2013.

KUMARI, P.; SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; SRIVASTAVA, M. M. Biosorption studies on shelled Moringa oleifera Lamarck seed powder: Removal and recovery of arsenic from aqueous system. **International Journal of Mineral Processing**, v. 78, p. 131-139, 2006.

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

KUROSAWA, K.; BUI, V. P.; VANESSENDELFT, J. L.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; GHIVIRIGA, I.; SAMBANDAN, T. G.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Characterization of *Streptomyces* MITKK-103, a newly isolated actinomycin X2-producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 145- 154, 2006.

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

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLORES, M. L. Nitrogen fixation and in vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Characterization of the endophytic bacterial community from citrus by isolation, specific PCR and DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 4, p. 637-642, 2006.

LACAVA, P. T.; LI, W. B.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; HARTUNG, J. S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 3, p. 535-541, 2006.

LAKO, J.; TRENNERY, V. C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1727-1741, 2007.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279 - 289, 2007.

LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams e Wilkins, v.4, 1989.

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

LEE, S. O.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; PARK, D. J.; KIM, C. J.; KIM, J. C. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1741–1746, 2008.

LEE, J. L.; HWABG, B. K. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 407-417, 2002.

LETEK, M.; FIUZA, M.; VILLADANGOS, A. F.; MATEOS, L. M.; GIL, J. A. Cytoskeletal proteins of actinobacteria. **International Journal of Cell Biology**, p.1-10, 2012.

LIU, Y.; PERERA, C. O.; SURESH, V. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1533-1539, 2007.

LIU, Y.; ZUO, S.; ZUO, Y.; WANG, J.; SONG, W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. **Annals of Microbiology**, v. 63, n.1, p. 71-79, 2013.

LO MONACO, P. A. V.; MATOS, A. T.; PEREIRA, M. S.; EUSTÁQUIO JÚNIOR, V.; BATISTA, A. P. S.; BAKER, S. A. A. Efeito da adição de diferentes substâncias químicas no extrato de sementes de moringa utilizado como coagulante no tratamento de esgoto sanitário. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 5, p. 1038-1048, 2013.

LORENZI, H., MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas cultivadas. **Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum**, p. 346-347, 2002.

LORIA, R.; BUKHALID, R. A.; FRY, B. A.; KING, R. R. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. **Plant Disease**, v. 81, p. 836-846, 1997.

LU, C. H.; SHEN, Y. A novel ansamycin, naphthomycin K from *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 60, n. 10, p. 649-53, 2007.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C., HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

LU, Y.; DONG, X.; LIU, S. BIE, X. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Produced Antibacterial Substance. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 717-724, 2009.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006.

LV, Y.; ZHANG, F.; CHEN, J.; CUI, J.; XING, Y.; LI, X.; GUO, S. Diversity and antimicrobial activity of endophytic Fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucre*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1300-1306, 2010.

MACHADO, L. S.; CARNEIRO, J. G. M. Semente de Moringa: Avaliação das Farinhas Integral e Desengordurada, Caracterização da Fração Lipídica e Ação Coagulante da Farinha Desengordurada sobre a Água Turva do Rio Poti. Teresina: UFPI. 2000. 13 p. (Relatório final PIBIC/UFPI)

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Brock. Biologia de los microorganismos**. 8ª ed. Prentice May, Barcelona. 1998. 1096 p.

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

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. Distribution of microorganisms in soil. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental microbiology**. Academic Press, p. 57-76, 2009.

MANGALE, S. M.; CHONDE, S. G.; RAUT, P. D. Use of Moringa oleifera (Drumstick) seed as Natural Absorbent and an Antimicrobial agent for Ground water Treatment. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 1, n. 3, p. 31-40, 2012.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S-K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. **Microbiological Research**, v. 169, n.4, p. 262-278, 2014.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.143-148, 2002.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 27-34, 2004.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 189-199, 2007.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1710-1712, 2009.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 280-283, 2005.

MARUNA, M.; STURDIKOVA, M.; LIPTAJ, T.; GODANY, A.; MUCKOVA, M.; CERTIK, M.; PRONAYOVA, N.; PROKSA, B. Isolation, structure elucidation and biological activity of angucycline antibiotics from an epiphytic yew streptomycete. **Journal of Basic Microbiology**, v.50, p. 1-8, 2010.

MATHUR, B. Moringa book. 2005. Disponível em: <www.treesforlife.org>. Acesso em: nov. 2011.

MEHRAVAR, M.; SARDARI, S.; OWLIA, P. Screening of membrane active antimicrobial metabolites produced by soil actinomycetes using membrane models. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 2008-2019, 2010.

MELO, F. M. P.; FIORE, M. F.; MORAES, L. A. B.; SILVA-STENICO, M. E.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4a. **Scientia Agrícola**, v. 66, n. 5, p. 583-592, 2009.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-

MELO, A. M. (Org.) **Micologia: avanços no conhecimento**, Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, v.1, p. 129-140, 2007.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7259-7267, 2007

MENEGHEL, A. P.; GONÇALVES JUNIOR, A. C.; RUBIO, F.; DRAGUNSKI, D. C.; LINDINO, C. A.; STREY, L. Biosorption of cadmium from water using *Moringa (Moringa oleifera Lam.)* seeds. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1383-1390, 2013.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; REZER, A. A. S.; SILVA, L. S.; CAVALHEIRO, C. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de caqui (*Diospyros kaki*, L.) cv. Quioto. In: **CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CYTAL®, 7**, 2009. Concordia, Argentina. Anais... 2009.

MINUTO, A.; SPADAR, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. et al. Control of soilborne pathogens to tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. **Crop Protection**, v.25, n.5, p.468-475, 2006.

MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 869-875, 2006.

MOFIJUR, M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ATABANI, A. E.; ARBAB, M. I.; CHENG, S. F.; GOUK, S. W. Properties and use of *Moringa oleifera* biodiesel and diesel fuel blends in a multi-cylinder diesel engine. **Energy Conversion and Management**, v. 82, p. 169-176, 2014.

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

MOMESSO, L. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; NOMIZO, A.; GOLDMAN, G. H.; PUPO, M. T. Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1680-1685, 2008.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 18-27, 2013.

MOYO, B.; MASIKA, P. J.; HUGO, A.; MUCHENJE, V. Nutritional characterization of *Moringa (Moringa oleifera Lam.)* leaves. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, 60, p. 1-11, 2011.

MOYO, B.; MASIKA, P. J.; MUCHENJE, V. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 1-8, 2012.

MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; SVASTI, S.; TUNTIPOIPAT, S. *Moringa oleifera* Pod Inhibits Inflammatory Mediator Production by Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Lines. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 445-455, 2012.

MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist**, v. 158, p. 579- 591, 2003.

MUKHOPADHYAY, N. K.; GARRISON, N. K.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; KHUSH, G. S.; PECK, H. D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v. 134, p. 151-159, 1996.

MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A. C. O.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

NAHYUN, K.; JIN, C.S.; WONCHEOL, K.; BANG, Y.H.; BEOM, S.K.; YOUNG-SOO, H. & DONGHO, L. Cytotoxic 6-Alkylsalicylic Acids from the Endophytic *Streptomyces laceyi*. **Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 12, p. 797-800, 2006.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

NARAYANA, K.J.P.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M.; VENKATESWARLU, Y.; KRISHNA, P.S.J. Study on Bioactive Compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. **Polish Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 35-39, 2008.

NAVES, R. L., CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Filtrados de culturas bacterianas endofíticas na motilidade, mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 384-388, 2004.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, S. K.; TALBOT, B. G. Active Agents and Mechanism of Coagulation of Turbid Waters Using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703-710, 1995.

NETO, L. F. S. P.; ROSA, G. A.; MORAIS, E. B. O uso de *Moringa oleifera* como purificador natural de alimentos. In: **SEMANA ACADÊMICA**, 5, 2008, Uberlândia: UFU, Anais... 2008.

NEVES, M. C. P.; GAVA, C. A. T.; **Actinomicetos no solo**. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa MG, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

SOUZA, I. F. A. C. Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*...

NEWMAN, D. K.; BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v.10, n. 296, p.1071-1077, 2002.

NICOLAOU, K. C.; CHEN, J. S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2290-2303, 2009.

NOROVSUREN, Z. H.; OBOROTOV, G. V.; ZENOVA, G. M.; ALIEV, R. A.; ZVYZGINTSEV, D. G. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. **Biological Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 505-507, 2007.

NOUMAN, W.; SIDDIQUI, M. T.; MAQSOOD, S.; BASRA, A. *Moringa oleifera* leaf extract: An innovative priming tool for rangeland grasses. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 36, p. 65-75, 2012.

NOUMAN, W.; BASRA, S. M. A.; SIDDIQUI, M. T.; YASMEEN, A.; GULL, T.; ALCAYDE, M. A. C. Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: a review. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, p. 1-14, 2014.

ODURO, I.; ELLIS, W. O.; OWUSU, D. Nutritional potential of two leafy vegetables: *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves. [Scientific Research and Essays](#), v. 3, n. 2, p. 57-60, 2008.

OJIMA, I. Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2587-2588, 2008.

OKAFOR, N. Modern industrial microbiology and biotechnology. **Science Publishers**, USA, p. 54-98, 2007.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M. S.; CORRÊA JUNIOR, A.; FERNANDES, G. W. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

OKORO, C. K.; BROWN, R.; JONES, A. L.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A.; GOODFELLOW, M.; BULL, A. T. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 95, n. 2, p. 121-133, 2009.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 2, 144–164, 2011.

OLIVEIRA, H.S. Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Moringa oleifera* (Moringaceae) na parasitemia de camundongos infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2000, Brasília-DF, Livro de resumos, 190p, p.100, resumo 4458-A10.

OLIVEIRA, I.C.; TEIXEIRA, E.M.B.; GONÇALVES, C.A.A. et al. **Avaliação centesimal da semente de *Moringa oleifera* Lam.** In: SEMINÁRIO INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2, 2009, Uberaba. Anais... Uberaba: IFTM, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; SILVA, M. G.; VAN DER SAND, S. T. Potencial antifitopatogénico de actinobactérias endofíticas aisladas para plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) del sur de Brasil y caracterización de *Streptomyces* sp. R18(6), un agente potencial de biocontrol. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 565-572, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Traditional medicine: definitions. Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/areas/traditional/definitions/en/>>. Acessado em: 23 de jan. 2015.

OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical Innovation. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 10, p. 449-459, 2010.

OSBURNE, M. S.; GROSSMAN, T. H.; AUGUST, D. R.; MACNEIL, I. Tapping into microbial diversity for natural products drug discovery. **American Society for Microbiology News**, v. 66, n. 7, p. 411-417, 2002.

PADHI, S.; TAYUNG, K. Antimicrobial activity and molecular characterization of an endophytic fungus, *Quambalaria* sp. isolated from *Ipomoea carnea*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 793-800, 2013.

PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. C. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.

PALIWAL R.; SHARMA, V.; PRECHETA A review on horse-radish tree (moringa oleifera): a multipurpose tree with high economic and commercial importance, **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 317-328, 2011.

PANDEY, B.; GHIMIRE, P.; AGRAWAL, V. P. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 20, p. 1-4, 2003

PANDHARE, J.; ZOG, K.; DESHPANDE, V.V. Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 2, p.165-169, 2002.

PASSOS, R. M.; SANTOS, D. M. C.; SANTOS, B. S.; SOUZA, D. C. L.; SANTOS, J. A. B.; SILVA, G. F. Qualidade pós-colheita da moringa (moringa oleifera lam) utilizada na forma in natura e seca. **São Cristovão: Revista GEINTEC**, v. 3, n. 1, p.113-120, 2012.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; RODRIGUESFILHO, E.; SOUZA, A. Q. L.; PEREIRA, J. O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

PATHOM-AREE, W.; STACH, J. E.; WARD, A. C.; HORIKOSHI, K.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. **Extremophiles**, v. 10, n. 3, p. 181-189, 2006.

PEDRAZA R. O.; BELLONE C, H.; BELLONE, S. C.; SORTE, P. M. F. B.; TEIXEIRA, K. R. S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 36-43, 2009.

PEDRINHO, E. A. N. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.). 2009. 74 f. **Tese** - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal. 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Micro-organismos endofíticos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PENNY, S.; HALDEMAN, D. The microbiology of the terrestrial deep subsurface. Capítulo 10 Phylogenetic Analysis and Implications for Subsurface microbiology, CRC Press 1997

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T. & FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PEREIRA, D. F.; VASCONCELOS, V. M.; VIEIRA, A. C. et al. **Composição e caracterização do óleo de moringa**. In: II ENCONTRO NACIONAL DE MORINGA. Aracajú/Sergipe, 2010.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1992.

PHIRI, C. Influence of *Moringa oleifera* leaf extracts on germination and early seedling development of major cereals. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, p. 774-777, 2010.

PHIRI, C.; MBEWE, D. N. Influence of *Moringa oleifera* leaf extracts on germination and seedling survival of three common legumes. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 12, p. 315-317, 2009.

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

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p. 665-672, 1995.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, p. 135-152, 2012.

POON, E. S.; HUANG, T. C.; KUO, T. T. Possible mechanism of symptom inhibition of bacterial blight of rice by an endophytic bacterium isolated from rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 18, p. 61-70, 1977.

POPOOLA, J. O.; OBEMBE, O. O. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n. 2, p. 682-691, 2013.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1195-1200, 2005.

PRABHU, K.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potencial of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 124-129, 2011.

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

PRESCOTT, L M. **Microbiology**. 5 ed. Editorial McGraw-Hill. Boston, massachusetts, USA. Pp524-528, 2002

PRITCHARD, M.; CRAVEN, T.; MKANDAWIRE, T.; EDMONDSON, A. S.; O'NEIL, J. G. A comparison between *Moringa oleifera* and chemical coagulants in the purification of drinking water: An alternative sustainable solution for developing countries. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 35, p. 798-805, 2010.

PROSSER, J. L.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 384-392, 2007.

PROVOROV, N. A.; BORISOV, I. A.; TIKHONOVICH, A. Comparative genetics and evolutionary morphology of symbiosis formed by plants with nitrogen-fixing microbes and endomycorrhizal fungi. **Zhurnal Obshchei Biologii**, v. 63, p. 451-72, 2002.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D. D.; LOHMANN, S.; DE CASTRO FRANÇA, S.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MÖLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRÄFE, U.; LEISTNER, E. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 162-167, 2002.

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

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

RAJKUMAR, M.; LEE W. H.; LEE K.J. Screening of bacterial antagonists for biological control of Phytophthora blight of pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 55-63, 2005.

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

RAKESH, S.; SINGH, V. J. Anti-inflammatory activity of Moringa oleifera leaf and pod extracts against carrageenin induced paw edema in albino mice. **Pharmacology Online**, v. 1, p. 140- 144, 2011.

RAMOS, H. P.; BRAUN, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S. Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immersa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 629-632, 2010.

RANGEL, M. S. Um purificador natural de água e um complemento alimentar para o nordeste do Brasil. Tabuleiros Costeiros, Aracajú, SE. 2009. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br>>. Acesso em: abr. 2014.

RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; CHANDRA, V. Tamarindus indica L. and Moringa oleifera M extract administration ameliorates fluoride toxicity in rabbits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 47, n. 11, p. 900-905, 2009.

REDDY, V. P. V.; RAO, S. N. S. S.; PRATIBHA, M. S.; SAILAJA, B.; KAVYA, B.; MANORAMA, R. R.; SINGH, S. M.; SRINIVAS, R. T. N.; SHIVAJI, S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 8, p. 538-546, 2009.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985-994, 2000.

REMYA, M.; VIJAYAKUMAR, R. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. **Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 2008.

RENNER, S. S.; BELLOT, S. Horizontal gene transfer in eukaryotes: fungi-to-plant and plant-to-plant transfers of organellar DNA. **Advances in Photosynthesis and Respiration**, v. 35, p. 223-235, 2012.

RICHARDS, T. A.; LEONARD, G.; SOANES, D. M.; TALBOT, N. J. Gene transfer into the fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 98-110, 2011.

RITZAU, M.; HEINZE, S.; FLECK, W.F.; DAHSE, H.M.; GRÄFE, U. New Macrodilide Antibiotics, 11-O-Monomethyl- and 11,11¢-O-Dimethylelaiohyphylins, from *Streptomyces* sp. HKI-0113 and HKI-0114. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1337-1339, 1998.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Microbiol Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROCHA, I. F.; PEREIRA, V. J. Influência do período de armazenamento no desempenho de mudas de moringa (*Moringa oleifera* LAM.) sob condições de ambiente controlado. In: ENCONTRO NACIONAL DE MORINGA, 2009, Aracaju - Sergipe. 2009. Disponível em: <<http://linux.alfamaweb.com.br/enam2009.com.br/site/trabalhos/01-02-ENAM2009.pdf>>. Acesso em: mar. 2013.

ROCHA, R.; LUZ, D. E.; ENGELS, C.; PILEGGI, S. A. V.; JACCOUD FILHO, D. S.; MATIELLO, R. R.; PILEGGI, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 73-78, 2009.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES L. S.; OLIVEIRA A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, n. 1-2, p. 249-261, 2008.

RODRIGUES, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. Porto Alegre, 2006.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by fungi from *Spodiopogon piceus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 261-267, 2000.

RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. et al. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

ROMERO, D.; TRAXLER, M. F.; LOPEZ, D.; KOLTER, R. Antibiotics as signal molecules. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5492-5505, 2011.

ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 420-430, 2010.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 24-33, 2005.

RUDGERS, J. A.; CLAY, K. Endophyte symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 107-124, 2007

RUPPEL, S.; RUHLMANN, J.; MERBACH, W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and on line emission fingerprinting. **Plant and Soil**, v. 286, p. 21-25, 2006.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.

SAJID, I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. Antitumour compounds from a saline soil isolate, *Streptomyces griseoincarnatus* CTF15. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 25, n. 5, p. 549-559, 2011.

SAMIULLA, D. S.; VAIDYANATHAN, V. V.; ARUN, P. C.; BALAN, G.; BLAZE, M.; BONDRE, S.; CHANDRASEKHAR, G.; GADAKH, A.; KUMAR, R.; KHARVI, G.; KIM, H.-O.; KUMAR, S.; MALIKAYIL, J.A.; MOGER, M.; MONE, M.K.; NAGARJUNA, P.; OGBU, C.; PENDHALKAR, D.; RAJA RAO, A. V. S.; VENKATESHWAR RAO, G.; SARMA, V. K.; SHAIK, S.; SHARMA, G. V. R.; SINGH, S.; SREEDHAR, C.; SONAWANE, R.; TIMMANNA, U.; HARDY, L. W. Rational selection of structurally diverse natural product scaffolds with favorable ADME properties for drug discovery. **Molecular Diversity**, v. 9, n. 1-3, p. 131-139, 2005.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; VÁZQUEZ, N. J. R. Highperformance liquid chromatography method to measure α and β -tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, p. 111-114, 2006.

SANTANA, C. R.; PEREIRA, D. F.; ARAÚJO, N. A.; CAVALCANTI, E. B.; SILVA, G. F. Caracterização físicoquímica da moringa (*Moringa oleifera* Lam). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 55-60, 2010.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância á salinidade. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v. 28, p. 142-149, 2012.

SANTOS, N. D. L.; MOURA, K. S.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, G. K. N.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Oviposition-stimulant and ovidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS One**, v. 7, n. 9, P. 1- 10, 2012

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SANTOS, R. O.; RABELO, T. S.; SCRHANK, S. G. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para o tratamento de efluentes têxteis. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 24, 2007, Belo Horizonte, MG. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Belo Horizonte, MG, ABES, 2007, p. 1-8.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212. 2011

SCHENDURE, J.; JI, H. Next-generetaion DNA sequencing. **Nature Biotecnonology**, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SCHERLACK, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continnum. **Mycological Research**, v. 6, n. 109, p. 661-686, 2005

SCOTT, J. J.; OH, D-C.; YUCEER, M. C.; KLEPZIG, K. D.; CLARDY, J.; CURRIE, C. R.. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. **Science**, v. 332, n. 5898, p. 63, 2008.

SÉGALAT, L. Invertebrate animal models of diseases as screening tools in drug discovery. **Chemical Biology**, v. 2, n .4, p. 231-236, 2007.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 239–249, 2004.

SHARMA, P. K.; SINGH, K.; SINGH, R. CAPALASH, N.; ALI, A.; MOHAMMAD, O.; KAUR, J. Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary

structure at ambient temperature. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 2795-2804, 2012.

SHIOMI, K.; HATAE, K.; HATANO, H.; TAKAHASHI, Y.; JIANG, C. L.; TOMODA, H. KOBASHI, S.; TANAKA, H.; OMURA, S. A New Antibiotic, Antimycin A9, Produced by *Streptomyces* sp. K01-0031. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 74-78, 2005.

SHWETA, S.; GURUMURTHY, B. R.; RAVIKANTH, G.; RAMANAN, U. S.; SHIVANNA, M. B. Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. **Phytomedicine**, v. 20, n.3-4, p. 337-342, 2013.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of **Moringa oleifera** seed flour. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1883-1891, 2013.

SUNITHA, V. H.; DEVI, N. SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.9, n. 1, p. 1-9, 2013.

SIDDIQUI, I.A. & S. EHTESHAMUL-HAQUE. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot root knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterranea**, v. 28, n. 2, p. 189-192, 2000.

SILVA, A.C.; ARAUJO, J.M.; AZEVEDO, J.L. Ocorrência de actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*). 20º Reunião anual de Genética de Microrganismos, Piracicaba. v. 20, 1995.

SILVA, A.R.; KERR, W.E. Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999. 95 p.

SILVA, D. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Diazotrophic bactéria occurrence in seeds of two wetland Rice cultivares. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 1-4, p. 158-161, 2011.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2038-2041, 2010.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A. R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1463-1466, 2005.

SILVA, G.H.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 6, p. 594-598, 2002.

SOUZA, I. F. A. C. Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*...

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasílica**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1883–1891, 2013.

SIQUEIRA, M. V., BRAUN, U., SOUZA-MOTTA, C. M. *Corynespora subcylindrica* sp. nov. - a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. **Sydowia**, v. 60, n. 1, p. 113-122, 2008.

