



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ROSILMA DE OLIVEIRA ARAUJO MELO

**ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-
ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia*
monandra E SUAS INTERAÇÕES COM A LECTINA DE FOLHAS
(BmoLL)**

Recife
2017

ROSILMA DE OLIVEIRA ARAUJO MELO

ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* E SUAS INTERAÇÕES COM A LECTINA DE FOLHAS (BmoLL)

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana C. Breitenbach B.Coelho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Janete Magali de Araujo

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Melo, Rosilma de Oliveira Araújo

Isolamento, avaliação e identificação de micro-organismos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* e suas interações com a lectina de folhas (BmoLL) / Rosilma de Oliveira Araújo Melo- Recife: O Autor, 2017.

127 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Janete Magali de Araújo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Micro-organismos 2. *Staphylococcus aureus* 3. Fungos I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Araújo, Janete Magali (coorientadora) III. Título**

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-138

ROSILMA DE OLIVEIRA ARAUJO MELO

ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* E SUAS INTERAÇÕES COM A LECTINA DE FOLHAS (BmoLL)

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia.

Aprovada em: 16 de Fevereiro 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Fisiologia-CB-UFPE

Prof^ª Dr^a Norma Buarque de Gusmão (Titular externo)
Departamento de Antibióticos- CB-UFPE

Prof^º. Dr^º. Thiago Henrique Napoleão (Titular externo)
Departamento de Bioquímica e Fisiologia-CB-UFPE

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia (Titular interno)
Departamento de Bioquímica e Fisiologia-CB-UFPE

Prof^a Dr^a Maria das Graças Carneiro da Cunha (Titular interno)
Departamento de Bioquímica e Fisiologia-CB-UFPE

Prof^º Dr^º Igor Felipe Andrade Costa de Souza (Suplente externo)
Faculdade Integrada de Pernambuco- FACIPE

Prof^a Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva (Suplente interno)
Departamento de Antibióticos- CB-UFPE

“O verdadeiro sucesso é alcançado quando se gosta do que faz”
Adaptado de Dale Carnegie

Dedicatória

Aos meus pais que acreditam na educação e no conhecimento como o único caminho para o crescimento humano e como tesouro que levamos para toda vida. Ao meu marido Dyego Melo e minha filha Allana Melo por sempre estarem ao meu lado na busca desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade do aprendizado intelectual, profissional e pessoal que obtive durante o tempo de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Raimundo e Maria, que foram os alicerces da minha trajetória como exemplos de pessoas dignas e vencedoras, e por me conduzirem e me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, Rosângela, Ramilton e Roseane pelo apoio, incentivo e momentos em família que me fortaleciam para permanecer com foco nas minhas metas.

Ao meu esposo, Dyego Melo, pelo amor, incentivo e muita PACIÊNCIA em suportar os momentos de aflição, ansiedade, estresse. E por ser a voz da razão que me fazia retornar ao meu ponto de equilíbrio. E a minha filha, Allana Melo, que na sua inocência me atrapalhava na tentativa de ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra pelo aceite da orientação por indicações apesar de nem me conhecer. E com seu espírito iluminado depositou confiança e perspectivas a minha pessoa. Obrigada, por me proporcionar conhecimento, discernimento e, sobretudo uma visão científica que permitiram minha afirmação como pesquisadora. Obrigada por sempre me dar apoio e ter paciência nos diversos momentos de dificuldade, ao longo desses quatro anos de pesquisa.

À Prof^a. Dr^a Janete Magali pela coorientação e incessante dedicação em me auxiliar na parte prática do meu projeto. Obrigada pelas inúmeras vezes que se disponibilizou para verificar o andamento do meu projeto, me dando suporte com seu vasto conhecimento na área da microbiologia.

À Prof^a. Kêsia Xisto pelo acolhimento e suporte físico para o desenvolvimento prático de todo meu trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, conversas, conselhos e repreensões dadas no momento certo e com o único intuito: Ajudar-me. Obrigada pelo incentivo e carinho dados a mim como a uma filha, que de fato me sinto.

À Prof^a. Dr^a Glaucia Lima e à Prof^a. Dr^a Norma Gusmão pela amizade, apoio técnico e disponibilidade de sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos (LAMA EA), Lucimere, João, Raysa e Natália por toda ajuda técnica e amizade.

Aos meus eternos amigos, Maria Claudia, Igor Souza e Vinícius com os quais pude compartilhar e conquistar todos os momentos dessa minha jornada. Obrigada amiga pela sua espontaneidade, boas conversas, gargalhadas e, sobretudo por ser sempre verdadeira. Obrigada, filho pelas palavras de incentivo, pelos momentos de descontração, pelas histórias emocionantes e pelo seu companheirismo. Obrigada, Vini pela ajuda na cansativa arte de fermentar actinobactérias, pela sua disponibilidade eterna, e por me conceder conversas de desabafos e aprendizagem mútua.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI), Pérsio, Erik, Camila, Diana, Patrícia pelo companheirismo, amizade, apoio e ajuda.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos: Iranildo e Vanessa por todo apoio em realizar o HPLC e amizade.

Às minhas amigas de longas datas, Lidiane, Marcela, Júlia, Gabriela e Raquel que independente da distância estiveram me apoiando incondicionalmente.

Ao Centro de Ciências Biológicas pela oportunidade e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelos ensinamentos compartilhados, bem como a secretária Adenilda por todo apoio dado.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de pesquisa concedida, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, Luiz Carlos, Fátima, Marcela e Alana pela amizade e por todo auxílio material.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Não existem estudos no que se refere à identificação de micro-organismos endofíticos de *Bauhinia monandra*, embora sejam relatados diversos estudos farmacológicos realizados com essa espécie. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi à prospecção de micro-organismos endofíticos de folhas de *B. monandra*, no intuito de identificar estes endofíticos, bem como explorar o potencial biotecnológico das actinobactérias endofíticas para produção enzimática e antimicrobiana. Folhas de *B. monandra* coletadas no Campus da Cidade Universitária (Recife, PE) foram desinfetadas, maceradas e semeadas em meios de cultura específicos. Após a purificação, as colônias bacterianas e fúngicas foram submetidas à identificação morfológica macroscópica e microscópica. As actinobactérias endofíticas foram avaliadas quanto à produção de enzimas; bem como foi realizada a avaliação antimicrobiana para seleção da estirpe com elevado potencial antimicrobiano e posterior produção de metabólitos ativos em cultivo submerso, seguido de processos de extração e separação cromatográfica dos compostos antimicrobianos obtidos do melhor meio de cultura. No presente estudo, as estirpes de fungos filamentosos endofíticos (59,7%) pertenciam aos gêneros *Penicillium*, *Curvularia* e *Aspergillus*. As bactérias não-filamentosas endofíticas (26,9%) foram agrupadas nos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*. E cepas de actinobactérias endofíticas (13,4%) foram classificadas como *Streptomyces* e *Nocardiopsis*. A metodologia utilizada para verificar quantitativamente a capacidade de produção enzimática foi eficiente, demonstrando que todas as actinobactérias endofíticas (n=9) das folhas de *B. monandra* foram capazes de hidrolisar amido, pectina, Tween 20 e 80; e celulose, confirmando a presença de amilase, pectinase, lipase, esterase e celulase, respectivamente. Na avaliação da produção de caseinase todas as actinobactérias endofíticas foram positivas, no entanto, para a degradação da gelatina apenas *Nocardiopsis* spp. 2F foi negativo, bem como no ensaio de tirosina todas as estirpes foram positivas exceto *Streptomyces* spp. 1F. A avaliação da atividade antimicrobiana primária das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*, realizada pelo teste de bloco de gelose mostrou que as cepas endofíticas *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp. 3F, *Streptomyces* spp. 5F, *Streptomyces* spp. 6F e *Streptomyces* spp. 8F, possuíam atividade antimicrobiana apenas diante de bactérias Gram-positivas, principalmente cepas de *Staphylococcus aureus* (n=16) isolados clínicos multiressistentes e oxacilina resistente (ORSA). A estirpe endofítica *Streptomyces* spp. 5F destacou-se como melhor produtor de substâncias antimicrobianas em 11 dos 12 meios de cultura submersa perante cinco cepas de *S. aureus* isolados clínicos, selecionando o meio ISP-3 com melhor desempenho produtivo. O processo extrativo dos produtos ativos com solventes foi bem sucedido com a massa micelial, destacando-se o metanol. Segundo separação cromatográfica de alta eficiência dos extratos brutos: aquoso do líquido metabólico (EAL) e metanólico da massa (EMM), o fracionamento demonstrou que os dois extratos apresentavam compostos com natureza polar. Estes resultados demonstram que a prospecção de micro-organismos endofíticos constitui uma fonte valiosa na obtenção de novas espécies e novos metabólitos bioativos, bem como a descoberta de moléculas com atividade enzimática e antimicrobiana promissora diante de bactérias multirresistentes do gênero *Staphylococcus*.

Palavras chave: *Bauhinia monandra*. Folhas. Endofíticos. Actinobactérias. *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

There are no studies regarding the identification of endophytic microorganisms of *Bauhinia monandra*, although several pharmacological studies with this species are reported. In this way, the objective of this work was to prospect endophytic microorganisms from *B. monandra* leaves, in order to identify these endophytes, as well as to explore the biotechnological potential of endophytic actinobacteria for enzymatic and antimicrobial production. *B. monandra* leaves collected at Campus Cidade Universitária (Recife, PE) were disinfected, macerated and seeded in specific culture media. After purification, bacterial and fungal colonies were submitted to macroscopic and microscopic morphological identification. Endophytic actinobacteria were evaluated for enzyme production; As well as the antimicrobial evaluation for selection of the strain with high antimicrobial potential and subsequent production of the active metabolites in submerged culture, followed by extraction and chromatographic separation of the antimicrobial compounds obtained from the best culture medium. In the present study, strains of endophytic filamentous fungi (59.7%) belonged to the genera *Penicillium*, *Curvularia* and *Aspergillus*. Endophytic non-filamentous bacteria (26.9%) were grouped in the genera *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*. And strains of endophytic actinobacteria (13.4%) were classified as *Streptomyces* and *Nocardiopsis*. The methodology used to verify quantitatively the enzymatic production capacity was efficient, demonstrating that all the endophytic actinobacteria (n = 9) of *B. monandra* leaves were able to hydrolyze starch, pectin, Tween 20 and 80, and cellulose, confirming the presence of amylase, pectinase, lipase, esterase and cellulase, respectively. In the evaluation of the caseinase production, all the endophytic actinobacteria were positive, however, for the degradation of the gelatin only *Nocardiopsis* spp. 2F was negative, as well as in the tyrosine assay all strains were positive except *Streptomyces* spp. 1F. The evaluation of the primary antimicrobial activity of the endophytic actinobacteria of *B. monandra* leaves, performed by the gel block assay showed that the endophytic strains *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp. 3F, *Streptomyces* spp. 5F, *Streptomyces* spp. 6F and *Streptomyces* spp. 8F, had antimicrobial activity only against Gram-positive bacteria, mainly strains of *Staphylococcus aureus* (n = 16), multiresistant clinical isolates and resistant oxacillin (ORSA). The endophytic strain *Streptomyces* spp. 5F was the best producer of antimicrobial substances in 11 of the 12 submerged culture media against five strains of *S. aureus* isolates clinically, selecting ISP-3 medium with better productive performance. The extractive process of the active products with solvents was successful with the mycelial mass, standing out the methanol. According to the high efficiency chromatographic separation of the crude extracts: aqueous of the metabolic liquid (AEL) and mass methanol (MME), the fractionation showed that the two extracts presented compounds with polar nature. These results demonstrate that the prospection of endophytic microorganisms is a valuable source in the acquisition of new species and new bioactive metabolites, as well as the discovery of molecules with promising enzymatic and antimicrobial activity against multiresistant bacteria of the genus *Staphylococcus*.

Key words: *Bauhinia monandra*. Leaves. Endophytic. Actinobacteria. *Staphylococcus aureus*

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1:** Aspectos de *Bauhinia monandra* (Campus Recife da UFPE). A-Espécime vegetal; B-folhas compostas; C- flores do tipo inflorescência terminal; D- frutos do tipo legume.....22
- Figura 2:** Representação esquemática da colonização de um vegetal por micro-organismos: bactérias e fungos.....26
- Figura 3:** Esquematização da técnica de isolamento de micro-organismos endofíticos segundo Araujo et al., 2002.....28

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figure 1.Optical microscopy of Actinobacteria: A, *Streptomyces* sp. (spiral spore chains); B, *Nocardiopsis* sp. (long chains of spores in abundance); C, *Streptomyces* sp. (straight verticillate chains).....56

Figure 2.Macroscopic characteristics of *Streptomyces* spp. in different media of solid culture. A, Agar malt yeast [ISP2]; B, international *Streptomyces* project medium 4 [ISP4]; C, casein starch agar [CAA]; D, glycerol starch agar [GAA]; E, Czapek [CZ] and F, medium complete [MC])...57

Figure 3. Actinobacteria growth in liquid medium.A, agar yeast malt (ISP-2) sterile and clear; B, pure Actinobacteria (particulate sediment) and C, contaminated Actinobacteria.....60

Figure 4.Schematic representation of a vegetable colonization by bacteria and fungi.....61

CAPITULO II

Figure 1.Optical microscopy of endophytic actinobacteria from leaves of *B. monandra*. A, *Streptomycesspp.* 1F; B, *Nocardiopsis spp.* 2F; C, *Streptomycesspp.* 3F; D, *Streptomycesspp.* 4F; E, *Streptomycesspp.* 5F; F, *Streptomycesspp.* 6F; G, *Streptomycesspp.* 7F; H, *Streptomycesspp.* 8F; I, *Streptomycesspp.* 9F.....78

CAPITULO III

Figura 1: Verificação da produção qualitativa das enzimas testadas nos diversos meios de cultivo. A- Amilase (*Streptomyces* spp.3F); B- Pectinase (*Nocardiopsis* spp.2F); C- Lipase (*Streptomyces* spp. 6F); D- Esterase (*Streptomyces* spp. 8F); E- Celulase (*Streptomyces* spp. 5F).....96

Figura 2: Variação dos valores de pH nos diversos meios de fermentação durante o período de fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B.monandra*.....102

Figura 3: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folha de <i>B. monandra</i> nos diversos meios perante a cepa <i>S. aureus</i> 672 UFPEDA.....	103
Figura 4: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folha de <i>B. monandra</i> nos diversos meios na presença de <i>S. aureus</i> 707 UFPEDA.....	105
Figura 5: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folha de <i>B. monandra</i> nos diversos meios perante <i>S. aureus</i> 725 UFPEDA.....	106
Figura 6: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folha de <i>B. monandra</i> nos diversos meios diante <i>S. aureus</i> 719 UFPEDA.....	108
Figura 7: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folha de <i>B. monandra</i> nos diversos meios na presença de <i>S. aureus</i> 732 UFPEDA.....	109
Figura 8: Avaliação antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da extração com solvente massa micelial da fermentação da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp.5F de folhas de <i>B. monandra</i> no meio ISP-3.....	109
Figura 9: Análise cromatográfica (HPLC) do extrato metanólico da massa micelial (EMM) da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folhas de <i>B. monandra</i> no meio ISP-3.....	110

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Table 1. Major constituents of the cellular wall from Actinobacteria and its relation to the taxonomy.....	58
---	----

CAPITULO II

Table 1: Macroscopic characteristics of endophytic actinobacteria from leaves of <i>B. monandra</i> ...	79
Table 2: Phenotypic growth and fermentation evaluation of endophytic actinobacteria from a single source of carbon.....	81
Table 3: Phenotypic growth evaluation of endophytic actinobacteria at different concentrations of NaCl and pH values.....	82

CAPITULO III

Tabela 1. Composição nutricional dos meios de cultura complexos para produção de compostos antimicrobianos.....	94
Tabela 2: Resultados da atividade antimicrobiana das actinobactérias endofíticas de folhas de <i>B. monandra</i> perante bactérias Gram-positivas.....	98
Tabela 3: Resultados da atividade antimicrobiana de actinobactérias endofíticas de folhas de <i>B. monandra</i> na presença de isolados clínicos de <i>S. aureus</i>	101

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
	OBJETIVOS	20
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Gênero <i>Bauhinia</i>	21
2.1.1	<i>Bauhinia monandra</i>	22
2.2	Micro-organismos endofíticos	24
2.2.1	Colonização nos vegetais	25
2.2.2	Isolamento	26
2.2.3	Diversidade	29
2.2.4	Importância biotecnológica	31
2.2.4.1	Micro-organismos endofíticos na agricultura	32
2.2.4.2	Agentes de controle biológico	33
2.2.4.3	Produtores enzimáticos	34
2.2.4.4	Produtores de fármacos	35
2.3	Metabólitos secundários	37
2.3.1	Metabólitos secundários: produção microbiana	38
2.3.2	Metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos	40
2.3.2.1	Metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos: aplicações	40
2.3.2.2	Metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos: atividade antimicrobiana	41
	REFERÊNCIAS	42
	 CAPITULO I: Actinobacteria: Versatile Microorganisms With Medical And Pharmaceutical Application	
	ABSTRACT	55
1.	Introduction	56
2.	Taxonomy	58
3.	Life Cycle	59
4.	Isolation and Identification of Actinobacteria	59
5.	Endophytic Actinobacteria	61
6.	Actinobacteria Biotechnological Importance	62
7.	Conclusions	63
	Acknowledgements	63
	Competing Interests	63
	References	63
	 CAPITULO II: Isolation and Identification of Endophytic Microorganisms from <i>Bauhinia Monandra</i> Leaves, mainly <i>Actinobacteria</i>	
	ABSTRACT	69

1.	Introduction	70
2.	Material and Methods	72
2.1	Collection and Identification of Botanical Material	72
2.2	Isolation of Endophytic Microorganisms	72
2.3	Analysis of the Endophytic Colonies	73
2.4	Physiological and Biochemical Characteristics of Endophytic Actinobacteria	74
3	Results and Discussion	74
4.	Conclusions	83
	Acknowledgements	84
	Competing Interests	84
	References	84

CAPITULO III: Potencial enzimático e antimicrobiano de actinobactérias endofíticas de folhas de *Bauhinia monandra*

	ABSTRACT	88
	RESUMO	89
1.	Introdução	90
2.	Materiais e Métodos	92
2.1	Actinobactérias endofíticas	92
2.2	Atividade Enzimática	92
2.3	Atividade Antimicrobiana	93
2.3.1	Bloco de gelose ou plugs	93
2.3.2	Fermentação	93
2.3.3	Extração e obtenção do composto bioativo	95
3.	Resultados e Discussão	95
3.1	Atividade enzimática das actinobactérias endofíticas de folhas de <i>B. monandra</i>	95
3.2	Atividade antimicrobiana das actinobactérias endofíticas de folhas de <i>B. monandra</i> .	97
3.3	Análise fermentativa da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp. 5F de folhas de <i>B. monandra</i>	102
3.4	Extração dos metabolitos ativos da fermentação da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp.5F de folhas de <i>B. monandra</i> no meio ISP-3.	108
3.5	Análise por HPLC e fracionamento de extratos brutos da fermentação da actinobactéria endofítica <i>Streptomyces</i> spp.5F de folhas de <i>B. monandra</i> no meio ISP-3.	109
4.	Agradecimentos	111
	Referências	111
3.	CONCLUSÕES	115

ANEXOS	116
SUBMISSÃO DO ARTIGO II: Isolation And Identification Of Endophytic Microorganisms From <i>Bauhinia Monandra</i> Leaves	116
NORMAS DO PERIÓDICO BIOTECHNOLOGY JOURNAL INTERNATIONAL	117
NORMAS DO PERIODICO ANNALS OF THE BRAZILIAN ACADEMY OF SCIENCES	124

1. INTRODUÇÃO

As plantas ao se estabelecerem em seus respectivos habitats fazem interações com diferentes espécies de seres vivos, entre eles os micro-organismos externos ou internos, com objetivo de obter recursos necessários à sua sobrevivência (PEIXOTO NETO et al., 2002; COSTA et al., 2010). Os vegetais possuem uma microbiota característica que tem importância para a sua sanidade e manutenção, sendo considerados micro-organismos endofíticos, aqueles organismos que vivem pelo menos um período de seu ciclo de vida no interior de tecidos e órgãos vegetais podendo ser encontrados em folhas, sementes, ramos e raízes, sem causar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros (GUTIERREZ et al., 2012; POLLI et al., 2012; NAIR; PADMAVATHY, 2014).

Os endofíticos geralmente estão associados com a sanidade da planta que os hospeda através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários, conferindo diversas vantagens tais como: controle de insetos e animais herbívoros, produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos, aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fito-hormônio e enzimas (STROBEL, 2001, BANDARA et al., 2006). A diversidade genética da microbiota, residente nos vegetais, com capacidade de prover compostos de estruturas diversificadas e de bioatividade ainda é pouco conhecida, apresentando-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 à obtenção de novas biomoléculas com atividade biológica (PEIXOTO- NETO et al., 2004; TURGEON; BUSHLEY, 2010).

O surgimento de micro-organismos com capacidade de desenvolverem resistência aos antibióticos utilizados na terapêutica convencional, ocasionada principalmente pelo uso abusivo e indiscriminado de fármacos, estimula a busca por novos e eficazes antimicrobianos. Este panorama constitui uma importante estratégia para a biotecnologia, desta forma os micro-organismos endofíticos apresentam-se como uma fonte promissora para a produção de metabólitos bioativos com ação antimicrobiana, antitumoral e entre outras (STROBEL; DAISY, 2003; WIYAKRUTTA et al., 2004).

A presença das actinobactérias como micro-organismos endofíticos tem despertado interesse por serem exímios produtores de metabólitos bioativos com aplicações na medicina e na indústria (POSADA; VEGA, 2005). 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

possuem aplicações farmacológicas e industriais, são as enzimas, agentes imunomoduladores e inibidores enzimáticos (NEVES, 2008). Apesar da dificuldade para se isolar um composto desconhecido com atividade antimicrobiana, diversas pesquisas por novos antibióticos continuam. Visto que antimicrobianos inéditos têm sido descobertos e relatados na literatura mundial, principalmente a partir da fermentação de várias espécies de actinobactérias, sobretudo as do gênero *Streptomyces* (BORUWA et al., 2004; SHIOMI et al., 2005; HAYAKAWA et al., 2007; KUROSAWA et al., 2006).

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) contém cerca de 60 espécies distribuídas no território brasileiro, sendo a espécie *Bauhinia monandra* Kurz conhecida no Brasil como “pata-de-vaca”, “unha-de-vaca”, “casco-de-vaca”, “unha-de-boi”, “unha-de-anta” e “mororó” (ANDRADE et al., 2005; COELHO; SILVA, 2000). Espécies de *Bauhinia*, tais como *B. monandra* têm sido na medicina popular como agente antidiabético ou antioxidante (FERNANDES et al., 2012). Várias pesquisas confirmam uso da *B. monandra* como agente hipoglicemiante como o trabalho de Menezes et al., 2007 utilizando extratos aquosos das folhas de *B. forficata* e *B. monandra* (10% p/v). Argolo et al., 2004 revela que extratos acetato de etila e clorofórmio de folhas de *B. monandra* possuem atividade antioxidante muito potente.

Apesar de relatos de diversos estudos realizados com a *B. monandra*, existe uma única pesquisa quanto à sua microbiota na qual Ramos et al. (2016) isolaram bactérias (n=32) e fungos (n=37). Entretanto não existem estudos no que se refere à identificação e utilização biotecnológica de endofíticos desta espécie. Visto que, os micro-organismos apresentam-se como uma fonte promissora na busca de diversos metabólitos biologicamente ativos e geram alguns dos mais importantes produtos para a indústria com diversas aplicações, como: antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunossupressores, antitumorais, enzimas, inseticidas, herbicidas e antiparasitários, dentre outras (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). A presente tese de doutorado teve por objetivo a prospecção de micro-organismos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra*, com o intuito de isolar, identificar os mesmos, bem como avaliar o potencial biotecnológico enzimático e antimicrobiano de compostos bioativos provenientes de actinobactérias endofíticas de *B. monandra*.

Objetivos

Geral

Estudar a diversidade microbiana endofítica de folhas de *B. monandra*, bem como avaliar do potencial biotecnológico enzimático e antimicrobiano de compostos bioativos provenientes de actinobactérias endofíticas de *B. monandra*

Específicos

- ✓ Isolar micro-organismos endofíticos de folhas de *B. monandra*;
- ✓ Identificar micro-organismos endofíticos em: bactérias, fungos e actinobactérias quanto à morfologia macroscópica e microscópica;
- ✓ Verificar as características fisiológicas e bioquímicas das actinobactérias endofíticas por meio de ensaios bioquímicos utilizando a taxonomia polifásica;
- ✓ Verificar qualitativamente a produção das enzimas específicas para cada substrato utilizado pelas actinobactérias endofíticas;
- ✓ Verificar qualitativamente a atividade antimicrobiana primária das actinobactérias endofíticas através do teste de bloco de gelose;
- ✓ Selecionar a melhor estirpe de actinobactéria endofítica com elevado potencial antimicrobiano;
- ✓ Verificar qualitativamente a atividade antimicrobiana secundária da actinobactéria endofítica selecionada, através de cultivo em diversos meio submersos;
- ✓ Selecionar o meio submerso de melhor produção de compostos antimicrobianos;
- ✓ Extrair o(s) composto(s) bioativos do líquido e massa micelial obtido da fermentação do meio escolhido;
- ✓ Análisar cromatograficamente (HPLC) os compostos antimicrobianos dos extratos obtidos do melhor meio de cultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Bauhinia*

Fabaceae é uma das maiores famílias botânicas, conhecida anteriormente como Leguminosae, com uma larga distribuição geográfica e com abundante número de gêneros e espécies distribuídos nas suas três subfamílias: *Faboideae* (*papilionoideae*), *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae* (ENGLER, 1964). Nesta última está presente o gênero *Bauhinia*, constituído por cerca de 300 espécies, sendo que 64 podem ser encontradas no Brasil (LEWIS, 1987).

O gênero *Bauhinia* foi criado em 1753, por Carolus Linnaeus, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin. *Bauhinia monandra* Kurz é uma planta nativa da Ásia, embora possa ser achada em muitos lugares como a Índia, Nigéria e outras regiões da África e América do Sul (BADAMI; DAULATABAD, 1969; BALOGUN; FETUGA, 1985). No Brasil é conhecida vulgarmente como “pata-de-vaca”, por causa das suas folhas bifoliadas, podendo também ser conhecida como unha-de-vaca, casco-de-vaca, unha-de-boi, unha-de-anta e mororó (ANDRADE et al., 2005). Em Pernambuco, podem ocorrer espécies nativas como *Bauhinia acuruana* Moric, *B. breviola* Benth, *B. cheilantha* Stend, *B. forficata* Link, *B. heterandra* Benth, *B. monandra* Kurz, entre outras (ROSILIO et al., 2004).

Muitos compostos já foram identificados no gênero, principalmente o grupo dos flavonoides, seguidos por terpenoides e esteroides (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Dois flavonóides da casca de *B. manca*, (2S)-7,4'-di-hidroxi-flavan e (2S)-3',4'-di-hidroxi-7-metoxi-flavan, demonstraram atividades significantes de antifungo em *Coprinus cinereus* e *Saprolegnia asterophora* (ACHENBACH et al., 1988). O extrato metanólico de gemas de *B. racemosa* (2,0 g/kg) reduziu significativamente a produção de ácido e pepsina em ratos com úlceras induzidas por aspirina (AKHTAR; AHMAD, 1995). Atividade hipoglicemiante foi demonstrada em folhas de *B. divaricata* (ROMAN-RAMOS et al., 1992), em *B. candicans* (LEMUS et al., 1999), e mais recentemente em *B. forficata* (PEPATO et al., 2002).

As principais atividades farmacológicas estudadas foram: antidiabética (*B. divaricata*, *B. candicans*, *B. monandra*, *B. variegata*, *B. forficata*, *B. cheilantha* e *B. megalandra*); antimicrobiana (*B. splendens*, *B. manca*, *B. rufescens* e *B. forficata*); anti-inflamatória (*B. forficata* e *B. guianensis*); e analgésica (*B. splendens*) (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

2.1.1 *Bauhinia monandra*

Bauhinia monandra possui grande valor econômico, é utilizada com fins ornamental, forrageiro e principalmente medicinal (PIO CORRÊA, 1926; VIEIRA, 1992; MARTINS ET AL., 1995, FERNANDES et al, 2012). É uma árvore de pequeno porte, mas pode atingir até 9,0 metros de altura, possuem pequenos ramos pendentes; folhas alternadas compostas por dois folíolos unidos pela base, glabras (sem pelos) e ovais de tamanhos variados, divididas no centro da metade para cima e provida de acúleos gêmeos na axila foliar. O fruto é um legume reto, ligeiramente encurvado nas extremidades, simples, seco e de deiscência elástica (Figura 1). Quando maduro possui margens de coloração castanha, quase negra e no centro, sob os núcleos seminíferos, castanha escura; quando imaturo apresenta-se de cor verde (ILKIU-BORGES; MENDONÇA, 2009). A *B. monandra* apresenta flores róseas ou brancas que possuem apenas um estame, sendo essa a característica que nomeou a espécie (Figura 1).



Figura 1: Aspectos de *Bauhinia monandra* (Campus Recife da UFPE). A-Espécime vegetal; B-folhas compostas; C- flores do tipo inflorescência terminal; D- frutos do tipo legume.

Espécies de *Bauhinia*, tais como *B. monandra* Kurz são amplamente utilizados em medicina tradicional como agente anti-diabético ou antioxidante. Embora vários estudos mostrem tais atividades, não foram elucidados ainda quais grupos de compostos são responsáveis por tais propriedades. Várias propriedades farmacológicas e ampla ocorrência no reino vegetal com distribuição restrita dentro de uma ordem, família ou gênero, destes compostos têm sido amplamente utilizados em vários medicamentos à base de plantas ativas (FERNANDES et al., 2012).

Diversos pesquisas têm demonstrado a capacidade hipoglicemiante de extratos de *B. monandra*, como o experimento realizado por Menezes et al. (2007) utilizando extratos aquosos das folhas de *B. forficata* e *B. monandra* (10% p/v) e testando em camundongos, demonstrou que ambos os extratos apresentaram atividade hipoglicemiante de acordo com a metodologia empregada, corroborando com o uso na medicina popular.

Estudos referentes à atividade antioxidante de *B. monandra*, tais como: Argolo et al. (2004), demonstram que os extratos clorofórmicos e acetato de etila das folhas de *B. monandra* contém compostos com significantes efeitos antioxidantes (flavonoides e esteroides). Já o extrato etanólico apresentou atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes tipo 2 induzida e acredita-se que essa atividade esteja relacionada com a forte ação antioxidante demonstrada nos experimentos.

Pesquisas em várias áreas, tais como a determinação da genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do infuso aquoso das folhas da *B. monandra* foram exploradas, utilizando testes em sistema *in vitro* como o DNA plasmidial, na presença e ausência de exonuclease III, e *in vivo* empregando sistema procarioto (transformação com bactérias competente DH10B) e eucarioto (teste *Allium cepa*), apresentando resultados que revelaram riscos e benefícios desse extrato vegetal para uso terapêutico e seus efeitos sobre integridade do material genético, especialmente quando empregados como hipoglicemiante (SISENANDO et al., 2009).

As propriedades medicinais do gênero *Bauhinia*, bem como o isolamento de lectinas são amplamente estudadas, sendo a lectina de folha de *B. monandra*, BmoLL, purificada através de fracionamento com sulfato de amônio (0-60%) seguido por cromatografia de afinidade em coluna de gel de guar (COELHO; SILVA, 2000). Enquanto que a lectina das raízes secundárias (BmoRoL) foi caracterizada em eletroforese em gel de poliácridamida para as proteínas básicas (SOUZA et al., 2011). Vale ressaltar o estudo realizado por Macedo et al. (2007) no qual relata a avaliação da lectina da folha de *B. monandra* (BmoLL) como inseticida contra

Callosobruchus maculatus, *Zabrotes subfasciatus* e larvas de *Anagasta kuehniella*, revelando que a BmoLL produziu 50% de mortalidade de *Z. Subfasciatus* e *C. maculatus*.

