

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

GUSTAVO BARTOLOMEU PEDROSA GOMES DA SILVA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFITICOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
(AROEIRA-VERMELHA): ISOLAMENTO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
PROSPECÇÃO QUÍMICA.**

**RECIFE
2013**

GUSTAVO BARTOLOMEU PEDROSA GOMES DA SILVA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFITICOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
(AROEIRA-VERMELHA): ISOLAMENTO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
PROSPECÇÃO QUÍMICA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia de Montenegro Stamford
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo

**RECIFE
2013**

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Pedrosa, Gustavo Bartolomeu Pedrosa Gomes da

Micro-organismos endofíticos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha): isolamento, atividade antimicrobiana e prospecção química/ Bruno Melo Lustosa– Recife: O Autor, 2013.

127 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Tania Lúcia de Montenegro Stamford

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e Apêndices

- 1. Microorganismos biotecnológicos 2. Anacardiaceae I. Stamford, Tania Lucia de Montenegro (orientadora) II. Título**

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 049

GUSTAVO BARTOLOMEU PEDROSA GOMES DA SILVA

**MICRO-ORGANISMOS ENDOFITICOS DE *Schinus terebinthifolius* Raddi
(AROEIRA-VERMELHA): ISOLAMENTO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
PROSPECÇÃO QUÍMICA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Tânia Lúcia de Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 26 de Fevereiro de 2013.

Dedico a Deus, aos meus pais,
Manoel e Maria Ângela e a meu
irmão, Renato.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todas as conquistas obtidas ao longo de minha vida.

Aos meus pais, que tanto amo, e que sempre me deram o apoio e a educação necessária para a conquista dos meus objetivos.

À minha família por sempre estar junto a mim.

Às minhas orientadoras: Tânia Lúcia de Montenegro Stamford e Janete Magali de Araújo pela transmissão de seus valiosos conhecimentos.

À professora Gláucia Manoella de Souza Lima por toda a ajuda e orientações ao longo dos meus experimentos.

À professora Thayza Christina Montenegro Stamford por aceitar o convite e fazer parte da minha banca.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, pelos ensinamentos essenciais.

À professora Márcia pelo apoio na reta final dessa pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Émerson, Carol, Guilhermy, Ivana, Milka, Gracyelle, Jéssica, Iasmim 1, Iasmim 2, Camila, Elyz, Diego do Peixe, Rodrigo, Janaína, Eduardo, Marcela, Nataliane, Catarine, Evelyn, Tássia e a todos os outros que me fizeram companhia e me ajudaram muito ao longo do mestrado.

Às minhas Pardalzetes estagiárias: Karine, Gabi, Louise, Helô, Laís, Darla, Rafaela e Elton, por toda a ajuda, dedicação e paciência ao meu lado.

A Fafá, Orlando, Luís e dona Ângela por sempre ajudarem em todos os momentos que foram precisos.

Aos meus amigos do mestrado: Glêzia, Guilherme, Darne, Glória, Danilo, Edkarla, Sandrine, Carla, Mariana e Rebeka por sobreviverem junto comigo no decorrer desses dois anos.

A todos os meus amigos que sempre estiveram comigo em vários momentos.

Aos professores do Departamento de Micologia da UFPE por contribuírem muito em nossa pesquisa.

Aos meus avós: Valdemar e Ana, Paulino, minha tia Neide e meus avós Tereza e José Antônio (in memória) que, desde minha infância, fizeram e ainda fazem parte de minha vida.

À professora Andréa Gomes, minha primeira orientadora e a que me colocou nesse caminho de pesquisador.

À FACEPE pelo apoio financeiro.

“Tudo o que a sua mão encontrar
para fazer, faça-o com todo o seu
coração.”

Jesus de Nazaré

RESUMO

O interesse por pesquisas relacionadas aos endofíticos e às suas propriedades biotecnológicas aumenta, à medida que surge a necessidade pela busca de novos metabólitos bioativos, produzidos por essas espécies, e que possam combater micro-organismos multirresistentes. Micro-organismos endofíticos foram isolados de folhas sadias de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) e avaliados quanto à atividade antimicrobiana, frente a micro-organismos patogênicos, através de um ensaio primário com blocos de gelose, fermentação líquida e testes realizados com seus extratos. Os extratos foram analisados através de prospecção química e bioautografia em camada delgada. Obteve-se 237 isolados fúngicos, 67 bacterianos e 13 de actinobactérias. Dos quarenta fungos e 13 actinobactérias testados, 8 (20%) e 13 (100%) apresentaram atividade inibitória, respectivamente. Foi realizada fermentação líquida com o fungo (*Mycelium stereo* F-61) e a actinobactéria (*S. kunmingensis* Act-3) os quais obtiveram melhores halos de inibição. As frações etéreas (pH 7,0 – 48 h) provenientes do *M. stereo* F-61, inibiram *S. aureus* (20 mm), *E. coli* (23 mm) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (23 mm). As frações de acetato de etila (pH 7,0 – 48 h) oriundas da *S. kunmingensis* (NBRC 14463), inibiram *S. aureus* (29 mm) e *S. aureus* (MRSA) (20 mm). Esses extratos apresentaram CMI para a *S. kunmingensis* Act-3 frente à *S. aureus* (62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *S. aureus* (MRSA) (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e para *M. stereo* F-61 contra *S. aureus* (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *S. aureus* (MRSA) (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *E. coli* (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A prospecção química dos extratos do *M. stereo* F-61 detectou açúcares redutores e compostos fenólicos no extrato metanólico, e de triterpenos, esteroides, mono/sesquiterpenos e compostos fenólicos no extrato etéreo. A bioautografia constatou que os princípios ativos produzidos pela *S. kunmingensis* Act-3 e pelo *M. stereo* F-61 não são semelhantes aos da planta. Conclui-se que os isolados produzem metabólitos secundários bioativos com ação antimicrobiana, e apresentam potencial para a descoberta de nova substância bioativa de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Actinobactérias endofíticas; Extração.

ABSTRACT

The interest in research related to endophytes and their biotechnological properties, increases as the need arises by the search for new bioactive metabolites, produced by these species that can combat multi-resistant microorganisms. Endophytic microorganisms were isolated from healthy leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Red) and they were evaluated for antimicrobial activity against pathogenic microorganisms through a primary test with blocks of agar, and liquid fermentation tests with their extracts. The extracts were analyzed by chemical prospecting and bioautography thin layer. There was obtained 237 fungal isolates, 67 bacterial and 13 actinobacteria. Were tested forty fungi and 13 actinomycetes, of which 8 (20%) and 13 (100%) had inhibitory activity, respectively. We performed liquid fermentation with the fungus (*Mycelium stereo* F-61) and the actinobacteria (*Streptomyces kunmingensis* Act-3) which has better inhibition zones. The ethereal fractions (pH 7.0) from the *M. stereo* F-61, could inhibit *S. aureus* (20 mm), *E. coli* (23 mm) and *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA) (23 mm). The fractions of ethyl acetate (pH 7.0) derived from *S. kunmingensis* Act-3 inhibited *S. aureus* (29 mm) and *S. aureus* (MRSA) (20 mm). These extracts showed MIC for *S. kunmingensis* (NBRC 14463) against *S. aureus* (62 mg mL⁻¹) and *S. aureus* (MRSA) (125 mg mL⁻¹), and the *M. stereo* F-61 against *S. aureus* (125 mg mL⁻¹) *S. aureus* (MRSA) (500 mg mL⁻¹) and *E. coli* (500 mg mL⁻¹). The prospect of chemical extracts of *M. stereo* F-61 revealed the presence of sugars and phenolic compounds in methanol extracts, and triterpenes, steroids, mono / sesquiterpenes and phenolic compounds in the ether extract. The bioautography found that the active compounds produced by *S. kunmingensis* Act-3 and the *M. stereo* F-61 is not similar to those produced by the plant. We conclude that the isolates produce bioactive secondary metabolites with antimicrobial activity, and exhibit potential for the discovery of a new bioactive substance of biotechnological interest.

Keywords: Endophytic fungi; Endophytic Actinobacteria; Extraction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Micro-organismos testes utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	43
Tabela 4.2 - Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pelo isolado fúngico F-61.....	54
Tabela 5.1 - Distribuição e frequência, por meio de cultivo, dos micro-organismos endofíticos isolados da Aroeira-Vermelha.....	59
Tabela 5.2 - Frequência dos fragmentos das folhas da Aroeira-Vermelha que apresentaram crescimento fúngico em cada meio de cultura.....	61
Tabela 5.3 - Frequência dos fragmentos das folhas da Aroeira-Vermelha que apresentaram crescimento de bactérias e actinobactérias em cada meio de cultura.....	65
Tabela 5.4 - Média, em milímetros, dos halos de inibição apresentados pelos isolados fúngicos, frente aos micro-organismos testes, no bloco de gelose.....	69
Tabela 5.5 - Média dos halos de inibição (mm) apresentados pelos isolados de actinobactérias, frente aos micro-organismos testes, nos meios ISP-2 e ISP-4, no ensaio primário.....	71
Tabela 5.6 - Média dos halos de inibição, em mm, obtidos pelo Fungo F-61 contra os micro-organismos testes, na fermentação líquida.....	74
Tabela 5.7 - Resultado das médias dos halos de inibição, em mm, obtidos pela actinobactéria Act-3 contra os micro-organismos testes, em fermentação líquida....	79
Tabela 5.8 - Identificação das Linhagens de fungos endofíticos isoladas da folha da Aroeira-Vermelha, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.....	83
Tabela 5.9 - Linhagens de actinobactérias isoladas, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.....	88

Tabela 5.10 - Resultados dos halos de inibição, em mm, dos extratos brutos do isolado *Mycelium stereo* F-61, obtidos a partir da extração com diferentes solventes e pHs, contra micro-organismos patogênicos.

.....91

Tabela 5.11 - Resultados da extração do metabólito bioativo do *S. kunmingensis* Act-3, em diferentes solventes e pHs, contra micro-organismos patogênicos.....94

Tabela 5.12 - Representação dos melhores solventes e pHs escolhidos para a extração do princípio ativo do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3.....97

Tabela 5.13 - Rendimentos dos extratos brutos concentrados do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3.....97

Tabela 5.14 - Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3 frente a micro-organismos patogênicos.....98

Tabela 5.15 - Representação dos compostos químicos presentes nos extratos: etéreo e metanólico do *Mycelium stereo* F-61.....100

Tabela 5.16 - Valores dos Rfs (cm) dos halos de inibição apresentados pelos extratos do *S. kunmingensis* Act-3 e do *Mycelium stereo* F-61 frente aos micro-organismos testes.....103

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	21
Figura 3.2 - Folhas e frutos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	22
Figura 3.3 - Flores e ramos da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).	23
Figura 3.4 - Frutos e sementes da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	24
Figura 4.1 - Folhas da <i>Schinus terebenthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha) coletadas para o isolamento dos endofíticos.....	39
Figura 4.2 - Esquema da metodologia utilizada no isolamento dos micro-organismos endofíticos.....	41
Figura 4.3 - Esquema da metodologia utilizada no ensaio secundário da atividade antimicrobiana.....	44
Figura 4.4 - Microcultivo da linhagem Act-3 no meio ISP-2.....	46
Figura 4.5 - Esquema da metodologia utilizada na obtenção da biomassa da linhagem Act.-3.....	46
Figura 4.6 - Esquema da metodologia utilizada na tentativa de extração do princípio ativo do líquido metabólico e da biomassa das linhagens: Actinobactéria Act-3 e Fungo F-61.....	51
Figura 4.7 - Esquema da divisão dos poços da placa utilizada nos testes de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).....	52
Figura 4.8 - Esquema da tentativa de extração, utilizando acetato de etila, do princípio ativo produzido pelas folhas da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	56
Figura 4.9 - Representação da bioautografia em camada delgada realizada com os extratos dos endofíticos e das folhas da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	58

Figura 5.1 - Diversidade da coloração apresentada pelos micélios aéreos dos isolados endofíticos da folha da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	63
Figura 5.2 - Representação da coloração dos micélios aéreos dos isolados de actinobactérias isoladas da folha da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha), em seus respectivos meios de cultivo.....	67
Figura 5.3 - Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio MPE.....	77
Figura 5.4 - Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio M1.....	78
Figura 5.5 - Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio CZpeck.....	78
Figura 5.6 - Variação do pH e da biomassa x tempo, da actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio MPE.....	82
Figura 5.7 - Variação do pH e da biomassa x tempo, da actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio M1.	82
Figura 5.8 - Variação do pH e da biomassa x tempo, da actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio ISP-2.....	82
Figura 5.9 - Cadeias de esporos das actinobactérias dos gêneros: <i>Streptomyces</i> sp. (cadeias de esporóforos curtos e espiralados) (A) e <i>Actinomadura</i> sp. (cadeias retas e pequenas de esporos, sedimentadas e ligeiramente curvadas) (B).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
Act.	Actinobactérias
ALA	Arginina Vitamina Ágar Modificado
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
BDA	Batata Dextrose Agar
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
F	Fungo
g	Grama
h	Horas
ISP2	International Streptomyces Project Medium 2
ISP4	International Streptomyces Project Medium 4
m	metros
M	Molar
mm	milímetros
pH	potencial hidrogeniônico
Rf	índice de retenção
RPM	rotação por minuto
SAB	Sabouraud Dextrose Ágar
UFC/ml	unidade formadora de colônia por mililitro
C-G	citosina e guanina
UTIs	unidades de terapia intensiva.
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal De Pernambuco
μL	microlitros
ml	mililitros

mm	milímetros
min	minutos
CCD	cromatografia em Camada Delgada
CZ	ágar Czapek
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Embrapa	Empresa brasileira de pesquisas agropecuárias
PBS	phosphate Buffered Saline
F	fungo
Act.	actinobactéria
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> multiresistente
CMI	concentração mínima inibitória
CMB	concentração mínima bactericida
LM	líquido metabólico
BIOM.	biomassa
LME	líquido metabólico esgotado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3.1. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha).....	21
3.2. Importância Biotecnológica dos Micro-organismos Endofíticos.....	28
3.2.1. Actinobactérias Endofíticas.....	30
3.2.2. Bactérias Endofíticas.....	33
3.2.3. Fungos Endofíticos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Coleta do Tecido Vegetal.....	39
4.2. Desinfecção.....	39
4.3 Isolamento.....	40
4.4. Ensaio Primário de Atividade Antimicrobiana	41
4.4.1. Teste em Bloco de Gelose.....	41
4.4.2. Preparação das Suspensões.....	42
4.5. Ensaio secundário da Atividade Antimicrobiana.....	43
4.6. Identificação dos Micro-organismos Testes.....	45
4.6.1. Identificação dos Fungos Endofíticos.....	45
4.6.2. Identificação das Actinobactérias.....	45
4.6.2.1 Caracterização Macroscópica e Taxonômica.....	45
4.6.2.2. Identificação Molecular.....	46

4.7 Extração do antibiótico.....	49
4.7.1 Separação da Massa Celular.....	49
4.7.2 Extração do Antibiótico – Biomassa.....	49
4.7.3 Extração do Antibiótico – Líquido Metabólico.....	50
4.8 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	51
4.9 Prospecção Química.....	53
4.10 Extração do Tecido Vegetal.....	55
4.11 Comparação dos metabólitos bioativos do extrato da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha) e dos metabólitos bioativos dos endofíticos.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Isolamento dos Micro-organismos Endofíticos.....	59
5.1.1. Fungos Isolados.....	59
5.1.2. Bactérias Isoladas.....	65
5.1.3. Actinobactérias Isoladas.....	66
5.2. Ensaio Primário da Atividade Antimicrobiana (Blocos de Gelose).....	68
5.2.1. Ensaio Primário com os Fungos Endofíticos.....	68
5.2.2. Ensaio Primário Com as Actinobactérias.....	70
5.3. Ensaio Secundário da Atividade Antimicrobiana.....	73
5.3.1. Fermentação Líquida com os Fungos Endofíticos.....	73
5.3.2 Fermentação Líquida com o Isolado de Actinobnactéria Act-3..	78
5.4. Identificação dos Micro-organismos Testes.....	78
5.4.1. Identificação dos Fungos Endofíticos.....	83
5.4.2. Identificação das actinobactérias.....	86
5.4.2.1. Caracterização Macroscópica e Taxonômica.....	86
5.3.2.2. Identificação Molecular.....	89

5.5. Extração do Princípio Ativo.....	90
5.5.1. Biomassa e Líquido Metabólico (<i>Mycelium stereo</i> F61).....	90
5.5.2. Biomassa e Líquido Metabólico (<i>S. kunmingensis</i> Act-3).....	93
5.6. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração	
 Mínima Bactericida (CMB).....	97
5.7. Prospeção Química.....	99
5.7.1. <i>Mycelium stereo</i> F-61.....	99
5.8. Comparação dos Metabólitos Bioativos do Extrato da <i>Schinus</i>	
 <i>terebinthifolius</i> Raddi (Aroeira-Vermelha) e dos Metabólitos	
 bioativos dos endofíticos.....	102
6.0. Conclusões.....	105
7.0. Referências.....	106

1. INTRODUÇÃO

As primeiras evidências de uma possível relação de simbiose entre micro-organismos endofíticos e vegetais vieram através da análise de tecidos fossilizados de caules e folhas superiores. A partir daí, hipóteses sugerem que esta relação se iniciou há centenas de milhares de anos atrás, e a vontade despertada pelos cientistas na tentativa de entendê-la cresce cada vez mais (STROBEL et al, 2000).

Os endofíticos habitam o interior dos tecidos das plantas de forma assintomática, concorrendo com patógenos, diminuindo o ataque de insetos e a herbivoria, elevando a tolerância a estresses abióticos e bióticos, protegendo a planta e beneficiando seu desenvolvimento, recebendo em correspondência proteção e nutrientes do seu hospedeiro (ESPOSITO et al, 2004; BAYAT et al, 2009). Essa relação de simbiose permite que os micro-organismos endofíticos levem às plantas algumas alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas. Deste modo, a planta pode passar a se comportar de uma forma diferente, frente a alguns estresses bióticos ou abióticos como: herbicidas, salinidade e presença de metais no solo, deficiência de água no ambiente, ataques herbívoros, entre outros. Tudo isso, induz a planta a interagir de maneira distinta em relação ao endofítico, sendo esse fato atribuído, muitas vezes, a produção de novos metabólitos por parte dos endofíticos (GUNDEL et al, 2010). Essa interação também influencia na composição da comunidade vegetal e produção de nutrientes (DAVITT et al, 2010).

Os micro-organismos endofíticos de plantas medicinais vêm sendo bastante estudados na busca de novos metabólitos bioativos que possam combater as bactérias multiresistentes (ARAÚJO et al, 2002). Concomitantes aos avanços dos estudos envolvendo os endofíticos surgem, na literatura mundial, descrições de novas espécies desses micro-organismos, que até então não eram de conhecimento científico, demonstrando com isso, a grande diversidade vegetal ainda inexplorada. Portanto, estima-se que à medida que forem realizados mais estudos envolvendo diferentes espécies vegetais, surgirão novas espécies de endofíticos com novas propriedades de interesse biotecnológico, uma vez que, países como o Brasil, apresentam grande parte de sua biodiversidade vegetal, pouco explorada (NETO et al, 2002; STROBEL, 2006). Os endofíticos possuem estruturas químicas que, em associação com esses tecidos vegetais, são modificadas e otimizadas

evolutivamente e isso implica uma grande alternativa para a descoberta de novos metabólitos secundários (BASHYAL et al, 2007).

