

Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica - PMPIT

DOUGLAS FABIANO VILAS BOAS

**Isolamento biomonitorado de composto antibacteriano produzido por
*Streptomyces tubercidicus***

Uberaba - MG

2017

DOUGLAS FABIANO VILAS BOAS

Isolamento biomonitorado de composto antibacteriano produzido por
Streptomyces tubercidicus

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, área de concentração “Desenvolvimento e Aplicação de Bioprocessos na Indústria”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Tecnológica.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Granato Malpass

Co-orientadoras:

Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva de Sousa

Prof^a. Dr^a. Mônica Hitomi Okura

Uberaba – MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

V752i Vilas Boas, Douglas Fabiano
Isolamento biomonitorado de composto antibacteriano produzido por *Streptomyces tubercidicus* / Douglas Fabiano Vilas Boas. -- 2017.
62 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Coorientadoras: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa e Profa. Dra. Mônica Hitomi Okura

1. Antibacterianos. 2. Endófitos. 3. Espectroscopia de ressonância magnética. I. Malpass, Ana Claudia Granato. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 615.33

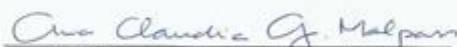
DOUGLAS FABIANO VILLAS BOAS

ISOLAMENTO BIOMONITORADO DE UM COMPOSTO
ANTIBACTERIANO PRODUZIDO POR STREPTOMYCES TUBERCIDICUS

Trabalho de conclusão apresentado ao
Programa de Mestrado Profissional em
Inovação Tecnológica da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, como requisito
para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 04 de agosto de 2017

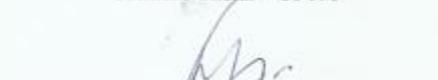
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Ana Cláudia Granato Malpass
Orientadora – PMPIT - UFTM



Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
Membro Titular – UFTM



Prof. Dr. Mauro Luiz Begnini
Membro titular – UNIUBE

Primeiramente a DEUS, por ser essencial em minha vida e que esteve ao meu lado em todos os momentos, me ajudando a superar todas as resistências e obstáculos que surgiram ao longo dessa caminhada, assegurando sabedoria, paciência, força e saúde.

Aos meus pais, Jose (*in memoriam*) que infelizmente não pode estar presente neste momento tão feliz de minha vida, e Luzia os quais amo muito e agradeço infinitamente a vida e o amor que dedicaram a mim e que sempre me apoiaram nas horas difíceis.

A minha esposa Valdirene por acreditar em mim, pelo carinho, paciência e incentivo à realização desse sonho.

Ao meu filho Otavio, minha vida, que embora não tivesse conhecimento disto, iluminou de maneira grandiosa meus pensamentos, me fazendo esquecer as minhas ansiedades e angustias.

A minha família, que nos momentos mais importantes de minha existência estavam presentes, amparando minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass pela amizade formada, por ter me aceitado como seu aluno, por acreditar em minha capacidade, pela paciência, compreensão e mais do que isso, pelos valiosos ensinamentos que foram de extrema importância na minha formação, além de ser para mim um exemplo de professora e orientadora.

A co-orientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa do Laboratório de Ensino, Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia DMP/CCBS/UFSCar pelo isolamento e concessão da actinobactéria.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Monica Hitomi Okura, pela grande amizade formada ao longo de minha vida de estudante, desde a formação técnica, a pós-graduação, pela ajuda incondicional sempre que precisei, por me contagiar de grandes ensinamentos, sendo para mim um espelho e modelo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes do Departamento de química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, por disponibilizar o laboratório de espectrometria de massas e pelas disciplinas cursadas.

Ao grande amigo Dr. Eduardo Jose Crevelin, especialista do laboratório de espectrometria de massas aplicada à química de produtos naturais do Departamento de química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pelos grandes ensinamentos e pela disposição de ajudar sempre que necessito.

Agradeço especialmente a Thayana da Conceição Alves e o Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da UFSCar pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear do composto bioativo;

À Profa. Dra. Jaine H. H. Luiz da UNIFAL pela grande contribuição na discussão dos espectros de RMN;

Agradeço ao servidor Enio Umberto Alves dos Santos, secretário do PMPIT por toda ajuda ao longo destes dois anos;

Ao PMPIT/UFTM que tornou possível a realização deste trabalho.

À FAPEMIG pelo projeto de pesquisa que financiou este trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

“Todo dia é de viver para ser o que for e ser tudo”.

Beto Guedes

RESUMO

Os microrganismos endofíticos apresentam uma grande diversidade genética e são importantes fontes para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Os produtos naturais de endofíticos apresentam amplo espectro de atividade biológica, incluindo antibióticos, imunossuppressores, anticancerígenos, antioxidantes e outros.

Neste trabalho reproduziu-se o cultivo do microrganismo endofítico *Streptomyces tubercidicus* isolado da planta *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado da cidade de São Carlos - SP, que faz parte do campus da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, seguindo as condições previamente descritas. Os resultados do cultivo demonstraram que a linhagem é bastante resistente ao tempo de armazenamento, pois quase dez anos após seu isolamento e estudos realizados por Ratti *et al.*, 2008.

O processo de separação e purificação por técnicas cromatográficas do extrato bioativo de *S. tubercidicus*, levou ao isolamento de uma fração ativa, a qual apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram + e Gram -. Esse resultado é diferente do obtido anteriormente, pois no estudo anterior foram obtidas duas frações ativas, porém uma com atividade contra a *Escherichia coli*, bactéria Gram + e outra com atividade contra bactéria *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram -.

O processo de elucidação estrutural do metabólito secundário bioativo isolado de *S. tubercidicus* ainda não foi finalizado, mas é possível concluir que não foi isolada a tubercidina composto bioativo produzido pelo *S. tubercidicus*, pois os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto majoritário isolado são bastante distintos dos dados simulados para a tubercidina.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos, atividade antibacteriana, RMN

ABSTRACT

Endophytic microorganisms present a great genetic diversity and are an important source for the discovery of new bioactive secondary metabolites. Natural endophytic products exhibit a broad spectrum of biological activity, including antibiotics, immunosuppressants, anticancer drugs, antioxidants and others. In this study, the endophytic microorganism *Streptomyces tubercidicus*, isolated from the *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) plant of the Cerrado of the Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), was cultivated and the results demonstrate that the lineage is quite resistant to storage time, as it was isolated almost ten years before the present cultivation. The process of separation and purification of the bioactive extract of *S. tubercidicus* led to the isolation of only one active fraction. This fraction displays antibacterial activity against Gram + and Gram - bacteria. This result is different from that previously obtained, where two active fractions were obtained, but one with activity against Gram + bacteria and another with activity against Gram - bacteria. The structural elucidation of the bioactive secondary metabolite isolated from *S. tubercidicus* has not yet been concluded, but it can be concluded that tubercidin has not been isolated as the ¹H and ¹³C NMR spectra of the isolated major compound are distinct from simulated data for tubercidin.

Keywords: Endophytic microorganisms, Antibacterial activity, NMR

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Estrutura química de Produtos Naturais isolados de microrganismos endofíticos..... | 22 |
| Figura 2. Estrutura da tubercidina, toiocamicina e sangivamicina..... | 23 |
| Figura 3: Biossíntese de derivados 7-deazapurinas..... | 25 |
| Figura 4: Análogos da tubercidina e da toiocamicina, isolados ou sintetizados..... | 27 |
| Figura 5. Representação esquemática do teste de sobrecamada para avaliação qualitativa da produção de substâncias bioativas..... | 31 |
| Figura 6. CCD do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i> obtido neste trabalho, revelada com vários reveladores..... | 39 |
| Figura 7. Fluxograma que representa o processo de separação e purificação do extrato bruto de <i>S. tubercidicus</i> | 40 |
| Figura 8: Espectro de RMN- ¹ H da fração St.2-B..... | 44 |
| Figura 9: Expansão do espectro de RMN- ¹ H da fração St.2-B entre δ 7,15-8,60 ppm..... | 44 |
| Figura 10: Expansão do espectro de RMN- ¹ H da fração St.2-B entre δ 4,60-6,10 ppm..... | 45 |
| Figura 11: Expansão do espectro de RMN- ¹ H da fração St.2-B entre δ 3,55-4,40ppm..... | 45 |
| Figura 12: Expansão do espectro de RMN- ¹ H da fração St.2-B entre δ 3,55-4,40 ppm..... | 46 |
| Figura 13: Espectro de RMN- ¹³ C da fração St.2-B..... | 46 |
| Figura 14: Espectro de HSQC da fração St.2-B..... | 47 |
| Figura 15: Estimativa dos deslocamentos químicos de A - RMN- ¹ H e de B - ¹³ C para a tubercidina, através do programa Chem Draw Ultra..... | 48 |
| Figura 16: Espectro de HMBC da fração St.2-B..... | 49 |
| Figura 17: Espectro de COSY da fração St.2-B..... | 50 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1. Exemplos de substâncias produzidas por microrganismos..... | 19 |
| Tabela 2. Valores da zona de inibição de <i>S. tubercidicus</i> e de discos de antibióticos utilizados comercialmente..... | 37 |
| Tabela 3: Dados da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais da amostra St.2-B..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|--|
| BHI | (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>) – Caldo de infusão Cérebro – Coração |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| COSY | (do inglês <i>Correlated Spectroscopy</i>) – Correlação Espectroscópica |
| EM | Espectrometria de massas |
| FAPEMIG | Fundação de amparo à pesquisa do estado de Minas Gerais |
| HMBC | (do inglês <i>Heteronuclear MultipleBond Correlation</i>) – Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações |
| HPLC | (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho |
| HPLC-MS/MS | (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry</i>) - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial |
| HSQC | (do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>) – Correlação Quântica Heteronuclear Simples |
| IC₅₀ | Concentração Inibitória de 50% |
| ISP2 | Agar extrato de Malte e Levedura |

| | |
|------------------------------|--|
| ISR | <i>(do inglês induction of system icresistance)</i> – Resistência Sistêmica Induzida |
| IV | Infravermelho |
| ppm | Partes por Milhão |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RMN de ¹³C | Ressonância Nuclear Magnética de Carbono |
| RMN de ¹H | Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio |
| RPM | Rotação por minuto |
| SAR | <i>(do inglês systemic acquired resistance)</i> - Resistência Sistêmica Adquirida |
| SARS | <i>(do inglês severe acute respiratory syndrome)</i> - Síndrome Respiratória Aguda Grave |
| TSB | <i>(do inglês Tryptic Soy Broth)</i> -CaldoTriptona-Soja |
| UFSCar | Universidade Federal de São Carlos |
| UFTM | Universidade Federal do Triângulo Mineiro |
| USP | Universidade de São Paulo |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2. OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1. Objetivos Gerais..... | 15 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 15 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 16 |
| 3.1. Considerações gerais sobre os microrganismos endofíticos..... | 17 |
| 3.2. Compostos com atividade antibiótica isolados de microrganismos endofíticos..... | 20 |
| 3.3. <i>Streptomyces tubercidicus</i> , tubercidina e análogos..... | 22 |
| 3.4. Biossíntese de derivados 7-deazapurinas..... | 24 |
| 3.5. Síntese de derivados da tubercidina e toiocamicina..... | 25 |
| 3.6. Microrganismos indicadores, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| 4. METODOLOGIA..... | 29 |
| 4.1. Microrganismo endofítico..... | 30 |
| 4.2. Bioensaio qualitativo de atividade antibacteriana..... | 30 |
| 4.3. Cultivo do microrganismo endofítico..... | 31 |
| 4.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... | 32 |
| 4.5. Separação e Purificação dos metabólitos secundários bioativos... .. | 32 |
| 4.6. Espectros de RMN do metabólito secundário bioativo isolado..... | 33 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| 5.1. Bioensaio qualitativo de atividade antibacteriana..... | 35 |
| 5.2. Cultivo do microrganismo endofítico..... | 37 |
| 5.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... | 38 |
| 5.4. Separação/Purificação dos metabólitos secundários bioativos..... | 39 |
| 5.5. Espectros de RMN do metabólito secundário bioativo isolado..... | 40 |
| 6. Conclusões..... | 51 |
| 7. Perspectivas Futuros..... | 53 |
| Referências Bibliográficas..... | 55 |

1.INTRODUÇÃO

Com o aumento de bactérias resistentes, de vírus que ameaçam a vida, os problemas de doenças recorrentes em pessoas transplantadas e o grande aumento na incidência de infecções por fungos na população mundial, há necessidade de se descobrir novos compostos com potencial químico e biológico (Strobel *et al.*, 2004).

Os microrganismos endofíticos foram isolados pela primeira vez em Darnel, na Alemanha, em 1904 e desde então existem várias definições para esses organismos. São microrganismos que vivem no interior dos tecidos de plantas sem causar nenhum dano aparente à planta ou sinal externo de infecção (Strobel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2008). Os endofíticos são pouco estudados, estima-se que existem mais de 250.000 diferentes espécies de plantas e 1 milhão de endofíticos no mundo tendo cada indivíduo, em média, quatro microrganismos endofíticos associados (Zhang *et al.*, 2006; Tejesvi *et al.* 2007; Ryan *et al.*, 2008). Como exemplo, 22 amostras de *Taxus baccata* e 1 amostra de *Taxus brevifolia* foram coletadas de diferentes locais do centro da Itália e destas amostras, 150 linhagens de fungos e 71 linhagens de Actinomicetos foram isoladas da casca e das folhas dessas plantas (Zhang *et al.*, 2006).

Esses microrganismos podem ser encontrados em uma grande variedade de tecidos de plantas, como por exemplo, sementes, óvulos, frutas, caule, raiz, folhas, tubérculo, broto, lenho, ráquis e casca (Zhang *et al.*, 2006). Os endofíticos residem, preferencialmente, nos espaços intercelulares mais do que nos espaços intracelulares dos tecidos de plantas (Zhang *et al.*, 2006). É possível isolar centenas de espécies de endofíticos de uma única planta e dentre estes, pelo menos um, geralmente, apresenta especificidade de hospedeiro. Entretanto, diversas espécies são capazes de colonizar várias espécies de hospedeiro pertencentes a famílias diferentes em um dado local geográfico (Zhang *et al.*, 2006).

