

Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Streptomyces hygroscopicus***Antioxidant and antimicrobial activity of *Streptomyces hygroscopicus***

DOI:10.34117/bjdv6n8-069

Recebimento dos originais: 08/07/2020

Aceitação para publicação: 10/08/2020

Jackelly Felipe de OliveiraBiotecnologista pela Universidade Federal da Paraíba, Mestranda em Biotecnologia pela
Universidade Federal de PernambucoInstituição: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento
de Antibióticos

Rua Prof. Artur de Sá s/n Cidade Universitária, Recife – PE – Brasil

E-mail: Jackellyfo33@gmail.com

Maria Luiza de Sousa Silva

Graduanda em Biomedicina na Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba - Campus I

Jardim Universitário, S/N - Castelo Branco, João Pessoa, PB, 58051-900

E-mail: smariasluiza2017@gmail.com

Luana Maria Cavalcanti Teixeira

Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PGBqF) pela

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Rua Prof. Artur de Sá s/n Cidade Universitária, Recife – PE – Brasil

E-mail: luana_tsuki@hotmail.com

Leonor Alves de Oliveira da Silva

Doutora em Microbiologia Aplicada pela Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho

Professora Adjunta da Universidade Federal de Pernambuco Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos, Rua Prof. Artur de Sá
s/n Cidade Universitária Recife-PE – Brasil

E-mail: laodls@yahoo.com.br

RESUMO

Os metabólitos secundários oriundos dos microrganismos são compostos de grande interesse industrial, farmacêutico e agrônomico. Os metabólitos secundários podem ser utilizados para crescimento ou exercem outras funções como a inibição de outros microrganismos, bem como compostos com propriedades antioxidantes. Dentre os microrganismos mais estudados quanto à produção dessas substâncias estão as Actinobactérias. Este trabalho teve como objetivo analisar a bioatividade especificamente a capacidade antioxidante e antifúngica do extrato oriundo da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* na qual foi utilizado uma fermentação submersa em meio MPE e utilizar acetato de para extração dos seus biocompostos. Inicialmente a atividade antioxidante do extrato acetato de etila foi realizada pelo método ABTS detectando uma inibição do radical ABTS de 29,15%. Ao realizar a atividade antioxidante do extrato através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC50 de $0,565 \pm 0,028$ mg/mL. Em ensaios da atividade antifúngico por

difusão em poço, o extrato apresentou inibição apenas nos apenas aos fungos *Fusarium oxysporum* e URM5522, com halos de inibição correspondente a 2,5 cm.

Palavras-chave: Actinobacteria, antifúngico, extrato da biomassa.

ABSTRACT

The secondary metabolites derived from microorganisms are compounds of great interest in several areas. Secondary metabolites may be used for growth or other functions such as inhibition of other microorganisms and can display antioxidants properties. The actinobacteria is the main microorganism that shows production of these substances. This work aimed to analyze the bioactivity specifically the antioxidant and antifungal capacity of the extract from the bacterium *Streptomyces hygroscopicus* in which a submerged fermentation was used in MPE medium and use acetate to extract its biocomposites. Initially the antioxidant activity of the ethyl acetate extract was performed by the ABTS method, detecting an ABTS radical inhibition of 29.15%. When carrying out the antioxidant activity of the extract through the DPPH method, we obtained the following IC₅₀ values of 0.565 ± 0.028 mg / mL. In antifungal tests by well diffusion, the extract showed inhibition only in *Fusarium oxysporum* and URM5522 fungi, with inhibition halos corresponding to 2.5 cm.

Keywords: Actinobacteria, antifungal, extract of biomass.