Existem mais de 30.000 casos de doenças descritos clinicamente, dos quais, menos de um terço são curáveis. O surgimento de bactérias resistentes às drogas tradicionais, novas viroses emergentes e a grande incidência mundial de infecções fúngicas, são uns dos principais responsáveis por essa situação. Portanto, é de interesse público e científico o desenvolvimento de novas terapêuticas capazes de minimizar esses danos à população a partir do desenvolvimento de novas drogas oriundas de substâncias isoladas dos endofíticos (KUMAR et al, 2011).

Outra ocorrência bastante significativa e, também, preocupante é o desmatamento e extrativismo vegetal que acontece, quase sempre, de forma desordenada e sem planejamento. Grande parte das plantas medicinais é alvo dessa prática. Uma forma de minimizar esses danos, garantindo a preservação das espécies vegetais, é a utilização dos endofíticos presentes nessas plantas como forma de produção de biocompostos, que são os responsáveis pelas características medicinais presentes no vegetal. A partir dessas substâncias, se torna viável o desenvolvimento de fármacos sem a necessidade de praticar o desmatamento (PRINCE, 2008). Deste modo, o estudo da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) e de sua relação com os micro-organismos endofíticos merece menção, uma vez que, além de ser uma planta que apresenta diversas propriedades medicinais (AMORIM et al, 2003), também é indicada para o reflorestamento ambiental, pois se adapta facilmente a diferentes regiões e solos (LORENZI, 1992).

Portanto, é necessário contínuo desenvolvimento de pesquisas direcionadas para o isolamento e a caracterização biotecnológica de endofíticos, podendo, assim, combater o crescimento de micro-organismos patogênicos resistentes a antifúngicos e antibacterianos (STROBEL et al, 2004), e auxiliar na descoberta de drogas para uso terapêutico humano (GUO et al, 2008; YAN et al, 2011).

Desta forma, este projeto tem como objetivo o isolamento de endofíticos, da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha), com capacidade de inibir o crescimento de bactérias multirresistente patogênicas, assim como identificar os metabólitos bioativos produzidos pelos endofíticos, na tentativa de descoberta de alguma nova substância bioativa.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL:

- Isolar micro-organismos endofíticos de diferentes tecidos vegetais de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha), avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados e realizar prospecção química dos seus extratos.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Isolar micro-organismos endofíticos das folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha).
- Realizar testes de atividade antimicrobiana contra diferentes micro-organismos testes.
- Identificar por biologia molecular os endofíticos que apresentarem os melhores resultados nos testes realizados.
- Avaliar as concentrações: mínima inibitória e mínima bactericida dos extratos dos endofíticos frente a micro-organismos patogênicos.
- Através da prospecção química, determinar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos dos endofíticos.
- Analisar, por bioautografia em camada delgada, os metabólitos bioativos dos endofíticos comparando com os do extrato da planta.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha)

A *Schinus terebinthifolius* Raddi, também conhecida, botanicamente, como: *Schinus lentiscifolia.*, *Sarcotheca bahiensis* Turcz., *Schinus antiarthritica* Mart., *Schinus mucromulata* Mart., *Schinus rhoifolus* Mart., *Schinus aroeira* Vell, e *Schinus chichita* Speg. (LORENZI, 2002), é uma árvore da família Anarcadiaceae, planta típica da vegetação litorânea brasileira, ocorre desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Também é bastante encontrada em terrenos alterados sob influência humana (LENZI et al; ORTH, 2005). Foi introduzida em vários países da América do Sul, regiões da América Central, Bermudas, Bahamas, Antilhas, Regiões dos Estados Unidos da América, Europa Mediterrânea, Norte da África, África do Sul e países asiáticos (WILLIAMS et al, 2005). Popularmente conhecida como Aroeira-Vermelha (RIBAS et al, 2006). Possui fácil adaptação em uma diversidade de ambientes e apresenta uma variação em seu tamanho de 2 a 15 m de altura (LENZI et al, 2004). Pode ser encontrada em áreas de restingas, tendo sua importância, uma vez que atua como cobertura vegetal. Na restinga pode ocorrer em diversas formações vegetacionais, entre elas: formação de clusia, mata de restinga e formação praieira com moitas (ASSUMPÇÃO & NASCIMENTO, 2000).



FIGURA 3.1. - *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha). Fonte: <http://www.sementespodseeds.com.br/Impr/lmg/aroeira01.jpg> acesso em: 20/08/2012 às 20:00.

Seus frutos pequenos e de coloração vermelha, são ovais e semelhantes a pequenas pimentas (LENZI et al, 2005), quando maduros adquirem um aspecto vermelho brilhante, chegando a 5 mm e apresentando apenas uma semente em seu interior (JESUS et al, 2007).



FIGURA 3.2 – Folhas e frutos da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha). Fonte: [http://2.bp.blogspot.com/_MlgQxGwSQs/Sw03EvPEqrl/AAAAAAAAAC8A/qPmMVGHibYQ/s1600/Aroeira+vermelha+\(3\).JPG](http://2.bp.blogspot.com/_MlgQxGwSQs/Sw03EvPEqrl/AAAAAAAAAC8A/qPmMVGHibYQ/s1600/Aroeira+vermelha+(3).JPG) acesso em: 20/08/2012 às 20:00.

Os seus ramos secundários são compostos por folhas imparipinadas, com um aroma característico, que possuem de 3 a 10 pares de folíolos glabros (LENZI; ORTH, 2004).

Cesário e Gaglianone (2008) classificaram taxonomicamente as flores da *Schinus terebinthifolius* Raddi como, pentâmera, actinomorfas, pequenas, diapétalas e dialissépalas, dispostas em inflorescências compostas do tipo panícula racemosas. Também observaram a presença de sépalas pequenas apresentando um formato triangular, e uma coloração verde, diferente das pétalas que são pequenas, brancas e ovais. Suas anteras são basifixas e possuem uma deiscência longitudinal, possuem dez estames heterodínamos, distribuídos em duas fileiras concêntricas. A teca é revestida por um tecido branco, e seu pólen é amarelo. As flores femininas apresentam um ovário súpero e uniclar e um estigma trilobado. Em estudos realizados foi observado que as características das flores da *Schinus*

terebinthifolius Raddi podem variar de acordo com a época do ano, apresentando períodos diferentes de floração, principalmente durante períodos quentes e chuvosos, onde a temperatura e a precipitação atingem seus maiores valores, a partir daí foram observadas plantas com flores estaminadas e gineceu bastante reduzido, assim como, plantas apresentando flores pistiladas e estames reduzidos.

De acordo com Talora e Morelatto (2000), o período inicial em que ocorre a floração da *Schinus terebinthifolius* Raddi, está interligado ao aumento da temperatura e a duração do período diurno, ao contrário à frutificação que não apresenta correlação com estes fatores.

Lenzi e Orth (2004) observaram que a *Schinus terebinthifolius* Raddi, no período de Setembro a Janeiro, apresentou inflorescências paniculadas terminais, apresentando flores pequenas e esbranquiçadas. Também caracterizou as flores como diclinas, ou seja, apresentam apenas o androceu ou o gineceu, são totais dependentes dos insetos para o transporte de seu pólen, e o dimorfismo sexual da planta é determinado pelo comprimento e a largura da inflorescência.



FIGURA 3.3 – Flores e ramos da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha). Fonte: <http://timblindim.wordpress.com/arvores/aroeira-vermelha/> acesso em: 15/01/2013 às 13:41.

Em concordância com as análises morfológicas e anatômicas realizadas por Guerreiro e Paoli (1999), a semente da *Schinus terebinthifolius* Raddi, que possui um formato irregular, é única por fruto, reniforme e é revestida por uma membrana

lisa de coloração amarela com uma mancha marrom-escura. Inicialmente apresenta um formato globoso, e o desenvolvimento da semente caracteriza uma mudança da forma globosa com presença de uma protuberância nas proximidades da micrópila para um formato reniforme, apresentando a protuberância inicial unida ao envoltório. Não possui uma micrópila visível, e ausência de endosperma, seu embrião, que é axial dobrado ou pleurorrizo e aclorofilado, possui dois cotilédones planos, carnosos, com um eixo hipocótilo-radícula longo, sua plúmula é pouco desenvolvida, e sua reserva é constituída, na maioria das vezes, por lipídeos e proteínas.



FIGURA 3.4 – Frutos e sementes da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha). Fonte: <http://timblindim.wordpress.com/arvores/aroeira-vermelha/> acesso em: 15/01/2013 às 19:08.

Seu caule pode ser utilizado para construção, fabricação de carvão e como lenha (LORENZI, 1998). O óleo essencial presente nos frutos e folhas, por apresentar um sabor picante e um valor econômico baixo, é muito utilizado na indústria culinária como, temperos, vinagre e pimenta. Também são utilizados em xaropes, bebidas e na fabricação de perfumes (KHALED et al, 2009).

O uso de antibióticos como promotores do crescimento de espécies vegetais é uma atividade que se faz muito presente na agricultura, contudo, com a proibição desta prática, é de fundamental importância à utilização de artifícios alternativos para suprir essa necessidade, de forma menos prejudicial ao homem e ao meio ambiente, e livre dos riscos de surgimento de uma resistência bacteriana (CORNELI,

2004), portanto, uma classe que pode vir a satisfazer essas necessidades substituindo os agentes antimicrobianos, são os aditivos fitogênicos, extratos vegetais ou extratos herbais (MENTEN, 2002).

Silva e colaboradores (2011) adicionaram o óleo da Aroeira-Vermelha à ração de frangos de corte e observaram que foi proporcionado o mesmo ganho de peso na aves tratadas com essa ração, quanto as alimentadas a base de promotores de crescimento. Esse óleo também estimula uma melhoria na superfície intestinal de absorção, além de proporcionar diminuições nos pesos relativos dos intestinos delgados e grosso das aves.

A *Schinus terebenthifolius* Raddi é uma planta medicinal bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades como atividades antiinflamatórias, cicatrizantes, antitérmica, adstringente e antimicrobiana, além de sua utilização no combate de doença das vias urinárias, bronquite, gripes e resfriados (LIMA, 2006). Também é analgésica e antipruriginosa, é utilizada no combate ao reumatismo, problemas menstruais, gripes, inflamações em geral, úlceras, blenorragia, diarreia, bronquite, cistites, doenças venéreas e uretrites (MARTINES et al, 1996). Externamente se faz o uso de toda a planta como anti-séptico em fraturas e feridas expostas. Relatos conferem à planta uma ação adstringente, e ao seu fruto uma ação antioxidante e antimicrobiana (SANTOS et al, 2007). A utilização do seu óleo essencial não é tóxica para animais ou seres-humanos (BARBOSA et al, 2007), além de ser comprovado possuir um potencial poder inseticida ao combater *Acanthoscelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus* Bohemian, em superfícies contaminadas (SANTOS et al, 2007). A casca de seu caule, e suas folhas são utilizadas em diversos países no tratamento de inflamações uterinas, doenças venéreas, distúrbios do trato urinário, diarreia, feridas e úlcera péptica (MARTINEZ, 1996).

O líquido obtido a partir da maceração de suas raízes tem utilidade no tratamento de tumores ganglionares (BARBOSA et al, 2007). Homeopaticamente, a planta é empregada no tratamento de distúrbios da pele, problemas sexuais, intumescimento linfático e debilidade (STASI; LIMA, 2002). Suas folhas secas esmagadas são utilizadas como compressas anti-sépticas sobre úlceras cutâneas. A infusão das folhas é empregada para tratar bronquite e doenças respiratórias (CARVALHO, 2003).

Entre essas e outras características apresentadas, algumas são comprovada cientificamente, como: o poder antioxidante que possuem os extratos alcoólicos e aquosos de seus frutos (SANTOS, 2007), atividade antiproliferativa e antitumoral que possui os extratos de suas folhas, através da indução da apoptose das células cancerígenas (QUEIRES et al, 2006). O extrato de seus frutos potencia o processo de cicatrização epitelial a partir de uma maior proliferação vascular e fibroblástica antiinflamatória, que foi comprovado através da observação da diminuição de processos inflamatórios crônicos (RIBAS et al, 2006).

Extratos etanólicos das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi, constituídos pelo grupo carboxílico livre, apresentam potencial inibidor de diferentes linhagens de células tumorais humanas *in vitro* (SANTANA et al, 2012). Guerra e colaboradores (2000), ao testarem a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi, obtiveram inibição dos micro-organismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e da levedura *Candida albicans*.

Lucena e colaboradores (2006) constataram que o uso do extrato hidroalcoólico de Aroeira-Vermelha apresenta efeito cicatrizante positivo nas cistomias em ratos. Freires e colaboradores (2011) utilizaram a tintura da Aroeira-Vermelha e observaram atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, obtendo halos de inibição semelhantes aos apresentados pelo antifúngico nistatina.

Lima e colaboradores (2004), trabalhando com o extrato aquoso, obtiveram atividades antimicrobianas frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans*. Guerra e colaboradores (2000) testaram o extrato líquido etanólico das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi e obtiveram halos de inibição frente à *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Siddiqui e colaboradores (1995) observaram que os óleos essenciais produzidos por esta planta possuem intensa atividade antibacteriana contra: *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*. Estudos científicos realizados por Santos e colaboradores (2006) determinaram a casca do caule da *Schinus terebinthifolius* Raddi com detentora de taninos, que lhe atribuem uma ação adstringente, desinfetante e antiinflamatória. Estes também realizaram estudos pré-clínicos que comprovaram a eficiência das substâncias produzidas por

esta planta, que atuam como protetor gástrico, a partir da elevação do pH do suco gástrico tornando-o levemente ácido. Lima e colaboradores (2006), também comprovaram, em estudos clínicos, que a utilização de tampões intravaginais em contato com a cérvix no período de 24 horas, possui ações terapêuticas em doenças vaginais como, cervicites e cérvico-vaginites crônicas.

Paulo e colaboradores (2009) testaram substâncias fitoterápicas compostas pela *Schinus terebinthifolius* Raddi e observaram que estas foram bem toleradas pelo organismo humano, não ocasionando alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significativas nos pacientes, o que sugerem uma baixa toxicidade dessas substâncias, além de indicar que a população pode fazer uso dessa composição fitoterápica.

Algumas das Propriedades apresentadas pela *Schinus terebinthifolius* Raddi podem estar relacionadas ao fato de esta espécie produzir substâncias fitoquímicas com propriedades fungitóxicas frente a micro-organismos patogênicos (JOHANN et al, 2010) além de substâncias químicas isoladas do extrato polar de suas folhas, tais quais: ácidos graxos e terpenóides (MONEAM et al, 1986), derivados de compostos fenólicos como, galatos de metila e etila, ácido gálico e galatos, e flavanóides como, afzelina, quercitina (SANTANA et al, 2012), emiricetrina.

As cascas do tronco da Aroeira-Vermelha, após análise química, mostraram presença de antraquinonas, esteróides livres e xantonas (LIMA et al, 2006). O óleo essencial de seus frutos apresenta variadas substâncias potencialmente úteis, tais como: canfeno, limoneno, terpineno, terpenol-4, cadineno, terpinoleno, germacreno-D, *p*-cimeno, silvestreno e *E*-cariofileno (AFFONSO et al, 2012). Estudos fitoquímicos realizados comprovaram a existência de alcoóis triterpênicos, cetonas, monoterpenos, sesquiterpenos e ácidos como constituintes das folhas, frutos e caules da Aroeira-Vermelha (LIOYD, 1977).

Matsuo (2011) isolou da *Schinus terebinthifolius* Raddi o composto α -Pineno, o qual tem um papel fundamental na indução do apoptose em células cancerígenas malignas, além de conferir proteção antimestática em modelos de melanoma maligno. Esse tumor é um dos mais agressivos de câncer, uma vez que este apresenta forte resistência às drogas convencionais, entretanto, o α -Pineno promove uma ruptura precoce do potencial mitocondrial, aumento da atividade da caspase-3, fragmentação do ADN, exposição de fosfatidilserina à superfície da célula,

agregação da heterocromatina e a produção de espécies reativas de oxigênio, o que resultou no apoptose da célula cancerígena.

El-massry e colaboradores (2009) realizaram a análise cromatográfica do óleo essencial de *Schinus terebenthifolius* Raddi extraídos com diclorometano e etanol e observaram a presença de monoterpenos (4,97%), sesquiterpenos (56,96%), monoterpenos oxigenados (34,37%) e sesquiterpenos oxigenados (3,32%). Esses compostos foram identificados, obtendo-se como os mais importantes: cis- β -terpineol, (E)-cariofileno, β -cedreno e citronelal.

Já foram relatados compostos fenólicos presentes em maiores quantidades no extrato etanólico da Aroeira-Vermelha, sendo esses: ácido cafeico, ácido cumárico e ácido sirínico. Tais constituintes são uns dos responsáveis pelas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, apresentadas por esta planta. A presença de um anel aromático possuindo uma ou mais hidroxilas (-OH) caracteriza o composto fenólico. Esses compostos podem ser divididos em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), fenóis simples, cumarinas, taninos, tocoferóis, ligninas ácidos fenólicos (ácido benzoico, cinâmico e seus derivados). Os flavonoides e taninos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (MOTA et al, 2009). O ácido elágico, um polifenol, foi isolado da Aroeira-Vermelha e teve confirmada a sua atividade antimicrobiana quando testada frente à *Helicobacter pylori* (MARTINI et al, 2009). Alguns autores atribuem essas propriedades antibacteriana e antifúngica à presença de compostos químicos como, alcaloides, esteróides, chalcones, urundeuvinas e, principalmente, de taninos. Entretanto, esses autores não obtiveram atividades dos extratos, contendo esses constituintes, quando testados contra *Escherichia coli* (LIMA et al, 2006).

3.2 Importância biotecnológica dos Micro-organismos endofíticos

Produtos de origem natural são fontes promissoras para a descoberta de novos metabólitos bioativos que, em geral, são produzidos por plantas, micro-organismos e animais. Esses metabólitos produzidos podem ser de origem primária: originados como produtos, a partir dos processos de catabolismo e anabolismo, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento celular, ou de origem secundária, que são moléculas de adaptação que passaram por um processo evolutivo a partir dos metabólitos primários, e possuem fins diferenciados em relação

aos compostos de origem primária (NEWMAN, 2008), sendo estes últimos, os principais responsáveis pelo aumento de pesquisas científicas que envolvem a interação simbiótica entre plantas e micro-organismos endofíticos (WALSH, 2010).

Os metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos endofíticos são promissores para a descoberta de novas atividades biológicas de interesse, uma vez que possuem diversas propriedades de interesse científico (PIMENTEL et al, 2010).

A busca por drogas mais potentes, de fácil produção e mais rentáveis movimenta o mercado farmacêutico mundial. A primeira droga anticancerígena, que já rendeu milhões de dólares para essas empresas, possui como principal componente o Taxol, um composto natural diterpenóide obtido a partir do extrato de uma planta conhecida como *Taxus brevifolia* (teixo), sendo assim, vem aumentando o interesse pela utilização de endofíticos que substituam compostos sintéticos e produzam, em grande quantidade, os mesmos produtos naturais antes isolados diretamente da planta (JALGAONWALA et al, 2011), logo, o cultivo de micro-organismos endofíticos em laboratórios, e em condições adequadas, a fim de induzir a produção de um metabólito secundário que satisfaça as necessidades desejadas, é um caminho que vem sendo seguido pelos cientistas e apresenta novas perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes (PELA' EZ, 2004).