Os microrganismos endofíticos apresentam uma grande diversidade genética e são importantes fonte para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Os produtos naturais de endofíticos apresentam amplo espectro de atividade biológica, incluindo antibióticos, imunossupressores, anticancerígenos, antioxidantes e outros. Polissacarídeos, enzimas e proteínas também já foram isolados de fungos e bactérias endofíticas, apresentando importantes funções biológicas (Zhang *et al.*, 2006).

Alguns metabólitos microbianos parecem ser característicos de certos biótopos, tanto em nível do organismo quanto do ambiente(Blackwell, 2000). Desta forma a pesquisa de metabólitos secundários de microrganismos endofíticos deve basear-se em organismos que habitam biótopos ímpares. Segundo Ratti *et al.* o bioma do cerrado é uma das mais ricas savanas do mundo, comportando imensa diversidade de fauna e flora(Ratti *et al.*, 2008). Em solos do cerrado, a população natural de actinomicetos pode ser superior a 75%, com predominância do gênero *Streptomyces* (Shirling & Gottlieb, 1966). O gênero *Streptomyces* é responsável pela produção de uma alta porcentagem dos antibióticos utilizados atualmente (Challis & Hopwood, 2003).

Neste trabalho foi estudado o microrganismo *Streptomyces tubercidicus*, isolado da planta *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado da cidade de São Carlos - SP, pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos UFSCar. O extrato bruto deste microrganismo apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*. Desta forma, foi realizado o isolamento biomonitorado do composto bioativo presente neste extrato.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Isolar o metabólito secundário antibacteriano presente no extrato bruto do *Streptomyces tubercidicus* e adquirir os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) deste composto.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- 1- Reproduzir o cultivado microrganismo endofítico *Streptomyces tubercidicus* isolado da planta *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado pertencente ao campus da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, pelo grupo da Profa. Dra. Cristina P. de Sousa do Departamento Morfologia e Patologia da UFSCar, nas condições previamente descritas para se obter o extrato bruto desse microrganismo (Ratti et al., 2010);
- 2- Com o extrato bruto de *S. tubercidicus*, realizar a separação e purificação do metabólito secundário bioativo utilizando-se técnicas cromatográficas de análise;
- 3- Analisar por Ressonância Magnética Nuclear mono e bidimensionais como metabólito secundário bioativo purificado para posterior análise e identificação estrutural do metabólito secundário bioativo;

3.REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Considerações gerais sobre os microrganismos endofíticos

Os relatos de compostos produzidos por microrganismos são historicamente mais recentes do que os produzidos a partir de plantas. Após a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, houve uma revolução no tratamento de infecções bacterianas, e os pesquisadores começaram uma intensa busca por compostos bioativos originados a partir de microrganismos. Desde então, um grande número de fármacos, com base nos compostos isolados de microrganismos, foi desenvolvido com ampla variedade de indicações terapêuticas.

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Baryem 1866 quem primeiro delineou uma possível distinção entre endofíticos e patógenos de plantas (Ratti, 2009). Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior dos tecidos de plantas sem causar nenhum dano aparente à planta ou sinal externo de infecção (Strobel *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2008). Os endofíticos são pouco estudados, estima-se que existem mais de 250.000 diferentes espécies de plantas e 1 milhão de endofíticos no mundo tendo, em média, cada indivíduo apresentando quatro microrganismos endofíticos associados (Zhang *et al.*, 2006; Tejesvi *et al.* 2007; Ryan *et al.*, 2008).

Esses microrganismos podem ser encontrados em uma grande variedade de tecidos de plantas, como por exemplo, sementes, óvulos, frutas, caule, raiz, folhas, tubérculo, broto, lenho, ráquis e casca (Zhang *et al.*, 2006). As bactérias endofíticas residem, preferencialmente, nos espaços intercelulares mais do que nos espaços intracelulares dos tecidos de plantas (Zhang *et al.*, 2006). É possível isolar-se centenas de espécies de endofíticos de uma única planta e, dentre estes, pelo menos um, geralmente, apresenta especificidade de hospedeiro. Entretanto, diversas espécies são capazes de colonizar várias espécies de hospedeiro pertencentes a famílias diferentes com um dado local geográfico (Zhang *et al.*, 2006).

Os endofíticos já foram detectados em plantas tropicais, temperadas e florestas boreais. Aparentemente, estes apresentam um importante papel nos ecossistemas, influenciando na biodiversidade das comunidades e mediando as interações ecológicas. Em algumas plantas, os fungos endofíticos apresentam

funções ecológicas novas, p.ex. termo tolerância de plantas crescendo em solos geotérmicos. Em pastos (do inglês “grasses”), os endofíticos dominantes produzem alcalóides tóxicos que detêm ou envenenam os herbívoros. Os endofíticos podem atuar especificamente na defesa, diminuir os danos causados por agentes patogênicos, insetos e em alguns casos acelerar a emergência de sementes, promover o equilíbrio da planta em condições adversas e aumentar o seu crescimento (Zhang *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2008).

Esse aumento no crescimento pode ocorrer por diversos mecanismos, atividade de solubilização de fosfato e produção de sideróforos, moléculas orgânicas capazes de sequestrar o Ferro, dentre outros metais, que podem alterar a disponibilidade de elementos tóxicos na rizosfera (Ryan *et al.*, 2008). Esses microrganismos também podem suprir vitaminas essenciais às plantas, fazer ajuste osmótico, aumentar a retirada de minerais do solo e alterar a acumulação de nitrogênio (Ryan *et al.*, 2008).

Os microrganismos endofíticos podem promover o crescimento da planta hospedeira e também agir como agentes biocontroladores. Os endofíticos também podem ser beneficiados pela planta, pois as condições ambientais podem favorecer a produção de metabolitos secundários bioativos e esses podem ser aplicados comercialmente (Ryan *et al.*, 2008). Acredita-se que certas bactérias endofíticas iniciam um processo conhecido como Resistência Sistêmica Induzida (ISR), a qual é similar à Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). A SAR se desenvolve quando a planta ativa seu sistema de defesa em resposta a uma infecção primária causada por um patógeno. A ISR é efetiva contra vários tipos de patógenos, mas difere da SAR, pois a bactéria não causa nenhum sintoma visível na planta hospedeira (Ryan *et al.*, 2008).

Metabolitos secundários produzidos por microrganismos constituem uma poderosa fonte de novos compostos com estruturas intrínsecas e com potentes atividades biológicas tais como antibióticos, antitumorais, imunossupressores, antivirais, antiparasitários, entre outros. Na Tabela 1 pode-se observar alguns exemplos de compostos bioativos produzidos por microrganismos.

Tabela 1. Exemplos de substâncias produzidas por microrganismos.

| Composto / Classe | Propriedades | Microrganismos |
|--|---------------------|----------------------------------|
| Cefalosporina C | Antibiótico | <i>Cephalosporium acremonium</i> |
| Avermectina | Antelmíntico | <i>Streptomyces avermitilis</i> |
| Herbicidina | Herbicida | <i>Streptomyces saganonensis</i> |
| Vitamina B ₁₂ (Cobalamina) | Vitamina | <i>Pseudomonasp.</i> |
| Piericidina | Inseticida | <i>Streptomyces mobaraensis</i> |

Fonte: Do autor, 2017

Microrganismos endofíticos, especialmente aqueles que pertencem ao gênero *Streptomyces*, são economicamente importantes de um ponto de vista biotecnológico, por produzirem antibióticos, compostos anticancerígenos e uma variedade de substâncias bioativas que são potencialmente aplicáveis nas indústrias agroquímicas e farmacêuticas (Ratti *et al.*, 2010).

Paralelamente à produção de novos compostos bioativos, muitos endofíticos têm apresentado capacidade natural de degradação de xenobióticos. Essa habilidade de alguns microrganismos endofíticos de serem resistentes a metais tóxicos e degradar compostos orgânicos provavelmente seja devido à exposição a diversos compostos no nicho planta/solo. Essa habilidade natural tem sido investigada com o propósito de fitoremediação de contaminação por metais tóxicos (Ryan *et al.*, 2008).

A origem genética dos metabólitos produzidos pelos microrganismos endofíticos ainda é desconhecida, mas especula-se que esses metabólitos podem surgir através da transferência horizontal de genes da planta para seus microrganismos endofíticos. Como é o caso do Taxol especula-se que haja uma transferência horizontal de genes de *Taxus* spp. aos seus endofíticos (Strobel *et al.*, 2002). Se este for o caso e a capacidade de produzir certos metabólitos secundários por alguns microrganismos ocorre através de transferência horizontal de genes das plantas para os microrganismos endofíticos, a conservação de plantas hospedeiras e sua flora microbiana é de vital importância na busca de novos medicamentos (Tejesvi *et al.* 2007).

3.2. Compostos com atividade antibiótica isolados de microrganismos endofíticos

É incontestável a ameaça real que doenças infecciosas como AIDS, SARS (do inglês “*Severe Acute Respiratory Syndrome*”), febre aviária, e outras, representam à população mundial. Com isso, é extremamente importante a obtenção de substâncias que atendam a necessidade de combate destas e outras doenças (Guo *et al.*, 2008).

Os endofíticos são uma rica fonte de novos produtos naturais para utilização na medicina, agricultura e indústria. Como dito anteriormente, estima-se que existam um milhão de espécies distintas de microrganismos endofíticos, entretanto somente uma pequena quantidade destes já foi estudada. Portanto, existe uma grande oportunidade de se encontrar novos produtos naturais de microrganismos endofíticos entre inúmeras plantas em diferentes nichos e ecossistemas. Apesar da maioria da pesquisa com microrganismos endofíticos ser baseada na produção de agentes antimicrobianos por fungos, alguns compostos de baixo peso molecular, com atividade em baixas concentrações contra patógenos humanos, animais e plantas foram isolados de bactérias endofíticas. Estudos recentes destacam o isolamento de vários compostos isolados de endofíticos, incluindo alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróis, etc. Até o momento os tipos de produtos naturais isolados de microrganismos endofíticos são antibióticos, anticancerígenos, imunossuppressores, etc (Guo *et al.*, 2008).

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

A coronamicina, um peptídeo com atividade antibiótica, foi isolada de *Streptomyces* sp. verticilado. Esse endofítico foi obtido de um epifítico *Monstera* sp.. A coronamicina é ativa contra fungos fitiáceos e contra fungos patógenos humano

Cryptococcus neoformans, além de apresentar atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* com IC₅₀ de 9,0 ngml⁻¹ (Ezra et al., 2004).

Weber et al. (2004) obtiveram outro antibiótico, isolado da fermentação de um fungo da espécie *Phomopsis* obtido a partir da planta medicinal *Erythrina crista*, que recebeu o nome de fomol (Figura 1). Este é uma lactona policetídica e sua estrutura também foi elucidada através da combinação de métodos espectroscópicos.

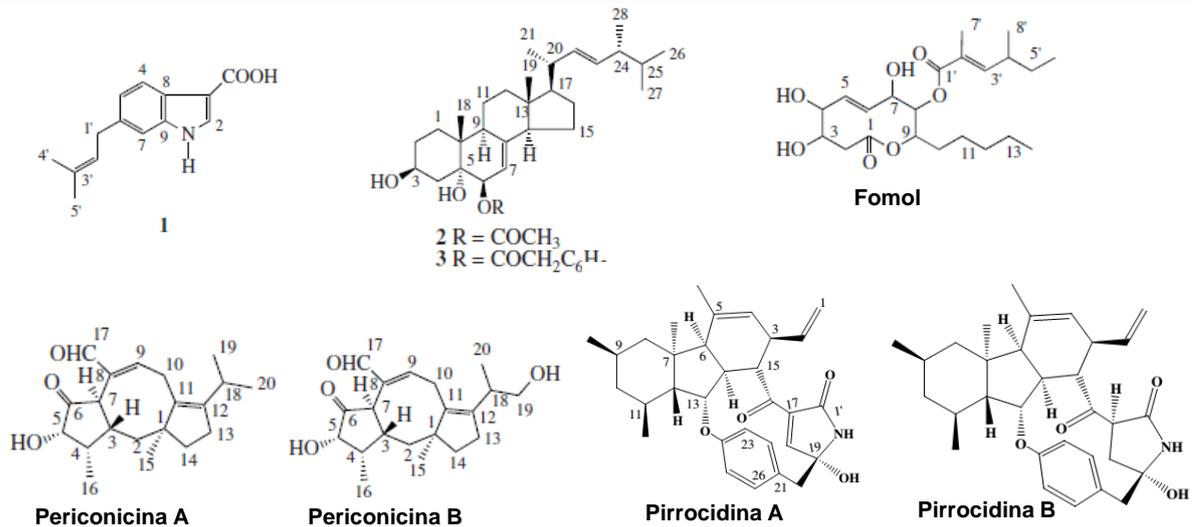
As periconicinas A e B (Figura 1), dois diterpenos, foram isolados por fracionamento biomonitorado do fungo endofítico *Periconia* sp., obtido a partir de amostras de *Taxus pida*, e apresentam atividade antibacteriana (Kim et al., 2004). Mais recentemente, dois antibióticos, as pirrocidinas A e B (Figura 1), foram isoladas a partir da fermentação de sementes amarelas de *Acremonium zeae* (NRRL 13540), e apresentaram importante atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* (Wicklow et al., 2005). Castillo (2006), estudando culturas de *Streptomyces* NRRL 30562 que apresentaram atividade antibiótica de amplo espectro, encontraram uma fração cujo espectro de Massas mostrava que os compostos apresentavam massas idênticas, mas tempos de retenção diferentes em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC).