Apesar de relatos de diversos estudos realizados com a *B. monandra*, não existem pesquisas quanto à sua microbiota, da mesma forma também existem aproximadamente 300.000 espécies de plantas no planeta capazes de abrigar pelo menos um endofítico, no entanto, poucas plantas foram completamente estudadas. Estes micro-organismos, geralmente estão associados com a sanidade da planta que os hospeda através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários como mecanismo de defesa, conferindo diversas vantagens tais como: controle de insetos e animais herbívoros; produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos; aumento da tolerância a estresses abióticos; produção de fitohormônios e outros fatores de crescimento.

2.2 Micro-organismos Endofíticos

A palavra endofítico tem origem grega (éndon + phytón), significa “dentro da planta”, sendo referida principalmente para bactérias e fungos que convivem de forma simbiótica com a planta hospedeira pelo menos em um período de seu ciclo de vida (GUTIERREZ; GONZALEZ; RAMIREZ, 2012).

Os micro-organismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary em 1866, neste período não despertaram interesse visto que pouco se conhecia a respeito de sua função. Entretanto, no final da década de 70, do século XX, diversos estudos demonstraram que os micro-organismos endofíticos viviam em associação mutualística com as plantas, recebendo nutrientes e proteção da planta e, em contrapartida, produzindo compostos químicos como enzimas, alcalóides e antibióticos, entre outros. Em condições de estresse como falta de água, presença de substâncias tóxicas ou ataque de patógenos ou insetos pragas, estes metabólitos protegiam e auxiliavam o vegetal. Surgindo desta forma interesse para as possíveis aplicações biotecnológicas desses micro-organismos, e esclarecimento das relações existentes entre eles e a planta (AZEVEDO et al., 2007; PEIXOTO- NETO et al., 2002; QIN et al., 2011).

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 podem ser encontrados em ramos e raízes, sem ocasionar, aparentemente, quaisquer danos aos seus hospedeiros. Os endofíticos podem proporcionar 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. Distinguindo-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos, que vivem na superfície dos vegetais. (AZEVEDO et al., 2000; GUNATILAKA, 2006; ASSUMPÇÃO et al., 2009; FAETH et al., 2010; TRIGIANO, 2010; SANTOS;VARAVALLO, 2011; NAIR; PADMAVATHY, 2014).

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. Contudo, 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(WAGNER; LEWIS, 2000; PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.2.1 Colonização nos Vegetais

Os endofíticos, com exceção dos transmitidos pelas sementes (transmissão vertical) penetram primariamente através da zona radicular, embora também possam utilizar aberturas naturais como estômatos e hidatódios presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (transmissão horizontal) (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000; SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005; JOHRI, 2006).

Dentro da planta os endofíticos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular alojando-se intra e/ou intercelularmente (BACON; WHITE, 2000; ZINNIEL et al., 2002).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 (TAN; ZOU, 2001). Entre as enzimas destacam-se as pectinases, esterases, celulasas e lipases (PETRINI et al., 1992).

As raízes constituem a principal porta de entrada utilizada por esses micro-organismos. 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 (Figura 2). Sendo, portanto, encontrados colonizando folhas, ramos e raízes. Apesar de

alguns estarem presentes em sementes, e após a germinação, colonizando outros tecidos das plantas, como geralmente ocorre nas gramíneas (PEIXOTO NETO et al., 2002; STĘPNIEWSKA; KUŹNIAR, 2013).

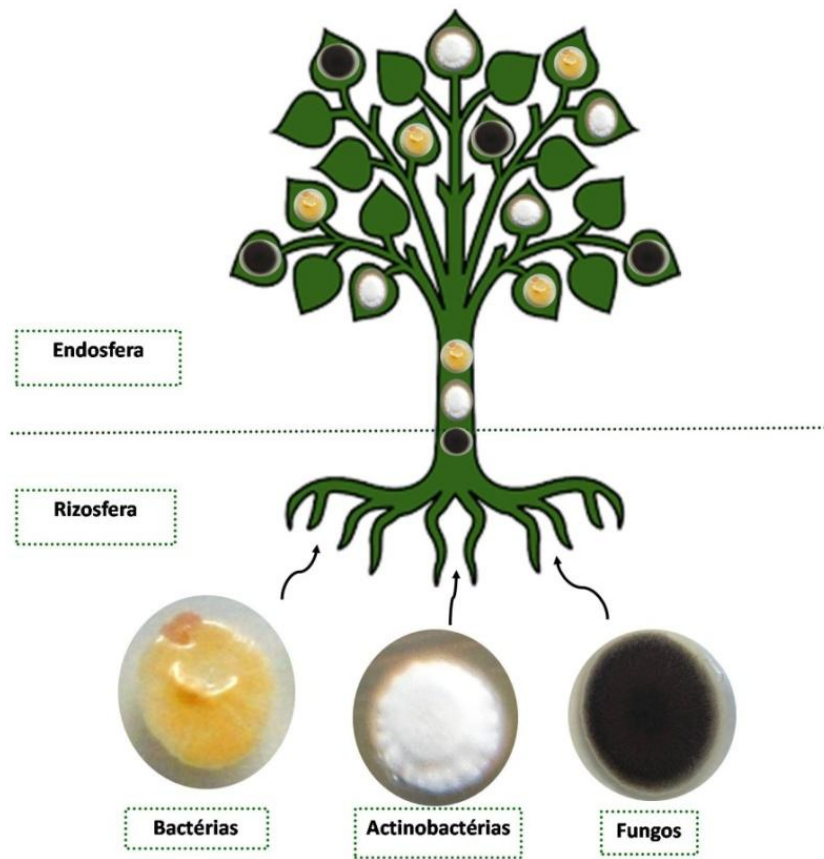


Figura 2: Representação esquemática da colonização de um vegetal por micro-organismos: bactérias e fungos.

2.2.2 Isolamento

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, 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).

Alguns parâmetros devem ser considerados para realizar o isolamento como: órgãos utilizados (localização na planta e época da coleta). Esses fatores influenciam no número e tipo de micro-organismos isolados. São necessárias várias coletas e repetições para distinguir os endofíticos verdadeiros daqueles que são epifíticos e contaminantes. É a recorrência de uma espécie de isolado que o caracteriza como um micro-organismo endofítico (ARAÚJO et al., 2005). 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, envolvidos no estudo, com etanol 70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% e novamente tratamento com etanol 70% ou água esterilizada e posteriormente, realiza-se a transferência dos fragmentos ou suspensões de células da parte vegetal para meios apropriados (Figura 3). Os tempos de tratamento e a própria concentração de hipoclorito de sódio podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado (ARAÚJO et al., 2002).

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 pequeno tempo. Porém, materiais mais adultos, provenientes do campo, devem ser tratados com concentrações maiores e por tempos mais prolongados (SMITH, 2000; SOUZA et al., 2006; CÂMARA, 2010).

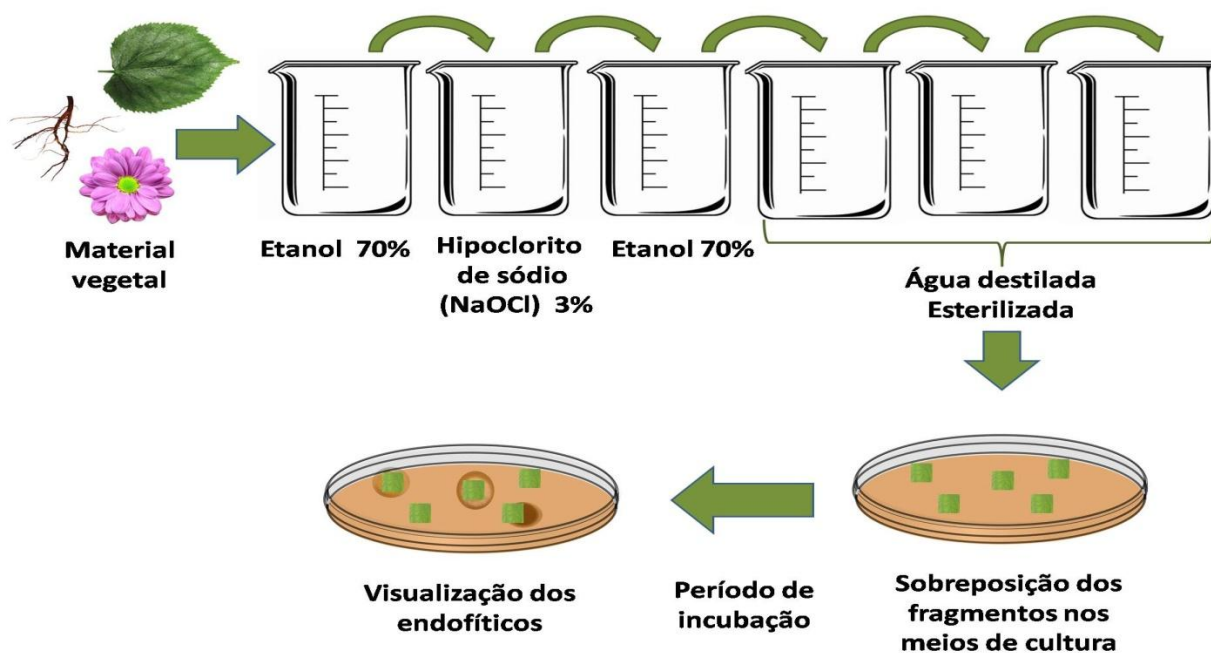


Figura 3: Esquemática da técnica de isolamento de micro-organismos endofíticos segundo Araujo et al., 2002.

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. É interessante salientar que alguns desses micro-organismos crescem inibidos 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). 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).

Outras técnicas de isolamento também tem sido utilizadas com o intuito de obter micro-organismos endofíticos, como no trabalho de Castro et al. (2011) no intuito de isolar bactérias endofíticas de *Cytisus striatus*, utilizaram para esterilização do material vegetal uma solução de NaClO suplementada com uma gota de Tween 80/100 ml, subsequentemente enxaguadas três vezes durante 1 min em água desionizada. Sendo o processo de esterilização superficial verificado por plaqueamento de aliquotas da terceira lavagem em meio de cultura, considerada bem sucedida caso não fosse observado crescimento após 7 dias de incubação. Bem como o estudo realizado por Huaidonget al.(2013) com o objetivo de isolar o endofítico *Rahnella* sp de *Polygonum pubescens*,

realizou o processo de esterilização com etanol a 75% durante 5 min e HgCl_2 a 0,1% c por 3 min, seguido por um enxágüe de cinco vezes com água destilada esterilizada.

2.2.3 Diversidade

Os micro-organismos são uma grande fonte de diversidade genética que necessitam de mais pesquisas (PROSSER et al., 2007). Acredita-se que das inúmeras plantas existentes no ecossistema mundial, cada indivíduo vegetal contenha um ou mais micro-organismos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; RYAN et al., 2008).

A ocorrência de endofíticos varia bastante de acordo com o clima da região onde se encontra o espécime vegetal. A maioria dos estudos descreve a microbiota de plantas isoladas de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (HASHIBA; NARISAWA, 2005).

O estudo realizado por Castro et al. (2011) permitiu o isolamento de endofíticos de folhas e raízes de *Cytisus striatus*, identificaram bactérias Gram-positivas pertencentes ao filo Proteobacteria (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*), bem como do filo Firmicutes (*Bacillus*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*) e do filo Actinobacteria (*Streptomyces*, *Leucobacter*, *Amiclatopsis*). O estudo de Aserse et al. (2013) obtiveram cinquenta e cinco isolados bacterianos de nódulos de *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp. E *Erythrina Brucei*, identificados em sua maioria como bactérias Gram-negativas pertencentes aos gêneros: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Variovorax*. Entretanto, sete isolados foram classificados como bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Planomicrobium*, e *Rhodococcus*.

Vários trabalhos estão sendo realizados no intuito de isolar e identificar fungos endofíticos de diversas espécies de plantas, como exemplo: o estudo realizado por Tan et al. (2012) relata o isolamento e identificação de 46 fungos a partir de raízes *Holcoglossum* (*Orchidaceae*) no sudoeste da China. Como resultados os autores descreveram que as amostras pertenciam a quatro classes, *Sordariomycetes* (41,30%), *Dothideomycetes* (36,96%), *Agaricomycetes* (17,39%), *Leotiomycetes* (4,35%). Trinta e seis espécies foram identificadas em nível de gênero, incluindo *Alternaria*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Colletotrichum*, *Cosmospora*, *Cryptosporiopsis*, *Cylindrocarpon*, *Didymella*, *Epulorhiza* (Anamórfico *tulasnella*), *Fusarium*, *Myrmecridium*, *Leptosphaeria*, *Paraconiothyrium* e *Phomopsis*.

Em seu estudo Mussi-Dias et al. (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*. Dentro desse contexto o experimento de Nascimento et al. (2015) verificaram a presença de fungos endofíticos de folhas em diferentes estágios de maturação de *Calotropis procera*, obtendo um total de 156 isolados de fungos. Esta pesquisa permitiu verificar que a taxa de colonização dos endofíticos aumentou com a idade da folha em desenvolvimento, sendo as espécies predominantes: *Phaeoramularia calotropidis*, *Guignardia bidwelli*, *Curvularia pallescens*.

As actinobactérias especialmente o gênero *Streptomyces* ocorrem em sua maioria no solo, mas vários estudos mostram a ocorrência destas bactérias como endofítico de plantas superiores (CASTILLO et al., 2002). No trabalho realizado por Rao; Rakshith; Satish(2015), actinobactérias endofíticas foram isoladas em um total de 117 cepas provenientes de *Combretum latifolium* (*Combretaceae*), representando nove gêneros diferentes de actinobactérias dentre eles: *Streptomyces* (35%), *Nocardiopsis* (17%) e *Micromonospora* (13%). No trabalho realizado por Tanvir et al., (2014) foram isoladas actinobactérias endofíticas de *Parthenium hysterophoru* (42), *Ageratum conyzoides* (45), *Sonchus oleraceus* (90), *Sonchus asper* (3) e *Hieracium canadense* (2). A maioria dos isolados foi obtido a partir das raízes (n = 127, 69,7%), sendo o gênero dominante *Streptomyces* (n = 96, 52,7%), enquanto *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Nocardia* e *Micromonospora* também foram isolados em menor frequência.

O conhecimento a respeito da extensão e caráter da diversidade microbiana é restrito, uma vez que as técnicas de isolamento permitem apenas a obtenção dos micro-organismos cultiváveis. Acredita-se que mais de 99% dos micro-organismos presentes na natureza não são cultiváveis utilizando-se técnicas convencionais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; 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 (PEIXOTO-NETO et al., 2004; LACAVA et al., 2006; RYAN et al., 2008).

2.2.4 Importância Biotecnológica

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 área farmacêutica e de defensivos agrícolas. A produção e obtenção 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 (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008; VISALAKCHI; MUTHUMARY, 2010; SANTOS; VARAVALLO, 2011; ZANARDI et al., 2012).

Bactérias endofíticas que estabelecem associações benéficas com as plantas desempenham papel fundamental na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal, quer seja em ecossistemas naturais ou manejados. Muitos destes procariotos derivam da camada superficial do solo e podem ser empregados em ensaios de promoção de crescimento vegetal (PCV) para melhoria da produção agrícola (COMPANT et al., 2010). Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, as bactérias endofíticas apresentam grande potencial para o controle biológico. Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos: competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; produção de compostos antimicrobianos (TAECHOWISAN et al. 2003); indução de resistência sistêmica (LODEWYCKX et al. 2002) ou produzindo enzimas (quitinases ou celulases) que degradam a parede celular de fungos patogênicos (EL-TARABILY, 2003).

Fungos endofíticos têm recebido grande interesse na última década como uma fonte de produtos naturais biologicamente ativos e estruturalmente diversa. Pesquisas anteriores têm revelado que a maioria dos produtos naturais isolados a partir de micro-organismos endofíticos possuem atividades antimicrobianas, e podem ser implicados em proteger a planta hospedeira contra micro-organismos fitopatogênicos (ORTEGA et al., 2014).

As actinobactérias compreendem um grupo de bactérias filamentosas saprófitas amplamente difundidas na natureza que desempenham um papel significativo na decomposição de matéria orgânica em nutrientes mais facilmente assimiláveis e na reciclagem do carbono e nitrogênio. São produtores de uma vasta gama de metabólitos secundários, muitos dos quais têm aplicações úteis em medicina humana e veterinária e agricultura. Diversas estirpes de actinobactérias estão sendo isoladas a partir de vários substratos recolhidos em todo o mundo e têm demonstrado a sua extraordinária capacidade biossintética em cultura (KURTBOKE, 2011). Actinobactérias endofíticas,

que podem ser recuperadas a partir de tecidos saudáveis da planta após desinfecção de superfície, são conhecidos para produzir uma variedade de metabolitos bioativos como: antibióticos, enzimas e promotores de crescimento das plantas. No entanto, informações sobre a biodiversidade, distribuição nos tecidos vegetais e potencial biossintético de actinobactérias endofíticas de plantas selvagens e nativas são escassas (CHAUDHARY et al., 2013).

2.2.4.1 Micro-organismos Endofíticos na Agricultura

Micro-organismos endofíticos podem atuar induzindo ou como mediadores de 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, essas substâncias atuam sinergicamente com os outros compostos vegetais na redução do potencial hídrico das células, ajudando na tolerância à seca (DIMKPA et al., 2009; GROVER et al., 2011).

A maioria dos estudos sobre endofíticos estão concentrados em vegetais aplicados na agricultura, uma vez que estes estabelecem associações benéficas com as plantas através do aumento da absorção de nutrientes minerais e água, desempenhando papel fundamental na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal (BOIERO et al., 2007; BARRETTI et al., 2008; DIMKPA et al., 2009). Desta forma bactérias endofíticas como: *Enterobacter* sp e *Burkholderia* sp. desempenham papel fundamental na manutenção e/ou incremento do crescimento vegetal, visando o aumento da produtividade (MELNICK et al., 2011). Com o objetivo de biocontrole de fitopatogenos tem se utilizado endósporos de bactérias endofíticas e fungos do gênero *Curvularia* (HANADA et al., 2010). Outra forma proposta, tem sido a fitoremediação com bactérias endofíticas *Enterobacter* sp e *Burkholderia* sp., poderiam diminuir fitotoxicidade de compostos orgânicos voláteis e permitir o crescimento de plantas em solo poluído (AFZAL et al., 2014). Bem como o isolamento de bactérias filamentosas (actinobactérias) como *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea* and *Amycolatopsis* e fungos *Aspergillus* e *Penicillium* para produção de compostos bioativos (NASCIMENTO et al., 2015). Esses trabalhos reforçam a importância do isolamento de endofíticos.

As bactérias endofíticas dos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, entre outras têm sido frequentemente descritas como promotoras do crescimento vegetal. Como no estudo de Rogers et al. (2011) ao investigaram o efeito da inoculação de estacas de madeira dura de

Populus deltoides Bartr. x *Populus nigra* L. OP367 (Choupo ou Álamo) com endofítico *Enterobacter* sp. 638 verificaram que as plantas inoculadas com o endofítico apresentavam 55% mais biomassa total que as controle, aumentando desta forma significativamente a produtividade em Choupo ou Álamo que é matéria-prima usada para biocombustíveis.

Os fungos endofíticos também podem promover esse desenvolvimento vegetal, como a espécie bastante estudada *Piriformospora indica*, um basidiomiceto que coloniza de forma endofítica raízes de inúmeros vegetais (PEIXOTO- NETO et al., 2002). Dentre os endofíticos, as actinobactérias endofíticas podem representar um importante agente 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. Desta forma, as actinobactérias endofíticas são considerados como bio-inoculantes para melhorar o desempenho das culturas através da agricultura orgânica, além da associação dos endofíticos com as plantas permitem a descoberta de novos metabolitos com estruturas químicas de importância biotecnológicas (GARCIA; KNAACK; FIUZA, 2015).

Corroborando com essa teoria o trabalho de Soares et al.(2010) demonstrou o efeito da inoculação e incubação de solo com seis isolados de actinobactérias, no crescimento inicial de mudas de tomateiro, em comparação com o controle solo não inoculado. O solo foi inoculado com actinobactérias e incubado por 20 dias, antes do plantio. Após 30 dias, as mudas foram coletadas para determinação da altura, diâmetro do caule, massa seca da parte aérea e raízes e acúmulo de nutrientes na parte aérea. Os isolados de actinobactérias promoveram incrementos significativos no crescimento e acúmulo de nutrientes, nas mudas de tomateiro. Confirmando-se que a incubação do solo, por 35 dias, antes do plantio, garante o tempo necessário para que as actinobactérias atuem na mineralização da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes para o crescimento das plantas.

2.2.4.2 Micro-organismos Endofíticos como Agentes de Controle Biológico

A diversidade da microbiota residente, associada as relações benéficas com o vegetal apresentam-se como importantes ferramentas na utilização dos endofíticos aplicados no controle biológico (LANNA- FILHO et al., 2010). Os micro-organismos endofíticos são potenciais agentes 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; MARIANO et al., 2004; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Os primeiros micro-organismos a serem utilizados no controle biológico foram os fungos (AZEVEDO et al., 2000). Como na pesquisa de Hanada et al. (2010) foram explorados endofíticos de plantas para promover proteção da planta. Com esse intuito, os autores avaliaram a diversidade de fungos endofíticos cultiváveis de caules e ramos de *Theobroma cacao* (cacau) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) aplicando em experimentos de campo para avaliar seu potencial como agentes de controle biológico contra *Phytophthora palmivora*. Os resultados indicaram que 70% dos isolados mostraram efeitos de biocontrole, o que sugere que a biodiversidade de fungos endófitos cultivável neste sistema é de um tipo principalmente mutualístico de interação com o hospedeiro. Oito isolados dos gêneros *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia*, *Tolypocladium* e *Fusarium* demonstraram alto nível de atividade contra o agente patogênico.

Entretanto, muitas bactérias estão sendo estudadas com o enfoque de controle biológico. A espécie bacteriana mais utilizada como antagonista a patógenos é *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2001). Além dessa, actinobactérias endofíticas estão sendo testadas como na pesquisa de GOUDJAL et al. (2014), que isolaram trinta e quatro actinobactérias das raízes de plantas, em sua maioria pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Todos os isolados foram testados quanto à sua atividade antifúngica *in vitro* frente à *Rhizoctonia solani*, exibindo resultados satisfatórios no controle deste fitopatógeno.

2.2.4.3 Micro-organismos Endofíticos: Produtores Enzimáticos

Micro-organismos ou suas enzimas são usados em uma variedade de atividades biotecnológicas tais como: hidrólise de polímeros, síntese de compostos, descontaminação de solos, entre outras. Entre as atividades, o melhoramento dos processos industriais usando as enzimas produzidas por micro-organismos é um importante campo na pesquisa, pois apresenta uma série de vantagens, como: facilidade de produção em larga escala, custo de produção relativamente baixo e susceptibilidade de manipulação genética (CUZZI et al, 2011).

As enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, de detergentes, têxteis e cosméticas. As propriedades hidrolíticas de enzimas como proteases, amilases e lipases podem favorecer o desenvolvimento das tecnologias de produção de combustíveis líquidos (álcool, biodiesel), solventes, plásticos biodegradáveis, bem como produtos refinados como: corantes, defensivos agrícolas, sabores, fragrâncias e produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário, a partir de matérias primas renováveis, processos menos agressivos, economicamente viáveis e ecologicamente aceitáveis (BORNSCHEUER, 2002).

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

Actinobactérias endofíticas são frequentemente investigadas devido ao seu potencial biotecnológico. Entre as várias enzimas de importância industrial destacam-se: amilases, celulasas, esterases, lipases, pectinases e proteases. A ocorrência de amilases em actinobactérias é uma característica comumente observada em *Nocardia* e *Streptomyces*. Entre outros micro-organismos produtores de amilases, o gênero *Bacillus* apresenta capacidade de produzir esta enzima em temperaturas que podem variar de 55°C a 80°C (COTARLET et al, 2009). Os gêneros que apresentam atividade celulolítica dentre os actinobactérias são *Microbispora*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces* e *Thermomonospora*, incluindo actinobactérias mesofílicas e termofílicas. As celulasas produzidas por *Streptomyces* sp. apresentam uma ótima atividade em temperaturas que variam de 50°C a 55°C, sendo estáveis em uma ampla faixa de pH (MUSSATTO et al., 2010). Economicamente as enzimas industriais mais importantes são produzidas por bactérias (*Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp.) fungos (*Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Saccharomyces* sp.) e actinobactérias (*Streptomyces* sp.) (KUMAR, 2012).

2.2.4.4 Micro-organismos Endofíticos: Produtores de Fármacos

O interesse a respeito do potencial farmacológico presente nos micro-organismos endofíticos foi intensificado depois da comprovação que fungos endofíticos podiam produzir os mesmos compostos ativos que a planta hospedeira. Como o caso do taxol que também era produzido pelo fungo endofítico, *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*. Sendo esse composto um antitumoral de alto valor agregado no mercado internacional (STROBEL; DAISY, 2003; TURGEON; BUSHLEY, 2010). Seguindo esse raciocínio Zhao et al. (2012)

comprovaram a produção do ácido cajaninstilbene (CSA) de guandu (*Cajanus cajan* L. Mill) a partir de fungos endofíticos desta planta como: *Fusarium solani* (ERP-07), *Fusarium oxysporum* (ERP-10), e *Fusarium proliferatum* (ERP-13). 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).

Outra fonte de promissora de metabolitos oriundos de actinobactérias tem sido descoberta a partir de micro-organismos endofíticos. Complementando essas informações, o estudo de Conti et al. (2016) utilizando uma actinobactéria endofítica de *Lychnophora ericoides* avaliaram o potencial biotecnológico de extratos oriundo dessa bactéria filamentosa através de ensaios anti-microbianos e citotóxicos frente a quatro linhagens celulares de cancer. Como resultado um percentual de 92% dos extratos mostraram atividade elevada ou moderada contra, pelo menos, um tipo de células cancerígenas ou agentes microbianos patogênicos. Além de realizarem uma investigação mais aprofundada dos perfis químicos desses extratos, na qual isolaram 16 compostos, dos quais o 2,3-dihidro-2,2-dimetil-4 (1H)-quinazolinona demonstrou atividade citotóxica potente contra todas as quatro linhas celulares tumorais testadas.

Vários são os compostos bioativos produzidos industrialmente pelas actinobactérias, os antibacterianos, como as penicilinas, as cefalosporinas e diversos macrolídeos; os agentes antifúngicos, como a anfotericina B e nistatina; os imunossupressores, como FK-506, rapamicina e 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 et al., 2000).

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 fármacos antibacterianos e antifúngicos por bactérias e fungos endofíticos, principalmente em países de grande biodiversidade de fauna, contribui para que pesquisas relacionadas a compostos bioativos adquirissem importância e relevância para a indústria farmacológica, visto a possibilidade de descoberta de novos compostos que poderão combater doenças (RODRIGUES et al., 2000).

2.3 Metabólitos Secundários

Os metabólitos associados com o processo vital da célula são denominados como primários. Contudo, existem nos organismos diversas substâncias às quais não podem ser atribuídos um papel bioquímico em tais vias primárias (FREIRE et al., 2014). Estas substâncias são heterogêneas na sua estrutura e distribuição estando limitada a poucos compostos e aparecendo apenas em alguns organismos, sendo denominados como metabólitos secundários (NIHORIMBERE, et al. 2011).

Metabólitos secundários são um grupo extremamente variado de produtos naturais sintetizados por plantas, fungos, bactérias não filamentosas, actinobactérias e animais que apresentam várias características comuns que promovem a integração com o metabolismo primário nos níveis celular e molecular (ROZE et al., 2011). Nos micro-organismos podem ser visto como a produção de compostos que aparentemente não exercem uma função para o organismo, uma vez que este sobrevive mesmo sem a sua formação. Embora quando o resultado é um produto que favorece a sobrevivência, este mecanismo é incorporado às reações primárias, como os pigmentos, que protegem contra os danos da luz ultravioleta e são importantes fatores de virulência (KEMPKEN; ROHLFS, 2010).

Ainda não está totalmente esclarecida a forma como ocorre esta biossíntese de metabólitos secundários, mas supostamente trata-se de um tipo de metabolismo alternativo como forma de defesa do organismo a um ambiente hostil, de caráter evolutivo e como estratégia de sobrevivência. Uma hipótese que explicaria a produção de antibióticos pelas actinobactérias seria que este mecanismo inibe o crescimento de outros organismos por competição pelos nutrientes limitados em determinado ambiente. Este fato permitiria as actinobactérias completarem o processo de esporulação, formando uma estrutura dormente com maiores chances de sobrevivência (MADIGAN, 2010).

Alguns produtos do metabolismo secundário, como os antibióticos, são capazes de impedir o desenvolvimento de outros micro-organismos mesmo em pequenas concentrações. Estima-se que o grupo das actinobactérias seja responsável pela produção de cerca de 4.600 antibióticos já conhecidos, superando a produção de antibióticos por fungos e outras bactérias. As vias biossintéticas de produção dos antibióticos foram evoluindo nas actinobactérias por cerca de um bilhão de anos (BALTZ, 2007). As actinobactérias produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, cujo interesse por esses compostos justifica-se pela grande variedade de atividade biológica, podendo ser empregados como antimicrobianos, antitumorais, antiparasitários, inibidores de enzimas e pigmentos, entre outras aplicações (KURTBOKE, 2011).

Outra fonte de metabólitos bioativos tem sido descoberta através do isolamento de micro-organismos endofíticos, uma vez que a biodiversidade de plantas com propriedades medicinais conhecidas e outras tantas das quais se desconhece os efeitos terapêuticos, abrigam um grande número de micro-organismos com potencial para produzir substâncias bioativas, indicando que pesquisas envolvendo o isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos, constituem uma fonte inesgotável de novos compostos bioativos (BELOQUI et al., 2008; SANTOS et al., 2011).

A produção de metabólitos secundários pelos micro-organismos endofíticos são 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 endófito, que para se adaptar a essa nova condição, pode produzir compostos que irão favorecer o processo de produção dos compostos bioativos (AZEVEDO et al., 2002). Por isso os metabólitos 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 (CLARDY et al., 2006; PRASHITH; SHOBHA; ONKARAPPA, 2010).

2.3.1 Metabólitos Secundários: Produção Microbiana

Estima-se que mais de 22.000 compostos bioativos desenvolvidos a partir de metabólitos secundários de micro-organismos foram descritos desde a primeira década desse milênio. Entre eles estavam incluídos antibióticos produzidos, por actinobactérias (cloranfenicol-*Spreptomyces venezuelae*, neomicina-*Spreptomyces fradiae*, vancomicina-*Streptomyces orientalis*) fungos (cefalosporina naturais-*Cephalosporium acremonium*, penicilinas naturais-*Penicillium notatum*); e bactérias unicelulares (bacitracina-*Bacillus licheniformis*, mupirocina-*Pseudomonas fluorescens*, polimixinas-*Bacillus polymyxa* + *Bacillus colistinus*) (BERDY, 2005; GUNATILAKA, 2006; DEMAINE; 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 (BIBB, 2005). Além dos antibióticos produzidos industrialmente, vários compostos comercializados, como agentes imunossupressores, quimioterápicos, herbicidas e vermífugos, entre outras substâncias farmacologicamente ativas, são

produzidos por actinobactérias (KIESER et al., 2007; CRUZ et al., 2015). Estudos recentes demonstraram o potencial de um grande número de actinobactérias endofíticas de produzirem diversos compostos biologicamente ativos com atividades farmacológicas distintas.

Outros compostos bioativos foram obtidos de actinobactérias endofíticas, como as anguciclinas, com atividade antimicrobiana frente *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (MARUNA et al., 2010); os compostos ativos irumamicina, X-14952b e 17-hidroxi-venturicidina A extraídos de *Streptomyces* sp. (FGUIRA et al., 2005); A kakadumicina, um antibiótico de amplo espectro e com ação também sobre o *Plasmodium falciparum* foi 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*, possui 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*), contudo a melhor atividade foi observada contra *Plasmodium falciparum* (CASTILLO et al., 2002).