Os micro-organismos endofíticos também são usualmente utilizados como antagonistas microbianos, ou seja, é investigada a sua ação antifúngica e quando confirmada tal característica, esses micro-organismos passam a ser empregados como agentes de controle biológico de doenças de plantas. Essas espécies inibem micro-organismos patogênicos presentes no solo e no ar, protegendo, desta forma, a planta (SOUSA et al, 2008).

Trabalhos mostram vias de penetração do micro-organismo endofítico na planta hospedeira, demonstrando que a principal porta de entrada para esses endofíticos são as raízes, uma vez que está em contato direto com o solo, que é um ambiente extremamente propício para a manifestação de populações antimicrobianas. A partir daí, se disseminam para os outros tecidos vegetais. Outra região da planta apontada como porta de entrada para os endofíticos são os

estômatos (AZEVEDO et al, 1998). Deste modo, os micro-organismos endofíticos podem ser isolados de diversas partes dos tecidos vegetais como: folhas, nódulos, raízes, caules e frutos; E de variedades de plantas, abrangendo plantas de interesse agrícola: *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) (MAGNANI et al, 2005); *Coffea arabica* L (café) (VEGA, 2005); *Azospirillum brasilense* (arroz) (JIMÉNEZ et al, 2001); *Glycine* sp. (soja) (HUNG, 2004); *Ipomoea batatas* (batata doce) (KHAN, 2009); *Beta vulgaris esculenta* (beterraba sacarina) (JACOBS, 1985).

3.2.1 Actinobactérias Endofíticas

As actinobactérias endofíticas são micro-organismos que podem ser encontrados em tecidos vegetais. Este grupo de micro-organismos pertence a um filo intermediário entre as bactérias e os fungos, e apresentam características similares a ambos (DAS et al, 2008), como também características próprias e que as diferenciam das bactérias e fungos (KUMAR et al, 2005). São aeróbios obrigatórios e produzem metabólitos denominados de geosmina, os quais são responsáveis pelo odor característico de terra molhada (MADIGAN et al, 2010). Pertencem ao grupo de micro-organismos Gram positivos (VENTURA et al, 2007) e apresentam em seu DNA uma grande quantidade de pares de base C-G (Citosina + Guanina) (STECKEBRANDT et al, 1997). Em sua estrutura pode ser observada duas formas diferentes de micélio: micélio do substrato e micélio aéreo (SIVA, 2001). Normalmente possuem filamentos com diâmetros variando entre 0,5 – 1,2 μm , suas hifas possuem comprimento indefinido, são menores e mais estreitas que as hifas fúngicas, e geralmente não possuem septos. É nas extremidades das hifas em que ocorre o seu crescimento, onde é possível observar ramificações (KONEMAN et al, 2008).

Apesar das semelhanças entre as actinobactérias e os fungos, existem diferenças cruciais que permitem distinguir esses micro-organismos. A principal diferença está relacionada quanto à organização celular, uma vez que os fungos são organismos eucariotos e as actinobactérias procariotas (KONEMAN et al, 2010). Alguns autores definiram os principais gêneros de actinobactérias e os principais constituintes detectados em suas paredes celulares: *Streptomyces* (L-DAP, glicina),

Micromonospora (Meso-DAP, glicina; hidróxi-DAP pode estar presente), *Actinomadura* (Meso-DAP), *Nocardia*, *Mycobacterium* e *Corynebacterium* (*tipodiphtheriae*) (Meso-DAP, arabinose e galactose), *Actinomyces* (lisina e ornitina), *Rothia* (lisina e ácido aspártico), *Oerskovia* (lisina, galactose e ácido aspártico), *Agromyces* (DAB (2,4-ácido diaminobutírico) e glicina) e *Mycoplana* (Meso-DAP(2-6-ácido diaminopimélico) e numerosos aminoácidos). Em todos os gêneros foi observado a presença de alanina, ácido glutâmico, ácido murâmico e glucosamina (GOODFELLOW et al, 1976). (HECHT & CAUSEY, 1976) caracterizaram a parede celular de actinobactérias dos gêneros: *Oerskovia* (Lisina, ácido aspártico, galactose), *Rhodococcus* (arabinose e galactose), *Nocardiopsis* e *Thermoactinomyces*, *Geodermatophilus* (galactose), *Dermatophilus* e *Microbiospora* (Meso-DAP (ácido diaminopimélico)), *Nocardiopsis* (L-DAP e glicina). Estes autores também evidenciaram a presença de ácido aspártico na parede celular de actinobactérias do gênero *Actinomyces*.

Uma característica bastante comum entre as actinobactérias é a sua capacidade de produzir metabólitos secundários com estruturas e propriedades incomuns e que possuem alta capacidade de inibição contra micro-organismos patogênicos, servindo como fonte para a produção de novos antibióticos e agentes anticancerígenos (DAVITT et al, 2010). Outros compostos produzidos pelas actinobactérias, e que possuem aplicações farmacológicas e industriais, são as enzimas, agentes imunomoduladores e inibidores enzimáticos (NEVES, 2008). Estudos também comprovaram a eficácia dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos patogênicos (SOUZA et al, 2000).

As actinobactérias, especialmente o gênero *Streptomyces*, têm maior ocorrência no solo, porém diversas pesquisas têm indicado seu predomínio como endofítico de vegetais superiores, destacando sua importância como fonte na busca de novas biomoléculas (CASTILLO et al, 2006). Já foram isolados de micro-organismos, incluindo os endofíticos, mais de 20.000 compostos biologicamente ativos, sendo os actinomicetos, responsáveis pela produção de 45% do total, restando 38% produzidos por fungos e apenas 17% por bactérias unicelulares (BERDY, 2005). Isso reflete nos resultados que apontam as actinobactérias como sendo o grupo de micro-organismos mais responsável pela produção de antibióticos

comercializados (PELA´EZ, 2004), entre eles: *Penicillium* spp., e *Aspergillus* spp., responsáveis pela produção do metabólito Penicilina, que originou os Antibióticos: Penicilina G, V, ampicilina, meticilina, amoxicilina e carbenicilina. Outras actinobactérias de destaque são: *Acremonium* spp. e *Emmericellopsis* spp., que originaram os antibióticos: Mefoxin (Cefoxitin), Ceclor (Cefaclor), a *Amycolatopsis lactamdurans*, responsável pela produção de Claforan (Cefotaxima) e Rocephin (Ceftriaxone), onde ambas as espécies apresentam a produção do mesmo metabólito: cefalosporinas. As actinobactérias do gênero *Streptomyces* também apresentam suas contribuições para a farmacologia, a partir da produção dos antibióticos: Ceftin (Cefuroxima), Primaxin (Imipenem), Invanz (Ertapenem), Vancocin, Monuril, Synercid (Dalfopristin/quinupristin) e Cubicin. Entre essas actinobactérias, os metabólitos secundários mais comumente isolados são: a tienamicina, vancomicina, fosfomicina estreptograminas (PELA´EZ, 2004).

SAJID e colaboradores (2011) isolaram de actinobactérias do gênero *Streptomyces* o ácido fenilacético e o indolil-3-ácido láctico, onde, extratos de ambos os compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra: *Candida albicans* e *Mucor miehei*. O ácido fenil acético geralmente pode ser produzido por fungos isolados de plantas superiores, por exemplo, *Aspergillus Niger* (NAIR et al, 1988) e por bactérias. Esse metabólito, quando adicionado à cultura de *Penicillium* sp., pode elevar a produção de penicilina G (parasticin) (KATO et al, 1953). Já o indolil-3-ácido láctico é comumente produzido por bactérias, fungos e levedura (LAATSCH et al, 2007).

Pereira (2011), trabalhando com actinobactérias isoladas do solo, observou elevada atividade antimicrobiana de 28 (93,3%) isolados actinobacterianos frente a linhagens de *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri* e *Candida albicans*, concluindo que essas actinobactérias possuem capacidade de produzir compostos antimicrobianos, principalmente antibióticos resistentes às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. As actinobactérias testadas pertenciam aos gêneros *Streptomyces*, *Actinomadura* e *Micromonospora*, os quais apresentaram taxa de inibição em torno de 53%, 13% e 10%, respectivamente.

Lee e colaboradores (2011) também obtiveram resultados positivos em relação à atividade antimicrobiana apresentada por actinobactérias isoladas do solo, uma vez que testaram 1.500 estirpes de *actinomicetos* do gênero *Streptomyces* e observaram que dos nove micro-organismos patogênicos que foram submetidos ao teste antimicrobiano, seis (66,66%) foram inibidos, sendo eles: *Alternaria logipes*, *Cercospora canescece*, *Colletotrichum gloeosporiodes*, *Diaporthe citri*, *Magnaporthe grisea* e *Sclerotinia soleroform*.

Estudos realizados com diversas actinobactérias mostram a dificuldade na obtenção de compostos que possam se tornar um antibiótico expressivo no combate a micro-organismos multiresistentes. Entretanto, evidências comprovam que apenas uma pequena parte das espécies de actinobactérias endofíticas existentes na natureza foi cultivada em laboratório. Logo, estima-se que o número de antibióticos produzidos por actinobactérias e que ainda não foram descobertos supera em números de 10^5 vezes mais os que já foram descobertos (WATVE et al, 2001), como também surgem novas actinobactérias aumentando, assim, o interesse dos cientistas em aprofundar seus conhecimentos a respeito desses micro-organismos (ZHANG et al, 2005). Além do mais, esse interesse despertado aumenta sucessivamente as descobertas, em anos recentes, de isolados de uma grande quantidade de tipos de plantas, incluindo: cereais, trigos, batatas, arroz, tomates, cenouras e citrinos (SESSITSCH et al, 2004) além de plantas de interesse medicinal (ZIN et al, 2007).

2.2 Bactérias Endofíticas

As bactérias são organismos unicelulares que se mostram presentes em todos os ambientes terrestres, interagindo nestes a partir de sua intensa atividade metabólica, a qual afeta as propriedades químicas e físicas do meio em que se encontram presentes (NEWMAN et al, 2002). Desta mesma forma, acontece na relação simbiótica existente entre as bactérias endofíticas e os tecidos vegetais dos hospedeiros, num processo de interação existente e demonstrado por estudos, como também comprovam o auxílio da bactéria no crescimento do tecido vegetal da planta hospedeira através da produção de fitohormônios como as citocinas, auxinas, etileno, gliberilinas e ácido abscísico (LEE et al, 2004; KUKLINSKY, 2004), e ainda o

estímulo na redução de doenças causadas por patógenos vegetais (HALLMANN et al., 1997), a exemplo das causadas pelas bactérias patogênicas, *Ralstonia solanacearum* e *Solanum lycopersicum*, que se manifestam no Eucalipto e no Tomateiro, respectivamente (BARRETI, 2001).

Outras características oriundas da associação entre bactérias endofíticas e plantas hospedeiras, e que podem ser citadas, são a produção de sideróforos (WENBO et al, 2001), fixação biológica de nitrogênio (VERMA et al, 2001) e indução de resistência sistêmica (HALLMANN, 1997). A forma de penetração desses micro-organismos na planta hospedeira acontece através dos estomas, feridas, raízes ou a partir da liberação de enzimas hidrolíticas que degradam a parede celular (SOUZA et al, 2004). Também pode ser observada a proliferação dessas bactérias em sementes, fitoplano e na rizosfera (KUSKE et al, 1997).

As bactérias são os micro-organismos que mais se destacam entre os endofíticos em relação ao seu número, visto que são os que se apresentam em maior quantidade e conseguem colonizar as regiões mais internas dos tecidos vegetais, ao contrário dos outros endofíticos que habitam, na maioria das vezes, os tecidos externos. As bactérias possuem essa vantagem devido ao fato de elas apresentarem uma regularidade maior em relação a mudanças de temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta (LODEWYCKX et al, 2002).

São diversos os gêneros e espécies de bactérias endofíticas isoladas de plantas, e estas são citadas em inúmeros trabalhos científicos, como por exemplo, o realizado por Coêlho e colaboradores (2011) que isolaram bactérias endofíticas de plantas nativas da Floresta Amazônica: *Carapa guianenses* Aublet (andiroba), *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn (sumaúma, conhecida localmente como sumaúma) e *Swietenia macrophylla* king (mogno de folha larga), sendo estes micro-organismos identificados geneticamente em nível de espécie, obtendo-se: *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. polyfermenticus*, *B. anthracis*, *B. velezensis* e *Pantoea dispersa*. Vale salientar que estas espécies de plantas possuem grande importância nas indústrias madeireiras e entre os fabricantes de produtos de aromaterapia.

Carrim e colaboradores (2006), em pesquisas com a folha e o caule da *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo), isolaram 18 bactérias endofíticas pertencentes a dez espécies diferentes, com predomínio de bactérias

dos gêneros: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, além de actinobactérias do gênero *Actinomyces*. Neste mesmo trabalho os micro-organismos foram testados quanto à atividade enzimática e foi observado, entre eles, um percentual de 60% com atividade amilolítica positiva, 40% com atividades esterásica e lipase positivas, 30% e 60% conseguiram hidrolizar a caseína e a gelatina, respectivamente. Não foram observadas, em nenhuma das estirpes testadas, atividades positivas para pectinase e celulase.

As bactérias endofíticas desenvolvem um importante papel na busca por substâncias fundamentais para a ciência. Essa associação resulta na produção de vários compostos assim como o taxol, isolados da bactéria *Taxomyces andreanae*, antimicrobianos a exemplo da Ecomicina B e C resultantes da associação da *Pseudomonas viridiflava* com gramíneas, ácidos antivirais produzidos por *Cyntonaema sp.*, antifúngicos isolados de *Serratia marcescens* e *Paenibaillus polmyxa* associados, respectivamente, com a planta aquática *Rhyncholacis penicillata* e com o trigo (RUBY et al, 2011).

A inoculação de bactérias endofíticas em plantas de interesse na agricultura pode contribuir no desenvolvimento das plantas através de uma ação daquelas, como fator de crescimento. Barreti e colaboradores, (2008) comprovaram este fato ao inocular em plantas de tomateiro bactérias endofíticas pertencentes às espécies: *Brevundimonas sp.* e *Micrococcus sp.*, e observaram diferenças significativas entre as plantas inoculadas com os isolados endofíticos e as plantas controles. As diferenças notadas entre essas plantas estão relacionadas à matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência de utilização (EU), absorção (EA) e translocação (ET) de macro e micronutrientes. A comparação desses parâmetros permitiu observar que os endofíticos proporcionaram um maior aumento no peso da matéria seca da parte aérea da planta, aumento da EU de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe e Zn, aumento da eficiência nutricional do tomateiro, melhoria da eficiência de utilização de nutrientes e maior eficiência na absorção de Fósforo.

3.2.3 Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos, por sua vez, também já foram citados como produtores de variadas substâncias bioativas que apresentaram atividade antimicrobiana contra inúmeras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de atividade contra fungo de interesse análogo, que é o caso da *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Também foram descobertas substâncias como a criptocina, que apresenta atividade antifúngica (LI et al, 2003).

Pesquisas realizadas por Schulz e colaboradores (2002) demonstraram uma maior atividade antimicrobiana de fungos endofíticos do que os isolados do solo, já que os primeiros conseguiram inibir pelo menos um dos micro-organismos patogênicos testados. Eles também observaram que fungos endofíticos produzem diferentes metabólitos bioativos a partir de variadas vias biossintéticas (isoprenóides, policetídeo, derivados de aminoácidos), sendo esses compostos pertencentes a diversos grupos estruturais: terpenóides, esteróides, xantonas, chinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citochalasininas e eniatinas. Também foi investigado o papel do endofítico e seus metabólitos bioativos em relação à sua associação com a planta hospedeira e chegou-se a conclusão de que os fungos endofíticos possuem exoenzimas essenciais que auxiliam na colonização. As concentrações de alguns metabólitos de defesa produzidos pela planta são maiores quando a planta hospeda um endofítico do que quando está infectada com um patógeno, ou seja, ocorre um equilíbrio entre a virulência do fungo e de defesa da planta. Porém, quando há o desequilíbrio em alguma dessas situações a doença se desenvolve na planta.

Já foi observada a produção de inúmeros metabólitos bioativos a partir de fungos endofíticos, como por exemplo, uma nova produção de Taxol, oriunda do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado do *Taxo brevifolia* (HUANG et al, 2008). Outros compostos, apresentando atividade citotóxica, produzidos por fungos endofíticos, também podem ser citados: Nafitoquinona isolada do fungo endofítico *Edenia gomezpompae*, seis novos ácidos derivados da tetramicina (RUBALCAVA et al, 2008), fenóis, citrina e diidroscitrina, isolados do fungo *Penicillium* sp. associado com a planta *Aegiceras corniculatum* (LIN et al, 2008).

Long e colaboradores (2011), testaram a atividade antimicrobiana e antitumoral de fungos endofíticos isolados da planta medicinal chinesa *Aquilaria sinensis* obtendo a inibição de linhagens de células cancerígenas SKVO3, por *Phaeoacremonium rubrigenum*, e 293-T por *Xylaria mali* e *Lasiodiplodia theobromae*, enquanto *Chaetomium globosum* e *Fusarium equiseti* inibiram o crescimento do fungo patogênico *Aspergillus fumigatus* e da bactéria *Bacillus subtilis*, respectivamente.

Huang e colaboradores (2006) testaram fungos endofíticos isolados das plantas *Axus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandise* obtendo resultados que demonstraram que os fungos endofíticos podem atuar como fontes seguras para a produção de anticancerígenos naturais, haja vista que de todas as linhagens endofíticas testadas, 13,4% exibiram atividade citotóxica em células cancerígenas HL-60, 6,4% contra células KB e 5,2% em ambas as linhagens de células. Este mesmo autor identificou os fungos testados como pertencentes, principalmente, aos gêneros: *Paecilomyces* sp., *Cephalosporium* sp. e *Tubercularia* sp., o que representa a grande variedade de fungos endofíticos que podem desempenhar esse papel. Essa diversidade é essencial pois a partir desses micro-organismos pode-se rastrear novos agentes anticancerígenos que apresentem atividade.

O potencial antimicrobiano de fungos endofíticos também foi avaliado por Tayung e colaboradores (2012) ao testarem linhagens isoladas dos tecidos de *Ipomoea carnea* e obterem atividade inibitória frente a micro-organismos patogênicos, sendo a *E. coli* o mais sensível. Do total de espécies isoladas foram obtidas: *Curvularia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Colletotrichum* e micélio estéril. Os metabólitos produzidos por *Curvularia* apresentaram atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton* sp.

Além da importante utilização dos fungos endofíticos em indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos, estes também desenvolvem importante papel em outros setores industriais, como é o caso dos fungos do gênero *Penicillium*, que é mundialmente conhecido devido a sua produção de metabólitos secundários e de enzimas extracelulares de interesse, por exemplo, as pectinases, que têm um papel crucial nas indústrias de sumos de frutas, atuando nas fases de maceração da polpa, suco de liquefação ou despectinização (GRASSIN et al, 1996).

Muitas dessas enzimas são obtidas com um custo muito elevado. Dessa forma, várias indústrias, visando minimizar os gastos, utilizam resíduos agroindustriais como substratos que favorecem a produção dessas enzimas por fungos endofíticos, como, por exemplo, na obtenção de celulase (FARINAS et al, 2008). A enzima glucosidase, produzida pelo fungo endofítico *Periconia* sp., é outra enzima bastante apreciada industrialmente pela sua termoestabilidade e por ser resistente a variações de pH (HARNPICHARNCHAI et al, 2009). Na agricultura, alguns desses fungos têm a função de agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN & SIKORA, 1996), e são utilizados como vetores para modificações genéticas em plantas através da introdução de genes de interesse (MURRAY et al, 1992).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do Tecido Vegetal

Foram coletadas, de três indivíduos diferentes de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) localizados no Campus da Universidade Federal de Pernambuco, seis amostras de folhas saudáveis de cada indivíduo, escolhidas aleatoriamente. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos/UFPEA para realização da desinfecção e isolamento dos endófitos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos identificados, até o início do experimento.