Com o intuito de desenvolver o estudo com fungos endofíticos, foi realizada uma triagem com quatro tipos de plantas medicinais da família *Euphorbiaceae*. Das 43 linhagens obtidas, 11 apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Dai et al., 2006). Em 2005, Zeng et al. também testaram a atividade antibiótica de 24 fungos endofíticos isolados de *Polygonum cuspidatum*, Como resultado, 3 linhagens identificadas como sendo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mycetia sterillia* mostraram capacidade de produzir substâncias antibióticas (Zeng et al., 2005).

Wang e colaboradores (2006), estudando a bioatividade de fungos endofíticos isolados de *Sino podophyllum hexadnim* e *Diphylleia sinensis*, mostraram que esses apresentam alta atividade antibacteriana. Porém, não foi realizado nenhum estudo para o isolamento da (s) substância (s) responsável (s) pela bioatividade das linhagens. Ishii e colaboradores (2013) isolaram do caldo fermentativo do fungo *Trichoderma* sp. FKI-6626 a citosporona S, que apresentou atividade antimicrobiana

contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de atividade antifúngica.

Figura 1. Estrutura química de Produtos Naturais isolados de microrganismos endofíticos



Fonte: Luet *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004

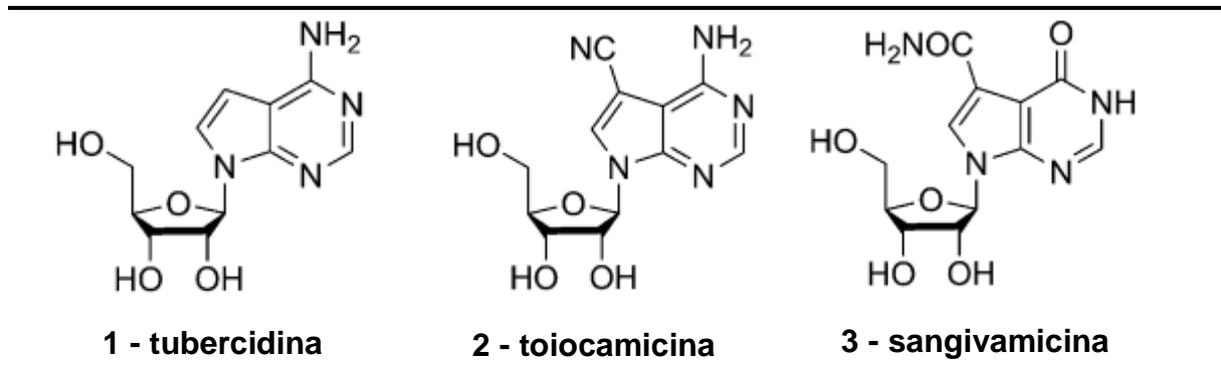
Além da importância medicinal da produção de antibióticos por endofíticos, estes também servem como agentes de controle biológico, uma vez que eles podem matar insetos ou patógenos e ainda serem utilizados para remediação ambiental (Van Aken, 2004; Newman & Reynolds; 2005; Sumarah, Miller & Adams, 2005; Rubini *et al.*, 2005. Muitos endofíticos ainda são capazes de fixar nitrogênio (Baldaniet *et al.*, 1986; Barraquio *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2003; Loiret *et al.*, 2004; Sandhiya *et al.*, 2005) e aumentar a captação de fósforo (Gasoni & Gurfmkel, 1997; Malinowski, Brauer e Belesky *et al.*, 1999), elementos importantes para o crescimento das plantas.

3.3. *Streptomyces tubercidicus*, tubercidina e análogos

Esse microrganismo é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia e não apresenta motilidade. *S. tubercidicus* foi isolado pela primeira vez do solo da cidade de Mobarra Chiba no Japão em 1957 por Anzai, Nakamura e Suzuki e colaboradores. Os mesmos autores isolaram o antibiótico tubercidina, em 1957, (Figura 2 – 1) do

extrato desse microrganismo. Devido à sua atividade biológica, a tubercidina foi patenteada pela Sigma Aldrich (patente 93747).

Figura 2. Estrutura da tubercidina, toiocamicina e sangivamicina.



Fonte: Do autor, 2017

Antes do isolamento da tubercidina, em 1956 Nishimura *et al.* (1956) isolaram a toiocamicina (Figura 2 - 2), um produto natural análogo à adenosina e derivado da pirrolo [2,3-*d*]-pirimidina (7-deazapurina). A toiocamicina é um metabólito antifúngico isolado de *Streptomyces toyocaensis*. Pouco tempo depois, em 1963 Rao e Renn isolaram a sangivamicina (Figura 2 - 3) de *Streptomyces rimosus*. Interessante é o fato deste mesmo microrganismo ter produzido a toiocamicina. Isso demonstra que ambos os compostos são produzidos pelo mesmo mecanismo de biossíntese (McCarty & Bandarian, 2012).

De fato, tanto a toiocamicina, como a tubercidina, quanto a sangivamicina apresentam uma unidade 7-deaza-adenosina com uma única diferença estrutural em C-7 da base. A toiocamicina e a sangivamicina possuem um substituinte ciano ou amido em C-7, respectivamente, enquanto que na tubercidina o substituinte C-7 é um hidrogênio (McCarty & Bandarian, 2012).

A toiocamicina apresenta atividade antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, também apresenta altos níveis de toxicidade (Saneyoshi, Tokuzen e Fukora, 1965). De acordo com Saneyoshi, Tokuzen e Fukora, (1965), a tubercidina exibe potente atividade antibiótica contra *Mycobacterium tuberculosis*, mas não inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e fungos. A tubercidina apresenta ainda atividade citotóxica contra células de sarcoma NF de rato sem cultura (Saneyoshi, Tokuzen e Fukora, 1965), fibroblastos de camundongos cultivados (Acs, Reich e Mori, 1964) e espécimes de tumores humanos (Wolberg, 1965), atividade antiviral

em relação a Vaccinia, Reovirus III e Mengiovirus, que contêm genomas compostos de DNA, RNA de cadeia dupla e RNA de cadeia simples, respectivamente (Acs, Reich e Mori, 1964), estabiliza microtúbulos contra a despolimerização induzida por vimblastina (Mooberry, Stratman e Moore, 1995), que é a mesma atividade apresentada pelo taxol e atividade anti-leishmania (Aoki et al, 2009). A sangivamicina é altamente citotóxica para células HeLa em cultura e Leucemia L1210 em ratos (Rao e Renn, 1963).

A toiocamicina, a tubercidina e a sangivamicina serviram como protótipos para o estudo do mecanismo de ação molecular de metabólitos 7-deazapurinas. Esses compostos parecem exercer sua ação citotóxica interferindo no metabolismo celular em uma variedade de níveis, em vez de um alvo celular específico (McCarty & Bandarian, 2012).

3.4. Biossíntese de derivados 7-deazapurinas

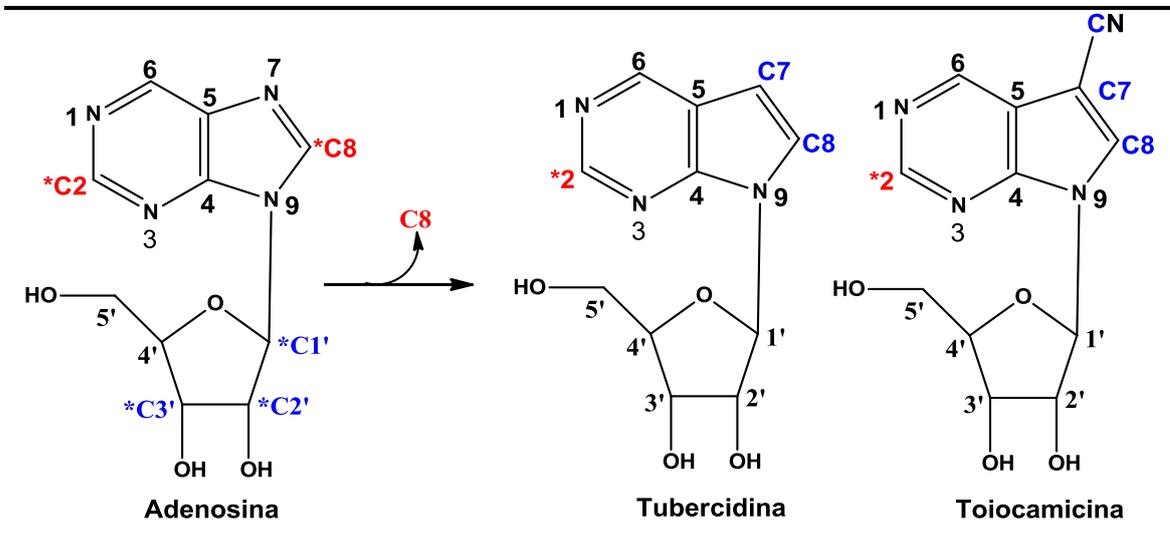
A biossíntese da tubercidina e de derivados 7-deazapurinas foi realizada através de estudos experimentais promovendo alimentação de culturas de linhagens bioprodutoras, que produzem esses metabólitos, com padrões de isótopos marcados radioativamente.

Nesses estudos alimentando as linhagens com [2-¹⁴C]-adenina e com [8-¹⁴C]-adenina, observou-se que apenas a [2-¹⁴C]-adenina é incorporada na base 7- deazaadenina da tubercidina. Isso sugere que o núcleo 7-deazapurina tem como precursor um nucleosídeo purínico com a perda do carbono 8 da purina, como pode ser observado na figura 3 (McCarty & Bandarian, 2012).

A origem dos carbonos 7 e 8 do anel pirrólico da tubercidina e da toiocamicina, bem como, do grupo ciano da toiocamicina foi determinada através de estudos alimentando-se as culturas com [1-¹⁴C]-ribose. Essa foi incorporada na base de deazapurínica. Isso pôde ser comprovado quando avaliou-se a radioatividade na toiocamicina isolada a partir de cultura na presença adenosina [U-¹⁴C] ou de [1', 2', e 3'-¹⁴C]-adenosina. Essas observações levaram à conclusão de que a ribose de um

nucleosídeo purínico é rearranjada para formar os carbonos 7 e 8, bem como, o carbono do grupo ciano na toiocamicina (McCarty & Bandarian, 2012).

Figura 3: Biossíntese de derivados 7-deazapurinas.



Fonte: Do autor, 2017

Apesar das estruturas da tubercidina, toiocamicina e sangivamicina serem mais semelhantes à estrutura da adenosina que da guanosina, experimentos de alimentação com guanina [$2\text{-}^{14}\text{C}$] ou adenina deram origem a 7-deazapurinas radio marcadas. Por isso, permanece incerto qual dos dois é o verdadeiro precursor das deazapurinas, porque a interconversão de purinas por caminhos endógenos não pode ser descartada (McCarty & Bandarian, 2012).

Como esses compostos são frequentemente isolados dos filtrados de cultura de 24-48 h após inoculação, sugere-se que as vias biossintéticas para a sua produção são ativadas na fase estacionária de crescimento. O cluster biossintético para a toiocamicina/sangivamicina também codifica um ativador transcricional tipo-LuxR. No entanto, o modo de regulação, e se a ativação da via está ligada a reguladores de transcrição gerais em *Streptomyces*, ainda é desconhecido.

3.5. Síntese de derivados da tubercidina e toiocamicina

Smith, Lee e Marquardt (1995) sintetizaram um derivado 5'-orto-metoxilado (**1** – Figura 4) para testar a hipótese da tubercidina, bem como, deste composto interagirem com receptores adenosina em vários sistemas biológicos. Utilizando-se cultura de células de ovário de hamsters, os autores demonstraram que **1** apresenta

1/3 da citotoxicidade da adenosina e é 10^5 mais citotóxico que a tubercidina. Os autores ainda demonstram em seu estudo que ambos, tubercidina e **1**, inibiram a liberação estimulada por antígeno de β 3-hexosaminidase de mastócitos derivados de medula óssea de rato *in vitro*, mas apenas a tubercidina foi ativa no teste de PCA (Resistência à Proteína C Ativada) *in vivo*. Segundo os autores, o efeito inibitório de **1** na liberação de mediadores de mastócitos não parece envolver interação com receptores de adenosina ou ser o resultado da conversão para **1** *per se* (Smith, Lee e Marquardt, 1995).

