



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
FACULDADE DE QUÍMICA

LORENA FERREIRA DA SILVA\*

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *PHANERA SPLENDENS* E  
ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA B1.5C1**

\*Bolsista PIBIC/UFPA

BELÉM/PA

2019

LORENA FERREIRA DA SILVA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *PHANERA SPLENDENS* E  
ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA B1.5C1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará como requisito à obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho

Coorientadora: Me. Eleana Monaliza Cerqueira Souza

BELÉM/PA  
2019

LORENA FERREIRA DA SILVA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *PHANERA SPLENDENS* E  
ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA B1.5C1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará como requisito à obtenção do grau de bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho

Coorientadora: Me. Eleane Monaliza Cerqueira Souza

Data da apresentação: 12/07/2019

Conceito: \_\_\_\_\_

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho - Orientadora  
Faculdade de Química - UFPA

---

Prof.<sup>a</sup> Me. Eleane Monaliza Cerqueira Souza - Coorientadora  
Secretaria de Estado de Educação do Pará

---

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho - Membro  
Faculdade de Química - UFPA

---

Me. Rosiane Fernandes Moreira - Membro  
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Química - UFPA

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus, pela saúde e disposição que me permitiu a realização deste trabalho.

A minha mãe Leida Maria pelo apoio durante o decorrer do curso permitindo que eu focasse somente no curso.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr. Patrícia Santana Barbosa Marinho pela oportunidade a mim dada no laboratório me possibilitando no aprendizado de novas técnicas, complementando assim a minha formação.

A Coorientadora Eleane Monaliza Cerqueira de Souza pela ajuda nos trabalhos durante o período de estadia no laboratório.

A minha colega de curso Gabriela Pantoja pela amizade e as horas de estudos.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos, pelas orientações dentro do laboratório.

A todos aqueles que incentivaram durante a minha vida.

## RESUMO

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e se destaca por ter a maior diversidade de plantas, além de inúmeras espécies de microrganismos, entre eles fungo e bactéria com enorme potencial para a elaboração de novos produtos. Contudo, nos últimos anos, a dificuldade e alto custo do desenvolvimento de novos fármacos, com diferenciado poder de atuação, tornou-se um grande desafio para a indústria farmacêutica e o aparecimento de resistência aos medicamentos já utilizados demonstra a enorme necessidade e aplicabilidade da triagem de microrganismos para o descobrimento de novas classes de antimicrobianos. Bactérias endofíticas são importantes para a área farmacêutica e biotecnológica devido à descoberta de novas substâncias para uso terapêutico humano, como por exemplo, antibióticos e anticancerígenos. O presente estudo teve como objetivo realizar o perfil químico e avaliação da atividade antimicrobiana das bactérias isoladas da *Phanera splendens*. Um espécime de *P. splendens* foi coletado na Embrapa Amazônia Oriental em período sazonal e foram isoladas 40 bactérias endofíticas que foram cultivadas por 7 dias em BHI líquido e o meio líquido sofreu partição líquido-líquido com AcOEt, os extratos AcOEt tiveram seus perfis químicos obtidos por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), no qual a bactéria B1.5C1 foi escolhida para estudos, sendo realizado cultivo em macro escala em meio sólido (arroz) por 21 dias. A solução etanólica sofreu partição líquido-líquido com AcOEt e hexano. Os metabólitos foram isolados por métodos cromatográficos e determinados por RMN. Foram identificadas as substâncias: ácido graxo, triacilglicerol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. Os extratos, de cultivo micro e macro escala, e as substâncias identificadas foram avaliadas pelo método MDA e CIM frente às bactérias certificadas *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo que para o ensaio em MDA os extratos apresentaram atividades antimicrobiana e para CIM, a fração A5C1-5 apresentou atividade bactericida.

Palavra-chave: bactérias endofíticas, *Phanera splendens*, perfil cromatográfico, ensaio antimicrobiano

## ABSTRACT

The Amazon is the largest tropical rainforest in the world and stands out for having the largest diversity of plants, and numerous species of microorganisms, including fungus and bacteria with huge potential for the development of new products. However, in recent years, the difficulty and high cost of developing new drugs, with different acting power, has become a major challenge for the pharmaceutical industry and the emergence of resistance to drugs already used demonstrates the enormous need and applicability of screening of microorganisms for the discovery of new classes of antimicrobials. Endophytic bacteria are important for the pharmaceutical and biotechnology field due to the discovery of new substances for human therapeutic use, such as antibiotics and anticancer drugs. The present study aimed to perform the chemical profile and evaluation of the antimicrobial activity of bacteria isolated from *Phanera splendens*. A specimen of *P. splendens* was collected at Embrapa Eastern Amazonia in seasonal season and 40 endophytic bacteria were cultured for 7 days in liquid BHI and the liquid medium was liquid-liquid partitioned with AcOEt, the AcOEt extracts had their chemical profiles obtained. HPLC (High Performance Liquid Chromatography), in which the bacterium B1.5C1 was chosen for studies, and cultivation was performed in macroscale in solid environment (rice) for 21 days. The ethanolic solution was liquid-liquid partitioned with EtOAc and hexane. The metabolites were isolated by chromatographic methods and determined by NMR. The following substances were identified: fatty acid, triacylglycerol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. and identified substances were evaluated by the MDA and MIC method against *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) certified bacteria. MDA extracts showed antimicrobial activity and for MIC, fraction A5C1-5 showed bactericidal activity.

Keyword: endophytic bacteria, *Phanera splendens*, chromatographic profile, antimicrobial assay

## LISTA DE FIGURA

<b>Figura 1.</b> Estrutura Antimicina A18.....	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura das substâncias Dinactina dimérica, nonactina dimérica.....	19
<b>Figura 3.</b> Substâncias bioativas obtidas de bactérias endofíticas de <i>Lychnophora ericoides</i> localizada do cerrado brasileiro.....	20
<b>Figura 4.</b> Estrutura de arenimicina.....	22
<b>Figura 5.</b> Imagem de parte da planta <i>Phanera splendens</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Solução etanólica das bactérias em meio sólido (arroz) após 24 horas de extração.....	28
<b>Figura 7.</b> Cultivo em meio sólido .....	29
<b>Figura 8.</b> Fluxograma referente ao processo de isolamento do extrato AcOEt por Sephadex-LH -20.....	30
<b>Figura 9.</b> Fluxograma referente ao processo de isolamento da fração A5C1-3 por Sílica gel.....	31
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt 1ª coleta $\lambda_{MAX}$ 230 nm, parte 1.....	39
<b>Figura 11.</b> Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt da 1ª coleta $\lambda_{MAX}$ 230 nm, parte 2.....	40
<b>Figura 12.</b> Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt da 2ª coleta $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	40
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de B1.5C1 $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	41
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico do extrato hexânico da B1.5C1 $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	42
<b>Figura 15.</b> Espectro no UV em $\lambda_{MAX}$ 230 nm das bandas do cromatograma extrato hexânico.....	42
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico do extrato AcOEt B1.5C1 $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	43
<b>Figura 17.</b> Espectro no UV $\lambda_{MAX}$ 230 nm das bandas do cromatograma extrato AcOEt.....	43
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico de comparação dos extratos hidroetanólico, AcOEt e hexano da B1.5C1 (arroz) $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	44
<b>Figura 19.</b> Perfil cromatográfico do extrato AcOEt das frações obtidas por Sephadex LH-20, $\lambda_{MAX}$ 230 nm.....	45

<b>Figura 20.</b> Estrutura do estigmasterol e $\beta$ -sistosterol.....	46
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura S1 e S2.....	49
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura S1 e S2.....	50
<b>Figura 23.</b> Estrutura do Ácido graxo.....	51
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância S3.....	52
<b>Figura 25.</b> Estrutura do triacilglicerol.....	53
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da S4.....	54
<b>Figura 27.</b> Ensaio antimicrobiano MDA dos extratos da bactéria B1.5C1 em triplicata.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fases orgânicas da bactéria B1.5C1 e do meio de cultura (branco).....	30
<b>Tabela 2.</b> Bactérias endofíticas isoladas da 1º coleta da planta <i>Phanera splendens</i> e morfologia.....	37
<b>Tabela 3.</b> Bactérias endofíticas isoladas da 2º coleta da planta <i>Phanera splendens</i> e morfologia.....	38
<b>Tabela 4.</b> Identificação das bactérias endofíticas isoladas da <i>Phanera splendens</i> por método de VITEK-2.....	39
<b>Tabela5.</b> Sinais de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para mistura S1 e S2 juntamente com os dados descritos na literatura para estigmasterol e o β-sitosterol, respectivamente.....	47
<b>Tabela 6.</b> Sinais de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para mistura S1 e S2 juntamente com os dados descritos na literatura para estigmasterol e o β-sitosterol, respectivamente.....	48
<b>Tabela7.</b> Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração 1x10 <sup>4</sup> UFC frente aos extratos AcOEt das bactérias da 1ª coleta, a quais foram cultivadas em micro escala meio sólido (arroz).....	56
<b>Tabela 8.</b> Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração 1x10 <sup>4</sup> UFC, frente aos extratos AcOEt, das bactérias da 2ª coleta, a quais foram cultivadas em micro escala, meio sólido (arroz).....	57
<b>Tabela 9.</b> Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração 1x10 <sup>4</sup> UFC, frente aos extratos AcOEt, hexânico e hidroetanólico da bactéria B1.5C1.....	57
<b>Tabela 10.</b> Frações e substâncias, submetida a ensaio antimicrobiano, em µg/mL.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de Etila
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>BGP</b>	Bacilos Gram-Positivo
<b>BOD</b>	Biochemical oxygen demand
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CGP</b>	Cocos Gram-Positivo
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CIL</b>	Cambridge Isotope Laboratorius
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Dublo dupleto
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DAD</b>	Detector diode arraya
<b>ed.</b>	Edição
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IEC</b>	Instituto Evandro Chagas
<b>ISP<sub>2</sub></b>	International Stretomyces Project Medium
<b><i>LaBQuiM</i></b>	Laboratório de Bioensaios e de Química de Micro-organismos
<b>MHz</b>	MegaHertz
<i>m</i>	Multipleto
<b>MDA</b>	Método Difusão Ágar
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MH</b>	Muller Hinton
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>µL</b>	Microlitos
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p.</b>	Página
<b>ppm</b>	Partes por Milhão

**RMN <sup>13</sup>C**                    Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13  
**RMN <sup>1</sup>H**                    Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1  
**s**                                Singleto  
**UFPA**                        Universidade Federal do Pará  
**V.**                              Volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 RELAÇÃO ENDÓFITO -PLANTA E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	17
2.2 ANTIBIÓTICOS.....	17
2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PRODUTORES DE NOVOS FÁRMACOS.....	18
2.4 INEFICÁCIAS DOS ANTIBIÓTICOS FRENTE À RESISTÊNCIA BACTÉRIANA.	20
2.5 <i>PLANTAPHANERA SPLENDENS</i> .....	23
<b>3 OBJETIVO</b> .....	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	25
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.3. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	26
4.4 IDENTIFICAÇÃO.....	26
<b>4.4.1 Identificação preliminar automática</b> .....	26
4.5 CULTIVO EM PEQUENA E MACRO ESCALA E PERFIS CROMATOGRÁFICOS	27
<b>4.5.1 Cultivo em microescala meio líquido (B.H.I.) e perfis cromatográficos por HPLC</b> .....	27
<b>4.5.2 Cultivo em microescalas em meio sólido (arroz)</b> .....	28
<b>4.5.3 Cultivo em macroescala em meio sólido (arroz) e verificação do perfil cromatográfico</b> .....	28
4.6 ISOLAMENTO E/OU IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	29
<b>4.6.1 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt B1.5C1</b> .....	29
<b>4.6.2 Determinação e/ou elucidação estrutural</b> .....	31
4.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS DE MÉTODO DIFUSÃO EM ÁGAR (MDA) E CONTROLE INIBITÓRIO MÍNIMO (CIM).....	32

<b>4.7.1. Ensaio antimicrobiano de método difusão em Ágar (MDA)</b> .....	32
4.7.1.1 Ativação das bactérias.....	32
4.7.1.2 Padronização das culturas.....	32
4.7.1.3 Preparo das amostras.....	33
4.7.1.4 Método de difusão em Ágar (MDA).....	33
4.7.1.5 Tipo de atividade.....	33
<b>4.7.2. Ensaio antimicrobiano de controle mínimo inibitório (CIM)</b> .....	34
4.7.2.1 Ativação das bactérias.....	34
4.7.2.2 Padronização das culturas.....	34
4.7.2.3 Preparo das amostras.....	34
4.7.2.4 Preparo do corante.....	34
4.7.2.5 Ensaio para medir o CIM.....	34
4.7.2.6 Tipo de atividade.....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA PLANTA <i>PHANERA SPLENDENS</i> .....	36
5.2 ANÁLISES DE PERFIL CROMATROGRÁFICO EM MEIO LÍQUIDO (B.H.I.) DE MICRO EXTRATOS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	39
5.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ORGÂNICO DA BACTÉRIAB1.5C1 EM MACRO ESCALA.....	41
5.4 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA COLUNA DE EXCLUSÃO.....	44
5.5 ISOLAMENTO E/OU IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO AcOEt A5C1-3. ....	45
<b>5.5.1 Mistura de estigmasterol e <math>\beta</math>-sitosterol</b> .....	46
<b>5.5.2 Substância (S3): Ácido graxo</b> .....	51
<b>5.5.3 Substância (S4): Triacilglicerol</b> .....	53
5.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS.....	55

<b>5.6.1 Ensaio antimicrobiano MDA.....</b>	<b>55</b>
<b>5.6.2 Ensaio antimicrobiano CIM.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca da maior biodiversidade mundial, com sua dimensão continental e enorme variedade de habitat terrestres e aquáticos, reúne seis importantes biomas (Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal) e o maior sistema fluvial do mundo. (ICMBIO/MMA, 2018). Segundo Jaydione e colaboradores (2012). A floresta amazônica possui uma extensão de aproximadamente 7.000.000 km<sup>2</sup>, e sua maior parte está presente em território brasileiro (estados do Amazonas, Amapá, Rondônia, Acre, Pará e Roraima) (IBGE 2012)(equivalente à área continental dos EUA). A floresta amazônicas e destaca por ter a maior diversidade de plantas, além de inúmeras espécies de microrganismos, entre eles fungos e bactérias com enorme potencial para a elaboração de novos bioprodutos. Porém, as espécies que a compõem essa biodiversidade e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004).

Os microrganismos fazem parte da história evolutiva da terra há 3-4 bilhões de anos iniciado quando se detectou os primeiros fósseis desses seres vivos (PAN et al., 2010). Por aproximadamente 1,5 bilhão de anos, procariotos foram as únicas formas de vida na terra (EVERT e EICHORN et al., 2014) desenvolvendo ao longo do tempo, a capacidade de sobreviver e se adaptar ao ambiente, bem como a de utilizar diversos meios e estratégias competitivas para suas existências (PAN et al., 2010); são potenciais produtores de moléculas essenciais na produção de medicamentos que ajudam a salvar milhares de vidas como antibióticos, e outros que prestam grande auxílio na saúde humana (CONTI et al., 2012).

Entre as adaptações desenvolvidas pelos microrganismos têm-se a relação entre planta e endófito no qual as plantas encontram-se relacionadas a esses microrganismos endofíticos que geralmente são associados com a sanidade da planta hospedeira através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários (ESPOSITO et al., 2004; BAYAT et al., 2009).

As bactérias endofíticas possuem grande potencial como agente de controle biológico de fitopatógenos, pois ao se associarem à planta hospedeira, produzem antibióticos, sideróforos e enzimas com ação antimicrobiana (STROBEL, 2006). Essa observação explica o motivo dos avanços de estudos dos produtos naturais provenientes de bactérias endofíticas terem se tornados fontes de moléculas bioativas com grande potencial para o desenvolvimento de produtos na

indústria farmacêutica, incluindo aqueles utilizados em ensaios clínicos para o tratamento de doenças provocadas por micro-organismos (ASOLKAR *et al.*, 2010).