1 INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são substâncias que são capazes de inibir ou atrasar as taxas de oxidação. Atualmente são divididos em dois tipos, os enzimáticos (composto pelas enzimas produzidas no organismo) e os não enzimáticos, fazendo parte do segundo grupo as substâncias que geralmente pertencem ao metabolismo secundário, a exemplo temos os flavonóides, licopenos e bilirrubina. Essas substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres e espécies não-radicaais, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (MOSCA et al., 2017). Assim, os antioxidantes são capazes de neutralizar um radical livre, devido a capacidade de doar o elétron que eles precisam. Neste contexto, os compostos antioxidantes vêm sendo amplamente utilizados no tratamento e prevenção de diferentes doenças e também podem ser empregados em diversas áreas como na indústria de alimentos, cosméticos, ou até mesmo na indústria farmacêutica (DOMÍNGUEZ et al., 2018; FALOWO et al., 2016). Desse modo, a prospecção de novos compostos com essa atividade é um campo de crescente pesquisas, tendo em vista a ampla demanda. Microrganismos, por sua vez, torna-se evidentes devido a capacidade de produção de várias moléculas de interesse biotecnológico, como exemplo, as substâncias com atividade antioxidante.

Dentre os microrganismos bastantes estudados quanto à produção de metabólitos secundários bioativos está o filo Actinobacteria destacando-se dentro desse filo a espécie

Streptomyces spp. (HWANG et al., 2014; TAN, et al., 2015). Esses microrganismos estão presentes em uma ampla variedade de ambientes naturais como solo, atmosfera, rios, lagos, ambientes marinhos e em habitats com características ecológicas específicas como depósitos de lixo, água residuárias, regiões vulcânicas, lagos salinos, fontes termais, entre outros (RAO et al., 2013). Grande parte desses metabólitos bioativos, são metabólitos secundários tendo base na sua biossíntese na formação os quais se originam dos metabólitos simples do metabolismo anfibólico (BILYK; LUZHETSKYY, 2016). Desse modo, uma vez secretados tem como objetivo de inibir a proliferação de outros organismos, no meio pobre, aumentando a chance de germinação de seus esporos e conseqüentemente sua sobrevivência (MADIGAN et al, 2004). Dentro do filo de bactérias a espécie *Streptomyces hygroscopicus* ganha destaque devido ser uma espécie com poucos estudos.

Os fungos fitopatogênicos, por sua vez, são organismos tem sua ação em plantações reduzindo suas taxas de germinação e sobrevivência, além de contribuir para perdas nutricionais da semente, gerando doenças em humanos e animais causando grandes impactos econômicos mundiais (SANTOS et al., 2011). Assim, grande tendência atual está no fato do desenvolvimento de compostos de origem orgânica frente a compostos sintéticos (BARROS et al. 2013). Dentro dessa categoria insere a substituição de produtos químicos sintéticos, pois esse gera uma serie de escala afetada, desde a saúde do produtor rural até todo ecossistema sendo grande parte desses produtos tóxicos são destinados ao controle de fungos fitopatogênicos. Dessa forma, devido a pressões bióticas, bactérias podem produzir diversos compostos antifúngico, sendo essa prospecção viável e altamente satisfatória como uma alternativa natural frente esses fitopatógenos (FUGA et al., 2011; JESUS; GUIMARÃES, 2018).

A Caatinga é um bioma brasileiro que possui uma área com cerca de 844.453 quilômetros quadrados, e seu ecossistema é restrito ao Brasil, o que implica a dizer que nenhuma outra região do mundo possui tal patrimônio biológico (BRASIL, 2018). Entretanto, apesar de ser rica em biodiversidade, há poucos estudos que buscam a prospecção de biomoléculas nessa região que possuem propriedades de interesse como o caso de moléculas com capacidade antioxidante principalmente aquelas produzidas por microrganismos (MELO et al., 2015). Dessa forma o presente trabalho teve por objetivo analisar a presença da atividade antioxidante do extrato em acetato de etila oriundo do microrganismo *Streptomyces hygroscopicus* isolado da Caatinga, além de estudar os efeitos desse extrato contra fungos fitopatogênicas afirmado, assim, sua propriedade antifúngica.