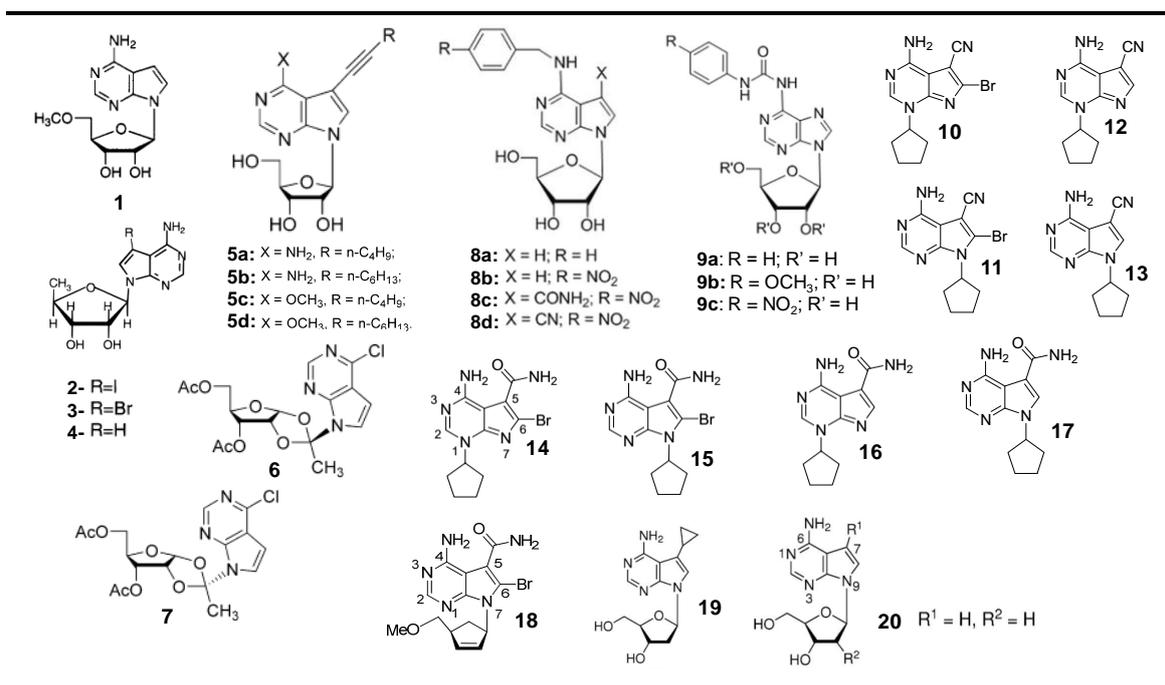
Mitchell et al (1996) isolaram três compostos inéditos, os análogos da tubercidina **3**, **4** e **5** a partir do extrato metanólico da ascídia *Didemnum voeltzkowi*, coletada nas Filipinas. Zhang et al (2002), sintetizaram seis análogos da tubercidina, os compostos **2 a-d**, **3** e **4** (Figura 4) e observaram que a proteína quinase A podia ser ativada pelo análogo 1a e a capacidade de ligação de cAMP a PKA-I era seletivamente inibida por esse composto. A desregulação na sinalização celular, i.e., ativação ou desativação de proteínas quinase, tem sido associada a muitas doenças, incluindo câncer e diabetes (Zhang et al., 2002).

Rayala e colaboradores sintetizaram os compostos **5 a-d** e **6 a-d**. Os autores mostram que em bioensaios de inibição específica de células cancerosas a proliferação foi observada em concentrações micromolares com os derivados 4-N-(4-nitrobenzílicos) da sangivamicina e da toiocamicina, e também com a 4-N-benziltubercidina. Já os derivados 6-ureidoadenosínicos, nenhum deles exibiu atividade inibitória contra a proliferação de células cancerígenas (Rayala et al., 2014)

Lee et al. (2014), sintetizaram vários análogos da toiocamicina, os compostos **10-18**, sendo que o composto **14** apresentou significativa atividade antiproliferativa contra células PA-1 de câncer de ovário humano, com IC_{50} de 3,9 μ M. O composto **18** apresentou atividade antiproliferativa similar ao composto **14**, com IC_{50} de 2.6 μ M (Lee et al., 2014).

Yang e colaboradores (2014), sintetizaram o composto **19**, um análogo da 2'-deoxy-tubercidina **20**, sintetizada previamente por Zabel, Saenger e Seela (1987).

Figura 4: Análogos da tubercidina e da toiocamicina, isolados ou sintetizados.



Fonte: Do autor, 2017

3.6. Microrganismos indicadores, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos que foram utilizados para o teste qualitativo de atividade antimicrobiana, foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A prevalência de micro-organismos importantes como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a vários antimicrobianos está aumentando, principalmente devido ao seu uso extensivo e indiscriminado. Isso representa um grande problema e ameaça para a saúde pública em muitos países, devido à persistência da circulação de cepas de bactérias resistentes no ambiente e a possível contaminação de água e alimentos, podendo tornar-se um meio pelo qual estas bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos são transmitidas para as pessoas, dificultando o tratamento (Manguiat & Fang, 2013)

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à Família Enterobacteraceae (Kaper *et al*, 2004). A grande maioria dessas amostras é pertencente à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente, 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais. A bactéria *Escherichia coli* tem a forma de bacilo, é gram - negativa, não - esporulada,

anaeróbia facultativa e fermentadora de açúcares. Existem muitas estirpes de *E. coli*, desde formas comensais até formas patogênicas. O contágio por *E. coli* se dá através da ingestão de água ou alimentos que não foram processados e tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção, como por exemplo, leite não-pasteurizado. O tratamento de infecções por *E. coli* é feito basicamente pela reposição de líquidos. O uso de antibacterianos é recomendado somente em casos graves (Alves, 2012).

Staphylococcus aureus é um patógeno associado a altas taxas de mortalidade e morbidade, capaz de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano. Sua capacidade em adquirir resistência à antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais o torna um perigoso agente infeccioso no ambiente hospitalar (LEITE, 2008). *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (Cruvinel & Silveira, 2011). Esta bactéria se apresenta como um coco gram - positivo, imóvel, medindo de 0,5 a 1,0 micrômetro, agrupando-se em massas irregulares que lembram cachos de uvas. Apresentam-se como germes anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 37°C (Williams, 1994). O *Staphylococcus aureus* habita frequentemente a mucosa nasal, a partir das quais contamina as mãos. Ele também é uma causa frequente de infecções cutâneas nas mãos. Destas fontes, pode facilmente penetrar no alimento (Tortora, 2000).

Os Estafilococos são microrganismos procariontes que se apresenta em forma de cocos, o que diferencia esta espécie é a parede celular rica em peptidoglicanos e a produção de enzimas e toxinas (ROSSI *et al.*, 2005). O *S. aureus* é um microrganismo capaz de causar desde pequenos furúnculos até sepse grave, sendo a principal bactéria causadora de doenças comunitárias e infecções hospitalares. *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias Gram-positivas encontradas na microbiota do corpo humano, pode causar infecções superficiais e até algumas disseminadas com elevada gravidade, a sua importância clínica é devido a incidência de infecções hospitalares graves causadas por amostra multirresistente (Cruvinel & Silveira, 2011).

4.METODOLOGIA

4.1. Microrganismo endofítico

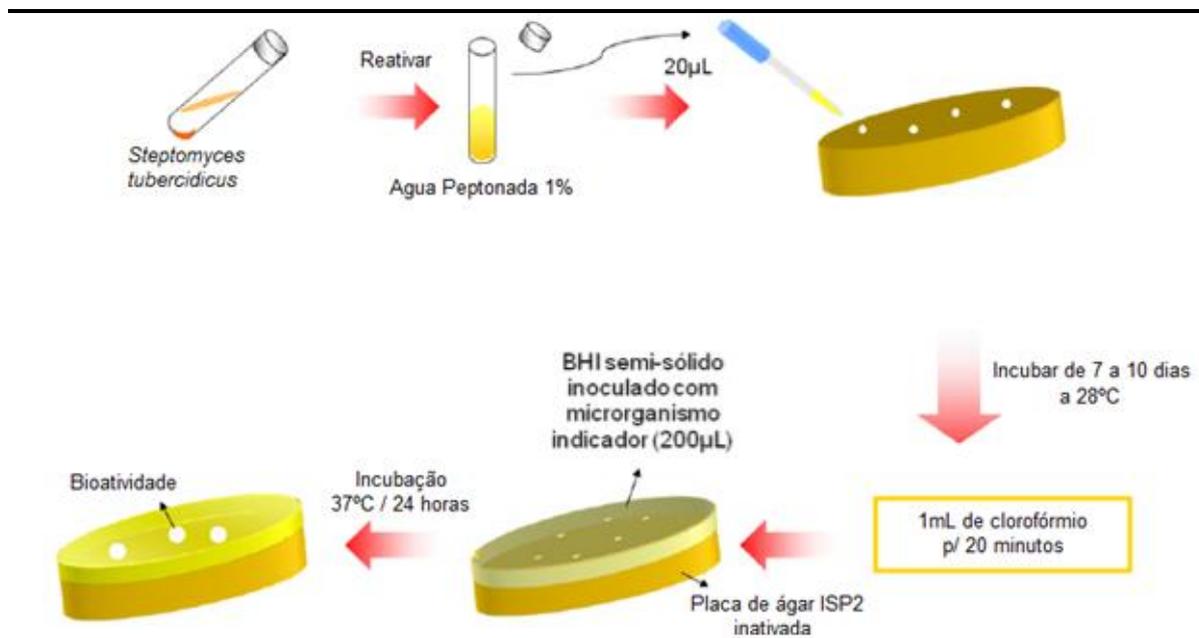
A linhagem do microrganismo endofítico foi cedida pela Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa e esse foi previamente isolado da planta Lobeira do Cerrado, da cidade de São Carlos – SP, planta pertencente ao campus da universidade Federal de São Carlos - UFSCar e identificado genotipicamente pelo método de amplificação e sequenciamento do RNA ribossomal 16S como *Streptomyces tubercidicus*, a linhagem estava armazenada a -70°C para manter sua integridade. Trabalhos anteriores (Ratti *et al.*, 2010) demonstraram que o extrato bruto de *S. tubercidicus* (filtrado da cultura) apresenta atividade contra *Escherichia coli* e contra *Staphylococcus aureus*, portanto o bioensaio de atividade antimicrobiana foi realizado somente contra esses microrganismos.

4.2. Bioensaio qualitativo de atividade antibacteriana

O teste da sobrecamada (*Overlay Assay*) foi utilizado para detectar a produção de compostos bioativos (Rosado & Seldin, 1993). Duas a três colônias dos microrganismos endofíticos foram diluídas, separadamente, em 10ml de água peptonada 0,1% e cinco alíquotas de 20 µL transferidas para a superfície de placas contendo ágar peptona, extrato de levedura e TSA (figura 5). As placas foram incubadas a 28°C por 7-10 dias. Após crescimento, 1 mL de clorofórmio foi adicionado na superfície interna da tampa de cada placa para inativação microbiana (20 minutos). As placas permaneceram semiabertas, por 30 minutos, para eliminação dos resíduos de clorofórmio.

Como dito anteriormente, os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 35218) foram utilizados como microrganismos indicadores. Estes microrganismos foram cultivados em 50ml de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas e 200 µL foram transferidos para tubos contendo 10 mL de BHI semissólido. As soluções resultantes foram vertidas na superfície de placas contendo o endofítico inativado. As placas foram incubadas (37 °C/24 - 48h) para verificar a ocorrência de zonas de inibição.

Figura 5. Representação esquemática do teste de sobrecamada para avaliação qualitativa da produção de substâncias bioativas.



Fonte: Rattiet al,2010

4.3. Cultivo do microrganismo endofítico.

O meio de cultura para o crescimento do Actinomiceto *Streptomyces tubercidicus* foi o meio ISP2 (extrato de levedura 2,5g; extrato de malte 10,0g; dextrose 4,0g; Agar 20,0g; água destilada 1000 mL; pH 7,0) suplementado 0,25% de peptona. O meio de inóculo foi preparado transferindo-se duas alçadas do microrganismo endofítico, acondicionado em *slant*, a um erlenmeyer com capacidade de 200 mL contendo 10 mL de ISP2. Este meio foi mantido “overnight” a 28° C e 180 rpm em incubadora *shaker*. Então, 1% (v/v) do inóculo (densidade óptica 0,8; λ 600 nm) foi adicionado a um erlenmeyer de 1000 mL contendo 200 mL de ISP2. O meio de produção foi incubado a 28° C e 180 rpm (Gerhardt et al., 1994). Após atingir a fase estacionária, a cultura foi centrifugada (10.000 rpm, 20 minutos) e o sobrenadante “*cell-free*” foi seco para a obtenção do extrato bruto.

4.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD):

Foram realizadas análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para comparar-se a natureza dos compostos contidos nos extratos brutos do cultivo realizado neste trabalho com a dos compostos do cultivo realizado no trabalho de Ratti *et al.* (2010). Os reveladores utilizados, separadamente, foram os mesmos utilizados por Ratti *et al.* (2010):

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

4.5. Separação e Purificação dos metabólitos secundários bioativos

O mesmo processo de separação utilizado no trabalho de Ratti (2010-B) foi seguido e as técnicas cromatográficas empregadas na separação do extrato bruto do *Streptomyces tubercidicus* foram específicas para extratos polares. O extrato bruto, também nomeado St, foi separado inicialmente em uma coluna de fase reversa do tipo Sep-Pak C-18 utilizando-se como fase móvel um gradiente de metanol em água. Foram obtidas quatro frações desta separação cromatográfica (St.1, St.2, St.3 e St.4) que foram avaliadas nos bioensaios de atividade antibacteriano contra *E. coli* e contra *S. aureus* separadamente. Entretanto, apenas a fração St.2 apresentou atividade biológica, e a mesma fração apresentou atividade contra *S. aureus* e *E. coli*.

A fração St.2 foi purificada por cromatografia de permeação em gel, utilizando-se Sephadex LH-20 e eluição isocrática utilizando-se metanol. Foram obtidas duas frações (St.2-A, St.2-B) que foram avaliadas no bioensaio antibacteriano contra *E. coli* e *S. aureus*. A fração St.2-B foi a única que apresentou atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*.

A fração ativa foi submetida às análises espectroscópicas para a determinação estrutural dos compostos.

4.6. Espectros de RMN do metabólito secundário bioativo isolado

Os espectros da fração St.2-B foram adquiridos em um Espectrômetro de Ressonância Magnética de 600 MHz na frequência do hidrogênio (14.1 Tesla) da Bruker modelo Ultra Shield Plus 600. Equipado com crioplatforma (cryofit), sonda criogênica com módulo ATMA (Automatic Tuning Matching) de 5 mm e gradiente em Z (CPTCI ^1H - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ Z-GRD) e unidade de controle de temperatura variável BVT 3000 (BCU 05).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de Ratti e colaboradores (Ratti *et al.*, 2010) foi o primeiro a demonstrar o endofitismo de *Streptomyces tubercidicus* na planta *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) a partir da vegetação do Cerrado. A linhagem estudada nesta dissertação é a mesma linhagem isolada por Ratti *et al.* (2010). A linhagem foi cedida pela co-orientadora deste trabalho, a Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa da UFSCar e o trabalho foi realizado reproduzindo-se os experimentos realizados anteriormente.