Os estudos com metabólitos secundários propiciam grande avanços no desenvolvimento de técnicas de cromatografia e identificação de substâncias. Desde o século XIX, químicos orgânicos dedicam-se com empenho na elucidação de novas estruturas, aprimorando inclusive metodologias, potencializando os efeitos de algumas substâncias ou mesmo, produzindo-as em largas escala. A descoberta da diversidade estrutural e, conseqüentemente, e de possíveis aplicações desses metabólitos move grande parte os estudos realizados atualmente visando suas aplicações na indústria de cosméticos, perfumaria, alimentos, entre outras. O reconhecimento das propriedades biológicas de muitos desses metabólitos, resultam em um elevado número de pesquisas voltadas a busca por novas substâncias com atividades antimicrobianas antiproliferativa, inseticida ou herbicida (MOTTA *et al.*, 2011, MOTTA *et al.*, 2013, SAVIETTO *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a dificuldade e alto custo do desenvolvimento de novos fármacos, com diferenciado poder de atuação, tornou-se um grande desafio para a indústria farmacêutica o que desencadeou em um declínio no lançamento de novos fármacos no mercado (DEMAIN, 2014). Juntamente, com este problema, está o aparecimento de resistência aos medicamentos já utilizados, o surgimento de novas doenças e problemas com a toxicidade (reação adversa aos medicamentos). Isto demonstra a enorme necessidade e aplicabilidade da triagem de microrganismos para o descobrimento de novas classes de antimicrobianos (CAMPO, 2009).

Diante do potencial dos micro-organismos endofíticos o trabalho teve como objetivo isolar as bactérias da planta medicinal *Phanera splendens*; a qual codificaram-se, identificaram-na e foram armazenadas no Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismo *LaBQuiM* – UFPA e realizou-se estudo químico e avaliação antimicrobiana dos extratos obtidos da bactéria endofítica B1.5C1 isolada da *Phanera splendens*.

## 2REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1RELAÇÃO ENDÓFITO -PLANTA E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Considerando todas as limitações associadas com a produtividade e vulnerabilidade de espécies de plantas, como fontes de novos metabólitos, os microrganismos servem como a mais nova, renovável e reprodutível fonte inesgotável de novas estruturas com potencial farmacêutico. Os microrganismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, podem desempenhar funções importantes para o desenvolvimento da planta, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, fitohormônios como a auxina e de compostos orgânicos voláteis que promovem o seu crescimento (HARDOIM et al., 2015). Além disso, podem estar envolvidos na proteção contra patógenos, pragas e insetos, por meio da competição por espaço e nutrientes e pela produção de compostos antimicrobianos (MARTINS et al., 2014).

Os estudos sobre endófitos também têm aumentado, especialmente por serem considerados uma rica fonte de novos compostos bioativos, como anticancerígenos e antioxidantes, importantes fármacos e produtos de interesse biotecnológico como enzimas, compostos químicos e voláteis e carotenóides (VALDUGA et al., 2014; HARDOIM et al., 2015).

### 2.2ANTIBIÓTICOS

Os antimicrobianos são substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos inibindo o seu crescimento ou causando a sua destruição (SÁEZ-LLORENS, 2000). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Os antibióticos foram definidos como substâncias químicas sintetizadas por várias espécies de microrganismos, vegetais, animais, que dificultam o crescimento de outros. A descoberta dos antibióticos e quimioterápicos permitiu o controle e cura das doenças infecciosas, mudando a evolução natural dessas doenças de forma marcantes (MOREIRA, 2004).

A descoberta dos antibióticos sulfonamidas e  $\beta$ -lactâmicos na década de 1930 levaram a um profundo impacto na saúde humana, por tornar possível o tratamento rápido de pacientes com infecções bacterianas que anteriormente eram consideradas fatais (BUTLER; COOPER, 2011).

Os antibióticos, por produzirem efeitos benéficos e maléficos para os pacientes, são medicamentos obrigados a serem vendidos com prescrição médica, mas ao contrário ainda são

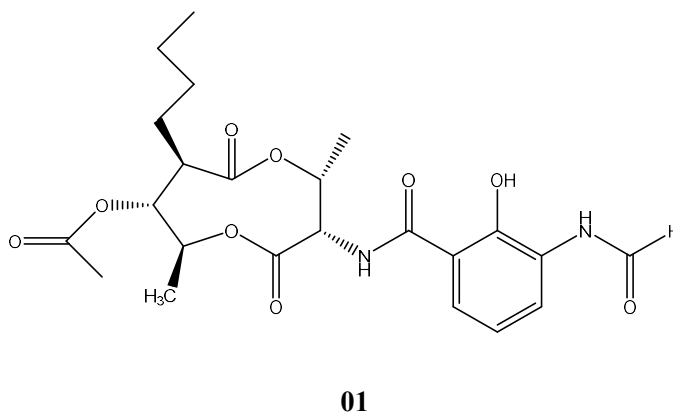
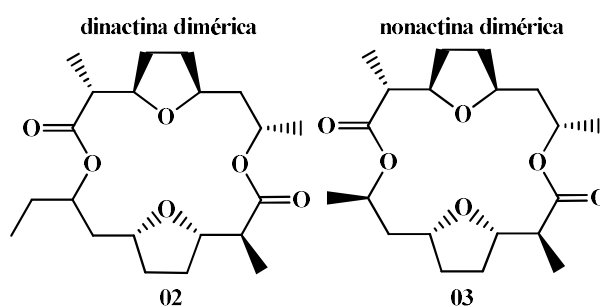
vendidos sem restrição nas farmácias, sendo assim, um dos principais fatores que contribuem para a resistência bacteriana e muitas vezes a ineficácia terapêutica (SOBRAVIME, 2001).

### 2.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PRODUTORES DE NOVOS FÁRMACOS

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos na terra, sendo os organismos mais bem-sucedidos do planeta em relação ao número de indivíduo podendo compreender mais de um milhão de espécies (KALLMEYER et al., 2012). Apesar dessa grande diversidade estima-se que se tenha o conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (TORSVIK et al., 2012).

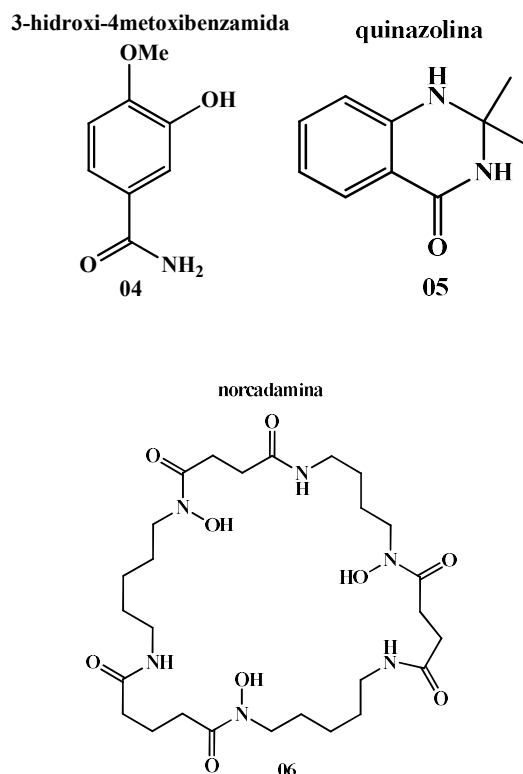
As bactérias são organismos extremamente adaptáveis e, por isso, extremamente capazes de viver em qualquer ambiente da Terra e, através de sua atividade metabólica que afetam as propriedades físicas e químicas de todo o ambiente a sua volta ocupando ou colonizando todos os nichos possíveis, desde o sistema digestivo de animais superiores e materiais mortos até fonte termal submarina, incluindo as superfícies e interiores de plantas, águas doces e salgadas, interiores de rochas e geleiras (NEWMAN & BANFIELD, 2002).

As bactérias endofíticas têm sido investigadas quanto aos metabólitos secundários, têm apresentados relatos sobre produção de substâncias bioativas (CLARDY et al., 2006), dentre elas pode-se citar antimicina A18 (01), um macrolídeo produzido da actinobacteria endofítica *Streptomyces albidoflavus* obtida do isolamento de uma planta de mangue *Bruguiera gymnorrhiza* (figura 1, p.19) que possui atividade antifúngica (YAN et al., 2010); outras substâncias são dinactina dimérica (02) e nonactina dimérica (03) (figura 2, p.19) que são macrolídeos com atividades antibacterianas e antitumoral ambos obtidos de actinobacteria endofítica *Streptomyces sp.* isolada da planta hospedeira *Maytenus hookeri*(ZHAO et al., 2005).

**Figura 1.** Estrutura Antimicina A18**Figura 2.** Estrutura das substâncias Dinactina dimérica, nonactina dimérica.

Estudo de micro-organismo no Brasil também tem verificado resultados excelentes com actinobactérias endofíticas, exemplo disso é verificado em bacterias endofíticas isolada da planta medicinal *Lychnophora ericoides* conhecida como arnica da serra onde foram isoladas dezesseis substâncias, dentre elas três se destacaram (figura 3, p. 20): uma substância inédita a 3-hidroxi-4-metoxibenzamida (04), a nocardamine (06) com forte atividade contra *Trypanosoma Cruzi* e a quinazolinona (05) este último já era obtido de maneira sintética, porém foi isolada pela primeira vez como produto natural e durante testes biológicos, a substância norcadamina (06) apresentou-se ativa contra quatro linhas celulares de cancer como: cólon-HCT-8, melanoma MDA-MB435, glioblastoma-SF-295 e leucemia HL-60 (CONTIA *et al.*, 2016).

**Figura 3.** Substâncias bioativas obtidas de bactérias endofíticas de *Lychnophora ericoides* localizada do cerrado brasileiro.



A indústria farmacêutica tem pesquisado cada vez mais a relação endófito planta, onde há a presença dos microrganismos endofíticos a qual interagem com a planta, sem lhe causar malefícios e ser produtor de antimicrobianos, sendo assim, dirige-se a identificar e produzir novos antibióticos que sejam eficazes contra os microrganismos resistentes.

## 2.4 INEFICÁCIAS DOS ANTIBIÓTICOS FRENTE À RESISTÊNCIA BACTÉRIANA

A incidência de infecção por bactérias resistentes aos medicamentos continua a aumentar e ainda é uma ameaça grave para a saúde humana, segunda a Organização Mundial da Saúde (OMS) essa resistência está ocorrendo em todas as regiões do mundo e as infecções de superbactérias, associadas a doenças como a tuberculose mata cerca de 700 mil pessoas por ano ao redor do mundo (CDC, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em abril de 2014 o relatório: “Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance” no qual descreve a atual situação da problemática da resistência bacteriana no mundo. Segundo o documento, o mundo está prestes a entrar em uma era “pós-antibióticos”, uma vez que em algumas regiões, o uso de

antibióticos não é eficaz. Ainda segundo o relatório, o problema também parece ser particularmente agudo nos países de economias emergentes, conhecidas como estados do “BRIC”: Brasil, Rússia, Índia e China”. Países desenvolvidos também são afetados em grande escala por estes microrganismos, nos Estados Unidos da América, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina provocou uma taxa de mortalidade maior que os casos de morte por HIV e Hepatite B somados (CDDEP, 2012).

Um panorama mundial, a partir da análise de dados oficiais nacionais, mostra que o quadro é preocupante. A começar pela falta de informações dos países sobre a situação de seus territórios, uma vez que apenas 114 dos 194 países fornecem dados nacionais sobre a resistência aos antibióticos (OMS, 2014). No Brasil, a resistências bacterianas nos hospitais representa um grande problema e um desafio na terapia das infecções bacterianas (ROSSI, 2011).

As taxas de resistências estão aumentando mundialmente, novos mecanismos de resistências estão surgindo e infecções causadas por bactérias multirresistentes estão cada vez mais difíceis de tratar. Nosso arsenal atual de antibióticos está constantemente a perder a sua eficácia e há poucos sinais de que será devidamente repostos em um futuro próximo (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes a uma ampla distribuição de antibióticos—incluindo *S.aureus* resistentes a metilina (MRSA) da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina é uma causa de preocupação crescente em todo mundo e tornou-se um problema de pandemia devido às limitadas opções terapêuticas disponíveis (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013; FERREIRA et al., 2014).

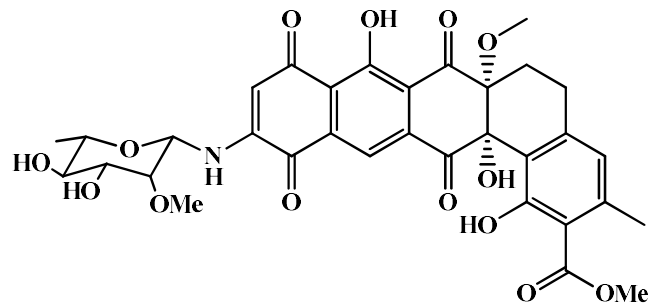
O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os microrganismos, mas é acelerado pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de agentes antibacterianos. Cepas resistentes são capazes de se propagar onde há descumprimento de medidas de prevenção e controle de infecções (OMS, 2014).

As mortes anuais relacionadas a casos de resistências a antibióticos poderão chegar em 2050 a 4,7 milhões na Ásia, 4,1 milhões na África e 392 mil na América Latina (CDC, 2016; NCBI, 2016). O uso constante de antimicrobianos inevitavelmente leva a seleção de microrganismos resistentes, surgindo à necessidade contínua por novos antibióticos. As bactérias como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*

*sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Enterococcus faecalis* são as mais relatadas em ambiente hospitalar, pois vem desenvolvendo um alto poder de resistência a antibióticos e vem ganhando importância para a OMS, a OMS se preocupa com o tratamento das doenças causadas por esses micro-organismos devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos de última geração (NCBI, 2016).

Microrganismos, como, por exemplo, bactérias marinhas pertencentes à ordem Actinomycetales, oferecem uma rica fonte de moléculas bioativas que têm potencial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. O gênero *Salinispora* apresentou compostos como a salinosporamida A, que atualmente está sendo utilizado em ensaios clínicos para o tratamento de câncer (ASOLKAR *et al.*, 2010). Estes compostos incluem antibióticos potentes da classe rifamicina, que são obtidos a partir de extratos de *Salinispora arenicola*. O antibiótico arenimicina (figura 4), obtido a partir do caldo de cultura após fracionamento biomonitorado, seguido de purificação da fração ativa, apresenta potente atividade antimicrobiana contra estafilococos resistentes aos medicamentos. Esta estrutura, que foi isolada a partir da actinobactéria *S. arenicola*, pertence à classe de antibióticos rifamicina (ASOLKAR *et al.*, 2010).

**Figura 4.** Estrutura de arenimicina



Fonte: ASOLKAR, 2010

A busca de novos produtos farmacêuticos continua a exigir esforços e hoje muitos medicamentos produzidos foram, originalmente, derivados de fontes naturais, como plantas e micro-organismos e estudos sobre a potencialidade dos micro-organismos endofíticos, principalmente os relacionados à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle biológico de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica.

## 2.5 PLANTAPHANERA SPLENDENS

A *Phanera splendens* (figura 5), pertence à família Leguminosae (Fabaceae). A espécie passou por controvérsias taxonômicas, sendo que já foi denominada *P.guianensis* (Aubl.). Vaz, pente. Nov., *Bauhinia guianensis* Aubl., *B.splendens*, porém desde 2010 é denominada *Phanera splendens*(VAZ, 2010).

**Figura 5.** Imagem de parte da planta *Phanera splendens*



Fonte: Autor

O gênero *Phanera* é de ocorrência pantropical e possui cerca de 300 espécies, contemplando árvores, arbustos e cipós com folhas simples inteiras, biloboladas ou bifoliadas, que normalmente causam controvérsias taxonômicas com o gênero *Bauhinia*(HAO *et al.*, 2003). No Brasil, em especial, a ocorrência de tal gênero é amplamente distribuída em biomas tão diversos quanto em áreas de seca como a caatinga, assim como nas florestas tropicais, com alto teor de umidade, e a similaridade nas características morfológicas têm sido objetivo de exaustivas tentativas taxonômicas (VAZ, 2010). Muitas espécies destes gêneros são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas como antifúngicos, antibacterianos, analgésicos, anti-inflamatórios e no tratamento da diabete (SCHULTES, 1990; AMOROZO *et al.*, 1988).