SOARES, E. C. L.; COSTA, E. P.; SILVA, L. C. N.; ARAÚJO, J. M. Isolamento, Identificação e Atividade Antimicrobiana de *Streptomyces* Sp. UFPE 968. **Scientia Plena**, v. 8, n. 12, p. 01–07. 2012.

SOUSA, E. *Moringa*. In: *Enciclopédia Luso-Brasileira da Cultura, Edição Século XXI* Volume XX. Braga: Editorial Verbo, 2001.

SOUZA A. Q. L.; SOUZA, A. F. L.; ALTOLFI FILHO, E.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução a micropropagação de plantas. 1. ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

SPILOTIS, V.; LALAS, S.; GERGIS, V.; DOURTOGLOU, V. Comparision of antimicrobial activity of seeds of different *Moringa oleifera* varieties. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 8, p. 39-40, 1998.

SREEKANTH, D.; SYED, A.; SARKAR, S.; SARKAR, D.; SANTHAKUMARI, B.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Production, purification, and characterization of Taxol and 10-DABIII from a new Endophytic Fungus *Gliocladium* sp. Isolated from the Indian Yew Tree, *Taxus baccata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 1342–1347, 2009.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. Proposal for a new hierarchic classification system, actinobactéria class nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

STANLEY, Y. The Family Streptomycetaceae. Bergy's Manual of Sistematic Bacteriology. Baltimore USA: USA Ed. Williams & Wilkins. V.4 p605-669, 2344-2347, 1994

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

STINSON M.; EZRA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, v. 165, p. 913-922, 2003.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MARTINEZMILLER, C.; CONDRON, M. M.; TELOW, D. B.; HESS, W. M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

STROBEL, G., DAISY, B. CASTILLOO, U. HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SU, R.; WANG, A.; HOU, S.; GAO, P.; ZHU, G.; WANG, W. identification of a novel fumarase C from *streptomyces lividans* TK54 as a good candidate for L-malate production. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 497-504, 2014.

SURETTE M.A.; STURZ A.V.; LADA R.R.; NOWAK J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L.): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant Soil**. v. 253, p. 381–390, 2003.

SUZUKI, K.; NAGALI, K.; SUZUKI, Y. Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. **Actinomycetologia**, v. 8, n. 2, p. 122-127, 1994.

SWAMINATHAN, S.; MORRONE, D.; WANG, Q.; FULTON, D. B.; PETERS, R. J. CYP76M7 is an ent-cassadiene C11a-hydroxylase defining a second multifunctional diterpenoid biosynthetic gene cluster in rice. **Plant Cell**, v. 21, p. 3315–3325, 2009.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 381–385, 2003.

TAHILIANI, P.; KAR, A. Role of *Moringa oleifera* leaf extract in the regulation of thyroid hormone status in adult male and female rats. **Pharmacy Research**, v. 41, n. 3, p. 319-323, 2000.

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

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, H.M.; CAO, L.X.; HE, Z.F.; SU, G.J.; LIN, B.; ZHOU, S.N. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities

against *Ralstonia solanacearum* in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1275–1280, 2006.

TARKKA, M. T.; HAMPP, R. Secondary metabolites of soil streptomycetes in biotic interactions. In: Karlovsky P, editor. Secondary Metabolites in Soil Ecology. 14. Berlin, Germany: Springer, Soil Biology Series; pp. 107–118. 2008.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.

TEIXEIRA, E. M. B. Caracterização química e nutricional da folha de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). 2012. 94 f. **Tese** de doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2012.

TEXEIRA, E. M. B.; CARVALHO, M. R. B.; NEVES, V. A.; SILVA, M. A.; ARANTES-PEREIRA, L. Chemical characteristics and fractionation of proteins from **Moringa oleifera** Lam. Leaves. **Food Chemistry**, v. 147, n. 15, p. 51-54, 2014.

TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2007.

TIAN, X. L.; CAO, L. X.; TAN, H. M.; HAN, W. Q.; CHEN, M.; LIU, Y. H.; ZHOU, S. N.; Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 700–707, 2007.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n. 296; p. 1064-6, 2002.

TRIGIANO, R. N.; NOE, J. P; WINDHAM. T.; WINDHAM, A. Nematoides parasitas de plantas. In: Fitopatologia. II Porto Alegre: Artmed, Cap. 8, p. 83-95. 2010.

TRINGE, S.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 442-446, 2008.

TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Manejo do Nitrogênio e enxofre na nutrição e adubação da cana-de-açúcar. CENA/USP, Piracicaba, SP.p.46.2009

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. Y. U.; CHEDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use. **A Review Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 117–126, 2006.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A.D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC1. **Tetrahed**, v. 64, p. 7583.7586, 2008.

TURGEON, B. G.; BUSHLEY, K. E. Secondary metabolism. In: BORKOVICH, K.; EBBOLE, D. (eds.). Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **American Society of Microbiology**, p. 376-395, 2010.

URIZAR, N. L.; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F.V.; ORDENTLICH, P.; YAN, Y.; GONZALEZ, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D. D. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. **Science**, v. 296, p. 1703-1706, 2002.

UZAMA, D.; THOMAS, S. A.; ORISHADIPE, A. T.; CLEMENT, O. A. The development of a blend of *Moringa oleifera* oil with diesel engines. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 2, p. 999-1001, 2011.

VALDÉS, M.; PEREZ, N.; ESTRADA, P.; CABALLERO, J.; PEÑA, J.; NORMAND, P.; HIRSCH, A. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 460-466, 2005.

VASCONCELLOS, R. L. F.; SILVA, M. C. P.; RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 6, p. 743-746, 2010.

VELAZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M.J.; RIVAS, R.; ZURDOPINEIRO, J.L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E.J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 118–124, 2008.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; SINDEREN, D. Genomics of actinobacteria: tracing the volutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.

VIJAY, L.; KUMAR, U. Effect of *Moringa oleifera* Lam. on normal and dexamethasone suppressed wound healing. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. s219-s223, 2012.

VISALAKCHI, S.; MUTHUMARY, J. Taxol (anticancer drug) producing endophytic fungi: an overview. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1-9, 2010.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* against red rot disease of sugarcane caused by *Coletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, p. 1-10, 2002

WAKSMAN, S. A.; HERINCI, A. T. *Journal of Bacteriology*, 1943, 46, 337
WAKSMAN, S. A.; SCHATZ, A.; REYNOLDS, D. M. Production of Antibiotic Substances by Actinomycetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, p. 112-124, 2010.

WATVE, M.G.; TICKOO, R.; MAITHILI, M.; JOG, B.; Bhole, D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 386–390, 2001.

WENZEL, J. B.; MORECO, A. A. A.; BOAS, E. V.; BURIN, F. A. G.; SOUZA, R. O. Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. **Perspectivas online – Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2013.

WEST, E. R.; COTHER, E. J.; STEEL, C. C.; ASH, G. J. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, p. 209-216, 2010

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; TRUJILLO, M. E.; LUDWIG, W.; SUZUKI, K. I.; PARTE, A. **Bergey's Manual® Of Systematic Bacteriology**. vol. 5. Springer. 2012.

WILLIAMS, S. T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E. M. H.; SNEATH, P. H. A.; SACKIN, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n.6, p. 174-1813, 1983.

WU, H.; LIU, W.; DONG, D.; LI, J.; ZHANG, D.; LU, C. *SlnM* gene overexpression with different promoters on natamycin production in *Streptomyces lydicus* A02. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 163-172, 2014.

WU, L.; HAN, T.; LI, W. JIA, M. RAHMAN, K.; QIN, L. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. **Current Microbiology**, v.66, n. 1, p. 40-48, 2013.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y-Q.; TANG, J-J.; ZHANG, A-L.; GAO, J-M. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. **Journal of agriculture and Food Chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3584-3590, 2014.

XIONG, Z-Q.; YANG, Y-Y.; ZHAO, N.; WANG, Y. Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, *Taxus x media*. **BMC Microbiology**, v.13, n. 71, p. 1-11, 2013.

XIONG, Z.; TU, X.; WEI, S.; HUANG, L.; LI, X.; LU, H.; TU, G. The mechanism of antifungal action of a new polyene macrolide antibiotic antifungalmycin 702 from *Streptomyces padanus* JAU4234 on the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. **Plos One**, v. 8, n. 8, p. 1-6, 2013.

YAGUE, P.; LÓPEZ-GARCÍA, M. T.; RIOSERAS, B.; SÁNCHEZ, J.; MANTECA, Á. Pre-sporulation stages of streptomyces differentiation: State-of-the-art and n.future perspectives. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342, n. 2, p. 79–88, 2013.

YAN, L. L.; HAN, N. N.; ZHANG, Y. Q.; YU, L. Y.; CHEN, J.; WEI, Y. Z.; LI, Q. P.; TAO, L.; ZHENG, G. H.; YANG, S. E.; JIANG, C. X.; ZHANG, X. D.; HUANG, Q.;

HABDIN, X.; HU, Q. B.; LI, Z.; LIU, S. W.; ZHANG, Z. Z.; HE, Q. Y.; SI, S. Y.; SUN, C. H. Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 5, p. 259-61, 2010.

YASMEEN, A.; BASRA, S. M. A.; WAHID, A.; NOUMAN, W.; REHMAN, H. Exploring the potential of *Moringa oleifera* leaf extract (MLE) as a seed priming agent in improving wheat performance. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 512-520, 2013.

YASSA, H. S.; TOHAMY, A. F. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adul rats. **Acta Histochemica**, v.116, n. 5, p. 844-854, 2014.

YE, L.; ZHOU, Q.; LIU, C.; LUO, X.; NA, G. XI, T. Identification and fermentation optimization of a marine-derived *Streptomyces Griseorubens* with anti-tumor activity. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38, n. 1, p. 14-31, 2009.

YU, Y.; LI, H.; ZENG, Y.; CHEN, B. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic Sandy intertidal sediments. **Polar Biology**, v. 33, p. 869–875, 2010.

YUAN, H.M.; ZHANG, X.P.; ZHAO, K.; ZHONG, K.; GU, Y.F.; LINDSTROM, K. Genetic characterisation of endophytic actinobacteria isolated from the medicinal plants in Sichuan. **Annals Microbiology**, v. 58, p. 597– 604, 2008.

YUAN, W.M., CRAWFORD, D.L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYE108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 3119-3128, 1995.

ZABALA, D.; BRAÑA, A.F.; FLÓREZ, A. B.; SALAS, J. A.; MÉNDEZ, C. Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. **Metabolic Engineering**, v. 20, p. 187-197, 2013.

ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; TREVISANT, H. C.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2233-2236, 2012.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **ChemBioChem**, v. 10, p. 625-633, 2009.

ZHANG, C.; LIU, S.; LIN, F.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. *Trichoderma taxi* sp.nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, p. 90–96, 2007.

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

ZHAO, P. J.; FAN, L. M.; LI, G. H.; ZHU, N.; SHEN, Y.M. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 11, p. 1228-1232, 2005.

SOUZA, I. F. A. C. Bioprospecção de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*...

ZIN, N. M.; SARMIN, N. I.; GHADIN, N.; BASTI, D. F.; SIDIK, N. M.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 274, p. 83-88, 2007.

CAPÍTULO 1*

(*) - Artigo aceito para ser publicado pelo ***British Microbiology Research Journal***.



Endophytic microorganisms in leaves of *Moringa oleifera* collected in three localities at Pernambuco State, northeastern Brazil

Igor F.A.C. Souza^{1*}, Thiago H. Napoleão¹, Kêzia X.R.F. de Sena², Patrícia M.G. Paiva¹, Janete M. de Araújo², Luana C.B.B. Coelho^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Brazil.

²Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife, Brazil.

ABSTRACT

Aims: This work investigated the population density of endophytic microorganisms from *Moringa oleifera* leaves collected in three localities at the state of Pernambuco (northeastern Brazil): urban (campus from the Federal University of Pernambuco, UFPE) and forest (botanical garden) areas at Recife city and an urban area (industrial district) at Caruaru city.

Place and Duration of Study: Department of Antibiotics and Department of Biochemistry from Federal University of Pernambuco, between July 2014 and July 2015.

Methodology: Sodium hypochlorite was used to disinfect the leaves, which were macerated in PBS buffer and separately sowed on seven culture media containing antibacterial or antifungal agents.

Results: The most of endophytes isolated were bacteria and the highest density was found in leaves from the forest area. With respect to the fungi, there was no statistical difference between the density in leaves from UFPE campus and botanical garden while no fungal isolate was obtained from leaves collected in Caruaru. The highest diversity of endophytes was found in leaves from botanical garden, with 111 different isolates. A total of 71, 94 and 50 bacterial isolates were obtained from leaves of UFPE campus, botanical garden and Caruaru, respectively. The number of fungal isolates were 17 (UFPE campus) and 12 (botanical garden).

Conclusion: In conclusion, the methodology employed in this work was effective for the isolation of endophytes; climatic and geographical conditions may interfere in density and diversity of endophytes from *M. oleifera* leaves.

Keywords: endophytes; *Moringa oleifera* leaves; plant-microorganism interaction.

1. INTRODUCTION

The plants possess a characteristic microbiota that is important to their health. Endophytic microorganisms are those that live at least one period of the life cycle inside a plant, without causing apparently any damage to their hosts. They get the benefit of plant protection and receive nutrients; as a counterpart, these microorganisms produce chemicals, such as antibiotics and enzymes, which help and protect the plant in certain circumstances [1].

The endophytes can be found in seed, tuber, root, stem, leaf and fruit, both in the intercellular space or inside the cells as well as in the conducting vessels. These microorganisms penetrate the plant tissue through natural openings (e.g. stomata, lenticels, hydathodes) or wounds, such as those caused by emergence of secondary roots or friction of growing roots in the soil as well as those caused by insects or fungi. The sources of endophytes may be seeds, rhizosphere, plant propagation material and the phylloplane [2,3].

The diversity of endophytes and their potential in producing bioactive metabolites have been broadly investigated aiming to find applications in medicine, agriculture and industries [4-6]. Several

researches have focused in the bioprospection of endophytes for production of enzymes (e.g. proteases, cellulases), antibiotics and insecticides, for example [7-9].

Moringa oleifera Lamarck is a plant that belongs to Moringaceae family, which is composed by a single genus containing 14 species. A tree can reach 12 m in height and has a sparse canopy with compound and bipinnate leaves composed by oval, small and hairless leaflets. The flowers are white and the fruits are dehiscent capsules resembling a pod that can measure up to 35 cm in length and contain winged and oleaginous seeds [10-12].

Zhao et al. [13] isolated from *M. oleifera* roots an endophytic fungus belonging to *Nigrospora* genus, which is able to produce secondary metabolites with antifungal activity. The endophytic fungi *Emericella* sp., *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamari* and *Aspergillus* sp. were isolated from leaves of a moringa plant from Sudan and showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus* [14]. Barnabas et al. [15] isolated endophytic fungi from *M. oleifera* leaves, stem, and roots collected in Bangalore (India) and demonstrated their antibacterial activity.

This work aimed to determine the population density of endophytic bacteria and fungi present in leaves of *M. oleifera* collected in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. The leaves were obtained in three different localities, comprising urban and forest fragment areas at Atlantic Forest and Agreste regions.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Leaves collection

M. oleifera leaves were collected at Recife city (Atlantic Forest region) in the *campus* from the Federal University of Pernambuco (UFPE; 8°03'03"S 34°56'51"W) and in the municipal botanical garden (*Jardim Botânico do Recife*; 8°04'38"S 34°57'47"W). Leaves were also collected at the industrial district (8°17'45"S 36°00'54"W) of Caruaru city (Agreste region). The collection place at UFPE campus is a garden surrounded by a 6-floor building and trees of great height. In the botanical garden, the leaves were collected from a plant present in a forest fragment. The plant from Caruaru is located at a sidewalk surrounded by houses and small buildings. The collected leaves were brought to the laboratory and immediately processed for isolation of endophytes.

2.2. Isolation of endophytic microorganisms

The collected leaves were washed profusely with tap water and neutral detergent to remove wastes and the excess of epiphytic microorganisms. Then, the material was submitted to disinfection in an aseptic chamber by immersion in 70% ethanol for 1 min, followed by 2.6% sodium hypochlorite for 4 min. The material was immersed again in 70% ethanol for 30 s in order to remove the excess of hypochlorite and then two consecutive times in distilled water for 30 s. The last washing water was sowed in Petri plates with different culture media as a control of the disinfection process [16].

The isolation of endophytes was carried out by maceration of the disinfected material in sterile PBS (in proportion of 1 g of leaves for 3 mL of buffer) followed by agitation in an orbital shaker for 90 min. The solution resulting from macerations was collected and dilutions (1:10 and 1:100) were prepared in PBS. Next, 100 µL of non-diluted or diluted solutions were sowed with a Drigalski loop in Petri plates containing culture medium. For bacteria, five culture media were used: Nutrient Agar (NA), Tryptic Soy Agar (TSA), L-arginine Agar (LAA), Complete Medium (CM) and Inorganic Salt Starch (ISP-4), all containing 100 µg/mL nystatin to prevent fungal growth. For isolation of fungi, it was used Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and Potato Dextrose Agar (PDA), both containing 100 µg/mL chloramphenicol. The plates were incubated at 27±2°C for 20 days. Each assay was performed in triplicate.

2.3. Analysis of colonies

The population density was obtained by daily observation during 30 days and counting of the number of colony forming units (CFU) being the results expressed as UFC per gram of leaf tissue. To determine the amounts of different bacteria and fungi isolated, the colonies were grouped in according

to macroscopic characteristics such as size, aspect of edges, texture, frontal and reverse colorations, adhesion to the substrate, pigment production and presence of aerial mycelium.

2.4. Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Significant differences between two or more groups were analyzed by One-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). For groups with more than two variables, it was employed Two-way ANOVA followed by Bonferroni's test ($p < 0.05$). The analyses were performed using the software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)

3. RESULTS AND DISCUSSION

Endophytic microorganisms have received increasing attention due to their potential in produce toxins, pharmaceuticals, enzymes, and growth factors, for example. In addition, the study of endophytic microbiota may reveal important informations about the interaction between the plant and environmental conditions. In this work, we isolated endophytes from leaves of *M. oleifera* plants collected at three localities in Pernambuco with distinct characteristics.

It was not observed oxidation of the leaves during the disinfection step, even using sodium hypochlorite for 4 min, which allowed the growth of endophytes. This was similarly reported by Soares et al. [17], who isolated microorganisms from *Eugenia uniflora* leaves also using this solution for disinfection. Seven culture media were used for isolation of endophytes from *M. oleifera* leaves in order to obtain a large diversity of microorganisms. Randall et al. [18] affirm that the choice of culture medium is very important for the success as well as to assure an increased frequency of the microorganisms. Also, the morphological diversity is influenced by the culture medium used.

The population density of endophytes from *M. oleifera* leaves collected in each locality can be seen in Figure 1. The most of endophytes isolated were bacteria, which is particularly interesting since previous works only reported the isolation of endophytic fungi from tissues of this plant. It can be observed that the highest density of bacteria was found in leaves of plants from botanical garden (Figure 1A). Probably, this is related to a higher diversity of the fauna and flora in comparison with the other collection places, which corresponded to urban areas. With respect to the fungi (Figure 1B), there was no statistical difference between the density in leaves of plants from UFPE campus and botanical garden while no fungal isolate was obtained from leaves collected in Caruaru.

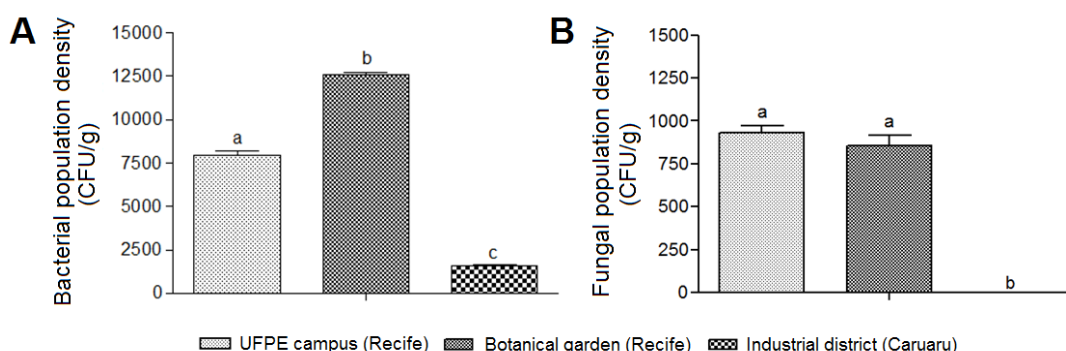


Fig. 1. Population density of bacteria (A) and fungi (B) in leaves of *Moringa oleifera* collected at UFPE campus and botanical garden at Recife city and at industrial district of Caruaru city, state of Pernambuco, northeastern Brazil.

Different letters indicate significant differences between localities according to Tukey's test ($p < 0.05$).

Several factors may account for the variations found regarding the three collection places. For example, the results may be linked to the differential exposition of leaves to luminosity. The plant from botanical garden lies within the forest, more protected from sun radiation and the plant from UFPE campus is located at a garden where there is a wide range of shade. On the other hand, the plant from

Caruaru was highly exposed to sunlight. The luminosity intensity may impact especially in the population of endophytic fungi that are sensitive to sun radiation [19].

Another important factor is the humidity, which also affect mainly the population of fungal endophytes [20]. At urban areas, the humidity tends to be lower than in forest, being a less conducive environment for survival of these microorganisms and resulting in the drying of the leaf. Pimentel et al. [21] worked with *Ilex paraguariensis* leaves and found a lower number of endophytic fungi in cultivated plants in comparison to individuals in forest. This may be the reason for the higher population density of endophytes in the plant from botanical garden.

The interaction plant-microorganism may be influenced by other factors such as the colonization site, the concentration of O₂ and CO₂, pH, nutrient availability, soil type and structure as well as susceptibility to different environmental adversities. Other influence factors are the presence and prevalence of different microbial groups, microbial diversity levels, pesticide treatment, developmental stage of the host plant, etc. [22,23]. These influences act on the diversity and density of endophytic community in the plant [24]. Also, pollution may exert negative effects on the endophytic microbiota [25], which may be linked to the lower density in leaves collected in Caruaru, since the locality was within the municipal industrial district.