FIGURA 4.1 – Folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) coletadas para o isolamento dos endófitos.

4.2. Desinfecção

O tratamento de desinfecção seguiu a metodologia de Mc inroy e colaboradores (1995). Cada material foi lavado em água corrente e em água destilada para a eliminação do excesso de resíduos e micro-organismos epífitos.

O material foi imerso em peróxido de hidrogênio a 20% por dez minutos, depois foram realizadas quatro lavagens em tampão fostato (0,02 M). A última água de lavagem de cada material foi plaqueada e utilizada como controle da desinfecção através da observação do crescimento de colônias epífíticas.

4.3. Isolamento

O isolamento seguiu a metodologia de Araújo e colaboradores (2002) (Figura 4.2). Antes de iniciar a fragmentação de cada tecido vegetal desinfetado, foram retiradas as bordas e nervuras de cada folha, a fim de facilitar a passagem do endofítico para o meio de cultivo, utilizando um estilete esterilizado. Após esse procedimento, cada folha foi fragmentada, com auxílio de um bisturi estéril, em 20 pedaços de aproximadamente 25 cm². O total de fragmentos foi de 360, dos quais foram distribuídos em placas de Petri contendo os meios: ISP2 e ALA para o isolamento de bactérias e actinobactérias endofíticas e Ágar Sabouraud e BDA para o isolamento de fungos endofíticos. As placas foram incubadas a 30°C por até 20 dias em uma estufa B.O.D. Foi realizada a avaliação do crescimento dos endofíticos a cada 24 horas. Todos os fungos, bactérias e actinobactérias que apresentaram crescimento foram imediatamente purificados através da técnica de repiques sucessivos em estrias paralelas, e por semeadura em estrias por esgotamento (DROVAL et al, 2001; TORTORA et al, 2006), respectivamente. Todos os micro-organismos isolados foram preservados na Coleção UFPEDA pelo método da subcultura e armazenados a ± 4 °C. A frequência do isolamento foi determinada observando a relação entre o número de fragmentos que apresentaram crescimento de endofíticos e o número total de fragmentos utilizados.

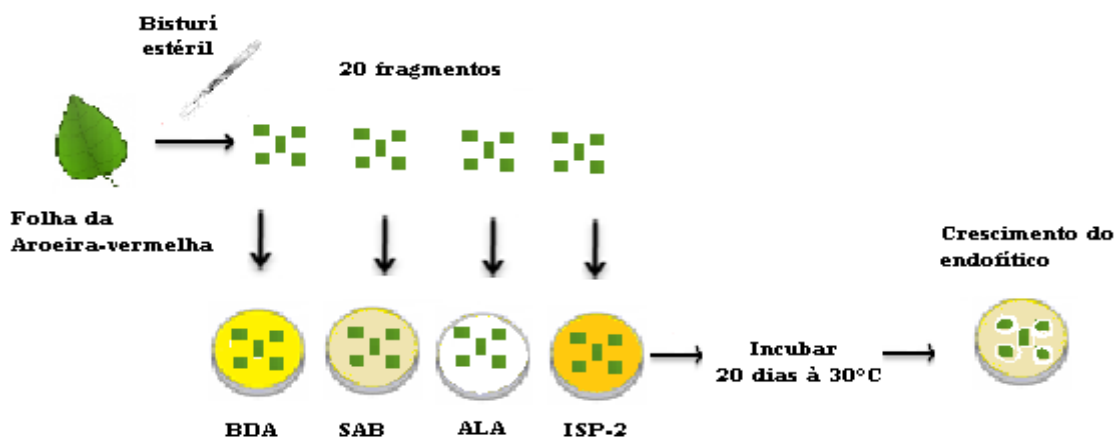


FIGURA 4.2 – Esquema da metodologia utilizada no isolamento dos micro-organismos endofíticos.

4.4. Ensaio primário da atividade antimicrobiana

Foi realizada uma seleção primária através do Teste de Difusão em Ágar, segundo metodologia de Ichikawa e colaboradores (1971), para avaliação da atividade antibacteriana dos isolados obtidos.

4.4.1. Teste em bloco de gelose

Foram selecionados 40 isolados fúngicos e os 13 isolados de actinobactérias da Aroeira-Vermelha. O critério utilizado na escolha dos fungos endofíticos foram as diferenças nas características macroscópicas dos seus micélios aéreos, visto que todos os micélios eram distintos entre si e os fungos escolhidos foram isolados de diferentes fragmentos. Em relação aos isolados actinobactérias, como foi baixo o número, todos foram testados.

A cultura pura de cada micro-organismo endofítico a ser testado foi utilizada para a preparação de uma suspensão de esporos em água destilada esterilizada. Foram transferidos 100 µL dessa suspensão para placas de Petri contendo 10 mL com os meios: ALA e ISP2 para testes com actinobactérias, e BDA e Sabouraud para testes com fungos. Para semear a suspensão nas placas foi utilizada uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas durante sete dias, a uma temperatura de

30°C, para crescimento em forma de tapete dos fungos endofíticos e das actinobactérias. Após esse período, com o objetivo de impedir contaminações provenientes dos esporos dos fungos testados, o que dificultaria a interpretação dos diâmetros dos halos, cada placa de Petri foi invertida e em suas tampas foi adicionado 1 ml de clorofórmio, uma vez que o vapor do clorofórmio inativa esses esporos. Após ocorrer a evaporação total do clorofórmio foram confeccionados os blocos de gelose, com auxílio de um furador esterilizado, de todos os endofíticos purificados. Para o ensaio contra cada micro-organismo teste, foram utilizados três blocos de gelose de cada endofítico. Esses blocos foram colocados em placas de Petri contendo as suspensões dos micro-organismos testes (Tabela 4.1). As placas contendo suspensões com bactérias e leveduras, previamente semeadas em forma de tapete, foram incubadas a 37 °C por 24/48 horas, com exceção da *Mycobacterium smegmatis* (30° C), e a 30 °C por 24 e 48 horas para *Candida Albicans* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente. O teste foi realizado em triplicata. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos (mm) após o crescimento do micro-organismo teste.

4.4.2 Preparação das suspensões

Para o preparo das suspensões foram utilizadas culturas puras dos micro-organismos testes, pertencentes à coleção de cultura microbiana do Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Cada micro-organismo foi semeado em tubos de ensaio e incubado a 30°C ou 37°C, durante 24 ou 48 h. Com o auxílio de uma alça de platina devidamente flambada, foi retirado um pouco do crescimento microbiano e transferido para tubos de ensaio contendo água destilada esterilizada, até adquirir uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de acordo com a escala de turbidimetria de MacFarland, formando assim a suspensão.

TABELA 4.1 - Micro-organismos testes utilizados para avaliação da Atividade Antimicrobiana.

Micro-organismos testes		
Fungo Filamentoso	<i>Fusarium oxysporum</i>	UFPEDA-2455
Levedura	<i>Candida albicans</i>	UFPEDA-1007
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i>	UFPEDA-86
	<i>Staphylococcus aureus</i>	UFPEDA-02
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Resistente à meticilina)	UFPEDA-663
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	UFPEDA-71
	<i>Streptococcus faecalis</i>	UFPEDA-138
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i>	UFPEDA-224
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFPEDA-396
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFPEDA-416

4.5. Ensaio secundário da atividade antimicrobiana

O isolado fúngico que apresentou os melhores halos de inibição foi submetido ao ensaio secundário. Foram utilizados meios líquidos, MPE, M1 e CZapeck, para fermentação dos fungos e a avaliação da atividade antibacteriana a cada 24 horas, durante um período de 120 horas, através do teste de difusão em disco (KIRBY et al, 1966), a fim de determinar o tempo de maior produção do princípio bioativo. Foram distribuídos 50 mL de cada meio em três Erlenmeyers de 250 mL, para o teste com cada micro-organismo selecionado. Em cada Erlenmeyer foram inoculados três blocos de gelose do endofítico teste e esses foram colocados em um agitador a uma rotação de 180 rpm, durante 48 horas, a temperatura de 30°C, para a preparação do pré-inóculo. Foram retirados 5 mL de cada Erlenmeyers e transferidos para outros contendo 45 mL de cada meio líquido, mantidos em temperatura ambiente, por 120 horas, em mesa agitadora com 180 rpm. O ensaio foi realizado em triplicata. A cada 24 horas, com o auxílio de uma pipeta automática, foram retiradas alíquotas de 1

mL, que foram transferidas para eppendorfs estéreis e devidamente identificados. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos visando obter a separação entre a massa celular e o líquido metabólico. Deste líquido foram utilizados 50 μ L para umedecer discos de papel de aproximadamente 8 mm de diâmetro e estes foram colocados em placas inicialmente semeadas com suspensão dos micro-organismos testes. As placas foram incubadas a 30°C/37°C, por 24/48 horas. O pH dos inóculos e a biomassa úmida foram aferidos a cada 24 horas. Foi calculada a média aritmética entre os diâmetros de cada halo de inibição formado a cada 24 horas (LYRA et al, 1964). O isolado Act- 3 passou pelo mesmo processo de fermentação, nos meios MPE, M1 e ISP-2 (KAWAMURA, 1976).

Blocos de gelose com crescimento
fúngico ou de actinobactéria

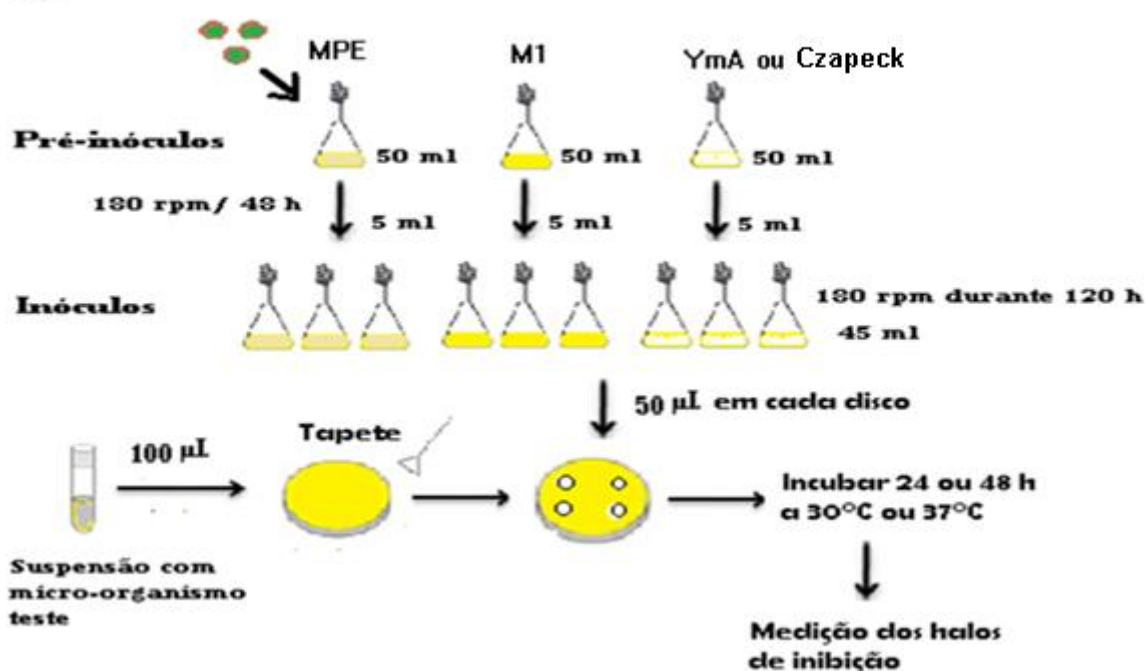


FIGURA 4.3 - Esquema da metodologia utilizada no ensaio secundário da atividade antimicrobiana.

4.6. Identificação dos micro-organismos endofíticos

4.6.1 Identificação dos fungos endofíticos

Os quatro fungos submetidos à fermentação líquida foram repicados em placas de Petri com os meios Sabouraud e BDA, e encaminhados ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco onde foram identificados em nível de subespécie.

Para a identificação foram observadas as características macroscópicas (coloração e aspecto do micélio aéreo e vegetativo, produção de pigmento e exsudato, meio de crescimento e tempo de incubação) e microscópicas (esporóforo, diferenciação das hifas, estruturas reprodutivas, disposição e dimensão dos septos) dos fungos endofíticos.

4.6.2. Identificação das actinobactérias

4.6.2.1 Caracterização macroscópica e taxonômica

Os isolados de actinobactérias foram caracterizados macroscopicamente e em nível de gênero, tendo a primeira caracterização ocorrida a partir da observação da coloração de seus micélios aéreos e vegetativos, assim como a produção de pigmentos no meio de cultivo.

Na identificação em nível de gênero foi usada a técnica taxonômica clássica, que avalia a micromorfologia das cadeias de esporos de cada actinobactéria, utilizando a microscopia óptica. Foi realizado um microcultivo das linhagens nos meios sólidos ISP-2, ISP-3 e ISP-4, segundo metodologia descrita por Shirling & Gottlieb (1966). Foram semeadas estrias largas paralelas de cada actinobactéria isolada, em placas de Petri contendo os meios citados. Em cada estria foi inserida uma lamínula, em posição inclinada, obtendo-se um ângulo de aproximadamente 45° entre a lamínula e a placa (Figura 4.4). As placas foram incubadas em estufa B.O.D (30°C) de 10 à 15 dias. Após esse período, as lamínulas foram observadas em microscopia óptica e as actinobactérias foram identificadas a partir das características micro-morfológicas dos micélios aéreos de cada linhagem. As

características macro-morfológicas dos micélios também foram observadas auxiliando na identificação.



FIGURA 4.4 - Microcultivo da linhagem Act-3 no meio ISP-2.

4.6.2.2 Identificação Molecular

A linhagem Act-3, por ser a que apresentou o melhor resultado durante o ensaio primário com blocos de gelose, foi escolhida para identificação molecular em nível de espécie.

Para a extração do DNA foi inicialmente realizada uma fermentação líquida com o isolado Act-3 para a obtenção da biomassa. Essa etapa está descrita na Figura 4.5.

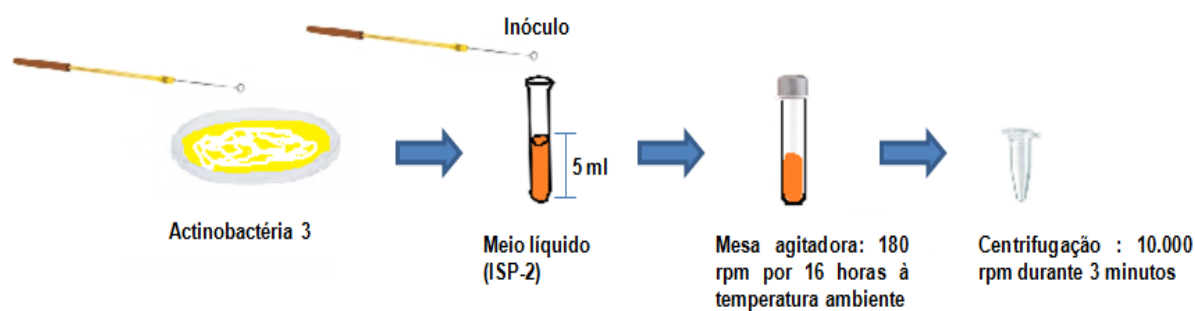


FIGURA 4.5 - Esquema da metodologia utilizada na obtenção da biomassa da linhagem Act.-3.

- Extração do DNA total

A metodologia empregada na extração do DNA total da linhagem Act-3 foi desenvolvida segundo Sambrook e colaboradores (1989). Inicialmente as células foram resuspendidas cuidadosamente em 480 µl de uma solução de EDTA (50 mM). Foi adicionada a mistura 120 µl de uma solução de enzima lítica, a fim de facilitar a lise da parede celular. A mistura foi homogeneizada com a utilização de um pipetador e incubada a 37°C por 40 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 15.000 rpm e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados 600 µl de uma solução de lise nuclear. Novamente a mistura foi homogeneizada e incubada em banho Maria a 80°C por 5 minutos para promover a lise celular. Após voltar a temperatura ambiente, foram adicionados 3 µl de uma solução de RNase para degradar o RNA, uma vez que esse ácido nucléico não é de interesse nesse procedimento. O tubo contendo a amostra foi invertido 5 vezes para que ocorresse uma mistura. Foi realizada nova incubação a 37°C por 30 minutos. Após antigir a temperatura ambiente, foram adicionados 200 µl de uma solução de precipitação de proteínas e a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex durante 20 segundos a fim de misturar a solução de proteínas com o lisado celular. A amostra foi incubada em gelo durante 5 minutos e centrifugada a 15.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo limpo de microcentrifugação (1,5 mL) contendo 600 µl de isopropanol à temperatura ambiente. A mistura foi homogeneizada delicadamente até se formar uma massa visível de DNA e esta permaneceu por 10 minutos em freezer. Em seguida, foi realizada nova centrifugação a 15.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi despejado cuidadosamente em papel absorvente e foi adicionado, no tubo contendo o DNA, 600 µl de etanol a 70%. O tubo foi invertido algumas vezes para a lavagem do pellet de DNA. A amostra foi centrifugada a 15.000 rpm por 2 minutos, e o etanol foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de um pipetador automático. O tubo foi invertido em papel absorvente, durante 15 minutos, até a secagem do pellet. Foram adicionados 100 µl de uma solução de reidratação de DNA no tubo com o pellet, e este foi incubado a 65°C por uma hora. Após essa etapa, o tubo foi agitado lentamente. Em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para

avaliar a integridade do DNA extraído, utilizando o Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

- Amplificação do gene DNA 16S

Após a confirmação da extração e da integridade do DNA a amplificação foi realizada através da técnica de PCR, com a utilização de oligonucleotídeos universais para Eubacteria fD1 (5´- AGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) e rD1 (5´- CGGTGTGTACAAGGCCCGGGGAACG-3´) (WEISBURG et al., 1991). As amplificações foram realizadas em volume final de 25 uL contendo 10 a 50 ng de DNA, 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTP, 3,0 mM de MgCl₂, 1X tampão e 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies).

A reação de PCR foi executada em termociclador programado para realizar desnaturação inicial a 94° C por 5 min, 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94°C/1', 52°C/30' e 72° C/2', respectivamente). Após a amplificação, foram utilizados 5 µL da reação de PCR para avaliação por eletroforese em gel de agarose (1,2% m/v) a 3 volts/cm⁻¹ em tampão TBE 1x e corado com Bluegreen (Invitrogen Life Technology). A sequência obtida a partir do sequenciamento do produto de amplificação foi comparada com todas as sequências no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências foram alinhadas usando-se o software Clustal, e a árvore filogenética foi construída utilizando 5,05 mega com o método neighbor joining. A topologia foi avaliada pela análise de bootstrap (1000 resampling).

4.7. Extração do antibiótico

4.7.1. Separação da Massa Celular

Inicialmente foi realizada uma tentativa de extração do princípio ativo do líquido metabólico e da biomassa do Fungo F-61 e da Actinobactéria Act-3. As melhores condições para a produção do antibiótico foram determinadas a partir dos resultados obtidos durante a fermentação desses micro-organismos. O processo de separação entre o líquido metabólico e a biomassa foi realizado através de uma centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos, seguido de filtração em funil (LYRA et al, 1964).