Desse modo, e justificável o seguinte trabalho cujo objetivo e realizar o isolamento das bactérias endofíticas em *Phanera splendens* e realizar o ensaio antimicrobiano dos extratos.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar, realizar o perfil cromatográfico das bactérias endofíticas de *Phanera splendens* e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Coletar a planta *Phanera splendens* em período sazonal;
- ❖ Isolar as bactérias endofíticas da *Phanera splendens* utilizando o meio de cultura adequado;
- ❖ Identificar as bactérias isoladas;
- ❖ Obter o perfil cromatográfico por HPLC dos microextratos das bactérias endofíticas isoladas;
- ❖ Realizar o cultivo em macro escala em meio de cultura sólido da bactéria de melhor perfil cromatográfico;
- ❖ Isolar os metabólitos secundários presente no extrato em macro escala e identificá-lo por técnica de RMN;
- ❖ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos bacterianos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os espécimes de *Phanera splendens* foram coletados na Embrapa Amazônia Oriental, em Belém – PA localizada na Estrada da Ceasa, 702-992 - Curió-Utinga, Belém – PA, latitude 1°26'04.1"Se Longitude 48°26'33.7"W. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados e transportadas à temperatura ambiente até o Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos – *LaBQuiM/UFPA* onde procedeu-se o processo de desinfecção antes dos isolamentos das bactérias endofíticas.

As amostras foram separadas em oito partes denominadas, casca do caule (CC), parte interna do cipó (IC), parte externa do cipó (EC), galhos (G), folhas (F), semente (S), casca do fruto (CF) e fruto parte interna (IF), onde foram isoladas as bactérias endofíticas. As coletas do espécime foram realizadas acompanhadas pelo Manoel dos Reis Cordeiro parataxônomo, e registrada no herbário da Embrapa sob n°195.571.

A coleta foi realizada em duas etapas, sendo considerado o período sazonal da Amazônia. A primeira coleta foi realizada às 07 h da manhã do dia 13 de março de 2017 (período chuvoso e as bactérias isoladas sendo denominada com prefixo de B.1) e a segunda às 07 h do dia 11 de setembro de 2017 (período de seca e as bactérias sendo denominada com prefixo de B.2).

### 4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Após as amostras serem lavadas em água corrente, realizou-se a escolha do material vegetal, selecionando de um modo geral as que se apresentavam saudáveis. A escolha dos materiais procedeu-se ao isolamento, realizando-se uma amostra composta por bloco, cortando os tecidos vegetais em fragmentos com auxílio de um bisturi estéril, realizando-se logo após o processo de desinfecção conforme metodologia proposta por CERIGOLI (2005) com algumas modificações.

Cada material foi lavado em água destilada para a eliminação do excesso de resíduos e micro-organismos epifíticos. Pedacos da planta selecionados foram primeiramente lavados com sabão neutro em água corrente e posteriormente, dentro da capela de fluxo laminar (PANCHANE PA320), foi realizada uma série de imersões para assepsia e eliminação dos micro-organismos epifíticos, primeiramente em hexanoPA (Tedia Brazil<sup>®</sup>) por 1 minuto, depois álcool 70 % por 30 segundos, em seguida solução de hipoclorito de sódio 2% por 4 minutos e, por fim, em água esterilizada por três vezes.

### 4.3. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

O isolamento seguiu a metodologia de Araújo e colaboradores (2002). Antes de iniciar a fragmentação com cerca de 1 cm<sup>2</sup> de cada tecido vegetal desinfetado, foram retiradas as bordas e nervuras de cada folha utilizando um estilete esterilizado, a fim de facilitar a passagem dos endofíticos para o meio de cultivo. Em cada tubo de ensaio com caldo B.H.I. (Infuso Cérebro Coração, preparado de acordo com o fabricante) foram colocados três pedaços do respectivo órgão vegetal e para o controle foi colocado três gotas da água esterilizada da última lavagem. Deste modo, foi utilizado no total 22 tubos de ensaio que foram transportados para Instituto Evandro Chagas (IEC).

No laboratório de bacteriologia do IEC esperou-se 24 h contando com o tempo de incubação nos tubos de ensaio com caldo B.H.I. para o desenvolvimento das primeiras colônias bacterianas crescidas a partir dos tecidos vegetais que posteriormente foram transferidas para novas placas de Petri (sendo esse procedimento repetido por 8 dias) contendo os seguintes meios Ágar B.H.I.; Agar MacConkey; Agar SS; Agar XLD, Ágar ISP2; M.H.A. Os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos utilizando-se autoclave vertical modelo (PHOENIX) para garantir total esterilidade dos meios, com exceção os meios Agar SS e XLD.

As placas foram armazenadas em incubadoras em estufa do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (QUIMIS) a 30 °C até o crescimento das colônias bacterianas. As colônias bacterianas crescidas foram transferidas para novas placas de Petri com o mesmo meio de cultura utilizado no isolamento. Todas as bactérias que apresentaram crescimento foram imediatamente purificadas através da técnica de repiques sucessivos em estrias paralelas, e por semeadura em estrias por esgotamento (DROVAL *et al*, 2001; TORTORA *et al*, 2006). As bactérias endofíticas isoladas foram codificadas e armazenadas em meio de estoque sob-refrigeração no Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos -*LaBQuiM* – UFPA.

## 4.4 IDENTIFICAÇÃO

### 4.4.1 Identificação preliminar automática

Identificação no VITEK seguiu-se com as amostras de acordo com o cultivo em placa do item 4.2. Após 24 horas de incubação dos microrganismos, estes foram postos em identificação no VITEK. Para este método de identificação foi necessário seguir os seguintes passos para cada microrganismo: Num tubo de ensaio de poliestireno, foram colocados 3mL de uma solução

aquosa a 0,45% de NaCl, pH 5,0 - 7,2; com uma alça estéril transferiu-se um número suficiente de colônias isoladas da placa com a cultura fresca (18 horas); homogeneizou-se a suspensão no (IKA-Genius 3).E foi realizada a leitura da turbidez do inoculo, com o auxílio de um Densicheck (aparelho que mede a turbidez da amostra dentro do tubo de ensaio); verificou-se que o valor McFarland apresentado variava entre 0,50 - 0,63 após várias medições da mesma. Após esta preparação, foram colocados 25 µL da suspensão num cartucho de identificação de bactérias no ID Endosafe®-PTS™ Gram (sistema que classifica a amostra em colônias Gram-negativas/ Gram-positivas/ leveduras). Após esta classificação foi atribuída uma carta correspondente a esta identificação e a amostra foi colocada no VITEK-2 para identificação. Os resultados da identificação demoraram em média 4 a 18 horas consoante a espécie em identificação. Estes isolados foram identificados no VITEK-2 três vezes, a partir de culturas frescas de dias diferentes como forma de garantir que os isolados selecionados corresponderiam a microrganismos puros. As bactérias endofíticas estão sendo identificada pela pesquisadora Dr<sup>a</sup> Daniela Cristiane da Cruz Rocha do Instituto Evandro Chagas (IEC).

#### 4.5 CULTIVO EM PEQUENA E MACRO ESCALA E PERFIS CROMATOGRÁFICOS

##### 4.5.1 Cultivo em microescala meio líquido (B.H.I.) e perfis cromatográficos por HPLC

Após a verificação do melhor tempo de cultivo as bactérias isoladas da primeira e segunda coleta foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo Ágar B.H.I., por um período de 24 h. Após esse tempo, foram transferidas, com o auxílio de uma alça de cultura aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo B.H.I. e incubadas por mais um período de 24 h. Posteriormente, foi transferido 1mL do pré-inóculo para cada frasco, sendo utilizado dois frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo 150mL de B.H.I., os frascos foram incubados durante 7 dias com agitação (100 rpm) para obtenção do extrato acetato de etila.

Posteriormente, a cultura foi centrifugada (QUIMIS) durante 15 min a 10.000g. Em seguida foi realizada filtração a vácuo utilizando filtros de celulose com poros de 0,22µm e efetuada partição líquido-líquido para cada amostra com 15mL de acetato de etila (AcOEt). Os extratos foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): Coluna Sunfire™ C18 5µm 4,6 x 150 mm (Waters®) acoplada a uma coluna de guarda Sunfire™ C18 5µm 4,6 x 20 mm (Waters®) e utilizando o método de Snyder modificado (SNYDER et al., 2010).

#### 4.5.2 Cultivo em microescalas em meio sólido (arroz)

Foram utilizados 41 frascos pequenos tipo penicilina, sendo um para o branco (controle) com uma quantidade de 10 gramas de arroz parbolizado (tio João®), mais um acréscimo de 5mL de água destilada e esterilizou-se em autoclave vertical de modelo (PHOENIX) por 45 minutos à temperatura 121°C, e esperou-se esfriar para adicionar em cada frasco 1mL do pré-inóculo de cada bactéria da primeira e segunda coleta, respectivamente, em capela de fluxo laminar (PANCHANE PA320) e deixou-se crescer por 21 dias. Após este período foi adicionado 3mL de etanol 96% em capela de fluxo laminar (PANCHANE PA320) com objetivo de matar as bactérias e garantir a não contaminação durante a manipulação do processo, a solução etanólica foi obtida a partir de 24 horas (figura 6) por filtração e efetuado partição líquido-líquido para cada amostra com 15mL de acetato de etila (AcOEt), a solução foi seca, seguindo a metodologia de Contia e colaboradores (2016).

**Figura 6.** Solução etanólica das bactérias em meio sólido (arroz) após 24 horas de extração.



Legenda: microextratos arroz em solução etanólica

Fonte: Autor

#### 4.5.3 Cultivo em macroescala em meio sólido (arroz) e verificação do perfil cromatográfico

A partir dos resultados obtidos dos perfis cromatográficos CLAE, a bactéria B.1.5C1, foi selecionada para o cultivo em larga escala no meio de cultura arroz.

Foram utilizados 12 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, com uma quantidade de 180 g do arroz parbolizado (tio João), mais um acréscimo de 200 mL de água destilada e esterilizou-se em autoclave vertical modelo (PHOENIX) por 45 minutos a 121°C, e esperou-se atingir a temperatura ambiente e em capela de fluxo laminar (PANCHANE PA320), adicionou-se em cada frasco 1mL do pré-inóculo da bactéria B.1.5C1 e deixou-se crescer por 21 dias. Após este período foi adicionado 300 mL de etanol 96% em capela de fluxo laminar com objetivo de matar as

bactérias e garantir a não contaminação durante a manipulação do processo, a solução etanólica foi obtida após 24 horas (figura 7), por filtração e a solução filtrante foi concentrada em evaporador rotativo (QUIMIS), a solução concentrada foi submetida à partição líquido-líquido com os solventes orgânicos hexano e acetato de etila (AcOEt) seguindo a metodologia de Contia e colaboradores (2016).

**Figura 7.** Cultivo em meio sólido



Legenda: bacteriano em meio sólido macroescala (arroz)



Legenda: Solução etanólica após 24 horas

Fonte: Autor

Os extratos foram analisados por HPLC, a fim de obter informações sobre o perfil cromatográfico destes. Para obtenção dos cromatogramas foi empregado gradiente exploratório binário usando mistura de solvente água (A) e acetonitrila (B) em uma coluna analítica  $C_{18}$ , a amostra foi aplicada em solução de concentração de 2 mg/mL e temperatura da coluna 40 °C. Fez-se variar a concentração do solvente B de 5% a 100% durante 60 minutos, com vazão de 2 mL/min. As análises foram acompanhadas por detector de diodos DAD.

#### 4.6 ISOLAMENTO E/OU IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

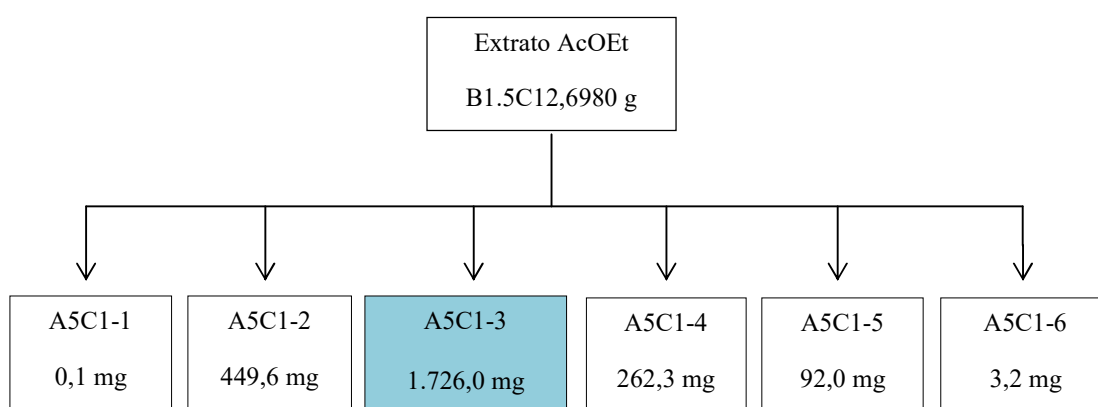
##### 4.6.1 Fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt B1.5C1

A bactéria B1.5C1 foi cultivada em grande escala e obteve as fases hexânicas, AcOEt e hidroetanólica (tabela 1, p.30).

**Tabela 1.** Fases orgânicas da bactéria B1.5C1 e do meio de cultura (branco).

Amostra	Fase	Massa(mg)
B1.5C1	Hexânica	183,0
B1.5C1	AcOEt	2.898,0
B1.5C1	Hidroetanólica	6.0024,9
Branco	Hexânica	1,0
Branco	AcOEt	61,5
Branco	Hidroetanólica	42,8

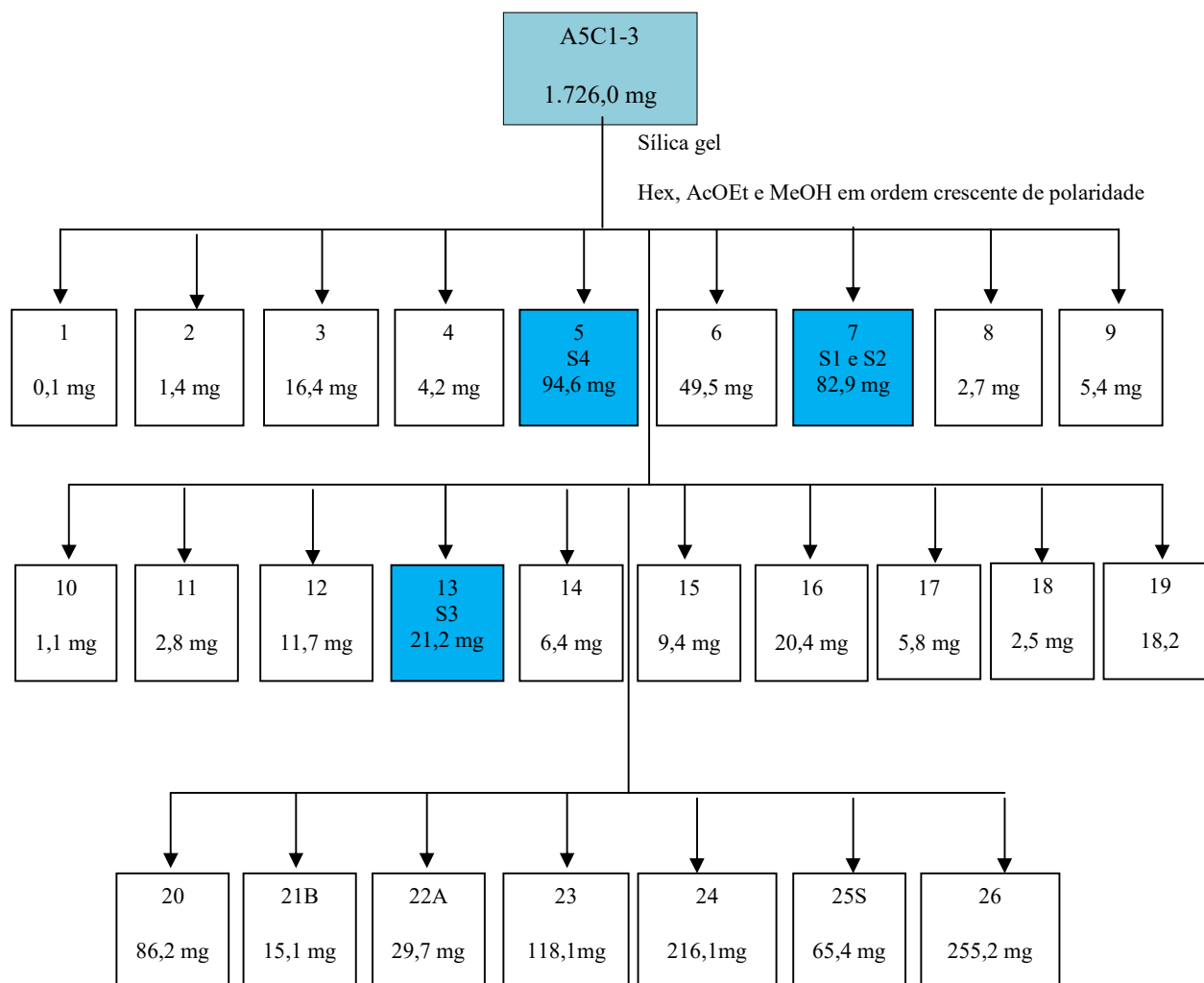
O extrato AcOEtB1.5C1 foi utilizado 2,6980 g da massa total que foi fracionado utilizando cromatografia de exclusão, Sephadex LH-20 e metanol como fase móvel, resultando em seis frações (A5C1-1, A5C1-2, A5C1-3, A5C1-4, A5C1-5, A5C1-6) (figura 8).