2 METODOLOGIA

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

A actinobactéria *S. hygrosopicus* utilizada neste estudo está depositada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco sob o número de identificação UFPEDA3370. A fermentação destinada a produção dos metabólitos secundários foi realizada em condições otimizadas por trabalhos previamente descritos por Borba (2016). Para o processo a *S. hygrosopicus* foi semeada em placas de petri contendo meio de cultura ISP2 ágar e mantida em estufa por 7 dias à 37°C, em seguida 30 discos (9 mm) foram inoculados em meio líquido ISP2 para obtenção do pré-inóculo da fermentação. A fermentação para obtenção do extrato foi realizada em biorreator *New Brunswick Scientific* BIOFLO 110 (capacidade de 7L) utilizando 3-4L de meio líquido MPE, onde o 300 mL de pré-inóculo foi adicionado, tendo o objetivo o crescimento da actinobactéria e produção do metabólito secundário bioativo. O biorreator possui controle de temperatura, está mantida a 37°C e agitação mecânica de 200 rpm. O arrefecimento foi realizado pela injeção de ar comprimido, controlado no parâmetro: nível de O₂ (1/1) (v/v). O pH inicial foi em torno de 7,2. Após as 96 h de incubação o produto da fermentação em meio MPE foi centrifugado a 10000 rpm por 7 min, com a finalidade de separar a biomassa do sobrenadante. Então na biomassa foi inicialmente hexano 1:1 biomassa/solvente e posteriormente adicionado acetato de etila na proporção de 1:1 biomassa/solvente mantidos sob agitação 150 rpm durante 30 min. A mistura foi posteriormente filtrada a vácuo e posteriormente o solvente orgânico presente no sobrenadante foi evaporado no rotaevaporador a uma velocidade de 60 rpm, a uma temperatura de 40°C e submetidos às avaliações seguintes.

2.2 TESTES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: MÉTODO ABTS E DPPH

Para obtenção da atividade antioxidante do extrato acetato de etila obtido da biomassa de *S. hygrosopicus*, foi utilizado o método do radical livre ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico). O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS 7 mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140 mM. Mantido a mistura no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico PA (Vetec) até obter uma absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm, a qual foi preparada e usada no dia da análise. 30 µL do extrato foi adicionado a 3,0 mL da solução de ABTS^{•+}. Após 6 minutos, foi realizada a leitura em 734 nm. A porcentagem de sequestro do radical ABTS^{•+} foi calculada.

Para o método DPPH, utilizou a metodologia empregado Blois (1958). A partir do extrato oleoso obtido no biorreator, foi retirado 69 mg e homogeneizado com auxílio de um vortex com 900µL de etanol e 100µL de DMSO. Dessa solução, separou 500 µL sendo realizada uma diluição seriada nas concentrações de 10mg/mL a 0,312mg/mL. Após esse processo, 40 µL de cada amostra diluída foi adicionada em placas de 96 poços, iniciado em ordem decrescente de diluição. Sendo adicionado 200µL de um radical livre estável orgânico com a nomenclatura de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) a 0,02mM em cada poço com as amostras diluídas e incubado no escuro por 30 minutos. Após esse tempo as amostras foram lidas no leitor de microplaca à 517 nm. Para analisar a capacidade que a amostra teve de sequestrar o radical DPPH, utilizou a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra} \times 100}{A \text{ controle}}$$

Na qual A controle é a absorbância da solução do DPPH sem a amostra e A amostra é amostra com o DPPH.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A avaliação da atividade antifungica inicialmente realizada frente aos fungos *Cladosporium tenuissimum* (URM5632), *Fusarium oxysporum* (URM7083), *Fusarium sonali* (URM320), *Mycrophonina pascolina* (URM2703) e *Colletotricum gloesporioides* (URM5522). Todos foram gentilmente cedidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