It should be noted that the numbers found in this work did not reveal the total reality since there is a "selection" of the microorganisms in according to their ability to grow in the culture media used. However, although such limitation will be always present in this kind of study, it is considered that the methods employed here provide a relevant guidance of the microbial population structure [26].

The analysis of the number of CFU obtained with each culture media is shown in Figure 2. For the leaves from plants of botanical garden and Caruaru, a higher number of bacterial isolates was obtained using the medium TSA, which is richer in nutrients and allow the growth of many bacterial groups, besides favoring a high bacterial population density. However, for leaves from UFPE campus, the highest number of isolates was obtained using the NA medium. This is the culture medium used for cultivation and enumeration of non-fastidious bacteria. It is a relatively simple formula that allows it to be used in various methodological processes, like a non-selective medium.

Regarding the ISP-4 medium, which favors the growth of actinobacteria, it was observed that there was a larger amount of isolates from leaves of UFPE campus in comparison with those from botanical garden (Figure 2A). This may be due to the characteristics of the soil, since this bacteria group is usually found in higher density in soils influenced by anthropic action.

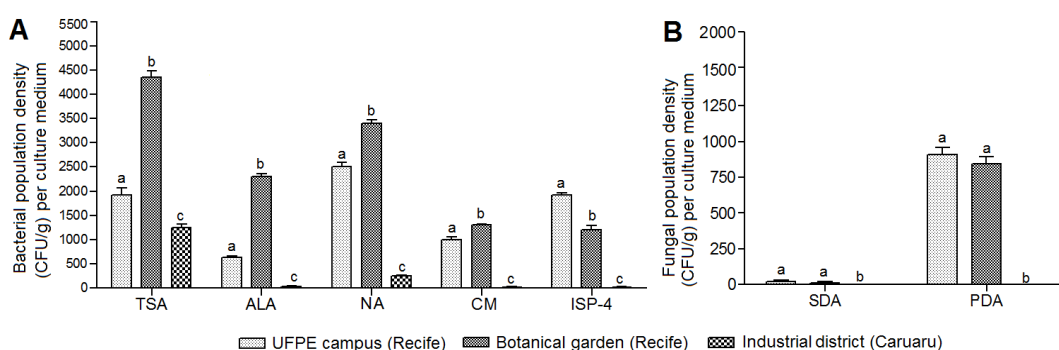


Fig. 2. Population density per culture medium of bacteria (A) and fungi (B) in leaves of *Moringa oleifera* collected at UFPE campus and botanical garden at Recife city and at industrial district of Caruaru city, state of Pernambuco, northeastern Brazil.

Different letters indicate significant differences between localities according to Bonferroni's test ($p < 0.05$).

There was a significant difference in the number of fungal isolates concerning the culture media used (Figure 2B) being a highest number of colonies obtained through PDA. This is in agreement with the findings of Devaraju and Satish [27] who reported that this medium was the most effective for the isolation of endophytic fungi from *Mirabilis jalapa*, in comparison with Malt Extract Agar and Czapek

Dox Agar. Borges et al. [28] highlights the importance of the choice of culture medium and incubation temperature for the isolation of endophytic fungi and showed that a higher amount of isolates can be obtained with PDA medium supplemented with tetracycline and incubation temperature of 28°C. Dhanalakshmi et al. [29] isolated fungi belonging to *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Exosphaeria*, *Nigrospora* and *Penicillium* from leaves and stem of *M. oleifera* also using PDA and SDA media.

The macroscopic observation of isolated bacteria allowed distinguishing different colorations of the colonies, such as white, gray, cream, yellow, orange and pink. The colonies presented mucoid to smooth textures. Some showed a drier aspect, with regular and irregular borders and without producing pigments, indicating that they are actinobacteria. In regard to the fungi, the isolates were grouped in morphotypes according to characteristics of the front and reverse of the colonies. The colors found were white, gray, brown, green and black. The textures were cotton wool, sandy, dry, serous, granular, powdery and warty while the borders were regular, irregular or radiated. Pigment production (red, black or green) was detected in some isolates.

This macroscopic analysis allowed the grouping of microorganisms with similar characteristics and thus the determination of the amount of different bacteria and fungi according to the place of collection. Table 1 shows the quantity of different endophytes isolated and the proportion of bacteria and fungi among them. The highest diversity was obtained for leaves from botanical garden, with more than twice the amount of different microorganisms found in leaves from Caruaru. In all cases, there is a higher diversity of bacterial isolates, which was also observed by Sturz et al. [30], working with leaf tissues of *Trifolium pratense*.

Table 1. Number of endophytes isolated from *Moringa oleifera* leaves collected in three different localities in the state of Pernambuco, Brazil.

Locality	Number of isolates		
	Total	Bacteria	Fungi
UFPE campus (Recife)	83	71	12
Botanical garden (Recife)	111	94	17
Industrial district (Caruaru)	50	50	0

The endophyte colonies were differentiated based on macroscopic characteristics.

In addition to the environmental factors discussed above, the lower density and diversity of endophytic fungi may be due to an inability of the microorganisms in growing outside the plant tissue and in conventional culture media [31]. Also, there are some endophytic fungi that grow very slowly and are difficult to isolate [32].

4. CONCLUSION

The methodology employed in this work was effective for the isolation of endophytes from *M. oleifera* leaves. The largest density and diversity of endophytic isolates was detected in leaves collected in a forest locality (botanical garden) while the material collected in the most anthropized area (industrial district in Caruaru) showed the lowest density and diversity. There were also differences regarding the culture media used for isolation. The results stimulate works on the bioprospection of the endophytes obtained.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e*

Tecnológico (CNPq) for research grants. PMGP and LCBBC are grateful to CNPq fellowships.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that there are no competing interests pertaining to the material in this manuscript.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

This work was carried out in collaboration between all authors; IFACS, KXRFS and JMA developed all experimental part of the article. IFACS, THN and LCBBC managed the literature searches and wrote the manuscript; JMA and PMGP participated in revision of this article. IFACS, JMA and LCBBC designed, supervised and managed the study performed. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Nair DN, Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants environment and humans. *Sci Word J*. 2014; 250693.
2. Shimaila R, Trevor CC, Bernard RG. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Appl Soil Ecol*. 2012;61:217-24.
3. Wright KM, Chapman S, Mcgeachy K, Humphris S, Campbell E, Toth IK and Holden NJJ. The endophytic lifestyle of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification and internal localization in roots. *Phytopathol*. 2013;103(4):330-340.
4. Strobel GA. Microbial gifts from rain forests. *J Plant Pathol*. 2002;24:14-20.
5. Chen Y, Mao W, Tao H, Zhu W, Qi X, Chen Y et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresour Technol*. 2011;102:8179–8184.
6. Zheng Y-K, Qiao X-G, Miao C-P, Liu K., Chen Y-K, Xu L-K et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol*. 2015:1-14.
7. Shiomi HF, Silva, HAS, Melo IS, Nunes FV, Bettiol W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Sci Agric*. 2006;63(1):32-39.
8. Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol Rev*. 2009:1-11.
9. Castro RA, Quecine MC, Lacava PT, Batista BD, Luvizotto DM, Marcon J, et al. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *SpringerPlus*. 2014;3(382):1-9.
10. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. 2nd ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. Portuguese
11. Paiva PMG, Santana GMS, Souza IFAC, Albuquerque LP, Agra-Neto AC, Albuquerque AC et al. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *Int Biodeter Biodegr* 2011;66:982-9.
12. Santos AFS, Luz LA, Pontual EV, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCB. *Moringa oleifera*: Resource management and multiuse life tree. *Adv Res* 2015;4(6):388-402.
13. Zhao JH, Zhang YL, Wang LW, Wang JY, Zhang CL. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28:2107–2112.
14. Mahdi T, Mohamed I, Yagi S. Endophytic fungal communities associated with ethno-medicinal Plants from Sudan and their antimicrobial and antioxidant prospective. *J Forest Prod Ind*. 2014;3(6):248-256.
15. Barnabas J, Murthy SS, Jagdeesh S. Antimicrobial properties of endophytic fungi isolated from *Cynodon dactylon* and *Moringa oleifera*. *Int J Biol Pharm Res*. 2013;4(2):98-104.
16. Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Kuklinsky Sobral J, Lacava PT. Manual: Isolamento de Micro-organismos Endofíticos. 1st ed. CALQ, Piracicaba; 2002. Portuguese.
17. Soares ECL, Costa EP, Silva LCN, Araújo JM. Isolation, identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. UFPEDA 968. *Sci Plena*. 2012;8(12):1-7.
18. Randall HT, Carroll KC, Tang YW, Wolk DM. Diagnostic microbiology of the immunocompromised host. 1st ed. American Society for microbiology, ASM Press, Washington; 2009.

19. Petrini O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema NJ, Heuvel J, Van den (Eds.) Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press. 1986:175-187.
20. Owen N, Hudley N. Endophytes: the chemical synthesizers inside plants. Sci Progr. 2004;(87):79-99.
21. Pimentel IC, Kuczkowski FR, Chime MA, Auer CG, Grigoletti Junior A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Floresta. 2006;36(1):123-128. Portuguese
22. Rasche F, Velvis H, Zachow C, Berg G, Elsas JD, Sessitsch A. Impact of transgenic potatoes expressing antibacterial agents on bacterial endophytes is comparable to effects of soil, wildtype potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. Can J Microbiol. 2006;42:555-566.
23. Berg G, Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol. 2009;68:1-13.
24. Procópio REL, Araújo WL, Maccheroni Jr W, Azevedo JL. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. Genet Mol Res. 2009;8(4):1408-1422.
25. Helander M, Vesterlund S-R, Saikkonen K. Responses of foliar endophytes to pollution. In: Pirttilä, AM, Frank, AC, editors. Endophytes of Forest Trees - Biology and Applications. 1st ed. Philadelphia: Springer; 2011.
26. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, Torsvik VL, Goksoyr J. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial-cells without cultivation. Microbial Ver. 1995;(59):147-169.
27. Devaraju R, Satish S. Endophytic Mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic *Fusarium* sp. J Exp Biol Sci 2011;2(1):75:79.
28. Borges LR, Lazzari SMN, Pimentel IC, Nova MXV. Diversity of filamentous fungi in soil with monoculture of yerba maté, *Ilex paraguariensis* St. Hil. Ciênc Agr Amb. 2011;9(2):185-194.
29. Dhanalakshmi R, Umamaheswari S, Sugandhi P, Arvind Prasanth D. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Moringa oleifera* of yercaud hills. Int J Pharm Sci Res. 2013;4(3):1064-1068.
30. Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biol Fert Soils. 1997;25:13-19.
31. Liu JY, Songa YC, Zhanga Z, Wanga L, Guob ZJ, Zoua WX, et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. J Biotechnol. 2004;114:279-287.
32. Promputtha L, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EHC, Hyde KD, Jeewon R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. Microb Ecol. 2007;(53):579-590.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam. EM TRÊS LOCALIDADES NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

I. F. A. C. DE SOUZA¹, K. X. R. F. DE SENA², P. M. G. PAIVA¹, J. M. DE ARAÚJO² e L. C. B. B. COELHO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: igor_souza_@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A moringa (*Moringa oleifera* Lamarck) pertence ao gênero *Moringa*, à família Moringaceae, ordem Capparidales, classe Magnoliophyta, subclasse Dilleniidae. Das quatorze espécies pertencentes a este gênero, onze são originárias da África, uma da Arábia e duas da Índia, estando a *M. oleifera* dentre essas últimas. É uma planta de porte arbóreo e pode crescer até 10 a 12 metros de altura. As folhas são bipenadas com sete folíolos pequenos em cada pina. São verdes pálidas, decíduas alternadas, pecioladas e compostas. Os folíolos laterais possuem formas elípticas enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que os laterais (PATERNIANI et al., 2009). A moringa é bastante cultivada pela sua importância econômica, com multiplicidade de uso alimentar, agrícola, medicinal e industrial (PAIVA et al., 2011; RANGEL, 2011).

No Brasil, a moringa foi introduzida por volta de 1950, sendo encontrada na Região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Pernambuco. Nas regiões secas, o cultivo desta planta é vantajoso, visto que suas folhas podem ser colhidas quando nenhum outro vegetal fresco está disponível (FERREIRA et. al., 2008; NUNES et al., 2010).

As plantas possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e manutenção. Novos micro-organismos endolíticos estão sendo constantemente descritos na literatura mundial atestando ser essa diversidade ainda não explorada convenientemente. São considerados micro-organismos endofíticos, aqueles que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de uma planta, sem causar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros, podendo ser encontrados em folhas, sementes, ramos e raízes de vegetais. Os endofíticos são diferentes dos micro-organismos epifíticos, que ficam sobre a superfície, e dos fitopatogênicos, que causam danos às plantas. (AZEVEDO, 2013).

Entre os micro-organismos endofíticos identificados têm se dado um maior destaque as actinobactérias devido a sua importância biotecnológica como produtores de dois terços de compostos antibióticos. As actinobactérias são classificadas como bactérias gram-positivas, podendo ser aeróbias estritas, microaerófilas, anaeróbias estritas ou facultativas. Apresentam um crescimento seco, com formação de micélio aéreo e vegetativo, velocidade de crescimento variável (entre 48 e 120h) e apresentam uma alta relação guanina-citosina (G-C) na constituição do ácido desoxirribonucleico (DNA) (STACKEBRANDT & SCHUMANN, 2006; VENTURA et. al., 2007). Esses micro-organismos exibem morfologias variadas, podendo apresentar-se nas formas cocóides ou cocabacilos, formas variadas de fragmentação de hifas ou com micélio diferenciado e altamente ramificado (VENTURA et. al., 2007). O gênero *Streptomyces* é o maior representante deste grupo e um dos maiores produtores de metabólitos bioativos (POSADA & VEGA, 2005).

A classificação taxonômica das actinobactérias foi muito beneficiada pela aplicação de técnicas quimiotaxonômicas e, principalmente, com o advento das técnicas moleculares (STACKEBRANDT & SCHUMANN 2006). O grupo das actinobactérias é visto como um

dos principais filós no domínio *Bacteria*, como inferido a partir de estudos da expressão gênica do segmento que codifica a subunidade 16S do ribossomo (rRNA) (LUDWIG & KLENK, 2005).

Esse trabalho teve por objetivo isolar e identificar, através da taxonomia clássica, actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* Lam., determinar a densidade populacional referentes ao sítio de coleta do material, bem como quantificar esses micro-organismos em três localidades do Estado de Pernambuco, Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta das Folhas de *M. oleifera*

Folhas de *M. oleifera* foram coletadas no *campus* Recife da Universidade Federal de Pernambuco, no Jardim Botânico do Recife e na cidade de Caruaru no Estado de Pernambuco, Brasil. Amostras do material já se encontram arquivadas sob o número de espécime 63184, IPA, no herbário “Dárdano de Andrade Lima” (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife, Brasil). As folhas foram imediatamente processadas para a realização do isolamento dos endofíticos.

2.2. Isolamento das Actinobactérias Endofíticas

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta, tendo sido lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos e outros resíduos. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi submetido ao processo de desinfecção, sendo imerso em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 2,6% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, para retirar o excesso de hipoclorito, as folhas foram lavadas duas vezes consecutivas em água destilada por 30 segundos, sendo a última água de lavagem utilizada para controle do processo de desinfecção, através de semeio em placa de Petri com diferentes meios de cultura utilizados no isolamento das actinobactérias (ARAÚJO et al., 2002). O isolamento foi realizado por maceração utilizando a solução Tampão Fosfato Salina (PBS) na proporção de 1 g de folhas para 3 ml de tampão, as quais foram maceradas e em seguida o homogenato foi colocado na mesa agitadora durante 1 h e 30 min, processo que ajuda na liberação dos micro-organismos. Nas placas foram colocados 100 µL da solução de folhas maceradas, nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e sem diluição, sendo semeadas com a alça de Drigalski sobre o meio de cultura e incubadas em temperatura ambiente, durante 20 dias. O ensaio foi realizado em triplicata. Para o isolamento das actinobactérias endofíticas foram utilizados cinco meios de cultura: Nutriente Ágar (NA), *Tryptic Soy Agar* (TSA), L-Arginina Ágar (ALA), Meio Completo (MC) e o meio *Inorganic Salt Starch* (ISP-4), todos contendo o antifúngico nistatina a 100 µg/mL.

A purificação dos micro-organismos foi realizada por esgotamento visando obter colônias isoladas. As actinobactérias foram mantidas em tubos de ensaio, contendo o respectivo meio de isolamento, sob refrigeração. A preservação das culturas puras foi realizada em tubos de penicilina, contendo meio sólido inclinado e adicionando óleo mineral esterilizado. Os tubos foram fechados com tampas de borracha, vedados com selo de alumínio e estocados a temperatura ambiente.

2.2 Identificação Clássica

2.2.1 Análise Macroscópica

O aspecto macromorfológico da colônia dependente do meio de cultura foi verificado através da observação da cor dos micélios aéreo e vegetativo, da presença ou ausência de bordas com cores diferentes, bem como de pigmentos produzidos pelos micro-organismos.

2.2.2 Análise Microscópica

A visualização de várias características micromorfológicas das actinobactérias, como a ramificação do micélio sobre o substrato, a formação de micélio aéreo e a sua fragmentação ou a formação de esporos foram observadas em microscópio óptico, através da técnica de mirocultivo em placa (SHIRLING & GOOTTLIEB, 1966). A análise foi realizada em câmara de fluxo laminar. As actinobactérias foram inoculadas em forma de estrias paralelas, utilizando-se alça bacteriológica em “L”, em placas de Petri contendo o meio de cultura em que se obteve melhor crescimento e esporulação, sendo em seguida inseridas três lamínulas por estria, em ângulo de 45°. Esses sistemas foram incubados em câmara de crescimento tipo B.O.D. (28°C ± 2) por 15 dias. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas e postas sobre lâmina e observadas ao microscópio com objetiva de 40x. A classificação foi realizada segundo Baltimore e Wikins (1986).

2.2.3 Crescimento e Fermentação em Única Fonte de Carbono

A avaliação da capacidade das actinobactérias endofíticas de crescer em meio de cultura basal de sais (para 1.000 mL, 2,64g de (NH₄)₂SO₄; 2,38g de KH₂PO₄; 5,65g de K₂HPO₄.3H₂O; 1g de MgSO₄.7H₂O; 1mL de solução de traço de sais, com 0,64g de CuSO₄.5H₂O, 0,11g de FeSO₄.7H₂O, 0,79g de MnCl₂.4H₂O, 0,15g de ZnSO₄.7H₂O em 100mL de água destilada; 15g de ágar; pH 6,8), contendo apenas uma única fonte de carbono, como recurso nutricional, adicionando o indicador vermelho de fenol, foi realizada. Este meio foi preparado e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, em seguida as soluções de carbono (açúcares) (1.0% p/v) foram preparadas e autoclavadas separadamente, sendo posteriormente incorporadas ao meio basal, nas concentrações determinadas. Foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: D-glicose, D-sacarose, D-xilose, D-lactose, D-manitol, D-sorbitol, D-arabinose, D-maltose, L-ramnose, L-arabinose, trealose, meso-inositol, dextrina e adonitol.

A semeadura foi realizada em estrias com o auxílio de uma alça bacteriológica em “O”. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 30°C por 14 dias. Foi analisada a utilização ou não da fonte de carbono comparando-se o crescimento das bactérias, bem como a fermentação dos carboidratos pelas linhagens testadas, através da verificação da mudança de cor do meio de vermelho para amarelo ou alaranjado, indicativo da produção de ácido.

2.2.4 Crescimento em Diferentes Concentrações de Cloreto de Sódio

A habilidade das actinobactérias endofíticas de crescerem em diferentes concentrações de NaCl foi realizada semeando os micro-organismos em meio Glicose Extrato de Levedura Ágar (para 1.000mL, 10g de peptona; 3g de extrato de carne; 10g de extrato de levedura; 10g de glicose; 15g de ágar; pH 6,9-7,1), com a adição de NaCl nas seguintes concentrações: 1%, 3%, 5% e 7 %. As linhagens foram semeadas em estrias com o auxílio de alça bacteriológica

em “O”. Após 7 dias de incubação a 30°C, foram consideradas positivas as placas que apresentaram algum tipo de crescimento.

2.2.5 Crescimento em Diferentes pH

A avaliação da capacidade das actinobactérias endofíticas de crescerem a diferentes pHs foi realizada semeando os micro-organismos em meio Glicose Extrato de Levedura Ágar, com concentração dobrada dos constituintes (para 1.000mL, 20g de peptona; 6g de extrato de carne; 20g de extrato de levedura; 20g de glicose; 15g de ágar). Após autoclavado, foi adicionado para cada 200mL de meio de cultivo, 200mL de solução tampão (Tampão Fosfato de Potássio a 0,2M). Sendo esta solução composta de diferentes proporções de Solução A (KH_2PO_4 – 0,2M) e Solução B (K_2HPO_4 – 0,2M), devidamente autoclavadas. Utilizou-se as seguintes proporções para o pH 4,0, 199,7mL de Solução A:0,3mL de Solução B; para o pH 5,0, 197,3mL de Solução A:2,7mL de Solução B; para o pH 9,0, 1,4mL de Solução A:198,6mL de Solução B; e para o pH 10,0, 0,1mL de Solução A:199,9mL de Solução B. As linhagens foram semeadas em estrias com o auxílio de alça bacteriológica em “O”. Após 14 dias de incubação a 30°C foram consideradas positivas as placas que apresentaram algum tipo de crescimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para o isolamento das actinobactérias endofíticas das folhas de *M. oleifera*, oriundas das três localidades no Estado de Pernambuco, mostrou-se eficiente, visto que os tempos utilizados nos processos de desinfecção com o hipoclorito de sódio não acarretaram oxidação dos tecidos foliares, corroborando com o trabalho de Dhanalakshmi e colaboradores (2013), no qual utilizando folhas e caules de *M. oleifera*, para o isolamento de fungos endofíticos, não observou oxidação desses tecidos durante a desinfecção.