5.1. Bioensaio qualitativo de atividade antibacteriana

Nos ensaios qualitativos de atividade antibacteriana, *S. tubercidicus* novamente apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, como visto no trabalho de Ratti *et al.* (Ratti *et al.*, 2010). Os valores de zona de inibição obtidos são similares aos de Ratti *et al.* (2010), os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos através de suas médias.

Para comparar a ação antibacteriana do extrato obtido do caldo fermentativo do *S. tubercidicus* com outros antibióticos, alíquotas de 200 µL foram adsorvidas em discos de mesmas dimensões dos discos de antibióticos utilizados comercialmente. Foram selecionados tanto discos de antibióticos contra bactérias Gram + (como *S. aureus*), quanto antibióticos contra bactérias Gram –(como *E. coli*). Os valores de zona de inibição podem ser observados na Tabela 2.

Analisando-se a tabela 2 observa-se que as zonas de inibição de *S. tubercidicus* utilizado neste trabalho apresentam valores comparáveis aos obtidos no estudo anterior. Isso mostra que a linhagem ainda continua apresentando o mesmo poder de produção de compostos bioativos que apresentava a quase dez anos. Isso é muito importante biotecnologicamente, pois mostra que essa linhagem apresenta um amplo tempo de vida útil, a linhagem estava armazenada a -70°C.

Além disso, comparando-se as zonas de inibição do teste utilizando o extrato do *S. tubercidicus*, com as zonas de inibição dos discos de antibióticos utilizados comercialmente (Tabela 2), as zonas de inibição do extrato de *S. tubercidicus* são bem maiores, com exceção da ciprofloxacina que apresenta zona de inibição comparável. Isso demonstra a importância do presente estudo, pois o composto

antibacteriano presente no extrato de *S. tubercidicus* apresenta atividade antibacteriana acentuada. Os testes foram realizados em triplicata e os valores foram expressos através de suas médias. A avaliação da atividade antibacteriana do composto presente no extrato do *S. tubercidicus* podem ser utilizados os métodos mais conhecidos: método de difusão em ágar por poço, disco - difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição, os quais são realizados em caldo. Os métodos de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade in vitro de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (Clsi, 2008). Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos, tem-se utilizado mais frequentemente o método de microdiluição em caldo (Ostrosky *et al.*, 2008).

Existem casos onde a atividade biológica é sinérgica, i.e., a atividade biológica apresentada pelo extrato bruto é superior à atividade biológica apresentada pelo composto puro. No presente trabalho o extrato bruto apresenta atividade antibacteriana contra *E. coli* e contra *S. aureus*, que são bactérias Gram – e Gram +, respectivamente. Com o isolamento do composto puro e a realização dos bioensaios desse foi possível verificar que o composto bioativo de *S. tubercidicus* não apresenta sinérgismo e que o composto apresenta atividade tanto contra *E. coli* quanto *S. aureus*. Isso é um dado que corrobora com o trabalho de Ratti *et al* (2010) e é inédito.

Tabela 2. Valores da zona de inibição de *S. tubercidicus* e de discos de antibióticos utilizados comercialmente.

| Amostra\Cepas patógenas | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Zona de inibição em mm | Zona de inibição em mm |
| <i>S. tubercidicus</i> estudado anteriormente * | 40,00 | 35,00 |
| <i>S. tubercidicus</i> estudado neste trabalho** | 39,00 | 35,00 |
| Extrato do <i>S. tubercidicus</i> | 31.00 | 28.50 |
| CLA15 | 19.00 | |
| CIP 05 | 33.00 | |
| CFC 30 | 21.00 | |
| CRO 30 | 29.50 | |
| CLO 30 | - | 23,50 |
| VAN 30 | - | 20,00 |

* linhagem estudada por Ratti et al. (2010);

** mesma linhagem isolada por Ratti et al (2010) porem, cultivada para a realização deste trabalho;

Legenda: discos de antibióticos (5 µg/disco) - claritromicina (CLA 15), ciprofloxacina (CIP 05), cefaclor (CFC 30), ceftriaxona (CRO 30), cloramfenicol (CLO 30) e vancomicina (VAN 30).

Fonte: Do autor, 2017

5.2. Cultivo do microrganismo endofítico

O cultivo do microrganismo *S. tubercidicus* foi realizado segundo o trabalho de Ratti e colaboradores (2010). Os autores relatam que em 48 horas de cultivo observou-se o início da produção das substâncias bioativas e que no décimo dia de cultivo a linhagem entrou na fase de declínio. Assim sendo, o cultivo foi realizado em 10 dias, seguindo as mesmas condições. Em seguida, o caldo de cultivo foi filtrado para a separação das células e liofilizado para a obtenção do extrato bruto de *S. tubercidicus*.

Observou-se que o cultivo realizado levou a um rendimento percentual e atividade biológica comparável ao do estudo anterior realizado por Ratti *et al.* (2010). Isso demonstra a grande estabilidade da linhagem em estudo, pois quase dez anos após o isolamento da linhagem, essa continua apresentando as mesmas características de cultivo

5.3. Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

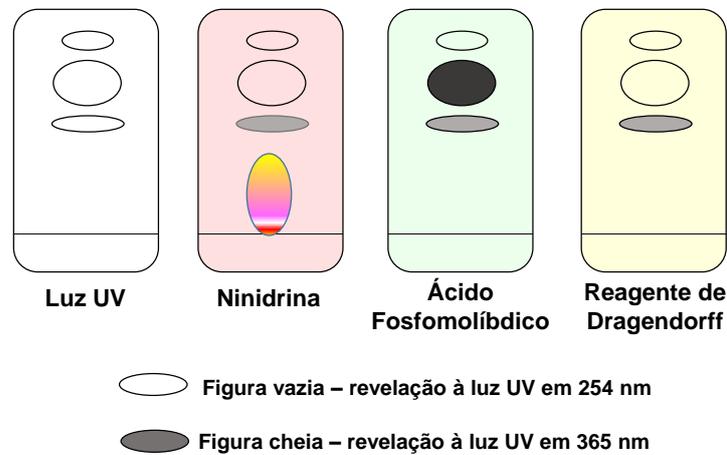
Com o objetivo de comparar a natureza dos compostos presentes no extrato bruto de *S. tubercidicus* cultivado neste trabalho, com o extrato desta mesma linhagem cultivada anteriormente, o extrato bruto obtido neste trabalho foi avaliado por CCD. O sistema eluente utilizado foi o mesmo sistema testado anteriormente, Metanol/Diclorometano (7:3). Foram utilizadas placas de fase estacionária de sílica (SiO₂). Quatro placas de CCD com o extrato bruto de *S. tubercidicus* foram preparadas, eluídas com o sistema eluente supracitado e reveladas com os reveladores descritos no item 4.4.

A Figura 6 representa a separação cromatográfica obtida para os quatro reveladores utilizados.

A natureza dos compostos presentes no extrato bruto *S. tubercidicus* cultivado neste trabalho é exatamente igual à natureza dos compostos presentes no extrato desta mesma linhagem cultivada anteriormente (Ratti *et al.* 2010).

Esse resultado demonstra mais uma vez a importância biotecnológica desta linhagem, uma vez que após quase 10 anos esta linhagem ainda continua produzindo compostos com a mesma natureza.

Figura 6. CCD do extrato bruto de *S. tubercidicus* obtido neste trabalho, revelada com vários reveladores.



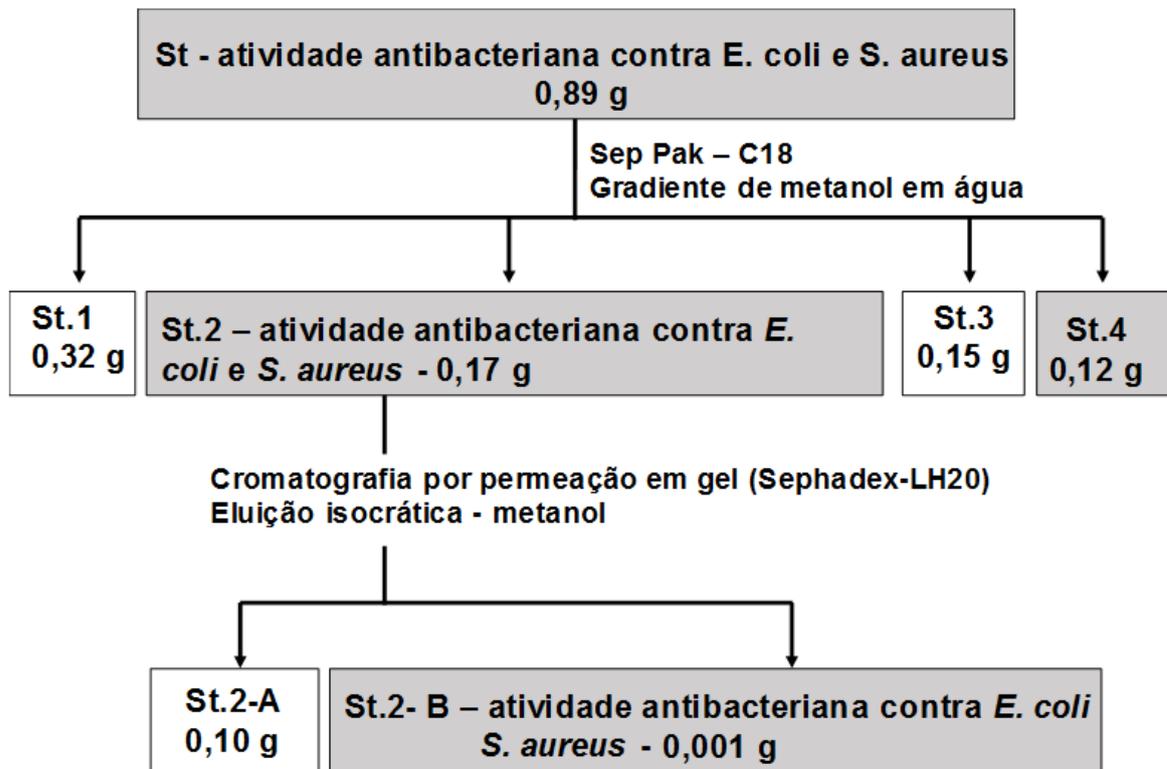
Fonte: Adaptado de Ratti et al., 2010

5.4. Separação/Purificação dos metabólitos secundários bioativos

O procedimento de separação seguiu o trabalho de Ratti *et al.* (2010) e pode ser repetido integralmente. O Fluxograma da Figura 7 representa o processo de separação e purificação dos compostos bioativos do extrato bruto de *S. tubercidicus*.

Como é possível observar pelo fluxograma da Figura 7, a massa da fração ativa St.2-B foi muito baixa e por isso, a determinação estrutural foi mais demorada, uma vez que foi necessária a utilização de microsonda para a aquisição dos espectros e esses demoraram muito mais tempos para serem obtidos. Cabe destacar que para a purificação dos compostos não foi possível à utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC) nem no trabalho anterior, nem neste trabalho. A fração ativa ainda apresenta impurezas, mas isso não impediu a determinação estrutural deste composto, uma vez que o composto majoritário nesta fração é justamente o composto ativo.

Figura 7. Fluxograma que representa o processo de separação e purificação do extrato bruto de *S. tubercidicus*.



Fonte: Do autor, 2017

5.5. Espectros de RMN do metabólito secundário bioativo isolado

O núcleo de cada átomo apresenta uma carga e, em alguns, essa carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo deste eixo. O momento angular da carga pode ser descrito em termos do número de spin. A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991).

O ^1H , o ^{13}C , assim como alguns outros núcleos, apresentam número de spin $+1/2$ e uma distribuição de carga uniforme e esférica. Quando encontram-se em um campo magnético B_0 , os spins se alinham na direção deste campo. Entretanto, quando um outro campo magnético B_1 é aplicado, em uma direção perpendicular à B_0 , os spins se alinham a esse campo. Assim, quando os núcleos excitados a estados de energia mais altos, pela absorção de energia, retornam ao estado fundamental perdem energia para o ambiente (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991).

O Processo de Relaxação Longitudinal, um dos mecanismos que explica o retorno ao estado fundamental, envolve a transferência de energia do núcleo em seu estado mais elevado em energia para as moléculas ao seu redor. Já o Processo de Relaxação Transversa, outro mecanismo que explica o retorno dos núcleos excitados ao estado fundamental, envolve a transferência de energia de um núcleo a outro, i.e., não há perda de energia, mas propagação de energia (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991).

Desta forma, os núcleos de ^1H e ^{13}C apresentam deslocamentos químicos (δ , ppm), característicos do ambiente eletrônico próprio e, com isso, pode-se realizar a elucidação estrutural de uma molécula com a análise conjunta de vários espectros, uma vez que cada um fornece informações diferentes. Os espectros de RMN- ^1H e de RMN- ^{13}C , que são espectros monodimensionais, fornecem informação a respeito dos diferentes núcleos de ^1H e de ^{13}C presentes na molécula. O espectro de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), fornece informações das correlações diretas entre os núcleos de ^1H e de ^{13}C presentes na molécula, ou seja, a que carbono cada hidrogênio, ou grupo de hidrogênios, está ligado. Já o espectro de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) fornece informações a respeito das correlações a longa distância entre os núcleos de ^1H e de ^{13}C presentes na molécula. É comum observar correlações até três ligações de distância. O espectro de COSY (Correlated Spectroscopy), fornece as correlações entre os núcleos de ^1H presentes na molécula (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991). Assim como o HSQC, o HMBC e o COSY, existem ainda outros espectros de RMN bidimensionais, entretanto, como não foram adquiridos neste trabalho não serão discutidos.