4.7.2. Extração do Antibiótico - Biomassa

Nesta etapa foram utilizados três solventes miscíveis em água: etanol, metanol e acetona, na proporção de 1:10 (g/mL), em diferentes pHs: 2,0, 7,0 e 9,0. As misturas (biomassa + solvente) foram realizadas em falcons (50 mL) e estes ficaram durante 1 hora em agitador mecânico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos e filtradas em papel de filtro, obtendo-se a separação entre a biomassa e o solvente com o princípio ativo. Discos de papel foram embebidos com 50 µL dos extratos obtidos, e foi realizado o teste de difusão em ágar frente aos micro-organismos testes: *S. aureus*, *S. aureus* MRSA e *E. coli* (LYRA et al, 1964).

4.7.3 Extração do Antibiótico – Líquido Metabólico

Os solventes utilizados para a extração do princípio ativo do líquido metabólico produzido pelo Fungo F-61 e pela Actinobactéria Act-3 foram: éter de petróleo, acetato de etila e clorofórmio, todos eles não miscíveis em água. Foi utilizado o líquido metabólico em seu pH normal (+/- 7,0) e nos pHs 2,0 e 9,0, para cada solvente, na proporção de 2:1 (líquido metabólico/ solvente). Foram realizados os mesmos procedimentos observados durante a extração do princípio ativo da biomassa, até a etapa de centrifugação. Foram separados os extratos do líquido metabólico esgotado com a utilização de uma pipeta e ambos foram submetidos ao teste de difusão em ágar, frente aos micro-organismos testes: *S. aureus*, *S. aureus* MRSA e *E. coli*. Antes da realização do teste o pH dos líquidos esgotados foram reajustados para 7,0. O teste com o líquido esgotado serviu como controle positivo para confirmar se o solvente extraiu por completo o princípio ativo produzido pelo endofítico (LYRA et al, 1964).

Após a extração, cada extrato foi concentrado através de rotaevaporação com bomba a vácuo trabalhando a uma potência de 200 watts, com uma vazão de 53 a 58 L/min, vácuo máximo de 650 mmHg (85,5 Kpa), rotação do motor de 2800 rpm.

A temperatura utilizada para evaporar os solventes foi de 55°C. O rotaevaporador trabalhou em uma rotação de 80 rpm.

A Figura 4.6 representa a metodologia utilizada na tentativa de extração do princípio ativo do líquido metabólico e da biomassa das linhagens: Actinobactéria Act-3 e Fungo F-61.

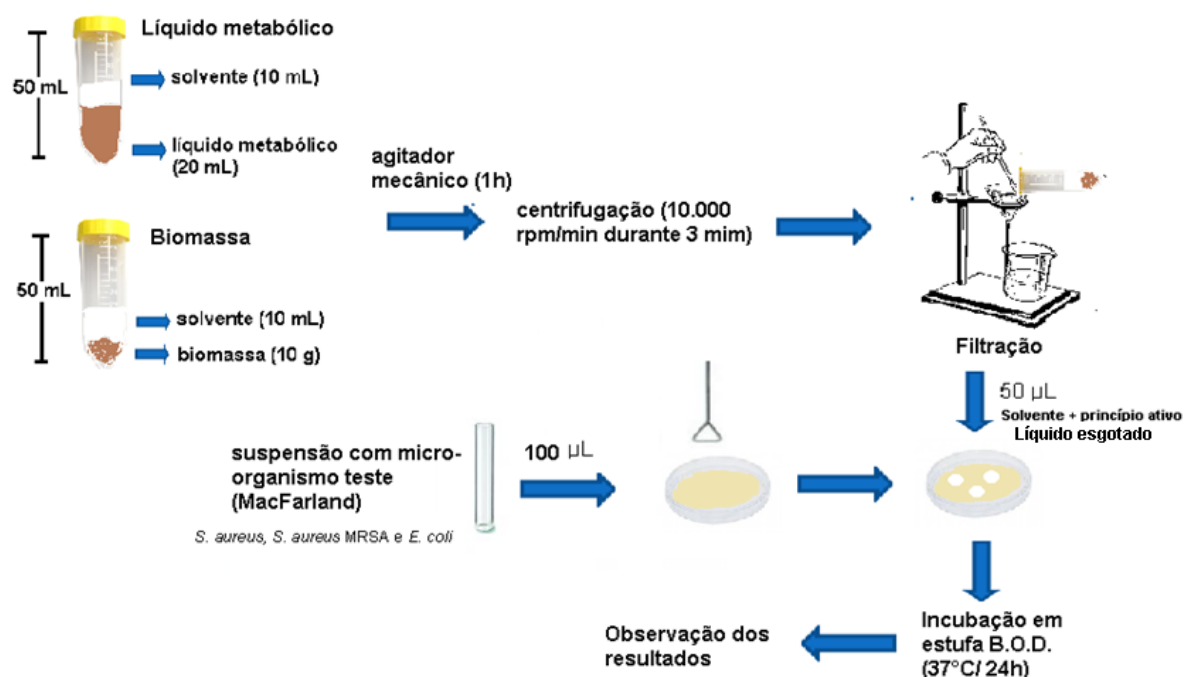


FIGURA 4.6 - Esquema da metodologia utilizada na tentativa de extração do princípio ativo do líquido metabólico e da biomassa das linhagens: Actinobactéria Act-3 e Fungo F-61.

4.8 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Foram realizados os testes de concentração mínima inibitória (CMI) de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004) visando estabelecer a menor concentração do extrato bioativo obtido a partir da fermentação do líquido metabólico e da biomassa do isolado fúngico F-61 e do isolado de actinobactéria Act-3, capaz de inibir os micro-organismos testes, e de concentração mínima bactericida, determinando a menor concentração capaz de impedir o total crescimento dos micro-organismos testes.

Para esses testes foram utilizadas placas com poços, os quais foram divididos de acordo com a Figura 4.7.

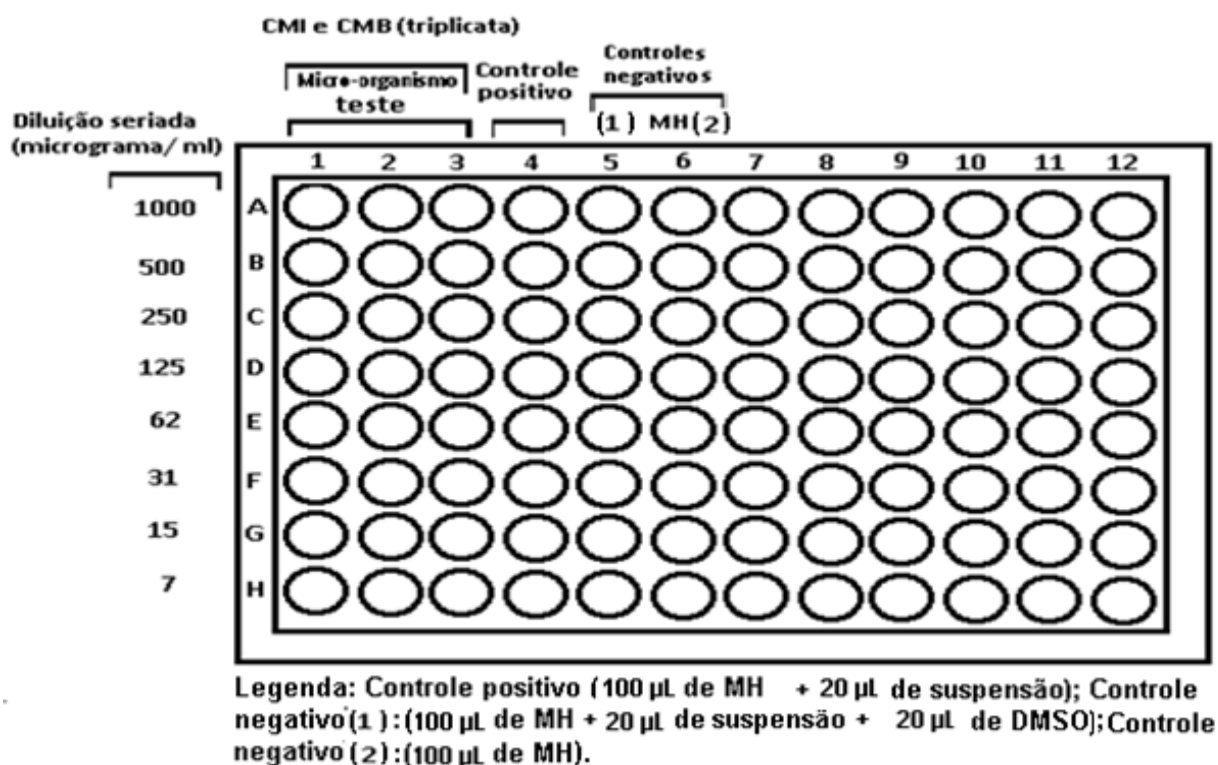


FIGURA 4.7 - Esquema da divisão dos poços da placa utilizada nos testes de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB).

Nos poços de 1 a 3 foram realizados os testes de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida. Inicialmente foram inoculados 100 µL de meio MH em cada poço, seguidos de 100 µL de uma solução contendo: 10 mg do extrato bruto metabólico ou da biomassa, do micro-organismo endofítico + 1 ml de uma solução de dimetil sulfoxido (DMSO) a 30%, nos poços presentes na fileira A de 1 a 3, obtendo-se uma concentração de 1000 µL/ml. A partir dessa concentração, foi realizada uma diluição seriada até obter uma solução de DMSO + extrato em uma concentração de 7 µg/mL. Em seguida foram inoculados, em cada poço, 20 µL de uma suspensão de cada micro-organismo teste utilizado, de acordo com a escala de turbidimetria de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para o controle positivo foram utilizados, em todos os poços, 100 µL de meio MH + 20 µL de suspensão bacteriana. Foram empregados dois controles negativos, onde nos poços utilizados para o primeiro (fileira 5) foram inoculados 100 µL do meio de cultura MH + 20 µL da

suspensão de micro-organismo + 20 µL de DMSO. Os poços utilizados para o segundo controle negativo (fileira 6) continham, apenas, 100 µL do meio de cultura MH. Nos primeiros poços a concentração do meio MH estava duplicada, uma vez que após a diluição, todas as amostras estariam com a mesma concentração de meio de cultura. A placa foi incubada em estufa B.O.D. a 37°C por 24 horas. Após esse período foram inoculados, em todos os poços, 25 µL de uma solução reveladora de resazurina (0,01 mg/ml) e a placa foi novamente incubada em estufa B.O.D., dessa vez por 2 horas. Após esse período foi realizada a leitura da placa. Poços na coloração azul indicaram a inibição do micro-organismo teste, e na coloração vermelho/róseo indicaram crescimento microbiano.

4.9 Prospecção Química

Foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) alíquotas de 10µL de cada extrato do isolado F-61 (extratos brutos metanólico da biomassa e etéreo do líquido metabólico) para a identificação das classes de metabólitos secundários; Empregaram-se diversas fases móveis e reveladores específicos (HARBORNE, 1998; METZ, 1961; ROBERTSON et al, 1956; SHARMA; DAWRA, 1991; WAGNER; BLADT, 1996) (Tabela 4.2). Os cromatogramas migraram em cubas previamente saturadas.

TABELA 4.2. Condições cromatográficas da prospecção química dos metabólitos secundários produzidos pelo isolado fúngico F-61.

Metabólitos	Sistema de		Referência
	Migração	Revelador	
Alcalóides	A	Dragendorff	Wagner e Bladt (1996)
Açúcares redutores	D	TTZ	Metz (1961)
Compostos fenólicos	A	NEU	Wagner e Bladt (1996)
Taninos Hidrolizáveis	A	NEU	Wagner e Bladt (1996)
Triterpenos e Esteróides	B	Lieberman-Burchard	Sharma e Dawra (1991)
Mono/Sequiterpenos	C	Vanilina Sulfúrica	Wagner e Bladt (1996)

A. Acetato de etila - Ácido acético - Ácido fórmico - Água (100:11:11:26, v/v); **B.** Tolueno - Acetato de etila (80:20, v/v); **C.** Tolueno - Acetato de etila (97:3, v/v), **D.** Acetona - n-Butanol - Tampão fosfato pH 5,0 (5:4:1, v/v).

A detecção dos metabólitos secundários:

- Alcalóides são evidenciados por bandas laranjas após revelação com Dragendorff e o padrão utilizado foi pilocarpina.
- Açúcares redutores são evidenciados após revelação com solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTZ) e aquecimento. Os padrões utilizados foram soluções de arabinose, glicose, sacarose e maltose.
- Para compostos fenólicos há presença de bandas com fluorescência levemente azulada e flavanóides, bandas laranja a vermelho quando revelados com o reagente de NEU (Difenilboriloxietilamina 1% em EtOH) e analisada em UV. O padrão utilizado foi quercetina.
- Taninos hidrolisáveis são evidenciados por manchas de coloração rósea após revelação com solução de vanilina clorídrica, comparando-se com os padrões de ácido elágico e ácido gálico.

- Em triterpenos e esteróides há presença de bandas marrons a azuladas após revelação com o reagente de Lieberman-Burchard e aquecimento. Os padrões utilizados foram ácido ursólico, β -amirina e β -sitosterol.
- Monoterpenos e sesquiterpenos são evidenciados por manchas de coloração azul escura após revelação com solução de vanilina sulfúrica, comparando-se com o padrão timol.

4.10 Extração do Tecido Vegetal

As folhas de *Schinus Terebenthifolius* Raddi, previamente fragmentadas, foram pesadas (1g) e transferidas para um erlenmeyer contendo 10 mL de Hexano, cujo objetivo era extrair os compostos fortemente apolares que não possuem relação com a atividade antimicrobiana. Elas permaneceram em contato com o solvente durante duas horas, em temperatura ambiente. Após esse período, o extrato foi filtrado em funil simples e papel filtro e foram adicionados 10 ml de acetato de etila no erlenmeyer permanecendo em contato com as folhas pré-tratadas com hexano, pelo mesmo período de tempo. O extrato foi novamente filtrado e acondicionado na geladeira em frasco âmbar. O papel do acetato de etila foi extrair os compostos que possuem relação direta com a atividade antimicrobiana encontrada na folha da planta (CERUKS et al, 2007).

Para a obtenção do extrato concentrado foi realizada uma rotaevaporação com auxílio de bomba a vácuo trabalhando a uma potência de 200 watts, numa vazão de 53 a 58 L/min, vácuo máximo de 650 mmHg (85,5 Kpa), rotação do motor de 2800 rpm. A temperatura utilizada para evaporar os solventes foi de 55°C. O rotaevaporador trabalhou em uma rotação de 80 rpm.

Essa etapa teve como objetivo tentar extrair o princípio ativo produzido pelo tecido vegetal.

A Figura 4.8 ilustra o esquema da tentativa extração, com acetato de etila, do princípio ativo produzido pelas folhas da Aroeira-Vermelha.

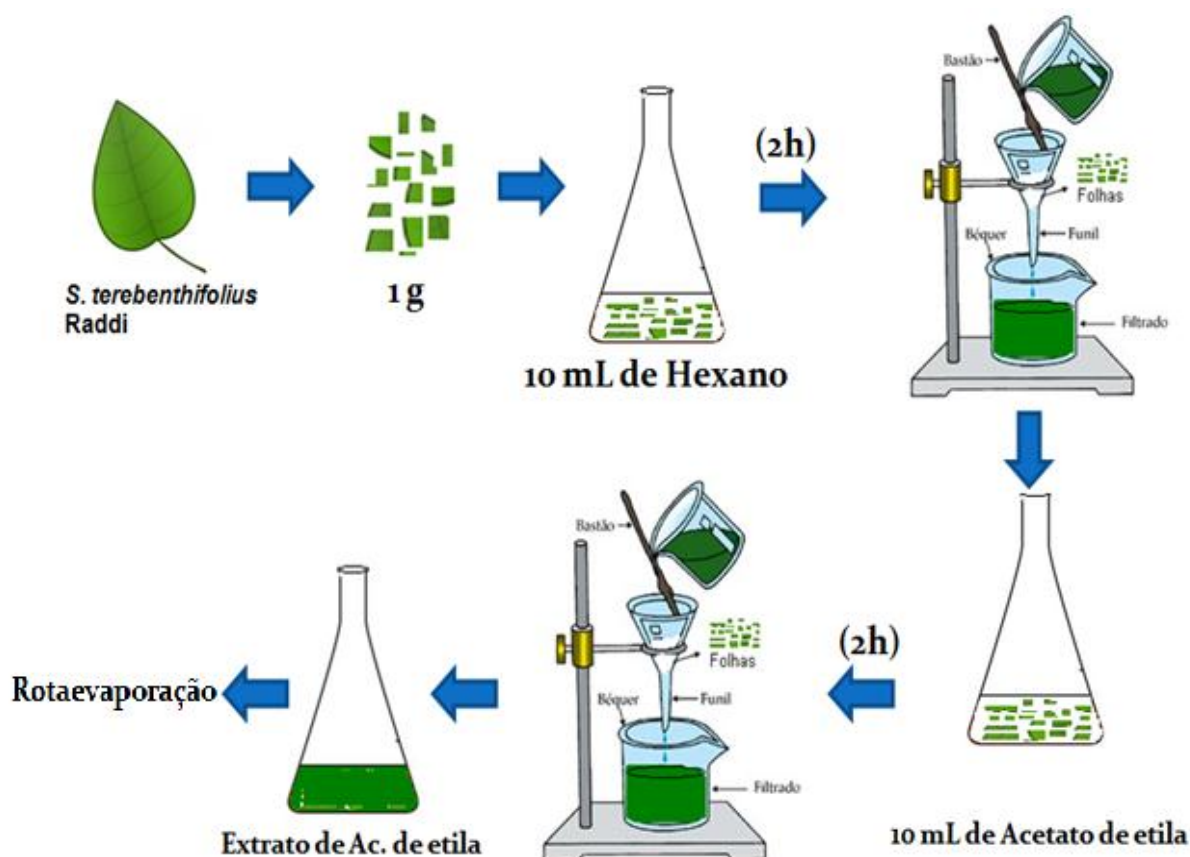


FIGURA 4.8 - Esquema da tentativa de extração, utilizando acetato de etila, do princípio ativo produzido pelas folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha).

4.11. Comparação dos metabólitos bioativos do extrato da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) e dos metabólitos bioativos dos endofíticos

Para a realização dessa etapa foi utilizada a metodologia de bioautografia em camada delgada (CCD) pelo método ágar overlay, descrita por Rodrigues (2009). Por meio dessa técnica foi avaliada, através do R_f, qual das frações bioativas do extrato da planta são semelhantes ao produto da fermentação do isolado que apresentou maior halo de inibição durante a avaliação da atividade antimicrobiana.