As bactérias endofíticas também apresentam um papel importante na produção de metabólitos secundários de uso relevante. Tendo um enfoque na fitorremediação assistida por micro-organismos como uma medida promissora para solos poluídos por metais pesados. O estudo realizado por He et al. (2013) verificaram a tolerância à metais pesados da bactéria endofítica *Rahnella* sp. JN6 isolada de raízes de *Polygonum pubescens* (Mn-hiperacumuladora) crescida solo contaminado com esse metal. Esta bactéria mostrou uma tolerância muito elevada aos metais: Cd, Pb e Zn, além de produzir substâncias promotoras do crescimento de plantas tais como ácido indol-3-acético, sideróforo (peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade por ferro), 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase e também fosfato inorgânico.

Os fungos filamentosos também são produtores de uma ampla variedade de produtos naturais, em muitos casos os benefícios que estes compostos conferem são ainda desconhecidos (IGARASHI, et al., 2004). Fungos endofíticos também estão sendo uma fonte promissora de diversos compostos, como por exemplo: o isolamento de um macrolídeo poli-hidroxilado, denominado mangiferaelactona dentre outros compostos isolados a partir de uma cultura sólida de *Pestalotiopsis manguiifera*, fungo endofítico de *Hyptis dilatata*, este macrolídeo apresentou atividade antimicrobiana acentuada frente *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (ORTEGA et al., 2014). Da mesma forma, Adelinet al. (2011) isolaram oito compostos a partir do caldo de cultivo do fungo

endofítico *Phomopsis* sp., bem como descreveram um macrolídeo bicíclico denominado benquinol que exibe atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e citotoxicidade frente a linhagem celular cancerígena HCT-116. Outra utilização para os fungos endofíticos tal quais as bactérias tem sido na área de biorremediação, como no trabalho de Chenet al.(2013) no qual utilizaram o fungo endofítico *Phomopsis liquidambari* isolado de *Bischofia polycarpamde* com o intuito de degradar o poluente ambiental (indol). Os resultados deste trabalho verificaram a degradação do composto em estudo e indicam uma possível aplicação deste fungo na biorremediação de ambiente contaminado com indol.

2.3.2 Metabólitos Secundários de Micro-organismos Endofíticos

2.3.2.1 Aplicações

Os metabólitos secundários possuem elevada importância para a farmacologia e biotecnologia, devido a sua diversidade e complexidade estrutural, visto que podem ser utilizados como modelos na síntese e semi-síntese de moléculas com atividade biológica de amplo espectro e com baixa toxicidade (KNIGHT et al., 2003; ORTHOLAND; GANESAN, 2004; KOEHN; CARTER, 2005; GULLO et al., 2006).

Desde a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, surgiram vários fármacos importantes, originários de metabólitos secundários de micro-organismos principalmente de actinobactérias, incluindo os antibióticos antibacterianos: cefalosporinas, ácido clavulânico, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, carbapeninas e monobactamas, tetraciclina, lincosaminas, estreptograminas, macrolídeos e peptídios cíclicos e estreptograminas (PUPO et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2009; CRUZ et al., 2015). Os antitumorais: antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina, daunomicina e mitramicina (KLIESLICH, 1986; PUPO et al., 2006), agentes hipoclorestolêmicos (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A, rapamicina, tacrolimus e ácido micofenólico), anti-inflamatório (ascomicina), hemolíticos e vasodilatadores (NEWMAN et al., 2000; MANN, 2002; KOEHN; CARTER, 2005; NICOLAOU et al., 2009; CRUZ et al., 2015).

Na relação íntima existente entre o micro-organismo endofítico e a planta hospedeira pode ocorrer produção de enzimas extracelulares que podem ser purificadas com diferentes aplicações nas indústrias, como as proteases, lipases e amilases (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). Os *Streptomyces* destacam-se entre as actinobactérias endofíticas pela capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas com aplicação industrial como as oxidoreduases, transferases,

hidrolases, liases, isomerases e sintases. No meio ambiente eles desempenham uma função importante na formação do húmus pela produção de enzimas extracelulares usadas na degradação de compostos celulolíticos (PADILHA, 1998).

2.3.2.2 Atividade Antimicrobiana

Os antibióticos são compostos químicos específicos produzidos por organismos vivos capazes de inibir em baixas concentrações os processos vitais de uma ou mais espécies de micro-organismos. São importantes para a medicina terapêutica, desempenhando funções antimicrobianas, antifúngicas, antitumorais, imunossupressoras e na agricultura através dos herbicidas (OUHDOUCH et al., 2001). Estes podem ter ação bactericida, matando os micro-organismos de forma direta, atuando em reações vitais para a célula infectante, ou apenas inibir o crescimento bacteriano por meio de uma ação bacteriostática, mantendo as bactérias em fase estacionária (HARDMAN; LIMBIRD, 2012).

Entre os maiores produtores de antibióticos estão os fungos e as actinobactérias. As actinobactérias constituem a maior fonte de antibióticos, sendo que cerca de dois terços dos antibióticos são sintetizados por estes micro-organismos (PANKEY; SABATH, 2013). Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* responde por cerca de 93% dos metabólitos secundários conhecidos. Os antibióticos produzidos por actinobactérias apresentam grande variedade de estruturas químicas, incluindo aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β -lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliéteres e tetraciclinas, dentre os quais podemos destacar cloranfenicol, eritromicina, neomicina, novobiocina, estreptomicina, tetraciclina, e gentamicina (MOHANDASA et al., 2013).

O decréscimo da eficácia de drogas outrora muito potentes, com o reaparecimento de micro-organismos resistentes a todos os fármacos disponíveis estão aumentando o risco de regressão à era pré-antibiótica, em que muitas pessoas morriam por infecções não tratáveis (DIAS; MONTEIRO, 2010). Neste sentido, a seleção de espécies microbianas é um aspecto importante uma vez que não existe uma fonte notável para a produção de metabólitos secundários estruturalmente diversos que apresentam atividade biológica de relevância farmacêutica, uma vez que os problemas de resistência, sensibilidade do paciente e a incapacidade de controlar certas doenças infecciosas tem dado um impulso para a busca contínua de novos antibióticos em todo o mundo (ARASU, 2009).

Referencias

- ACHENBACH, H.; STÖCKER, M.; CONSTENLA, A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. **Phytochemistry**, v.27, n.6, p.1835-1841, 1988.
- ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; MARTIN, M. T.; RETAILLEAU, P.; GOFF, G.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUAZZANI, J. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, v. 72, n.18, p.2406–2412, 2011.
- AFZAL, M.; KHAN, Q. M.; SESSITSCH, A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. **Chemosphere**, v.117 p.232–242, 2014.
- AKHTAR, A. H.; AHMAD, K. U. Anti-ulcerogenic evaluation of the methanolic extracts of some indigenous medicinal plants of Pakistan in aspirin-ulcerated rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.46. p.1-6, 1995.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, n.1, p.143-69, 1995.
- ANDRADE, C. A. S.; BASZKIN, A. ; MAGALHÃES, N. S. S.; COELHO, L. C. B. B.; MELO, C. P. Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and *Concanavalin A* lectin monolayers, part I. Journal of Colloid and Interface Science, Elsevier Academic Press, v.15, p. 371-378, 2005.
- 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.
- ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCONI, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de micro-organismos endofíticos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, p 85, 2005.
- ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 4906-4914, 2002.
- ARGÔLO, A. C. C.; MALTA, G. S. A. A.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 229-233, 2004.
- ARASU, M. V.; DURAI PANDIYAN, V.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). **Journal de Mycologie Médicale**, v. 19, p. 22-28, 2009.
- ASERSE, A. A.; RÄSÄNEN, L. A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p.10117–10134, 2013.

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.

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.; JÚNIOR, W. M.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: Serafini LA, Barros NM, Azevedo JL, editors. *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. 1st ed. Caxias do Sul: EDUCS: 2002, p. 235-268.

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.

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.

BADAMI, R. C.; DAULATABAD, C. D. Component acids of *Bauhinia* seed oils. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.20, n.2. p.99-100, 1969.

BALTZ, H.R. Antimicrobials from *Actinomycetes*: Back to the future. **Microbe**. v. 2, p. 125-131, 2007.

BANDARA, W. M. M. S; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v.31, n.5, p. 645-650, 2006.

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 Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.731-739, 2008.

BARY, A. **Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten**. Vol. 2. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany: Leipzig, 1866.

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

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

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 208-215, 2005.

BIEBER, B. et al. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 381-382, 1998.

BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V.; Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p. 874 - 880, 2007.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BORUWA, J. et al. Synthesis, absolute stereochemistry and molecular design of the new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3571-3574, 2004.

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, cap. 5, p. 221-260. Brasília 2010.

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.; YAVAR, D. Mununbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v.148, n.1, p.2675-2685, 2002.

CASTRO, C. B.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; WEYENS, N.; ACEA, M. J.; VANGRONSVELD, J. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterisation. **Planta Soil**, v.340. n.2, p.413-433, 2011.

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. et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, v. 148, p.2675-2685, 2002.

CHAUDHARY, H. S.; YADAV, J.; SHRIVASTAVA, A. R.; SINGH, S.; SINGH, A. L. K.; GOPALAN, N. Antibacterial activity of *actinomycetes* isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 4, p. 118-123, 2013.

CHEN, Y.; XIE, X. G.; REN, C. G.; DAI, C. C. Degradation of N-heterocyclic indole by a novel endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. **Bioresource Technology**, v.129, n.2, p.568-574, 2013.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v.24, n.12, p.1541 - 1550, 2006.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

COMPANT, S.; VAN DER HEIJDEN, M. G.; SESSITSCH, A. Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. **FEMS Microbiology Ecology**, v.73, n.2, p.197-214, 2010.

CONTI, R.; CHAGAS, F. O.; CARABALLO-RODRIGUEZ, A. M.; MELO, W. G. P.; NASCIMENTO, A. M.; CAVALCANTI, B. C.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Endophytic Actinobacteria from the Brazilian Medicinal Plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the Biological Potential of Their Secondary Metabolites. **Chemistry & Biodiversity**, v.13, n.6, p.727-736, 2016.

- 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. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília 2010. v.1, cap.1, p. 17-89, 2010.
- COTARLET, M.; NEGOITA, T.; BAHRIM, G.; STOUGAARD, P. Cold Adapted amylase and protease from new *Streptomyces* alga Antarctic Strain. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 5, p. 23-30, 2009.
- 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.
- CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Global Science and Technology**, v. 4, p.47-57, 2011.
- DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J.; Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability. **New Phytologist, Houston**, v.188, p.24-834, 2010.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v.62, p.5-16, 2009.
- DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Clínica Farmacológica**. Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, investigação e inovação. 2010.
- DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, v.32, p.1682–1694, 2009.
- EL-TARABILY, K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.257-266, 2003.
- ENGLER, A. Syllabus der pflanzenfamiliem. Berlin: Gebrüder Borntraeger, v.2, p.49, 1964.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUSC, 2004. 510p.
- 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.
- FERNANDES, A. J.D.; FERREIRA, M. R. A.; RANDAU, K. P.; SOUZA, T. P.; SOARES, L. A. L. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). **The Scientific World Journal**, v.1, p 1-7, 2012.
- 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.

- 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.
- 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 Sobral**, vol. 16, nº 1, p. 61-102, 2014.
- 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.
- GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Endophytic bacteria as biological control agents in rice fields. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, 1-9, 2015.
- GOUDJAL, Y.; TOUMATIA, O.; YEKKOUR, A.; SABAOU, N.; MATHIEU, F.; ZITOUNI, A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. **Microbiological Research**, v.169, n.1, p.59– 65, 2014.
- 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.
- GULLO, V. P.; MCALPINE, J.; LAM, K.S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.33, n.7, p.523-531, 2006.
- 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.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v.69, n.3, p.509-526, 2006.
- GUTIERREZ, R. M. P., GONZALEZ, A. M. N.; RAMIREZ, A. M. Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.2992-3030, 2012.
- HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v. 11, n. 4, p.901-910, 2010.
- HASHIBA, T.; NARISAWA, K. The development and endophytic nature of the fungus *Heteroconium chaetospora*. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, n.2, p.191-196, 2005.
- HAYAKAWA, Y. et al. 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.
- HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ed. McGrawHill, 2012.

- HE, H.; YE, Z.; YANG, D.; YAN, J.; XIAO, L.; ZHONG, T.; YUAN, M.; CAI, X.; FANG, Z.; JING, Y. Characterization of endophytic *Rahnellasp.* JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. **Chemosphere**, v.90, n.6, p.1960–1965, 2013.
- HUAIDONG, H.; ZHIHONG, Y.; DANJING, Y.; JUNLAN, Y.; LI, X.; TING, Z.; MING, Y.; XINDE, C.; ZHANQIANG, F.; YUANXIAO, J. Characterization of endophytic *Rahnellasp.* JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. **Chemosphere**, v.90, n. 3, p.1960–1965, 2013.
- IGARASHI, Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes. **Actinomycetologia**, v.18, p.63-66, 2004.
- ILKIU-BORGES, F.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Bauhinia monandra* Kurz. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p.168-174, 2009.
- JOHRI, B.N. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science**, v.90, n.10, p.1315-1316, 2006.
- KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis a chemical defense strategy against antagonistic animals.**Fungal Ecology**, v.3, p. 107-114, 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.; SANGLIER, 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.
- KIESER, T.; BIBB, M. J.; BUTTNER, M. J.; CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. **Practical Streptomyces Genetics**. 2nd.edn The John Innes Foundation: Norwich, 2000.
- KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. **Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture**. In: Bacon, C.W.; White Jr, J.F. (Ed.) Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker, 199-233p, 2000.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T.The envolving role of natural products in drug discovery.**Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-220, 2005.
- KUMAR, K. S.; HARITHA, R.; SWATHI, A.; SIRISHA, B.; RAMANA, T. Taxonomy and Antimicrobial Activity of *Streptomyces coeruleorubidus* sp. Isolated from Marine Sediment. **Research Journal of Microbiology**, v. 7, p. 171-181, 2012.
- KURTBOKE, D. I.Exploitation of phage battery in the search for bioactive actinomycetes.**Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p.931–937, 2011.
- 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.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*.**Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.4, n.2, p.12-20, 2010.

LEMUS, I.; GARCIA, R.; DELVILLAR, E.; KNOP, G. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. **Phytotherapy Research**, v.12, n.2, p.91-94, 1999.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Kew Botanic Gardens**, p.369, 1987.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 21, p.582-606, 2002.

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.717-24, 2009.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G.M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagastakuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotessubfasciatus* and *Callosobruchusmaculatus* (Coleoptera: Bruchidae): **Comparative Biochemistry and Physiology- Part A. Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n.00, p. 486-498, 2007.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p.1160,2010.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically activepolyketides 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.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.de.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**, Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1995. p. 220.

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.

MELNICK, R. L.; SUÁREZ, C.; BAILEY, B. A.; BACKMAN, P. A. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. **Biological Control**, v.57, p.236–245, 2011.

MENEZES, F. S. et al., Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 8-13, 2007.

MOHANDASA, S.; POOVARASANA, S.; PANNEERSELVAMA, P.; SARITHAA, B.; UPRETIA, K.K.; KAMALA,R.; SITA, T. Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus*

mosseae spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes. **Scientia Horticulturae**, v.150, p. 371–376, 2013.

MUSSATO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. Technological, trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817-830, 2010.

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 Medicinais de Botucatu**, v.14, n.2, p.261-266, 2012.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. **The Scientific World Journal**, v.1, p. 1-11, 2014.

NASCIMENTO, T. L.; OKI, Y.; LIMA, D. M. M.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; FERNANDES, G. W.; SOUZA-MOTTA, C. M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal ecology**, v. 14, p.79 - 86, 2015.

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.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v.17, p.215-234, 2000.

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

NIHORIMBERE, V.; ONGENA, M.; SMARGIASSI, M.; THONART, P.; Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.15, p.327-337, 2011.

ORTEGA, H. E. A. B.; SHEN, Y. Y. C. K.; TENDYKE, A. C.; RÍOS, N. D.; CUBILLA-RÍOS, L. Polyhydroxylated macrolide isolated from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 2642–2645, 2014.

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

OUHDOUCH, Y.; BARAKATE, M.; FINANCE, C. Actinomycete of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. **European Journal of Soil Biology**, v. 37, p. 69-74, 2001.

PADILHA, G. Biologia Molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. Em Melo, I. S. e Azevedo, J. L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa, Jaguariúna, p.327- 347, 1998.

PANKEY, G., SABATH, L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. **Oxford Journals**, v.38, p.864-865, 2013.

PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.191- 197, 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. **Biotechnoliga Ciência & Desenvolvimento**, v.29, p.62-76, 2002.

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.

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

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p.400, 1926.

POLLI, A. et al. A. Aspectos da interação dos micro-organismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **Revista de Saúde e Biologia**. v.7, n.2, p.82-89, 2012.

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.

PRASHITH, K. 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.

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**, London, v.5, p. 384-392, 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.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. “Biodiversity, Bioactive Natural Products and Biotechnological Potential of Plant-associated Endophytic Actinobacteria.” **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.457–73, 2011.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by fungi from *Spodias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.261-267, 2000.

RAMOS, S. A.F.; SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S.; ARAÚJO, J. M.; COELHO, L. C. B. B. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.17, p.600-607, 2016.

RAO, H. C. Y.; RAKSHITH; D.; SATISH, H. C. Y.; RAKSHITH; D.; SATISH, S. Antimicrobial properties of endophytic actinomycetes isolated from *Combretum latifolium* Blume, a medicinal shrub from Western Ghats of India. **Frontiers in Biology**, v.10, n.6, p.528–536, 2015.

- ROGERS, A.; MCDONALD, K.; MUEHLBAUER, M. F.; HOFFMAN, A.; KOENIG, K.; NEWMAN, L.; TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D. Inoculation of hybrid poplar with the endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638 increases biomass but does not impact leaf level physiology. **Global Change Biology and Bioenergy**, v.4, n.3, 2011.
- ROMAN-RAMOS, R.; ALARCON- AGUILAR, F.; LARA-LEMUS, A.; FLORESSAENZ, J. L. Hypoglycaemic effect of plants used in Mexico as anti-diabetics. **Archives of Medical Research**, v.23, n.1, p.59-64, 1992.
- ROSILIO, V.; BOISSONNADE, M. M.; COELHO, L. C. B. B.; MAGALHÃES, N. S. S.; ANDRADE, C. A S.; BASZKIN, A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. Colloids and Surfaces. **A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 250, p. 491-497, 2004.
- ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, v.48, n.1, p.35-48, 2011.
- 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.
- SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, n.6, p.275-280, 2004.
- 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.
- 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 Mediciniais**, v.13, n.4, p 486-491, 2011.
- SHIOMI, H. F.; SILVA, H. S. A.; MELO, I. S.; NUNES, F. V.; BETTIOL, W. Bioprospecting endophytic bactéria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agrícola**, v. 63, n. 1, p. 32-39, 2006.
- SISENANDO, H. A. A. A. C.; MACEDO, M. F. S.; SATURNINO A. C. R. D.; COELHO, L. C. B. B.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.
- SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P. M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L. C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.
- SOARES, A. C. F.; SOUSA, C. S.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F. S. Isolados de Estreptomicetos no Crescimento e Nutrição de Muda de Tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.40, n.4, p. 447-453, 2010.
- 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, p.152, 2006.

SMITH, J. **Micro-propagation of the Gynea Lily: a report for the Rural Industries Research and Development Corporation**. Kingston: RIRDC, p.59, 2000.

STĘPNIEWSKA, Z.; KUŹNIAR, A. Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.9589–9596, 2013.

STROBEL, G. et al. *Stegolerium kukenani* gen. et sp. nov. an endophytic taxol producing fungus from the Roraima *Stegolepsis guianensis* and *Kukenan tepuis* of Venezuela. **Mycotaxon**, v.78, p.353-61, 2001.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 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.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia - manual das plantas medicinais**. São Paulo: Agronômica Ceres, p.347, 1992.

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

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 of Medical Mycology**, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.

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

TAN, X.-M.; CHEN, X.-M.; WANG, C.-L.; JIN, X.-H.; CUI, J.-L.; CHEN, J.; GUO, S.-X.; ZHAO, L.-F. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (*Orchidaceae*) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan Provinces of China. **Current Microbiology**, v.64, p.140–147, 2012.

TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with *Asteraceae* plants: isolation, biodiversity and bioactivities. *Biotechnology Letters*. v.36, n.4, p.767–773, 2014.

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. (eds.). Cellular and molecular biology of filamentous fungi. **American Society of Microbiology**. p. 376-395, 2010.

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.

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSRI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.256-272, 2004.

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

ZHAO, J.; FU, Y.; LUO, M.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHAO, C.; GU, C. Endophytic fungi from *Pigeon pea* [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.] produce antioxidant Cajaninstilbene Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.4314–4319, 2012.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B. N.; FENG, Z. KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.5, p.2198-2208, 2002.

Capítulo I

Actinobacteria: Versatile Microorganisms With Medical And Pharmaceutical Application

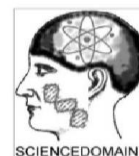
Artigo publicado no periódico British Biotechnology Journal, em Agosto de 2015.

doi:10.9734/bbj.2016.28728 (<http://www.sciencedomain.org/review-history/15996>)



British Biotechnology Journal
15(4): 1-13, 2016, Article no.BBJ.28728
 ISSN: 2231-2927, NLM ID: 101616695

SCIENCEDOMAIN international
www.sciencedomain.org



Actinobacteria: Versatile Microorganisms with Medical and Pharmaceutical Application

**Rosilma de O. Araujo-Melo¹, Igor F. A. C. Souza², Maria C. V. Vicalvi-Costa¹,
 Janete M. de Araújo¹, Kêsia X. R. F. de Sena¹ and Luana C. B. Coelho^{3*}**

¹*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
 Avenida dos Economistas, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 52171-011, Brazil.*

²*Faculdade Integrada de Pernambuco, Avenida Caxangá, nº 4477, Várzea, Recife-PE,
 CEP 50740-000, Brazil.*

³*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Avenida Moraes Rego, S/N,
 Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-420, Brazil.*

Authors' contributions

This work was collaboration among all authors. Authors ROAM, IFACS and LCBBC managed the literature search and wrote the manuscript. Authors KXRFS and JMA participated in revision of this article. Author MCVVC contributed with comments and English translation. Authors ROAM, JMA and LCBBC designed, supervised and managed the study performed. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/BBJ/2016/28728

Editor(s):

(1) Chan Yean Yean, Department of Medical Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Malaysia.

Reviewers:

(1) Kohji Ishihara, Okayama University of Science, Japan.

(2) Mehlika Benli, Ankara University, Turkey.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/15996>

Review Article

Received 2nd August 2016
Accepted 25th August 2016
Published 31st August 2016

ABSTRACT

The Actinobacteria receive much attention, since they produce a variety of metabolites, including antibiotics and enzyme inhibitors. These bacteria are distributed in various habitats, including soil, ocean, extreme environments, lichen, plants, and animals. The classification of Actinobacteria based upon the morphological observation, physiological and biochemical characteristics were not adequate to differentiate the genera of this phylum. Following, another identification was available based in the distribution of specific constituents from the cellular wall, such as diaminopimelic acid and carbohydrates. With the advent of molecular biology, the identification of genera and species was more reliable. The screening of microbial natural products has become an important route to

*Corresponding author: E-mail: lcbcoelho@gmail.com;

discover new bioactive compounds in order to develop new therapeutic agents. Actinobacteria remains one of the leading producers of biopharmaceuticals; endophytic Actinobacteria also yield secondary metabolites with wide range of biological activity. This review focus on gathering relevant information on identification, classification, chemical diversity of Actinobacteria, as well as reveals some biotechnological applications of these bacteria.

Keywords: Actinobacteria; microorganisms; biotechnology potential.

1. INTRODUCTION

Previously, the Actinobacteria were called actinomycetes, name of greek origin, where aktis means "lightning" and mykes, fungus, or "radial growth as fungus" that were initially classified as an intermediate group between fungi and bacteria. Investigations with electron microscopy and cytological studies showed that filamentous bacteria are prokaryotic [1].

The phylum Actinobacteria contains unicellular, Gram-positive, aerobic, facultative anaerobic or anaerobic microorganisms [2]. There is predominant filamentous morphology with the ability to form filiform aggregates due to the formation of hyphae with a diameter between 0.5 to 1.0 μm resembling the filaments of fungi (Fig. 1). The diameter of Actinobacteria cells varies between 0.5 and 2.0 μm , generally less than 1.0 μm , being most of free life or saprophytic [3].

Actinobacteria can be autotrophic, heterotrophic, chemotrophic or phototrophic, however, for the most part, they are chemoorganotrophic, which grow at neutral pH; But there are some acidophilic, alkalophilic or halophilic [3]. The majority of Actinobacteria are mesophilic and the optimum temperature for growth is between 25°C

and 30°C. At temperatures below 5°C growth is virtually null, and above 55°C, there are some thermophilic species, belonging to the genus *Streptomyces*, *Thermospora* and *Thermoactinomyces*. However, high temperatures can be lethal if the microorganism is not in a humid environment [4].

The less evolved Actinobacteria have an incomplete mycelial development, which occurs only during active growth. However, most developed ones have two types of mycelium, in the substrate, the rhizoids; and outside substrate, the aerial mycelium. The Actinobacteria, which produce mycelium using this structure for attachment and penetration, can release enzymes that degrade essential compounds in order to obtain nutritional supplements [5].

Actinobacteria produce spores that allow survival in extreme habitats conferring protection, normally correlated to their morphological diversity, leading to the formation of a wide variety of spore structures. There are the arthrospores in *Streptomyces*, endospores in *Thermoactinomyces*, aleuriospores in the genus *Micromonospora* and mobile zoospores in *Oerskovia*, *Geodermatophilus* and *Kitasatoa* [6,7].

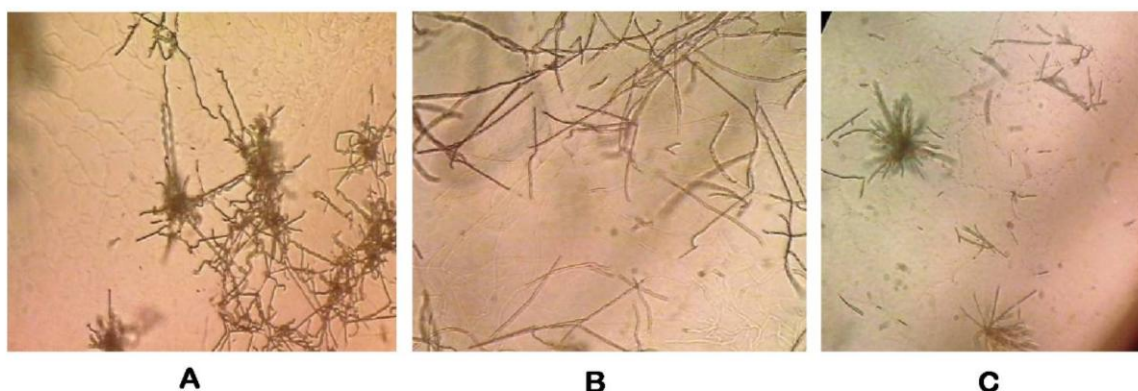


Fig. 1. Optical microscopy of Actinobacteria: A, *Streptomyces* sp. (spiral spore chains); B, *Nocardioopsis* sp. (long chains of spores in abundance); C, *Streptomyces* sp. (straight verticillate chains)

The growth cycle of some Actinobacteria is primarily designed for sporulation phase. After germination of the spores, vegetative mycelium substrata grows at the surface and inside of the solid culture medium, until it differentiates into reproductive aerial mycelium on which spore formation occurs [8]. At the stage of formation of these spores, pigments and antimicrobial substances are produced occurring activation of secondary metabolism [9].

The cell wall is composed of peptidoglycans, lipoproteins, lipopolysaccharides, teichoic acids, among others. The presence of guanine-cytosine (GC) from 63 to 75% constitutes a group of bacteria with a higher percentage of that pair of nitrogenous base with genomes ranging from 2.5 Mb to 9.7 MB [3,4,10]. On solid culture media, they have colonies dry or coriaceous, which may be smooth to wrinkled appearance with strong adhesion to the culture medium, which can be coated by air or reproductive mycelium, and this is a peculiar feature. This aerial mycelium can have different colors in different culture media for the same species, such as white and gray (Fig. 2).

The Actinobacteria have a characteristic odor of "wet earth", which is related to volatile compounds produced by its secondary metabolism, such as geosmin. Besides that, feature intense metabolic activity, producing terpenoids, pigments and extracellular enzymes with which degrade organic matter of plant and animal origin producing secondary metabolites of economic importance [11]. These microorganisms have a worldwide distribution and occur in plants, isolated from leaves and roots [12]. The soil is the most common habitat of Actinobacteria, being abundant in rhizosphere soil region influenced by the roots of the plant [13,14]; The bacteria can occur in the desert [15]; Mangrove [16]; Pasture [17]; Insects [18]; And marine organisms [19].

Filamentous bacteria are found in extreme habitats such as marine sediments [20], glaciers [21] and hyper-arid desert [22]. In addition, are included pathogens (particularly from the genus *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* and *Tropheryma*), inhabitants of soil (for example, *Micromonospora* and *Streptomyces*), plant commensal (e.g., *Frankia* spp.), and gastrointestinal commensal (*Bifidobacterium* spp.) [23,24].

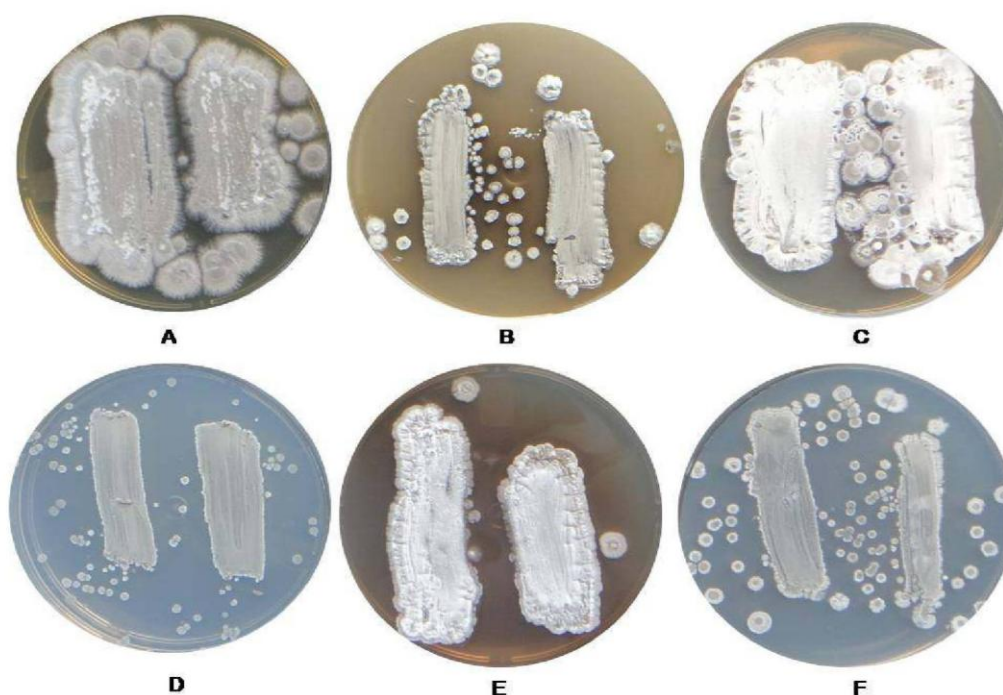


Fig. 2. Macroscopic characteristics of *Streptomyces* spp. in different media of solid culture. A, agar malt yeast [ISP2]; B, international *Streptomyces* project medium 4 [ISP4]; C, casein starch agar [CAA]; D, glycerol starch agar [GAA]; E, Czapek [CZ] and F, medium complete [MC]

2. TAXONOMY

The molecular, biochemical or physiological characteristics to distinguish between species belonging to the phylum Actinobacteria from other bacteria were not known initially. However, after the advent of genomic analysis, specific proteins identified from the Actinobacteria helped to distinguish Actinobacteria and subgroups [25].