**Figura 8.** Fluxograma referente ao processo de isolamento do extrato AcOEt por Sephadex-LH - 20.

As frações foram posteriormente analisada em cromatografia delgada analítica (CCDA) tendo como eluente AcOEt, hexano, diclorometano e MeOH. E em seguida foi verificado seus perfis cromatográficos por HPLC para assim determinar o melhor método de isolamento dos metabólitos secundários.

Após a verificação dos extratos por HPLC foi escolhida a fração A5C1-3. Este foi fracionada utilizando cromatografia de coluna filtrante com sílica gel e hexano, AcOEt e MeOH em gradiente crescente como fase móvel, resultando em 26 frações (figura 9, p.31), as quais posteriormente foram analisadas em cromatografia delgada analítica (CCDA).

**Figura 9.** Fluxograma referente ao processo de isolamento da fração A5C1-3 por Sílica gel.



#### 4.6.2 Determinação e/ou elucidação estrutural

Métodos usuais como RMN (BRUKER) foram usados na determinação e/ou elucidação estrutural acompanhado de comparação dos dados descritos na literatura. As constantes de acoplamento foram medidas em Hz e o solvente clorofórmio deuterados utilizados foram da marca CIL (Cambridge Isotope Laboratorius).

#### 4.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS DE MÉTODO DIFUSÃO EM ÁGAR (MDA) E CONTROLE INIBITÓRIO MÍNIMO (CIM)

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Química de Microrganismos (*LaBQuiM*) da UFPA. Foram utilizadas cepas certificadas das bactérias *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853) cedidas pelo Instituto Evandro Chagas.

Os extratos, frações e as substâncias tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas pelo método de difusão em Ágar (MDA) e CIM (concentração inibitória mínima) de acordo com Maia Araújo e colaboradores (2011) e pela subcomissão de teste à susceptibilidade antifúngica do comitê nacional dos EUA para padrão clínico Laboratorial (CLSI, 2017).

##### 4.7.1. Ensaio antimicrobiano de método difusão em Ágar (MDA)

###### 4.7.1.1 Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri, contendo Ágar B.H.I., por um período de 24 horas. Após esse período foram transferidas, com auxílio de uma alça de cultura estéril, aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaios contendo 3mL de caldo B.H.I. e incubadas por mais um período de 24 horas em estufa B.O.D.(Biochemical Oxygen Demand) (QUIMIS).

###### 4.7.1.2 Padronização das culturas

Obteve-se por meio de uma mistura das soluções de  $H_2SO_4$  a 1% (9,95 mL) e  $BaCl_2$  também a 1% (0,05mL) uma solução de sulfato de bário ( $BaSO_4$ ). Após este processo comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a solução bacteriana padronizada em uma concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL (unidades formadas de colônias por mililitros) com o tubo de ensaio que continha o sulfato de bário. Sendo assim, obtiveram-se a turbidez correspondente à escala de McFarland 0,5( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL), onde as suas concentrações foram padronizadas para se obter uma cultura com aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC, e para a análise dos extratos foram realizadas diluições até alcançar as concentrações de  $1,0 \times 10^4$  UFC.

#### 4.7.1.3 Preparo das amostras

Foram utilizados 1 mg de extratos dissolvidas em 100  $\mu$ L de DMSO, contido em tubos de Eppendorf. Em seguida foram adicionados 900  $\mu$ L de caldo B.H.I. esterilizado. No intervalo de cada adição do solvente e do caldo B.H.I., as amostras eram agitadas para uma melhor homogeneização.

#### 4.7.1.4 Método de difusão em Ágar (MDA)

Em capela de fluxo laminar (PANCHANE PA 320), em 20 placas de Petri se verteu o meio Ágar MH (Mueller Hilton) e deixou esfriar, após a condição ideal de temperatura da placa, mergulhou-se uma alça de cultura estéril em um tubo de ensaio contendo a suspensão bacteriana de uma cepa padrão na concentração  $1,0 \times 10^8$  UFC, ajustada à turbidez de 0,5 da escala McFaland, para bactérias de primeira e segunda coleta, já para os extratos em macro escala foi utilizado 12 placas de Petri para realização do ensaio antimicrobiano MDA e as cepas padrões encontravam-se na concentração de  $1,0 \times 10^4$  UFC para análise dos extratos em macro escala

Na superfície de uma placa de Ágar Mueller Hilton, foi inoculado cada microorganismo esfregando-se a alça de cultura estéril em toda a superfície do Ágar-MH. Em seguida, foram realizadas perfurações no Ágar-MH com 6 mm de diâmetro nas quais foram depositadas alíquotas de 30  $\mu$ L de cada extrato. As placas foram incubadas a 32 °C em estufa B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) (QUIMIS), e após 24 horas foram medidos, os diâmetros dos halos de inibição promovidos pelos extratos, sendo que para análise dos extratos em macroescala foi realizado o ensaio em triplicata.

#### 4.7.1.5 Tipo de atividade

Após as 24 horas de incubação, examinaram-se cada placa. Os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco, medidos em milímetros usando uma régua encostada na parte de trás da placa. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu com no mínimo 7 mm.

## 4.7.2. Ensaio antimicrobiano de controle mínimo inibitório (CIM)

### 4.7.2.1 Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri, contendo Ágar B.H.I., por um período de 24 horas. Após esse período foram transferidas, com auxílio de uma alça de cultura estéril, aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaios contendo 3mL de caldo B.H.I. e incubadas por mais um período de 24 horas em estufa B.O.D.(Biochemical Oxygen Demand) (QUIMIS).

### 4.7.2.2 Padronização das culturas

Obteve-se por meio de uma mistura das soluções de  $H_2SO_4$  a 1% (9,95 mL) e  $BaCl_2$  também a 1% (0,05mL) uma solução de sulfato de bário ( $BaSO_4$ ). Após este processo comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a solução bacteriana padronizada em uma concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL (unidades formadas de colônias por mililitros) com o tubo de ensaio que continha o sulfato de bário. Sendo assim, obtiveram-se a turbidez correspondente à escala de McFarland 0,5( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL), e foram realizadas diluições até alcançar as concentrações de  $1,0 \times 10^4$  UFC.

### 4.7.2.3 Preparo das amostras

Foram utilizados 1 mg de extratos dissolvidas em 100  $\mu$ L de DMSO, contido em tubos de Eppendorf. Em seguida foram adicionados 900  $\mu$ L de caldo B.H.I. esterilizado. No intervalo de cada adição do solvente e do caldo B.H.I., as amostras eram agitadas para uma melhor homogeneização.

### 4.7.2.4 Preparo do corante

Pesou-se 0,1 g TTC (cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólico) e dissolveu-se em 5 mL de água destilada e estéril, homogeneizando a solução. Desta solução pipetou-se 10  $\mu$ L de TTC na cavidade da placa de Elisa.

### 4.7.2.5 Ensaio para medir o CIM

Nas placas de Elisa de 96 furos foram adicionados 100  $\mu$ L de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100  $\mu$ L da solução

contendo a amostra a ser testada e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas sucessivas diluições, retirando-se 100 µL da primeira cavidade (cavidade A) transferindo esse volume para a próxima (cavidade B), homogeneizando, esse procedimento é repetido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde são retirados 100 µL e descartados. A última linha da placa é usada como um controle do meio usado não acrescentando nessa a amostra a ser testada. Por fim em cada cavidade adicionou-se 5µL da suspensão bacterianas e incubou-se as placas a 37 °C por 24 h. A leitura dos resultados foi feita com TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico).

#### 4.7.2.6 Tipo de atividade

Nas cavidades onde não apresentou coloração vermelha, os extratos foram (re)inoculadas em placa de Petri contendo meio de cultura Ágar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde houve impedimento do crescimento da bactéria, indica que o extrato ou substância possui efeito bacteriostático a essa concentração e onde a bactéria não apresentou crescimento, indica que o extrato ou substância possui efeito bactericida.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DA PLANTA *PHANERA SPLENDENS*

Obteve-se 40 isolados bacterianos, sendo 24 isolados na primeira coleta e 16 na segunda coleta, onde a classificação morfológica e Gram (BGP- bacilos gram-positivos, CGP- cocos gram-positivos) se determinaram conforme as tabelas 2 (p. 37) e tabela 3 (p. 38). Entre os isolados foi observado predomínio de bacilos Gram-positivos. As identificações das bactérias estão sendo realizadas no IEC e até o momento apenas duas já foram identificadas. Este número, provavelmente poderia ser maior, pois além do método dificultar o isolamento de colônias devido à forma de crescimento ao redor dos órgãos vegetais tornando difícil diferenciar àquelas que apresentam características distintas. Além disso, selecionaram-se apenas aquelas capazes de se desenvolver no meio de cultura utilizado. Segundo Cerigioli (2005) tais limitações aplicam-se à maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo.

**Tabela 2.** Bactérias endofíticas isoladas da 1ª coleta da planta *Phanera splendens* e morfologia

Parte da planta	Isolados	Formas e coloração de Gram
<b>Galho (G)</b>	B1.1G	BGP
	B1.2G	CGP
	B1.1G(1.1)	BGP
	B1.2G(1.2)	CGP
	B1.2G(1.2)2.1	CGP
	B1.3G	BGP
<b>Folha (F)</b>	B1.10F	CGP
	B1.11F(1.1)	BGP
	B1.11F(1.2)	BGP
	B1.11F2	BGP
	B1.12F1	BGP
	B1.12F2	BGP
<b>Parte interna do cipó (CI)</b>	B1.7CI	BGP
	B1.8CI	BGP
	B1.8CI1	BGP
	B1.8CI2	BGP
	B1.9CI1(1.1)	BGP
	B1.9CI1(1.2)	BGP
	B1.9CI2(1.1)	BGP
	B1.9CI3C	BGP
<b>Cipó (C)</b>	B1.4C	BGP
	B1.6C1	BGP
	B1.5C1	BGP
	B1.5C2(1.1)	BGP
	B1.5C2(1.2)	BGP

Legenda: F (folha); G (galho); C (cipó); CI (parte interna do cipó); BGP (bacilo Gram positivo) e CGP (cocos Gram-positivo).

**Tabela 3.** Bactérias endofíticas isoladas da 2º coleta da planta *Phanera splendens* e morfologia

<b>Meio de cultura</b>	<b>Isolados</b>	<b>Formas e coloração de Gram</b>
<b>MH (Mueller Hinton)</b>	B.2-IF-06 MH	BGP
	B.2-IC-03 MH	BGP
	B.2-S07-MH	BGP
	B.2-G-02 MH	BGP
	B.2-CC-04 MH	BGP
	B.2-CF-08 MH	BGP
	B.2-F-05 MH	BGP
<b>ISP<sub>2</sub> (InternationalStreptomyces Project Medium 2)</b>	B.2-IF-06 ISP2	BGP
	B.2-F-05 ISP2	BGP
	B.2-G-02 ISP2	BGP
	B.2-CF-08 ISP2- 1	BGP
	B.2-CC-04 ISP2	BGP
	B.2-S-07 ISP2	BGP
	B.2-G-02 ISP2-1	BGP
	B.2-CF-08 ISP2- 2	BGP
	B.2-IC-03 ISP2	BGP

Legenda: ISP<sub>2</sub> (InternationalStreptomyces Project Medium2); MH (Mueller Hinton); BGP (bacilo Gram-positivo)e CGP (cocos Gram-positivo).

As identificações das bactérias estão sendo realizadas no VITEK-2 (tabela 4, p.39) que é um sistema automatizado de identificação direcionado a laboratórios de microbiologia clínica que fornece condições de identificação de colônias através de testes bioquímicos. Este sistema de identificação de bactérias e leveduras utiliza cartas colorimétricas com 64 poços, contendo substratos para testes individuais, que são incubadas e interpretadas automaticamente. Para uma melhor detecção é necessário que a colônia esteja totalmente isolada.

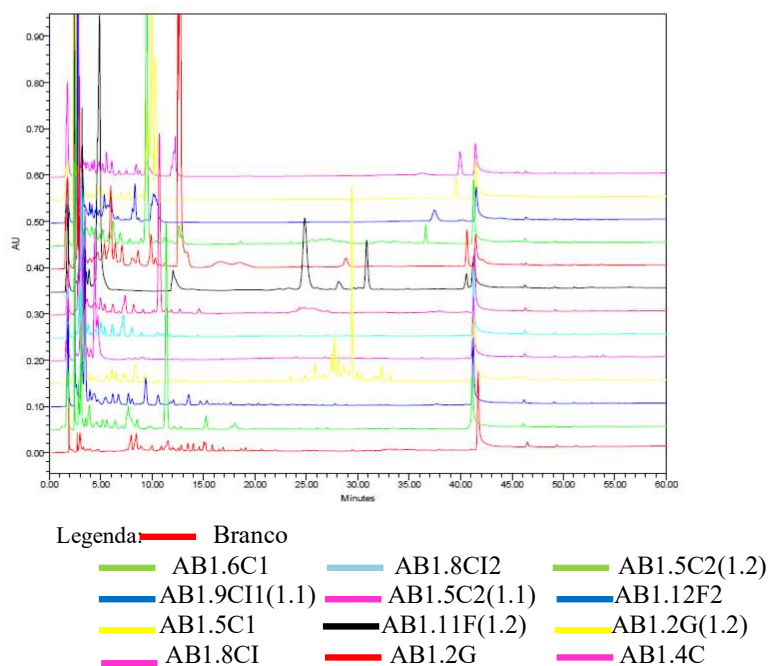
**Tabela 4.** Identificação das bactérias endofíticas isoladas da *Phanera splendens* por método de VITEK-2

Amostra	Identificação automatizada Vitek 02
B1.2G(1.2)	<i>Staphylococcus hominis ssp hominis</i>
B1.2G(1.2)2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

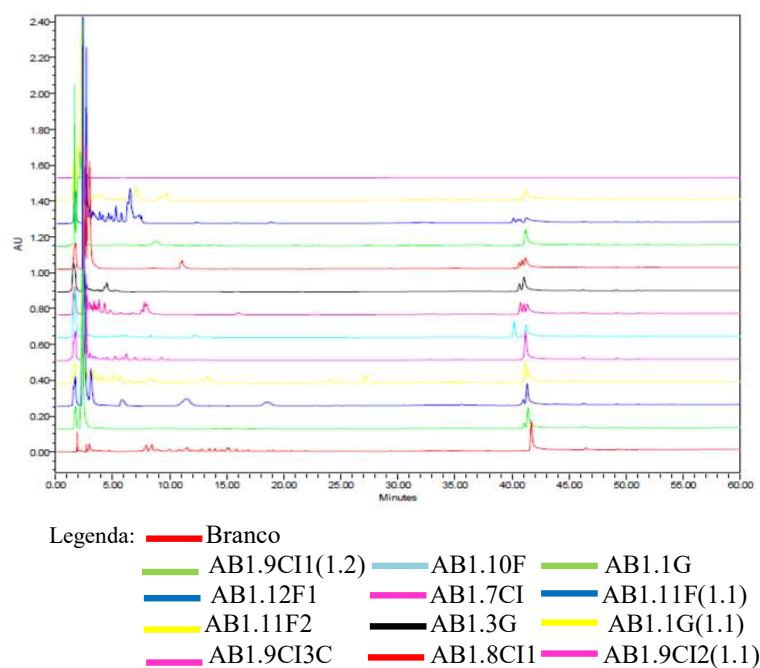
## 5.2 ANÁLISES DE PERFIL CROMATROGRÁFICO EM MEIO LÍQUIDO (B.H.I.) DE MICRO EXTRATOS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Para os 40 extratos bacterianos obtidos foram realizados seus perfis cromatográficos via HPLC no modo analítico em gradiente exploratório 95%-5% H<sub>2</sub>O/Acetonitrila, observando os perfis cromatográficos como pode-se observar (figura 10, 11 e 12, p. 40). A escolha do melhor comprimento de onda para análise, seu adequou-se através do monitoramento da faixa de onda de 200 a 600 nm, a qual o comprimento de onda selecionado para análise foi de  $\lambda_{MAX}$  230 nm, onde se podem observar os metabólitos secundários nos presentes extratos.