Os fungos foram cultivados em Ágar dextrose batata. Soluções foram feitas previamente adicionando NaCl à 0,9% utilizando tween como diluente em água destilada. Após preparada, essa solução à cultura previamente estabelecida e com uma ajuda de uma alça foi possível desprender os esporos da placa obtendo assim uma solução salina de esporos. Após esse processo, 200µL dessa solução foram inseridos com auxílio de uma pipeta no meio de cultura Ágar dextrose batata e semeados com uma alça de trigaslki com o propósito de espalhar o fungo de forma homogênea. Assim, foram feitos quatro poços de 9 mm de diâmetro nas placas de ágar semeadas com o respectivo organismo teste na qual 100 µL do extrato acetato de etila obtido da biomassa de *S. hygroscopicus* foi inoculado em três poços e por fim água destilada foi inoculado no quarto poço servindo como controle negativo. A inibição do crescimento foi examinada após 24 h de incubação a 37 °C. A atividade antifúngica foi estimada pela medida do diâmetro da zona inibitória.

2.4 ANÁLISE QUALITATIVA DE DETECÇÃO DE FLAVONÓIDES E ALCALÓIDES

Análise preliminar da presença de flavonoides e alcaloides presentes no extrato acetato de etila da biomassa de *S. hygroscopicus* foi realizada através de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias.

Para análise da presença de flavonoides utilizou a metodologia de Silva e seus colaboradores (2013). Para isso, foram pesados 10,36 mg do extrato oleoso em um béquer adicionados o extrato e 5mL de metanol, além disso, foram inseridos no meio 1 mL de HCl e 1 cm de fita de magnésio totalizando 43 mg, sendo assim esperando 15 minutos até o surgimento de coloração rosada como indicativo da presença de flavonóides.

Para detectar a presença de alcalóides foi baseado no teste de revelador Dragendoff (WAGNER, 1996). Foi pesado 1g de extrato em um tubo de ensaio, neste mesmo tubo foi adicionado 10 mL de H₂SO₄ 1%, consecutivamente a mistura foi aquecida em banho-maria a 100° C durante 2 minutos e filtrada logo após. Alíquota do filtrado foi colocada em outro tubo de ensaio e em seguida foi gotejado o reagente de Dragendorff.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA

O processo de otimização da obtenção do extrato, realizado por Borba (2016) promoveu uma ótima extração do extrato, tendo um rendimento de 2,6 a partir de 3 L. Além disso, o solvente acetato de etila por possuir características de ser um solvente apolar fraco, ele pode ter característica de extração de metabólitos secundários polares e apolares que possuem características polares quanto apolares, mostrando um solvente ideal para esse tipo de processo (TIAN *et al.*, 2013).

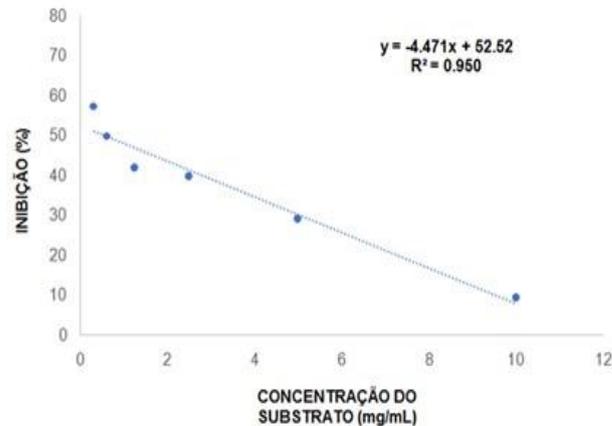
Em trabalhos anteriores que analisaram a otimização de obtenção de *Streptomyces* como o Ahmed e colaboradores em 2016, mostrou ser um dos melhores solventes para esse tipo de método. Ademais de suas propriedades positivas de carácter extrator, há outras vertentes a ser considera positivos para a escolha do acetato de etila como solvente como o caso de questões de técnica, duração da extração, questões ambientais e de segurança além a questão de custos.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na literatura existem uma variedade de testes *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante, no presente trabalho utilizou-se de duas metodologias distintas. Avaliou a capacidade do extrato acetato de etila em reduzir captura dos radicais de ABTS (2,2azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)), a concentração de 1,485 mg/mL do extrato apresentou uma inibição do radical ABTS

de 29,15%. Ao realizar a atividade antioxidante do extrato através do método de DPPH, obtivemos os seguintes valores de IC₅₀ de $0,565 \pm 0,028$ mg/mL estes dados estão apresentados na Figura 1.