A escolha de cinco meios de cultura diferentes para a realização do isolamento das actinobactérias endofíticas possibilitou a obtenção de melhores resultados, com um número maior de isolados, ratificando a diversidade presente na microbiota dessas folhas, o que, também, é corroborado pelo estudo de Randall e colaboradores (2009), que afirmam que a escolha do meio de cultivo é essencial para o sucesso do processo de crescimento e metabolismo microbiano, bem como para o aumento na frequência dos micro-organismos isolados. A diversidade morfológica é influenciada pelo método e meio de cultura utilizado no isolamento (QIN et al., 2012)..

Para a seleção e separação das actinobactérias dos demais micro-organismos endofíticos isolados durante o processo, foram observadas as características macroscópicas intrínsecas desse grupo de bactérias, as quais, em meio de cultura sólido, apresentam colônias secas e não cremosas, podendo ser lisas ou com aspecto rugoso, duras, coriáceas e com intensa aderência ao meio de cultura, sendo essa propriedade primordial para a diferenciação dos demais grupos de micro-organismos, e recobertas por uma fina película, o micélio aéreo ou reprodutivo, apresentando diferentes colorações, como branco, rosa, laranja, verde, cinza, parda, entre outras (KONEMAN et al., 2008; GOODFELLOW, 2012). Foram isoladas 33 actinobactérias endofíticas, sendo 21 linhagens provenientes das folhas coletadas da *M. oleifera* no Jardim Botânico do Recife; 8, no *campus* Recife da UFPE; e 4, na Cidade de Caruaru. Cada micro-organismo foi identificado pelas letras iniciais do local de coleta mais uma numeração correspondente a ordem de isolamento (JB’x’ – Jardim Botânico do Recife; UFPE’x’ – *campus* Recife da UFPE; CC’x’ – Cidade de Caruaru).

Observou-se que uma maior densidade de isolamento de actinobactérias pertencente as folhas oriundas do Jardim Botânico, isso se deve em parte pela grande diversidade e interação da fauna e da flora encontrada nesse local. Outro fator responsável pela grande diferença na densidade no número de isolados pode ser devido à exposição da folha à luminosidade, pois as espécies vegetais encontradas no Jardim Botânico do Recife estão dentro da mata, protegida da radiação solar, o mesmo não ocorrendo com aqueles vegetais presente numa área urbanizada, como no *campus* Recife da UFPE, nem aquelas espécies vegetais cultivadas na Cidade de Caruaru, as quais estão sujeitas a uma maior exposição à luz. Essa diferença de intensidade e período de exposição podem repercutir diretamente na população das actinobactérias. A umidade do ambiente é outro fator que pode afetar diretamente essas densidades. Sob a mata, existe um ambiente mais úmido, mais propício à sobrevivência desse grupo de micro-organismos, enquanto que, a pleno sol, a umidade tende a ser menor, ocorrendo o ressecamento da folha, inviabilizando a sobrevivência de um número maior de endofíticos.

Estudos relatam que a interação existente entre o micro-organismo e a planta pode ser influenciada por diversos fatores, como o clima, a concentração de O₂, CO₂, pH, disponibilidade de nutrientes, tipo de solo, estrutura do solo, susceptibilidade a diferentes adversidades ambientais, afinidade com o hospedeiro, estágio de desenvolvimento da planta hospedeira, distribuição geográfica, condições ecológicas, sazonalidade, altitude, precipitação, umidade, entre outros. Consequentemente, a presença, a distribuição, a densidade e a diversidade desse grupo microbiano estarão relacionadas a essas variáveis (BERG & SMALLA, 2009; PROCÓPIO et al., 2009; MATSUMURA & FUKUDA, 2013).

Convém salientar que os números encontrados provavelmente não revelam a realidade, pois foram “selecionados” as actinobactérias capazes de se desenvolverem nos meios de cultura utilizados. Tais limitações estão presentes na maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo, entretanto, essas metodologias fornecem indicações relativas da densidade e distribuição da população de micro-organismos endofíticos (KAEWKLA & FRANCO, 2013).

Os micro-organismos endofíticos e suas interações com os vegetais despertaram o interesse de estudo sobre essa relação e trabalhos recentes, através do uso de meios de cultura, revelam a existência de micro-organismos, em especial as actinobactérias, até então não descritos na literatura. Portanto, os estudos dos micro-organismos presentes nos mais diferentes vegetais através de seu isolamento em meios de cultura diversos são respaldados pelas conhecidas e já bem relatadas limitações, retratadas, na revisão realizada por Amann e colaboradores (1995), através da frase “a anormalidade da contagem em placa”.

Lechevalier (1989) afirma que na identificação das actinobactérias é importante levar em consideração diferentes características dessas bactérias filamentosas, o que implica na utilização de várias técnicas diferentes para esse fim. Em relação à morfologia deve-se observar a cor do micélio aéreo e o tipo de esporo. Para tanto é importante utilizar um meio de cultura que possibilite uma boa esporulação e diferenciação da cor do micélio aéreo.

A análise macroscópica das colônias de actinobactérias isoladas foi realizada através da observação da cor do micélio aéreo e do micélio vegetativo e a produção de pigmentos. Verificou-se que não houve diversidade em relação aos aspectos observados, apresentando como coloração do verso, que corresponde ao micélio aéreo, as cores cinza, branco, amarelo e marrom; para o reverso, o micélio vegetativo, as seguintes cores, bege, branco e marrom. Apenas o isolado “CC4” produziu um pigmento de coloração amarelada, o que pode inferir ser algum tipo de composto químico, esses resultados podem ser observados nas Tabelas 1, 2 e 3, correspondentes a cada sítio de coleta do material botânico.

Tabela 1 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* do Jardim Botânico do Recife

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
JB1	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB2	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i>
JB3	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB4	Cinza	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB5	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB6	Cinza, com bordas brancas	Cinza	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB7	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB8	branco	Cinza	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB9	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB10	Cinza	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB11	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB12	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB13	Amarelo	Bege	Não	<i>Nocardiosis</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB14	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB15	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB16	Branco	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB17	Amarelo	Marron	Não	<i>Streptomyces</i>
JB18	Branco	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB19	Cinza, com bordas branca	Branco	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
JB20	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
JB21	Cinza, com bordas branca	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>

Tabela 2 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* do campus Recife da UFPE

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
UFPE1	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE2	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
UFPE3	Cinza	Bege	Não	<i>Actinomadura</i> ou <i>Streptomyces</i>
UFPE4	Marrom	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE5	Marrom, com bordas branca	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE6	Marrom, com bordas branca	Branco	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE7	Cinza	Marrom	Não	<i>Streptomyces</i>
UFPE8	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>

Tabela 3 – Análise macroscópica e determinação do gênero pelo microcultivo das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru

Isolado	Cor do Micélio Aéreo	Cor do Micélio Vegetativo	Pigmento	Gênero
CC1	Marrom	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC2	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC3	Cinza	Bege	Não	<i>Streptomyces</i>
CC4	Branco	Bege	Sim	<i>Streptomyces</i>

A análise microscópica, através da metodologia do microcultivo, permitiu observar os esporos e estruturas relacionadas e inferir que 12 isolados pertencem ao gênero *Streptomyces*, pois foram observados esporos espiralados, 1 isolado, o JB13, apresentou características morfológicas referentes ao gênero *Nocardioopsis*, devido a observação de hifas longas com esporos ao longo de toda a hifa. Contudo, em 20 actinobactérias endofíticas não foi possível determinar o gênero, pois apresentaram semelhança entre os gêneros *Actinomadura* e *Streptomyces*, por apresentarem esporos curtos ao longo da hifa. Sendo assim, é necessário o estudo molecular do rRNA 16S para uma identificação mais precisa quanto ao gênero e possível espécie desses micro-organismos endofíticos isolados.

Alimuddin e colaboradores (2011) realizaram um estudo com 43 actinobactérias endofíticas isoladas de diferentes plantas: *Melaleuca leucadendra* (L.) (cajeput), *Tectona Grandis* (teca), *Swietenia macrophylla* King (mogno) e *Phyllostachys pubescens* (bambu). A maioria dos micro-organismos isolados, 53%, apresentaram seus micélios aéreos na coloração cinza. A menor ocorrência foi observada na coloração marrom (5,6%). Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, visto que 57,6% dos isolados apresentaram a coloração cinza em seus micélios aéreos e apenas 12,2%, a coloração marrom, contudo a menor porcentagem se refere as actinobactérias com o micélio aéreo de cor amarela (6,1%).

A análise da micromorfologia das actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* permitiu inferir, de modo preciso, que 36,3% pertencem ao gênero *Streptomyces*. Isso pode ser explicado por ser um micro-organismo de crescimento rápido, que esporula facilmente e não apresenta muitas exigências nutricionais (VELHO-PEREIRA & KAMAT, 2012). Verma e colaboradores (2009) isolaram actinobactérias, das folhas e hastes de *Azadirachta indica* A. Juss., e o gênero *Streptomyces* (49,09%) também foi predominante. Sonashia e colaboradores (2011) isolaram 30 actinobactérias, das quais 53,33% se classificaram como sendo do gênero *Streptomyces*, 10% como *Actinomadura* e 13,33% como *Micromonospora*. As características comuns a esses gêneros são, por ordem: cadeia de esporos com enrolamento espiral, e em loop; cadeias de esporos retas e abertos, e aglomerados de conídios únicos em micélio.

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

Gangwar e colaboradores (2014) isolaram 40 actinobactérias endofíticas de três espécies vegetais medicinais: *Aloe vera*, *Mentha arvensis* e *Ocimum sanctum*, sendo o gênero *Streptomyces* o mais isolado, correspondendo a uma taxa de 60%, seguido do gênero *Micromonospora* com 25%, *Actinopolyspora* e *Saccharopolyspora* com 7,5%, cada.

No estudo realizado por Shutsrirung e colaboradores (2013) foi possível isolar 252 actinobactérias de tangerina (*Citrus reticulata* L.), sendo a maioria desses isolados (85,3%)

pertencentes ao gênero *Streptomyces*, seguido pelo *Nocardiopsis* (4,4%), *Micromonospora* (4,0%), *Microbispora* (2,8%), *Spirillospora* (2,0%) e *Nocardia* (1,6%).

Passari e colaboradores (2015) isolaram 42 actinobactérias endofíticas de sete plantas medicinais, presentes em parques públicos na Índia, entre todos os isolados, o gênero *Streptomyces* foi o mais abundante em todos os vegetais com 66,6% do total de micro-organismos endofíticos.

Nos ensaios fenotípicos, quanto à fermentação dos açúcares foi observado que as actinobactérias endofíticas do Jardim Botânico do Recife apresentam certa similaridade no padrão de fermentação dos açúcares. É interessante salientar que o D-Sorbitol não foi fermentado por nenhum dos micro-organismos. D-Maltose e o D-Manitol os mais facilmente fermentados. A linhagem JB17 apresentou certa dificuldade na utilização desses açúcares. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de <i>M. oleifera</i> provenientes do jardim Botânico do Recife																					
ACÚCARES	JB1	JB2	JB3	JB4	JB5	JB6	JB7	JB8	JB9	JB10	JB11	JB12	JB13	JB14	JB15	JB16	JB17	JB18	JB19	JB20	JB21
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	NC	+	+	+	++	NC	++	+	++	+
D-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	NC	-	-	+++	+++
L-Arabinose	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	NC	++	++	++	++	++	++	++	++
Destrina	+	++	+	+	+	+	++	+	-	+	+	+	NC	++	++	++	NC	++	++	++	++
Glicose	-	-	-	-	++	++	++	++	+	++	+	++	NC	++	++	++	NC	++	++	++++	++++
Meso-Inositol	+	+	+	+	+	+	+	NC	-	-	-	-	NC	-	-	+	NC	NC	+	++	+
D-Lactose	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	NC	+++	+++	++	+++
D-Maltose	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	NC	+++	+++	+++	+++
D-Manitol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	NC	+++	+++	+++	NC	++++	++++	++++	++++
L-Ramnose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	-	NC	+	+	+	+	++	+
Sacarose	-	NC	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	NC	-	+	++	NC	+	+	++	+
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Trealose	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	NC	+++	+++	+++	NC	+++	+++	+++	+++
D-Xilose	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	NC	+++	+++	+++	++	++	++	++	++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

Os isolados do *campus* Recife da UFPE, também, apresentaram repetições nos padrões de fermentação dos açúcares. Novamente, o D-Sorbitol não foi fermentado por nenhuma das linhagens e o D-Maltose e D-Manitol facilmente fermentados. Todas as linhagens apresentaram algum grau de crescimento através da utilização desses carboidratos, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera* provenientes do campus Recife da UFPE

AÇÚCARES	UFPE1	UFPE2	UFPE3	UFPE4	UFPE5	UFPE6	UFPE7	UFPE8
Adonitol	++	++	++	++	++	++	+	++
D-Arabinose	+++	+++	+	+	+	+	++++	++++
L-Arabinose	++	++	++	++	++	++	++	++
Destrina	++	++	++	++	++	++	+	+
Glicose	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
Meso-Inositol	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Lactose	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
D-Maltose	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
D-Manitol	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
L-Raminose	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Trealose	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++
D-Xilose	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

As mesmas observações feitas para as actinobactérias do Jardim Botânico do Recife e do campus Recife UFPE também são realizadas nos isolados da Cidade de Caruaru, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Fermentação de carboidratos por actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera* provenientes da Cidade de Caruaru

AÇÚCARES	CC1	CC2	CC3	CC4
Adonitol	++	++	++	++
D-Arabinose	++++	++++	+++	+++
L-Arabinose	++	++	+	+
Destrina	+	+	++	++
Glicose	+	-	++	++
Meso-Inositol	-	+++	+	+
D-Lactose	++++	+++	+++	+++
D-Maltose	+++	+++	+++	+++
D-Manitol	+++	+++	+++	+++
L-Raminose	++	+	+	++
Sacarose	-	+	+	+
D-Sorbitol	NC	NC	NC	NC
Trealose	+++	+++	+++	+++
D-Xilose	++	++	+++	+++

Legenda: (+) Pouca Fermentação; (++) Boa Fermentação; (+++) Ótima fermentação; (++++) Excelente Fermentação; (-) Não fermentou; (NC) Não cresceu

Os ensaios para a observação da capacidade das actinobactérias endofíticas crescerem em diferentes faixas de pH e concentrações de NaCl foram realizado e os resultados podem ser observados nas Tabelas 7, 8 e 9. Observa-se que a linhagem JB13 não cresceu em pH 4,0, tendo o seu melhor crescimento no pH 5,0. A linhagem JB21 cresceu apenas nos valores de pH 5,0 e 9,0. A actinobactéria JB2 não cresceu na concentração de 7% de NaCl, assim como a JB21, que apresentou crescimento apenas na concentração de 3% do sal, sendo portanto uma linhagem sensível a variação desses parâmetros. Observa-se que as linhagens UFPE5 e UFPE6 foram inibidas pela alta concentração de NaCl. Contudo, os isolados desse sítio apresentaram um crescimento sem a formação do micélio aéreo. Os micro-organismos isolados das folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru foram idênticas quanto ao seu desenvolvimento nos meios de culturas com essas variáveis.

Tabela 7 - Crescimento de actinobactérias endofíticas folhas de <i>M. oleifera</i> do Jardim Botânico do Recife em diferentes concentração de pH e NaCl																						
		JB1	JB2	JB3	JB4	JB5	JB6	JB7	JB8	JB9	JB10	JB11	JB12	JB13	JB14	JB15	JB16	JB17	JB18	JB19	JB20	JB21
pH	4,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC
	5,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C
	9,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C
	10,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	NC
NaCl	1%	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	NC
	3%	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C	C
	5%	C*	C*	C*	C*	C*	C	C	C*	C*	C*	C*	C*	C	C	C	C	C	C	C	C	NC
	7%	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C*	C	C	C	C	C*	C	C	NC

Legenda: C* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C – Crescimento sem a formação do micélio aéreo; NC – Não cresceu

Tabela 8 - Crescimento de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* do campus Recife da UFPE em diferentes faixas de pH e concentrações de NaCl

		UFPE1	UFPE2	UFPE3	UFPE4	UFPE5	UFPE6	UFPE7	UFPE8
pH	4,0	C*	C*	C*	C*	C*	C	C*	C*
	5,0	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*	C*
	9,0	C	C	C*	C	C	C	C	C
	10,0	C	C	C*	C	C	C	C	C
NaCl	1%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	3%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	5%	C	C	C*	C	C	C	C	C
	7%	C	C	C	C	NC	NC	C	C

Legenda: C* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C – Crescimento sem a formação do micélio aéreo; NC – Não cresceu

Tabela 9 - Crescimento de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* da Cidade de Caruaru dem diferentes faixas de pH e concentrações de sais

		CC1	CC2	CC3	CC4
pH	4,0	C*	C*	C*	C*
	5,0	C*	C*	C*	C*
	9,0	C	C	C	C
	10,0	C	C	C	C
NaCl	1%	C	C	C	C
	3%	C	C	C	C
	5%	C	C	C	C
	7%	C	C	C	C

Legenda: C* - Crescimento com formação de micélio aéreo; C – Crescimento sem a formação do micélio aéreo

A análise das características fenotípicas através da comparação com os dados contidos nas tabelas presente no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* permite inferir que são necessários outros testes relacionados à fisiologia desses micro-organismos para uma correta identificação em relação ao gênero e possível espécie desses endofíticos. Portanto, esses resultados corroboram com a necessidade e importância de um estudo molecular para a identificação da microbiota presente no interior das folhas de *M. oleifera*.

4. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para o isolamento das actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* foi adequada, isolando-se um total de 33 micro-organismos, sendo 21 (63,6%) isolados do Jardim Botânico do Recife, 8 (24,2%) do *campus* Recife da UFPE e 4 (12,2%) da Cidade de Caruaru.

Através da observação macroscópica e microscópica foi possível a determinação do gênero em 13 (39,4%) isolados, com predominância do gênero *Streptomyces* sp. Não foi possível a identificação dos demais devido a características inerentes a mais de um gênero.

A análise fenotípica apresentou dificuldade na identificação desses micro-organismos devido a grande diversidade de ensaios requeridos para uma correta identificação taxonômica.

5. REFERÊNCIAS

- ALLIMUDDIN; WIDADA, J.; MUSTOFA, W. A.; Antifungal Production of a Strain of *Actinomycetes* spp Isolated from the Rhizosphere of *Cajuput* Plant: Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v.16, n.1, p.1-10, 2011.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, PT. **Manual de Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**. Piracicaba, 86 p, 2002.
- DHANALAKSHMI, R.; UMAMAHESWARI, S.; SUGANDHI, P.; ARVIND PRASANTH, D. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Moringa oleifera* of yercaud hills. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 3, p. 1064-1068, 2013.

- FERREIRA, P. M. P.; FARRIAS, D. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritionl potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 431-437, 2008.
- GANGWAR, M.; DOGRA, S.; GUPTA, U. P.; KHARWAR, R. N. Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 2, p. 184-191, 2014.
- GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. In: **Bergey's Manual os Systematic Bacteriology**. Springer, p. 33-2028, 2012.
- KAEWKLA, O.; FRANCO, C. M. M. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 2, p. 384-393, 2013.
- KONEMANN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.1760, 2008.
- LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Williams & Wilkins, v. 4, 1989.
- LUDWIG, W.; KLENK H. P. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2 ed., v. 2, p. 49–65, 2005.
- MATSUMURA, E.; FUKUDA, K. A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperate forests of Kanto district, eastern Japan. **Fungal Biology**, v. 117, n.3, p. 191-201, 2013.
- NUNES, T. A.; C; BARROS, H. D.; BARBOSA, C. R. M.; BARBOSA, F. M.; FILGUEIRA, P. P. A.,PANNIRSELVAM, P.V. Tecnologia de moringa oleifera como alimento funcional para saúde humana e animal. In: **Encontro Nacional de Moringa**, 2010. Aracaju – SE.
- PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. C. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.
- PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; SAIKIA,R.; GUPTA, V. K.; SINGH, B. P. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.
- PATERNIANI J. E. S.; MANTOVANI M. C.; SANT'ANNA M. R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 765–771, 2009.
- POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). **Mycologia**, v. 97, n. 6, p. 1195-1200, 2005.
- QIN, S.; CHEN, H-H.; ZHAO, G-Z.; LI, J.; ZHU, W-Y.; XU, L-H.; JIANG, J-H.; LI, W-J. Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforestrevealed by culture-dependent and culture-independent methods. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, p. 522-531, 2012.
- RANDALL, H.T.; CARROLL, K.C.; TANG, Y.W.; WOLK, .D.M. Diagnostic microbiology of the immunocompromised host. 1a Edição. **American Society for Microbiology**, ASM Press, Washigton, 2009.

- RANGEL, M. S. A. *Moringa oleifera*: um purificador natural de água e complemento alimentar para o Nordeste do Brasil (2011). Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A10moringa.htm>>. Acesso 14 agosto 2015.
- SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v 16, p. 313-340, 1966.
- SHUTSRIRUNG, A.; CHROMKAEW, Y.; PATHOM-AREE, W.; CHOONLUCHANON, S.; BOONKERD, N. Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. **Soil Biology**, v. 59, n.3, p. 322-330, 2013.
- SONASHIA, V. P.; KAMAT, N. M.; Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.2, p.223-228.
- VELHO-PEREIRA, S.; KAMAT, N. M. Screening of actinobacteria for antimicrobial activities by a modified "Cross-Streak" method. **Nature Precedings**, p. 1-16, 2012.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G. F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 495–548, 2007.
- VERMA, V. V.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C.; Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p.749-756, 2009.
- ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTRÖM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. Actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Current Microbiology**, v. 62, p. 182-190, 2011.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam.

I. F. A. C. DE SOUZA¹, K. X. R. F. DE SENA², P. M. G. PAIVA¹, J. M. DE ARAÚJO² e L. C. B. B. COELHO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: igor_souza_@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* Lam. é uma planta tropical pertencente à família das Moringaceae, composta apenas por um gênero (*Moringa*) e 14 espécies. É nativa da Índia e encontrada em muitos países da África, Ásia e América do Sul. Considerada uma espécie arbórea, pode chegar a 12 m de altura, gerando flores e frutos em um ano. (PAIVA et al., 2011). A moringa pode ser facilmente propagada por sementes ou por estacas. As sementes podem ser plantadas diretamente no local definitivo ou em sementeiras. Não há necessidade de nenhum tratamento prévio. A planta requer poucos tratamentos culturais e cresce rapidamente alcançando a altura de 4m no primeiro ano. Em condições favoráveis, uma única planta pode produzir de 50 a 70 kg de frutos/ano. É uma das plantas mais úteis para as regiões semiáridas (SANTANA et. al., 2010).