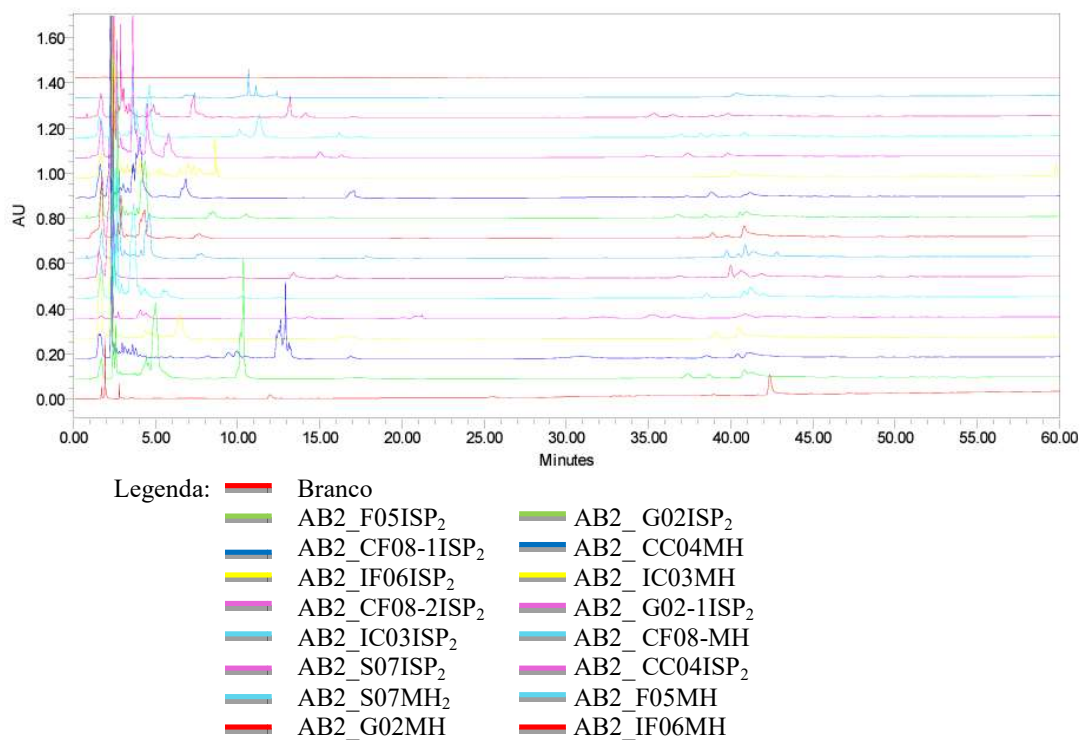
**Figura 10.** Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt<sup>1a</sup> coleta  $\lambda_{MAX}$  230 nm, parte 1.



**Figura 11.** Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt da 1ª coleta  $\lambda_{MAX}$  230 nm, parte 2.



**Figura 12.** Perfil cromatográfico dos micros extratos AcOEt da 2ª coleta  $\lambda_{MAX}$  230 nm.

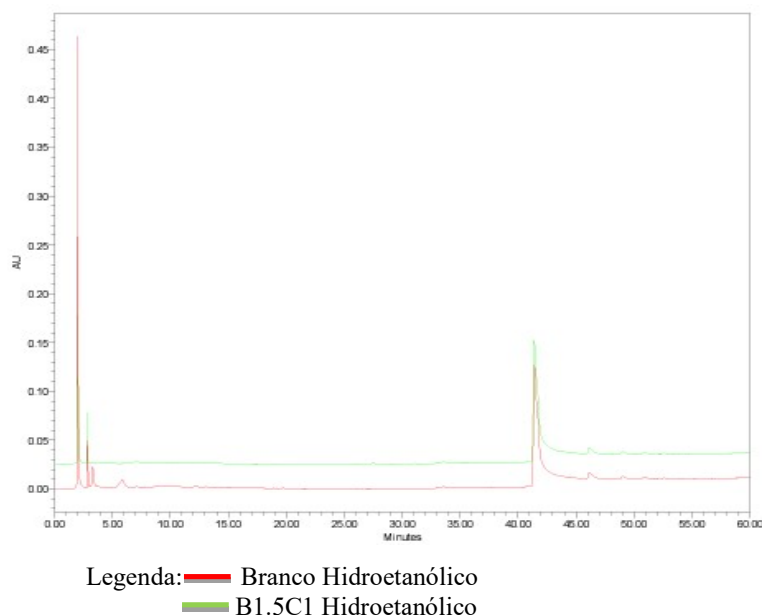


Na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos das 40 bactérias por HPLC, ao longo de 7 dias de cultivo utilizando o AcOEt como solvente de extração pode-se observar que a bactéria B.1.5C1 apresentou melhor produção de metabólitos comparado com as demais bactérias, sendo verificando uma gama de metabólitos de média polaridade. Ao observar as (figuras 9, 10 e 11, p. 39 e 40) pode-se perceber que as bactérias obtidas na segunda extração produziram menores quantidades de metabólitos secundários, justificando a escolha da bactéria para produção de extrato em macro escala.

### 5.3 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO ORGÂNICO DA BACTÉRIA B1.5C1 EM MACRO ESCALA

Os extratos orgânicos da bactéria foram analisadas por HPLC para verificação de produção de metabólitos secundários, pode-se observar nos extratos hidroetanólico (figura 13), hexânicos (figuras 14-15, p.42) e AcOEt (figura 16- 17, p.43), a produção ou não de metabólitos em seus respectivos extratos para assim, escolher o melhor para processo de isolamento e identificação dos metabólitos.

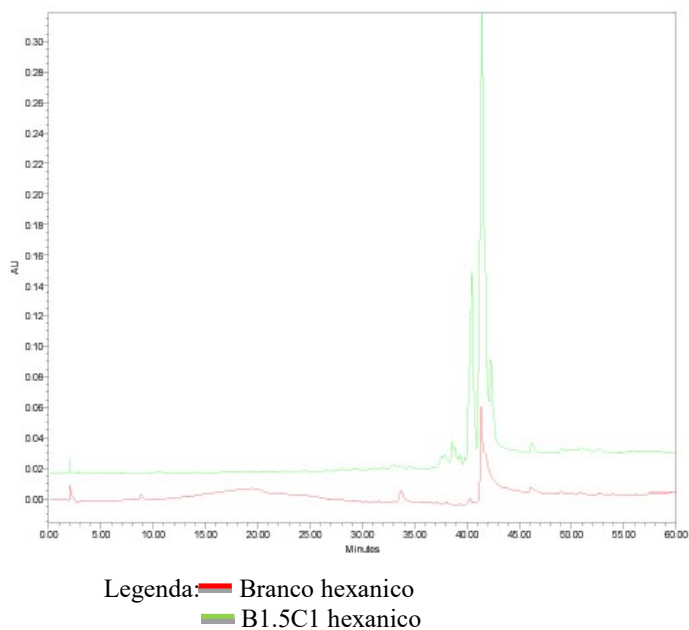
**Figura 13.** Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de B1.5C1  $\lambda_{MAX}$  230 nm.



Conforme a figura 12, referente à ao perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico, pode observar que o respectivo extrato não apresentou sinais de metabólitos, somente há sinais do

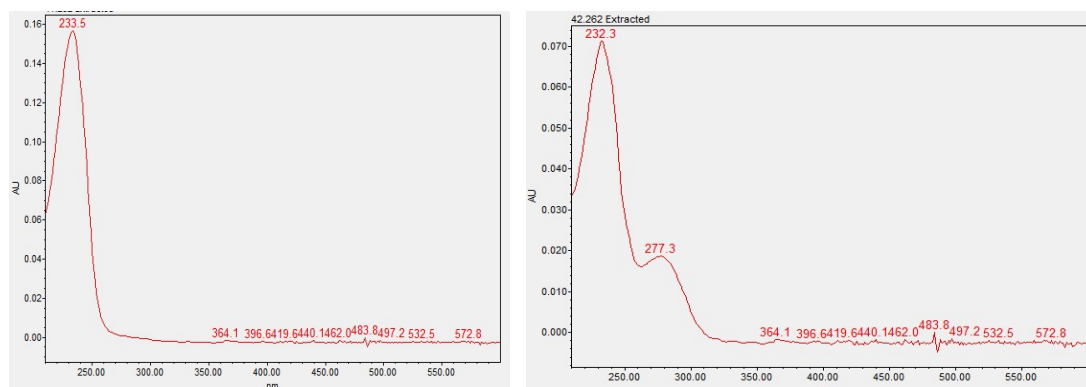
meio de cultura, logo o extrato hidroetanólico não é possível utilizá-lo para processo de isolamento e identificação já que o mesmo não apresenta metabólitos.

**Figura 14.** Perfil cromatográfico do extrato hexânico da B1.5C1  $\lambda_{MAX}$  230 nm.



O extrato hexânico foi analisado em comprimento de  $\lambda_{MAX}$  230 nm, na qual se pode observar pouca produção de metabólitos com bandas de absorvâncias em torno  $\lambda_{MAX}$  230 nm no espectro de UV (figura 14).

**Figura 15.** Espectros no UV em  $\lambda_{MAX}$  das bandas do cromatograma do extrato hexânico



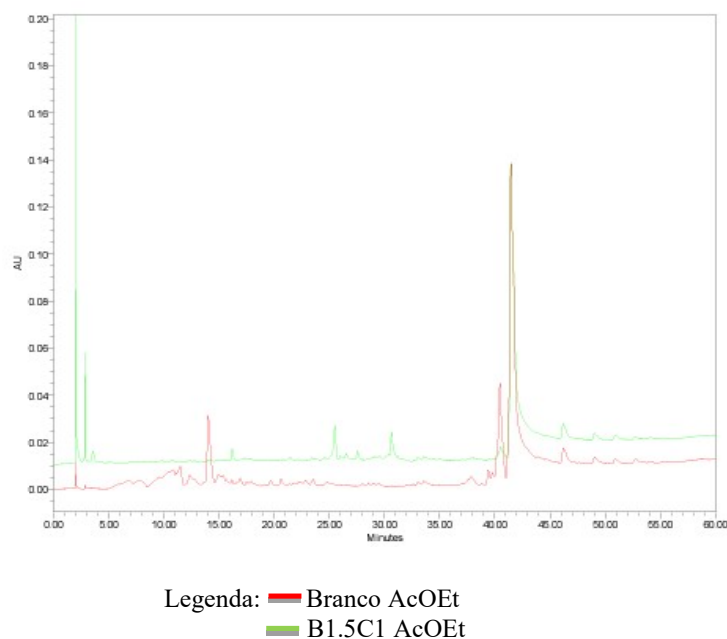
Legenda: pico em  $t_R$  em 41,23 min

Legenda: picos em  $t_R$  em 42,26 min

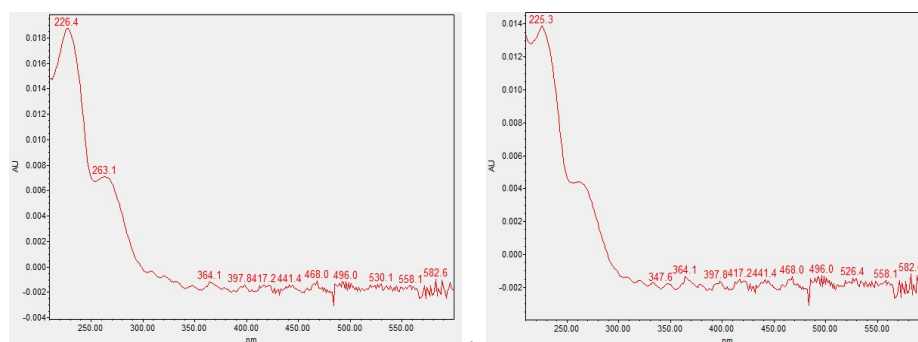
Fonte: Autor

No espectro de UV-Vis em  $\lambda_{MAX}$  230 nm do extrato hexânico é possível observar dois picos de sinais de absorvância em seus respectivos tempo de retenção ( $t_R$ ), no qual em  $t_R=41,23$  min à  $\lambda=232,3$  nm e há pico também em  $t_R=42,26$  min para  $\lambda=232,3$  nm e  $\lambda=277,3$  nm o que indica a presença de um possível metabólito produzido pela bactéria extraído na fase hexânica.

**Figura 16.** Perfil cromatográfico do extrato AcOEt B1.5C1  $\lambda_{MAX}$  230 nm.



**Figura 17.** Espectros no UV  $\lambda_{MAX}$  das bandas do cromatograma do extrato AcOEt.



Legenda: pico em  $t_R$  em 25,49 min

Legenda: pico em  $t_R$  em 30,58 min

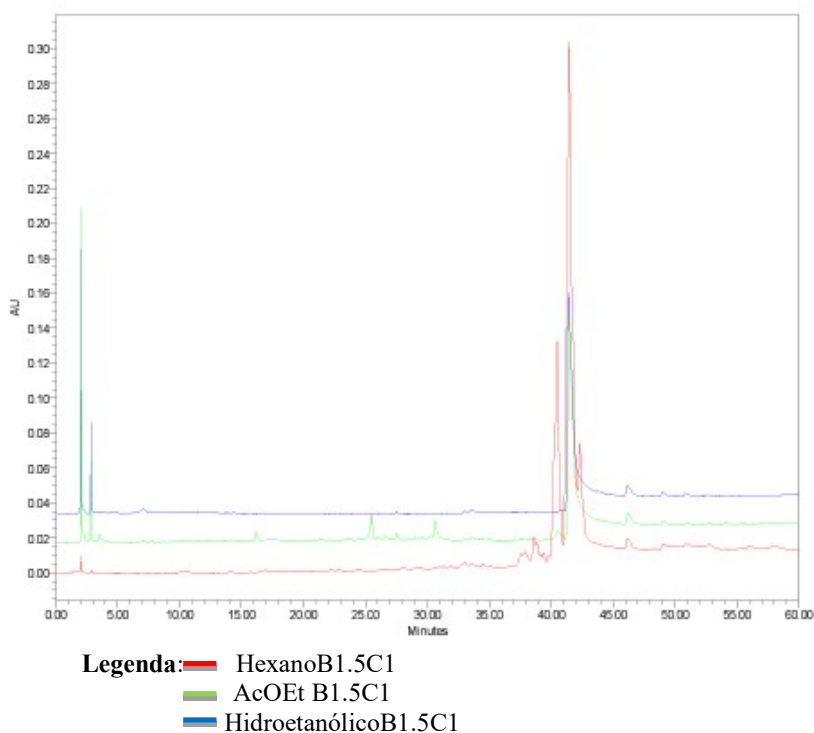
Fonte: Autor

O cromatograma do extrato AcOEt indica uma produção de metabólitos secundários em uma região de média polaridade. O espectro de UV-Vis em  $\lambda_{MAX}$  230 nm do extrato AcOEt é

possível observar dois picos de sinais de absorvância em seus respectivos tempos de retenção, no qual em  $t_R=25,49$  min à  $\lambda=226,4$  nm e  $\lambda=263,1$  nm e  $30,58$  min para  $\lambda=225,3$  nm que indica a presença de possíveis metabólitos produzidos pela bactéria extraída na fase AcOEt

Quanto a comparação dos extratos orgânicos da bactéria B1.5C1 (figura 18) em comprimento de  $\lambda_{MAX}$  230 nm, pode-se verificar que o extrato AcOEt apresentou um resultado considerável em termo de produção de metabólitos, sendo que este extrato foi escolhido para fracionamento e isolamento dos metabólitos presentes.