Foi preparada 10 mL de uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) e de *S. aureus* (MRSA) (UFPEDA 663) de acordo com a escada de turbidimetria

de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), e 100 μ L de cada suspensão foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de Mueller Hinton Ágar (MH) semi-sólido (aproximadamente 45°C) e homogeneizadas em agitador. Prosseguindo com o teste, 20 μ L de cada extrato bruto obtido a partir da extração no líquido metabólico e na biomassa do isolado fúngico F-61 e do isolado de actinobactéria Act-3, foi solubilizado em seus respectivos solventes de origem e, em seguida, foram aplicados 10 μ L (10 mg/mL) desses extratos em cada ponto marcado na placa juntamente com os extratos da folha da Aroeira-Vermelha. Foram utilizadas cromatoplasmas de silicagel 60f254 (Merck®) ou placas de CCD (20x20) cortadas em quadrados de (5x5 cm). As placas foram eluídas em uma fase móvel composta por acetato de etila:metanol (9:1). Foi adicionada uma pequena quantidade do meio Mueller Hinton Ágar (MH) semi-sólido contendo a suspensão de *S. aureus*, em uma placa de Petri estéril até preenchê-la por completo. Em seguida, foram colocadas na placa de Petri as placas cromatográficas eluídas, e, sobre esta, foi vertido o meio de cultura inoculado (overlay). Após a solidificação, a placa foi incubada a 37°C por 24h.

Depois do período de incubação, para a revelação da bioautografia foi utilizada uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (20 mg/mL) e incubação a 37°C por 2 horas. A leitura da placa foi realizada a partir da observação de halos de inibição contra um fundo vermelho/roxo. A presença de halos de inibição confirma a atividade antimicrobiana dos extratos (HOMANS et al, 1970).

Através da medição e da comparação do Rf do halo de inibição apresentado por cada extrato, foi avaliada se os princípios bioativos produzidos pelos endofíticos são semelhantes aos da planta.

O esquema da bioautografia em camada delgada realizada com os extratos da Aroeira-Vermelha e dos endofíticos selecionados está representado na Figura 4.9.

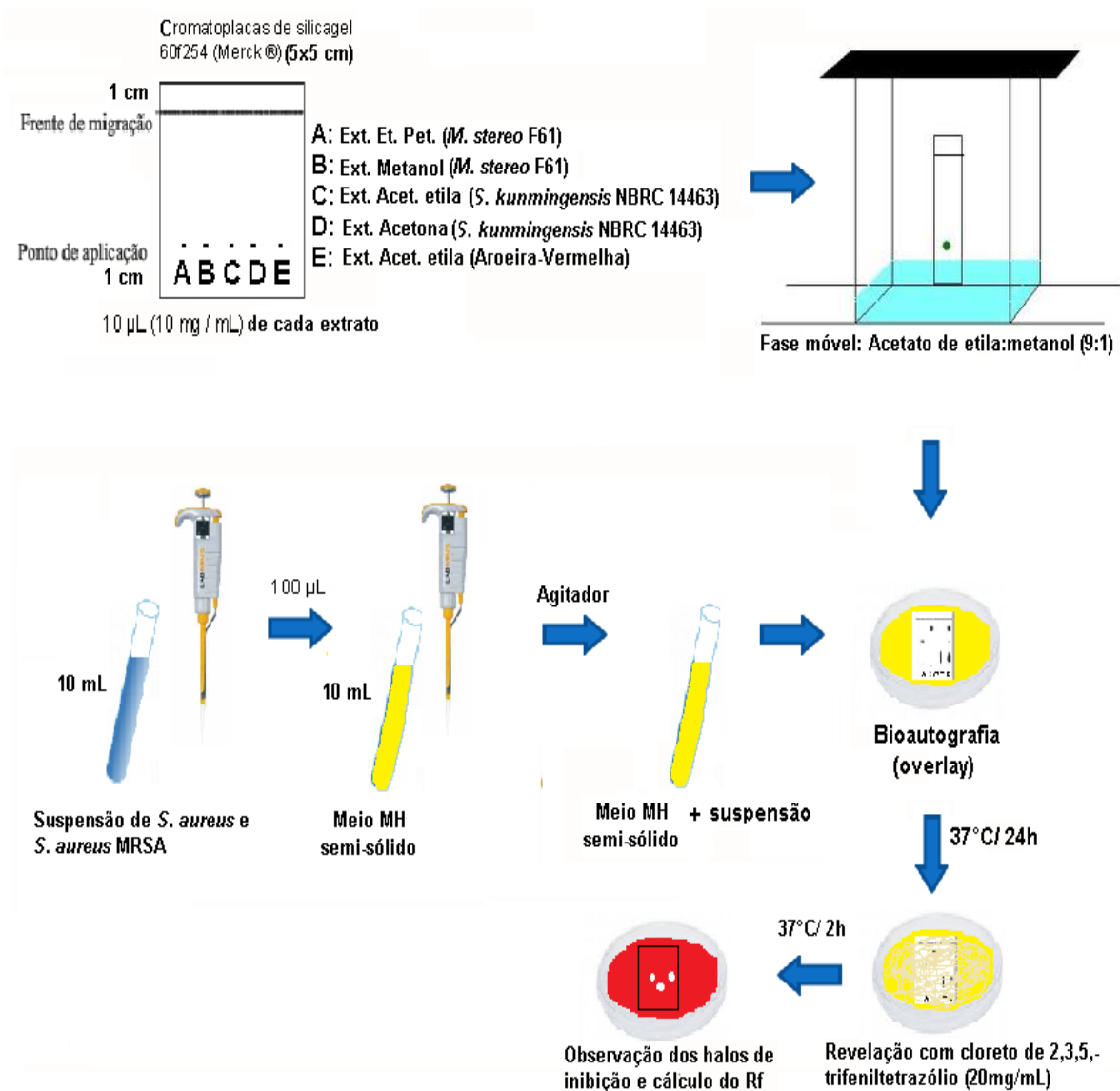


FIGURA 4.9 – Representação da bioautografia em camada delgada realizada com os extratos dos endofíticos e das folhas da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos Micro-organismos Endofíticos

A escolha das folhas de plantas em geral, para o isolamento, está relacionada com o fato de este tecido vegetal ser o mais utilizado na busca de novos compostos bioativos produzidos por endofíticos presentes em diversas plantas (FENNER et al, 2006), além de, comprovadamente, possuir fins terapêuticos (SOARES et al, 2007).

A tabela abaixo representa a distribuição dos micro-organismos endofíticos em cada meio de cultura em que foram isolados.

Tabela 5.1 – Distribuição e frequência, por meio de cultivo, dos micro-organismos endofíticos isolados da Aroeira-Vermelha.

Micro-organismos isolados	Total de isolados	ALA		ISP-2		BDA		SAB	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Bactérias	67	28	41,79	39	58,20	-	-	-	-
Actinobactérias	13	5	38,46	8	61,53	-	-	-	-
Leveduras	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fungos	237	12	5,06	13	5,48	75	31,64	137	57,80
Total	317	45		60		75		137	

5.1.1 Fungos isolados

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.1, os meios utilizados no isolamento de fungos endofíticos apresentaram resultados satisfatórios atendendo aos objetivos iniciais. Dos 237 isolados fúngicos das folhas da Aroeira-Vermelha, pode-se afirmar que houve uma predominância de isolados fúngicos no meio de

cultura Sabouraud, o qual apresentou 137 (57,80%) isolados, seguido do meio BDA com 75 (31,64%) isolados.

Mesmo com a utilização do antifúngico Nistatina na concentração de 100 mg/L nos meios ISP-2 e ALA, estes apresentaram crescimento de fungos endofíticos, sugerindo a ocorrência de fungos endofíticos resistentes a Nistatina na concentração utilizada. Foram obtidos 12 isolados fúngicos no meio ALA, correspondendo a 5,06% dos isolados, e 13 isolados fúngicos no meio ISP-2, equivalendo a 5,48% do total. Foi escolhida a utilização da Nistatina por ser um antifúngico experimentalmente usual que causa a morte celular de fungos patogênicos e saprofíticos a partir de alterações na permeabilidade da membrana (DEGASPARI et al, 2005).

A quantidade de isolados fúngicos nos meios Sabouraud e BDA foi de 212, o que representa 89,45% dos isolados fúngicos endofíticos. Os 25 isolados restantes cresceram nos meios ISP-2 e ALA.

A principal porta de entrada para micro-organismos endofíticos na planta é a raiz. Contudo, ao penetrar nesta, os endofíticos se disseminam para outros tecidos vegetais, e assim, conseguem colonizar regiões distantes como as folhas (AZEVEDO et al, 1998).

Dos 317 micro-organismos endofíticos isolados, 237 (74,76%) foram isolados fúngicos, o que sugere uma maior concentração destes nas folhas da Aroeira-Vermelha em relação a outros micro-organismos endofíticos. Outros estudos com isolados de folhas também indicam uma predominância de fungos endofíticos habitando esse tecido vegetal. Tonial (2010) isolou, das folhas da Aroeira-Vermelha, 48 fungos e 3 actinobactérias, implicando uma maior diversidade de fungos endofíticos na folha em relação à quantidade de bactérias e actinobactérias endofíticas. Lima (2008), também utilizando a Aroeira-vermelha, observou uma taxa de colonização de 88,2% de fungos.

Magalhães e colaboradores (2008) isolaram 159 fungos endofíticos de *Eremanthus erythropappus* (candeia), dos quais, 35, 9 e 115 colônias foram isoladas, respectivamente, de fragmentos de folhas, sementes e caules. Pimentel e colaboradores (2010) comprovaram a diversidade de fungos endofíticos em folhas de *Pinus taeda* (pinheiro) ao isolar 784 fungos a partir de 1.200 fragmentos. As

folhas de *Bauhinia brevipes* (unha-de-boi), também foram apontadas como ambiente propício para desenvolvimento de colônias fúngicas, tendo sido isoladas 1110 colônias de fungos endofíticos (HILARINO et al, 2011). Fernandes (2009) e Sette e colaboradores (2006), respectivamente, isolaram e identificaram 22 e 37 linhagens de fungos endofíticos obtidos a partir de folhas de e *Coffea robusta* (café).

Estudos envolvendo outras plantas medicinais também apontaram uma maior colonização de fungos endofíticos nas folhas, em relação a outros tecidos e micro-organismos endofíticos, como mostrado por Silva (2006) ao isolar 183 micro-organismos das folhas e raízes da planta medicinal *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, dos quais 126 são bactérias, 53 fungos e quatro actinobactérias.

Pillegi (2006), durante o isolamento de uma actinobactéria, 793 fungos e 121 bactérias de *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira santa), observou que número de fungos isolados das folhas e pecíolos superou bactérias e actinobactérias. Entretanto, as bactérias predominaram entre os isolados das sementes.

A análise da Tabela 5.2 permite avaliar a frequência de fungos endofíticos isolados por fragmento.

TABELA 5.2 Frequência dos fragmentos das folhas da Aroeira-Vermelha que apresentaram crescimento fúngico em cada meio de cultura.

	SABOURAUD	BDA	ISP-2	ALA
Total de fragmentos	90	90	90	90
Fragmentos com crescimento	79	67	12	13
Frequência	87,77%	74,44%	13,33%	14,44%

Os resultados mostram altas frequências de crescimento fúngico nos meios Sabouraud e BDA. Dos 90 fragmentos presentes no meio Sabourand, 79 apresentaram crescimento, correspondendo uma frequência de 87,77%, sendo este o meio que apresentou maior frequência de crescimento fúngico. Os fragmentos no meio BDA apresentaram uma frequência de 74,44%, o que corresponde a um crescimento em 67 fragmentos. Dos 180 fragmentos presentes nos meios Sabourand e BDA, 146 apresentaram crescimento de isolados de fungos

endofíticos, o que representa uma freqüência de 81,11%. Dos 180 fragmentos presentes nos meios ISP-2 e ALA, 25 apresentaram crescimento fúngico, correspondendo a um percentual de 13,88 %, sendo 12 fragmentos no meio ISP-2 e 13 no meio ALA, caracterizando uma freqüência de 13,33% e 14,44%, respectivamente.

Resultados semelhantes a esses foram obtidos no isolamento de fungos endofíticos das folhas da *Annona squamosa* L. e *Annona muricata* L. (pinha), pois, dos 110 isolados da *Annonas* s. L, foi observada uma taxa de colonização de 74,8% nas folhas e de 67,2% nos fragmentos do caule. Freqüências de 72,4% e 77,2% foram observadas nas folhas e fragmentos de caule da *A. muricata* L. (SILVA, 2008).

Hilarino e colaboradores (2011) obtiveram freqüências significativas no isolamento de fungos endofíticos de fragmentos de folhas da *Bauhinia brevipes* (Fabaceae), apresentando um percentual de 81,7% de crescimento. Pimentel e colaboradores (2010), trabalhando com fragmentos de acículas de *Pinus taeda* (pinheiro), obtiveram uma taxa de colonização de 65,33%. Entretanto, Pimentel e colaboradores (2006), apenas uma taxa de colonização de 17,2%, de fungos endofíticos isolados de 1728 fragmentos de *Glycine Max* (L.) Merrill (soja).

Souza e colaboradores (2004) observaram freqüências de 81,8% e 39,5% de fungos em folha e caule, nessa ordem, da planta *Palicourea longiflora*, e 66,6% e 21% em folha e caule de *Strychnos cogens* bentham.

Na Figura 5.1 observa-se a diversidade da coloração apresentada pelos micélios aéreos dos isolados fúngicos da folha da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha)

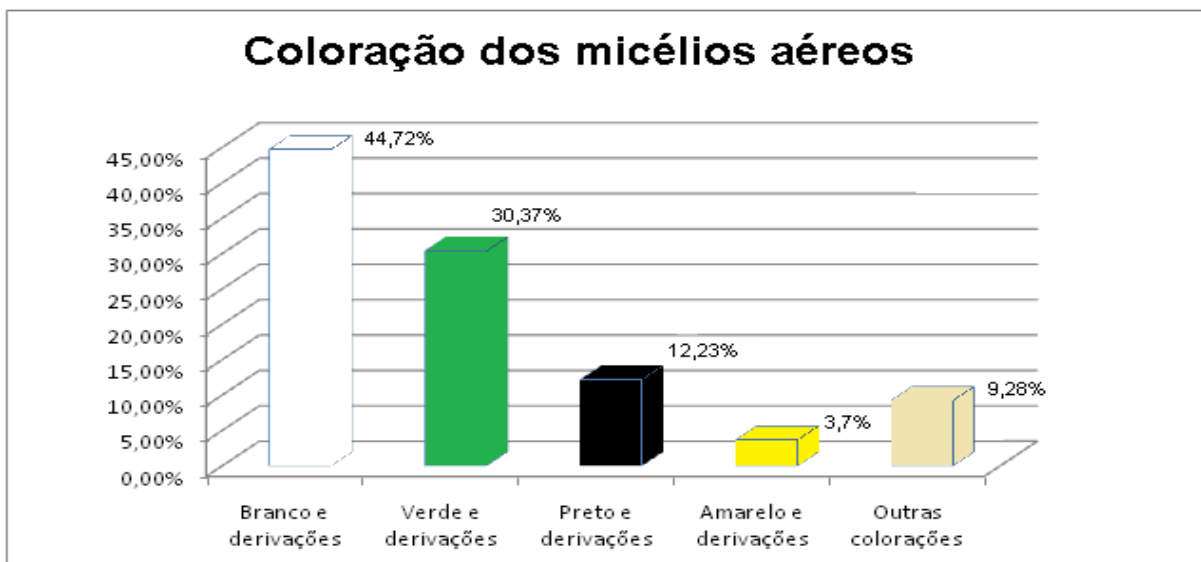


FIGURA 5.1 – Diversidade da coloração apresentada pelos micélios aéreos dos isolados endofíticos da folha da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha).

Foi observada uma grande diversidade de isolados endofíticos da Aroeira-vermelha, lembrando que são diversas as colorações apresentadas, tanto no crescimento no verso da placa quanto em seu reverso, o que caracterizam isolados distintos. A coloração predominante no reverso foi a branca e suas derivações: branco com creme, branco amarronzado, branco esverdeado e alaranjado, branco amarelado, branco com bege, branco acinzentado, branco com castanho e branco com esporos pretos, totalizando 106 isolados fúngicos, o que caracteriza 44,72% do total de isolados. A segunda coloração foi o verde e derivações: verde cinzento, verde amarronzado e verde com bordas brancas, totalizando 72 fungos, ou 30,37% dos isolados. A coloração preta e seus derivados, que compreende: preto, preto rugoso e preto acinzentado totalizaram 29 isolados, o que representa 12,23% do total. Colorações como: castanho, creme, marrom, rosa, goiaba, ferrugem e laranja, foram observadas em 21 isolados, representando 9,28% dos endofíticos. Por fim, amarelo e seus derivados: amarelo, amarelo com branco, amarelo com verde, amarelo com cinza, amarelo com esporos pretos, amarelo com cinza e branco, representam 3,7 %, ou seja, nove isolados endofíticos.

Pimentel (2006) isolou variedade de fungos endofíticos de diversas espécies em folhas e tronco de *Glycine Max* (L.) Merrill (soja). Os principais gêneros identificados foram: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium*.

Observa-se que alguns gêneros também foram identificados por Pimentel (2010) quando isolou de acículas de *Pinus taeda* (pinheiro): *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Hansfordia*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia* e *Xylaria*, mostrando que no tecido vegetal existem espécies mais presentes que outras.

Neste trabalho, os micélios aéreos dos 237 isolados fúngicos apresentaram as seguintes características: micélio algodonoso, micélio esporulado e micélio aveludado, sendo 118 isolados algodonosos, o que representa 49,78% do total de isolados, 74 isolados esporulados, 31,22%, e 45 isolados aveludados, totalizando 18,98%, destes sendo, 68,78% de isolados que não produziram esporos. Resultados superiores foram apresentados por Hilarino e colaboradores (2011) que encontraram 85,71% de micélio não-esporulante.

Observou-se a presença de 25 isolados fúngicos produtores de exsudados, sendo seis isolados com pigmentação, mostrando a presença de pigmentos solúveis no meio em que foi cultivado.

5.1.2. Bactérias Isoladas

A Tabela 5.3. mostra a frequência dos fragmentos das folhas da Aroeira-Vermelha que apresentaram crescimento de bactérias e actinobactérias em cada meio de cultura.

TABELA 5.3. – Frequência dos fragmentos das folhas da Aroeira-Vermelha que apresentaram crescimento de bactérias e actinobactérias em cada meio de cultura

	ALA- Actinobact.	ISP-2 Actinobact.	ALA- Bactéria	ISP-2 - Bactéria
Total de fragmentos	90	90	90	90
Fragmentos com crescimento	5	8	28	39
Frequência	5,55%	8,88%	31,11%	43,33%

Dos 90 fragmentos da folha da Aroeira-Vermelha que foram selecionados para o isolamento em meio ISP-2, 39 fragmentos apresentaram crescimento bacteriano, o que representa uma frequência de 43,33%. No meio ALA, a frequência obtida foi de 31,11%, o que significa que 28 fragmentos apresentaram crescimento bacteriano. A frequência total de bactérias isoladas dos 180 fragmentos foi de 31,66% (Tabela 5.3.).

Sturz e colaboradores (2000) observaram diversidade de bactérias endofíticas isoladas de feijão, melão, ervilha, trigo, repolho, pimentão e banana. Teixeira e colaboradores (2007) isolaram na planta *Manihot esculenta* Crantz (Mandioca) 482 endofíticos, identificados 137, sendo encontradas 47 espécies de micro-organismos pertencentes a 27 gêneros. Os gêneros de bactérias mais comumente encontrados representaram 71% do total e foram: *Bacillus* (o mais frequente) *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Stenotro* e *Serratia*. Barretti e colaboradores (2009) obtiveram 40 isolados de bactérias endofíticas oriundos das folhas e caules do tomateiro.