Waksman & Henrici [26] proposed the classification system of Actinobacteria based on micro-morphology and variable cellular wall chemotype; there are four main types of cellular wall (Table 1). The most common approach used to classify genres within the group of Actinobacteria includes phylogeny based upon 16S rRNA [27].

This characterization followed the composition and structure of peptidoglycan by the amino acid located in position 3 of the side chain from the tetrapeptides, the presence of glycine in

interpeptide bridges and carbohydrate contained in peptidoglycans. In addition to the above mentioned groups of Actinobacteria there are *Actinomyces* (V- lysine; Ornithine), *Rothia* (VI- lysine and aspartic acid), *Oerskovia* (VI + Gal- lysine; Galactose; Aspartic acid), *Agromyces* (2,4-D acid diaminobutyric acid and glycine) and *Mycoplana* (meso-DAP numerous amino acids) [28].

Mingma et al. [32] isolated from 317 Actinobacteria, 77 from roots of leguminous plants and 240 from rhizosphere soil. Analysis of the cellular wall showed that 289 strains were of type L, L-isomer of 2-6- diaminopimelic acid, whereas 28 strains had the meso isomer. Isolates were identified by sequence analysis of 16S rRNA, whose L-DAP were identified as *Streptomyces* sp.; however, isolates which contained meso-DAP belonged to the genera *Amycolatopsis*, *Isopterocola*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Nocardia*, *Nonomuraea*, *Promicromonospora* and *Pseudonocardia*.

Table 1. Major constituents of the cellular wall from actinobacteria and its relation to the taxonomy

Group	Cellular wall type	DAP: 2-6- diaminopimelic acid	Detected major constituents
Streptomyces (Streptoverticillium, Chainia, Actinopycnidium, Actinosporangium, Elytrosporangium); Microellobosporia; Sprorichthya Nocardiosis Intrasporangium	I	L,L	Glycine
Micromonospora Actinoplanes; Amorphosporangium; Ampullariella; Dactylosporangium	II	Meso	Xylose, arabinose
Actinomadura Dermatophilus Microbispora, Pilimelia Actinoplanes Frankia Streptosporangium; Spirillospora; Planomonospora Dermatophilus	III	Meso	Madurose, without arabinose and xylose
Nocardia Rhodococcus Corynebacterium Mycobacterium Saccharomonospora Micropolyspora Pseudonocardia Thermomonospora	IV	Meso	Galactose, arabinose and without xylose

Data obtained from [28,29,30,31].

The Actinobacteria is considered one of the largest phylum in the domain Bacteria; This is inferred from the standard phylogenetic branch 16S rRNA of belonging microorganisms. The separation of the phylum from other taxa of Bacteria concerns insertions/deletions in some proteins, the presence of a large insertion in the 23S rRNA gene and different arrangements of genes [33].

The order Actinomycetales consists of 63 genera [34], generally divided into two groups. The nocardioforme actinomycetes feature with crude mycelium followed by fragmentation; the group sporoactinomycetes displays an aerial mycelium network well developed with spores. In the latter group are the *Streptomyces* genus, *Actinoplanes* and *Microbispora*, among others [35].

The most recent data about the taxonomic classification of the phylum Actinobacteria, present in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2012, include five classes, 19 orders, 50 families and 221 genera; Also Acidimicrobiia, Actinobacteria, Coriobacteriia, Rubrobacteria and Thermoleophilia, the constituent classes [4].

3. LIFE CYCLE

The life cycle of Actinobacteria varies with the nutritional status, that is, under good growing conditions exhibit septated mycelia similar to multicellular fungi; While in limiting conditions, only the vegetative mycelia is developed [36]. The microorganisms have a complex life cycle which begins by germinating the spores, causing the vegetative mycelia with branching hyphae which penetrate the substrate being responsible for support and adsorption of nutrients, metabolizing organic sources (polysaccharides, proteins, lipids and aromatic compounds), by extracellular enzymes. The vegetative mycelium or primary hyphae originates the secondary hyphae or aerial mycelium, which protrude on the substrate surface constituting the reproductive mycelium undergoing morphological differentiation, which include septation and spore formation. These are formed as a result of nutrient reduction, most of which are thermosensitive, but well support desiccation that are important in adaptation, promoting survival of the species during dry season [8,37].

Most genres reproduced by the formation of spores may vary from mobile zoospores to specialized propagules [38]. Within this

Actinobacteria group are the sporoactinomycetes forming spores in specific regions of the aerial mycelium, produced in large quantities, where each one has germination potential. *Streptomyces* are characteristic arthrospores; in *Thermoactinomyces*, endospores; in *Micromonospora*, aleuriospores; in *Actinoplanaceae*, *Geodermatophilus*, *Kitasatoa* and *Oerskovia*, mobile zoospores [7,39]. However, *Micrococcus*, *Arthrobacter* and *Corynebacterium* genera reproduce by binary fission, whereas the genera *Mycobacterium*, *Nocardia* and *Rhodococcus*, known as nocardioforme Actinobacteria, have rudimentary mycelium which fragments into coccoid elements, yielding a new mycelium [40].

The pigments and secondary metabolites are produced at the stage of spore formation due to activation of secondary metabolism [8,41], which accumulates *in vitro* during the fermentative process. This methodology consists of the cultivation of microorganism in special conditions, necessary for maximum production of the desired metabolite, which may occur, in liquid or solid media, but the liquid assets are the most used by industry [42].

The temperature control and pH, in which there is a great productivity of metabolite, are important factors to be established. It is interesting to note that the variation in production of the compounds depends upon both environmental factors and genetic of the microorganism. This variation is apparently caused by the low specificity of the enzymes involved in secondary metabolism, since errors in the processing of these substances would not be lethal to the microorganism [42].

4. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTINOBACTERIA

The phylum Actinobacteria is isolated from different sources, such as, soils, plants, animals and humans (pathogens, like *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*) [42]. The diversity of the phylum is influenced by environmental factors such as temperature, pH and nutrient availability, promoting the development and proliferation of Actinobacteria [12].

The plate cultivation method, used for the study of microorganisms is used as being effective to analyze the morphological characteristics of Actinobacteria. The presence, shape and color of

the mycelia and spores, as well as the characteristic of the colonies can allow classifying as family and gender, being very important the choice of suitable culture media, aiming to promote differences in development due to nutritional and population dynamics involved in the environment [43].

Most Actinobacteria grow in culture media, such as Agar Triplicase Soy, Blood Agar, Brain Heart Infusion, for not producing mucopolysaccharides, such as other bacteria, exhibit dry and not creamy colonies. For the differentiation and development of spores and / or pigments, it is necessary a culture media supplemented with colloidal chitin, oat, starch with inorganic salts, and water with certain polysaccharides such as carbon source, yeast extract or peptone. For example, some colonies of *Streptomyces* species which grow as hard bright and pale colonies in Nutrient Agar. In a medium with oat, or medium starch with inorganic salts, bright yellow colonies can grow with powdery aerial mycelium of various colors [44].

The growth of Actinobacteria colonies on solid medium can be visualized after 3 to 4 days of incubation, but the development of mature aerial mycelium with spores range from 7 to 14 days; In some slow growing strains, the development of colony can take up to a month in culture [45]. However, growth in stationary liquid media is restricted to the formation of a surface film or particulate sediment leaving the liquid medium transparent, facilitating differentiation. Medium contaminated by bacteria becomes turbid, as can be seen in Fig. 3. Agitation at a speed between 200 and 220 rpm allows a better aeration. Unlike non-filamentous bacteria, Actinobacteria may grow forming pellets or filament groups in liquid medium.

The microscopic examination reveals the micro-morphology of Actinobacteria varying depending on the genus; For example, *Arthrobacter* and *Rhodococcus* result in coccobacillus shape, *Nocardia* shows fragmentation of hyphae, and *Streptomyces* is highly differentiated with branched aerial mycelium. Regarding the spores, there are types, number and arrangements of the chain, in *Microbispora* in longitudinal pairs; *Streptomyces*, spiral spore chains, straight or verticillate, while in *Actinoplanes* and *Streptosporangio*, the spores are within the sporangium. The use of electron microscopy has some additional information about the surface of

the spores, such as smooth, wrinkled, prickly or downy [46, 47, 48].



A **B** **C**
Fig. 3. Actinobacteria growth in liquid medium. A, agar yeast malt (ISP-2) sterile and clear; B, pure Actinobacteria (particulate sediment) and C, contaminated Actinobacteria

A biochemical nutritional and physiological characterization occurs along the cultivation in order to assist in the classification. Some assays may be performed as the use of different sources of carbon and nitrogen, antibiotic resistance, substrate degradation tests, growth test on different conditions and biochemical tests, such as the catalase and proteolysis [31,48].

The macro and micromorphologic analysis combined with other biochemical tests and physiological nutrition, are usually not sufficient for distinguishing Actinobacteria from other groups of Gram-positive bacteria. Thus, the analysis of genotypic characteristics, by molecular biology techniques, presents itself as a highly effective alternative to classify, identify and determine the phylogenetic relationships within the group of Actinobacteria [49].

A widely used method is the analysis by PCR (Polymerase Chain Reaction) [50]. The subunits 16S and 23S rRNA molecules are fairly large and therefore contain sufficient information to allow meaningful comparisons. The 16S rRNA gene is more manageable than the 23S in

experiments; Therefore, it is widely used in phylogenetic studies [10].

The guanine and cytosine content (GC) in the Actinobacteria DNA can vary from 51% to *Corynebacterium* genus, more than 70% in species of *Streptomyces* and *Frankia*, but less than 50% was observed in *Tropheryma whippelii* [7].

The sequence of nucleotides from 16S rRNA is highly conserved in some regions, containing also variable regions; Mutation rates are relatively low. A large number of sequences are available in databases, facilitating the identification of regions with unique sequences by alignments, with consequent determination of species. In addition to the highly conserved sequences, the 16S rRNA gene has very variable regions, which enable the measurement of both near and far phylogenetic relationships, allowing determine the Domain, Division, Family, Class, Order, genus and species of the analyzed microorganisms [51].

5. ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA

Some associations between Actinobacteria and plants are well characterized within the *Actinomycetales* order, where there are examples of phytopathogenic, symbiotic and endophytic species. Regarding endophytic Actinobacteria, higher plant tissues constitute an important niche. Biodiversity of endophytic Actinobacteria is huge and have been isolated from different internal tissues of a variety of vegetables such as wheat, rice, potatoes, carrots, tomatoes and citrus fruits [52,53], different species of woody trees, ferns and mosses [12].

Endophytic microorganisms enter the plant primarily through the roots; however, aerial parts, such as flowers, stems and cotyledons can be used as input ports (Fig. 4). The penetration may occur through active forms in tissues of plants by the use of hydrolytic enzymes such as cellulases and pectinases, or passively promoted by natural openings or caused by injury [54].

The first Actinobacteria isolated from plants of internal tissues belong to the genus *Frankia*, a nitrogen fixer microorganism from legumes [55]. However, the Actinobacteria genera reported in the literature as more frequent in plant tissues are *Streptomyces*, *Microbispora*, *Micromonospora* and *Nocardioideis* [56,57].

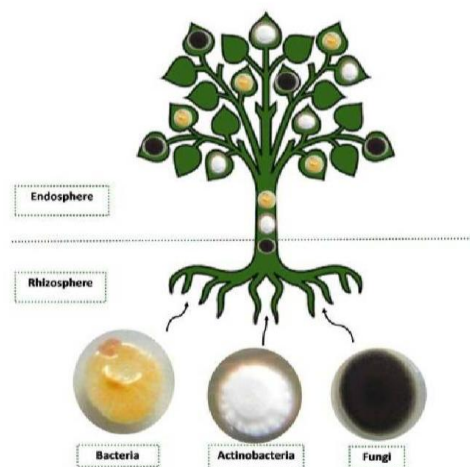


Fig. 4. Schematic representation of a vegetable colonization by bacteria and fungi

In the work carried by Rao et al. [58], endophytic Actinobacteria were isolated in 117 strains from *Combretum latifolium* (*Combretaceae*), representing 9 different genera of Actinobacteria among them *Streptomyces* (35%), *Nocardiopsis* (17%) and *Micromonospora* (13%). The preliminary evaluation of antibacterial activity showed that all strains of *Streptomyces* spp. exhibited significant activity against the tested pathogens; CLA-66 and CLA-68 strains, *Nocardiopsis* sp., also showed satisfactory results.

The work carried out by Tanvir et al. [59] allowed the isolation of endophytic Actinobacteria of *Parthenium hysterophoru*: *Ageratum conyzoides*, *Sonchus oleraceus* and *Hieracium canadense*. Most of the isolates were obtained from roots (69.7%) being the predominant genus *Streptomyces* while *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Nocardia*, and *Micromonospora* were also isolated in lower frequency. From total isolates, 47.2% showed antimicrobial activity, while 52.1% and 66.6% showed potent cytotoxicity and antioxidant activity, respectively.

Numerous Actinobacteria genera have been isolated from marine environments such as marine sediments and several species of sponges. Vincent et al. [60] identified and isolated 180 Actinobacteria from 16 different species of sponges. Phylogenetic analysis revealed the presence of Actinobacteria belonging to the genera *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Solwaraspora*, *Mycobacterium* and *Cellulosimicrobium*.

Janso et al. [61] performed isolation of 123 endophytic Actinobacteria from roots and leaves of tropical plants, which were more prevalent in roots and the following genera were identified: *Sphaerisporangium*, *Planotetrastroma*, *Thermomonosporae*, *Micromonosporaceae*. In addition to performing bioactivity tests and mass spectrometry liquid-chromatography (LC-MS) to profiles of crude extracts of fermentation in 91 strains. About 60% of the extracts exhibit bioactivity and LC-MS spectra profiles indicative of secondary metabolites.

Other bioactive compounds were obtained from endophytic Actinobacteria, as anguciclines with antimicrobial activity against *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* [62]; Irumamicine, 14952b and X-17-hydroxy-venturicidina A the active compounds, which are all taken from the same strain of *Streptomyces* sp. [63]; 8-hydroxyquinoline with activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria [64].

The kakadumicine, a broad-spectrum antibiotic with action on *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria, was produced by strain *Streptomyces* sp. (NRRL 30566), endophytic of *Grevillea pteridifolia* [65]. The munumbicines, peptidic antibiotic produced by *Streptomyces* sp. (NRRL 30562), obtained from medicinal plant *Kennedia nigriscans*, has a broad spectrum of action on Gram-positive bacteria such as *Bacillus anthracis* and multiresistant *Mycobacterium tuberculosis*. The munumbicine B proved to be active also against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) but the best activity was against *Plasmodium falciparum* [66].

6. ACTINOBACTERIA BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE

The first antibiotic was isolated from the genus *Streptomyces*, in the 1940s; From that moment, the Actinobacteria highlighted in the production of active compounds [67,68]. These microorganisms hold an extremely rich and diverse metabolism, producing secondary metabolites of extraordinary chemical variety, which attracted the attention of biotechnology branch [60], with applications in human medicine, animal and agriculture [58,69,70,71]. The most studied and representative genera with this potential are *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardia* and *Streptomyces* [72].

Products from Actinobacteria include antibiotics, antifungals, extracellular enzymes (chitinases,

peroxidases, glucanases), enzyme inhibitors, neurotransmitters, terpenoids, pigments, anti-tumor, plant growth promoters, pesticides, etc. [73]. From 45% of composites with biological activities derived from filamentous Actinobacteria, approximately 80% of 7,600 compounds are produced by *Streptomyces* sp. characterizing this genus as one of the most important in producing bioactive compounds [74]. Even with this metabolic diversity, only about 10% of the total number of natural products synthesized by these organisms were discovered [75].

Silva Lacerda et al. [76] assessed the antimicrobial potential of Actinobacteria isolated from *Caesalpinia pyramidalis* rhizosphere of the Caatinga Biome, evaluating 78 Actinobacteria for antimicrobial activity. The isolates of 52.9% (obtained at 37°C) and 47.05% (produced at 45°C) had activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA), *Fusarium moniliforme* and *Candida albicans*. Highlighting the isolated C1.129 identified by 16S rDNA analysis as *Streptomyces parvulus*, fermented in liquid medium, a crude ethanolic extract showed a MIC of 0.97 µg / mL for MRSA and *B. subtilis*; An ethyl acetate extract showed MIC of 3.9 µg / ml for *S. aureus* and MRSA, showing the great potential of metabolites produced.

There are several bioactive compounds industrially produced by Actinobacteria. The antibacterials, such as penicillins, cephalosporins, and many macrolides; antifungal agents, such as amphotericin B and nystatin; immunosuppressants, such as FK-506, ascomycin and rapamycin; Chemotherapeutic agents such as bleomycin, dactinomycin, doxorubicin, staurosporine; Herbicides, such as phosphinothricin; In the treatment of diabetes, such as acarbose; And anthelmintic agents such as avermectin and milbemycin [77].

Another source of promising uses of metabolites originating from Actinobacteria is from endophytic microorganisms, since they may act to improve crop yields by its host protection against pathogens. Therefore, the presence of endophytic Actinobacteria may represent an important agent in the development and maintenance of plant health and act on plant growth, through assimilation of nutrients and production of secondary metabolites.

Endophytic Actinobacteria, are considered as bio-inoculants to improve crop performance

through organic agriculture. The association of endophytes with plants allows the discovery of new taxons and its metabolites with new chemical structures of biotechnological importance [78].

The work of Soares et al. [79] demonstrated the effect of soil inoculation with six isolates of Actinobacteria, on tomato seedlings as compared with uninoculated soil control. After 30 days, the seedlings were collected to determine the height, stem diameter, dry weight of shoots and roots as well as accumulation of nutrients. The Actinobacteria isolated promoted significant increases in growth and accumulation of nutrients in tomato seedlings.

Thirty-four endophytic Actinobacteria were isolated from plant roots, of which twenty-nine isolates belonging to the *Streptomyces* genus and five belonging to other genus. All isolates were screened for antifungal activity against *Rhizoctonia solani*; six strains were selected for biocontrol of *R. solani* in sterile and non-sterile soil to promote the growth of tomato seedlings. In both soils, tomato seeds coated with endophytes significantly reduced the severity of tipping tomatoes [80].

The study by Conti et al. [81] using an endophytic Actinobacteria of *Lychnophora ericoides* evaluated the biotechnological potential of extracts from filamentous bacteria using antimicrobial and cytotoxic assays, as well as investigation of chemical profile. A percentage of 92% of the extracts showed high or moderate activity against at least one type of cancer cell or pathogenic microbial agents. Sixteen compounds, of which 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-4 (1H)-quinazolinone, showed potent cytotoxic activity against all cancer cell lines tested.

Endophytes are equipped with degradation pathways, producing metabolites, which could promote cleaning of pesticides through bio-emulsifiers. Recently the use of endophytic Actinobacteria has been proposed for bioremediation. Fuentes et al. [82] performed assays using pure and Actinobacteria culture associations with the purpose to achieve bioremediation of chlordane (insecticide), using six *Streptomyces* sp., which showed no growth inhibition, and were assayed for removing chlordane. In pure cultures, all strains showed dechlorination activity and removal of chlordane.

7. CONCLUSIONS

Actinobacteria, microorganisms widely distributed in nature, inhabit mainly the soil. These prokaryotes are broadly responsible for the production of various metabolites commercially available, such as antibiotics. Endophytic Actinobacteria also produce active substances, and have important functions in the development of plants with agro industrial interest. This review provides data with a focus on spreading the importance of these microorganisms, as well as turn the attention to the fact that more studies are necessary for application of these Actinobacteria as innovative biotechnological tools.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for fellowship (LCBBC), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Pandey B, Ghimire, P, Agrawal, VP. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. Acad Sci Technol. 2004;4(3):1-4.
2. Hopwood D. *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. J Ind Microbiol Biotechnol. 2003;30(8):468-471.
3. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico: Texto e atlas colorido. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica; 2008.
4. Goodfellow M. Phylum XXVI. Actinobacteria phylum. Nov. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2th. Springer: New York; 2012.
5. Huang XL, Zhuang L, Lin HP, Goodfellow M, Hong K. Isolation and bioactivity of endophytic filamentous Actinobacteria from tropical medicinal plants. Afr J Biotechnol. 2012;11(41):9855-9864.

6. Raju A, Piggott AM, Conte M, Trimov Z, Alexandrov K, Capon RJ. nocardiopepsins: New fkbp12-binding macrolide polyketides from an Australian marine-derived Actinomycete, *Nocardiopepsis* sp. Chem Eur J. 2010;16(10):3194-3200.
7. Ventura M, Canchaya C, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71(3):495-48.
8. Yague P, López-García MT, Rioseras B, Sánchez J, Manteca A. Pre-sporulation stages of streptomyces differentiation: State-of-the-art and future perspectives. Fems Microbiol Lett. 2013;342(2):79-88.
9. Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic Actinobacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(3):457-473.
10. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12th ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.
11. Choi HJ, Kim DW, Choi YW, Lee YG, Lee Y, Jeong YK, Joo WH. Broad-spectrum *in vitro* antimicrobial activities of *Streptomyces* sp. strain BCNU 100. Biotechnol Bioprocess Eng. 2012; 17(3):576-583.
12. Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J, et al. Actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. Curr Microbiol. 2011;62(1): 182-190.
13. Mehravar M, Sardari IS, Owlia P. Screening of membrane active antimicrobial metabolites produced by soil actinomycetes using membrane models. J Paramed Sci. 2010;1(4):18-25.
14. Vasconcellos RLF, Silva MCP, Ribeiro CM, Cardoso EJBN. Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) Actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. Sci. Agric. 2010;67(6): 743-746.
15. Norovsuren ZH, Oborotov GV, Zenova GM, Aliev RA, Zvyzintsev DG. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. Biol Bull. 2007;34(4):505-07.
16. Yu Y, Li H, Zeng Y, Chen B. Phylogenetic diversity of culturable bacteria from Antarctic Sandy intertidal sediments. Polar Biol. 2010;33(6):869-875.
17. Lee JL, Hwang BK. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can J Microbiol. 2000;48(5):407-17.
18. Kaltenpoth M, Gottler W, Herzner G, Strohm E. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. Curr Biol. 2005;15(5):475-479.
19. Zheng Z, Zeng W, Huang Y, Yang Z, Li J, Cai H et al. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan strait, China. Fems Microbiol Lett. 2000;188(1):87-91.
20. Pathom-Aree W, Stach JE, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. Extremophiles. 2006;10(3):181-189.
21. Reddy VPV, Rao SNSS, Pratibha MS, Sailaja B, Kavya B, Manorama RR et al. 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. Res Microbiol. 2009;160(8):538-546.
22. Okoro CK, Brown R, Jones AL, Andrews BA, Asenjo JA, Goodfellow M, et al. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. Anton Leeuw Int J G. 2009;95(2):121-133.
23. Barkaa EA, Vatsaa P, Sancheza L, Gaveau-Vaillanta N, Jacquarda C, Klenkb HP et al. Taxonomy, physiology and natural products of Actinobacteria. Microbiol Mol Biol R. 2016;80(1):1-43.
24. Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: Informed by Actinobacterial systematics. Anton Leeuw Int J G. 2010;98(2):119-42.
25. Gao B, Paramanathan R, Gupta RS. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. Anton Leeuw Int J G. 2006;90(1):69-91.
26. Waksman SA, Henrici AT. The nomenclature and classification of the actinomycetes. J Bacteriol. 1943;46(4): 337-341.
27. Krishnaveni J, Radzom M, Zeeck A, Kishan V. Taxonomy, fermentation, biological activities, isolation and characterization of metabolites obtained from a new strain of *Streptomyces noursei* (KC46). Indian J Biotechnol. 2011;10(2): 212-218.

28. Lechevalier HA, Lechevalier MP. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 1970;20:435-443.
29. Hecht ST, Causey WA. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria. *J Clin Microbiol.* 1976;4(3):284-287.
30. Anderson AS, Wellington EMH. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(3): 797-814.
31. Chun J, Blackall LL, Kang SO, Hah YC, Goodfellow MA. Proposal to reclassify *Nocardia pinenses* Blackall et al., as *Skermania piniformis* Gen. Nov., Comb. Nov. *J Syst Evol Microbiol.* 1997;47(1): 127-131.
32. Mingma R, Pathom-Aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from *Leguminosae* plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. glycine. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(1): 271-280.
33. Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Global Sci Tech.* 2011;4(2):47-57.
34. Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W et al. In: *Bergey's manual® of systematic Bacteriology.* 2nd Springer: New York; 2012.
35. Olano C, Méndez C, Salas JA. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. *Microb Biotechnol.* 2011;4(2):144-164.
36. Procópio REL, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(5):466-471.
37. Ambarwati A, Sembiring L, Soeghihardjo CJ. Antibiotic produced by *Streptomyces* associated with rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6(1): 52-57.
38. Gao B, Gupta RS. Conserved indels in proteins sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(6):2401-2412.
39. Cunha IGB, Sobrinho TJSP, Silva REA, Amorim ELC, Araujo JM. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. *Brazilian Journal of Pharmacy.* 2009;90(2): 120-123.
40. Flardh K, Butter MJ. *Streptomyces morphogenetics*: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Rev Microbiol.* 2009;7:36-49.
41. Mahajan GB, Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes a review. *Front Biosci.* 2012;4(1):240-253.
42. Okafor N. Modern industrial microbiology and biotechnology. Science Publishers: Enfield, New York; 2007.
43. Gil SV, Pastor S, March GJ. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiol Res.* 2009;164(2):196-205.
44. Bergey J, Hendricks D, Holt J. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. Philadelphia: Editorial Lippincott. Williams & Wilkins Co; 2000.
45. Letek M, Fiuza M, Villadangos AF, Mateos LM, Gil JA. Cytoskeletal proteins of Actinobacteria. *Int J Cell Bio.* 2012;13(2): 1-10.
46. Oliveira ALM, Canuto EL, Reis VM, Baldani JL. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Braz J Microbiol.* 2003;34(1):59-61.
47. Bull AT. *Microbial Diversity and Bioprospecting.* 1th ed. American Society for Microbiology ASM Press: Washington; 2004.
48. Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 1983;129(6):174-1813.
49. Cook AE, Meyers PR. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(6):1907-1915.
50. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey N. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria class nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(2):479-491.
51. Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, Tebbe CC. Secession of microbial communities during hot composting as

- detected by PCR single-strand conformation polymorphism-based genetics profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(3):930-936.
52. Tian XL, Cao LX, Tan HM, Han WQ, Chen M, Liu YH, Zhou SN. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microbial Eco.* 2007;53(4):700-707.
 53. Velazquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdopineiro JL, Heydrich M, et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol.* 2008;48(2):118-124.
 54. Stępniewska Z, Kuźniar A. Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(22):9589-9596.
 55. Provorov NA, Borisov IA, Tikhonovich A. Comparative genetics and evolutionary morphology of symbiosis formed by plants with nitrogen-fixing microbes and endomycorrhizal fungi. *J Gen Biol.* 2002;63(6):451-472.
 56. El-Shatoury SA, El-Kraly OA, Trujillo ME, El-Kazzaz WM, El-Din ESG, Dewedar A. Generic and functional diversity in endophytic actinomycetes from wild compositae plant species at south Sinai. *Egypt Res Microbiol.* 2013;164(7):761-769.
 57. 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 Sci Plant Nutr.* 2013;59(3):322-330.
 58. Rao HCY, Rakshith D, Satish S. Antimicrobial properties of endophytic actinomycetes isolated from *Combretum latifolium* Blume, a medicinal shrub from western ghats of India. *Front Biol.* 2015;10(6):528-536.
 59. Tanvir R, Sajid I, Hasnain S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with *Asteraceae* plants: isolation, biodiversity and bioactivities. *Biotechnol Lett.* 2014;36(4):767-773.
 60. Vicente J, Stewart A, Song B, Hill RT, Wright JL. Biodiversity of actinomycetes associated with caribbean sponges and their potential for natural product discovery. *Mar Biotechnol.* 2013;15(4):413-424.
 61. Janso JE, Carter GT. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4377-4386.
 62. Maruna M, Sturdikova M, Liptaj T, Godany A, Muckova M, Certik M, et al. Isolation, structure elucidation and biological activity of angucycline antibiotics from an epiphytic yew *Streptomyces*. *J Basic Microbiol* 2010;50(2):1-8.
 63. Fguira LFB, Fotso S, Ameer-Mehdi RB, Mellouli L, Laatsch H. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res Microbiol.* 2005;156(3):341-347.
 64. Narayana KJP, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y, Krishna PSJ. Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Pol J Microbiol.* 2008;57(1):35-39.
 65. Bieber B, Nüske J, Ritzau M, Gräfe U. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. *J Antibiot.* 1998;51(3):381-382.
 66. Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiol.* 2002;148(9):2675-2685.
 67. 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. *Mol Biol Rep.* 2014;41(1):497-504.
 68. 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. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2014;41(1):163-172.
 69. Ballav S, Dastager SG, Kerkar S. Biotechnological significance of Actinobacterial research in India. *Recent Res Sci Technol.* 2012;4(4):31-39.
 70. Soares ECL, Costa EP, Silva LCN, Araújo JM. Isolamento, identificação e atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. UFPE 968. *Sci Plen.* 2012;8(12):01-07.
 71. Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ, et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and

- their antipathogenic activities *in vitro*. World J Microbiol Biotechnol. 2004;20(3): 303-309.
72. Oliveira MF, Silva MG, Van Der Sand ST. Potencial antifitopatogénico de Actinobacterias endofíticas aisladas para plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) del sur de Brasil y caracterización de *Streptomyces* sp. R18(6), un agente potencial de biocontrol. Res Microbiol. 2010;161(1):565-572.
 73. 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. Appl Soil Ecol. 2010;45(3):209-217.
 74. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 2005;58(1):1-26.
 75. Watve MG, Tickoo R, Maithili M, Jog B, Bholen D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Arch Microbiol. 2010;176(5):386-390.
 76. Silva-Lacerda GR, Santana RCF, Vicalvi-Costa MCV, Solidônio EG, Sena KXFR, Lima GMS, et al. Antimicrobial potential of Actinobacteria isolated from the rhizosphere of the caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Genet Mol Res. 2016;15(1):1-12.
 77. Rodrigues KF, Hesse M, Werner C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by fungi from *Spondias mombin*. J Basic Microbiol. 2000;40(4):261-267.
 78. Masand M, Jose PA, Menghani E, Jebakumar SRD. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31(12):1863-1875.
 79. Soares ACF, Sousa CS, Garrido MS, Lima FS. Isolados de estreptomicetos no crescimento e nutrição de mudas de tomateiro. Pesq Agropec Bras. 2010;40(4):447-453.
 80. Goudjal Y, Toumatia O, Yekkour A, Sabaou N, Mathieu F, Zitouni A. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of algerian Sahara. Microbiol Res. 2014;169(1):59-65.
 81. Conti R, Chagas FO, Caraballo-Rodriguez AM, Melo WGP, Nascimento AM, Cavalcanti BC, et al. Endophytic Actinobacteria from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the biological potential of their secondary metabolites. Chem Biodiv. 2016;13(6):727-736.
 82. Fuentes MS, Colin VL, Amoroso MJ, Benimeli CS. Selection of an actinobacteria mixed culture for chlordane remediation. Pesticide effects on microbial morphology and bioemulsifier production. J Basic Microbiol. 2016;56(2):127-137.

© 2016 Araujo-Melo et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://sciencedomain.org/review-history/15996>

Capítulo II

Isolation and Identification of Endophyte Microorganisms from *Bauhinia Monandra* Leaves, mainly *Actinobacteria*

Artigo aceito no periódico Biotechnology Journal International, em Fevereiro de 2017.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTE MICROORGANISMS FROM *Bauhinia monandra* LEAVES, MAINLY *Actinobacteria*

Rosilma de O. Araujo-Melo^{1*}; Igor F. A. C. Souza²; Carlos Vinícius J. de Oliveira¹; Janete M. de Araújo¹; Kêsia X. F. R. de Sena¹; Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{3*}

¹Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Avenida dos Economistas, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 52171-011, Brazil.

²Faculdade Integrada de Pernambuco, Avenida Caxangá, nº 4477, Várzea, Recife-PE, CEP 50740-000, Brazil.

³Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-420, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Authors ROAM, IFACS and LCBBC managed the literature search and wrote the manuscript. Authors KXFRS, CVJO and JMA participated in revision of this article.

Authors ROAM, JMA and LCBBC designed, supervised and managed the study performed. All authors read and approved the final manuscript.

Abstract

The present work aimed the prospection of microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves, with the purpose to identify endophytes to obtain strains with possible biotechnological applications. *B. monandra* leaves, disinfected with hypochlorite solution, were macerated in phosphate buffered saline and seeded in ten culture media containing antibacterial or antifungal agents. The endophytic filamentous fungus strains detected belonged to the genera *Penicillium*, *Curvularia* and *Aspergillus*. Non-filamentous endophyte bacteria were grouped in the genera *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*; and strains of endophytic *Actinobacteria* were classified as *Streptomyces* and *Nocardiopsis*. The methodology applied in this work was effective for the isolation of endophytic, allowing obtaining a diversity of microorganisms. The present study revealed the predominance of the genus *Penicillium* in leaves of *B. monandra*. This work introduces the first data of identification from endophyte *Actinobacteria* in the leaves of *B. monandra*.

Key words: endophytes, microorganisms, *Bauhinia monandra*, leaves, *Actinobacteria*.

*Corresponding authors: E-mails: lcbbbc@coelho@gmail.com; rosilma23@hotmail.com

1. INTRODUCTION

The plants, when establishing themselves in their respective habitats, make interactions with different species of living beings, among them the external or internal microorganisms, in order to obtain the necessary resources for their survival [1,2]. The microorganisms that coexist in a symbiotic way with the host plant are called endophytes [3]; they inhabit the interior of plant tissues and organs without causing damage to their host [4,5].

Endophytes are generally associated with the health of the plant that hosts them through the production or inhibition of primary and/or secondary metabolites, conferring several advantages such as: control of insects and herbivorous animals, production of antimicrobials against phytopathogenic microorganisms, resistance to stress conditions, changes in physiological properties, phytohormone production, toxins and enzymes [6,7].

The location of the endophytes within the plant varies according to abiotic factors, affecting the structure of the plants. In this way, the microbial community resident in the phyllosphere (the aerial parts of the plant) faces a nutrient-poor environment and the variation of temperature, humidity and UV radiation. In contrast, the microbial community in the rhizosphere (the soil directly in contact with the roots) resides within an environment rich in nutrients from plant metabolism. Thus, although studies have shown that environmental variability promotes diversity, this concept does not apply to microbial communities, since the phyllosphere is generally no more diverse than that of the rhizosphere; the nutritional facility is that allows the variety. Environmental variations may influence the phyllosphere microorganisms as regards their biosynthetic machinery, justifying the need for endophytic studies in this part of the plants [8].

Endophytic microorganisms in several habitats present versatility in the production of bioactive compounds with economic interest; they are potentially useful in agriculture and industry, particularly related to food and pharmaceuticals. They can be used for biological control of diseases, promotion of plant growth, bioremediation, vectors for introduction of genes, antibiotics, immunomodulatory agents, enzymes and enzyme inhibitors [9,10,11].

Most endophytic studies are concentrated on plants commercialized in agriculture, since endophytic bacteria such as *Enterobacter* sp. and *Burkholderia* sp. play a fundamental role in the maintenance and/or increase of plant growth, aiming to increase productivity [12]. Considering biocontrol of phytopathogen, endophyte fungi of the genus *Curvularia* and endospore bacteria were tested against *Phytophthora palmivora* and demonstrated high potential in the control of pathogen state [13]. The phytoremediation with endophytic bacteria *Enterobacter* sp. and *Burkholderia* sp. could decrease the phytotoxicity of volatile organic compounds and allow the growth of plants in polluted soil [14]. Endophytic strains could be of use to obtain bioactive compounds from *Actinobacteria* (filamentous bacteria) such as *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nonomuraea* and *Amycolatopsis* as well as fungi like *Aspergillus* and *Penicillium*. These works reinforce the importance of the isolation of endophytes [15].

The genus *Bauhinia* (*Fabaceae* family) contains about 60 species distributed in the Brazilian territory; the species *Bauhinia monandra* Kurz is known in Brazil as “pata-de-vaca”, “unha-de-vaca”, “casco-de-vaca”, “unha-de-boi”, “unha-de-anta” or “mororó” [16,17]. *Bauhinia* species such as *B. monandra* have been used in folk medicine as antidiabetic or antioxidant agents [18]. Several investigations confirm the use of *B. monandra* as a hypoglycemic promoter such as the work of Menezes et al. [19] using aqueous extracts from leaves of *B. forficata* and *B. monandra* (10% w/v). Argolo et al. [20] showed that ethyl acetate and chloroform extracts from *B. monandra* leaves have very potent antioxidant activity.

In spite of several studies carried out with *B. monandra*, there is little research on the microbiota, such as the study by Ramos et al. [21] which isolated bacteria and fungi from leaves. However, there are no studies regarding endophytic *Actinobacteria* identification of this species. Also, the present work aimed to prospect microorganisms from *B. monandra* leaves, in order to identify endophytic species of this plant and obtain *Actinobacteria* strains with potential biotechnological applications.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 COLLECTION AND IDENTIFICATION OF BOTANICAL MATERIAL

The mature proximal leaves of *B. monandra* were collected at Recife city in the *campus* from the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE; 8°03'0.05"S 34°56'59.68"W) from November to December 2013. The collected leaves were immediately taken to the Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos (LAMA EA, Departamento de Antibióticos, UFPE) for processing. An exsiccate of the collected plant was identified by the Biologist Marlene Barbosa and deposited in Herbarium Geraldo Mariz of the Federal University of Pernambuco under the n° 75832.

2.2 ISOLATION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS

The collected leaves were washed with sterile distilled water to remove residues and the excess of epiphytic microorganisms. The material was then disinfected in an aseptic chamber by immersion in 70% ethanol for 1 min, followed by 2% (w/v) sodium hypochlorite for 4 min. The material was immersed again in 70% ethanol for 30 s to remove excess hypochlorite and then three consecutive times in sterile distilled water for 30 s. The last wash water was seeded in Petri dishes with different culture media as a control of the disinfection process. After seven days, if there were no growth of microorganisms in the sterility evaluation, the recovered fungi and bacteria were considered as endophytes [22].

Isolation of endophytes was performed by maceration of the disinfected material in sterile phosphate buffer saline (pH 7.4), PBS (in the ratio of 1 g of leaves to 3 ml of buffer) followed by shaking on an orbital shaker for 90 min. The resulting solution from the maceration was collected and the dilutions (1:10 and 1: 100) were prepared in PBS. Then, 100 µl of undiluted or diluted solutions were seeded with the Drigalski loop in Petri dishes containing culture medium.

Three culture media were used for bacteria: tryptic soy agar (TSA-g/L:15.0 pancreatic digestion of casein, 5.0 NaCl, 5.0 papaya digestion of soybean meal, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH: 7.3 ± 0.2); L-arginine agar (LAA- g/L: 0.3 L-arginine, 1.0 glucose, 1.0 glycerol, 0.3 K₂HPO₄, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.3 KCl, 1.0 yeast extract, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH 7.4± 0.2), and complete medium (CM-g/L: 0.3 glucose, 0.5 NaNO₃, 0.3 K₂HPO₄, 0.3 MgSO₄·7H₂O, 0.3 KCl, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH: 7.4± 0.2).

Four media were used for actinobacteria: agar inorganic starch salts (ISP-4- g/L: 20.0 starch; 2.0 K₂HPO₄; 2.0 MgSO₄ · 7H₂O; 2.0 NaCl; 4.0 (NH₄)₂SO₄; 4.0 CaCO₃; 1.0 distilled water; 15.0 agar; 2mL/1L solution of trace amounts of salts: 1.0 mg FeSO₄·7H₂O, 1.0 mg MnSO₄·7H₂O, 1.0 mg ZnSO₄·7H₂O. pH: 7.0-7.4); international *Streptomyces* project medium 2 (ISP-2- g/L: 4.0 yeast extract, 10.0 malt extract, 4.0 glucose, 5.0 starch, 1.0 distilled water, 15.0 agar. pH 7.2± 0.2); agar starch casein (ASC- g/L: 10.0 starch, 0.3 casein, 2.0 KNO₃, 2.0 NaCl, 2.0 K₂HPO₄, 0.05 MgSO₄·7H₂O, 0.01 Fe(SO₄)·7H₂O, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH: 7.4± 0.2) and Czapek (CZ-g/L: 30.0 sucrose, 2.0 NaNO₃, 1.0 K₃ PO₄, 0.50MgSO₄·7H₂O, 0.5 KCl, 0.1 FeSO₄·7H₂O, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH: 7.3 ± 0.2), all containing 100 µg / mL nystatin to inhibit fungal growth.

The fungal isolation used Sabouraud dextrose agar (SDA-g/L: 10.0 bacteriological peptone, 40.0 glucose, 15.0 agar, distilled water, pH: 5.6± 0.2) and potato dextrose agar (PDA-g/L: 200.0 potato infusion, 20.0 glucose, 15.0 agar, 1.0 distilled water, pH: 5.6 ± 0.2), both containing 100 µg/mL chloramphenicol. Plates were incubated at 27 ± 2 °C for 20 days. Each assay was performed in triplicate. After purification, the endophytic microorganisms were preserved by the mineral oil technique [23].

2.3 ANALYSIS OF THE ENDOPHYTIC COLONIES

The isolated endophytic bacteria were Gram-stained, and later grouped as Gram-positive and Gram-negative. Then, Gram-negative bacilli-shaped bacteria were reassembled according to the results of biochemical assays: triple sugar and iron (TSI); citrate; urea; cytochrome oxidase; sulphide, indol and motility (SIM); motility, indol and ornithine (MIO) and fermentation of carbohydrates, such as fermenters (*Enterobacteriaceae*) and non-fermenters. Gram-positive bacteria were regrouped as Gram-positive cocci or bacilli [24].

The following aspects characterized the isolated endophytic fungal colonies: size, texture, borders, relief and pigmentation. Aman blue staining (0.1% w/v) was then performed to observe hyphae and other structures within the tissues and classification at the gender level [25].

The analysis of actinobacterium morphological characteristics was performed through macroscopic identification in which the *Actinobacteria* were seeded in the ISP-2, ISP-4, ASC, glycerol asparagine agar (GAA-g/L: 10.0 glycerol, 1.0 asparagine, 1.0 K₂HPO₄, 15.0

agar, 1.0 distilled water, pH 7.2 ± 0.2), CZ, MC media to visualize aerial mycelium staining and soluble pigment production. Also, with the microscopic identification through the micro culture of the isolates as Holt et al. [26].

2.4 PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC ACTINOBACTERIA

Biochemical identification of *Actinobacteria* was carried out through biochemical tests using the polyphase taxonomy, which evaluated the use of carbon sources as well as coloring of the aerial mycelium [27,28].

The ability of each strain to produce different enzymes was examined using standard methods. Lipase and esterase, according to Neirotti et al. [29]; protease (gelatinase and caseinase), according to Chapman [30]; pectinase, tyrosinase and cellulose, according to Hankin et al. [31]; α -amylase, according to Anderson [32]; production of melanin pigment, according to Pridham et al. [33]; production of hydrogen sulphide, according to Cowan [34]; and use of different carbon sources, according to Pridham et al. [35]. Cultural characteristics such as aerial mycelium color, substrate mycelium color and pigmentation of the selected *Actinobacteria* were observed in ISP agar medium [36].

3. RESULTS AND DISCUSSION

The biodiversity of plants with medicinal properties or not, harbors a variety of microorganisms with the potential to produce bioactive substances. In this work, endophytes from leaves of *B. monandra* were isolated and identified. Studies on bioprospecting of microorganisms seek the isolation and identification of endophytes, constituting an inexhaustible source of new metabolites and genetic diversity of new species.

Surface sterilization is the critical point in the isolation of endophytes and was used in plant tissues to eliminate all epiphytes. In the present study, the disinfection treatments used for leaves were efficient, without tissue oxidation, even using the sodium hypochlorite solution during 4 min, allowing endophyte growth; the controls remained clean. This was similarly reported by Souza et al. [37] that isolated microorganisms from leaves of *M. oleifera* using

the same solution for disinfection. Ten culture media were applied for the isolation of endophytes from *B. monandra* leaves, allowing obtaining the diversity of isolated microorganisms. Jin et al. [38] stated that the composition of the nutrients in each culture medium is very important to ensure the increase of the frequency and morphological diversity of the microorganisms.

In this work, five isolation procedures were performed, in which bacteria, fungi and endophytic *Actinobacteria* were obtained. There was a higher frequency of endophytic bacterial isolates with a percentage of 59.7%, while endophytic fungal isolates represented a total of 26.9%, and less frequently, *Actinobacteria* with 13.4%.

The finding of endophytic microbial communities in plant tissues has been reported for many cultivable species and at different stages of growth. Groups of fungi and non-filamentous bacteria are the most common endophytic isolates. Among the most commonly isolated fungi and bacteria genera are: *Ascomycetos*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* [39,40]. However, endophyte actinobacteria have also been studied from *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces*, and *Nocardia* [41]; these genera have been constantly found as endophytic *Actinobacteria*.

In the present study, the strains of endophytic filamentous fungi identified were *Penicillium* (38.9%), *Curvularia* (16.7%), *Aspergillus* (11.1%) and the other colonies (33.3%) are still under analysis. The interaction between plants and microorganisms has been described in the genus *Bauhinia* mainly for fungal species; however, there are no studies on the identification of the microbiota of leaves from *B. monandra*.

Within this context, Bezerra et al. [42] described the isolation of ninety-five endophytic fungi from fragments of *B. forficata*. The species of fungi isolated from stem and leaf were *Acremonium curvulum*, *Aspergillus ochraceus*, *Gibberella fujikuroi*, and *Penicillium glabrum*. The most frequent species were *Myrothecium verrucaria* (10.5%) isolated from the stem, *G. fujikuroi* (10.5%) isolated from leaf and stem, and *A. curvulum* (9.5%) isolated from sepals. Corroborating, Mussi-Dias, et al. [9] carried out the study with fresh leaves of several medicinal species, among them *B. forficata*, verifying greater frequency of endophytic fungi in the leaves of this plant, being identified *Colletotrichum* sp. UENF/CF 77 and *Nigrospora* sp. UENF/CF 78. Complementing, Hilarino et al. [43] evaluated the

endophytic distribution in *B. brevipes* leaves from which 1110 colonies were grouped in 126 taxa, due to their morphological characteristics. The main endophytic genus found was *Phomopsis*, followed by *Dothiorella*, *Pestalotiopsis* and *Acremonium*.

Other studies with the genus *Bauhinia* reinforce the present research, such as Pinheiro et al. [44] that reported the isolation of five *Aspergillus* spp. EJC08 of *B. guianensis*, ergosterol (1), ergosterol peroxide (2), mevalolactone (3), monomethylsulocrine (4) and tripacidine (5). Compounds 3, 4 and 5 were tested to evaluate their antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, demonstrating satisfactory activities against these microorganisms. Complementing, Bagchi et al. [45] conducted a study to identify isolated endophytic fungi of leaf, petiole and stem of *B. vahlii*, obtaining three hundred isolates belonging to 38 genera. *Penicillium* sp. (19.6%), *Pestalotiopsis* sp. (12.2%) and *Aspergillus* sp. (10.4%) were the most commonly found, although *Phialophora* sp., *Nigrospora* sp., *Torula* sp., *Bispora* sp., *Curvularia* sp. were also isolated.

The afore mentioned studies revealed similar results that corroborate with the study in this article, since fungi belonging to the genus *Penicillium*, *Aspergillus* and *Curvularia* were also isolated. The predominant frequency of the genus *Penicillium* in *B. monandra*, as well as in *B. vahlii* was confirmed. The genus *Aspergillus* is often isolated as an endophyte in practically all species of *Bauhinia*.

Plants provide a nutrient-rich niche for the growth and development of microorganisms, particularly bacteria. Several endophytic bacteria are being isolated from different plant species, obtained mainly from leaves, in which biotic factors such as host species, genotype and leaf age are determinants in the composition of the microbial communities associated with plants, as well as the geographic distribution of the host plants [46].

Although there are studies on endophytic fungi of species of the genus *Bauhinia*, the genus description of endophytic bacteria and *Actinobacteria* in these plants is scarce, especially in relation to their identification. However, endophytic bacteria have beneficial effects on the plant, since they inhabit the internal tissues and produce substances that confer advantages to the host.

In order to identify the endophytic bacterial strains of *B. monandra* leaves isolated in the present study they were subjected to Gram staining, confirming that 57.5% belonged to the Gram-positive group, of which 43.5% were short rods; 34.8% sporulated long rods and

21.7% coccobacilli, these being identified as *Bacillus* sp., while 42.5% were Gram-negative. The work of Haque et al. [47] when screened the diversity of endophytic bacteria of Chinese cabbage leaves found isolates from four phylogenetic groups: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* (*Cytophaga* sp.), *Firmicutes* (*Bacillus* sp., *Bacillus clausii* and *Bacillus subtilis*) and *Actinobacteria* (*Arthrobacter* sp. and *Mycobacterium* sp.), typical phyla of the aerial part of the plants (phylosphere). The research of Romero et al. [48] characterized endophytic bacteria from tomato leaves identifying strains of *Exiguobacterium aurantiacum*, *Exiguobacterium* spp., *Staphylococcus xylosus*, *Pantoea eucalypti*, *Bacillus methylotrophicus*, *Pseudomonas veronii*, *Pseudomonas rhodesiae* and *Pseudomonas cichorii* that corroborate with results mentioned above.

Continuing bacterial identification, endophytic Gram-negative bacteria isolated from *B. monandra* leaves (n=17) were submitted to biochemical assays (cytochrome oxidase and TSI). As a result, 35.3% were classified as non-fermenting bacilli, while 29.4% belonged to the Enterobacteriaceae family, remaining 35.3% for identification. Therefore, the Enterobacteriaceae found were carried out complementary biochemical tests such as citrate, urea, SIM, MIO and fermentation of carbohydrates, identifying 66.7% belonging to the *Enterobacter* genera; 33.3% to Enteric group 68 and all non-fermenting bacilli were from the genus *Burkholderia*, according to Koneman et al. [24].

Results similar to our research, by Verstraete et al. [49], which identified the bacterial community associated with coffee (*Rubiaceae*), found species of the genus *Burkholderia* such as *B. caledonica*, *B. graminis*, *B. phenoliruptrix* and *B. phytofirmans*, being this genus of endophytic bacteria considered a beneficial group associated to the plant. As well as the study by Aregu et al. [50] in which they obtained fifty-five bacterial isolates of nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp. and *Erythrina brucei*. In addition, identifying most of the isolates as Gram-negative bacteria belonging to genera *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium*, *Serratia* and *Variovorax*. However, seven isolates were classified as Gram-positive bacteria belonging to the genus *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Planomicrobium* and *Rhodococcus*.

As seen in previous results, the endophytic isolates are mostly non-filamentous bacteria and fungi, and a specific protocol is important for the isolation of *Actinobacteria*. Thus, as a

more important factor that influences the process of obtaining cultures of filamentous bacteria, selective culture media allow a more pronounced development of these bacteria [51].

In the present study were used specific media for *Actinobacteria* (ISP-4, ISP-2, ASC and Czapek) allowing isolation of nine strains of endophytic *Actinobacteria* from *B. monandra* leaves, identified through optical microscopy as the genera *Streptomyces* (1F, 3F, 4F, 5F, 6F, 7F, 8F and 9F) with 88.9% containing verticillate and in spiral chains; and *Nocardiosis* (2F) with 11.1% (Fig. 1).

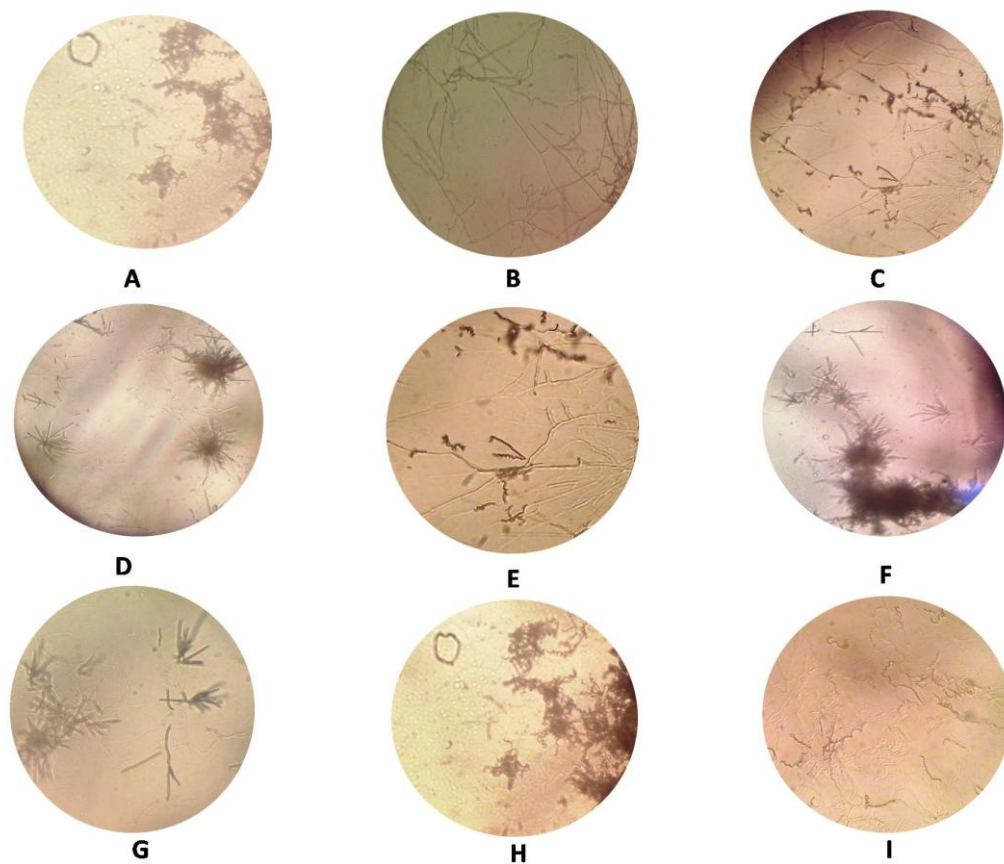


Fig. 1. Optical microscopy of endophytic *Actinobacteria* from leaves of *B. monandra*. A, *Streptomyces* spp. 1F; B, *Nocardiosis* spp. 2F; C, *Streptomyces* spp. 3F; D, *Streptomyces* spp. 4F; E, *Streptomyces* spp. 5F; F, *Streptomyces* spp. 6F; G, *Streptomyces* spp. 7F; H, *Streptomyces* spp. 8F; I, *Streptomyces* spp. 9F.

Several studies report the isolation and identification of actinobacteria. Denis et al. [52] mentioned the isolation of eighteen *Actinobacteria* from male cones of *Pinus sylvestris*, in addition to common genera such as *Streptomyces*; several species belonging to the genus *Rhodococcus*, *Amycolatopsis*, and *Micromonospora* were also found. Mei et al. [53] carried out a comparative study between endophytic and rhizosphere *Actinobacteria* of

Centella asiatica. The results showed that the community of *Actinobacteria* in the plant tissue was slightly more diversified compared to the rhizosphere, revealing the families *Streptomycetaceae* (83-100%), *Micromonosporaceae* (99-100%) and *Gordoniaceae* (99%). Six genera belonging to these families were identified: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Verrucosisspora*, *Actinoplanes*, *Couchioplanes* and *Gordonia*.

Together with the optical microscopy, biochemical, nutritional and physiological characterization can be carried out in order to reinforce the classification and identification of *Actinobacteria*. Some assays can be performed, such as plate culture method, use of different carbon and nitrogen sources, antibiotic resistance, substrate degradation tests, growth development under different conditions and biochemical tests, such as catalase and proteolysis [54,55].

The different nutritional composition present in the culture media are of great importance to observe variations in the development of microorganisms. The method of plaque cultivation allows the analysis from the morphological characteristics of *Actinobacteria*, such as the presence, shape and color of mycelia and spores, as well as the characteristics of colonies, which can be used to classify the family and genus [56,57].

In this way, the present work using the development in culture media for endophytic *Actinobacteria* of *B. monandra* leaves verified that they did not reveal very diversified colors of mycelium, mainly aerial mycelium, which were: white, gray, white with border gray and gray with white borders; also showed the presence of soluble pigments: yellow and brown (Table 1).

Table 1: Macroscopic characteristics: microculture of endophytic *Actinobacteria* from leaves of *B. monandra*.

Actinobacteria	Aerial mycelium color / soluble pigment					
	ISP-2	ISP-4	ASC	GAA	CZ	MC
<i>Streptomyces</i> spp. 1F	white	absent	white	white/ yellow	white	white

<i>Nocardiopsis</i> spp. 2F	gray	gray/ brown	white/ gray	white	white/ brown	white/ gray
<i>Streptomyces</i> spp. 3F	white	white / yellow	absent / brown	absent / yellow	white / yellow	absent
<i>Streptomyces</i> spp. 4F	white	white / gray	white	gray/ yellow	gray	gray
<i>Streptomyces</i> spp. 5F	white/ gray	gray/ white	absent	absent	absent	white
<i>Streptomyces</i> spp. 6F	white	absent	white	white	gray	gray
<i>Streptomyces</i> spp. 7F	white	white	white	white	white	absent
<i>Streptomyces</i> spp. 8F	gray	gray/ brown	white/ gray	white / brown	white / brown	white/ gray
<i>Streptomyces</i> spp. 9F	absent	absent	absent	white	white	absent

Culture media: ISP-2, International *Streptomyces* project medium 2; ISP-4, Agar inorganic starch salts; ASC, Agar starch casein; GAA, Glycerol asparagine agar; CZ-Czapek; CM, Complete medium.

Atta et al. [58] using the biochemical, nutritional and physiological characterization with the *Actinobacteria* AZ-55 isolated from soil, carried out a comparative study with international keys, suggesting that the isolate was *Streptomyces lydicus*, being later confirmed the identification with the analysis of the ribosomal sequence of RNA 16S.

Using the growth and fermentation assay on a single carbon source it was found that the endophytic *Actinobacteria* of *B. monandra* leaves grew at all the sources of carbon used as described in Table 2. Regarding the fermentation, it was possible to analyze that all of the *Actinobacteria* fermented D-glucose, D-xylose, D-maltose and dextrin, while all of them did not ferment D-sorbitol and adonitol.

The other carbohydrates had different results with all *Actinobacteria*. D-sucrose (22.2%), D-lactose (66.7%), D-mannitol (55.6%), D-arabinose (11.1%), L-rhamnose (88.9%), L-arabinose and trehalose (77.8%), and meso-inositol (44.4%), fermented; D-sucrose (77.8%), D-lactose (33.3%), D-mannitol (44.4%), D-arabinose (88.9%), L-rhamnose (11.1%), L-arabinose and trehalose (22.2%), and meso-inositol (55.5%), did not ferment.

Streptomyces spp. 3F fermented 80% of all carbohydrates; *Streptomyces* spp. 4F and *Streptomyces* spp. 6F have the same phenotypic profile.

Table 2: Phenotypic growth and fermentation evaluation of endophytic *Actinobacteria* from a single source of carbon.

Carbohydrates	Growth in single carbon source and/or fermentation								
	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	8F	9F
D-Glucose	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
D-Sucrose	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
D-Xylose	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
D-Lactose	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+
D-Manitol	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+
D-Sorbitol	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
D-Arabinose	+/-	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
D-Maltose	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
L-Ramnose	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
L-Arabinose	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+
Trehalose	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/-
Meso-Inositol	+/+	+/-	+/+	+/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+
Dextrin	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Adonitol	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

(+) Positive; (-) negative.

The evaluation of the growth in different NaCl concentrations allowed verifying that all endophytic *Actinobacteria* of *B. monandra* leaves are tolerant until a 3% concentration of sodium chloride. However the strains *Streptomyces* spp. 1F, *Streptomyces* spp. 5F and *Streptomyces* spp. 9F are tolerant up to 7% of salt and *Streptomyces* spp. 4F, *Streptomyces* spp. 6F and *Streptomyces* spp. 8F are halotolerant up to 5%; and *Streptomyces* spp. 7F is also tolerant up to 7%, as is evident from Table 3. Regarding the growth in different pH values, 77.8% of the *Actinobacteria* tested grew in all pH ranges, except *Streptomyces* spp. 4F, and *Streptomyces* spp. 6F, which had growth in alkaline pH ranges (9 and 10). *Streptomyces* spp. 4F and *Streptomyces* spp. 6F also showed similar results for the growth assays at different concentrations of NaCl and pH values.

Table 3: Phenotypic growth evaluation of endophytic *Actinobacteria* at different concentrations of NaCl and pH values.

<i>Actinobacteria</i>	Phenotypic Assays							
	NaCl concentrations				pH values			
	1%	3%	5%	7%	4	5	9	10
<i>Streptomyces</i> spp. 1F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nocardiopsis</i> spp. 2F	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 3F	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 4F	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 5F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 6F	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 7F	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 8F	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Streptomyces</i> spp. 9F	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Growth; (-) Absence of growth.

Enzymes in general are used in food, pharmaceutical, detergent, textile and cosmetic industries showing a variety of biotechnological activities, such as hydrolysis of polymers, synthesis of compounds, and decontamination of soils, among others. Enzymes produced by fungi and bacteria have a number of advantages, such as large-scale yield, relatively low production cost and susceptibility to genetic manipulation [59]. The search for other potential enzymatic sources led to the discovery of enzymes produced by endophytes, which were initially obtained by soil microorganisms; *Actinobacteria* are a promising group in enzymatic production [60].

In relation to enzymatic production capacity, all endophytic *Actinobacteria* from *B. monandra* leaves were able to hydrolyze starch, cellulose, Tween 20 and 80, confirming the presence of amylase, cellulase, lipase and esterase, respectively. In the tyrosine assay, all strains were positive except *Streptomyces* spp. 1F. In the production evaluation of pectinase and casein protease all actinobacteria were positive, however in relation to gelatin degradation only *Nocardiopsis* spp. 2F was negative.

The production of the melanin pigment was only observed in *Streptomyces* spp. 3F, and the production of sulphide in *Streptomyces* spp. 3F, *Streptomyces* spp. 5F and *Streptomyces* spp. 8F. Only *Streptomyces* spp. 3F strain reacts positively to melanin production, as well as to hydrogen sulphide, *Streptomyces* spp. 8F and *Streptomyces* spp. 5F strains produced only hydrogen sulphide.

Within this context the study of Mitsuiki et al. [61] described a strain *Nocardiopsis* spp. alkalophilic (TOA-1) producing a variety of alkaline hydrolytic enzymes, as well as an alkaline protease, designated NAPase; it had a keratinolytic activity and high stability under acidic conditions, being functional in the range of pH 9-10. Singh et al. [62] characterized an alkaline serine protease obtained from a *Streptomyces clavuligerus* (Mit-1), stable in several pH ranges, of extreme resistance against chemical denaturation by urea. These studies corroborate with the present work since the endophytic *Actinobacteria* of *B. monandra* leaves also showed production of several enzymes, including proteases.

4. CONCLUSIONS

The methodology used in this work was adequate to isolate and identify endophytes from *B. monandra* leaves, as well as to provide supporting data that these microorganisms are

not epiphytic, since sterile controls were free of microorganisms.