A análise conjunta dos espectros mono e bidimensionais fornece informações para a determinação estrutural dos compostos orgânicos. Os dados da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais para a fração bioativa St.2-B, isolada neste trabalho, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Dados da análise dos espectros de RMN mono e bidimensionais da amostra St.2-B.

| ¹³ C/HSQC (ppm) | ¹ H (ppm) | Correlações HMBC | Correlações COSY |
|----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 168 | δ 8,54 (s) | 141 | 8,54 |
| 152 | δ 8,18 (s) | - | 8,18 |
| 141 | δ 8,31 (s) | 152 | 8,31 |
| 91 | δ 5,97 (d) | 152 | 5,97; 4,74 |
| 86 | δ 4,16 (m) | - | 4,16 |
| 74 | δ 4,74 (m) | 91 | 4,32; 4,74; 5,97 |
| 71 | δ 4,32 (m) | - | 4,32; 4,74 |
| 70 | δ 3,53 (m) | 62 | 3,53; 4,32 |
| 62 | δ 3,87(m) | 74; 71 | 3,87; 4,32 |
| 30 | δ 1,23(m) | - | 1,23 |

Fonte: Do autor, 2017

A análise dos espectros da fração bioativa St.2-B iniciou-se pela interpretação conjunta dos espectros de RMN-¹³C e de RMN-¹H. Embora a amostra tenha permanecido no equipamento de RMN para a aquisição do espectro de RMN-¹³C por mais de 15 horas não foi possível observar todos os carbonos presentes na amostra, devido à baixa quantidade de amostra. Isso é algo bastante comum em amostras contendo baixa quantidade, pois a abundância isotópica do ¹³C (0,011) é bem mais baixa que a do ¹H (0,999), ou seja, sua sensibilidade é de 1,6% da sensibilidade do hidrogênio (Silverstein, Bassler & Morrill, 1991). Assim sendo, a avaliação dos átomos de carbono presentes na molécula foi feita com base no espectro de RMN-¹³C, bem como, na correlação direta ¹H-¹³C pelo espectro de HSQC.

Pelo espectro de RMN-¹H (figura 8) e suas expansões (figuras 9,10,11 e 12), de RMN-¹³C (figura 13) e de HSQC (figura 14) foi possível observar:

- Sinais bastante desblindados de hidrogênios em δ 8,54, 8,31 e 8,18, todos singletos, ligados aos carbonos em δ 168, 141 e 152, respectivamente. Esses

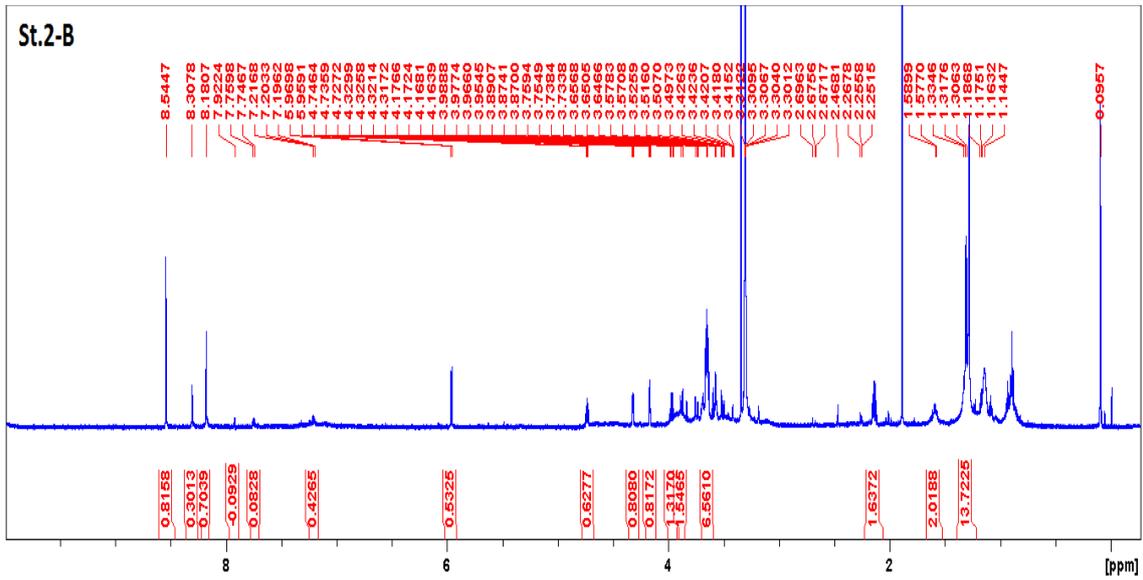
sinais são característicos de hidrogênios ligados à carbonos vizinhos à heteroátomos, principalmente, nitrogênio;

- Um dubleto em $\delta \sim 5,97$, ligado ao carbono em $\delta 91$, característico de hidrogênio ligado a carbono sp^2 , i.e., carbono em dupla ligação;
- Vários sinais entre $\delta 4,00-3,00$, característicos de hidrogênios ligados à carbonos funcionalizados do tipo sp^3 ;
- Um sinal em $\delta 1,23$ ligado ao carbono em $\delta 30$, característico de hidrogênios metilênicos ($R-CH_2-R$).

Entretanto, é possível ainda perceber que a amostra apresenta impurezas que não foram eliminadas durante a etapa de purificação. Essa amostra deveria ser purificada por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE / HPLC) em uma coluna de fase reversa do tipo C18 ou mesmo em uma coluna derivatizada com grupos aminopropil, uma vez que a amostra apresenta sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos vizinhos à nitrogênio. Porém, essa etapa não poderá ser realizada, pois apesar do programa de mestrado da universidade possuir o equipamento, o mesmo ainda não foi instalado e, portanto, não pode ser utilizado.

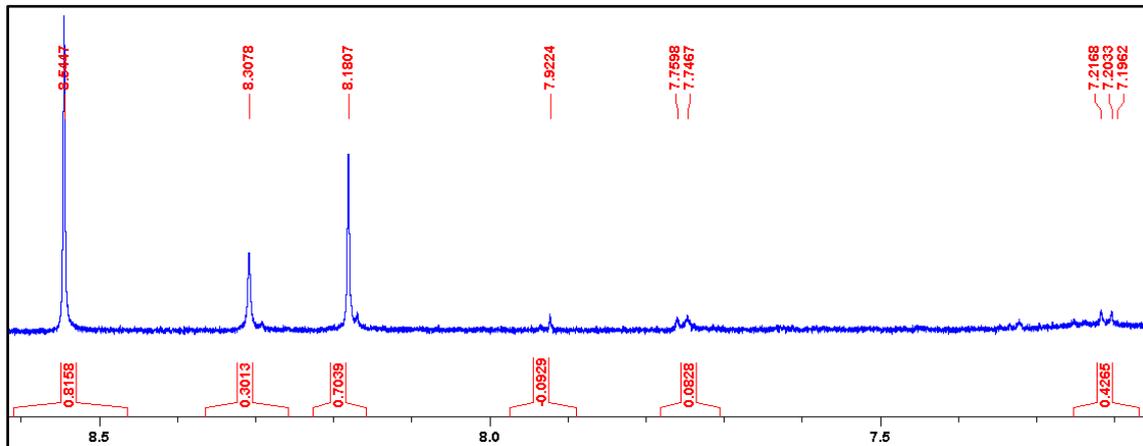
Apesar da presença de impurezas, é possível verificar a presença de um composto majoritário, cujos sinais são mais intensos. Assim sendo, a análise dos espectros se torna um pouco mais difícil e deve ser realizada com bastante cautela para não confundir-se os sinais do compostos majoritário com os sinais das impurezas.

Figura 8: Espectro de RMN-¹H da fração St.2-B.



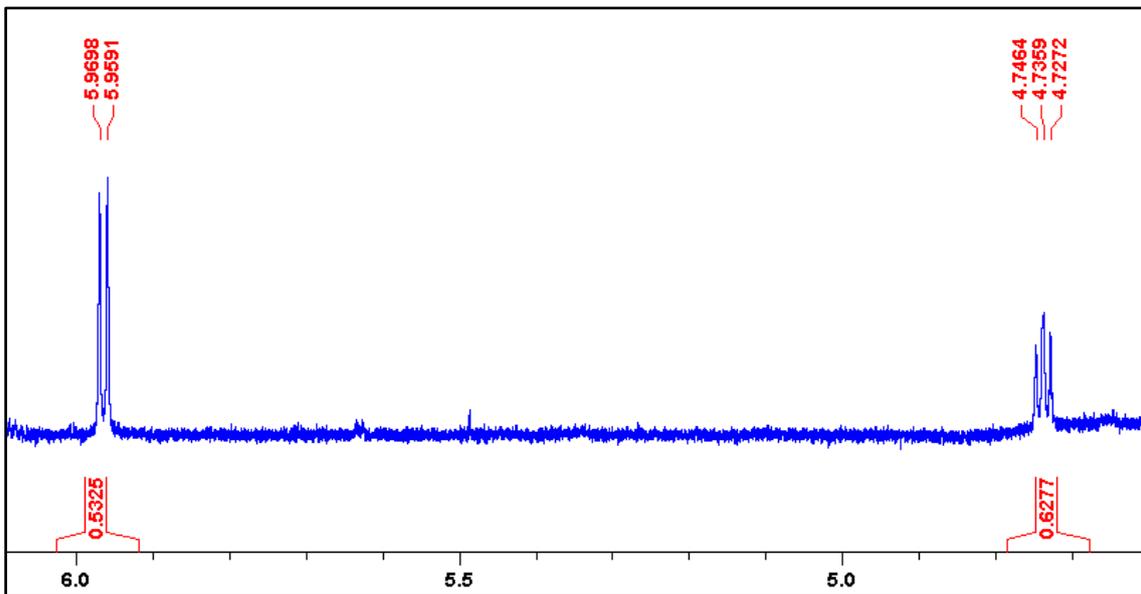
Fonte: Do autor, 2017

Figura 9: Expansão do espectro de RMN-¹H da fração St.2-B entre δ 7,15-8,60 ppm.



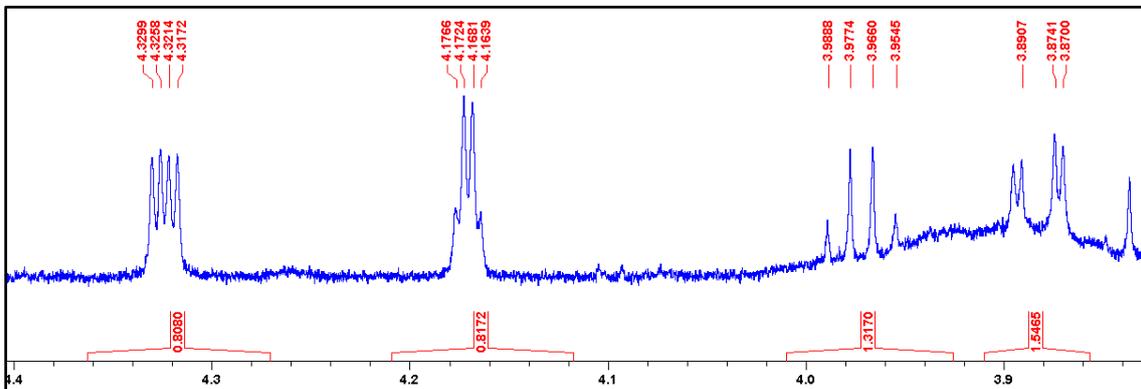
Fonte: Do autor, 2017

Figura 10: Expansão do espectro de RMN-¹H da fração St.2-B entre δ 4,60-6,10 ppm.



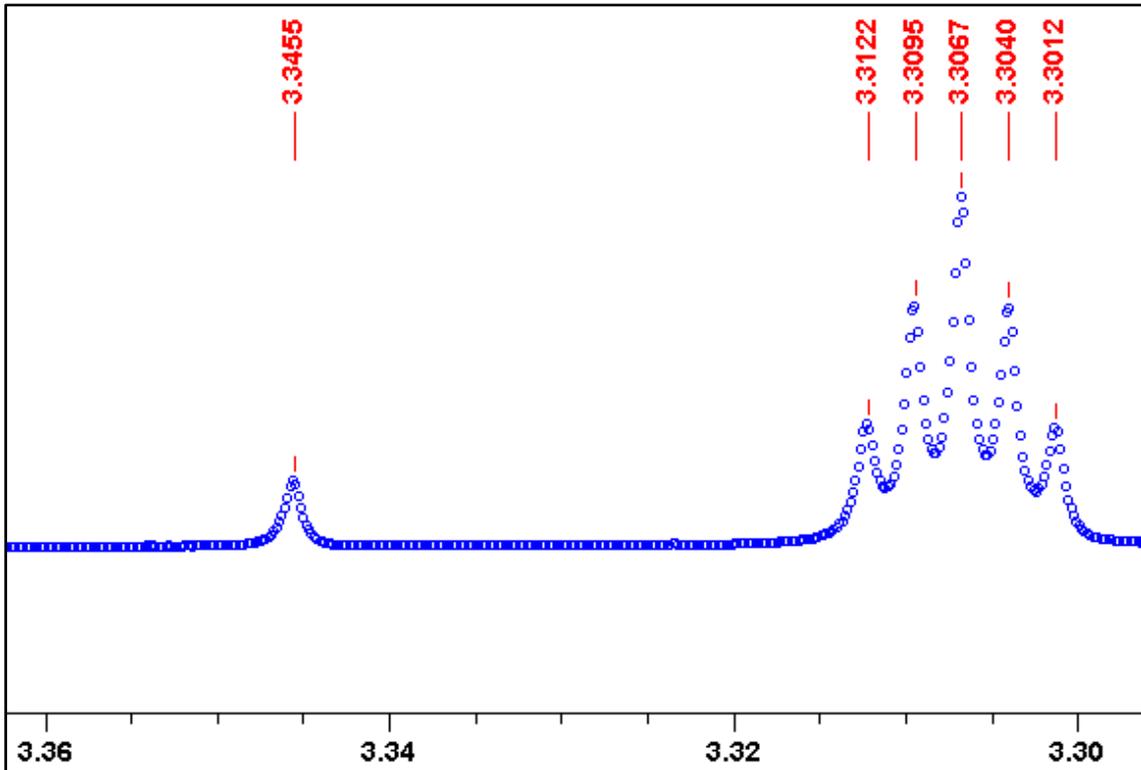
Fonte: Do autor, 2017

Figura 11: Expansão do espectro de RMN-¹H da fração St.2-B entre δ 3,55-4,40 ppm.