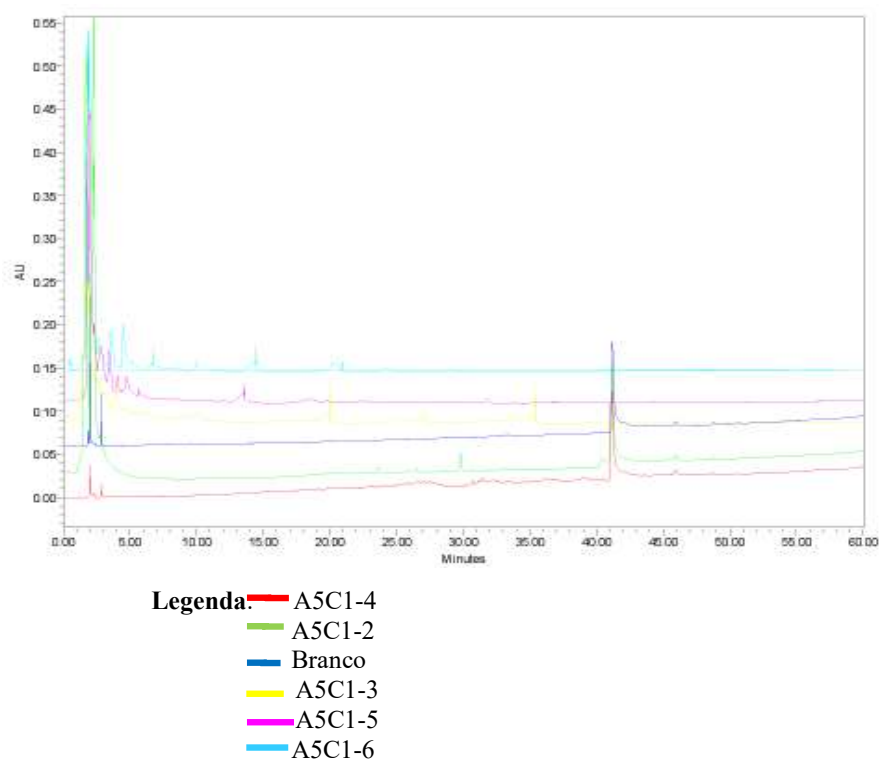
**Figura 18.** Perfil cromatográfico de comparação dos extratos hidroetanólico, AcOEt e hexano da B1.5C1 (arroz)  $\lambda_{MAX}$  230 nm.



#### 5.4 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRAFICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA COLUNA DE EXCLUSÃO

O extrato AcOEt da B1.5C1 foi fracionado em cromatografia de exclusão a qual obteve-se seis frações (figura 19, p. 45), sendo que as frações foram analisadas por HPLC e CCDA, na qual a fração A5C1-3 foi escolhida para isolamento dos metabólitos

**Figura 19.** Perfil cromatográfico do extrato AcOEt das frações obtidas por Sephadex LH-20,  $\lambda_{MAX}$  230 nm

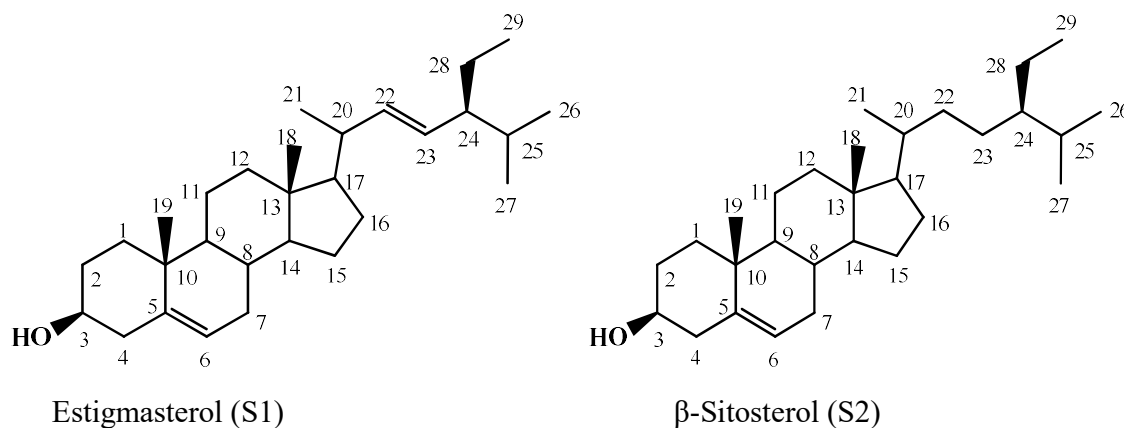


### 5.5 ISOLAMENTO E/OU IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO EXTRATO AcOEt A5C1-3.

O estudo químico da bactéria B1.5C1 levou ao isolamento e/ou identificação estrutural das substâncias  $\beta$ -sistosterol e estigmasterol, triacilglicerol e ácido graxo.

### 5.5.1 Mistura de estigmasterol e $\beta$ -sitosterol

**Figura 20.** Estruturas do estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol



Através de sinais característicos dos esteroides no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 21, p.49) da mistura S1 e S2 foram possíveis caracterizar a presença de estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (figura 20). A maioria dos sinais concentrou-se entre  $\delta_{\text{H}}0,5$  e  $2,0\text{Hz}$ . Somente quatro sinais de hidrogênio apareceram em campo menos desprotegido, sendo estes os dos hidrogênios olefínicos localizados no anel B de ambos esteroides e na cadeia lateral do estigmasterol, e ainda referente ao hidrogênio oximetínico (FORGO; KOVER, 2004). Destacam-se o sinal multiplete em  $\delta_{\text{H}}3,49$  (1H; H-3) e o sinal duplete em  $\delta_{\text{H}}5,34$  (1H; 5,2 Hz; H-6) que são sinais de hidrogênios comuns em ambos os compostos e, portanto, possuem o mesmo deslocamento químico. Ainda, pode ser visualizado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura de S1 e S2, Sinais duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}5,02$  (1H; 15,2 Hz e 8,8 Hz; H-23) e  $\delta_{\text{H}}5,14$  (1H; 15,2 Hz; H-22) referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral do estigmasterol (FORGO; KOVER, 2004).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 22, p.50), a presença de quatro sinais de carbono ( $\delta_{\text{C}}140,7$ ;  $\delta_{\text{C}}138,3$ ;  $\delta_{\text{C}}129,2$  e  $\delta_{\text{C}}121,7$ ) que segundo dados da literatura sugerem que  $\delta_{\text{C}}140,7$  e  $\delta_{\text{C}}121,7$  são característicos de esteroides com ligação dupla em C-5 e C-6 (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003) e em  $\delta_{\text{C}}129,2$  e  $138,3$  foram atribuídos aos carbonos 22 e 23, respectivamente (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003). Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de compostos esteroidais como  $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  dos esteroides  $\beta$ -sitosterol e do estigmasterol, destaca-se os sinais em carbono  $\delta_{\text{C}}12,2$ , referente ao C-29 que é um grupo de metila a mais na cadeia lateral

de esteroides como ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol. Esses dados foram comparados com os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos da literatura (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012) para os esteroides  $\beta$ -sistosterol e do estigmasterol, as quais se podem observar similaridades como observado na tabela 5 para RMN  $^1\text{H}$  e na tabela 6 (p.48) para RMN  $^{13}\text{C}$ .

**Tabela5.** Sinais de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para mistura S1 e S2 juntamente com os dados descritos na literatura para estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol, respectivamente.

Posição	Estigmasterol		B-sitosterol	
	$^1\text{H}\delta$ , multip., <i>J</i> em Hz		$^1\text{H}\delta$ , multip., <i>J</i> em Hz	
	S1	Lit <sup>a</sup>	S2	Lit <sup>a</sup>
3	3,49 ( <i>m</i> )	3,51 ( <i>td</i> ; 4,5; 4,2; 3,8)		3,53( <i>td</i> ; 4,5; 4,2; 3,8)
6	5,34( <i>d</i> ; 5,2)	5,31 ( <i>t</i> ; 6,1)		5,36 ( <i>t</i> ; 6,4)
19	0,91( <i>d</i> ;6,4)	0,91 ( <i>d</i> ; 6,2)	0,93 ( <i>d</i> ; 6,4)	0,93 ( <i>d</i> ; 6,5)
20		4,98 ( <i>m</i> )		
22	5,14 ( <i>dd</i> ; 15,2)	5,14 ( <i>m</i> )		
23	5,02 ( <i>dd</i> ; 15,2; 8,8)			
24	0,84( <i>m</i> ;7,6)	0,83 ( <i>t</i> ; 7,1)	0,84 ( <i>m</i> ; 7,2)	0,84 ( <i>t</i> ; 7,2)
26	0,82( <i>m</i> ;6,8)	0,82 ( <i>d</i> ; 6,6)		0,83 ( <i>d</i> ; 6,4)
27	0,80( <i>m</i> ;6,8)	0,80 ( <i>d</i> ; 6,6)	0,82 ( <i>m</i> ; 6,8)	0,81 ( <i>d</i> ; 6,4)
28		0,71 ( <i>s</i> )	0,60 ( <i>s</i> )	0,68 ( <i>s</i> )
29		1,03 ( <i>s</i> )	1,00 ( <i>s</i> )	1,01 ( <i>s</i> )

<sup>a</sup>[CHATURVEDULA; PRAKASH,2012]

**Tabela 6.** Sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para mistura S1 e S2 juntamente com os dados descritos na literatura para estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol, respectivamente.

Posição	Estigmasterol		$\beta$ -sitosterol	
	$^{13}\text{C}$		$^{13}\text{C}$	
	S1	Lit <sup>b</sup>	S2	Lit <sup>b</sup>
1	37,2	37,6	37,2	37,5
2	31,9	32,1	31,9	31,9
3	71,8	72,1	71,8	72,0
4	42,3	42,4	42,3	42,5
5	140,7	141,1	140,7	140,9
6	121,7	121,8	121,7	121,9
7	31,9	31,8	31,9	32,1
8	31,9	31,8	31,9	32,1
9	50,1	50,2	50,1	50,3
10	36,5	36,6	36,5	36,7
11	21,0	21,5	21,0	21,3
12	39,7	39,9	39,7	39,9
13	42,3	42,4	42,3	42,6
14	56,7	56,8	56,7	56,9
15	24,3	24,4	26,0	26,3
16	29,1	29,3	28,2	28,5
17	56,0	56,2	56,0	56,3
18	39,7	40,6	36,1	36,3
19	21,0	21,7	19,0	19,2
20	24,3	25,4	33,9	34,2
21	45,8	46,1	26,0	26,3
22	138,3	138,7	45,8	46,1
23	129,2	129,6	23,0	23,3
24	11,9	12,1	11,9	12,2
25	29,1	29,6	29,1	29,4
26	19,8	20,2	19,8	20,1
27	19,8	19,8	19,4	19,6
28	18,7	18,9	19,0	19,0
29	11,8	12,2	11,9	12,0

<sup>b</sup>(DE-EKNAMKUL; POTDUANG,2003)

Figura 21. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura S1 e S2.

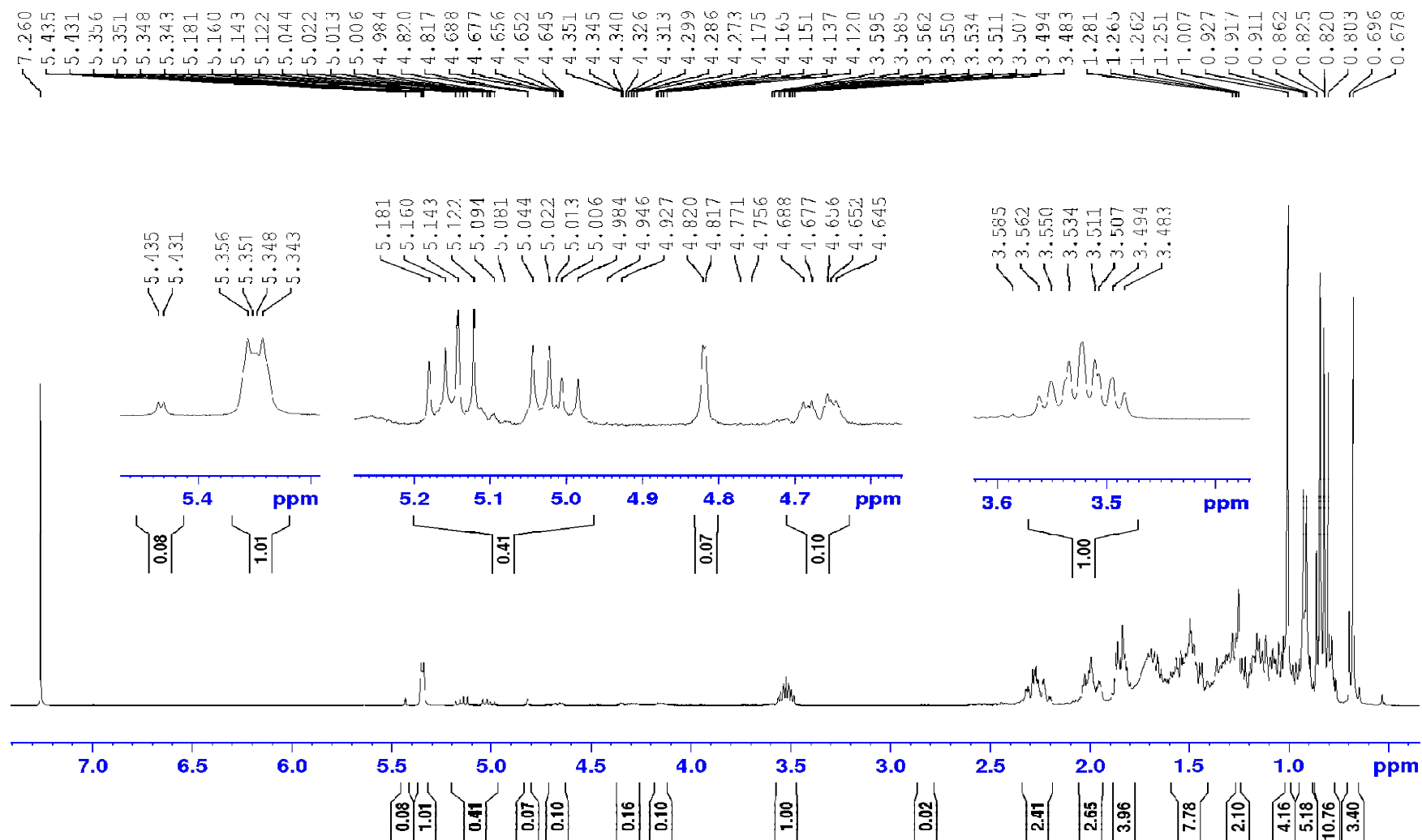
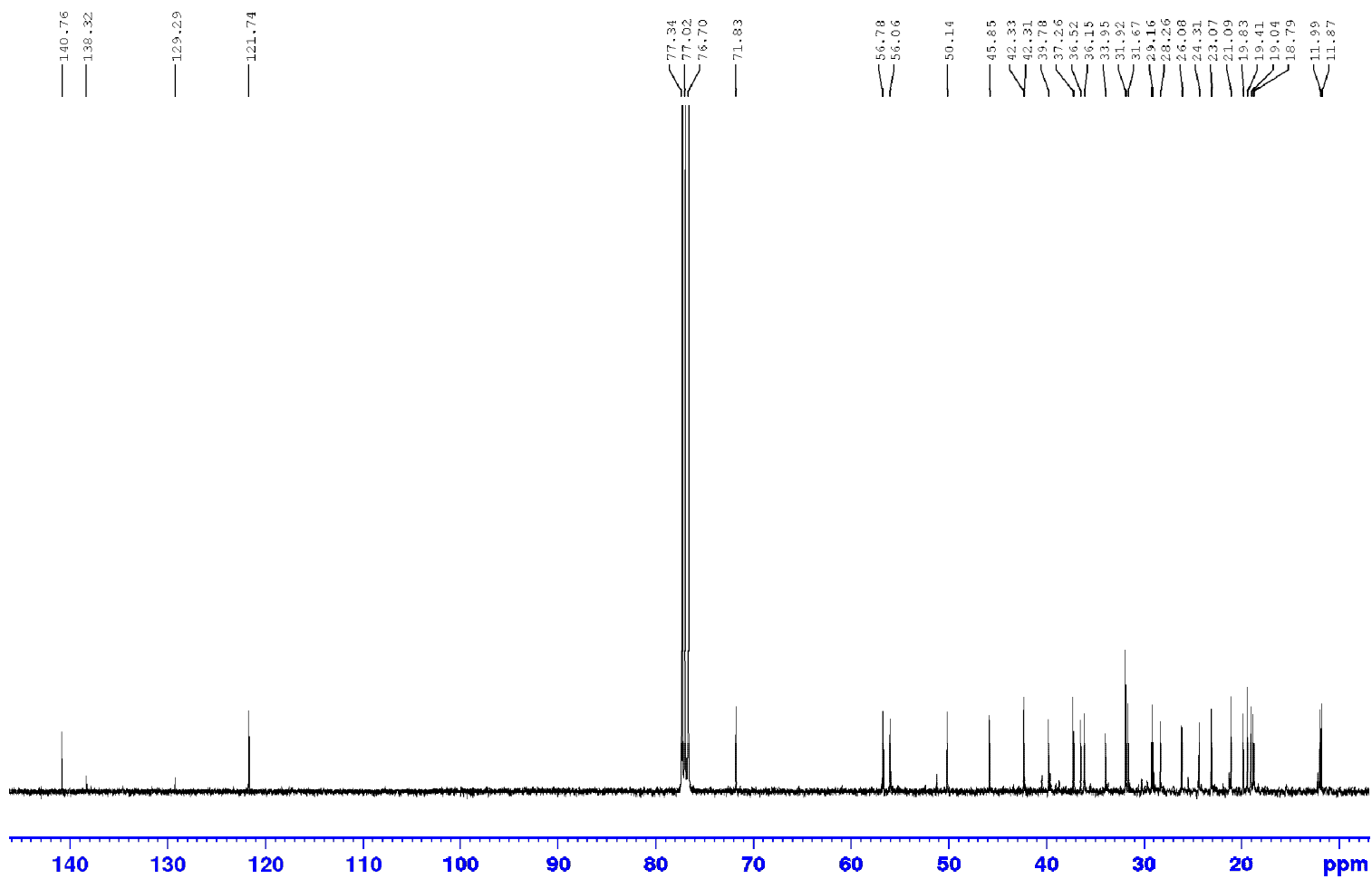


Figura 22. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura S1 e S2.