Figura 1. Percentual de inibição de DPPH do extrato acetato de etila de *S. hygroscopicus*.



Fonte: Autor (2018)

A atividade antioxidante de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* pode apresentar grandes variações. Manivasagan e colaboradores (2013), demonstraram que uma protease produzida por *Streptomyces* sp. obteve IC₅₀ de $78 \pm 0,28$ mg/mL. Ser e seus colaboradores (2013), em um estudo sobre atividade antioxidante de uma nova espécie de *Streptomyces* sp. mostrou que extrato metabólicos em concentração de 2 mg/mL apresentaram porcentagem de inibição de $27,24 \pm 1,91\%$. Esse resultado é algo interessante pois, em um ambiente que exista estresses como estresses oxidativos os organismos bem mais adaptados são aqueles que irão possuir atividade antioxidante gerando assim uma vantagem seletiva.

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A atividade antioxidante de metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Streptomyces* pode apresentar grandes variações. Manivasagan e colaboradores (2013), demonstraram que uma protease produzida por *Streptomyces* sp. obteve IC₅₀ de $78 \pm 0,28$ mg/mL. Ser e seus colaboradores (2013), em um estudo sobre atividade antioxidante de uma nova espécie de *Streptomyces* sp. mostrou que extrato metabólicos em concentração de 2 mg/mL apresentaram porcentagem de inibição de $27,24 \pm 1,91\%$. Esse resultado é algo interessante pois, em um ambiente que exista estresses como estresses oxidativos os organismos bem mais adaptados são aqueles que irão possuir atividade antioxidante gerando assim uma vantagem seletiva.

Figura 2. Halo de inibição de *Fusarium oxysporum* com o extrato de *S. Hygroscopicus*.



Fonte: Própria (2019)

Diferentes classes de compostos químicos do metabolismo secundário são encontradas em extratos provindos de culturas de *Streptomyces* sp. como demonstrado por Jaivel e colaboradores (2014), ao realizar o teste qualitativo para flavonóides e alcalóides no extrato acetato de etila de *S. hygroscopicus*, os resultados foram positivos para o teste de alcalóides e negativo para flavonoides. Sabe-se que as variedades de alcalóides são produzidas por vários organismos, incluindo bactérias, fungos e plantas, como metabólitos secundários que exibem bioatividades úteis. Os alcalóides foram originalmente definidas como compostos orgânicos de origem vegetal que possuem bioatividades fortes e exibem basicidade que é atribuído a presença de nitrogênio (KISHIMOTO et al., 2016).