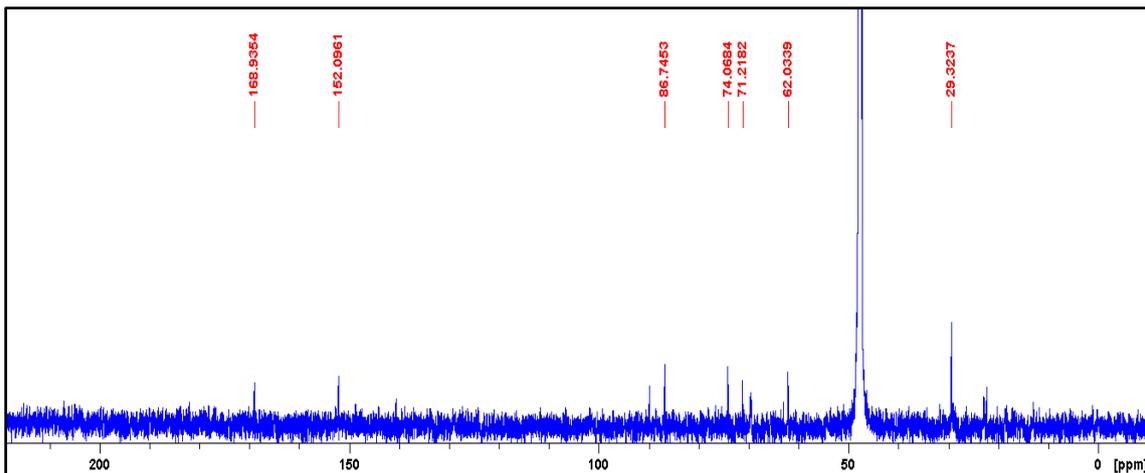
Fonte: Do autor, 2017

Figura 12: Expansão do espectro de RMN-¹H da fração St.2-B entre δ 3,30-3,36 ppm.



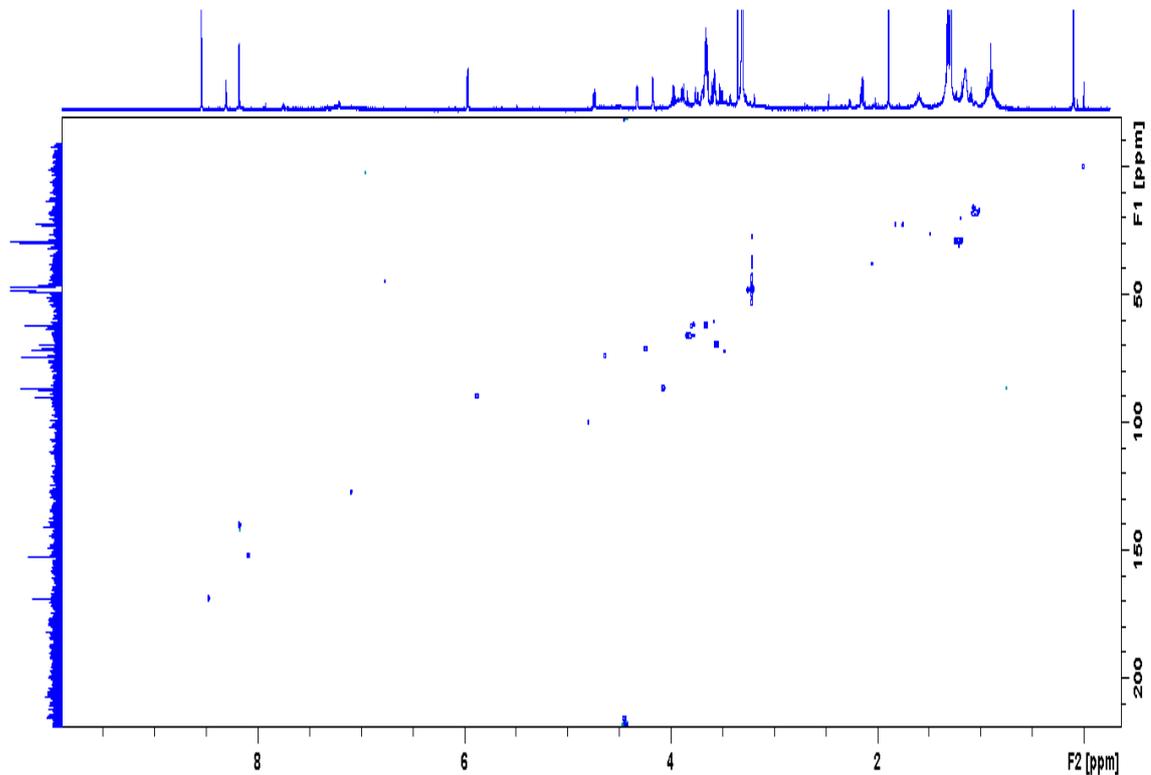
Fonte: Do autor, 2017

Figura 13: Espectro de RMN-¹³C da fração St.2-B.



Fonte: Do autor, 2017

Figura 14: Espectro de HSQC da fração St.2-B.



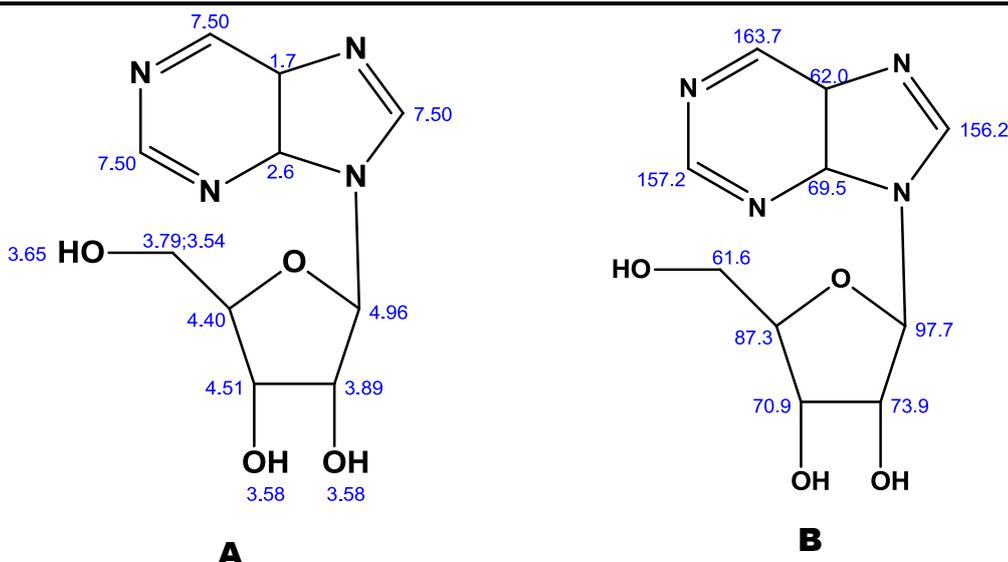
Fonte: Do autor, 2017

Se compararmos os dados dos espectros RMN-¹H, RMN-¹³C e de HSQC com os dados estimados pelo programa Chem Draw Ultra para a tubercidina (figura 15), composto amplamente isolado do extrato de *S. tubercidicus*, observa-se uma grande diferença nos deslocamentos químicos, tanto de hidrogênio, quanto de carbono.

Analisando-se os dados para a fração St.2-B pode-se dizer que existe a possibilidade da presença de estrutura cíclica com átomos de nitrogênios e/ou oxigênio, porém essa estrutura deve ser diferente do sistema bicíclico derivado da adenina. O grau de blindagem do próton pelos elétrons circulantes depende da densidade eletrônica relativa em torno desse próton. A densidade eletrônica em torno do próton, por sua vez, depende em grande parte da presença de grupos eletronegativos. Quanto mais próximo destes grupos “retiradores de elétrons” menos blindado estará o próton, diante disso a presença dos sinais desblindados em δ 8,54, 8,18 e 8,31, indica a possibilidade da presença de nitrogênio e/ou de oxigênio no sistema cíclico ou mesmo de carbonila, em contrapartida, prótons ligados a carbonos de duplas e triplas ligações possuem blindagem relativamente alta, devido à alta densidade eletrônica das ligações π e absorvem energia num campo

magnético mais alto, o que demonstra a diferença com o sistema bicíclico derivado da adenina.

Figura 15: Estimativa dos deslocamentos químicos de **A** - RMN-¹H e de **B** - ¹³C para a tubercidina, através do programa Chem Draw Ultra.



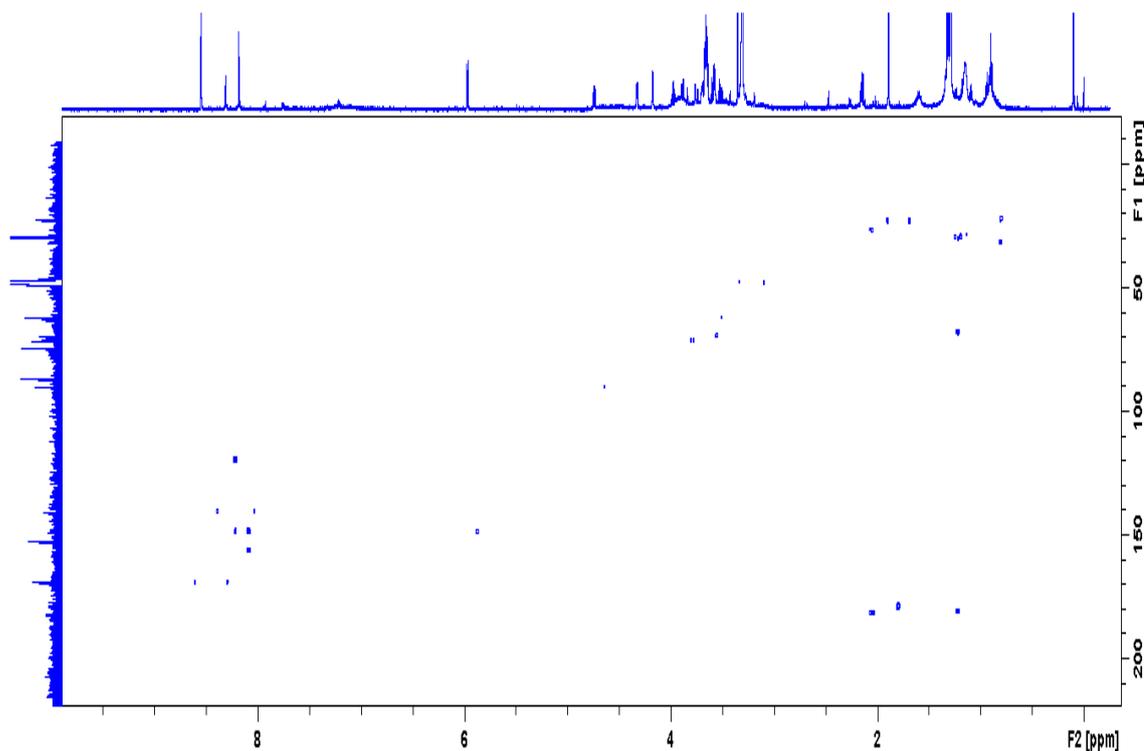
Fonte: Do autor, 2017

Analisando-se o espectro de HMBC da fração St.2-B (figura 16) observa-se as correlações a longa distância:

- Entre o hidrogênio em δ 8,54 com o carbono em δ 141;
- Entre o hidrogênio em δ 8,31 com o carbono em δ 152;
- Entre o hidrogênio em δ 5,97; 5,96 com o carbono em 152;
- Entre o hidrogênio em δ 4,74 com o carbono em δ 91;
- Entre o hidrogênio em δ 3,53 com o carbono em δ 62;
- Entre o hidrogênio em δ 3,87; 3,89 com os carbonos em δ 74 e 71;

Observa-se uma correlação do hidrogênio ligado a carbono sp^2 ($\delta \sim 5,97$) com o carbono em 152, que faz parte de um provável um sistema cíclico. Observa-se ainda que o hidrogênio em 4,74 ppm correlaciona com o carbono em δ 91, da dupla ligação, portanto, pode ser a continuação de uma cadeia lateral do sistema cíclico ou uma ponte entre dois sistemas cíclicos funcionalizados.

Figura 16: Espectro de HMBC da fração St.2-B.