There was a predominance of endophytic fungi from the genus *Penicillium*; also, original data were reported on the identification of non-filamentous endophytic bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Burkholderia* and *Enterobacter*, as well as endophytic *Actinobacteria* from the genera *Streptomyces* and *Nocardiosis*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for fellowship (LCBBC), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco/FACEPE.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

References

1. Peixoto-Neto PAS, Azevedo JL, Araújo, WL. Endophytic microorganisms. *BiotechnolSci Develop.* 2002; 29(1):62-76.
2. Costa, M. G. C.; Scherwinski-Pereira, J. E.; Otoni, W. C. Importance of contamination and endemic microorganisms in the culture of plant cells, tissues and organs. *Emb Infor Techno.* 2010; 1(1): 17-89.
3. Gutierrez RMP, Gonzalez AMN, Ramirez AM. Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Curr Med Chem.* 2012;19(18):2992-3030.
4. Polli A., Neves AF, Gallo F, Gazarini J, Rhoden SA, Pamphilea JA. Aspects of the interaction of endophytic microorganisms and host plants and their application in biological control of pests in agriculture. *J HealthBiol.* 2012;7(2):82-89.
5. Nair D, Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants. *Environment and Humans.Sci World J.* 2014; 1(4):1-11.
6. Strobel GA, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.*2003;67(4):491-502.
7. Bandara WMMS, Seneviratne G, Kulasooriya SA. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *J Biosci.* 2006; 31(5):645-650.
8. Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One.* 2013; 8(2):1-9.
9. Mussi-Dias V, Araújo ACO, Silveira SF, Rocabado JMA, Araújo KL. Endophytic fungi associated with medicinal plants. *J BrazMed Pl.*2012;14(2):261-266.
- 10.Santos TT, Varavallo MA. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. *Semina: Biol Health Sci.* 2011;32(2):199-212.
- 11.Janso JE, Carter GT. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(13):4377-4386.
- 12.Melnick RL, Suárez C, Bailey BA, Backman PA. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biol Control.* 2011;57(3):236-245.
- 13.Hanada RE, Pomella AWV, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira, JO. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biol.*2010;11(4):901-910.
- 14.Afzal M, Khan QM, Sessitsch A. Endophytic bacteria: Prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants.*Chemosphere.* 2014;117(5):232-242.
- 15.Nascimento TL, Oki Y, Lima DMM, Almeida-Cortez JS, Fernandes GW, Souza-Motta CM. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropisprocera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol.* 2015; 14(3):79-86.

16. Andrade CAS, Baszkin A, Magalhães NSS, Coelho LCB, Melo CP. Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and *Concanavalin A* lectin monolayers, part I. J Colloid Interface Sci. 2005;289 (2):371-378.
17. Coelho LCB, Silva MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. Phytochem Anal. 2000;11(1):295-300.
18. Fernandes AJD, Ferreira MRA, Randau KP, Souza TP, Soares, LAL. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpinaceae). Sci World J. 2012;1(2):1-7.
19. Menezes FS, Minto ABM, Ruela HS, Kuste RM, Sheridan H, Frankish N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. J Braz Pharmac. 2007;17(1):8-13.
20. Argôlo ACC, Malta GSAA, Pletsch M, Coelho LCB. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. Bioresource Technol. 2004;95(2):229-233.
21. Ramos SAF, Silva LCN, Correia MTS, Araújo JM, Coelho LCB. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. Afr J Microbiol Res. 2016;10(17):600-607.
22. Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, Van-Elsas JD, Van-Vuurde JW, Azevedo JL. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Appl Environ Microbiol. 2002;68(10):4906-14.
23. Rhodes ME. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. J Appl Microbiol. 1957;20(1):108-118.
24. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
25. Larone DH. Medically important fungi: a guide to identification. 15th ed. New York: Elsevier; 1987.
26. Holt JG, Williams ST, Sharpe ME. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
27. Williams ST, Goodfellow M, Wellington EM, Vickers JC, Alderson G, Sneath PH et al. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. J Gen Microbiol. 1983;129(6):1815-1830.
28. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol. 1966;16(1):313-340.
29. Neirotti E, Azevedo JL. Semiquantitative evaluation of cellulase production in *Humicola* sp. J Microbiol. 1988;19(1):78-81.
30. Chapman GS. A simple method for making multiple tests on a microorganism. J. Bacteriol. 1952;63(1):147-151.
31. Hankin L, Zucker M, Sands DC. Improved solid medium for the detection and enumeration of proteolytic bacteria. Appl. Microbiol. 1971;22(1):205-509.
32. Anderson JA. Mikrobiology. 3th ed. Berlin: Kongress; 1939.
33. Pridham TG, Anderson P, Foley C, Lindenfelser LA, Hesselting CW, Benedict RG. A section of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. Antibiotics Ann. 1957;2(1):947-953.
34. Cowan, S.T. Manual For The Identification of Medical Bacteria. 2th ed. Cambridge: Univ. Press; 1974.
35. Pridham TG, Gottlieb D. The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. J Bacteriol. 1948;56(1):107-114.
36. Shirling EB, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* II. Species descriptions from first study. Int J Syst Bacteriol. 1968;18(1):69-189.
37. Souza IFAC, Napoleão TH, Sena KXRF, Paiva PMG, Araújo JM, Coelho LCB. Endophytic microorganisms in leaves of *Moringa oleifera* collected in three localities at Pernambuco State, Northeastern Brazil. Br Microbiol Res J. 2016;13(5):1-7.
38. Jin H, Yang XY, Yan ZQ, Liu Q, Li XZ, Chen JX, Zhang DH, Zeng LM, Qin B. Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. Syst Appl Microbiol. 2014;37(5):376-385.
39. Rodrigues, K.F.; Hesse, M.; Werner, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by fungi from *Spodias mombin*. J Basic Microbiol. 2000;40(4):261-267.
40. Zou WX, Meng JC, Lu H, Chen GX, Shi GX, Zhang TY et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. J Nat Prod. 2000;63(11):1529-1530.
41. Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(3):457-473.
42. Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva-Nogueira EB. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. J Braz Microbiol. 2015;46(1):49-57.
43. Hilarino MPA, Silveira FAO, Oki Y, Rodrigues L, Santos JC, Junior AC. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). Acta Bot Bras. 2011;25(4):815-821.

44. Pinheiro EAA, Carvalho JM, Santos DCP, Feitosa AO, Marinho PSB, Guilhon, GMSP. Chemical constituents of *Aspergillus* sp. EJC08 isolated as endophyte from *Bauhinia guianensis* and their antimicrobial activity. *Anais Acad Brasil Ci.* 2013;85(4):1247-1253.
45. Bagchi B, Banerjee D. Diversity of fungal endophytes in *Bauhinia vahlii* (A Lianas) from different regions of Paschim Medinipur District of West Bengal. *Inter J Sci Environ Technol.* 2013;2(4):748-756.
46. Dimitroula H, Syranidou E, Manousaki E, Nikolaidis NP, Karatzas GP, Kalogerakis N. Mitigation measures for chromium-VI contaminated groundwater-The role of endophytic bacteria in rhizofiltration. *J Hazard Mater.* 2015;281(1):114-120.
47. Haque MDA, Lee JH, Cho KM. Endophytic bacterial diversity in Korean kimchi made of Chinese cabbage leaves and their antimicrobial activity against pathogens. *Food Control.* 2015;56(1):24-33.
48. Romero FM, Marina M, Pieckenstain FL. Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Res Microbiol.* 2016;167(3):222-233.
49. Verstraete B, Janssens S, Lemaire B, Smets E, Dessein S. Phylogenetic Lineages in *Vanguerieae* (*Rubiaceae*) Associated with *Burkholderia* Bacteria in Sub-Saharan Africa. *Am J Bot.* 2013;100(12):2380-2387.
50. Aregu AA, Leena AR, Fassil A, Asfaw H, Kristina L. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(23):10117-10134.
51. Cunha IGB, Sobrinho TJSP, Silva REA, Amorim ELC, Araujo JM. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;90(2):120-123.
52. Denis VAG, Irina VV, Yuriy VR, Bogdan TT, Tatyana AP, Tatyana GG et al. Actinobacteria possessing antimicrobial and antioxidant activities isolated from the pollen of scots pine (*Pinus sylvestris*) grown on the Baikal shore. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2016;109(10):1307-1322.
53. Mei E, Dedy DS, Yulin L. Community structures of endophytic actinobacteria from medicinal plant *Centella asiatica* L. urban-based on metagenomic approach. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8(2):292-297.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 1983;129(6):1743-1813
54. Lechevalier HAA. Practical guide to generic identification of actinomycetes. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* New York: Williams e Wilkins;1989.
55. Gil SV, Pastor S, March GJ. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiol Res.* 2009;164(2):196-205.
56. Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. *Current Microbiol.* 2011;62(1):182-190.
57. Atta HM, El-Sayed AS, El-Desoukey MA, Hassan M, El-Gazar M. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. *J Saudi Chem Soc.* 2015; 19(4): 360-371.
58. Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB. Extracellular enzymes produced by endophytic fungi isolated from *Baccharisdracunculifolia* (Asteraceae). *Global Sci Technol.* 2011;4(2):47-57.
59. Choi YW, Hodgkiss IJ, Hyde KD. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *J Ag. Sci Tech.* 2005;1(1):55-66.
60. Mitsuiki S, Sakai M, Moriyama Y, Goto M. and Furukawa K, Purification and some properties of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* ssp. TOA-1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(1):164-167.
61. Singh SP, Thumar JT, Gohel SD, Purohit MK. Molecular diversity and enzymatic potential of salt-tolerant alkaliphilic actinomycetes. *Curr Res Technol.* 2010;10(2):280-286.

Capítulo III

Potencial enzimático e antimicrobiano de actinobactérias endofíticas de folhas de *Bauhinia monandra*

Artigo (traduzido) será submetido ao periódico Anais da Academia Brasileira de Ciências

Potencial enzimático e antimicrobiano de actinobactérias endofíticas de folhas de *Bauhinia monandra*

Rosilma de Oliveira Araujo Melo¹;

Igor Felipe Andrade Costa de Souza²;

Carlos Vinícius Jackes de Oliveira;

Janete Magali de Araújo¹;

Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena¹;

Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{3*}

¹Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Avenida dos Economistas, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 52171-011, Brasil.

²Faculdade Integrada de Pernambuco, Avenida Caxangá, nº 4477, Várzea, Recife-PE, CEP 50740-000, Brasil.

³Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE, Avenida Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50670-420, Brasil.

Título abreviado: Potencial enzimático e antimicrobiano de *Actinobacteria*

Palavras chave: actinobactérias endofíticas, antimicrobianos, *Bauhinia monandra*, enzimas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

*Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho: Av. Dr. José Augusto Moreira, nº 294, Casa Caiada, Olinda-PE, CEP: 53130-410, Brasil. Telefone/fax: (81) 3011-1044, e-mail: lcbbcoelho@gmail.com

ABSTRACT

Studies with endophytic microorganisms have aroused scientific interest due to the discovery of several new bioactive substances. Due to the lack of reports on the enzymatic and antimicrobial potential of endophytic actinobacteria from *Bauhinia monandra* leaves, this research has the following objectives: to verify the enzymatic and antimicrobial production; Production, extraction and chromatographic analysis of antimicrobial compounds. In the present study, it was found that all actinobacteria produced qualitatively amylase, pectinase, lipase, esterase, cellulase and caseinase. The evaluation of the primary antimicrobial activity of the endophytic actinobacteria of *B. monandra* leaves, performed by the gelose block assay showed that the endophytic strains *Nocardia* spp.

2F, *Streptomyces* spp. 3F, *Streptomyces* spp. 5F, *Streptomyces* spp. 6F and *Streptomyces* spp. 8F, had antimicrobial activity only against Gram-positive bacteria, mainly strains of *Staphylococcus aureus* (n = 16), multiresistant clinical isolates and resistant oxacillin (ORSA). The endophytic strain *Streptomyces* spp. 5F was the best producer of antimicrobial substances in 11 of the 12 submerged culture media against five strains of *S. aureus* isolates clinically, selecting ISP-3 medium with better productive performance. The extractive process of the active products with solvents was successful with the mycelial mass, standing out the methanol. According to the high efficiency chromatographic separation of the crude extracts: aqueous of the metabolic liquid (AEL) and mass methanol (MME), the fractionation showed that the two extracts presented compounds with polar nature. These results demonstrate that the prospection of endophytic microorganisms is a valuable source in the acquisition of new species and new bioactive metabolites, as well as the discovery of molecules with promising enzymatic and antimicrobial activity against multiresistant bacteria of the genus *Staphylococcus*.

RESUMO

Estudos com micro-organismos endofíticos têm despertado interesse científico devido à descoberta de diversas substâncias bioativas inéditas. Por não existirem relatos sobre o potencial enzimático e antimicrobiano de actinobactérias endofíticas das folhas de *Bauhinia monandra*, esta pesquisa tem como objetivos: verificar a produção enzimática e antimicrobiana; produção, extração e análise cromatográfica dos compostos antimicrobianos. No presente estudo, verificou-se que todas as actinobactérias produziram qualitativamente amilase, pectinase, lipase, esterase, celulase e caseinase. A avaliação da atividade antimicrobiana primária das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*, realizada pelo teste de bloco de gelose mostrou que as cepas endofíticas *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp. 3F, *Streptomyces* spp. 5F, *Streptomyces* spp. 6F e *Streptomyces* spp. 8F, possuíam atividade antimicrobiana apenas diante de bactérias Gram-positivas, principalmente cepas de *Staphylococcus aureus* (n=16) isolados clínicos multirresistentes e oxacilina resistente (ORSA). A estirpe endofítica *Streptomyces* spp. 5F destacou-se como melhor produtor de substâncias antimicrobianas em 11 dos 12 meios de cultura submersa perante cinco cepas de *S. aureus* isolados clínicos, selecionando o meio ISP-3 com melhor desempenho produtivo. O processo extrativo dos produtos ativos com solventes foi bem sucedido com a massa micelial, destacando-se o metanol. Segundo separação cromatográfica de alta eficiência dos extratos brutos: aquoso do líquido metabólico (EAL) e metanólico da massa (EMM), o fracionamento demonstrou que os dois extratos apresentavam compostos com natureza polar. Estes resultados demonstram que a prospecção de micro-organismos endofíticos constitui uma fonte valiosa na obtenção de novas espécies e novos metabólitos bioativos, bem como a descoberta de moléculas com atividade enzimática e antimicrobiana promissora diante de bactérias multirresistentes do gênero *Staphylococcus*.

1. INTRODUÇÃO

As actinobactérias abrangem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas Gram-positivas. Amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em vários habitats como: água; plantas em decomposição; nódulos de raízes, sedimentos, lodo ativado, fezes de animais e produtos alimentícios, porém seu hábitat principal é o solo (Madigan et al. 2010).

Todas as plantas apresentam em seu interior micro-organismos, até mesmo diversas espécies em um único hospedeiro, se tornando uma fonte promissora para o isolamento de actinobactérias presentes nos tecidos internos de vegetais superiores. Estas actinobactérias endofíticas têm demonstrado extraordinária capacidade biossintética em cultura (Kurtboke, 2011). Actinobactérias endofíticas, que podem ser recuperadas a partir de tecidos saudáveis da planta após desinfecção de superfície, são conhecidas por produzir uma variedade de metabólitos bioativos como: antibióticos, enzimas e promotores de crescimento das plantas. No entanto, informações sobre a biodiversidade, distribuição nos tecidos vegetais e potencial biossintético de actinobactérias endofíticas de plantas selvagens e nativas são escassas (Chaudhary et al. 2013).

As enzimas de origem microbiana despertam mais interesse em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica, como: diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (Cuzzi et al., 2011). A utilização de enzimas microbianas vem apresentando grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. A busca por novas técnicas que otimizem o custo para a produção do combustível álcool é cada vez mais intensa e por isso estudos são cada vez mais frequentes na tentativa de descobrir novas celulasas hidrolisadoras de celulose e hemicelulose (Siqueira et al., 2010). As amilases apresentam grande importância biotecnológica, como aplicações nas indústrias de: detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação e cereais (Syed; Agasar; Pandey, 2009). A produção de protease tem sido estudada com várias finalidades industriais tais como processamento de alimentos, bebidas, couro, formulação de detergentes, no amaciamento da carne e formulação de medicamentos (Carrimetal., 2006).

A pesquisa de compostos biologicamente ativos para fins terapêuticos provenientes de micro-organismos endofíticos obtidos de plantas utilizadas pela medicina popular tem enriquecido a descoberta de novos fármacos com potenciais antiinflamatório, antimicrobiano e antitumoral, entre outros (Cao et al. 2004). Desta forma a espécie *B. monandra* tem sido usada na medicina alternativa como agente antidiabético e antioxidante. Diversos estudos farmacológicos foram realizados com essa espécie, entretanto não existem estudos quanto à utilização biotecnológica de endofíticos. (Fernandes et al. 2012).

As actinobactérias endofíticas possuem metabolismo extremamente rico e produzem metabólitos secundários de extraordinária variabilidade química, uma vez que o mesmo composto pode ser sintetizado por diferentes estirpes (*Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Micromonospora*, *Nocardia*), os quais atraem o interesse de diversas indústrias (Soares et al. 2012). As enzimas produzidas por actinobactérias endofíticas são usadas em uma variedade de atividades biotecnológicas tais como: hidrólise de polímeros, síntese de compostos, descontaminação de solos. Entre as atividades, o melhoramento dos processos industriais usando as enzimas produzidas por micro-organismos é um importante campo na pesquisa, pois apresenta uma série de vantagens, como: facilidade de produção em larga escala, custo de produção relativamente baixo e susceptibilidade de manipulação genética (Cuzzi et al. 2011).

Vários produtos naturais com estruturas químicas diferentes são sintetizados pelas actinobactérias endofíticas, principalmente pelo gênero *Streptomyces*, que produz inúmeros antibióticos e continua sendo considerada uma fonte rica de novos metabólitos bioativos (Goodfellow and Fiedler 2010; Waksman et al. 2010). A produção da maior parte das substâncias antimicrobianas é específica de cada espécie, e esses metabólitos são importantes para as actinobactérias, pois conferem vantagens em comparação com outros micro-organismos no ambiente (Procópio et al. 2012).

O desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas (Rang et al. 2004; Silveira et al. 2006). Entretanto, o uso inadequado e excessivo desses antimicrobianos tem causado desenvolvimento de micro-organismos resistentes, tornando-se uma ameaça para a saúde pública (Shore et al.

2011). Em destaque, as infecções hospitalares, comunitárias e intoxicações são causadas principalmente por *Staphylococcus aureus* que apresentam alta virulência e resistência adquirida aos antibióticos usados na terapêutica. como cepas de *S. aureus* resistente à oxacilina (ORSA) e metilicilina (MRSA)(Foster 2005; Tenover 2006).

Desta forma as actinobactérias endofíticas tem sido uma fonte para descoberta de metabólitos bioativos, uma vez que a biodiversidade de plantas e inúmeros habitats abriga um grande número de micro-organismos com capacidade para produzir compostos biotecnologicamente importantes, indicando que pesquisas envolvendo produção de enzimas e antibióticos por micro-organismos endofíticos, constituem uma fonte inesgotável de novos compostos bioativos. Por não se ter relatos de trabalhos anteriores sobre o potencial enzimático e antimicrobiano de actinobactérias endofíticas de *Bauhinia monandra*, esta pesquisa tem como objetivos: verificar a produção das enzimas: amilase, celulase, lipase, esterase, pectinase, tirosinase, caseinase e gelatinase; seleção da actinobactéria endofítica com elevado potencial antimicrobiano, para posterior produção dos metabolitos ativos em cultivo submerso; extração e separação cromatográfica dos compostos antimicrobianos obtidos do melhor meio de cultura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Actinobactérias endofíticas

As actinobactérias foram isoladas de folhas de *Bauhinia monandra* coletadas na cidade do Recife, no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, 8°03'0.05"S34°56'59.68"W), e identificadas como *Streptomyces* spp. 1F; *Nocardiosis* spp. 2F; *Streptomyces* spp. 3F; *Streptomyces* spp. 4F; *Streptomyces* spp. 5F; *Streptomyces* spp. 6F; *Streptomyces* spp. 7F; *Streptomyces* spp. 8F e *Streptomyces* spp. 9F.

2.2 Atividade Enzimática

A capacidade de cada estirpe para produzir diferentes enzimas foi examinada usando métodos padrões. Lipase e esterase de acordo com Neirotti; Azevedo (1988); protease (gelatinase e caseinase) de acordo com Chapman (1952); pectinase, tirosinase e celulase de acordo com o método de Hankin et al. (1971); α -amilase de acordo com o método de

Anderson (1939); A atividade enzimática foi determinada pelo método de Hanki and Anagnostakis (1975), através da relação entre o diâmetro do halo de degradação e diâmetro da colônia, com valores expressos como índice enzimático (IE). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA ($p < 0,05$), sendo as comparações das médias realizadas através do t. test ou teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Statistica 8.0 (StatSoft. Inc.).

2.3 Atividade Antimicrobiana

2.3.1 Bloco de gelose ou plugs

A produção primária de compostos antimicrobianos foi estimada por meio da técnica de bloco de gelose (Ichikawa et al., 1971), utilizando-se *Staphylococcus aureus* (01 UFPEDA), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Candida albicans* (1007 UFPEDA) como micro-organismos teste. Bem como 15 cepas de *S. aureus* isolados clínicos multirresistentes: UFPEDA 670, UFPEDA 671 (ORSA), UFPEDA 672, UFPEDA 691, UFPEDA 700, 707 UFPEDA, 711 UFPEDA, 718 UFPEDA, 719 UFPEDA (ORSA), 725 UFPEDA, 728 UFPEDA, 729 UFPEDA, 730 UFPEDA, 731 UFPEDA e 732 UFPEDA (ORSA). Placas de Petri contendo agar Müller-Hinton foram inoculadas com uma suspensão (10^8 UFC/mL) dos micro-organismos teste ou isolados clínicos, padronizadas pelo tubo nº 0,5 da escala de MacFarland.

As actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* foram semeadas em forma de tapete em agar ISP-2 por 7 dias a 30°C. Posteriormente, foram obtidos cilindros de 6,0 mm de diâmetro, sobrepostos nas placas previamente inoculadas com os micro-organismos teste. As placas foram incubadas por 24h a 35°C. A produção de biocompostos com atividade antimicrobiana foi verificada pela formação de halos claros de inibição do crescimento microbiano e expressos em milímetros (mm). O efeito inibitório perante os micro-organismos testados foi classificado de acordo com Sahin; Ugur (2003), sendo o tamanho da área de inibição dividido em: inativo (<10mm); parcialmente ativo (11mm a 20mm); moderadamente ativo (21 a 30 mm); e altamente ativo (>31mm).

2.3.2 Fermentação

Para a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana em meios líquidos foi selecionada a actinobactéria endofítica com efeito inibitório altamente ativo diante os micro-organismos no teste anterior. Foram testados os meios de cultura submersos, visando avaliar o melhor meio e tempo de produção do princípio bioativo (Tabela 1).

Tabela 1: Composição nutricional dos meios de cultura complexos para produção de compostos antimicrobianos

Meio de cultura	Composição
MPE	g/L: 20.0 glicose; 20.0 farinha de soja; 5.0 NaCl; 2.0 CaCO ₃ . pH: 7.0 ± 0.2
MK	g/L: 4.0 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 10.0 glicose; 5.0 farinha de soja; 3.0 CaCO ₃ ; 5.0 NaCl. pH: 7,0± 0.2
M615	332 ml leite soja; g/l: 50.0 glicose; 10.0 CaCO ₃ . pH: 7,0± 0.2
ISP-2	g/L: 4.0 extrato de levedura; 10.0 extrato de malte; 4.0 glicose, 5.0 amido. pH: 7,0± 0.2
MMM	g/l: 10.0 glicose; 5.0 casitona; 20.0 amido; 5.0 extrato de levedura; 1.0CaCO ₃ . pH 7.2± 0.2
ISP-4	g/L: 20.0 amido; 2.0 K ₂ HPO ₄ ; 2.0 MgSO ₄ . 7H ₂ O; 2.0 NaCl; 4.0 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 4.0 CaCO ₃ ; 2mL/1L solução de traços de sais: 1.0 mg FeSO ₄ .7H ₂ O, 1.0 mg MnSO ₄ .7H ₂ O, 1.0 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O. pH: 7,0 - 7.4
ISP-3	g/L: 20 farinha de aveia; 1mL/1L solução de traços de sais: 1.0 mg FeSO ₄ .7H ₂ O, 1.0 mg MnSO ₄ .7H ₂ O, 1.0 mg ZnSO ₄ .7H ₂ O. pH 7.2± 0.2
M410	g/l: 10.0 glicose; 10.0 glicerol; 15.0 casaminoácidos; 5.0 farinha de aveia; 10.0 peptona; 5.0 extrato de levedura; 1.0 CaCO ₃ . pH 7.2± 0.2
M1	g/l: 10.0 glicose; 10.0 farinha de soja; 5.0 NaCl; 1.0CaCO ₃ ; 0.15 K ₂ HPO ₄ . pH 7.2± 0.2
M1L	g/l: 10.0 glicose; 10.0 farinha de casca de laranja; 5.0 NaCl; 1.0CaCO ₃ ; 0.15 K ₂ HPO ₄ . pH 7.2± 0.2
M1MA	g/l: 10.0 glicose; 10.0 farinha de casca de maracujá; 5.0 NaCl; 1.0CaCO ₃ ; 0.15 K ₂ HPO ₄ . pH 7.2± 0.2
M1MI	g/l: 10.0 glicose; 10.0 mix de farinhas (quinoa, maracujá, trigo, soja, aveia, gergelim e linhaça); 5.0 NaCl; 1.0CaCO ₃ ; 0.15 K ₂ HPO ₄ . pH 7.2± 0.2

Foram utilizados Erlenmeyers (250mL) contendo 50mL de cada meio de cultura, inoculados com a actinobactéria endofítica selecionada e cultivados sob agitação-180rpm a 28°/30°C por 24h. Em seguida 10% (v/v) deste pré-inóculo foi utilizado para inocular cinco Erlenmeyers de cada meio contendo cada um 100mL cultivados nas mesmas condições de rotação e temperatura por 168 h. A atividade antimicrobiana e pH foi

acompanhado em intervalos de 24 em 24 h durante a realização do experimento (Kawamura et al.1976).

A atividade antimicrobiana foi estimada empregando-se o método da difusão em disco descrito por Bauer et al. (1966),utilizando cinco cepas de *S. aureus* isolados clínicos. Os sobrenadantes alíquotados a cada 24h durante a fermentação em cada meio de cultivo, foram utilizados para impregnar os discos de papel-filtro (6 mm) e aplicados na superfície da placa teste (24h a 37°C). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram determinados pela média aritmética dos halos de inibição em milímetro.

2.3.3Extração e obtenção do composto bioativo

Verificado o melhor tempo e meio para produção dos metabólitos, o líquido metabólico foi centrifugado e a biomassa (pellet) tratada com solventes: acetato de etila, clorofórmio, éter etílico, ciclohexano, hexano, etanol, metanol e acetona, enquanto o fermentado (sobrenadante) em pH 2, 7 e 9 foi tratado com clorofórmio, acetato de etila, éter etílico, ciclohexano e hexano, sendo o pH final dos extratos corrigido para 7(Lyra et al.1964). A verificação de atividade antimicrobiana dos extratos obtidos do liquido e da massa foram avaliados com o teste de difusão em agar (Bauer et al. 1966). Foi iniciado o processo de separação dos compostos antimicrobianos no extrato com destaque na atividade antibiótica através da análise cromatográfica líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo (Agilent, série 1100), utilizando-se coluna de fase reversa (C-18) (Agilent Technologies), fluxo de 1 mL.min⁻¹, detector de UV/Vis (370nm) durante 40min e fase móvel de metanol:água:acetonitrila 40:45:15.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade enzimática das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*.

As enzimas em geral são utilizadas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, detergentes, têxteis e cosméticas, mostrando uma variedade de atividades biotecnológicas, como hidrólise de polímeros, síntese de compostos e descontaminação de solos, entre outras. Enzimas produzidas por fungos e bactérias têm uma série de vantagens, tais como rendimento em larga escala, custo de produção relativamente baixo e susceptibilidade à manipulação genética (Cuzzi et al. 2011). As enzimas foram inicialmente obtidas por micro-organismos do solo, principalmente as actinobactérias,

entretanto a busca por outras fontes potenciais enzimáticas desencadeou na descoberta da produção destas por micro-organismos endofíticos (Choi et al. 2005).

No presente estudo, a metodologia utilizada para verificar quantitativamente a capacidade de produção enzimática foi eficiente, demonstrando que todas as actinobactérias endofíticas das folhas de *B. monandra* foram capazes de hidrolisar amido, pectina, Tween 20 e 80; e celulose, confirmando a presença de amilase, pectinase, lipase e esterase; e celulase, respectivamente como pode ser observada na figura 1. No ensaio de tirosinase todas as estirpes foram positivas exceto *Streptomyces* spp. 1F. Na avaliação da produção de caseinase todas as actinobactérias foram positivas, no entanto, para a degradação da gelatina apenas *Nocardiopsis* spp. 2F foi negativo.

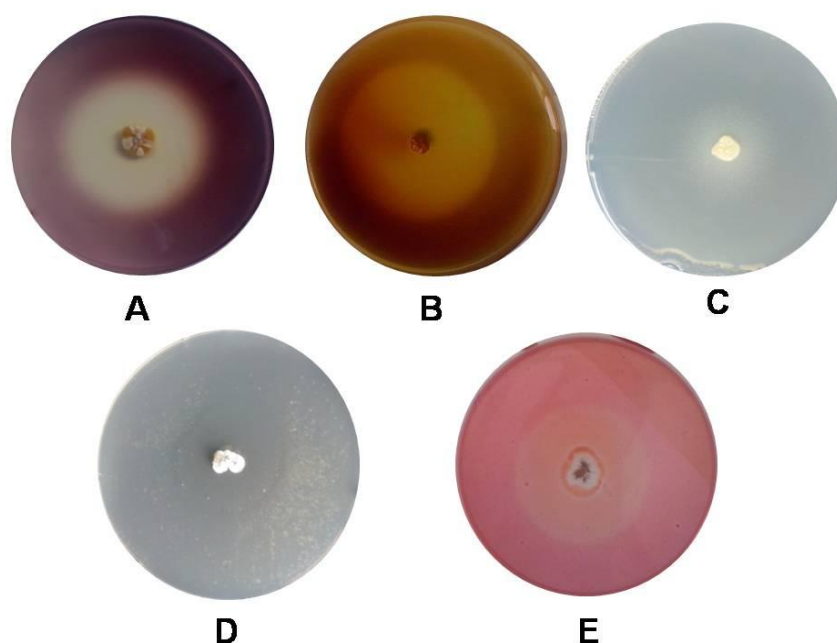


Figura 1: Verificação quantitativa da produção das enzimas testadas nos diversos meios de cultivo. A- Amilase (*Streptomyces* spp. 3F); B- Pectinase (*Nocardiopsis* spp. 2F); C- Lipase (*Streptomyces* spp. 6F); D- Esterase (*Streptomyces* spp. 8F); E- Celulase (*Streptomyces* spp. 5F).

Não houve diferença estatística significativa na quantidade da produção enzimática analisando cada enzima supracitada entre as actinobactérias endofíticas, visto que todos

os isolados foram enquadrados no mesmo grupo estatístico, de acordo com t test ($p < 0,05$).

Dentro deste contexto o estudo realizado por Stamford et al. (2001) permitiu a produção e caracterização de uma α -amilase extracelular a partir do endofítico *Nocardiopsis* sp., actinobactéria isolada de inhame (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), demonstrando que esta enzima possui atividade máxima em 70°C e termoestabilidade até 90°C, sendo importante em processos industriais de degradação do amido. Bem como o trabalho de Mitsuiki et al. (2002) descrevem uma estirpe *Nocardiopsis* spp. alcalófila (TOA-1) produtora de uma variedade de enzimas hidrolíticas alcalinas, bem como uma protease alcalina, designada NAPase; essa tinha uma atividade queratinolítica e estabilidade elevada sob condições ácidas, sendo funcional na faixa de pH 9-10. Singh et al. (2010) caracterizaram uma serino protease alcalina obtida de um *Streptomyces clavuligerus* (Mit-1), estável em várias faixas de pH de extrema resistência contra a desnaturação química pela uréia. Esses estudos corroboram com o presente estudo visto que as actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* também apresentaram produção de diversas enzimas, inclusive de proteases.