### 5.5.2 Substância (S3): Ácido graxo

Da fração 13 (S3) foi isolada é um ácido graxo (figura 23) como observado na análise de RMN. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 24, p.52) de S3 mostrou um sinal referente aos hidrogênios da metila do ácido graxo em  $\delta_{\text{H}} 0,88(m)$ , um sinal singlete intenso em  $\delta_{\text{H}} 1,25$  Hz referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia graxa, apresentou também um sinal em  $\delta_{\text{H}} 2,32$  ( $t$ ,  $J=7,6$  Hz) típico de hidrogênio  $\text{CH}_2$  vizinho à carbonila e  $\delta_{\text{H}} 5,34$  ( $m$ ) típico de hidrogênios olefínico no composto. Os dados de RMN foram comparados com a literatura o que demonstra a substância S3 sendo do grupo de ácidos graxos por não apresentar os hidrogênios característicos dos gliceróis e insaturado (KOLLAR, 2012).

**Figura 23.** Estrutura do ácido graxo

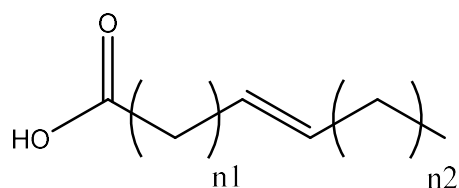
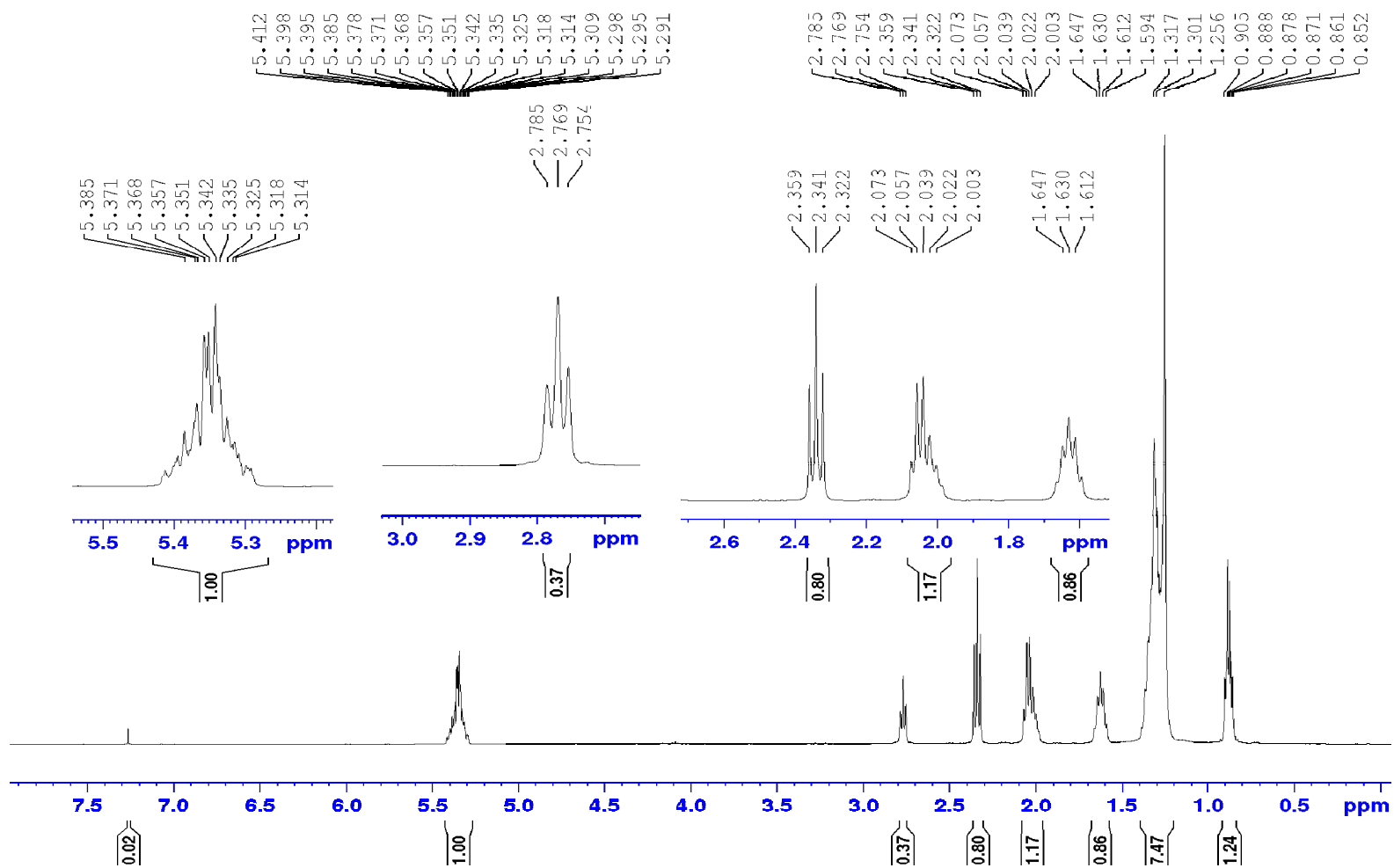
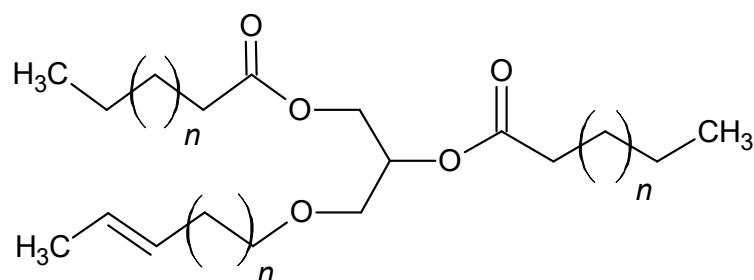


Figura 24. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância S3



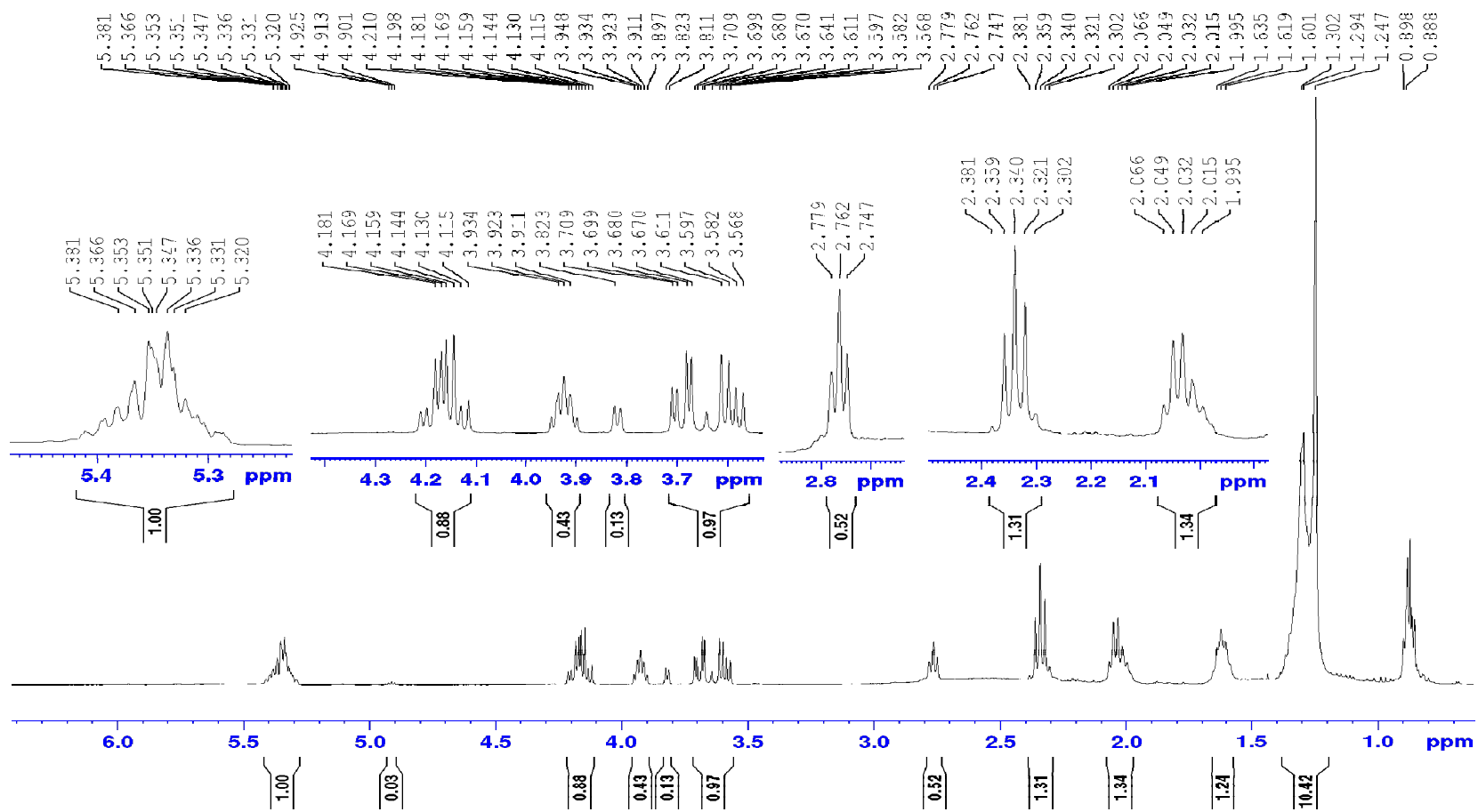
### 5.5.3 Substância (S4): Triacilglicerol

Figura 25. Estrutura do triacilglicerol.



O padrão espectral para a substância S4 (figura 25) apresentado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 26, p.53) mostrou um sinal singlete intenso em  $\delta_{\text{H}} 1,25\text{Hz}$  referentes aos hidrogênios metilênico de cadeia alquílica, um tripleto em  $\delta_{\text{H}} 1,63\text{Hz}$  referentes ao grupo metileno  $\beta$  adjacente a carbonila de éster, um sinal quinteto em  $\delta_{\text{H}} 2,00\text{ Hz}$  característico de metilenos vizinhos à ligação dupla na cadeia alquílica, apresentou também um sinal em  $\delta_{\text{H}} 2,32$  ( $t$ ,  $J = 7,6\text{ Hz}$ ) típico de hidrogênio metileno vizinho de carbonila de éster. Foram observados ainda dois sinais duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}} 3,70$  ( $J = 11,6\text{ Hz}$  e  $4,0\text{Hz}$ ) e em  $\delta_{\text{H}} 3,61$  ( $J = 11,6\text{ Hz}$  e  $5,6\text{ Hz}$ ), um sinal multipletos em  $\delta_{\text{H}} 5,34\text{Hz}$ , característicos de hidrogênios olefinicos. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  da substância S3 foram comparados com a literatura e foi observado similaridades com o composto triacilglicerol (SOUZA, 2014).

Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da S4.



## 5.6 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS

### 5.6.1 Ensaio antimicrobiano MDA

Dentre as propriedades atribuídas aos microrganismos endofíticos, ressalta-se o crescente interesse pelo potencial antimicrobiano, onde os metabólitos secundários produzidos pelas bactérias endofíticas da *Phanera splendens*, podem atuar diretamente sobre os microrganismos prejudicando a sobrevivência e a multiplicação. Sendo assim, foi realizado o ensaio antimicrobiano de método de difusão em Ágar seguindo a metodologia de acordo com Maia-Araújo e colaboradores (2011) e CLSI (2007)

O resultado obtido do teste MDA na concentração das cepas bacterianas em  $1 \times 10^8$  UFC foi de halo de inibição menores que 7 mm, logo os micros extratos das bactérias da 1º e 2º coleta cultivadas em micro escala, meio sólido (arroz), não tiveram efeito antimicrobiano frente as cepas bacterianas padrão, conforme estar ilustrado na tabela 7 (p.56) para bactérias de primeira coleta e tabela 8 (p. 57) para bactérias de segunda coleta.

**Tabela 7.** Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração  $1 \times 10^4$  UFC frente aos extratos AcOEt das bactérias da 1ª coleta, a quais foram cultivadas em micro escala meio sólido (arroz).

<b>EXTRATO (1mg/ ml)</b>	<b><i>B. Subtilis</i></b>	<b><i>E. Coli</i></b>	<b><i>P. Aeruginosa</i></b>	<b><i>S. Aureus</i></b>
B1.11F(1.2)	-	-	-	-
B1.5C2(1.1)	-	-	-	-
B1.7CI	-	-	-	-
B1.8CI	-	-	-	-
B1.8CI1	-	-	-	-
B1.2G	-	-	-	-
B1.11F2	-	-	-	-
B1.8CI2	-	-	-	-
B1.2G(1.2)	-	-	-	-
B1.1G	-	-	-	-
B1.6CI	-	-	-	-
B1.1G (1.1)	1 mm	-	-	-
B1.9CI2 (1.1)	1 mm	2 mm	-	-
B1.3G	-	-	-	-
B1.12F1	-	-	-	-
B1.4C	-	-	-	2 mm
B1.11F(1.1)	2 mm	1 mm	-	-
B1.10F	-	-	-	-
B1.5C1	-	-	-	-
B1.12F2	-	-	-	-
B1.9CI1(1.2)	-	-	-	-
B1.9CI3C	-	-	-	-
B1.9CI1 (1.1)	-	-	-	-
B1.5C2(1.2)	-	-	-	-
BRANCO	-	-	-	-
AMOXILINA	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm
BENZILPENICELINA	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm

Legenda: (-) não houve crescimento do halo de inibição

**Tabela 8.** Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração  $1 \times 10^4$  UFC, frente aos extratos AcOEt, das bactérias da 2ª coleta, a quais foram cultivadas em micro escala, meio sólido (arroz).