5.1.3 Actinobactérias Isoladas

A Tabela 5.1. apresenta os 13 isolados de actinobactérias endofíticas das folhas da Aroeira-Vermelha. Pode-se observar que foram encontrados 8 isolados de actinobactérias no meio ISP-2 e 5 isolados de actinobactérias no meio ALA, o que representa 61,53% e 38,46% do total de actinobactérias isoladas. A baixa frequência de actinobactérias isoladas pode ser atribuída aos meios de cultura utilizados, que, provavelmente, não supriram as necessidades para o crescimento do endofítico. Portanto, com a utilização de outros meios de cultivo, possivelmente poderá ocorrer um acréscimo nessa taxa.

Em estudo realizado com actinobactérias endofíticas foram isoladas 43 actinobactérias de diferentes plantas: *Melaleuca leucadendra* (L.) (cajeput), *Tectona Grandis* (teca), *Swietenia macrophylla* King (mogno) e *Phyllostachys pubescens* (bambu). A maioria dos membros isolados, 53%, apresentaram seus micélios aéreos na coloração cinza. A menor ocorrência foi observada na coloração castanha (5,6%) (ALIMUDDIN et al, 2011). Qui e colaboradores (2009) também encontraram uma grande diversidade de actinobactérias endofíticas em plantas medicinais de florestas tropicais em Xishuangbanna na China, obtendo 2174 actinobactérias correspondentes a 32 gêneros distintos. Entre os gêneros predominantes identificados estão: *Pseudonocardia* (57%), *Nocardiopsis* (8,3%), *Micromonospora* (6,4%) e *Streptosporangium* (3,8%). Verma e colaboradores (2009) isolaram actinobactérias, das folhas e hastes de *Azadirachta indica* A. Juss., predominantemente do gênero *Streptomyces* (49,09%), seguidos de *Streptosporangium* (14,5%), *Microbiospora* (10,9%), *Streptoverticillium* (5,5%), *Sacchromonospora* sp. (5,5%) e *Nocardia* (3,6%).

A Tabela 5.3 mostra a frequência de fragmentos que apresentaram crescimento de actinobactéria. A melhor frequência foi obtida no meio ISP-2 (8,88%) dos 90 fragmentos utilizados.

A Figura 5.2 representa a coloração dos micélios aéreos das estirpes de actinobactérias isoladas da folha da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha), em seus respectivos meios de cultivo.

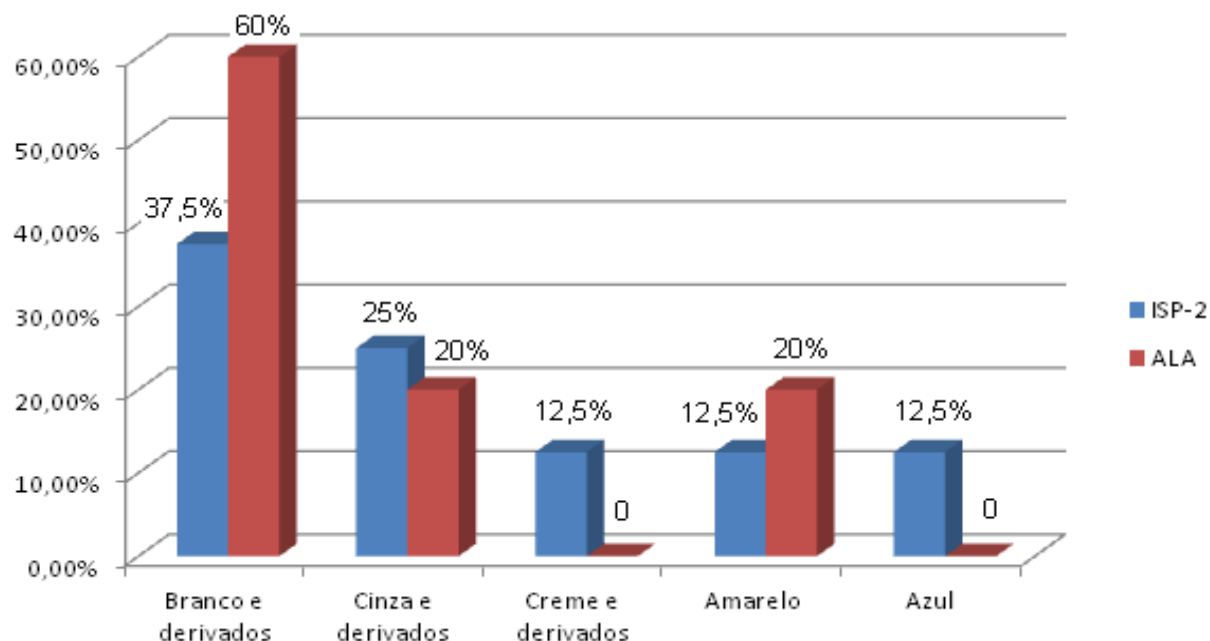


FIGURA 5.2 - Representação da coloração dos micélios aéreos das estirpes de actinobactérias isoladas da folha da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha), em seus respectivos meios de cultivo.

Entre as actinobactérias isoladas no meio ISP-2, observou-se, quanto à coloração dos pseudo-micélios, diversidade de cores: cinza e derivados, brancos e derivados, creme e derivados, amarelo e azul, apresentando também, pigmentação no meio de cultivo. A coloração branca e derivados (37,5% - 3 actinobactérias) predominou entre os isolados, seguida da coloração cinza e derivados (25% - 2 actinobactérias) e das colorações amarela, creme e derivados e azul, com 1 actinobactéria (12,5%), cada. No meio ALA, foram observadas as seguintes colorações: branca e derivados (3 actinobactérias – 60 %), cinza (1 actinobactéria – 20%) e amarela (1 actinobactéria – 20%).

A coloração branca foi relatada como a mais predominante em estudos realizados por Masmeh (1992), os quais revelaram a distribuição da flora dos isolados na Jordânia e apresentam micélios de coloração branca como sendo os mais dominantes (43,6%).

Sonashia e colaboradores (2011) isolaram 30 actinobactérias, das quais 53,33% se classificaram como sendo do gênero *Streptomyces*, 10% como *Actinomadura* e 13,33% como *Micromonospora*. As características comuns a esses

gêneros são, por ordem: cadeia de esporos com enrolamento espiral, e em loop; cadeias de esporos retas e abertos, e aglomerados de conídios únicos em micélio.

As Actinobactérias podem apresentar colorações distintas em seus micélios. Nos micélios de actinobactérias do gênero *Streptomyces* já foram observadas as cores: verde, vermelho, azul, cinza, branco e violeta. Outro gênero que apresenta variações nas colorações do micélio são as actinobactérias que fazem parte do gênero *Actinomadura*, podendo apresentar as cores: azul, cinza, rosa, creme, branco, amarelo ou esverdeado. Ou seja, essas variações pertinentes à coloração do micélio aéreo são características peculiares a cada gênero de actinobactéria, assim como possui relação com o meio de crescimento (WILLIAMS et al,1989).

Os gêneros mais freqüentes de actinobactérias encontrados por Araújo e colaboradores (2000) nas raízes e folhas de *Zea mays* L. (milho) foram: *Microbispora* (62%), seguidos de *Streptomyces* e *Streptosporangium*, nos meios Ágar Amido-Caseína e Ágar Água. Os autores concluíram que existe grande diversidade de endofíticos que podem ser explorados biotecnologicamente.

5.2 Ensaio Primário da Atividade Antimicrobiana (Blocos de Gelose)

5.2.1 Ensaio Primário com os Fungos Endofíticos

Dos 237 isolados, foram selecionados 40 fungos endofíticos que possuíam diferentes características morfológicas, e estes foram utilizados no teste com bloco de gelose. Os fungos selecionados foram: F-10, F-12, F-17, F-18, F-24, F-61, F-67, F-69, F-72, F-73, F-76, F-81, F-84, F-88, F-90, F-91, F-94, F-100, F-102, F-103, F-105, F-115, F-131, F-133, F-137, F-139, F-158, F-160, F-165, F-167, F-169, F-178, F-180, F-188, F-190, F-197, F-199, F-202, F-220 e F-223.

Vale salientar que o objetivo desse ensaio foi selecionar os melhores micro-organismos que foram testados na segunda etapa (fermentação), reduzindo os custos totais.

Dos 40 isolados fúngicos testados, apenas sete (17,5 %) apresentaram atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testes (Tabela 5.4).

TABELA 5.4. – Média, em milímetros, dos halos de inibição apresentados pelos isolados fúngicos, frente aos micro-organismos testes, no bloco de gelose.

Micro-organismos Testes	Linhagens						
	F-10	F-61	F-100	F-105	F-169	F-178	F-188
<i>Bacillus subtilis</i>	20 ± 0.0	35 ± 0.0	16,4±0,94	16 ± 0.8	-	-	>10 ±0.0
<i>Candida albicans</i>	-	26 ± 0.94	15 ± 0.0	18,7 ±0,47	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	17 ± 0.0	23.7±0.47	16.7±0.47	>10 ±0.0	-	>10 ±0.0	-
<i>Escherichia coli</i>	-	25 ± 0.0	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	23,4 ±0.47	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	21,7 ±0.47	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	24,7 ±0.47	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	24,7 ±0.47	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	35 ± 0.0	-	>10 ±0.0	19 ±0.0	>10 ±0.0	>10 ±0.0
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	16 ±0.86	22,4 ±0,47	-	-	-	-	>10 ±0.0

Legenda: F – fungo; (MRSA) – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; - Sem atividade.

É possível observar que o isolado fúngico F-61 foi o único que inibiu todos os micro-organismos testes, apresentando médias dos halos de inibição superiores a 20 mm. As maiores médias apresentadas foram contra as bactérias *S. aureus* e *B. subtilis*, 35 mm, ambos apresentaram, mostrando que o isolado F-61 foi o mais ativo frente aos micro-organismos testes.

Souza e colaboradores (2004) testaram 79 linhagens isoladas das plantas *Palicourea longiflora* (aubl.) rich (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* Benthham (Loganiaceae) e obtiveram uma frequência de atividade de 6,33% contra *E. coli*, halo de inibição (19 mm). Estes resultados são inferiores aos encontrados no nosso trabalho.

Observa-se na Tabela 5.4 que o *B. subtilis* foi o micro-organismo teste mais sensível aos isolados fúngicos, com halos de inibição variando entre <10-35 mm, enquanto que *K. pneumoniae* foi o micro-organismo teste mais resistente, porém, foi inibido com halo de inibição de 21,7 mm pelo isolado fúngico F-61. A bactéria *S. aureus* resistente à meticilina só foi inibida quando testadas contra os fungos F-61,

F-10 e F-188. Entretanto, não apresentou halo de inibição expressivo em relação ao fungo F-188.

Gong e colaboradores (2009) testaram 26 fungos endofíticos isolados de *Dracaena cambodiana* (dragoeiro) e *Aquilaria sinensis*, dos quais, cinco (22,72%), 15 (57,69%) e cinco (22,72%) inibiram, respectivamente, *S. aureus*, *B. subtilis* e *C. albicans*. No presente trabalho, cinco (12,5%), cinco (12,5%) e três (7,5%) isolados fungicos inibiram os mesmos micro-organismos citados. Em relação ao *B. subtilis*, estes mesmos autores encontraram halos de inibição variando entre 9 - 22 mm para *S. aureus* e *C. albicans* os maiores halos de inibição observados foram de 15 mm e 17,3 mm, respectivamente. Esses resultados foram inferiores aos apresentados pelo isolado F-61, o qual apresentou halos de inibição de 35 mm para *S. aureus* e de 26 mm para *C. albicans*.

Siqueira e colaboradores (2011) realizaram um ensaio antimicrobiano com blocos de gelose confeccionados a partir de fungos endofíticos isolados das folhas de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta). Dos 203 isolados, 7,88 % (16) apresentaram atividade contra, pelo menos, um patógeno (bactéria Gram-positiva, Gram-negativa e fungo), com halos de inibição variando de 12 a 30 mm. No presente estudo, dos 40 fungos endofíticos testados, 17,5% (7) inibiram, no mínimo, um micro-organismo teste. Os halos de inibição variaram entre >10 a 35 mm, incluindo uma bactéria resistente à metilicina.

5.2.2. Ensaio Primário com as Actinobactérias

Os 13 isolados de actinobactérias foram submetidos ao ensaio primário. Cada isolado de actinobactéria foi semeado nos meios ISP-2 e ISP-4, sólidos, para comparação e escolha do melhor meio de cultivo para produção do metabólito secundário.

Os micro-organismos testes foram: *Escherichia coli* (UFPEDA-224), *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-86), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71), *Candida albicans* (UFPEDA-1007), *Fusarium oxysporum* (UFPEDA-2455), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA-138),

Staphylococcus aureus MRSA (UFPEDA-663), *K. pneumoniae* (UFPEDA-396) e *P. aeruginosa* (UFPEDA-416).

Os resultados da Tabela 5.5 no meio ISP-2 e ISP-4 mostram que o isolado Act-3 foi o mais resistente frente aos micro-organismos testes, uma vez que, só não inibiu o *M. smegmatis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *E. coli*. Observou-se que os isolados Act-6, Act-10, Act-7 e Act-5, foram os menos resistentes.

TABELA 5.5 – Média dos halos de inibição (mm) apresentados pelos isolados de actinobactérias, frente aos micro-organismos testes, nos meios ISP-2 e ISP-4, no ensaio primário.

Linhagens	Micro-organismos testes									
	2455	663	2	86	138	1007	71	224	396	416
Act-1	Isp-2	-	22±0.94	21±0.48	23,4±0.23	20±0.0	-	-	-	-
	ISP-4	-	20±0.0	19±0.94	22,4±0.86	18±0.0	-	-	-	-
Act-3	Isp-2	29,4±0.43	28,3±0.24	34,3±0.94	35,7±0.37	30,7±0.47	17,7±0.47	-	-	-
	ISP-4	20,7±0.49	22,4±0.86	29,4±0.23	28±0.0	25,7±0.88	-	-	-	-
Act-4	Isp-2	-	24,4±0.41	38,4±0.41	25,4±0.75	28,7±0.47	-	-	-	-
	ISP-4	-	23,4±0.23	28,4±0.75	27,7±0.88	32,7±0.47	-	36±0.0	-	-
Act-6	Isp-2	-	-	-	11±0.0	-	-	-	-	-
	ISP-4	-	-	-	17±0.0	-	-	-	-	-
Act-7	Isp-2	-	23±0.0	-	12±0.81	-	-	-	-	-
	ISP-4	-	17±0.0	-	-	20±0.0	-	-	-	-
Act-8	Isp-2	-	30,4±0.49	31,4±0.75	30,7±0.47	23,4±0.49	-	-	-	-
	ISP-4	-	-	22,4±0.49	16±0.0	-	-	-	-	-
Act-9	Isp-2	-	29±0.0	33±0.81	33,4±0.56	28,4±0.56	-	-	-	-
	ISP-4	-	24±0.0	26,7±0.47	29±0.0	25,4±0.56	-	-	-	-
Act-10	Isp-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ISP-4	-	17±0.81	17±0.0	-	20±0.0	-	-	-	-
Act-11	Isp-2	-	20±0.0	22±0.48	22±0.0	-	-	-	-	-
	ISP-4	-	-	18±0.0	20±0.0	-	-	-	-	-
Act-12	Isp-2	-	20±0.0	20±0.0	-	23,4±0.49	-	-	-	-
	ISP-4	-	15±0.0	14±0.48	-	22,4±0.49	-	-	-	-
Act-13	Isp-2	-	22±0.0	20±0.0	24±0.94	22±0.48	-	-	-	-
	ISP-4	-	21±0.0	15±0.48	18±0.48	15±0.0	-	-	-	-

Legenda: 2455 (*F. oxysporum*); 663 (*S. aureus* MRSA); 02 (*S. aureus*); 86 (*B. subtilis*); 138 (*E. faecalis*); 1007 (*C. albicans*); 71 (*M. smegmatis*); 224 (*E. coli*); 396 (*K. pneumoniae*); 416 (*P. aeruginosa*); Act. (actinobactéria); - sem atividade.

Dos treze isolados de actinobactérias testados no meio ISP-4, onze (84,61%) apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um micro-organismo

teste. Apenas os isolados Act-2 e Act-5 não apresentaram atividade inibitória para nenhum micro-organismo teste. Pode-se observar que as bactérias gram-negativas, *E. coli* (224), *K. Pneumoniae* (396) e a *P. aeruginosa* (416) foram os micro-organismos testes mais resistentes para todos os isolados de actinobactérias em ambos os meios. A bactéria *S. aureus* foi o micro-organismo mais sensível, sendo inibido por nove (69,23%) dos isolados de actinobactérias no meio ISP-4.

O isolado Act-3 foi o que apresentou os melhores halos de inibição frente aos micro-organismos testes, nos meios ISP-2 e ISP-4. A bactéria teste *S. aureus* Multiresistente só apresentou resistência aos isolados: Act-2, Act-5 e Act-6.

Rahman (2011) testou linhagens isoladas do solo de Rajshahi em Bangladesh e obteve resultados semelhantes aos descritos neste trabalho. Nenhuma actinobactéria isolada inibiu a bactéria Gram negativa *E. coli.*, contudo, mostraram atividade contra a *S. aureus*. Houssam e colaboradores (2009) também não encontraram resultados satisfatórios ao testar estirpes endofíticas de *Streptomyces* sp. contra *E. coli.*, mostrando a sua resistência. Os autores observaram que os micro-organismos testes: *B. subtilis* e *S. aureus*, também apresentaram resistência em todos os testes realizados.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a sensibilidade do *B. subtilis*, com inibição de 75% e 62,5% dos isolados de actinobactérias cultivados nos meios ISP-2 e ISP-4, respectivamente. A bactéria *S. aureus*, juntamente com o *S. aureus* MRSA, também foram sensíveis, apresentando um percentual de inibição de 50% e 75% nos meios ISP-2 e ISP-4, respectivamente.

O fato de as bactérias Gram-positivas terem apresentado uma maior sensibilidade aos metabólitos secundários produzidos, do que as bactérias Gram-negativas e aos fungos, pode-se inferir que está relacionado às diferenças estruturais observadas em ambas as paredes celulares, sendo essas diferenças, possíveis de alterar o desempenho do metabólito secundário produzido pelo micro-organismo (TORTORA, 2005). A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por 90% de peptidoglicanos, diferente das bactérias Gram-negativas que possuem uma parede celular mais complexa, além de uma membrana externa que não é observada nas bactérias Gram-positivas. Todos esses fatores interferem na resistência a antibióticos, observadas nessas espécies (TRABULSI et al, 2008).

Sonashia (2011), trabalhando com 30 isolados de actinobactérias endofíticas, observou que 28 apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura, sendo esta, uma cepa de *Candida albicans* multidroga resistente.

Ceylan e colaboradores (2008) realizaram um ensaio com bloco de gelose e testaram 15 amostras de *Streptomyces* sp. do solo da Turquia frente a micro-organismos testes, obtendo halos de inibição superiores a ≥ 30 mm, quando testados contra *S. aureus*. Nedialkova e colaboradores (2005) testaram linhagens de actinobactérias isoladas da Antártida frente a micro-organismos testes e também observaram forte resistência da bactéria Gram-negativa *E. Coli*, uma vez que esta só foi inibida por apenas uma linhagem de actinobactéria, e sensibilidade do *B. Subtilis*, que foi inibido por 60% das linhagens testadas. Os resultados obtidos por esses autores foram semelhantes ao observado no presente trabalho. Thakur e colaboradores (2007) testaram a atividade antibacteriana de 110 isolados de *Streptomyces* do solo de áreas florestais indianas e obtiveram uma percentual de 59,09% de amostras apresentando atividade antibacteriana, seguidos de 42,72% de amostras com atividades antifúngicas e 30% com atividade para ambos os espectros.