3.2 Atividade antimicrobiana das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*.

A avaliação da atividade antimicrobiana primária das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra*, realizada pelo teste de bloco de gelose mostrou que as estirpes endofíticas *Nocardiopsis* spp.2F, *Streptomyces* spp.3F, *Streptomyces* spp.5F, *Streptomyces* spp.6F e *Streptomyces* spp.8F, apresentaram atividade antimicrobiana diante de bactérias Gram-positivas: *S. aureus* (UFPEDA 01); *M. luteus* (UFPEDA 06); *B. subtilis* (UFPEDA16); *M. smegmatis* (UFPEDA 71) e *E. faecalis* (UFPEDA 138), não apresentando atividade contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*UFPEDA 224 e *S.marcescens*UFPEDA 398) e levedura (*C. albicans*UFPEDA 1007) observados na tabela 2.

Tabela 2:Atividade antimicrobiana das actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* perante bactérias Gram-positivas.

Micro-organismo teste	Halos de inibição (média $\pm$ desvio padrão)				
	2F	3F	5F	6F	8F
<i>S. aureus</i> (UFPEDA 01)	30.7 $\pm$ 0.5	20.3 $\pm$ 0.4	39.3 $\pm$ 0.9	25.3 $\pm$ 0.5	26.3 $\pm$ 0.4
<i>M. luteus</i> (UFPEDA 06)	39 $\pm$ 0.8	14.7 $\pm$ 0.5	35.3 $\pm$ 0.4	39 $\pm$ 0.8	31.6 $\pm$ 1.2
<i>B. subtilis</i> (UFPEDA 16)	31 $\pm$ 0.8	14.7 $\pm$ 0.4	35.7 $\pm$ 0.4	24.7 $\pm$ 0.4	32.7 $\pm$ 1.2
<i>M. smegmatis</i> (UFPEDA 71)	24.3 $\pm$ 0.4	18.3 $\pm$ 0.8	21.0 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 0.8	31 $\pm$ 0.8
<i>E. faecalis</i> (UFPEDA 138)	31 $\pm$ 0.8	17.3 $\pm$ 1	26.3 $\pm$ 1.2	26.7 $\pm$ 1	30.3 $\pm$ 0.5

Actinobactérias endofíticas: *Streptomyces* spp. 1F, *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp.3F, *Streptomyces* spp.4F, *Streptomyces* spp.5F, *Streptomyces* spp.6F, *Streptomyces* spp.7F, *Streptomyces* spp.8F e *Streptomyces* spp.9F

O efeito inibitório verificado no teste de bloco perante *S. aureus* (UFPEDA01) foi considerado moderadamente ativo para as cepas *Nocardiopsis* spp.2F, *Streptomyces* spp.6F e *Streptomyces* spp.8F, parcialmente ativo para estirpe *Streptomyces* spp.3F; sendo altamente ativo para *Streptomyces* spp.5F (Tabela 2). Os resultados obtidos para *M. luteus* (UFPEDA06) permitiram classificar como altamente ativo as cepas *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp.5F, *Streptomyces* spp.6F e *Streptomyces* spp.8F; sendo parcialmente ativa estirpe *Streptomyces* spp.3F. Estes resultados foram semelhantes para *B. subtilis* (UFPEDA16), diferindo apenas na atividade da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp.6F considerada como moderadamente ativa.

Os resultados analisados para *M. smegmatis* (UFPEDA71) demonstraram efeito inibitório moderado *Nocardiopsis* spp. 2F e *Streptomyces* spp.5F, parcial *Streptomyces* spp.3F e *Streptomyces* spp.6F; sendo ativamente ativo apenas a actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp.8F. Os resultados obtidos para *E. faecalis* (UFPEDA138) mostraram

que as estirpes *Nocardiopsis* spp. 2F, *Streptomyces* spp.6F e *Streptomyces* spp.8F foram moderadamente ativas; a cepa *Streptomyces* spp.3F parcialmente ativa e *Streptomyces* spp.5F altamente ativa (Tabela 2).

Outros estudos com actinobactérias endofíticas reforçam atividade de estirpes endofíticas do gênero *Streptomyces* com atividade perante bactérias Gram positivas, tal qual Soares et al. (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano de *Streptomyces* sp. AEU1 endofítico de folhas de *Eugenia uniflora* L. verificado através do bloco de gelose perante *S. aureus* (UFPEDA 02), *M. tuberculosis* (UFPEDA 82), *B. subtilis* (UFPEDA86), *M. luteus* (UFPEDA100), *E. coli* (UFPEDA224), *K. pneumoniae* (UFPEDA396), *P. aeruginosa* (UFPEDA416), *C. albicans* (UFPEDA1007), *Malassezia furfur* (UFPEDA1320), *Aspergillus niger* (UFPEDA2003), *Shigella flexneri* (UFPEDA41), *Salmonella enteridis* (UFPEDA414), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA620), e 16 cepas *S. aureus* isolados clínicos, tendo como resultados, o endofítico *Streptomyces* sp. (AEU1) apresentou atividade antimicrobiana diante todos micro-organismos testados exceto *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Para as 16 linhagens de *S. aureus* isolados clínicos, foram observados halos de inibição variando de 37,3 a 42,3 mm.

Complementando, o trabalho realizado por Thao et al. (2016) verificaram a atividade antimicrobiana de *Streptomyces* sp. TQR12-4 (endofítico de *Citrus nobilis*) através do teste de bloco de gelose utilizando como micro-organismos teste: *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC25922 e *P. aeruginosa* ATCC10145, este endofítico demonstrou efeito inibitório moderado para as cepas de *S. aureus* e *B. subtilis* com halos de inibição com 26 e 25 mm, respectivamente, e nenhuma atividade foi observada perante a *P. aeruginosa*.

Na pesquisa realizada por Atta et al. (2015) foi utilizada uma cultura de *Streptomyces lydicus* que exibiu um largo espectro de atividades antimicrobianas frente a bactérias Gram-positivas: *S. aureus* NCTC 7447, *M. luteus* ATCC 9341, *B. subtilis* NCTC 10400; bactérias Gram-negativas: *E. coli* NCTC 10416 e *P. aeruginosa* ATCC 10145; e para fungos unicelulares e filamentosos: *Candida albicans*, IMRU 3669; *Aspergillus niger* IMI 31276; *Alternaria alternata*; *Rhizoctonia solani*; e *Fusarium oxysporum*.

No estudo realizado por Sudipta et al. (2015) verificou-se o potencial antimicrobiano de *Streptomyces thermoviolaceus* NT1 (endofítico de *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) contra *S. aureus* (MRSA), *S. aureus* (isolado clínico- penicilina resistente), *B. subtilis* (ATCC 11774), *B. cereus* (ATCC 14579), *Vibrio parahemolyticus* ATCC 1782, *P.*

aeruginosa (ATCC9027), *Shigella flexnerii* (ATCC 12022), e *E. coli* (isolado clínico), o endofítico apresentou atividade antibiótica na presença de todos os micro-organismos testados, sendo mais eficaz para as bactérias Gram-positivas do que as Gram- negativas. Os estudos anteriores apresentam resultados que corroboram na ação antimicrobiana para *S. aureus*, *M. luteus* e *B. subtilis* encontrados na presente pesquisa.

No presente estudo, verificou-se que a cepa *Streptomyces* spp.5F apresentou melhor efeito inibitório em comparação com as demais actinobactérias endofíticas. No teste de bloco de gelose complementar utilizando 16 cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multiressistentes, as actinobactérias endofíticas de folhas de *Bauhinia monandra*: *Nocardiosis* spp.2F, *Streptomyces* spp.3F, *Streptomyces* spp.5F, *Streptomyces* spp.6F e *Streptomyces* spp.8F apresentaram atividade antimicrobiana perante estas cepas. Em destaque a cepa *Streptomyces* spp.5F apresentou efeito inibitório elevado frente cepas *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (ORSA): UFPEDA 672;UFPEDA 719 e UFPEDA 732, bem como para as demais estirpes de *S. aureus* isolados clínicos(Tabela 3).A estirpe *Streptomyces* spp.5F foi escolhida para dar continuidade ao ensaio secundário para a produção destes compostos ativos em cultivo submerso.

Micro-organismos de importância epidemiológica têm desenvolvido resistência, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes, responsáveis por diferentes processos infecciosos tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunodeprimidos (Antunes et al., 2006). Sendo necessário a descoberta de novos agentes antimicrobianos, como no estudo realizado Lima et al., (2017) utilizando *Streptomyces hygroscopicus* ACTMS-9H isolado da rizosfera de *Paullinia cupana*, verificaram que esta estirpe apresentou atividade antimicrobiana frente a diversas cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente: *S. aureus* ORSA UFPEDA 700, *S. aureus* UFPEDA ORSA 709, *S. aureus* UFPEDA ORSA 718, sendo esta atividade relacionada a um composto isolado a partir do cultivo submerso do *Streptomyces hygroscopicus* denominado de elaiofilina.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monadra* perante isolados clínicos de *S. aureus* multirresistentes.

Micro-organismo teste	Halos de inibição (média $\pm$ desvio padrão)				
	2F	3F	5F	6F	8F
670 UFPEDA	25.7 $\pm$ 0.6	15.7 $\pm$ 0.8	30$\pm$0.6	24.7 $\pm$ 0.6	17.3 $\pm$ 0.6
671 UFPEDA	24.7 $\pm$ 0.9	14.7 $\pm$ 0.6	31$\pm$0.6	25.7 $\pm$ 0.8	20.3 $\pm$ 2
672 UFPEDA ORSA	23.7 $\pm$ 0.6	14 $\pm$ 1.2	32$\pm$0.8	24.7 $\pm$ 1	20 $\pm$ 0.8
691 UFPEDA	25.7 $\pm$ 0.8	13.3 $\pm$ 0.6	31$\pm$0.6	24.7 $\pm$ 0.8	19.3 $\pm$ 0.8
700 UFPEDA	23 $\pm$ 1	16.3 $\pm$ 1.2	31$\pm$0.8	25.3 $\pm$ 0.9	21.3 $\pm$ 1.2
707 UFPEDA	25 $\pm$ 0.6	16 $\pm$ 0.6	35$\pm$0.6	29.7 $\pm$ 0.5	20 $\pm$ 2
711 UFPEDA	22.3 $\pm$ 0.6	15 $\pm$ 1	32$\pm$1	25 $\pm$ 2	17 $\pm$ 0.5
718 UFPEDA	23.7 $\pm$ 1	14.3 $\pm$ 0.8	30$\pm$1.2	25 $\pm$ 0.6	20 $\pm$ 1.2
719 UFPEDA ORSA	24 $\pm$ 1.2	13.7 $\pm$ 2	35$\pm$0.6	25 $\pm$ 2	19.3 $\pm$ 0.9
725 UFPEDA	25 $\pm$ 0.5	15 $\pm$ 0.8	35.7$\pm$0.6	27 $\pm$ 0.8	20.7 $\pm$ 0.6
728 UFPEDA	23.3 $\pm$ 0.8	15 $\pm$ 1	30.7$\pm$0.6	26.3 $\pm$ 1.2	18.7 $\pm$ 0.8
729 UFPEDA	22 $\pm$ 0.9	14 $\pm$ 0.8	30$\pm$0.8	25 $\pm$ 0.8	17.7 $\pm$ 0.8
730 UFPEDA	25.7 $\pm$ 0.6	15 $\pm$ 0.9	30$\pm$1	25 $\pm$ 0.9	20 $\pm$ 1
731 UFPEDA	24 $\pm$ 1	14.7 $\pm$ 1.2	32$\pm$0.6	24 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 0.6
732 UFPEDA ORSA	22.3 $\pm$ 0.6	18.3 $\pm$ 0.6	37$\pm$0.6	25 $\pm$ 1	16.3 $\pm$ 1.2

3.3 Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folhas de *B. monandra*

Os metabólitos secundários, como, por exemplo, os antibióticos, são sintetizados por várias vias metabólicas e também por espécies geneticamente distintas, sendo sua produção afetada por diferentes condições ambientais. Parâmetros da fermentação, tais como: tempo, temperatura, pH e nutrientes, podem ser modificados visando ampliar a quantidade dos metabólitos secundários produzidos (Pfefferle et al. 2000).

Durante o processo fermentativo em meio líquido utilizando a actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F, a análise de variações dos valores de pH em intervalos de 24h permitiu verificar que os meios de cultivo (MPE, MK, ISP-2, MMM, M1MI) apresentaram elevação constante, com pico em 96 h e finalizaram o processo fermentativo com pH 8, entretanto os meios (M1 e M410) tiveram o pico de elevação em 120h e ph final de 9 demonstrando a produção de compostos alcalinos. Para os meios (ISP-4, M1L e M1MA) a alteração de pH se iniciou em 120h com pH 7 que se manteve ate o final, verificando a produção de metabólitos neutros. O meio M615 foi o único que não apresentou variação de pH, sendo a fermentação iniciada e finalizada cm pH 6. E o meio ISP-3 foi o único que apresentou uma discreta variação de pH finalizando com valor 6, correlacionado com a produção de compostos ácidos (Figura 2).

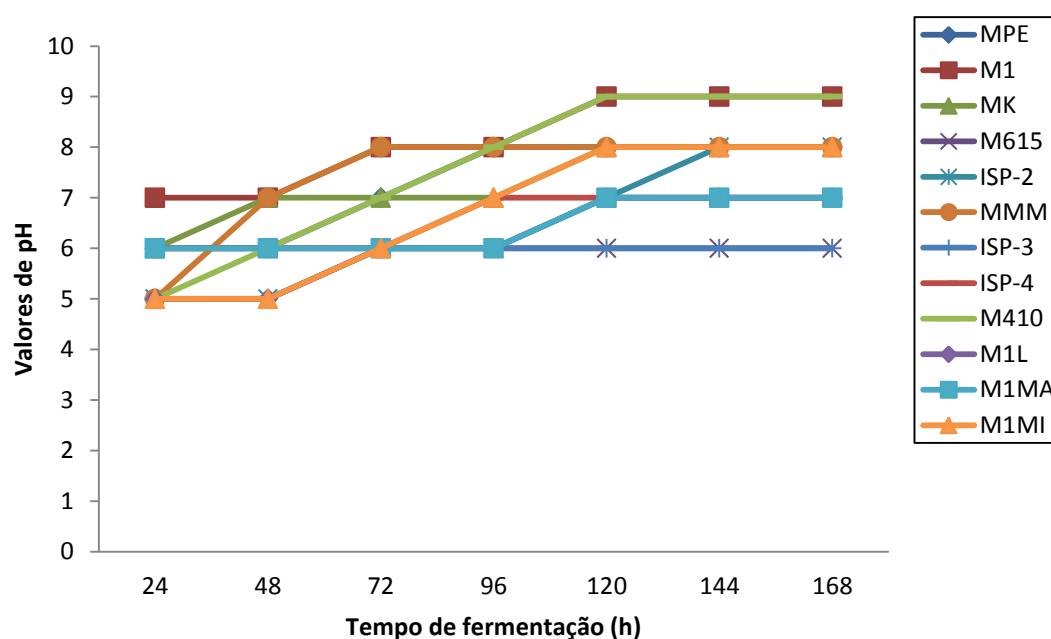


Figura 2: Variação dos valores de pH nos diversos meios de fermentação durante o período de fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra*.

Aliados a parâmetros físicos e químicos, os meios utilizados para o cultivo submerso de actinobactérias apresentam um impacto crucial na expressão de genes produtores de metabólitos secundários, uma vez que a composição de meios complexos e/ou a utilização de fontes específicas de carbono e nitrogênio possibilitam diversos resultados. Resultados influenciados pelo grupo taxonômico do micro-organismo em estudo (Goodfellow and Fiedler 2010).

Desta forma a produção de metabolitos antimicrobianos pela actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F foi efetiva em todos os meios de cultivo utilizados, exceto no meio M615, resultado que pode ser corroborado pela ausência de variação de pH. Os demais meios tiveram ação antibiótica perante as cinco cepas de isolados clínicos de *S. aureus* UFPEDA utilizadas (Figuras 3,4,5,6,7).

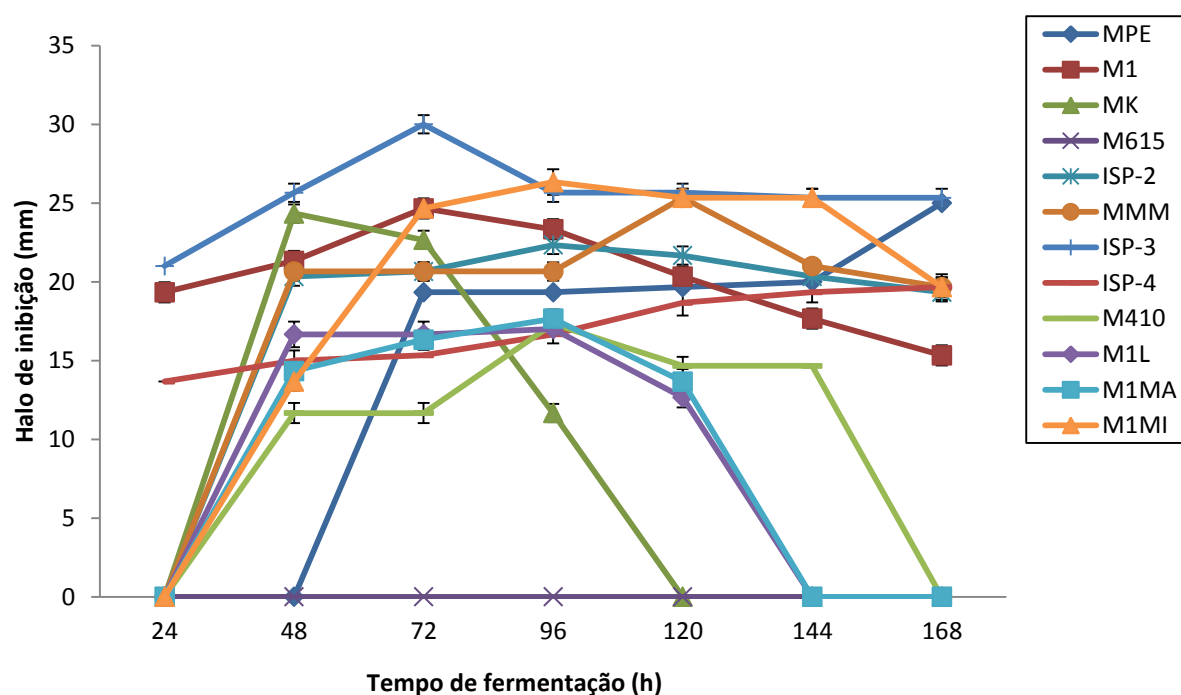


Figura 3: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* nos diversos meios perante a cepa *S. aureus* 672 UFPEDA.

A análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* nos diversos meios perante as cepas *S. aureus* 672 e 707 UFPEDA demonstrou a influencia dos componentes dos meios de cultivo utilizados na produção dos compostos ativos. Uma vez que a composição dos meios MPE, M1, MK, e M615 apresentam como componente principal a farinha de soja, em concentrações

decrecentes de 20g, 10g, 5g e leite de soja respectivamente. Demonstrando que a quantidade de farinha de soja para a melhor produção de metabólitos ativos foi a do meio M1, visto que teve início em 24h, pico em 72h e decréscimo lento até 168h (Figuras 3 e 4).

Comparando-se o meio M1 com os meios modificados M1L, M1MA e M1MI, cuja modificação refere-se ao componente substituído (farinha de soja), por farinha de casca de laranja, farinha de casca de maracujá e mix de farinhas (quinoa, maracujá, trigo, soja aveia, gergelim e linhaça). Observa-se em todos os gráficos que o meio M1L foi o menor produtor de metabolitos com início tardio em 48h e produção constante sem elevação, da mesma forma o M1MA iniciou a produção tardia, curta com término em 120h. Tendo melhor desempenho a fermentação com o meio M1MI com produção semelhante ao ISP-3 no tempo de 96h (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7).

Nesse contexto English et al.(2016) utilizaram um total de 6 meios de cultivo complexos, dentre eles: Malte-Levedura de Wickersham adicionado de oligoelementos; Caldo de soja triptona (TSB); TSB com glicose; Batata-Glicose; Milho-glicose; e Amido adicionado de oligoelementos com composições diversas para fermentação em meio de cultivo submerso com a estirpe marinha de *Streptomyces* (USC-633) durante 8 dias sob agitação a 120 rpm e 30 °C, tendo os resultados obtidos a partir do teste de disco com os líquidos dos fermentados uma baixa atividade antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 13706) apenas nos meios incorporados com glicose e manitol juntamente com os oligoelementos. Desta forma o melhor meio de produção o malte-levedura de Wickersham adicionado de oligoelementos, também demonstraram a perda de atividade perante *E. faecalis* (ATCC 51575) obtida no teste de bloco de gelose, provavelmente ocasionada pela modificação ou não produção do composto ativo nos meios de cultivo líquido.

Este estudo corrobora com a presente pesquisa que o uso de diversos componentes nos meios de cultura propicia o crescimento e desencadeiam a secreção de compostos bioativos, aumentando a probabilidade de encontrar novos agentes terapêuticos. Bem como a grande maioria dos meios utilizados por nos mantiveram a atividade antimicrobiana encontrada no teste inicial do bloco de gelose.

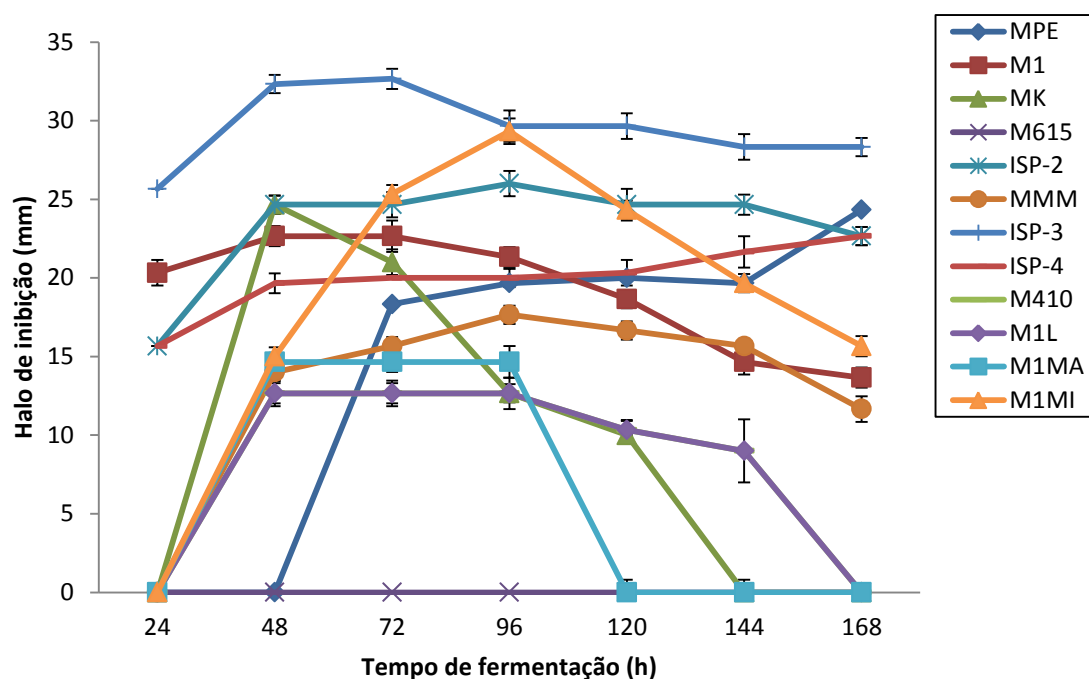


Figura 4: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B.monandra* nos diversos meios na presença de *S. aureus* 707 UFPEDA.

Nas figuras 4 e 5, pode-se notar que o meio ISP-4 em comparação com o MMM teve ação antibiótica em 24h e produção constante até 168h, embora o meio MMM apresente em sua composição carboidratos como glicose e amido. E no meio ISP-4 o amido é a única fonte de carboidrato. A fonte de carbono interfere na produção de antibiótico através da repressão de enzimas biossintéticas (Sanchez and Demain 2002) justificativa que pode ter ocorrido no meio MMM causando decréscimo de produção.

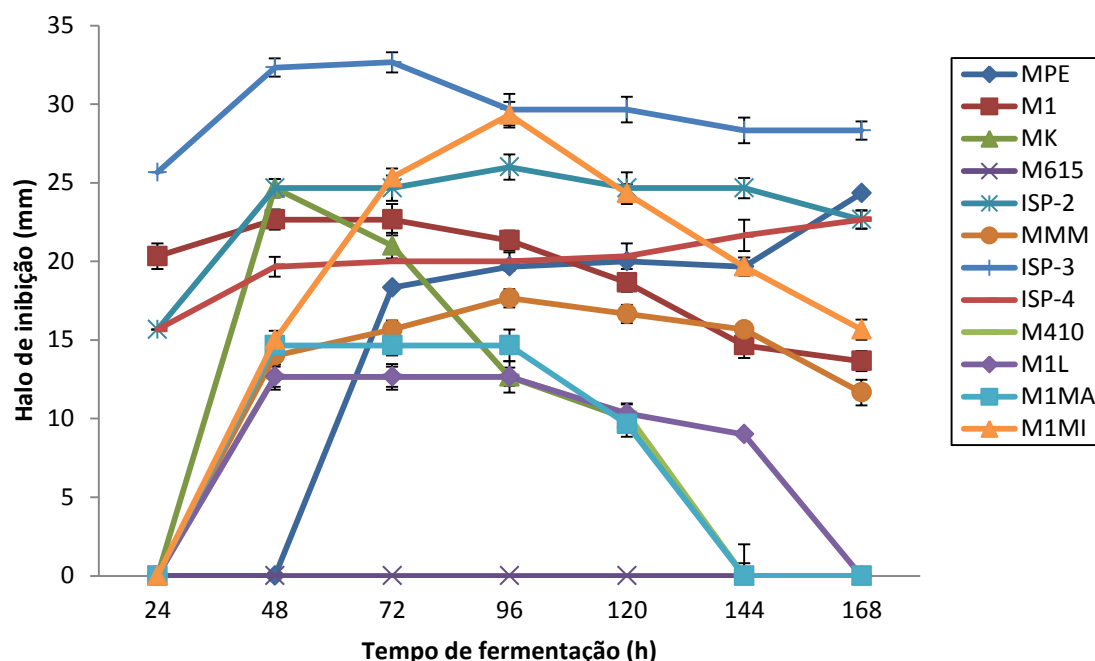


Figura 5: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* nos diversos meios perante *S. aureus* 725 UFPEDA.

Na presente pesquisa, no meio ISP-2 obteve-se melhor produção de metabólitos antimicrobianos quando comparado com os meios M1, MPE, MK, MMM, ISP-4, M410, M1L, M1MA. Tendo pico de produção em 96h e produção constante até o término do processo fermentativo (Figura 5).

Segundo Cunha et al. (2009) os quais realizaram a fermentação de *Streptomyces* sp. EBR49-A (endofítico das raízes de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist) em diferentes meios de cultura (ISP2, ISP2M, MPE, MPEM e MA) durante 96 horas, tendo como micro-organismo teste *B. subtilis* ATCC 6633, demonstraram que o meio ISP2 com fonte de carbono (glicose 4%) apresentou maior halo de inibição em 72h de cultivo, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os meios de cultura ISP2 e ISP2M (acrescido de amido), o ISP2 destacou-se como o melhor meio de produção do composto bioativo.

No estudo realizado por Sudipta et al. (2015) ao otimizarem a produção antibacteriana de *Streptomyces thermoviolaceus* NT1 (endofítico de *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don) utilizando uma variação de condições físicas (pH -5 a 10 e temperatura de incubação 20 a

45 °C) e químicas (adição de glicose, galactose, frutose, maltose, lactose e sacarose (1%, p / v) e triptona, peptona, farinha de soja a 0,5%, p/v; KNO₃, NH₄NO₃ e NH₄Cl a 0,2%, p/v) ao caldo ISP-2, verificaram que esta estirpe produzia substâncias antibióticas mais pronunciadas no meio com pH-7 e a 35 ° C com 1% de glicose adicional e triptona (0,5%).

Estes resultados mencionados acima confirmam o ISP-2 como meio de produção fermentativa de relevância para produção de compostos antibióticos, corroborando com a pesquisa em estudo quando este foi comparado com os meios M1, MPE, MK, MMM, ISP-4, M410, M1L, M1MA. Embora não obteve melhores resultados quando comparados aos meios ISP-3 e M1MI.

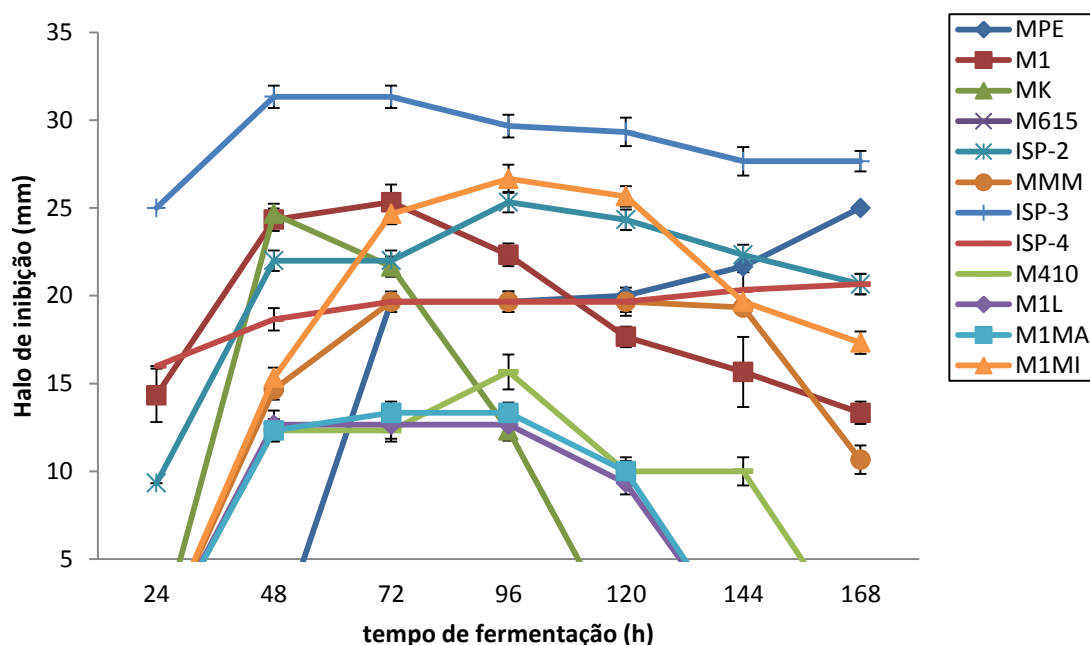


Figura 6: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* nos diversos meios diante *S. aureus* 719 UFPEDA.

A análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* observada nas figuras 6 e 7, bem como nas figuras anteriores (3, 4 e 5) demonstram que o meio de cultura ISP-3 teve melhor produção de substâncias antimicrobianas ativas. Neste meio a produção iniciou-se em 24h, tendo pico de produção em 72h, resultados que se assemelham aos encontrados no bloco de gelose para estes mesmo micro-organismos. Estes dados demonstram que o meio ISP-3 foi capaz de reproduzir a produção obtida em meio sólido observado no bloco de gelose.

Comparando a composição do ISP-3 (20g farinha de aveia) em relação aos meios M1MI (10g farinha de aveia) e M410 (5g farinha de aveia), verificou-se que o decréscimo do ingrediente majoritário (farinha de aveia) nestes meios também causou diminuição na produção de compostos antibióticos, dado observado em todos gráficos de fermentação. Nota-se efeito contrário do que ocorreu nos meios que continham soja (Figura 7).