Fonte: Do autor, 2017

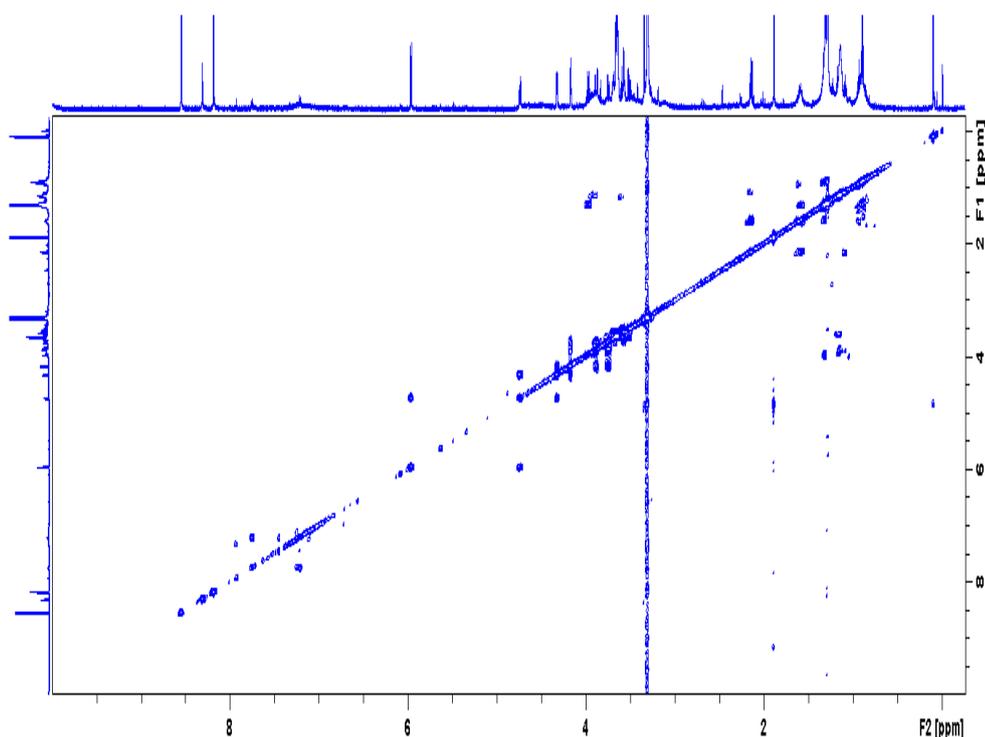
Através da análise do espectro de COSY (figura 17), é possível observar as correlações:

- Entre os hidrogênios desblindados em δ 8,54, 8,32 e 8,18 com eles mesmos;
- Entre o hidrogênio em dupla ligação em δ 5,97 com os hidrogênios em δ 4,74 e vice-versa;
- Entre os hidrogênios em δ 4,74 com os hidrogênios em δ 4,32 e vice-versa;
- Entre os hidrogênios em δ 3,53 com os hidrogênios em δ 4,32;
- Entre os hidrogênios em δ 3,87 com os hidrogênios em δ 4,32;

As correlações observadas corroboram com as conclusões obtidas a partir da análise do espectro de HMBC, i.e., que o composto majoritário da fração St.2-B pode ser constituído de sistema cíclico contendo nitrogênios e/ou oxigênio que não se correlaciona com o restante da estrutura, um outro sistema cíclico contendo carbonos funcionalizados ou então uma cadeia lateral contendo carbonos funcionalizados que correlacionam entre si. E ainda, que a ligação entre os sistemas cíclicos ou o sistema cíclico e a cadeia lateral deve ocorrer a partir do carbono 91

sp^2 ligado aos hidrogênios em δ 5,97; 5,96, pois é a única correlação observada entre esses possíveis sistemas cíclicos ou entre o sistema cíclico e uma possível cadeia lateral.

Figura 17: Espectro de COSY da fração St.2-B.



Fonte: Do autor, 2017

Entretanto, apesar das muitas informações obtidas a partir dos espectros discutidos neste trabalho, ainda não é possível propor uma estrutura para o composto majoritário da fração St.2-B. Ainda se faz necessária a aquisição de outros espectros, por exemplo de um DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), através do qual é possível distinguir as hibridizações dos carbonos presentes na amostra (sp^3 , sp^2 ou sp) e de ^{15}N para se ter certeza ou descartar a presença desse átomo no possível sistema cíclico.

A realização do espectro de Massas da amostra através da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) também será realizada para, em conjunto, com os espectros de RMN propor-se uma estrutura para o composto majoritário da fração St.2-B e a publicação dos resultados obtidos.

6.Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível reproduzir o cultivo do microrganismo endofítico *Streptomyces tubercidicus* isolado da planta *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira), do Cerrado pertencente ao campus da UFSCar, seguindo as condições previamente descritas para se obter o extrato bruto desse microrganismo. Destaca-se que esse resultado demonstrou que a linhagem é bastante resistente ao tempo de armazenamento, pois quase dez anos após seu isolamento, essa ainda continua apresentando as mesmas características de cultivo.

A partir do processo de separação e purificação do metabólito secundário bioativo de *S. tubercidicus*, utilizando-se técnicas cromatográficas, conclui-se que o processo de purificação necessitaria de mais uma etapa de purificação utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE / HPLC) e coluna de fase reversa C-18 ou uma coluna de fase reversa derivatizada com grupos aminopropil.

O processo de elucidação estrutural do metabólito secundário bioativo isolado de *S. tubercidicus* ainda não foi concluído, mas é possível concluir que não foi isolada a tubercidina, pois os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto majoritário isolado são bastante distintos dos dados simulados para a tubercidina, além disso, a atividade biológica descrita para a tubercidina é bem distinta da verificada no extrato e frações obtidas pela purificação do extrato no presente trabalho.

7.Perspectivas futuras

- Pretende-se finalizar a aquisição dos espectros de RMN e analisar a fração por espectrometria de Massas para completar a elucidação estrutural do composto bioativo isolado e publicação do artigo científico dos resultados obtidos,
- Já está em fase final de preparação um artigo de revisão sobre microrganismos endofíticos, entre o autor deste trabalho, a orientadora e co-orientadoras, em colaboração com a Profa. Dra. Jaine H. H. Luiz da UNIFAL, que também realiza pesquisa científica com microrganismos endofíticos. Esse artigo será submetido à Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação, vinculada ao PMPIT-UFTM;
- Pretende-se cultivar o microrganismo em biorreator nas mesmas condições para obter-se maior quantidade de extrato bruto e realizar-se o processo de isolamento e purificação deste composto para explorar-se melhor a atividade contra bactérias Gram + e Gram – apresentada.

Referências Bibliográficas

ACS G, REICH E, MORI M. Biological and biochemical properties of the analogue antibiotic tubercidin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the **USA**,v.52, p.493–501,1964.

ALVES, A. R. F. Doenças alimentares de origem bacteriana. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

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

AOKI J. I.; YAMASHIRO-KANASHIRO E. H.; RAMOS, D. C. C.; COTRIM, P. C. Efficacy of the tubercidin antileishmania action associated with an inhibitor of the nucleoside transport. **Parasitology Research**,v.104, p.223–228,2009.

BAE, H.; KIM S.; SICHER JR, R.C.; KIM M.S.; STREM, M.D.; BAILEY, B.A. The drought response of *Theobroma cacao* (cacao) and the regulation of genes involved in polyamine biosynthesis by drought and other stresses. **Biological Control**,v.46, p.24-28,2008.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**,v.36, p.86–93,1986.

BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant Soil**, v.194, p.139–149,1997.

BLACKWELL, M. Terrestrial Life—Fungal from the Start? **Science**, v.15, n.289, p.1884-1885, 2000.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v.252, p.139–149,2003.

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

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

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals**. Norma aprovada 3^a ed. Wayne, PA, CLSI document M31-A3, 2008.

CRUVINEL, A,R; SILVEIRA, A,R, SOARES, J.S. perfil antimicrobiano de *staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em uti no distrito federal. **Cenarium Farmacêutico**, v.4, n° 4, p.11-15, 2011.

DAI, C.C.; YU, B.Y.; ZHAO, Y.T.; JIANG, J.H.; YANG, Q.Y. The screening and identification of endophytic fungi from four species of family Euphorbiaceae and the strain sp. antibacterial activity. **Journal of Nanjing Forestry University**,v.30, p.79–83,2006.

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

GASONI, L.; DE GURFMKEL, B.S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. **Mycological Research**, v.101, p.867–870,1997

GERHARDT, P.; MURRAY, G.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. Methods for general and molecular microbiology. In ASM publication, Washington, D.C., 791 p.1994.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**,v.44, n.2, p.136–142,2008.

ISHII, T.; NONAKA, K.; SUGA, T.; MASUMA, R.; OMURA, S.; SHIOMI, K. Cytosporone S with antimicrobial activity, isolated from the fungus *Trichoderma* sp. FKI-6626. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, p.679–681,2013.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**. 2004;2:123-40

KIM, S.; SHIN, D.S.; LEE, T.; OH, K.B. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, v.67, n.3, p.448-450,2004.

LEE, J.; SEO, H.; YOON, S.; CHOI, K.; LEE, C.; RHEE, H. The synthesis and evaluation of new carbocyclic pyrrolo-[2,3-*d*]-pyrimidine nucleoside analogs **Heterocycles**, v.89, n.7, p.1557-1584,2014.

LEITE, GUSTAVO BALDUINO. Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília. Brasília, 2008. 101 f.

LOIRET, F.G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.504–511,2004.

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

MALINOWSKI, D.P.; BRAUER, D.K.; BELESKY, D.P. The Endophyte *Neotyphodium coenophialum* Affects Root Morphology of Tall Fescue Grown under Phosphorus Deficiency. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.183, p.53–60,1999.

MANGUIAT LS, FANG TJ. Microbiological quality of chicken and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. **Food Microbiol.** 2013;36(1):57-62. [DOI: 10.1016/j. fm.2013.04.005].

MCCARTY, R. M.; BANDARIAN, V. Biosynthesis of pirrolopyrimidines. **Bioorganic Chemistry**, v.43, p.15-25, 2012.

MITCHELL, S. S.; POMERANTZ, S. C.; CONCEPCIÓN, G. P.; IRELAND, C. M. Tubercidin Analogs from the Ascidian *Didemnum voeltzkowi*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.1000-1001,1996.

MOOBERRY, S. L.; STRATMAN, K.; MOORE, R. E. Tubercidin stabilizes microtubules against vinblastine-induced depolymerization, a taxol-like effect. **Cancer Letters**, v.96, p.261-266,1995.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6–8,2005.

NISHIMURA H, KATAGIRI K, SATO K, MAYAMA M, SHIMAOKA N. Toyocamycin, a new anti-candida antibiotics. **Journal of Antibiotics**,v.9, p.60–62,1956.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n.2, 2008.

RAO, K.; RENN, D. BA-90912: An antitumor substance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**,v.161, p.77–79,1963.

RATTI, R. P.; SERRANO, N.F.G.; HOKKA, C.O.; SOUSA, C.P. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus* coagulase-positive strain.Journal of Venomous Animals and Toxins including tropical **Disease**, v.14, n.2, p.294-302,2008.

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

RATTI, R.; TOLEDO PIZA A.C.M.; GRANATO, A. C.; HOKKA, C.O.; DUBREUIL, J.D.; PAIVA DE SOUSA, C. Growing kinetics and antimicrobial activity of *S. tubercidicus* against pathogenic bacteria and fungi. **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Singapura: World Scientific Publishing Co., 2010, 589-592.

RAYALA, R.; THEARD, P.; ORTIZ, H.; YAO, S.; YOUNG, J. D.; BALZARINI, J.; ROBINS, M. J.; WNUK, S. F. Synthesis of Purine and 7-Deazapurine Nucleoside Analogues of 6-*N*-(4-Nitrobenzyl)adenosine; Inhibition of Nucleoside Transport and Proliferation of Cancer Cells. **Chem Med Chem**, v.9, p.2186–2192,2014.

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

ROSSI, F.S.; Ceccon, M.E.J.R.; Krebs, V.L.. Infecções Estafilocócicas Adquiridas nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2005.

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

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.

SANDHIYA, G.S.; SUGITHA, T.C.; BALACHANDAR, D.; KUMAR, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43, p.802- 807, 2005.

SANEYOSHI M, TOKUZEN R, FUKORA F. Antitumor Activities and Structural Relationship of Tubercidine Toyocamycin and Their Derivatives. **Gann**, v.56, p.219-223, 1965.

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

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 5a. edição, John Wiley & Sons, Inc. EUA, 1991.

SMITH, C. G.; LEE, S. J.; MARQUARDT, D. L. Effects of Tubercidin and its 5'-O-Methyl Ether on Adenosine Receptors and Mediator Release Functions in Mast Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.2259-2262, 1995.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J.K., ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v.60, p.179, 2002.

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

SUMARAH, M.W.; MILLER, J.D.; ADAMS, G.W. Measurement of a rugulosin-producing endophyte in white spruce seedlings. **Mycologia**, v.97, p.770–776, 2005.

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

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre, ArTmed; 2000.

VAN AKEN, B. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p.508–517, 2004.

WANG, X.P.; ZHONG, J.; WANG, X.H.; LI, M.X.; ZHANG, L.Q. Study on the bioactivity of the endophytic fungi isolated from *Sinopodophyllum hexandrum* and *Diphylleia sinensis*. *Natural Product Research and Development*, v.8, p.15–19, 2006.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTIN, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **Journal of Antibiotics**, 57, 559–563, 2004.

WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v.109, p.610–618, 2005.

WILLIAMS MD, WILKINS ST. Bergey's. **Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed., Baltimore; 1994.

WOLBERG WH. Effect of tubercidin on nucleoside incorporation in human tumors. **Biochemical. Pharmacology**, v.14, p.1921–1925, 1965.

YANG, H.; BUDOW-BUSSE, S.; EICKMEIER, H.; REUTERC, H.; SEELA, F. 7-Cyclopropyl-2'-deoxytubercidin: a carbocyclic side-chain derivative of 7-deaza-200-deoxyadenosine. **Acta Crystallographica**, p.1-5, 2014.

ZABEL, V.; SAENGER, W.; SEELA, F. Structures of 2'-deoxytubercidin (I) and 2'-deoxytubercidin dihydrate (II). **Acta Crystallographic**, p.131–134, 1987.

ZENG, S.R.; XU, Q.W.; YE, B.T.; KE, Y.; FANG, B.Y.; HUANG, X.M. Isolation of endophytic fungi from *Polygonum cuspidatum* sieb.et zucc. and screening of isolates

producing antibiotic active substances. **Journal of Fungal Research**,v.3, p.24–26, 2005.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes.**Natural Products Report**,v.23, p.753–771,2006.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; LI, X.; ZHANG, L. Study on the Synthesis and PKA-I Binding Activities of 5-Alkynyl Tubercidin Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**,v.10, p. 907–912, 2002.