Os endofíticos são definidos como micro-organismos cultiváveis ou não, que vivem no interior de plantas, localizando-se, de modo geral, nas suas partes aéreas, como caules e folhas, também podem ser encontrados em ramos e raízes, sem ocasionar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros (SANTOS & VARAVALLLO, 2011). Os micro-organismos endofíticos têm sido isolados de vários órgãos de diferentes espécies de plantas e são objetos de investigação científica, devido a sua biodiversidade e ao seu potencial para produzir metabólitos bioativos que podem ter aplicação na medicina, agricultura e indústria (CHEN et. al., 2011). Muitas das espécies isoladas são reconhecidas como produtoras de metabólitos secundários com atividade biológica, os quais podem resultar em importantes e raros compostos, os quais são encontrados apenas nas plantas hospedeiras (TRIGIANO, 2010; TURGEON & BUSHLEY, 2010). Entre os micro-organismos endofíticos identificados têm se dado um maior destaque as actinobactérias devido a sua importância biotecnológica (STACKEBRANDT & SCHUMANN, 2006).

Os representantes das actinobactérias apresentam atividades metabólicas diversificadas. Alguns desses micro-organismos podem produzir enzimas extracelulares e uma ampla variedade de metabólitos secundários (RAJU et al., 2010; AL-ASKAR, 2012). Notavelmente, as actinobactérias, particularmente aqueles que habitam plantas que crescem em um ambiente poluído, podem produzir enzimas líticas que contribuem para a degradação de vários tipos de compostos orgânicos poluentes presentes do microambiente (MITTER et al., 2013). Além disso, muitos dos metabólitos secundários produzidos pelas actinobactérias são antibióticos potentes, uma característica que tornou o gênero *Streptomyces* conhecido como o maior produtor de antibióticos primários para indústria farmacêutica (BERDY, 2005).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial biotecnológico de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* Lam., através da análise qualitativa da atividade antimicrobiana e da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares presentes nesses micro-organismos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Actinobactérias Endofíticas

As 33 actinobactérias isoladas de folhas de *M. oleifera* Lam., depositadas na Coleção de Micro-organismos, do Departamento de Antibióticos, da Universidade de Pernambuco, Brasil (UFPEDA), originárias do Jardim Botânico do Recife (sigla 'JBx'), do Campus Recife da UFPE (sigla 'UFPEx') e da Cidade de Caruaru (sigla 'CCx') foram reativadas, utilizando-se meios líquidos correspondentes aos meios nos quais elas estavam preservadas, sob agitação de 150rpm, a 30°C, por 120 horas. Para a manutenção desses micro-organismos, para os ensaios qualitativos, foram realizados repiques dessas actinobactérias em tubos de ensaio contendo o meio sólido inclinado ISP-4, incubados a 30°C, por 7 dias.

2.2 Avaliação Qualitativa da Atividade Antimicrobiana

Para a análise das actinobactérias endofíticas isoladas com potencial de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, foi realizada uma seleção primária em meio sólido, através da técnica do "Teste em Bloco de Gelose" ou "Teste de Difusão em Ágar", caracterizada pela difusão do composto bioativo em ágar (ICHIKAWA et al., 1971). Inicialmente, suspensões em soro fisiológico esterilizado, contendo 0,1% de Tween 80, com os esporos de cada uma das 33 actinobactérias endofíticas foram submetidas à agitação em vórtex e 0,1mL de cada suspensão foi espalhada com alça de Drigalsky, para crescimento em forma de tapete (pour plate), em placas de Petri contendo 20mL dos meios onde as actinobactérias apresentaram melhor crescimento, com produção do micélio aéreo, sendo incubadas por 7 dias a 30°C. Após este período, cilindros de 7,0 mm de diâmetro (plugs) foram cortados e transferidos, com o auxílio de uma pinça, para a superfície das placas de Petri, contendo os meios de cultura específicos, ágar Müeller-Hinton e Sabouraud-ágar, para bactérias e fungos, respectivamente, previamente inoculados com 100µL da suspensão, em água destilada, dos micro-organismos testes, as quais foram padronizadas para a turbidez do tubo N° 0,5 da escala de MacFarland, aproximadamente $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL. As placas foram incubadas respeitando-se as características fisiológicas dos micro-organismos testes. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição formado por cada bloco foram medidos (em mm), calculando-se a média aritmética e o desvio-padrão.

Os micro-organismos testes utilizados nos ensaios qualitativos da atividade antimicrobiana, foram provenientes de culturas pertencentes a Coleção de Culturas Microbianas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), sendo eles: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Candida kruzei* (UFPEDA 1002), *Candida albicans* (UFPEDA 1007) e *Aspergillus níger* (UFPEDA 2003).

2.3 Avaliação Qualitativa da Atividade Enzimática

A determinação da produção de enzimas extracelulares pelas actinobactérias foi realizada pelo método de difusão em ágar. Cada amostra do micro-organismo endofítico foi inoculada com alça em forma de agulha no centro de placas de Petri com 15 mL dos meios de cultura específicos contendo a fonte de carbono para cada enzima. As placas foram incubadas a 30°C, em tempos variáveis, de acordo com cada metodologia. Foi avaliada a presença da

atividade de sete enzimas: amilase, carboximetilcelulase, esterase, lipase, pectinase, protease e xilanase, conforme descrito a seguir.

Os resultados foram detectados pela visualização do halo de degradação do substrato ao redor da colônia, utilizando reveladores característicos para cada teste, adicionando-os a superfície do meio após o crescimento das actinobactérias, sendo o diâmetro da colônia e do halo de degradação medidos em milímetros com um auxílio de um paquímetro, pelo verso da placa. O índice enzimático (IE) foi obtido através do cálculo da relação entre o diâmetro do halo de degradação e o diâmetro da colônia, desse modo, quanto maior o índice maior é a atividade enzimática no meio.

2.3.1 Atividade Amilolítica

A degradação do amido foi avaliada no meio ágar nutritivo (AN) acrescido de amido (0,2% de amido; 0,5% de peptona; 0,15% de extrato de carne; 0,15% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; e 1,5% de ágar. pH 6,0). Após a inoculação pontual das actinobactérias nas placas, estas foram incubadas por 5 dias a 30°C. Em seguida foi realizada a revelação do teste através da adição de cristais de iodo sobre as placas em agitação, para que os cristais pudessem sofrer sublimação e o vapor reagir com o amido. Quando há essa interação, é produzida uma coloração enegrecida no meio de cultura e o halo hidrolítico é visualizado como uma área incolor transparente circundando a colônia (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.3.2 Atividade Carboximetilcelulolítica

Esse ensaio foi realizado em meio CMC (Carboximetilcelulase) (1% de carboximetilcelulose; 0,7% de KH_2PO_4 ; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,06% de extrato de levedura; e 1,5% de ágar. pH 5,5). Após a inoculação, as placas foram incubadas por 4 dias a 30°C. A capacidade carboximetilcelulolítica foi constatada pela adição de 5mL da solução de vermelho congo a 0,025% nas placas por 30 minutos. Para facilitar a visualização do halo, foi adicionado 1mL de NaCl 0,5M por 5 minutos. As actinobactérias que degradaram a carboximetilcelulose apresentaram halos alaranjados ao seu redor (HANKIN et al., 1971).

2.3.3 Atividade Esterásica

A produção de esterase foi observada após a inoculação pontual das linhagens de actinobactérias em meio de cultura específico (2% de Tween 80; 0,5% de peptona; 0,1% de extrato de levedura; 0,4% de NaCl; e 1,5% de ágar. pH 6,5) e cultivada a 30°C. Após 7 dias, as placas foram colocadas a temperatura de 4°C durante um período de 48 horas. Nas colônias positivas para a produção de esterase, foram observados halos esbranquiçados devido à formação de cristais de sais de cálcio do ácido láurico (NEIROTTI & AZEVEDO, 1988).

2.3.4 Atividade Lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica presente nas actinobactérias endofíticas, a metodologia foi a mesma utilizada para a detecção da enzima esterase, porém com a substituição do Tween 80 pelo Tween 20 (NEIROTTI & AZEVEDO, 1988).

2.3.5 Atividade Pectinolítica

A degradação da pectina foi avaliada em meio TSA modificado (*Trypticase Soy Agar*) (1,5% de triptona; 0,5% de NaCl; 0,5% peptona de soja; 1% de pectina cítrica; e 1,5% de ágar. pH 7,3). As placas foram incubadas por 5 dias na temperaturas de 30°C. A pectinase teve sua atividade revelada após a adição de 5mL da solução de iodeto de Gram às placas, que foram mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, foi observado halo translúcido ao redor da colônia, indicando a positividade na produção da enzima (ANDERSON, 1939).

2.3.6 Atividade Proteolítica

A hidrólise de proteínas foi avaliada por inoculação das actinobactérias em meio YMA modificado (*Yeast Malt Agar*) (1% de glicose; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de extrato de malte; 0,5% de peptona bacteriana; 1% de caseína; e 1,5% de ágar. pH 6,5). Após inoculação, as placas foram incubadas a 30°C por 4 dias. Como método de revelação para o teste, houve a adição de 5mL de uma solução de ácido acético 5% às placas, reagindo com o meio por 5 minutos, cujo precipitado torna o ágar mais opaco e acentua as zonas claras ao redor das colônias, caracterizando a hidrólise da caseína (VIEIRA, 1999).

2.3.7 Atividade Xilanolítica

A hidrólise da xilana por actinobactérias foi testada através da inoculação em meio AN modificado (Ágar Nutritivo) (0,5% de peptona; 0,15% de extrato de carne; 0,15% de extrato de levedura; 0,5% de NaCl; 0,02% de xilana; e 1,5% de ágar. pH 7,0), as placas foram incubadas a 30°C por 4 dias. A atividade xilanolítica foi revelada pela adição de Lugol a 0,5% por 5 minutos e lavadas com água destilada. As colônias xilanase positivas apresentaram halos claros ao redor das colônias (MACIEL, 2006).

2.4 Análises Estatísticas

Os ensaios foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e os dados obtidos foram analisados através de análise da variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de $p \leq 0,05$ de probabilidade, usando-se o Sistema de Análise Estatística - SANEST.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para a reativação das 33 linhagens de actinobactérias endofíticas das folhas de *M. oleifera* foi eficiente. Não foi observada nenhum tipo de contaminação quando esses micro-organismos foram repicados em placas de Petri contendo os meios de cultura nos quais eles haviam sido preservados.

As actinobactérias testadas apresentaram atividades inibitórias sobre os micro-organismos testes. Essas bioatividades variaram em relação a cada grupo de micro-organismos testados (Gram-positivos, Gram-negativos, bacilo álcool-ácido resistente, leveduras e fungo filamentosos). Esses resultados podem ser observados nas Tabelas 1 e 2

Tabela 1 – Média dos halos de inibição ($\pm$ desvio-padrão), em milímetros, apresentados pelos isolados de actinobactérias frente aos micro-organismos testes (Gram-positivos e Gram-negativos)

Linhasgens	Micro-organismos Testes (UFPEDA)					
	02	86	100	224	396	416
JB1	-	-	-	-	-	-
JB2	-	-	-	-	-	-
JB3	-	-	-	-	-	-
JB4	-	-	-	-	-	-
JB5	-	-	-	-	-	-
JB6	-	-	-	-	-	-
JB7	-	-	-	-	-	-
JB8	-	-	-	-	-	-
JB9	-	-	-	-	-	-
JB10	12 $\pm$ 1,73	12	26 $\pm$ 1,73	-	-	-
JB11	11,67 $\pm$ 2,08	11,67 $\pm$ 1,53	29,67 $\pm$ 0,58	-	-	-
JB12	10,33 $\pm$ 0,58	-	24,67 $\pm$ 0,58	-	-	-
JB13	16 $\pm$ 2	23,33 $\pm$ 2,31	31 $\pm$ 1,73	-	-	-
JB14	-	-	-	-	-	-
JB15	-	-	-	-	-	11,33 $\pm$ 0,58
JB16	-	-	-	-	-	-
JB17	11,67 $\pm$ 0,58	14,67 $\pm$ 2,52	-	-	-	-
JB18	-	-	-	-	-	-
JB19	-	-	-	-	-	-
IB20	-	-	-	-	-	-
JB21	-	-	-	-	-	-
UFPE1	23 $\pm$ 1	17,33 $\pm$ 2,31	29 $\pm$ 1,73	16,67 $\pm$ 2,08	15	-
UFPE2	-	-	-	-	-	-
UFPE3	-	-	23,33 $\pm$ 1,15	-	-	-
UFPE4	-	-	12,33 $\pm$ 0,58	-	-	-
UFPE5	-	-	-	-	-	-
UFPE6	-	-	-	-	-	-
UFPE7	19,67 $\pm$ 3,21	14,33 $\pm$ 0,58	30,67 $\pm$ 1,15	-	12,33 $\pm$ 0,58	-
UFPE8	-	-	-	-	-	-
CC1	28,33 $\pm$ 0,58	28 $\pm$ 1	35 $\pm$ 5	-	-	-
CC2	11	-	-	-	-	-
CC3	24	16,67 $\pm$ 0,58	23,67 $\pm$ 1,53	17 $\pm$ 3,33	22,33 $\pm$ 1,53	11,67 $\pm$ 0,58
CC4	23,67 $\pm$ 1,53	17	24	16,33 $\pm$ 0,58	22 $\pm$ 2	10,33 $\pm$ 0,58

Legenda: UFPEDA 02 - *Staphylococcus aureus*; UFPEDA 86 - *Bacillus subtilis*; UFPEDA 100 - *Micrococcus luteus*; UFPEDA 224 - *Escherichia coli*; UFPEDA 396 - *Klebsiella pneumoniae*; UFPEDA 416 - *Pseudomonas aeruginosa*; - sem atividade.

Tabela 2 – Média dos halos de inibição ($\pm$ desvio-padrão), em milímetros, apresentados pelos isolados de actinobactérias frente aos micro-organismos testes (bacilo álcool-ácido resistente, leveduras e fungo filamentoso)

Linhagens	Micro-organismos Testes (UFPEDA)			
	71	1002	1007	2003
JB1	-	-	-	-
JB2	-	-	-	-
JB3	-	-	-	17,33 $\pm$ 6,81
JB4	-	-	-	-
JB5	-	-	-	13,33 $\pm$ 1,53
JB6	-	-	-	14 $\pm$ 1,73
JB7	-	-	-	14,33 $\pm$ 1,15
JB8	-	-	-	14,67 $\pm$ 0,58
JB9	-	-	-	14 $\pm$ 1
JB10	17,67 $\pm$ 1,15	-	-	-
JB11	18,67 $\pm$ 1,53	-	-	-
JB12	17 $\pm$ 1	-	-	16 $\pm$ 1
JB13	21,67 $\pm$ 1,53	-	-	-
JB14	-	-	-	-
JB15	-	-	-	17,33 $\pm$ 2,52
JB16	-	-	-	20 $\pm$ 2,65
JB17	-	-	-	12
JB18	15 $\pm$ 1	17,33 $\pm$ 0,58	18	28 $\pm$ 2
JB19	-	-	15	21 $\pm$ 1,73
IB20	13 $\pm$ 1	-	10,67 $\pm$ 0,58	20,67 $\pm$ 1,15
JB21	14,33 $\pm$ 0,58	-	13,33 $\pm$ 0,58	25
UFPE1	30	16 $\pm$ 1	14,33 $\pm$ 0,58	23,67 $\pm$ 2,52
UFPE2	-	-	-	-
UFPE3	-	-	-	-
UFPE4	-	16 $\pm$ 1	-	42,33 $\pm$ 2,31
UFPE5	-	-	-	39,33 $\pm$ 0,58
UFPE6	-	-	-	-
UFPE7	25,33 $\pm$ 1,15	15 $\pm$ 1	15,33 $\pm$ 1,53	23,67 $\pm$ 1,53
UFPE8	-	-	-	-
CC1	16,67 $\pm$ 1,15	-	-	16
CC2	-	12,33 $\pm$ 0,58	-	-
CC3	30,67 $\pm$ 1,53	17,67 $\pm$ 0,58	20,33 $\pm$ 1,53	19,33 $\pm$ 0,58
CC4	29,67 $\pm$ 0,58	16	19,67 $\pm$ 1,53	19,67 $\pm$ 1,15

Legenda: UFPEDA 71 - *Mycobacterium smegmatis*; UFPEDA 1002 - *Candida kruzei*; UFPEDA 1007 - *Candida albicans*; UFPEDA 2003 - *Aspergillus Níger*; - sem atividade.

Os micro-organismos testes Gram-positivos, diferentemente dos Gram-negativos, foram bastante sensíveis quando do teste de inibição, através da difusão em ágar, visto que 13 (39,4%) isolados apresentaram atividade inibitória sobre o *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), o *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e o *Micrococcus luteus* (UFPEDA 100), com halos variando de 10 a 35mm. Destaca-se o isolado CC1, o qual apresentou os maiores halos de inibição, com valores entre 28 e 35mm. Os micro-organismos testes UFPEDA 02 e UFPEDA 100 foram os mais sensíveis, sendo inibidos por 11 das 13 actinobactérias ativas contra os Gram-positivos. Os maiores valores de halos de inibição foram observados sobre o *Micrococcus luteus*, caracterizando-o como um micro-organismo bastante sensível.

No ensaio contra os micro-organismos testes Gram-negativos, observou-se que apenas 5 (15,2%) dos isolados endofíticos das folhas de *M. oleifera* foram ativos. Sendo o micro-organismo teste UFPEDA 396 (*Klebsiella pneumoniae*) o mais sensível frente às actinobactérias testadas, visto os maiores halos de inibição apresentados. Contudo a *Pseudomona aeruginosa* (UFPEDA 416) foi a mais resistente, não apresentando halos superiores a 12mm. Apenas três isolados (UFPE1, CC3 e CC4) apresentaram atividade inibitória sobre a *Escherichia coli*, com halos menores que 20mm.

Zitouni e colaboradores (2003) sugerem que as actinobactérias possuam uma característica de gradação decrescente de sua atividade inibitória, conforme a seguinte escala: bactérias Gram-positivas > fungos > bactérias Gram-negativas. Essa hierarquização quanto à bioatividade desses isolados ambientais frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode ter sua origem atribuída às diferenças morfológicas existentes entre esses micro-organismos: enquanto os Gram-negativos possuem uma membrana externa lipopolissacarídica na parede celular, os Gram-positivos apenas têm uma camada de peptidoglicano espessa, a qual não constituiria uma barreira de proteção efetiva (GEBREYOHANNES et al., 2013). Enfatiza-se também a elevada taxa de resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas a vários antimicrobianos e a existência de misturas de produtos microbianos bioativos em triagens sem outras etapas de fracionamento e purificação, as quais contêm substâncias estrutural e funcionalmente similares a algumas das drogas antibacterianas já existentes (MADIGAN, 2010).

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

Ceylan e colaboradores (2008) realizaram um ensaio com bloco de gelose e testaram 15 amostras de *Streptomyces* do solo da Turquia frente a micro-organismos testes, obtendo halos de inibição superiores a 30mm, quando testados contra *Staphylococcus aureus*. Nedialkova e colaboradores (2005) testaram linhagens de actinobactérias isoladas da Antártida e também observaram forte resistência da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, uma vez que esta só foi inibida por apenas uma linhagem de actinobactéria, e a sensibilidade do *Bacillus subtilis*, que foi inibido por 60% das linhagens testadas.

Rahman (2011) testou linhagens de actinobactérias isoladas do solo de Rajshahi em Bangladesh e observou que nenhuma linhagem testada inibiu a bactéria Gram negativa *Escherichia coli*, contudo, mostraram atividade contra a *Staphylococcus aureus*. Houssam e colaboradores (2009) também não encontraram resultados satisfatórios ao testar estirpes endofíticas de *Streptomyces* sp. contra *Escherichia coli*, ratificando a sua resistência.

A ação sobre o *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71), um bacilo álcool-ácido resistente, foi observada em 12 (36,4%) das 33 actinobactérias testadas. Contudo, a atividade

de 7 isolados dentre os 12 que foram ativos não passou dos 20mm de halo de inibição. Entretanto as linhagens CC3 e CC4 apresentaram as maiores atividades inibitórias com halos de inibição entre 29 e 30mm.

Na análise sobre as leveduras, observou-se que 10 (30,3%) actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* apresentaram atividade. A *Candida albicans* (UFPEDA 1007) apresentou maior sensibilidade frente aos isolados testados, sendo inibida por 8 das 10 actinobactérias ativas. Novamente, destacam-se as linhagens CC3 e CC4 frente a esse grupo de micro-organismos, apresentando halos de inibição que variaram de 16 a 20mm.

A porcentagem de actinobactérias ativas contra as leveduras encontradas no presente estudo é relativamente alta quando comparada com outros estudos, como o de Bachiega e colaboradores (2005) que encontraram 20,3% de atividade contra *C. albicans*. Gandotra e colaboradores (2012) observaram que, dos *Streptomyces* sp. analisados, 33,3% mostraram alguma atividade antifúngica frente a isolados de *Candida* spp. Outros autores também encontraram atividade para isolados de *C. albicans* com porcentagem de 12,5% (SUSITHRA et al., 2009), 11,1% (ALY et al., 2011) e 5% (HONG et al., 2009) das actinobactérias isoladas.

Solecka e colaboradores (2012) relatam a atividade antifúngica contra diversos fungos patogênicos a partir de metabólitos produzidos por actinobactérias, em especial aquelas pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Atividades antagonicas frente a *Candida albicans* foram relatados em outros estudos realizados por Atta e colaboradores (2011) e por Oliveira e colaboradores 2013 ao utilizarem actinobactérias.