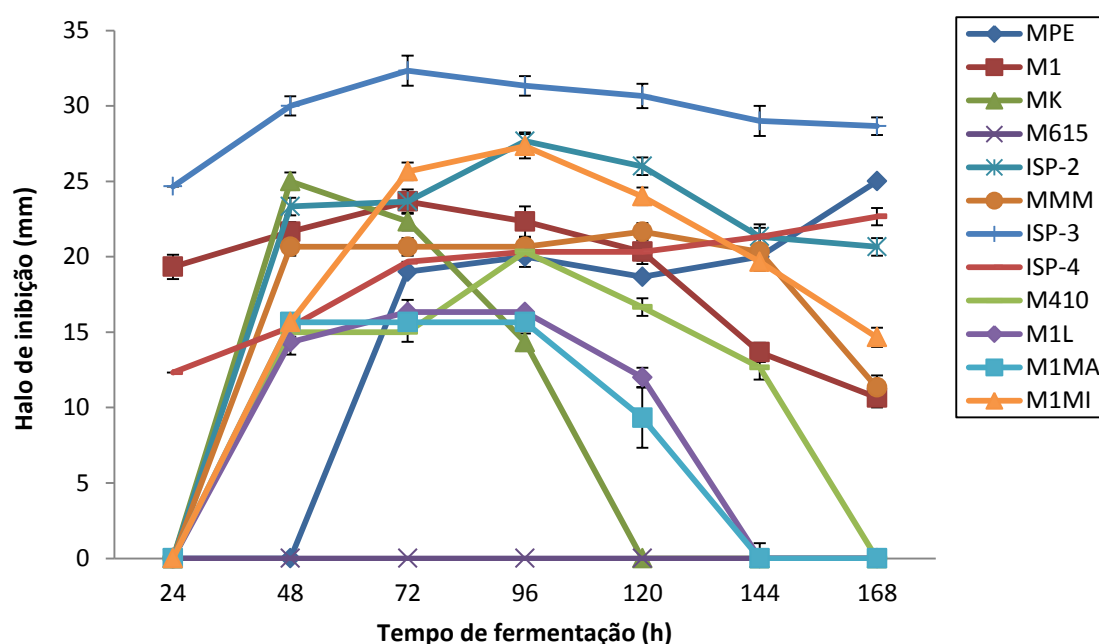


Figura 7: Análise fermentativa da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folha de *B. monandra* nos diversos meios na presença de *S. aureus* 732 UFPEDA.

3.4 Extração dos metabolitos ativos da fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folhas de *B. monandra* no meio ISP-3.

O meio ISP-3 foi considerado o melhor para produção antimicrobiana com a actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F, procedendo-se a extração com solvente dos produtos bioativos no líquido metabólico e na massa micelial. Nenhum dos solventes utilizados no líquido foi capaz de extrair o princípio ativo. Os resultados obtidos da extração com a massa observados na figura 8 permitem concluir que o metanol apresentou melhores resultados da atividade antimicrobiana perante as cepas de *S. aureus* isolados clínicos UFPEDA, sendo o solvente escolhido para obtenção dos

compostos antimicrobianos produzidos pela actinobactéria endofítica de folhas de *B. monandra* *Streptomyces* spp. 5F

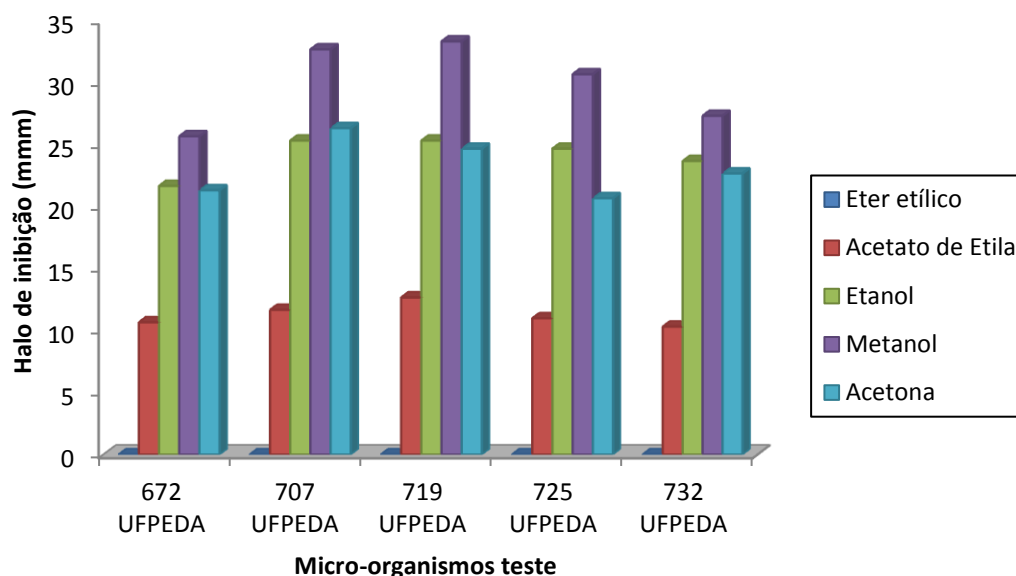


Figura 8: Avaliação antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da extração com solvente massa micelial da fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp.5F de folhas de *B. monandra* no meio ISP-3.

3.5 Análise por HPLC e fracionamento de extratos brutos da fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces*spp.5F de folhas de *B. monandra* no meio ISP-3.

Uma vez que os solventes não foram capazes de extrair o princípio ativo presente no líquido metabólico da fermentação da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp.5F de folhas de *B. monandra* no meio ISP-3, este líquido foi liofilizado e obtido o extrato aquoso (EAL). O extrato metanólico obtido da extração da massa micelial *Streptomyces* spp.5F em meio ISP-3 foi submetido a rotaevaporação e obtido o extrato metanólico (EMM). Ambos os extratos mL foram avaliados com testes de discos (concentração por disco 2000µg) perante cinco cepas de *S. aureus* isolados clínicos utilizadas na análise fermentativa, confirmando a atividade antimicrobiana dos mesmos. Estes dois extratos foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a fim de separar os compostos e fazer uma comparação entre os mesmos.

No cromatograma do extrato metanólico da massa micelial (Figura 9) visualiza-se compostos polares e um composto majoritário com tempo de retenções semelhante ao cromatograma do extrato aquoso do líquido. A análise por HPLC demonstrou que os dois extratos apresentavam moderado grau de pureza e compostos semelhantes com natureza polar. Sendo necessários estudos na área de espectroscopia voltados para identificar as moléculas encontradas nos extratos provenientes da fermentação em meio ISP-3 pela *Streptomyces* spp. 5F actinobactéria endofítica de folhas de *B. monandra*.

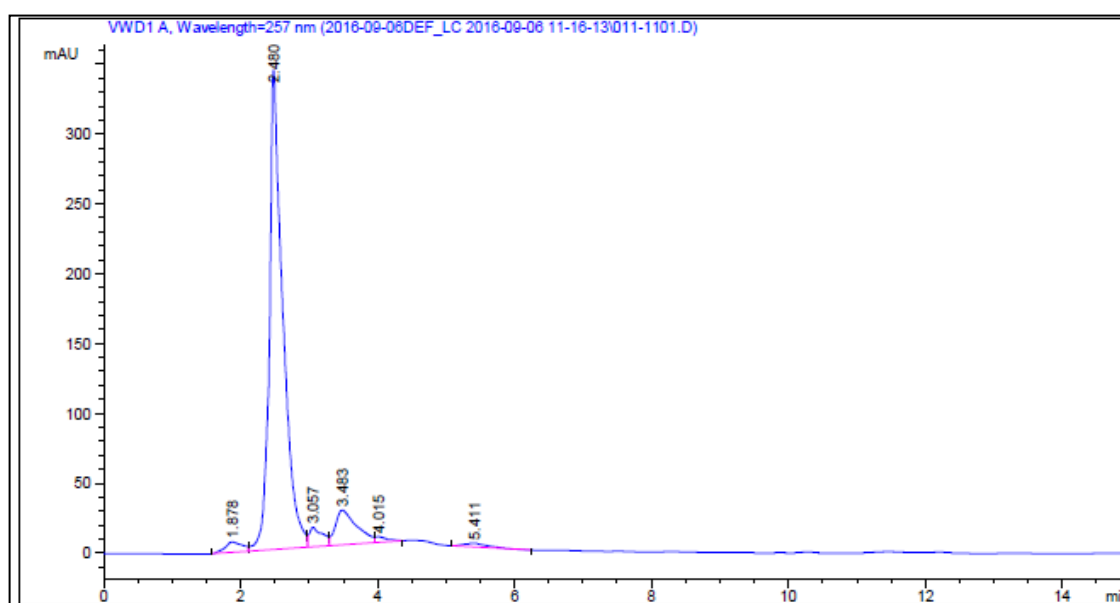


Figura 9: Análise cromatográfica (HPLC) do extrato metanólico da massa micelial (EMM) da actinobactéria endofítica *Streptomyces* spp. 5F de folhas de *B. monandra* no meio ISP-3.

A maioria dos antibióticos produzidos por actinobactérias endofíticas é originária do gênero *Streptomyces*, este tem sido relatado por diversos autores devido seu grande potencial produtor de compostos bioativos (Stamford et al. 2001; Mitsuiki et al. 2002; Singh et al. 2010). Diversas substâncias bioativas foram obtidas desse gênero, como as anguciclinas, com atividade antimicrobiana frente *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Maruna et al. 2010); os compostos ativos irumamicina, X-14952b e 17-hidroxi-venturicidina A extraídos de *Streptomyces* sp. (Fguira et al. 2005); A kakadumicina, um antibiótico de amplo espectro e com ação também sobre o *Plasmodium falciparum* foi isolado de *Streptomyces* sp. (NRRL 30566), endofítico de *Grevillea pteridifolia* (Bieber et al. 1998). Bem como Castillo et al. 2002 proporcionaram a descoberta da munumbicina B, antibiótico produzido por *Streptomyces* NRRL30562 (endofítico de *Kennedia nigriscans*). Estas observações sugerem que micro-organismos endofíticos constituem

uma importante fonte para a descoberta de novos antibióticos e outras substâncias com potencialidades biotecnológicas.

As actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* foram capazes de produzir enzimas de grande importância industrial, como: amilase, pectinase, lipase, esterase e celulase. Bem como estes micro-organismos apresentaram produção de antibióticos com ação inibitória na presença de bactérias Gram-positivas, principalmente perante *S. aureus* isolados clínicos multirresistentes. A estirpe endofítica *Streptomyces* spp. 5F foi o melhor produtor de substâncias antimicrobianas em 11 dos 12 meios de cultura submersa, selecionando o meio ISP-3 com melhor desempenho produtivo. O processo extrativo da fermentação da actinobactéria de folha de *B. monandra* *Streptomyces* spp. 5F com solventes foi bem sucedido na massa micelial com o metanol obtendo o extrato metanólico da massa (EMM), sendo obtido do líquido apenas o extrato aquoso (EAL). A separação por HPLC dos extratos EMM e EAL demonstrou que o fracionamento dos dois extratos apresentavam poucos compostos de natureza polar. Sendo necessários estudos em espectroscopia para identificação dos metabólitos ativos dos extratos estudados.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à bolsa de produtividade em pesquisa (LCBBC), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco / FACEPE.

REFERÊNCIAS

- Andrade CAS, Baszkin A, Magalhães NSS, Coelho LCBB, Melo CP. 2005. Dielectric properties of *Bauhinia monandra* and *Concanavalin A* lectin monolayers, part I. J Colloid Interface Sci 289:371-378.
- Anderson JA. 1939. Mikrobiology. 3th ed. Berlin: Kongress.
- Antunes RMP, LimaEO, PereiraMSV, Camara CA, ArrudaTA, Catão RRM et al. 2006. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Rev Bras Farmacogn 16: 517-524.
- Atta HMA, El-Sayed ASB, El-Desoukey MAB, Hassan MCM, El-Gazar D. 2015. Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces lydicus*: Fermentation, extraction and biological activities. J Saudi Chem Soc 19:360–371.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 45: 493-496.

- Bieber B, Nüske J, Ritzau M, Gräfe U. 1998. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. J Antibiot 51: 381-382.
- Cao L, Qui Z, You J, Tan H, Zhou S. 2004. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface – sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Lett Appl Microbiol 39: 425-430.
- Carrim AJI, Barbosa EC, Vieira, JDG. 2006. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Braz Arch Biol Technol 49: 353-359.
- Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB et al. 2002. Mununbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. Microbiol 148: 2675-2685.
- Chapman GS. 1952. A simple method for making multiple tests on a microorganism. J. Bacteriol 63:147-151.
- Chaudhary HS, Yadav J, Shrivastava AR, Singh S, Singh ALK and Gopalan N. 2013. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India). J Adv Pharm Technol Res 4: 118 -123.
- Coelho LCB, Silva MBR. 2000. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. Phytochem Anal 11:295-300.
- Choi YW, Hodgkiss IJ, Hyde KD. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. J Ag. Sci Tech 1:55-66.
- Cunha IGB, Sobrinho TJSP, Silva REA, Amorim ELC, Araujo JM. 2009. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEA. Rev Bras Farmacogn 90:120-123.
- Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB. 2011. Extracellular enzymes produced by endophytic fungi isolated from *Baccharis cunculifolia* (Asteraceae). Global Sci Technol 4:47-57.
- English AL, Boufridi A, Quinn RJ, Kurtboke DI. 2016. Evaluation of fermentation conditions triggering increased antibacterial activity from a near-shore marine intertidal environment-associated *Streptomyces* species. Synth Syst Biotechnol 1: 1-11.
- Fernandes AJD, Ferreira MRA, Randau KP, Souza TP, Soares, LAL. 2012. Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). Sci World J 1:1-7.
- Fguira LFB, Fotso S, Ameer-Mehdi, RB, Mellouli L, Laatsch H. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Res Microbiol 156: 341-347.
- Foster TJ. 2005. Immune evasion by *Staphylococci*. Nat Ver Microbiol 3: 948-958.
- Goodfellow M, Fiedler HP. 2010. A guide to successful bioprospecting: Informed by Actinobacterial systematics. Anton Leeuw Int J G 98: 119-42.
- Hankin L, Anagnostakis SL. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycol 67: 597-607
- Hankin L, Zucker M, Sands DC. 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of proteolytic bacteria. Appl. Microbiol 22:205-509.
- Ichikawa T, Ishikura T, Osaki A. 1971. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. Folia Microbiol 16: 218-224.
- Kawamura T, Tago K, Beppu T, Arima K. Antiviral antibiotic S15-1. 1976. Taxonomy of the producing strain and study of conditions for production of the antibiotic. J Antibiot 29: 242-247.

Kurtboke D I. 2011. Exploitation of phage battery in the search for bioactive actinomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:931–937.

Lima SMA, Melo JGS, Militão GCG, Lima GMS, Lima MCA, Aguiar JS et al. 2017. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon (Brazil). *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 711-723.

Lyra FDA, Gonçalves LO, Coelho JSB, Albuquerque MMF, Maciel GM, Oliveira LL et al. 1964. Ciclamina e ciclacidina, dois novos Antibióticos Produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. *An Acad Bras Cienc* 36: 323-334.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV and Clark DP. 2010. *Microbiologia de Brock*. 12th ed. Porto Alegre: Artmed;

Maruna M, Sturdikova M, Liptaj T, Godany A, Muckova M, Certik M. 2010. Isolation, structure elucidation and biological activity of angucycline antibiotics from an epiphytic yew streptomycete. *J. Basic Microbiol* 50: 1-8.
Mitsuiki S, Sakai M, Moriyama Y, Goto M. and Furukawa K. 2002. Purification and some properties of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardopsis* ssp. TOA-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 164-167.

Neirotti E, Azevedo JL. 1988. Semiquantitative evaluation of cellulase production in *Humicola* sp. *J Microbiol* 19: 78-81.

Pfefferle C, Theobald U, Gürtler H, Fiedler H. 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol* 80: 135-42.

Pridham TG, Anderson P, Foley C, Lindenfelser LA, Hesselting CW, Benedict RG. 1957. A section of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Ann* 2: 947-953.

Procópio REL, Silva IR, Martins MK, Azevedo JL, Araújo JM. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis* 16: 466-471.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. 2004. *Farmacologia* 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Sahin N, Ugur A. 2003. Investigation of the antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. *Turk J Biolog* 27: 79-82.

Sanchez S, Demain AL. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzym Technol* 31: 895-906.

Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S et al. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 3765-3773.

Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM, Terenzi H. 2006. Recent achievements to combat bacterial resistance. *Quim Nova* 29: 844-855.

Siqueira FG, Siqueira LG, Jaramillo PMD, Silveira MHL, Andreus J, Couto FA et al. 2010. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *Int Biodeter Biodegr* 64: 20-26.

Singh SP, Thumar JT, Gohel SD, Purohit MK. 2010. Molecular diversity and enzymatic potential of salt-tolerant alkaliphilic actinomycetes. *Curr Res Technol* 10: 280-286.

Soares ECL, Costa EP, Silva LCN, Araújo JM. 2012. Isolation, Identification And Antimicrobial Activity Of *Streptomyces* sp. UFPEDA 968. *Sci Plena* 8: 1-7.

Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCBB, Araújo JM. 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresour technol* 76: 137-41.

Sudipta R, Debdulal B. 2015. Broad spectrum antibacterial activity of granaticinic acid, isolated from *Streptomyces thermoviolaceus* NT1; an endophyte in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. J app pharm Sci 5: 6-11.

SyedDG, Agasar D, Pandey A. 2009. Produção parcial purificação da α -amilase a partir de um novo isolado de *Streptomyces gulbargensis*. J Ind Microbiol Biotechnol 36: 189-194.

Tenover FC. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. Am J Infect Control 34:64-73.

Thao Pth, Linh Nv, Lien Nth, Hieu Nv. 2016. Biological Characteristics and Antimicrobial Activity of Endophytic *Streptomyces* sp. TQR12-4 Isolated from Elite *Citrus nobilis* Cultivar Ham Yen of Vietnam. Int J Microbiol 23: 1-7.

Waksman SA, Schatz A, Reynolds DM. 2010. Production of Antibiotic Substances by Actinomycetes. Ann New York Acad Sci 1213:112-124.

CONCLUSÕES

- A metodologia utilizada para o isolamento foi adequada para isolar e identificar pela primeira vez micro-organismos endofíticos nas folhas de *Bauhinia monandra*, bem como forneceu dados comprobatórios que estes micro-organismos não são epifíticos;
- Os dados inéditos obtidos confirmam a presença de fungos endofíticos do gênero *Curvularia* e *Aspergillus*, sendo predominante o gênero *Penicillium*. Também foram identificadas bactérias não-filamentosas endofíticas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Enterobacter*, bem como actinobactérias endofíticas do gênero *Streptomyces* e *Nocardiopsis*.
- As actinobactérias endofíticas de folhas de *B. monandra* foram capazes de produzir enzimas de grande importância industrial, como :amilase, pectinase, lipase, esterase e celulase. Bem como estes micro-organismos apresentaram produção de antibióticos com ação inibitória na presença de bactérias Gram-positivas, principalmente perante *S. aureus* isolados clínicos multirresistentes;
- A estirpe endofítica *Streptomyces* spp. 5F foi o melhor produtor de substâncias antimicrobianas em 11 dos 12 meios de cultura submersa, selecionando o meio ISP-3 com melhor desempenho produtivo.
- O processo extrativo da fermentação da actinobacteria de folha de *B. monandra* *Streptomyces* spp. 5F com solventes foi bem sucedido na massa micelial com o metanol obtendo o extrato metanolico da massa (EMM), sendo obtido do liquido apenas o extrato aquoso (EAL). A separação por HPLC dos extratos EMM e EAL demonstrou que o fracionamento dos dois extratos apresentavam poucos compostos de natureza polar. Sendo necessários estudos em espectroscopia para identificação dos metabólitos ativos dos extratos estudados.

ANEXOS

SUBMISSÃO DO ARTIGO II: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FROM *Bauhinia monandra* LEAVES

Manuscriptsubmitted - www.sciencedomain.org

Dear **Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho**, [Author / Reviewer / Editor],

CONGRATULATION! YOUR MANUSCRIPT HAS BEEN SUCCESSFULLY SUBMITTED.

Kindly note thefollowing:

YourLogin Id lcbbcoelho@gmail.com

Afterlogin click on "Myaccount" onthe extreme right corner ofthewebpage.

Manuscriptnumber: **2017/BJI/31636**

Kindlywritethemanuscriptnumberin thesubjectline for furthercorrespondence.

Advantageof SUBCENTRAL

1. Easyanduser-friendly.
2. Instantmanuscriptnumbergeneration.
3. 24X7 service
4. Online discountrequest.
5. Online status ofpaper.

WITH THANKS
IT DEPARTMENT, SCIENCEDOMAIN international
*** Thisis a system generatedemail.**

NORMAS DO PERIÓDICO BIOTECHNOLOGY JOURNAL INTERNATIONAL

General Guideline for Authors

Type of papers

1. Original research papers:

Papers that include original empirical data that have not been published anywhere earlier (except as an abstract). Null/negative findings and replication/refutation findings are also welcome. This type of paper normally should not exceed 25 double-spaced pages of text (including references) and should not contain more than 15 figures/tables. We advise a length of 3000-6000 words (including everything).

2. Short Research Articles:

Short Research Articles (or Research Notes) are single-finding papers (or one year experiment for agricultural papers) that can be reports with one or two illustrations (figures/tables) and lab protocols. Posters from conferences or internal meetings may be summarized as Short Research Articles (or Research Notes). In many cases, some additional detail, particularly in the methods, description of the results, and/or discussion/conclusions will be required to make sure that readers (and referees) have enough information to understand the description of the work. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

3. Short communications:

Short Communications are urgent communications of important preliminary results that are very original, of high interest and likely to have a significant impact on the subject area of the journal. A Short Communication needs only to demonstrate a 'proof of principle'. Authors are encouraged to submit a Original Research Paper to the journal following their Short Communication. There is no strict page limit for a Short Communication; however, we advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

4. Review papers:

These papers will not have empirical data acquired by the authors but will include discussion of papers published and data acquired in a specific area. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

5. Minireview papers:

Minireviews are brief historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas covered within the scope of the journal. They must be based on published articles; they are not outlets for unpublished data. They may address any subject within the scope of the journal. The goal of the Minireviews is to provide a concise summary of a particular field in a manner understandable to all readers. We advise a length of 3000-6000 words, (including 30-70 references plus 2-3 figures and/or tables (if required)).

6. Systematic Reviews: (Mainly for bio-medical journals)

Systematic Reviews should usually be based on medical interventions or animal model studies. We recommend that authors consult the PRISMA guidelines for reporting in Systematic Reviews. Systematic Reviews should deal with a clearly formulated question and use systematic and explicit methods to identify, select, and critically assess the relevant research. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

7. Policy Papers:

The purpose of the policy paper is to provide a comprehensive and persuasive argument justifying the policy recommendations presented in the paper, and therefore to act as a decision-making tool and a call to action for the target audience. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

8 . Commentaries / Opinion Articles:

An opinion-based article on a topical issue of broad interest which is intended to engender discussion. We advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

9. Data Notes

Data Notes are brief descriptions of scientific datasets that include details of why and how the data were created; they do not include any analyses or conclusions.

10. Study Protocols and pre-protocols: (Mainly for bio-medical journals)

SDI journals welcome protocols for any study design, including observational studies and systematic reviews. All protocols for randomised clinical trials must be registered and follow the CONSORT guidelines; ethical approval for the study must have been already granted.

Study pre-protocols (i.e. discussing provisional study designs) may also be submitted and will be clearly labelled as such when published. Study protocols for pilot and feasibility studies may also be considered.

11. Method Articles:

These articles describe a new experimental or computational method, test or procedure, and should have been well tested. This includes new study methods, substantive modifications to existing methods or innovative applications of existing methods to new models or scientific questions.

We also welcome new technical tools that facilitate the design or performance of experiments and data analysis such as software and laboratory devices, or of new technologies to assist medical treatment such as drug delivery devices. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

12. Data Articles (Mainly for bio-medical journals):

A dataset (or set of datasets) together with the associated methods/protocol used to create the data. No analysis of the data, results or conclusions should be included.

13. Case reports / Case studies (Mainly for bio-medical journals):

Case reports describe patient cases which are of particular interest due to their novelty and their potential message for clinical practice. While there are several types of case reports, originality and clinical implications constitute the main virtues by which case reports are judged. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677298>). Case studies are an invaluable record of the clinical practices of a profession. While case studies cannot provide specific guidance for the management of successive patients, they are a record of clinical interactions which help us to frame questions for more rigorously designed clinical studies. Case studies also provide valuable teaching material, demonstrating both classical and unusual presentations which may confront the practitioner. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597880/>). Abstract (not more than 250 words) of the Case reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures.

14. Clinical Practice Articles (Mainly for bio-medical journals):

A short article relating to a specific clinical problem or scenario that discusses issues relating to patient management and treatment pathways using an evidence-based approach. Clinical Practice Articles include case series (i.e. group or series of case reports involving patients who were given similar treatment), but should not be based on a single case (see Case Reports).

15. Grey literature government reports:

A special section of the journal will be dedicated to publication of (extended) abstracts of “grey literature government reports”. Many governmental research institutes in Europe/world are confronted with the problem that their very good scientific reports are produced directly for governmental sponsors. Results are typically presented in reports, which are published on an institute’s website only. However, scientists like to publish their work in the scientific arena, albeit that there may be little, if any, funding to support writing of the results in a scientific paper. Whereas the reports may be of very high scientific quality, they are not readily disseminated into the scientific world because they are not identified by normal literature attending systems. This then leads to very good scientific work being unnoticed by a wider audience, possible re-duplication of the work in other countries, a loss of resources, and hence to a slower progression of science. Therefore, this journal offers to publish good governmental reports in this peer-reviewed scientific journal via an abstract of the report. As such, this journal will publish (extended) abstracts of governmental reports (in English language only following a regular peer review system. Scientific excellence, open access and English language are the only prerequisites. Upon scientific acceptance of the work, the extended abstract will contain the title of the work, the authors as well as a original full scientific report. In this way the scientific reports will be opened to a worldwide scientific audience and authoring scientists will get the results of their work disseminated in the scientific arena.

16. Abstracts of scientific meetings:

Abstracts of oral presentations and posters (within the scope of the journal) can be published in discussion with the academic editors. Standardised abstracts (prepared in accordance with journal guidelines) need to be in English language and will be peer-reviewed prior to publication. It is recommended to contact the editor before submitting abstracts of a scientific meeting. Normally a collection of the abstracts (minimum 10 abstracts) will be published in a special issue. Abstracts are

not considered for regular issues of the journal. Publication of 'collection of abstracts of a conference, symposia, etc' requires a guest editorial board. Normally the 'Review committee / Screening committee' of the conference will form the guest editorial board. List of the guest editors also will be published in the special issue.

17. Letter to the Editor:

A letter to the editor provides a means of communication between the author of an article and the reader of a journal, allowing continued dialog about journal content to take place. Although not original research per se, a letter may provide new insight, make corrections, offer alternate theories, or request clarification about content printed in the journal. Letters to the Editor are considered for publication (subject to editing and abridgment) provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Letters in reference to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). Letters not related to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). A letter can have no more than eight references and one figure or table. A letter can be signed by no more than four authors. Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. This type of article will be fully peer reviewed.

Manuscript structure

The manuscript should be written in English with simple lay out. The text should be prepared in single column format. Bold face, italics, subscripts, superscripts etc. can be used. The text, excluding the abstract, if required, can be divided into numbered sections with brief headings. Starting from introduction with section 1. subsections should be numbered (for example 2.1 (then 2.1.1, 2.1.2, 2.2, etc.), up to three levels.

Brief guidelines

Title Page

The title page should contain a brief title, name(s) of author(s) and their affiliations. The title should be without any abbreviations and it should enlighten the contents of the paper. All affiliations should be provided with a lower-case superscript letter just after the author's name and in front of the appropriate address.

The name of the corresponding author should be indicated along with telephone and fax numbers (with country and area code) along with full postal address and e-mail address.

Abstract

The abstract should be concise and informative. It should not exceed 300 words in length. It should briefly describe the purpose of the work, techniques and methods used, major findings with important data and conclusions. Different sub-sections, as given below, should be used. No references should be cited in this part. Generally non-standard abbreviations should not be used, if necessary they should be clearly defined in the abstract, at first use.

Keywords

Immediately after the abstract, about 4-8 keywords should be given. Use of abbreviations should be avoided, only standard abbreviations, well known in the established area may be used, if appropriate. These keywords will be used for indexing.

Abbreviations

Non-standard abbreviations should be listed and full form of each abbreviation should be given in parentheses at first use in the text.

Introduction

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey and the scope and justification of the work done.

Material and methods

Give adequate information to allow the experiment to be reproduced. Already published methods should be mentioned with references. Significant modifications of published methods and new methods should be described in detail. This section will include sub-sections. Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly.

Results & Discussion

Results should be clearly described in a concise manner. Results for different parameters should be described under subheadings or in separate paragraph. Table or figure numbers should be mentioned in parentheses for better understanding.

The discussion should not repeat the results, but provide detailed interpretation of data. This should interpret the significance of the findings of the work. Citations should be given in support of the findings. The results and discussion part can also be described as separate, if appropriate.

Tables & Figures

Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures.

Conclusions

This should briefly state the major findings of the study.

Acknowledgements

A brief acknowledgement section may be given after the conclusion section just before the references. The acknowledgments of people who provided assistance in manuscript preparation, funding for research, etc. should be listed in this section. All sources of funding should be declared as an acknowledgement. Authors should declare the role of funding agency, if any, in the study design, collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Competing Interests

Declaration of competing interest is compulsory. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If no such declaration has been made by the authors, SDI reserves to assume and write this sentence: "Authors have declared that no competing interests exist."

Authors' Contributions

Authors may use the following wordings for this section: "'Author A' designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript. 'Author B' and 'Author C' managed the analyses of the study. 'Author C' managed the literature searches..... All authors read and approved the final manuscript."

Reference to a journal:

For Published paper:

1. Hilly M, Adams ML, Nelson SC. A study of digit fusion in the mouse embryo. Clin Exp Allergy. 2002;32(4):489-98.

Note: List the first six authors followed by et al.

Note: Use of DOI number for the full-text article is encouraged. (if available).

Note: Authors are also encouraged to add other database's unique identifier (like PUBMED ID).

For Accepted, unpublished papers.

Same as above, but "In press" appears instead of the page numbers. 1. Saha M, Adams ML, Nelson SC. Review of digit fusion in the mouse embryo. J Embryol Exp Morphol. 2009;49(3): (In press).

Reference to a book:

Personal author(s)

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.

Editor(s) or compiler(s) as authors

Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berkswits M, editors. The Merck manual of diagnosis and therapy. 18th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories; 2006.

Authored chapter in edited publication

Glennon RA, Dukat M. Serotonin receptors and drugs affecting serotonergic neurotransmission. In: Williams DA, Lemke TL, editors. Foye's principles of medicinal chemistry. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Reference to Web-resource or Electronic articles.

Hugo JT, Mondal SC. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis: a conceptual framework. *Global Health*. 2006;16:4. Accessed 29 March 2012. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Anonymous. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis: a conceptual framework. *Global Health*. 2006;16:4. Accessed 29 March 2012. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Reference to Organization as author

Diabetes Prevention Program Research Group. A study of digit fusion in the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 2009;49(2):259–276.

Nomenclature and Units

Internationally accepted rules and the international system of units (SI) should be used. If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

For biological nomenclature, the conventions of the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature* should be followed.

Scientific names of all biological creatures (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be mentioned in parentheses at first use of their English term.

Chemical nomenclature, as laid down in the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

NORMAS DO PERIODICO ANNALS OF THE BRAZILIAN ACADEMY OF SCIENCES



ISSN 0001-3765 *printed version*

ISSN 1678-2690 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Aim and editorial policy
- Preparation of manuscripts

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at <https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo>. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. However, a proposal for a Review may be submitted in the form of a brief letter to the Editor at any time. The letter should state the topics and authors of the proposed review, and should state why the topic is of particular interest to the field.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some áreas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated

the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

hile papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines (**maximum of 5 figures free of charge**). Their tentative placement in the text should be indicated.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each **figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm**. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each

linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 áreas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the áreas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Deland-Sheer E, Giuffrida R And Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

Books and book chapters

Davies M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W And Burke EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody Rw. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Other publications

International Kimberlite Conference, 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings... Rio de Janeiro: CPRM, 1994, 495 p.

Siatycki J. 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 1985, 55 p. Preprint no. 600.



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

R. Anfilofio de Carvalho, 29, 3° and.

20030-060 Rio de Janeiro RJ Brasil

Tel: +55 21 3907-8100

Fax: +55 21 3907-8101 