EXTRATO (1mg/ ml)	<i>B. Subtilis</i>	<i>E. Coli</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>S. Aureus</i>
B2CC-04ISP2	-	-	-	-
B2IF-06ISP2	-	-	-	-
B2IF-06MH	-	-	-	-
B2S-07MH	-	-	-	-
B2G-02ISP2	-	-	-	-
B2F-05ISP2	-	-	-	-
B2IC-03MH	-	-	-	-
B2G-02MH	-	-	-	-
B2CF-08-1ISP2	-	-	-	-
B2CF-08MH	-	-	-	-
B2F-05MH	-	-	-	-
B2CC-04MH	-	1 mm	-	-
B2G-02-1ISP2	-	-	-	-
B2CF-08-2ISP2	-	-	-	2 mm
B2S-07ISP2	-	-	-	-
B2IC-03ISP2	-	-	-	-
BRANCO	-	-	-	-
AMOXILINA	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm
BENZILPENICELINA	10 mm	10 mm	10 mm	10mm

Legenda: (-) não houve crescimento do halo de inibição

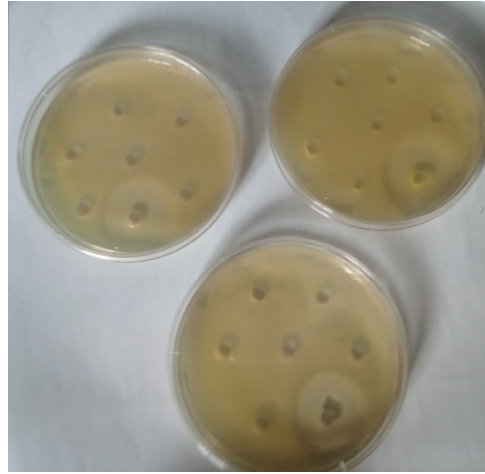
O ensaio antimicrobiano MDA em triplicada de concentração de  $1 \times 10^4$  UFC, frente aos extratos orgânico obtidos da bactéria B1.5C1, não apresentaram atividade antimicrobiana, diante das cepas bacterianas padrões (tabela 9), pois não pode-se observar a formação de halo inibição, somente o antibiótico amoxicilina apresentou halo de inibição maior que 7 mm (figura 26, p.57).

**Tabela 9.** Ensaio antimicrobiano em MDA na concentração  $1 \times 10^4$  UFC, frente aos extratos AcOEt, hexânico e hidroetanólico da bactéria B1.5C1.

EXTRATO (1mg/ ml)	<i>B. Subtilis</i>	<i>E. Coli</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>S. Aureus</i>
AcOEt	-	-	-	-
Hexânico	-	-	-	-
Hidroetanólico	-	-	-	-
AMOXILINA	10 mm	10 mm	10 mm	10 mm

Legenda: (-) não houve crescimento do halo de inibição

**Figura 27.** Ensaio antimicrobiano MDA dos extratos da bactéria B1.5C1 em triplicata.



Fonte: autor

### 5.6.2 Ensaio antimicrobiano CIM

As frações e substâncias obtidas por cromatografia de exclusão Sephadex LH-20 e a da coluna filtrante por sílica gel, respectivamente, foram submetidas ao ensaio antimicrobiano sendo este fração(A5C1-2; A5C1-3; A5C1-4 e A5C1-5), já as substâncias(mistura S1 e S2, S3 e S4), que frente às bactérias teste *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), foi realizado o ensaio antimicrobiano pelo método de micro diluição que se baseia na sucessiva diluição das amostras em placas de 96 poços e submete-se o microrganismo a ação do agente em estudo.

A determinação da concentração inibitória mínima dos extratos foi confirmada após a adição da solução de TTC 2,0% e a observação da formação de coloração vermelha (rosada) nos poços, que indica crescimento microbiano devido à inatividade dos extratos e das substâncias empregados sendo estes incapazes de inibir o crescimento do microrganismo em estudo, não possuindo ação bacteriostática. Os poços que não apresentaram alteração na sua coloração e que permaneceram transparentes ou com cor característica possuem ação bacteriostática, pois inibiram o crescimento microbiano (GABRIELSONe t al.,2002).

E os valores da ação antimicrobiana de acordo com MIC contra os patógenos estudados são que os extratos que apresentarem CIM<100µg/mL têm potencial antimicrobiano promissor (bom), CIM entre 100 – 500 µg/mL possuem atividade inibitória moderada, CIM entre 500 – 1.000 µg/mL apresenta atividade inibitória fraca e extratos que apresentaram CIM superior a

1.000 µg/mL são inativos frente aos patógenos (FABRY et al., 1998; HOLETZ et al., 2002; DALL'AGNOL et al., 2003; TANAKA et al., 2005; CHAVASCO et al., 2014).

A fração A5C1-5 é um potencial promissor antimicrobiano com CIM menor do que 100 µg/mL (tabela 10), que quando reinoculada em placa de petri BHI/Ágar mostrou-se como bactericida, contudo a mesma não apresenta estudos de isolamento e identificação de substâncias sendo assim, não se pode aferir qual metabólito presente é responsável pela ação bactericida. E as demais frações não apresentaram atividade antimicrobiana.

**Tabela 10.** Frações e substâncias, submetida a ensaio antimicrobiano, em µg/mL

Frações	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
A5C1-2	> 500	> 500	>500	>500
A5C1-3	> 500	>500	>500	>500
A5C1-4	> 500	>500	>500	>500
A5C1-5	62,5 (=)	>500	>500	>500
S1 e S2	> 500	> 500	>500	>500
S3	> 500	>500	>500	>500
S4	> 500	>500	>500	>500
Penicilina	15,62 (-)	>500	>500	7,81 (-)

Legenda: CIM; - Bacteriostático;= Bactericida

As substâncias S1 e S2 em mistura, S3 e S4 não apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias teste como observado no referencial os valores de CIM obtidos são maiores que 100 µg/mL sendo assim, baixas ou inativas atividades antimicrobianas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram isolados da planta *Phanera splendens* 40 bactérias endofíticas que apresentaram em sua maioria características de forma e coloração de Gram como bacilo Gram-positivo, contudo houve exceções como a B1.2G(1.2), B1.2G(1.2)2.1 e 10F a qual mostraram-se como cocos Gram-positivos; e no processo de identificação das bactérias endofíticas realizado por VITEK-2 foram identificadas B1.2G(1.2) como *Staphylococcus hominis ssp hominis*, a B1.2G(1.2)2.1 como *Staphylococcus epidermidis*.

O fracionamento cromatográfico do extrato AcOEt da bactéria proporcionou o isolamento e/ou identificação estrutural de triacilglicerol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol e de ácido graxo.

Os extratos AcOE em micro e macro escala não apresentaram resultados satisfatório no ensaio antimicrobiano MDA, pois o halo de inibição foi menor que 7 mm. No ensaio biológico em CIM das frações obtidas, somente a fração A5C1\_5 mostrou-se bactericida a 62,5  $\mu\text{g/mL}$ .

O estudo da bactéria endofítica vem contribuir na busca de metabólitos ativos e um direcionamento para pesquisa, tornando-se importante para estudo de isolamentos de metabólitos secundários de bactérias endofíticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOROZO, M. C. M.; E GELY, A. Uso de Plantas Mediciniais por Caboclos do Baixo Amazonas. Barcarena-PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi*, Série Botânica, v.4, p.47-131, 1988.

ARAÚJO, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, 2002.

ASOLKAR, R. N.; T. N.; JEENSEN, P.R., FERNICAL, W. **Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomyete *Salinispora arenicola*.** Journal Antibiotic (Tokyo), v.63, p.37-39, 2010.

BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M.; Effects of Endophytic Fungi on Some Drought Tolerance Mechanisms of Tall Fescue in a Hydroponics Culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, v.56, n.4, p.510-516, 2009.

BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. **Antibiotics in the clinical pipeline.** The journal of antibiotics, v.64, p.413-425, 2011.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Definition of MRSA. Online Source <http://www.cdc.gov> 2016.

CDDEP- Center for Disease Dynamics, Economics e Policy. Resistancemap: <http://www.cddep.org/map>, 2012.

CAMPOS, F.F. **Isolamento e identificação de substâncias produzidas por fungos endofíticos associados a pteridofitas (Fabaceae)**, 2009.

CHAVASCO, J. M. **Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado.** Revista Instituto Medici, 2014.

CHATURVEDULA, V. S. P.; PRAKASH, I. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, v.01, n.09, p. 239-242, 2012

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.** 8.ed. Wayne, PA, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2017.

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

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zeamays* L.) e potencial para promoção de crescimento.** (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 132 p, 2005.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M T. **Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos.** *Ciência e Cultura*, v. 64, n.3, p. 43-47, 2012.

CONTIA, R., CHAGAS, F.O., RODRIGUEZ, A. M. C., MELO. W.G., NASCIMENTOCA. M., CAVALCANTI, B. C., MORAES, M. O., PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L.V., KROGH, R., ANDRICOPULO, A. D., LOPES, N. P. AND PUPO. M. T; **Endophytic Actinobacteria from the Brazilian Medicinal Plant *Lychnophora ericoides* MART. and the Biological Potential of Their Secondary Metabolites.** *Chem. Biodiversity*, v. 13, p.727 – 736, 2016.

DROVAL, A. A.; LIMA, D. P.; HABU, S.; **Manual Prático de Microbiologia de Alimentos. Curso de Microbiologia de Alimentos**, Manual do Participante. CEFET/PR – Unidade de Medianeira, 2001.

DALL'AGNOL, R. **Antimicrobial activity of some Hypericum species.** *Phytomedicine*, v.10, p.511-6, 2003.

DE-EKNAMKUL, M.; POTDUANG, B. **Byosynthesis of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol in croton sublyratus proceeds via a mixed origin of isoprene units.** *Phytochemistry*, v.62, n.03, p.389-398, 2003

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Edusc, Caxias do Sul, p.510, 2004.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven- Biologia vegetal.** Guanabara Koogan, 8. ed.- Rio de Janeiro, 2014.

FABRY, W. **Antibacterial activity of East African medicinal plants.** *Journal Ethnopharmacol*, v.60, p.79-84, 1998.

FERREIRA, J. S.; COSTA, W. L. R.; CERQUEIRA, E. S.; CARVALHO, J. S.; OLIVEIRA, L. C.; ALMEIDA, R. C. C. **Foodhandler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil.** *Food control*, v.37, p.395-400, 2014

FORG, P.; KOVER, K. Gradient enhanced selective experiments in the <sup>1</sup>H RMN chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol a phytosterol derivative **steroids**, v.69, n.01, p.43-50, 2004.

GABRIELSON, J. **Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates.** *Journal of Microbiological Methods*, v.50, p.63 – 73, 2002.

HAO, G.; ZHANG, D.; ZHANG, M.; GUO, L.; LI, S. **Phylogenetics of Bauhinia subgenus Phanera (Leguminosae: Caesalpinioideae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA.** *Bot. Bull. Acad. Sin.*, v. 44, p. 223-228, 2003

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. **The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HOLETZ, F. B. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

IBGE. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. 2ª Ed Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em <WWW.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/vegetação.-2012

KALLMEYER, J. ,POCKALNY R, ADHIKARI R.R. ,SMITH D. C., D'HONDT S.L. **Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment.** *ProcNatlAcadSci*.2012

KOLLAR, S. R. M. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para análise de Biodiesel por RMN.**, dissertação de mestrado ,Universidade de Brasília, Brasília –DF, 2012

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / -- 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F.;L. S. Mendonça; S. C. Orellana; E. D. Araujo.Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.7, n.4, p.1-4, 2011.

MARCON, J. L.; MENIN, M.; ARAÚJO, M. G. P.; HRBEK, T. (Org.). **Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e consevação.** Manaus: Edua, 2012.

MARTINS, M. K. et al. Aspectos teóricos da caracterização molecular de micro-organismos. In: ARAÚJO, W.L. et al. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização.** Santarém: UFOPA, 2014.

MOREIRA, L. B. Princípios para o uso de antimicrobianos. **Rev AMRIGS**, v. 48, n.2, p.73-152. 2004.

MOTTA, L.B.; FURTAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.E.; SALATINO, M. L. F.; DUARTE—ALMEIDA, J. M.; NEGRINI, G.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L. T. G.; CORDEIRO, L.**Constituients and ntiproliferative activity of extracts from leaves of croton macrobothry.** *Brazilian journal of Pharmacognosy*, 2011.

MOTTA, L.B.; FURTAN, C.M.; SANTOS, D.Y.A.E.; SALATINO, M. L. F.; DUARTE—ALMEIDA, J. M.; NEGRINI, G.; CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L. T. G.; MONTEIRO, P.A.; CARUZO, M. B. J.; SALATINO, A. **Antiproliferative activity and constituents af leaf extracts of croton Sphaerogynes bill. (Euphorbiaceae),** 2013.

NCBI.National Center for Biotechnology Information.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 2016.

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

OMS- Organização Mundial da Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **WHO Library Cataloguing-in-publication**,2014.

PAN, S.Y.; PAN,S.; YU,Z.L; MA,D.L.; CHEN,S.B.; FONG,W.F.; HAN,Y.F; KO,K.M. New Perspectives on Innovative Drug Discovery: An Overview. **Journalof Pharmacia PharmaceutSci**, v.13, n.3, p. 450 - 471, 2010.

ROSSI, F. **The challenges of antimicrobial resistance in Brazil**.Clinical Infectious Diseases:An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, v.52, p.1138-43, 2011

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J**. v. 19, p. 200-206. 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 3rd Edition, 960 pages. ISBN: 978-0-470-16754-0, Ed. Wiley, 2010.

SAVIETTO, J. P.; FURLAN, C.M.; MOTTA, L.B.; SLATINO,A.; SANTOS, D.Y.A.C. **Antiproliferative activity of methanol extratcts of four spicies of croton on diferent human**. Brazilian Journal of Phamacognosy, 2013

SCHINDLER, B. D.; JACINTO, P.E.; KAATZ, G.W. **Inibition of drug efflux pumps in Satphylococcusaureus: current status of potentiating existing antibiotics**. Future Microbiology, v.8, n.4, p.491-507, 2013.

SOBRAVIME & AIS – LAC. **O que é uso racional de medicamentos**. Sobravime São Paulo: p. 50-56. 2001.

SOUZA, A.Q. L.**Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: Palicourealongiflora(aubl.) rich e Strychnoscogensbentham**. **RevistaActaAmazônica**, v. 34 (2), p. 185 – 195, 2004.

SOUZA, E.M.C. **Estudo químico e investigação do fungo endofíticopestalotiopissp. ESJ07 isolado Bauhiniaguianiensis**. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Pará. Belém-PA, 2014

STROBEL, G. A.; **Harnessingendophytes for industrial microbiology**. CurrentOpinion in Microbiology, v. 9, p. 240-244, 2006.

TANAKA, J. C. A. **Constituintes químicos de Lueheadivaricata Mart. (Tiliaceae)**. Química Nova, v.5, p.834- 7, 2005.

TORSVIK V, OVREAS L, THINGSTAD TF. **Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors.** *Science*, v. 10, n. 296; p. 1064-6, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, A. L.; **Microbiologia Artmed**, Porto Alegre, ed.8, 1ª reimpressão, 894 p. 2006.

VALDUGA, E. et al. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 207-213, 2014.

VAZ, A. M. S. F. New **combinations in Phanera (Leguminosae; Cercideae) from Brazil Rodriguésia**, v. 61(Sup): S33-S40, 2010

ZHAO, P.; LI, G. H.; SHEN, Y. M. **New chemical constituents from the endophyte streptomyces species LR4612 cultivated on Maytenushookeri.** *Chemistry e Biodiversity*, 2005.

YAN, L. L.; HAN, N. N.; ZHANG, Y. Q.; YU, L. Y.; JIE, C.; WEI, Y. Z.; LI, Q. P.; TAO, L.; ZHENG, G. H.; YANG, S. E.; JIANG, C. X.; ZHANG, X. D.; HUANG, Q.; HABDIN, X.; HU, Q. B.; LI, Z.; LIU, S. W.; ZHANG, Z. Z. HE, Q. Y.; SI, S. Y.; SUN, Y. A.; C. H. Antimycin A18 produced by an endophytic Streptomyces albidoflavus isolated from a mangrove plant. **The Journal of Antibiotics**, 2010.

WALSH, C.; **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.

WRIGHT, P. M.; SEIPLE, I. B.; & MYERS, A. G. **The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery.** *Angewandte Chemie International Edition*, v.53, p. 8840-8869, 2014.