Das 33 actinobactérias utilizadas no ensaio do Bloco de Gelose para o fungo filamentoso *Aspergillus niger* (UFPEDA 2003), 21 (63,6%) apresentaram halos de inibição que variaram de 12 a 42mm. As linhagens UFPE4 e UFPE5 foram as mais ativas contra esse micro-organismo teste, apresentando halos com valores entre 39 e 42mm. As linhagens CC3 e CC4 que haviam apresentado atividades inibitórias interessantes para os demais grupos de micro-organismos testes, apresentou valores intermediários, com média de 19mm. Este resultado mostra-se importante diante da dificuldade relatada na literatura de isolar micro-organismos produtores de antifúngicos.

Augustine e colaboradores (2005) ao testarem 218 isolados de actinobactérias observaram que apenas um (0,45%) isolado mostrou atividade antifúngica. Das 100 actinobactérias isoladas por Lakshmipathy e Kannabiran (2009), apenas 3 mostraram atividade inibitória contra fungos filamentosos. Deepa e colaboradores (2011) isolaram 30 actinobactérias do solo e obtiveram atividade antifúngica em apenas 5 (16%) dos isolados frente ao fungo filamentoso *Microsporum* spp., porém os autores inferiram que após a observação através da separação desses compostos bioativos por CCD (Cromatografia em Camada Delgada) que os valores de Rf obtidos foram semelhantes aos compostos antifúngicos utilizados comercialmente, podendo significar que os mesmos compostos são responsáveis pela atividade antimicótica desses isolados.

Apesar dessa dificuldade, Silva e colaboradores (2011) isolaram 71 actinobactérias associadas a líquens e observaram, através do teste de atividade antimicrobiana em meio sólido, que os melhores resultados diante dos micro-organismos testes foram para *Aspergillus niger* (65%) e *Candida albicans* (56%).

É interessante salientar que os resultados obtidos no presente estudo não refletem o verdadeiro potencial antimicrobiano das actinobactérias endofíticas, pois segundo Owen e Hundley (2004), a produção de compostos bioativos é estimulada pela interação dos micro-organismos com a planta ou por fatores ambientais, portanto existe a possibilidade da capacidade biosintética estar diminuída quando do cultivo *in vitro*.

As actinobactérias são responsáveis pela produção de mais da metade dos compostos bioativos encontrados na literatura, incluindo antibióticos, agentes imunossupressores,

agentes antitumorais e enzimas (QIN et al., 2009; AMRITA et al., 2012; Xu et al., 2014; Xu 2015).

As publicações existentes de prospecção de actinobactérias têm focado em enzimas de interesse biotecnológico (COELHO et al., 2012). De acordo com Gomes e colaboradores (2007), existe uma relação estreita entre o nicho ecológico do micro-organismos e o seu perfil enzimático intra e extracelular.

No presente estudo foi avaliada a produção extracelular das enzimas amilase, carboximetilcelulase, esterase, lipase, pectinase, protease e xilanase, por actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Lealem e Gashe (1994) consideram que as amostras que apresentam o índice enzimático (IE) com valor igual ou maior que 2,0 são promissoras para aplicação biotecnológica na produção enzimática.

A hidrólise do amido formado por dois polímeros de glicose (amilose e amilopectina), foi observada em 24 (72,7%) isolados dos 33 testados. Os IE variaram de 1,8 a 4,2, caracterizando essas actinobactérias como boas produtoras da enzima amilase (Figura 1). A produção de amilases por microrganismos é fonte de pesquisa para utilização em processos de panificação, fermentação, solubilização de goma, indústria têxtil e branqueamento de papel (KUROSAWA et al., 2006).

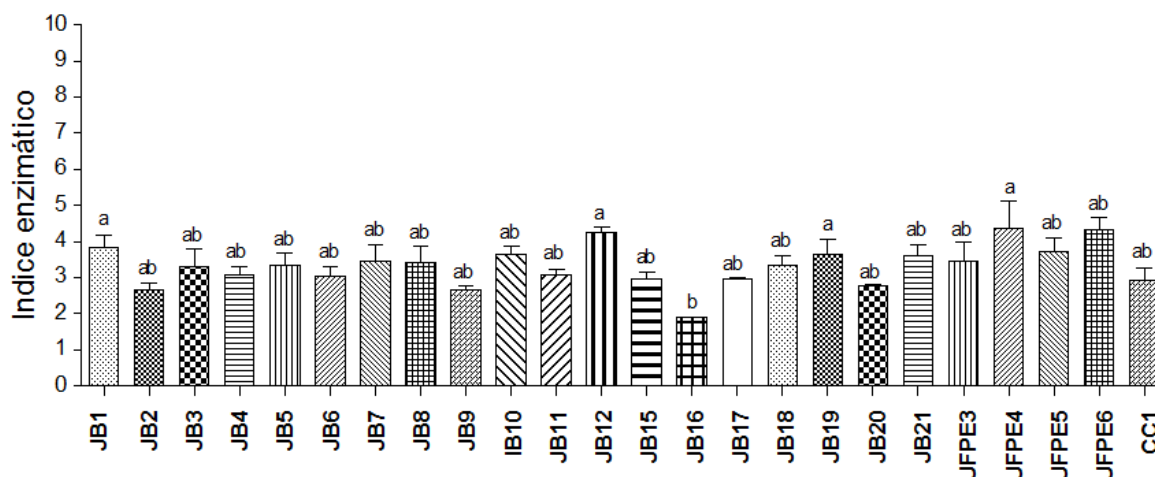


Figura 1. Índices enzimáticos da atividade da amilase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Karanja e colaboradores (2010) observaram a hidrólise amilolítica com IE entre 3,4 e 5,2 para espécies de *Streptomyces* isoladas de solos em Quênia. Aysha e colaboradores (2006) relataram um IE de 1,2 para *Actinomyces pyogenes*, o qual diante do parametro utilizado por Lealem e Gashe (1994), norteador dos dados do presente estudo, a caracteriza como uma fraca produtora de amilase.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), o amido é um importante composto orgânico de reserva nos vegetais cuja degradação é limitada a poucos micro-organismos. De acordo com esses autores, a produção de amilases, ácidos orgânicos, CO_2 e dextrinas durante a decomposição, são características que incluem as actinobactérias no grupo de bons degradadores de amido.

A produção de glicose, álcool e proteínas a partir de celulose são os principais alvos de estudo para aplicação de celulasas (HECK et al. 2002). As celulasas podem ser aplicadas nos

variados processos industriais que envolvam utilização de material vegetal. A avaliação dos isolados de actinobactérias, no presente estudo, revelou atividade carboximetilcelulolítica em 28 (84,8%) dos 33 micro-organismos testados. Apenas 5 (15,2%) isolados não foram capazes de produzir extracelularmente essa enzima. Os valores do IE variaram de 2,1 a 8,3, destacando a linhagem JB17, seguida das linhagens UFPE7 e JB19 como as maiores produtoras de carboximetilcelulase, com IE de 8,3, 7,8 e 7,3, respectivamente (Figura 2).

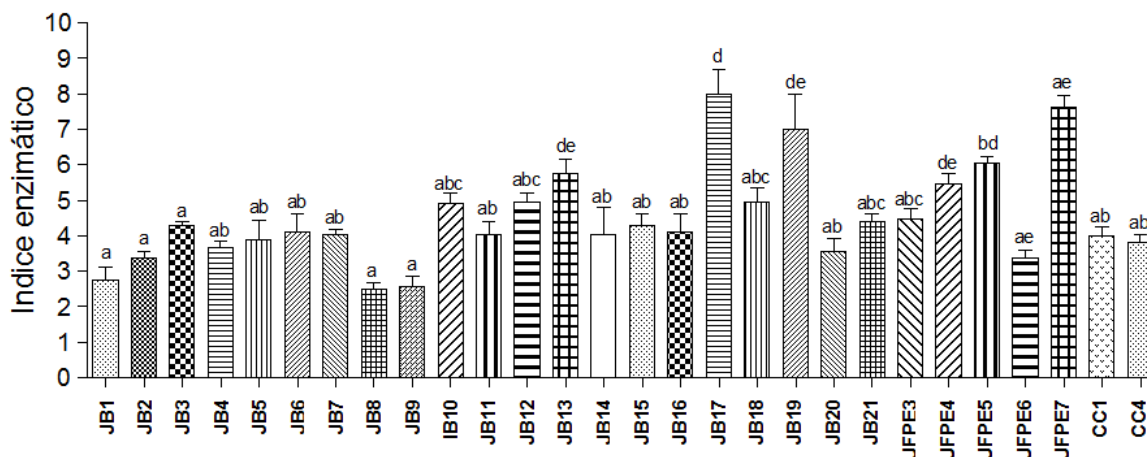


Figura 2. Índices enzimáticos da atividade da carboximetilcelulase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Na triagem realizada por El-Sersy e colaboradores (2010), para actinobactérias produtoras de celulase, foram avaliadas seis espécies, sendo cinco pertencentes ao gênero *Streptomyces* e uma ao gênero *Nocardopsis*, todas isoladas do ecossistema marinho. Após sete dias de incubação, todas as espécies de actinobactérias apresentaram sinais de crescimento em ágar CMC e demonstraram resultados positivos no teste com vermelho congo, destacando-se a espécie *Streptomyces ruber* como a melhor produtora da enzima.

Silva e colaboradores (2015), avaliando a atividade celulolítica de 28 isolados de actinobactérias oriundas de amostras de solo do Parque Nacional de Ubajara, CE, verificaram que 21 destas produziram celulase extracelular. Os autores obtiveram 10 isolados com $IE \geq 2,0$, porém o maior valor de IE obtido foi 6,9, valor intermediário aos obtidos no presente estudo. O IE para os 28 isolados testados produtores de carboximetilcelulase foi em média de 4,3, sendo superior ao trabalho de Silva e colaboradores (2015) no qual o valor médio foi de 2,1. Entretanto, Oliveira e colaboradores. (2006), estudando bactérias isoladas de solo da região amazônica identificaram apenas 6 bactérias com atividade celulolítica extracelular, dos quais apenas uma cepa foi considerada como uma boa produtora de carboximetilcelulase.

Das espécies de *Streptomyces* isolados por Ramirez e Cocha (2003), 92% apresentaram atividade celulolítica no meio CMC, corroborando com o alto percentual de actinobactérias endofíticas produtoras dessa enzima relatada nesse estudo.

Os lipídeos, por sua vez, são biomoléculas de ésteres de glicerol e ácidos graxos. Estudos têm revelado que a utilização dessas biomoléculas, óleos vegetais, por micro-organismos cultivados em meio enriquecido com estes compostos, promove o aumento de metabólitos secundários, como as enzimas esterase e lipase (VASCONCELOS, 2008). O potencial biotecnológico das esterases e lipases tem sido constantemente ampliado, com a utilização dessas enzimas, para o desenvolvimento de sabores específicos na indústria alimentícia (GONÇALVES, 2007), obtenção de biodiesel (SHIEH et al., 2003), síntese de

medicamentos (KIM et al., 2002), adição em detergentes (CARDENAS et al., 2001) e na indústria de papel para a remoção de componentes hidrofóbicos da madeira (JAEGER & REETZ, 1998).

Quando da análise na formação de cristais de sais de cálcio do ácido láurico no meio de cultura oriundos da ação das enzimas esterase e lipase, observou-se que 29 (87,9%) e 19 (57,6%) isolados foram capazes de degradar os ésteres de cadeia longa e de cadeia curta, respectivamente. Contudo os IE apresentaram valores que variaram de 2 a 5,6 para a esterase, e de 1,8 a 5 para lipase. Ressalva-se o baixo potencial biotecnológico das actinobactérias endofíticas JB6, JB7, JB9, JB17, UFPE6 E UFPE7 por apresentarem IE menores que 2 para a atividade lipolítica (Figura 3 e 4).

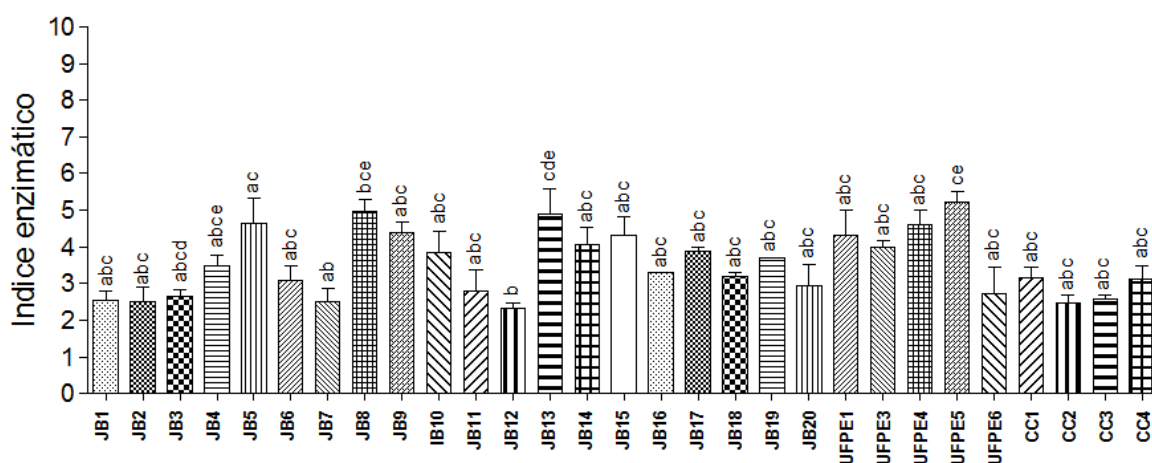


Figura 3. Índices enzimáticos da atividade da esterase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

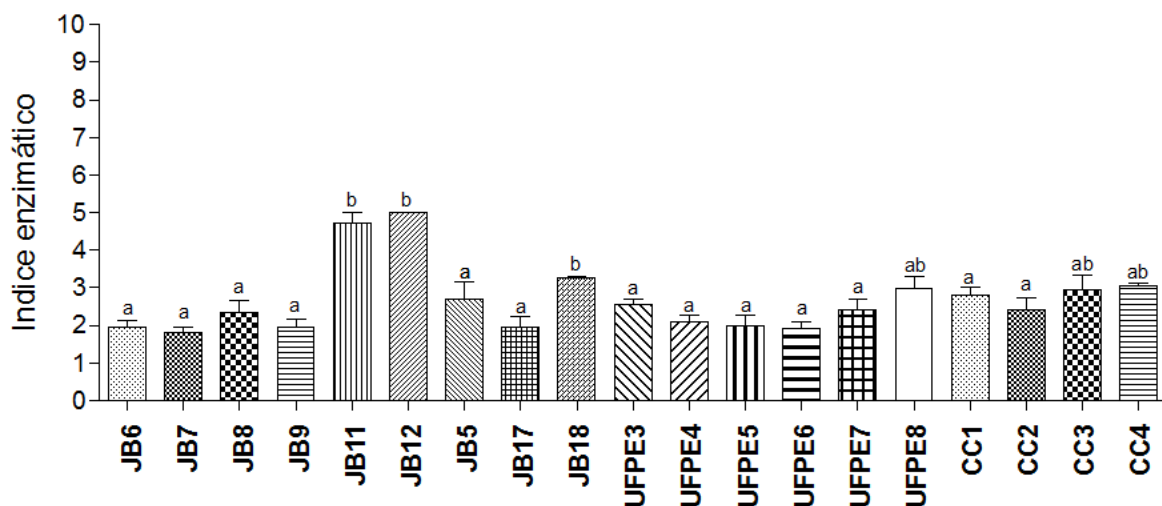


Figura 4. Índices enzimáticos da atividade da lipase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Estes resultados confirmam os achados de Rodrigues (2006), que em um estudo investigou actinobactérias isoladas a partir de uma pilha de compostagem. As esterases (Tween 80) e lipases (Tween 20) foram produzidos por 88% e 44% dos isolados, respectivamente.

Sacco (2013), avaliando a atividade lipolítica de 16 cepas oriundas de amostras de solo contendo bagaço de cana em decomposição, verificaram que 11 destas produziram lipase extracelular. Os autores obtiveram somente 1 isolado com IE $\geq 2,0$, o que ratifica a dificuldade na produção dessa enzima pelas actinobactérias endofíticas testadas.

O potencial biotecnológico de actinobactérias para a produção de lipases e esterases também foi relatado por Karanja e colaboradores (2010). Os autores relataram IE máximo de 5,3 e de 4,2 para a hidrólise de Tween 80 e Tween 20, respectivamente. Aqui, os resultados obtidos são bem parecidos, com IE máximo de 5,3 para a esterase e de 4,4 para a lipase.

A produção de lipases e esterases é uma característica típica de vários micro-organismos e é influenciada, principalmente, pelas condições de crescimento. Na avaliação da produção extracelular dessas enzimas, inferiu-se que 4 (12,1%) e 14 (42,4%) isolados não foram capazes de produzir esterase e lipase, respectivamente. Estes resultados podem ser ligados ao intervalo e/ou especificidade estreita da temperatura de incubação dos substratos utilizados. Alguns autores afirmam que estas enzimas são específicos do substrato e, assim, as suas atividades variam com a composição de triacilglicerol de óleos usados (NITHANGENI et al., 2001; EDEM, 2002).

Pectinases são enzimas capazes de hidrolisar a pectina presente na lamela média e parede primária de células vegetais (GOMES et al., 2007), o que auxiliaria a entrada do micro-organismo nos vegetais. Essas enzimas são normalmente utilizadas na indústria alimentícia para extração e clarificação de sucos de frutas e produção de vinhos (POLIZELI et al., 2006) e nas indústrias de papel (BEG et al., 2001; VIIKARI et al., 2001).

A produção da enzima pectinase foi observada em 20 (60,6%) das 33 actinobactérias endofíticas testadas. Apresentando valores de IE muito próximos e com média de 3,8 (Figura 5).

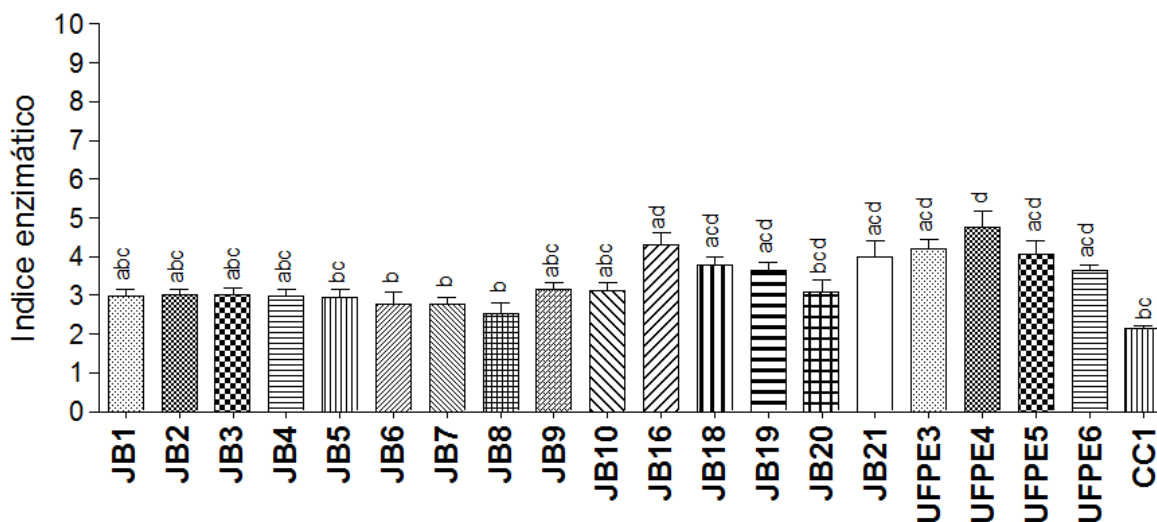


Figura 5. Índices enzimáticos da atividade da pectinase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

As proteases são as enzimas com maior utilização em processos biotecnológicos industriais. Estas enzimas são termoestáveis e produzidas por diversos organismos, como fungos, bactérias, actinobactérias, animais e plantas, com inúmeras aplicações em indústrias

de alimentos, de couro, de detergente, farmacêutica e no tratamento de resíduos (NAIDU & DEVI, 2005).

Na avaliação qualitativa da atividade proteolítica, observou-se que 31 (93,9%) das actinobactérias endofíticas foram ativas na hidrólise da proteína. Apenas as linhagens JB13 e UFPE2 não produziram protease. Destacam-se as linhagens JB17 e CC4 como os maiores valores de IE de 7,5 e 8,4, respectivamente. O isolado JB7 apresentou o menor IE com valor de 2,0 (Figura 6).

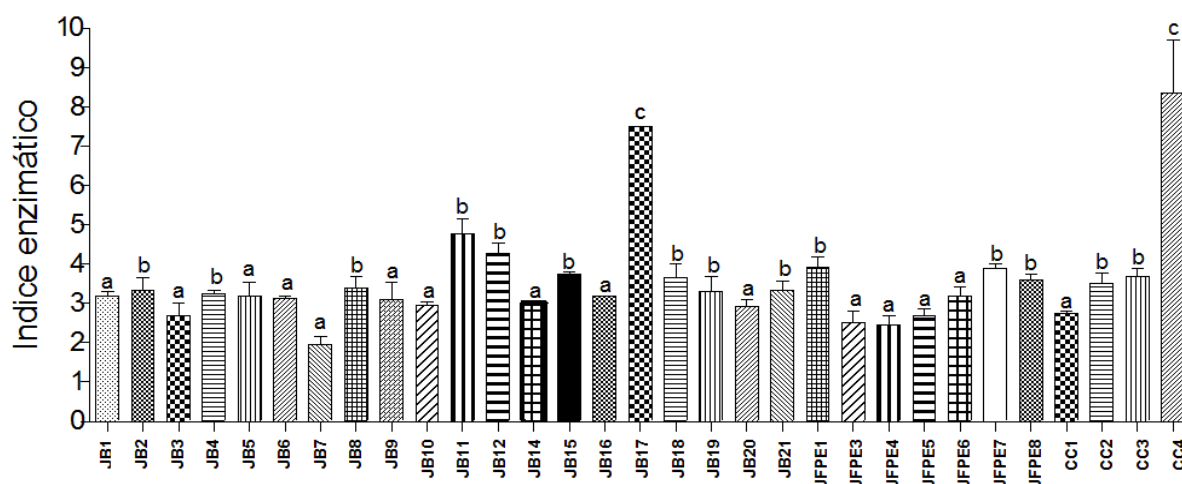


Figura 6. Índices enzimáticos da atividade da protease produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Estes resultados equivalem com aqueles obtidos por Karanja e colaboradores (2010), que observaram valores EI entre 3,0 e 7,4 na hidrólise proteolítica de leite com baixo teor de gordura por *Streptomyces* isolados quando incubados entre 27,5°C e 32,5°C. Azevedo e colaboradores (2003) relataram que *Streptomyces* isolados do solo do bioma Cerrado no Brasil foram capazes de hidrolisar a caseína.