4 CONCLUSÕES

O extrato acetato de etila obtido da biomassa de *Streptomyces hygroscopicus*, apresentou atividade antioxidante capaz de reduzir os radicais 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico e 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, apresentando atividade antimicrobiana capaz de inibir os fungos fitopatogênico *Fusarium oxysporum* e URM5522 o extrato bioativo em teste qualitativo mostrou-se positivo para a classe de metabólitos secundários de alcalóides. Constituindo um extrato bastante promissor para trabalhos futuros de purificação e identificação dos compostos bioativos, caracterizando-o como um extrato potencialmente aplicável na indústria biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- AHMED, I. K.; HANAN, E. B.; HUMODI, A. S. Streptomyces species from red sea habitat: isolation, characterization and screening for antibacterial compounds. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. v.6, n.1, p.62-71, 2016.
- AMINI, J.; AGAPOOR, Z.; ASHENGROPH, M. Evaluation of Streptomyces spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. *Journal of Plant Protection Research*, v.56, n.3, 2016.
- BARROS, L. S.; ADORIAM, A. I.; KOBAYASTI, L. Uso de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial in vitro de *Acremonium* sp. e *Fusarium verticillioides*. *Revista Enciclopédia Biosfera, Goiânia*, v.9, n.16, p.2072-2076. 2013.
- BILYK, O.; LUZHETSKYY, A. Metabolic engineering of natural product biosynthesis in 22 actinobacteria. *Curr Opin Biotechnol*. v.42, n.1, p.98-107, 2016.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. *Nature*, v.181, 28 n. 4617, p.1199-1200, 1958.
- BORBA, C. B. A. Avaliação de metabólito Secundário de *Streptomyces* sp., sua atividade 24 antimicrobiana e citotoxicidade; identificação morfológica e molecular da actinobactéria. 25 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em 26 Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE. 2016.
- BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. *Biomass: Caatinga*. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomass/caatinga>. Acessado em: 15 out, 2018.
- DOMÍNGUEZ, R. et al. Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food Research International*. v. 113. p. 93-101. Nov, 2018.
- FALOWO, A. B.; FAYEMI, P.O; MUCHENJE. Natural antioxidants against lipid-protein 13 oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int*, v.64, p.171-181, 14 2014.
- FUGA, C. A. G.; GONÇALVES, D. C.; CUNHA, W. V. Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Bacillus* spp. "in vitro". *Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão. Patos de Minas*, v.1, n. 8, p.188194, 2011.
- HWANG, K. S. et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the 31 production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, v. 32, p. 255–268, 2014.
- JAIVEL, N.; UVARANI, C.; RAJESH, R.; VELMURUGAN, D.; MARIMUTHU, P. Natural 33 occurrence of organofluorine and other constituents from *Streptomyces* sp. TC1. *J Nat Prod*. 34 v. 77, n. 1, p. 2-8. Jan, 2014.
- JESUS, M. S.; GUIMARÃES, P. G. Utilização de bactérias no controle de fungos fitopatogênicos in vitro. *Ver Ourucur*. v.8, n.1, 2018

KISHIMOTO, S.; SATO, M.; TSUNEMATSU, Y.; WATANABE, K. Evaluation of 1 Biosynthetic Pathway and Engineered Biosynthesis of Alkaloids. *Molecules*. v. 21. n.8. p. 2 1078. Ago, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock: *Biologia de los 9 microorganismos*. 10 ed. Pearson: Prentice Hall. p. 1011. Jan, 2004.

MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K. K. S. Production, 11 Characterization and Antioxidant Potential of Protease from *Streptomyces* sp. MAB18 Using 12 Poultry Wastes. *BioMed Research International*, p.1-13. 2013.

MELO, I. S. et al. Biodiversidade e bioprospecção de microrganismos da caatinga. *EMBRAPA Meio Ambiente*. Mar, 2015.

MOSCA, S. S.; SANCHES, R. A.; COMUNE, A. C. A Importância dos antioxidantes na 22 neutralização dos radicais livres: uma revisão. *Revista Saúde em Foco*, 9^a ed, 2017.

RAO, K.V.R.; RAO, T. R. Molecular characterization and its antioxidant activity of a newly 1 isolated *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 from mangrove soil. *Journal of Young 2 Pharmacists*. v.5, n.4, p.121-126, 2013.

SANTOS, A. F.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. Patologia de sementes florestais: 10 Importância da sanidade das sementes florestais: Embrapa florestas, Belém, p.236, 2011.

SER, H. L.; TAN, L. T. H.; LAW, J. W. F.; CHAN, K. G.; DUANGJAI, A. Focused Review: 12 Cytotoxic and Antioxidant Potentials of Mangrove-Derived *Streptomyces*. *Frontiers in 13 Microbiology*, v.8, 2017.

SILVA, et al. Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia 15 de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). *Rev. Bras. Pl. Med*, v.15, n.4, p.717-726. Set, 2013.

TAN, L. T. et al. Investigation of Antioxidative and Anticancer Potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 Isolated from Malaysia Mangrove Soil. *Front. Microbiol*, v.6, p.1316. Nov, 2015

TIAN, Y.; XU, Z.; ZHENG, B.; LO, Y. M. 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punicagranatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 202–208.