As xilanases também têm atraído interesses biotecnológicos devido às suas amplas aplicações no branqueamento de celulose, na produção de bioetanol e na produção de oligossacarídeos (KUMAR et al., 2012).

Essas enzimas têm sido descritas em actinobactérias, como *Thermomonospora* e *Actinomadura*. São ativas em pH 6,0-7,0, porém, xilanases ativas em pH alcalino têm sido descritas a partir de *Bacillus* sp. e *Streptomyces viridosporus* (PÉREZ et al., 2002). A atividade xilanolítica foi observada em apenas 12 (36,4%) das 33 actinobactérias endofíticas testadas. Contudo os valores do IE variaram de 3,0 a 8,0, sendo esse maior valor encontrado na linhagem JB21 (Figura 7).

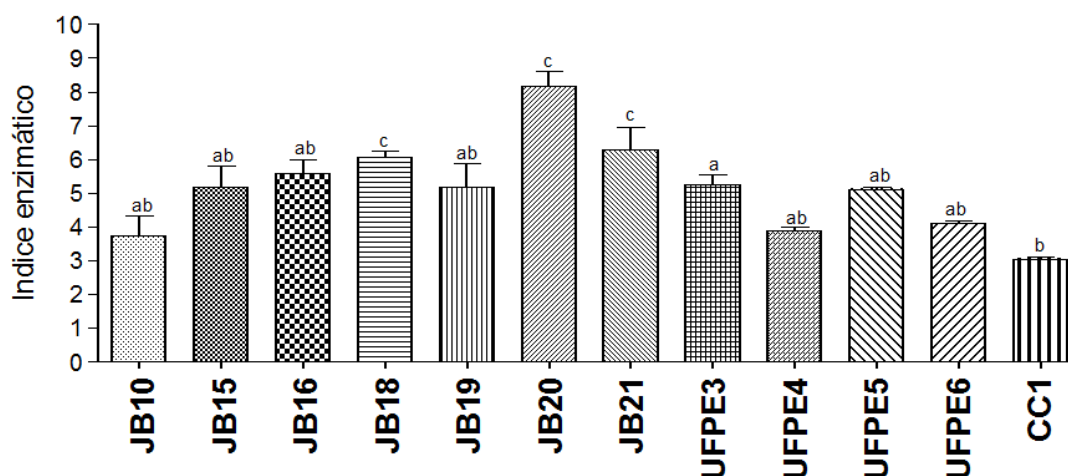


Figura 7. Índices enzimáticos da atividade da xilanase produzida pelas linhagens de actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera*. Barras no gráfico seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Resultados semelhantes foram encontrados por Kumar e colaboradores (2012), onde das 57 actinobactérias isoladas do solo na Índia, apenas 13 exibiram a capacidade de produzir a enzima xilanase, destacando-se a espécie *Streptomyces* sp. RCK-2010. Contudo, esses autores inferiram que essa produção poderia ser otimizada variando-se as condições de cultivo e as fontes de carbono e nitrogênio. Entre as várias fontes de carbono testadas por esses autores, a espécie produziu maiores índices de xilanase em farelo de trigo e, entre as fontes de nitrogênio, mais altas concentrações da enzima foram verificadas em extrato de carne, seguido de peptona.

As linhagens JB18, UFPE3, UFPE4, UFPE5, UFPE6 e CC1 apresentaram atividade enzimática para a produção de todas as enzimas testadas. O isolado UFPE2 não apresentou nenhuma atividade enzimática para as enzimas ensaiadas nesse estudo. As condições de armazenamento e constantes repicagens de micro-organismos são fatores que contribuem para possíveis mutações que resultam em alterações morfológicas e fisiológicas como mudanças de cor da cultura, perda da capacidade de esporulação e síntese de algumas substâncias (TERAMOTO et al., 2011). Os Índices Enzimáticos apresentados pela actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* sugerem um potencial para futura aplicação biotecnológica desses micro-organismos.

4. CONCLUSÕES

Das 33 actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera*, 26 (78,8%) apresentaram atividade inibitória para pelo menos um dos micro-organismos testes, tendo menor ação sobre as bactérias Gram-negativas, com apenas 5 (15,2%) isolados ativos frente a esse grupo. Maior atividade antimicrobiana foi observada sobre o fungo filamentoso *A. niger*, com 21 (63,6%) linhagens inibindo o crescimento.

Na avaliação qualitativa na produção extracelular de enzimas, 32 (97%) actinobactérias apresentaram pelo menos uma atividade enzimática frente as 7 enzimas testadas. Um total de 5 (15,2%) isolados produziram todas as enzimas e apenas a linhagem UFPE2 (3%) não apresentou nenhuma atividade. A protease é a enzima mais facilmente

produzida pelas actinobactérias testadas, visto que 31 (93,9%) a produziram e a xilanase apresenta-se como a de menor produção pelos endofíticos, com apenas 12 (36,4%) isolados produzindo-a.

Portanto, a análise qualitativa das atividades antimicrobiana e enzimática demonstrou que as actinobactérias isoladas das folhas de *M. oleifera* possuem potencial biotecnológico na produção de compostos bioativos.

5. REFERÊNCIAS

- AL-ASKAR, A. A. Microbiological studies on the in vitro inhibitory effect of *Streptomyces collinus albescens* against some phytopathogenic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 3277-3283, 2012.
- ALY, M.; AL-AIDROOS, B.; ALFASSI, F. Production of non polyenic antifungal agent from *Streptomyces* sp. BM54, isolated from marine shrimps. **Crown Journal of Medicine**, v. 1, n. 1, p. 01-08. 2011.
- AMRITA, K.; NITIN, J.; DEVI, C. S. Novel bioactive compounds from mangrove derived actinomycetes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 9, p. 25-29, 2012.
- ANDERSON, J.A.A. The use of tributyrinager in dairy bacteriology. **International Microbiology**, v. 3, p. 726-728, 1939.
- ATTA, H. M.; HAROUN, B. M.; KHALIFA, M. A.; Physico-chemical characteristics of vernamycin-A antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* SP-AZ-SH-29. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 247-255, 2011.
- AUGUSTINE, S. K.; BHAVSAR, S. P.; KAPADNIS, B. P. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, p. 164-170. 2005.
- AYSHA, J. I. C.; EDWEIS, C. B.; JOSE, D. G. V. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Srcives of Biology and Biotechnology**, v. 49, p. 353-359, 2006.
- AZEVEDO, L. A. I.; CASTILHO, L. R.; LEITE, S. G. F.; FREIRE, D. M. G.; COELHO, R. R. R. Protease from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. Optimization of culture medium employing statistical experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p. 749-755, 2003.
- 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, p. 29-37, 2005.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BERDY, Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* vol. 58, pág. 1–26, 2005
- CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y.; LI, H.; ZHAO, C.; YANG, Y.; HOU, Y.; WANG, C.; LI, N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8179–8184, 2011.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of a novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic**, v. 14, p. 111-123, 2001.

- CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A.; Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 2, p. 72-82, 2008.
- COELHO, R. R. R. GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; FRANCO, M. N.; OLIVEIRA, M. N. Q.; NASCIMENTO, R. P. Actinomicetos de solos brasileiros: um baú de enzimas interessantes. **Microbiologia in Foco**, v. 5, p. 5-13, 2012.
- DEEPA, L.; GOWTHAMI, K.; KUMAR, K. In vivo Screening of Antimicrobial Activity of Soil Actinomycetes Against Human Pathogens. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 7, n. 5, p. 624-628. 2011.
- EDEM, D. O. Palm oil: biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 57, p. 319-341, 2002.
- EL-SERSY, N. A.; **ABD-ELNABY, H.; ABOU-ELELA, G. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-TOUKHY, N. M. K.** Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6355-6364, 2010.
- GAMUNDI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 986-996, 2003.
- GANDOTRA, S.; BISHT, G. R.; SAHARAN, B. S. Antifungal activity of endophytic actinomycetes (*Streptomyces*) against *Candida* species. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 1, n. 4, p. 375-378. 2012.
- GEBREYOHANNES, G.; MOGES, F.; SAHILE, S.; RAJA, N. Isolation and characterization of potential producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedical**, v. 3, p. 426-435, 2013.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.
- GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. 2007. Tese – Universidade Federal de Minas Gerais.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D.C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied of Microbiology**, v. 22: p. 205-209, 1971.
- HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and Xylanase Production by Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soybean Industrial Residue Based Solid-state Cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 213-218, 2002.
- HONG, K.; GAO, A.; XIE, Q.; GAO, H.; ZHUANG, L.; LIN, H.; YU, H.; YAO, X.; GOODFELLOW, M.; RUAN, J. Actinomycetes for Marine Drug Discovery Isolated from Mangrove Soils and Plants in China. **Marine Drugs**, v. 7, p. 24-44. 2009.
- HOUSSAM, M. A.; MAGED, S. A. Antimycin-A antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* sp. AZ-AR-262: taxonomy, fermentation, purification and biological activities. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, p. 126-135, 2009.
- ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OSAKI, A. Improvement of kasugamycin-Producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiology**, v. 16, p. 218-224, 1971.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KARANJA, E. N.; BOGA, H. I.; MUIGAI, A. W.; WAMUNYOKOLI, F.; KINYUA, J.; NONOH, J. O. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. **Scientific Conference Proceedings**, p. 17-30, 2010.

- KIM, G. J.; CHA, C. J.; CERNIGLIA, C. E. Purification and characterization of an erythromycin resistant *Pseudomonas* sp. GD 100. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, p. 239-244, 2002.
- KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3, p. 170-177, 2012.
- KUROSAWA, K.; HOSAKA, T.; TAMEHIRO, N.; INAOKA, T.; OCHI, K. Improvement of α -Amylase Production by Modulation of Ribosomal Component Protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 71-77, 2006.
- LAKSHMIPATHY, D.; KANNABIRAN, K. A Morphological, Biochemical and Biological Studies of Halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan Environment. **American Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 207-213. 2009.
- LARGE, K. P.; MIRJALILI, K.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A. P. Lipase activity in *Streptomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 569-575, 1999.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.
- MITTER, B.; PETRIC, A.; SHIN, M.W.; CHAIN, P.S.; HAUBERG-LOTTE, L.; REINHOLD-HUREK, B.; NOWAK, J.; SESSITSCH, A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-15, 2013.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729p.
- NAIDU, K. S. B.; DEVI, K. L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 724-726, 2005.
- NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M.; Screening the Antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, v. 4, p. 29-35, 2005.
- NEIROTTI, E.; AZEVEDO, J.L. Semiquantitative method to evaluate cellulases production in *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 19, p. 78-81, 1988.
- NITHANGENI, M. B.; PATTERTON, H. G.; TANDER, A.V.; VERGEER, W. P.; LITTHAUER, D. Overexpression and properties of purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: A comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 705-712, 2001.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JÚNIOR, A. F. C. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.
- OLIVEIRA, T. L.; LIMA, E. O.; LIANZA, M. C. S.; FERNANDES, H. M. B.; FILHO, A. A. O.; SOUZA, I. A. Atividade antifúngica de extratos isolados de *Streptomyces* spp. obtidos em solos paraibanos contra leveduras do gênero *Candida* spp. **BIOFAR, Revista de Biology e Fárrmacia**, v. 9, p. 34-41, 2013.
- OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, p. 79-99, 2004.

- PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. C. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 982-989, 2011.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 53-63, 2002.
- POLIZELI, M. L. T.; GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474- 480, 2006.
- QIN, S.; LI, J.; CHEN, H.; ZHAO, G.; ZHU, W.; JIANG, C.; XU, L.; LI, W. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6176–6186, 2009.
- RAHMAN, M. A.; MOHAMMAD, Z. I.; ANWAR, U. I. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. **Biotechnology Research International**, p. 1-6, 2011.
- RAJU, A.; PIGGOTT, A. M.; CONTE, M.; TNIMOV, Z.; ALEXANDROV, K.; CAPON, R. J. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry European Journal**, v.16, p.3194 – 3200, 2010.
- RAMIREZ, P.; COHA, J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termofílico: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, p. 67-77, 2003.
- SACCO, L. P. Isolamento de Bactérias Produtoras de Enzimas de Interesse em Processos Biotecnológicos. 2013. 46f. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.
- SANTANA, C. R.; PEREIRA, D. F.; ARAÚJO, N. A.; CAVALCANTI, E. B.; SILVA, G. F. Caracterização físico-química da moringa (*Moringa oleifera* Lam.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 55-60, 2010.
- SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212. 2011.
- SCHREMPF, H.; WALTER, S. The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 353-355, 1995.
- SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalysed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, p. 103-106, 2003.
- SILVA, N. M. V.; PEREIRA, T. M.; ASTOLFI FILHO, S.; MATSUURA, T. Taxonomic characterization and antimicrobial activity of actinomycetes associated with foliose lichens from the amazonian Ecosystems. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 910-918, 2011.
- SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 2026-2036, 2015.
- SOLECKA, J.; ZAJKO, J.; POSTEK, M.; RAJNISZ, A. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. **Central European Journal Boil**, v. 7, n. 3, p. 373-390, 2012.

- SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 50-55, 2008.
- SUSITHRA, M. P.; THENMOZHI, M.; KANNABIRAN, K. Anticandidal activity of *Streptomyces paraguayensis* isolated from marine sediment samples collected at the Puducherry coast, bay of Bengal, India. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 527-537, 2009.
- TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, p. 296 – 298, 2011.
- TRIGIANO, R. N.; NOE, J. P.; WINDHAM, T.; WINDHAM, A. Nematoides parasitas de plantas. In: **Fitopatologia**. II Porto Alegre: Artmed, Cap. 8, p. 83-95, 2010.
- TURGEON, B. G.; BUSHLEY, K. E. Secondary metabolism. In: BORKOVICH, K.; EBBOLE, D. Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **American Society of Microbiology**, p. 376-395, 2010.
- VASCONCELOS, E.S. Caracterização bioquímica e morfológica de mutantes de *Streptomyces claurigerus* ATCC 27064 através de aplicação de radiação UV e tratamento químico. 2008. 89f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.
- VIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: Rehm HJ, editor. **Biotechnology**, p. 523-546, 2001.
- XU, D. B.; YE, W. W.; HAN, Y.; DENG, Z. X.; HONG, K. Natural products from mangrove actinomycetes. **Marine Drugs**, v. 12, p. 2590-2613, 2014.
- XU, J. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. **RSC Advances**, v. 5, p. 841-892, 2015.
- ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTRÖM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. Actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Current Microbiology**, v. 62, p. 182-190, 2011.
- ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI, B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research Microbiology**, v. 156, p. 984-986, 2005.

CAPÍTULO 4

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO *IN VITRO* DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp. ISOLADO DE FOLHAS DE
Moringa oleifera Lam.**

I. F. A. C. DE SOUZA¹, K. X. R. F. DE SENA², P. M. G. PAIVA¹, J. M. DE ARAÚJO² e L.
C. B. B. COELHO¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: igor_souza_@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Moringa oleifera* Lamarck é uma planta tropical pertencente à família das Moringaceae, caracterizada como uma planta arbórea, com vagens de três faces (diferentes de uma vagem normal, que tem apenas duas faces), folhas longo-pecioladas bipinadas (PATERNIANI et al., 2009), cujo comprimento é de até 3 cm, e flores brancas perfumadas. Sua propagação acontece por meio de sementes, mudas ou estacas, podendo atingir até 12 m de altura (SANTANA et. al., 2010). É nativa do norte da Índia e usada desde a antiguidade no Egito, Grécia, Roma, África e no Deserto da Judéia (MORAES & ALBERTO, 2008). Apresenta valores importantes na medicina, indústria alimentar, condimentar, cosméticos, além de ser utilizada no tratamento de água (KHALAFALLA et al., 2010; PAIVA et al., 2011).

Os endofíticos são definidos como micro-organismos cultiváveis ou não, que vivem no interior de plantas, localizando-se, de modo geral, nas suas partes aéreas, como caules e folhas, mas também podem ser encontrados em ramos e raízes, sem ocasionar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros (SANTOS & VARAVALLO, 2011). As propriedades terapêuticas dos endofíticos ainda não têm sido amplamente exploradas e a utilização desses micro-organismos está associada a sua capacidade metabólica de produção de moléculas bioativas, potencialmente úteis na inibição de patógenos significantes em saúde pública. O isolamento desses micro-organismos a partir de plantas é importante, gerando aplicabilidade em biotecnologia; constituindo uma fonte rica de novos compostos farmacologicamente ativos e com grande potencial na medicina e agricultura (COMPANT et. al., 2010; RAMASAMY et al., 2010).

Entre os micro-organismos endofíticos identificados, têm se dado um maior destaque às actinobactérias devido a sua importância biotecnológica como produtores de dois terços dos compostos antibióticos (SU et al., 2014; WU et al., 2014). Atualmente são conhecidos mais de 500 antibióticos diferentes produzidos por esse grupo de bactérias. Destes, mais de 60 tem aplicação prática na indústria, agricultura, medicina e veterinária. O gênero *Streptomyces* é o mais conhecido entre as actinobactérias, compreendendo bactérias facilmente isoladas. As espécies desse gênero são muito valiosas, pois produzem a maioria dos antibióticos comerciais, dentre eles a estreptomicina (MADIGAN, 2010). Além das estreptomicinas, os *Streptomyces* são produtores de antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, novobiocina, vancomicina, e até mesmo antifúngicos, como nistatina e anfotericina B (LACAZ, 2002).

A produção de metabólitos secundários *in vivo* é de grande importância na interação metabólica entre o micro-organismo endofítico e a planta hospedeira, tais como na sinalização, na defesa e na regulação da simbiose. Os metabólitos secundários produzidos por endofíticos podem ser pertencentes a diversas classes de substâncias, como, por exemplo, os esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, furanodionas, terpenóides e citocalasinas

(SCHULZ & BOYLE, 2005). Portanto, essa versatilidade biossintética é enorme, podendo os metabólitos secundários oriundos desses organismos serem obtidos *in vitro* em grandes quantidades por processos fermentativos (SANCHES & DEMAINE, 2002). Em geral, a biossíntese de metabólitos secundários é ativada na fase final do crescimento logarítmico ou já na fase estacionária da fermentação, quando a divisão celular e a produção de biomassa ocorrem em níveis muito baixos (ASAGBRA et al., 2005).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a produção *in vitro* de metabólitos secundários, através de processos fermentativos, de *Streptomyces* sp. isolado de folhas de *M. oleifera* Lam., para determinar as melhores condições de cultivo nesse bioprocesso, com posterior extração dos compostos bioativos produzidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Streptomyces* sp.

A linhagem selecionada para os ensaios em meio líquido, produção e extração do composto bioativo foi a CC4, oriunda das folhas de *M. oleifera* coletadas na Cidade de Caruaru. Esse micro-organismo, pertencente ao gênero *Streptomyces*, apresentou excelentes resultados nos ensaios primários em um trabalho anterior realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaios Antimicrobianos, do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco, bem como foi o único isolado a produzir pigmento, sendo um indicativo de composto com possível atividade biológica.

2.2 Ensaio Fermentativo

A actinobactéria endofítica selecionada no ensaio primário como melhor produtora do composto bioativo, através do teste de Bloco de Gelose, foi cultivada em 16 meios de cultura líquidos e testada contra os micro-organismos testes sobre os quais esse micro-organismo foi ativo. Durante o ensaio, nos diferentes meios de cultura, foram retiradas amostras diárias e acompanhadas a variação de pH, produção de biomassa e do composto bioativo. Tal procedimento visou determinar o melhor meio e as melhores condições de cultivo para maior produção do antibiótico, para posterior extração do princípio bioativo.

Os meios de cultura líquidos utilizados foram: ISP-1 (0,5% de triptona; 0,3% de extrato de levedura; pH 7,0-7,2); ISP-2 (0,4% de extrato de levedura; 1% de extrato de malte; 0,4% de glicose; suplementado com 0,5% de amido; pH 7,2); Ágar Farinha de Aveia - ISP-3 (2% de farinha de aveia cozida e filtrada; 0,1% de solução de sais, composta por 0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2); Ágar Amido Sal Inorgânico - ISP-4 (2% de amido; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,2% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2% de NaCl ; 0,4% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,4% de CaCO_3 ; 0,2% de solução de sais, composta por 0,1% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; pH 7,0-7,4); Meio de Produção de Euromicina - MPE (2% de farinha de soja; 2% de glicose; 0,2% de CaCO_3 ; 0,015% de K_2HPO_4 ; 0,5% de NaCl ; pH 6,7-7,0); Meio 1 (1% de farinha de soja; 1% de glicose; 0,5% de NaCl ; 0,1% de CaCO_3 ; pH 7,0); Czapek (3% de sacarose; 0,2% de NaNO_3 ; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% de KCl ; 0,001% de FeSO_4 ; pH 6,6); Meio Kanna (1% de glicose; 0,1% de extrato de levedura; 5% de solução de sais, composta por 2% de NH_4NO_3 , 1,3% de KH_2PO_4 , 0,36% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% de KCl ; 0,008% de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,014% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,007% de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,006% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0); Meio 615 (5% de glicose; 1% de CaCO_3 ; 33,2% de leite de soja; pH 7,0); Meio K (0,5% de farinha de soja; 1% de glicose; 0,5% de NaCl ; 0,3% de CaCO_3 ; 0,4% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 7,0); Arginina Levedura Ágar - ALA (0,1% de glicose; 0,1% de glicerol; 0,1% de extrato de levedura; 0,03%

de L-arginina; 0,03% de K_2HPO_4 ; 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,03% de NaCl; 0,1% de solução de sais, composta por 0,1% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; pH 6,4); Ágar Variado Pobre - AVP (0,5% de peptona; 0,5% de glicose; 0,5% de extrato de carne; 0,2% de NaCl; 0,5% de “corn steep”; pH 7,0); Batata Dextrose Ágar - BDA (100% de extrato aquoso de batata a 20%; 2% de glicose; pH 6,8-7,0); Caseína Amido Ágar - CAA (1% de amido; 0,03% de caseína; 0,2% de NaCl; 0,2% de KNO_3 ; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,005% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,002% de $CaCO_3$; 0,001% de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; pH 7,0-7,4); Glicerol Asparagina Ágar - GAA (1% de glicerol; 0,1% de asparagina; 0,1% de K_2HPO_4 ; pH 7,0); e *Casamino Acids Yeast Extract Glucose Agar* - YCED (0,03% de extrato de levedura; 0,03 de casaminoácidos; 0,03% de glicose; 0,2% de K_2HPO_4 ; pH 7,2).

Para a realização do pré-inóculo, foram adicionados 5 blocos de gelose da actinobactéria selecionada a cada 50mL dos meios de cultura testados, mantidos sob agitação de 180rpm, a 30°C por 24 horas, posteriormente, realizou-se o inóculo, 10% (v/v) do pré-inóculo. Retirando-se a cada 24 horas de cultivo, com o auxílio de uma pipeta automática, alíquotas (1mL) do mosto fermentado para avaliar o pH, a quantidade de biomassa produzida e a atividade antimicrobiana resultante do bioprocesso. A análise foi realizada diariamente, durante al., 1964)os primeiros 7 dias e, posteriormente, com intervalos de 7 dias, até completar 28 dias.

A atividade antimicrobiana durante a fermentação foi avaliada através do teste de Difusão em Ágar (BAUER, et al., 1966), no qual discos de papel Whatman nº4 estéreis, com diâmetro de 5mm, foram umedificados com 25µL do mosto fermentado e, em seguida, transferidos para placas de Petri semeadas com uma suspensão, na concentração padronizada para a turbidez do tubo N° 0,5 da escala de MacFarland, aproximadamente $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL dos micro-organismos testes: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Candida albicans* (UFPEDA 1007) e *Aspergillus niger* (UFPEDA 2003). Esses micro-organismos foram sensíveis no ensaio primário em meio sólido. As placas de Petri foram mantidas por 2 horas sob refrigeração a 4°C, para permitir a difusão do composto bioativo (EL-NAGGAR, 2006). Após o prazo de incubação necessário para o crescimento de cada micro-organismo teste, os diâmetros dos halos de inibição formado ao redor de cada disco foram medidos (em mm). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados determinados como a média aritmética ($\pm$ desvio-padrão) dos diâmetros dos halos de inibição, em milímetros.

2.3 Extração dos Compostos Bioativos

Para a extração dos compostos bioativos, foi realizada a fermentação em biorreator, no meio e condições que apresentaram estatisticamente melhor produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. O processo de separação entre o líquido metabólico e a biomassa foi realizado através de uma centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos, seguido de filtração com papel de filtro em funil.

2.3.1 Extração de Metabólitos Bioativos da Massa Celular

A massa celular foi tratada com os solventes acetato de etila, acetona, clorofórmio, etanol e metanol, na proporção 1:10 (g/mL). As misturas (biomassa + solvente) foram realizadas em falcons (50 mL) e estes ficaram durante 24 horas sob agitação, para extração dos produtos bioativos intracelulares. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm durante 3 minutos e filtradas em papel de filtro, obtendo-se a separação entre a biomassa e o solvente com o princípio ativo (extrato). Discos de papel foram embebidos com

25 µL dos extratos obtidos e foi realizado o teste de difusão em ágar frente aos micro-organismos testes para determinação da atividade antimicrobiana..

2.3.2 Extração de Metabólitos Bioativos do Líquido Metabólico

Na extração dos princípios ativos presentes no líquido metabólico, o pH foi ajustado para 2,0; 7,0 e 9,0. Estes líquidos, em todos os valores de pH, foram tratados com cinco solventes orgânicos não miscíveis em água (acetato de etila, ciclohexano, clorofórmio, éter de etila e hexano), na proporção de 2:1 (líquido metabólico:solvente), seguidos de agitação por 24 horas. Foram realizados os mesmos procedimentos observados durante a extração do princípio ativo da biomassa, até a etapa de centrifugação. Foram separados os extratos do líquido metabólico esgotado com a utilização de uma pipeta e ambos foram submetidos ao teste de difusão em ágar, frente aos micro-organismos testes, realizado através do teste de Difusão em Ágar (BAUER, et al., 1966). Antes da realização do teste o pH dos líquidos esgotados foram reajustados para 7,0. O teste com o líquido esgotado serviu como controle positivo para confirmar se o solvente extraiu por completo o princípio ativo produzido pelo endofítico.

2.4. Análise Estatística

A análise estatística entre mais de dois grupos foi realizada através do teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de comparação múltipla de *Tukey* ($p \leq 0,05$). Para os grupos com mais de duas variáveis, foi utilizado o teste ANOVA de duas vias seguido do teste de *Bonferroni* ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no *software Graphpad Prism 5*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios utilizando-se os 16 meios de cultura para determinação da melhor condição de cultivo na produção de compostos com atividade antimicrobiana, foi observado que mesmo havendo crescimento do *Streptomyces* sp. CC4 em todos os meios de cultivo, não houve produção de compostos bioativos nos meios: ISP-1, ISP-4, Meio Khanna, ALA, AVP, BDA, CAA, GAA, YCED. Isso pode ser explicado por ser tratar de meios não utilizados para processo fermentativos.

A linhagem selecionada, quando do teste em difusão em ágar, apresentou atividade para todos os grupos de micro-organismos testes ensaiados, contudo, esse grande espectro de ação foi reduzido a apenas aqueles do grupo dos Gram-positivos durante o bioprocessamento. Diversos fatores podem estar relacionados, como possíveis mutações devido aos repiques sucessivos para manutenção desse isolado, condições de cultivo, e diferenças na produção quando num substrato sólido e líquido.

Okudoh & Wallis (2007) sugerem, ainda, que a perda da ação antibiótica em ensaios de caráter secundário pode se atribuída a algumas interferências do processo como um todo, desde a preparação do filtrado, a composição dos meios de cultura e as circunstâncias de cultivo.

Em testes primários, em meios sólidos, os compostos antibióticos estão na sua fase de produção e concentrados na massa microbiana em desenvolvimento e, geralmente, filtrados livres de células são aplicados nas etapas de *screening* secundário. O aspecto a ser realçado mais uma vez é que essas biomoléculas ativas estão intimamente relacionadas ao crescimento micelial e não tanto à sua liberação nos caldos de fermentação e, certamente, os extratos que se originaram a partir do meio líquido não terão a mesma potência em relação ao próprio

crescimento celular. Essa observação não é de cunho randômico e está diretamente correlata com o real papel natural desses metabólitos na morfogênese, fisiologia e estilo de vida desses micro-organismos (OMOTO et al. 1979; SHOMURA et al. 1979).

A actinobactéria selecionada (triagem primária) para os testes de triagem secundária da atividade antimicrobiana foi submetida à produção e extração dos metabólitos antibióticos a partir do crescimento das mesmas em meios líquidos. Este procedimento foi assim conduzido, uma vez que, tais biomoléculas podem estar presentes tanto associadas às células microbianas (intracelularmente) ou serem liberadas na solução sob fermentação constante (extracelularmente).

Através da análise estatística, por uma regressão logarítmica, avaliou-se a regressão das amostras para uma linha em crescimento logarítmico. Sendo assim, quanto mais próximo o valor do R^2 (*Qui Quadrado*) de 1 melhor será o meio, pois indica que houve menor dispersão dos dados. Pela análise da Figura 1, observa-se que os meios K e MPE são os melhores estatisticamente, contudo a escolha do Meio K para a produção do mosto fermentado para extração de compostos bioativos se deve a um intervalo menor de tempo para essa produção.

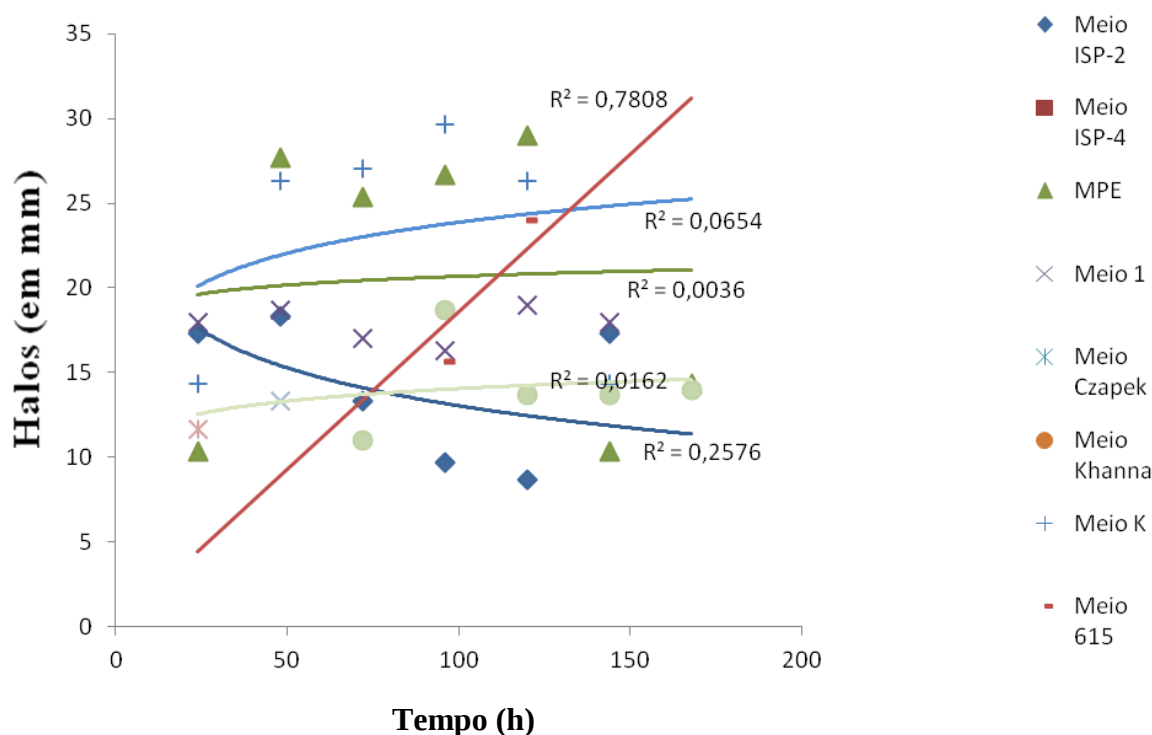


Figura 1 - Gráfico de regressão logarítmica para os meios utilizados no processo fermentativo

A biossíntese de antibióticos é uma propriedade específica dos micro-organismos produtores e depende muito das condições das culturas (FURLAN 1997). É fundamental a busca por parâmetros de cultivo ideais para tornar possível uma melhor produção das biomoléculas ativas. A composição dos meios de cultura, como as fontes de carbono, nitrogênio e fosfato, presença de elementos-traço, pH e temperatura, tempo de cultivo e oferta de oxigênio, constituem basicamente essas variáveis (IWAI & OMURA, 1982; REDDY et al. 2011).

Na realização do ensaio para extração do princípio ativo encontrado no líquido metabólico e/ou biomassa, observou-se que a linhagem endofítica *Streptomyces* sp. CC4 ao produzir o composto com bioatividade esse localiza-se no interior das células, visto que o

teste com o líquido metabólico filtrado e esgotado pelos solventes e os extratos orgânicos não apresentaram nenhum valor de halo de inibição para o *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Staphylococcus aureus* isolado da urina (UFPEDA 671) e o *Staphylococcus aureus* isolado do sangue (UFPEDA 672), todos obtidos da Coleção de Cultura de Micro-organismos do departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Entretanto, os solventes utilizados no processo de extração do princípio ativo da biomassa foram adequados visto os valores observados frente aos micro-organismos testes. O controle negativo foi realizado apenas com os solventes e nenhum apresentou atividade inibitória. A Tabela 1 mostra os valores dos halos de inibição $\pm$ desvio padrão.

Tabela 1 – Valores (+ desvio padrão) dos halos de inibição no teste da extração do princípio ativo da biomassa com cinco solventes

Micro-organismos Testes	Solventes				
	Acetato de Etila	Acetona	Clorofórmio	Etanol	Metanol
<i>S. aureus</i> (UFPEDA 02)	29,7 $\pm$ 0,6	32,7 $\pm$ 0,6	30,7 $\pm$ 0,6	29,3 $\pm$ 1,2	50,3 $\pm$ 0,6
<i>S. aureus</i> isolado de urina (UFPEDA 671)	24,3 $\pm$ 0,6	27,7 $\pm$ 0,6	18	25,3 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 0,6
<i>S. aureus</i> isolado de sangue (UFPEDA 672)	24,7 $\pm$ 0,6	27	19,3 $\pm$ 1,2	31 $\pm$ 1,7	26,7 $\pm$ 0,6

O clorofórmio foi o solvente com menor capacidade de extração do princípio ativo da biomassa, visto os valores intermediários dos halos de inibição quando da utilização desse solvente para extração. O metanol apresentou um halo interessante quanto ao *Staphylococcus aureus* da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, com valor médio de 50,3mm.

Essa bioatividade sobre espécimes isolados de ambiente hospitalar denota essa actinobactéria como possível fonte de fármacos de interesse clínico, visto a resistência intrínseca muitas vezes apresentada por esses micro-organismos oriundos do hospital.

Vijayakumar e colaboradores (2012) mencionam que a atividade antimicrobiana de compostos gerados por actinobactérias varia essencialmente dependendo das amostras microbianas que os sintetizam, o solvente de extração empregado e da natureza dos patógenos e demais organismos-alvo testados.

Krishnaveni e colaboradores (2011) utilizaram acetona para extração de metabólitos bioativos da massa micelial da fermentação de *Streptomyces noursei*. Em concordância com os nossos estudos, os extratos brutos da linhagem de *Streptomyces noursei* exibiram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, dentre estas, alguns isolados clínicos resistentes.

É inegável a incontestável superioridade na qualidade dos ensaios secundários com os extratos brutos em relação aos testes com os pequenos blocos de gelose. A principal evidência desse avanço está na melhor nitidez dos halos gerados pelas soluções etanólicas e metanólicas do que em relação aos provocados pelos *plugs*. Isso decorre especialmente: (i) da maior difusão dos compostos que são liberados nos caldos de fermentação quando os mesmos são ressuspensos em solução aquosa; e (ii) da concentração das porções filtradas e tratadas com os solventes. A opção pela variante da técnica de difusão se fundamenta na simplicidade do procedimento e da dispensabilidade dos discos de papel filtro. Além disso, existe o risco dos metabólitos antimicrobianos se depositarem nos discos em vista da precipitação concomitante de algum composto hidrofóbico, o que preveniria a propagação das biomoléculas no ágar. Ressalta-se que em vista do papel filtro dos discos ter a superfície hidrofílica, as substâncias

com atividade que possuem caráter catiônico não poderão também se difundir. Em vista dessa viabilidade, esses métodos baseados na difusão em ágar e suas variantes foram e até hoje são a primeira alternativa nos estágios iniciais de seleção de produtos naturais com ação antimicrobiana (FIEDLER, 2004; VALGAS et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

A actinobactéria utilizada no presente estudo, *Streptomyces* sp. CC4, apresentou crescimento micelial nos 16 meios líquidos testados, porém em 50% desses meios (ISP-2, ISP-4, MPE, Meio1, Meio K, Czapek, Khanna e Meio 615) produziu compostos bioativos contra *Staphylococcus aureus*. O espectro de ação inibitória desse endofítico diminuiu drasticamente durante os ensaios em meios líquidos.

O princípio ativo encontra-se na massa celular, pois o líquido metabólico puro e esgotado por solventes não miscíveis não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana, sendo essa observada na extração com solventes do composto bioativo presente na biomassa, sendo o metanol o melhor extrator.

5.REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F.D.; DA ROCHA, U.N.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; VAN OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). A. Van. Leeuw. **Journal of Microbiology**, v. 97, p. 389–399, 2010.
- BAUER, A. M.; KIRBY, M. N.; SHERRIS, J. C. et al. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-494, 1966
- BEZERRA, A. M. E.; MEDIEROS FILHO, S.; FREITAS, J. B. S.; TEÓFILO, E. M. Avaliação da qualidade das sementes de *Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento. **Ciências Agrotécnicas**, v. 28, n. 6, p. 1240-1246, 2004.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669–678, 2010.
- EL-NAGGAR, M. Y.; EL-ASSAR, S. A.; ABDUL-GAWAD, S. M. Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation, Purification and Structural Elucidation. **The Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 432-438, 2006.
- FIEDLER, H. P. Screening for bioactivity. In: BULLI, A. T. **Microbial Diversity and Bioprospecting**, p. 324-335, 2004.
- FURLAN, R. L. A. Obtenção e estudo de mutantes com produção alterada do antibiótico retamicina sintetizado por *Streptomyces olindensis* DAUFPE5622. 1997. 76 f. **Dissertação** – Universidade de São Paulo, 1997.
- IWAI, Y.; OMURA, S. Culture conditions for screening of new antibiotics. **Journal of Antibiotics**, v. 35, p. 124-141, 1982.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
- MORAES, L.; ALBERTO, C. *Moringa oleifera*, a “Árvore do Futuro”. Disponível em: <<http://iniciacom.wordpress.com/2008/10/14/moringa-oleifera-E2%80%9Carvore-do-futuro%E2%80%9D/>>. Acesso em: fev de 2013.

- OKUDOH, V.I.; WALLIS, F. M. Antimicrobial activity of rare actinomycetes isolated from natural habitats in KwaZulu-Natal, South Africa. **South African Journal of Science**, v. 103, p. 216-222, 2007.
- OMOTO, S.; SHOMURA, T.; SUZUKI, K.; INOUE, S. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. II Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (strain SF-1993). **Journal of Antibiotics**, v. 32, p. 436-441, 1979.
- PATERNIANI J. E. S.; MANTOVANI M. C.; SANT'ANNA M. R. Uso de sementes de *Moringa oleifera* para tratamento de águas superficiais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.6, p.765-771, 2009.
- RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; BAKAR, H. A.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. S.; ALI, M. F.; FAIZAL WEBER, J. F.; COLE, A. L. J. Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 640-643, 2010.
- REDDY, N. G.; RAMAKRISHNA, D. P. N.; RAJAGOPAL, S. V. Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites. **Egyptian Journal of Biology**, v. 13, p. 21-29, 2011.
- ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Microbiol Biotechnology*, v. 55, p. 284 – 289, 2001.
- SANCHES, S.; DEMAINE, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SHOMURA, T.; YOSHIDA, J.; AMANO, S.; INOUE, S.; NIIDA, T. Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology – productivity relationship of *Streptomyces halstedii* (strain SF-1993). **Journal of Antibiotics**, v.32, p. 427-435, 1979.
- SILVA, F. J. A.; Matos, J. E. X. Sobre dispersões de *Moringa oleifera* para tratamento de água. **Revista Tecnologia**, v.29, n.2, p.157-163, 2008.
- TORTORA, G.J. DERRICKSON, B. **Principios de anatomía y fisiología**. 11 eds. Editorial Médica Panameric.
- VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2006.
- VIJAYAKUMAR, R.; PANNEERSELVAM, K.; MUTHUKUMAR, C.; THAJUDDIN N.; PANNEERSELVAM, A.; SARAVANAMUTHU, R. Optimization of antimicrobial production by a marine actinomycete *Streptomyces afghaniensis* VPTS3-1 isolated from Palk Strait, East Coast of India. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 230-239, 2012.

5. CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para o isolamento de micro-organismos endofíticos de folhas de *M. oleifera* foi eficiente. A maior densidade de isolados foi detectada nas folhas coletadas no Jardim Botânico do Recife, enquanto que a Cidade de Caruaru mostrou o menor número de endofíticos isolados.
- A metodologia utilizada para o isolamento das actinobactérias endofíticas de folhas de *M. oleifera* foi adequada, isolando-se um total de 33 micro-organismos, sendo 21 (63,6%) isolados do Jardim Botânico do Recife, 8 (24,2%) do campus Recife da UFPE e 4 (12,2%) da Cidade de Caruaru.
- Através da observação macroscópica e microscópica foi possível a determinação do gênero em 13 (39,4%) isolados, com predominância do gênero *Streptomyces*. Não foi possível a identificação dos demais devido a características inerentes a mais de um gênero.
- A análise fenotípica apresentou dificuldade na identificação desses micro-organismos devido a grande diversidade de ensaios requeridos para uma correta identificação taxonômica.
- Das 33 actinobactérias endofíticas isoladas de folhas de *M. oleifera*, 26 (78,8%) apresentaram atividade inibitória para pelo menos um dos micro-organismos testes, tendo menor ação sobre as bactérias Gram-negativas, com apenas 5 (15,2%) isolados ativos frente a esse grupo. Maior atividade antimicrobiana foi observada sobre o fungo filamentoso *A. niger*, com 21 (63,6%) linhagens inibindo o crescimento.
- Na avaliação qualitativa na produção extracelular de enzimas, 32 (97%) actinobactérias apresentaram pelo menos uma atividade enzimática frente as 7 enzimas testadas. Um total de 5 (15,2%) isolados produziram todas as enzimas e apenas a linhagem UFPE2 (3%) não apresentou nenhuma atividade. A protease é a enzima mais facilmente produzida pelas actinobactérias testadas, visto que 31 (93,9%) a produziram e a xilanase apresenta-se como a de menor produção pelos endofíticos, com apenas 12 (36,4%) isolados produzindo-a.
- A actinobactéria *Streptomyces* sp. CC4, apresentou crescimento micelial nos 16 meios líquidos testados, porém em 50% desses meios (ISP-2, ISP-4, MPE, Meio1, Meio K, Czapek, Khanna e Meio 615) produziu compostos bioativos

contra *Staphylococcus aureus*. O espectro de ação inibitória desse endofítico diminuiu drasticamente durante os ensaios em meios líquidos.

- O princípio ativo encontra-se na massa celular, pois o líquido metabólico puro e esgotado por solventes não miscíveis não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana, sendo essa observada na extração com solventes do composto bioativo presente na biomassa, sendo o metanol o melhor extrator.