5.3 Ensaio Secundário da Atividade Antimicrobiana

5.3.1 Fermentação Líquida com os Fungos Endofíticos

Para essa etapa foi selecionado o fungo F-61, o qual apresentou o melhor resultado durante o ensaio primário.

Os resultados da média dos halos de inibição obtidos pelo isolado Fungo F-61 contra os micro-organismos testes, na fermentação líquida, estão mostrados na Tabela 5.6.

TABELA 5.6 - Média dos halos de inibição, em mm, obtidos pelo Fungo F-61 contra os micro-organismos testes, na fermentação líquida.

Mic. Testes	24h		48h		72h		96h		120h	
	MPE	M1	MPE	M1	MPE	M1	MPE	M1	MPE	M1
<i>B. subtilis</i> (86)	14±0.0	-	16,3±0.94	17±0.81	25±0.94	12±0.81	22,3±0.47	15±0.0	22,3±0.47	15,6±0.47
<i>E. coli</i> (224)	-	-	21±0.81	-	22±0.0	-	24,3±1.9	20±0.0	15±0.0	-
<i>F. oxysporum</i> (2455)	12,6±0.47	-	15,6±0.47	-	10±0.0.	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (396)	14±0.81	-	17,6±0.47	-	18±0.0.	-	27,3±0.94	19,6±0.47	30±2.8	19,3±0.94
<i>M. smegmatis</i> (71)	14,3±0.47	-	16,7±0.94	-	13,6±0.47	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (416)	-	-	17,6±0.47	-	21,6±0.47	23,3±0.47	17±0.0	24,3±0.47	-	30±0.0
<i>S. aureus</i> (02)	15±0.0	-	31,3±0.47	21±0.47	29,3±0.47	11±0.81	15,3±0.47	-	-	-
<i>S. aureus</i> MRSA (663)	15±0.0	-	26,4±0.81	-	15±0.81	-	-	-	-	-

Os resultados expressos na Tabela 5.6 demonstram que o Fungo F-61, crescido em meio MPE em fermentação líquida, produziu metabólitos bioativos mais eficientes em diferentes tempos de incubação para as bactérias, *Staphylococcus aureus* (48 h), *B. subtilis* (72h), *E. coli* (96h), *K. pneumoniae* (120h), mostrando, provavelmente, que o isolado fúngico F-61, crescido no mesmo meio de cultura contendo os mesmos nutrientes, pode produzir mais de um metabólito bioativo em diferentes tempos e em presença de diferentes tipos de bactérias patogênicas. Entretanto, para *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se que o Fungo F-61, em meio M1, com 120 horas de incubação, apresentou melhor halo de inibição (30 mm) em relação ao meio MPE, que apresentou o seu melhor halo de inibição com 72 horas (21,7 mm).

Hamada e colaboradores (1974) citaram o meio MPE como forte indutor para a produção de uma maior quantidade de metabólitos secundários em relação a outros meios. Essa circunstância, provavelmente, está relacionada ao fato de o MPE possuir uma riqueza de proteínas, carboidratos e lipídeos em sua composição, o que, possivelmente, minimizariam esforços maiores dos micro-organismos para a produção de metabólitos primários, estimulando uma maior produção de metabólitos secundários, uma vez que suas vias metabólicas se concentrariam na produção destes compostos.

Foi realizada a fermentação líquida utilizando o meio CZapeck, porém, os resultados foram insatisfatórios. Assim como foi observado por Tonial (2010), utilizando o meio CZapeck com isolados da Aroeira-Vermelha, a eficiência de alguns meios de fermentação em relação a outros varia, pois, a composição do meio pode interferir diretamente nessa ocorrência, visto que alguns meios não suprem as necessidades metabólicas do endofítico testado, proporcionando uma necessidade de o micro-organismo degradar e utilizar seus metabólitos secundários, que seriam excretados no meio, como fonte de nutrientes para auxiliar no seu metabolismo.

Souza e colaboradores (2004), ao testarem o líquido metabólico, obtido a partir da fermentação em meio BD acrescido de 0,2% de extrato de levedura, de 79 linhagens de fungos endofíticos isolados das plantas *Palicourea longiflora* (aubl.) rich (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* bentham (Loganiaceae), obtiveram uma percentual de 24,05% fungos que apresentaram atividades antagônicas contra, pelo menos, um micro-organismo teste utilizado. No presente estudo, 80% e 50% dos micro-organismos testes foram inibidos pelos metabólitos secundários produzidos pelo Fungo F-61 quando fermentado nos meios MPE e M1, respectivamente.

Observou-se que 84,61% dos metabólitos bioativos que apresentaram halo de inibição, tiveram seus melhores rendimentos com menos de cinco dias de incubação. Tonial (2010) obteve resultados semelhantes com os extratos produzidos, pois, 42,5% desses extratos apresentaram os melhores resultados inibitórios com menos de cinco dias de incubação.

Os dois fungos (*C. albicans* e o *F. oxysporum*) testados foram inibidos pelo Fungo F-61 durante o ensaio primário, contudo mostraram-se resistentes na fermentação líquida em todos os meios. De acordo com Owen e Hundley (2004) a planta hospedeira pode interferir diretamente na produção do metabólito bioativo por parte do endofítico. Depois de isolado, o endofítico pode cessar a produção desse princípio imediatamente, ou após determinado período de tempo. Dessa forma, uma atividade anteriormente observada, pode não ser exibida em experimentos subsequentes. Portanto, são necessários experimentos que visem desvendar quais fatores podem contribuir para a continuidade da síntese desses compostos in vitro.

Huang e colaboradores (2001) realizaram testes de atividade antifúngica com caldos fermentativos (meio líquido dextrose de batata) de 172 estirpes de fungos

endofíticos e obtiveram uma percentual de 52,3% de atividade antifúngica, com halos de inibição variando entre 7 e 46 mm, contra pelo menos um micro-organismo testado. Resultados como esses indicam que os fungos endofíticos podem atuar como uma nova fonte para a produção de agentes antimicrobianos.

Fernandes e colaboradores (2009) testaram extratos brutos de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica* L. (café) frente a bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, e observaram que todos os extratos inibiram, pelo menos, um dos micro-organismos testes. O extrato bruto de *Alternaria alternata* apresentou os maiores halos de inibição: *C. albicans* (16 mm) e *S. aureus* (27 mm). No presente trabalho, a fermentação líquida do Fungo F-61 com 48 horas de incubação, proporcionou um halo de inibição de 31,3 mm para *S. aureus*.

A análise da Figura 5.3 permite observar que no meio MPE a maior produção de biomassa pelo Fungo F-61 acontece com 72 horas de incubação, ou seja, a partir desse período é cessada essa produção e ocorre um decréscimo dessa biomassa. O período anterior às 72 horas é destinado à produção de metabólitos secundários (fase exponencial), à medida que se aproxima da fase estacionária (período em que ocorre um esgotamento de nutrientes essenciais, cessando o crescimento exponencial e sendo observado um declínio na concentração de células viáveis) são produzidos os metabólitos secundários. De acordo com a Figura 5.6 os melhores tempos de produção do princípio ativo acontecem justamente no período entre 48 – 72 horas de incubação. Entretanto, alguns metabólitos secundários continuam sendo produzidos após 72 horas. O que sugere que diferentes princípios ativos são produzidos.

As variações observadas quanto à produção dos princípios bioativos evidenciam que cada micro-organismo endofítico pode atuar de forma melhor em diferentes meios de cultivo e tempos de incubação. Siqueira e colaboradores (2011), ao realizarem fermentação com fungos endofíticos no meio extrato de malte líquido (ME), observaram que o melhor tempo de produção do metabólito secundário do fungo endofítico isolado da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham. Variou entre 72-96 horas.

Pinto (2003) relatou em seus estudos que o declínio na atividade antimicrobiana dos metabólitos bioativos presentes no líquido da fermentação, à

medida que passa o tempo, é resultado direto da ação do próprio micro-organismo, que degrada o composto formado. Okafor (2007) propõe que só após a fase de crescimento celular exponencial, é que ocorre a produção dos metabólitos secundários. Sendo assim, o tempo de produção dos metabólitos secundários com capacidade de inibir micro-organismos patogênicos varia de acordo com a espécie.

O pH do líquido metabólico do Fungo F-61 nos três meios de incubação se mantiveram praticamente constantes ao longo das 120 horas. No meio MPE foi observado que prevaleceu um pH muito próximo do neutro, o que sugere que este é o pH ótimo de atuação do Fungo F-61 no meio MPE para a produção de metabólitos secundários. Nos meios M1 e CZapeck o pH continuou neutro durante todo o período de incubação. Contudo, em meios e em pHs diferentes outros fungos endofíticos podem produzir metabólitos bioativos, como foi observado por Siqueira e colaboradores (2011) ao encontrarem um pH 5 ótimo de atuação de fungos endofíticos com atividade para *S. aureus*, *B. subtilis* e *K. pneumoniae*.

Os resultados obtidos nessa etapa evidenciam que os metabólitos excretados no meio apresentam uma atividade antimicrobiana que possuem relação direta com o tempo total de incubação, uma vez que os micro-organismos testes foram inibidos em tempos de incubação diferentes.

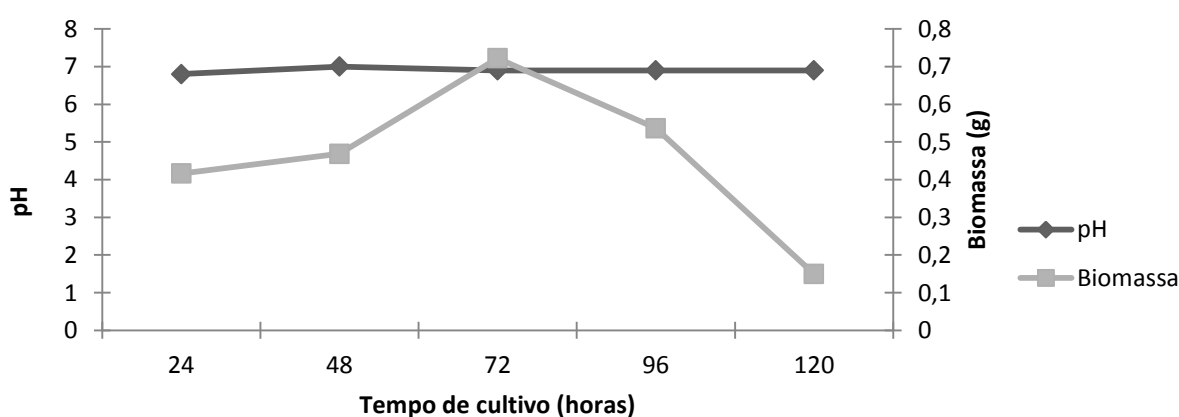


FIGURA 5.3 – Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio MPE.

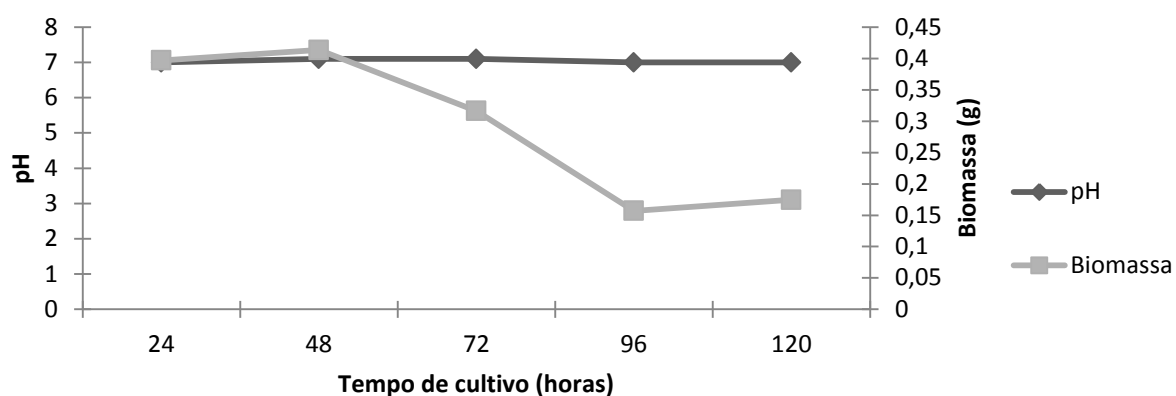


FIGURA 5.4 – Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio M1.

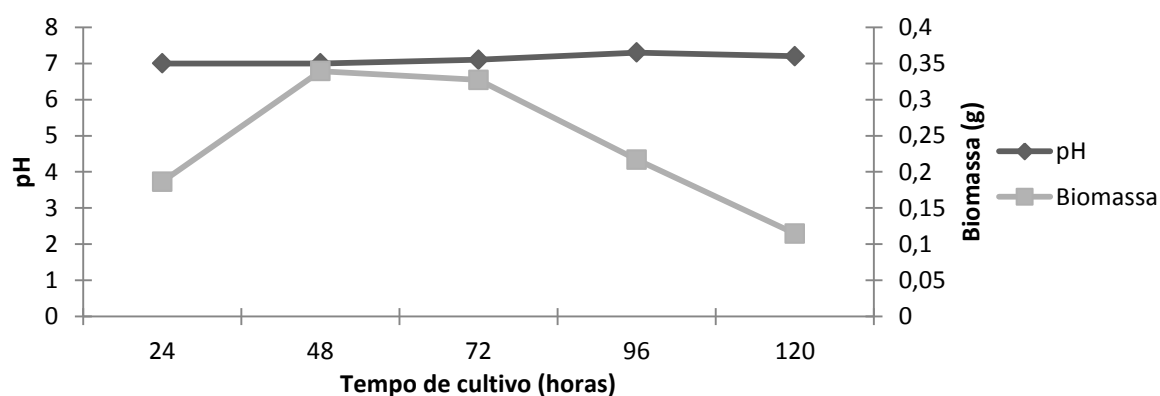


FIGURA 5.5 – Variação do pH e da biomassa x tempo, do Fungo F-61 em fermentação líquida no meio CZpeck.

5.3.2 Fermentação Líquida com o Isolado de Actinobactéria Act-3

Na Tabela 5.7 encontram-se os resultados da média dos halos de inibição obtidos a partir da fermentação líquida da actinobactéria Act-3 nos diferentes meio de cultura.

TABELA 5.7 – Resultado das médias dos halos de inibição, em mm, obtidos pela actinobactéria Act-3 contra os micro-organismos testes, em fermentação líquida.

Tempo	Meios	Micro-organismos testes									
		Bs.	Ec.	Fo.	Kp.	Ms.	Pa.	Sa	SaM.	Ef.	Ca.
24h	M1	-	-	-	-	20±0.0	-	12±0.81	-	-	13±0.0
	MPE	10±0.0	-	15±0.0	-	25±0.81	-	-	-	-	15±0.81
	ISP-2	20±0.0	-	15±0.81	-	25,3±0.47	-	18±0.94	15±0.94	12±0.81	18±0.0
48h	M1	15,3±0.47	-	10±0.81	-	30±0.0	-	13±0.0	10±0.0	16±0.94	25±0.81
	MPE	12±0.0	-	20±0.0	-	40±0.0	-	10±0.81	18±0.47	15±0.81	20±0.0
	ISP-2	24±0.0	-	23±0.81	-	40±0.0	-	28±0.47	20±0.0	21±0.81	28±0.0.
72h	M1	18±0.0	-	13±0.0	-	26±0.94	-	15±0.0	10±0.0	17±0.94	13±0.81
	MPE	18,3±0.81	-	14±0.0	-	30,3±0.47	-	18±0.0.	15±0.81	20±0.0	10±0.81
	ISP-2	22±0.0	-	20±0.81	-	32±0.81	-	23±0.81	17±0.0	19±0.81	22±0.47
96h	M1	20±0.81	-	11±0.81	-	25±0.47	-	20±0.81	10±0.0	20±0.0	-
	MPE	20±0.81	-	14±0.0	-	30±0.47	-	15±0.81	16±0.0	20±0.81	-
	ISP-2	20±0.0	-	15±0.0	-	30±0.81	-	14±0.47	12±0.94	20±0.0	20±0.47
120h	M1	18±0.81	-	-	-	26±0.81	-	14±0.0	12±0.0	15±0.81	-
	MPE	20±0.0	-	-	-	30±0.0	-	15±0.0	15±0.81	20±0.81	-
	ISP-2	20±0.0	-	14±0.0	-	30±0.81	-	14±0.0	11±0.0	20±0.47	18±0.0

Legenda: - MPE; - M1; ISP-2; Legenda: Fo. (*F. oxysporum*); SaM. (*S. aureus* MRSA); Sa. (*S. aureus*); Bs. (*B. subtilis*); Ef. (*E. faecalis*); Ca. (*C. albicans*); Ms. (*M. smegmatis*); Ec. (*E. coli*); Kp. (*K. pneumoniae*); Pa. (*P. aeruginosa*); - Sem atividade.

Dos três meios utilizados na fermentação do actinobactéria Act-3, o ISP-2 foi o que apresentou os melhores resultados, uma vez que foram observados halos de inibição maiores que 20 mm contra sete (70%) micro-organismos testes. O melhor tempo de produção do princípio bioativo foi de 48 horas para todos os micro-organismos que se mostraram sensíveis. A *E. coli* (224), *P. aeruginosa* (416) e *K. pneumoniae* (396) apresentaram resistência em todos os meios e durante as 120 horas em que ocorreu a fermentação. O micro-organismo *M. smegmatis* (71) foi o mais sensível em todos os meios testados, pois foi inibido com halos de inibição superiores a 30 mm.

Assim como ocorreu no teste com blocos de gelose, não foi observada inibição de micro-organismos Gram-negativos. Resultados semelhantes a esse, foi encontrado por Thakur e colaboradores (2007) ao testarem a atividade antimicrobiana de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, oriundas da rizosfera de florestas indianas, e observarem a resistência das bactérias Gram-negativas testadas. Entretanto, os testes realizados com bactérias Gram-positivas demonstraram uma maior sensibilidade dessas diante dos metabólitos produzidos pelas actinobactérias endofíticas.

Ellaiah e colaboradores (2002) realizaram uma fermentação submersa com 16 isolados de actinobactérias encontradas em sedimentos do Rio Krishna de Andhra Pradesh, e testaram suas respectivas atividades antimicrobianas, obtendo uma percentual de 40% de atividade antibacteriana, 30% antifúngica e 16,6% inibiram fungos e bactérias. No presente trabalho observou-se que a actinobactéria Act-3 apresentou resultados satisfatórios, visto que inibiu 75% das bactérias testes e 100% dos fungos.

Cunha e colaboradores (2009) ao testarem a fermentação de uma bactéria endofítica nos meios ISP-2, MPE e M1, observaram que o meio ISP-2 favoreceu uma melhor produção de metabólitos bioativos frente ao *B. Subtilis*, com halos de inibição superiores a 20 mm. Contudo, os meios MPE e M1 estimularam, de forma menos eficiente, à produção desses metabólitos. Porém, no presente trabalho o *B. Subtilis* foi inibido nos três meios de fermentação e em diferentes períodos chegando a apresentar halos de inibição de até 20 mm. Entretanto, como foi observado na Tabela 5.7., o meio ISP-2 foi o meio mais eficiente nos testes antimicrobianos em geral. Logo, é importante salientar que a composição do meio, assim como a quantidade da fonte de carbono presente em cada um deles, exibe uma relação direta com a produção do metabólito, uma vez que pode atuar na repressão de enzimas biossintéticas (SANCHEZ e DEMAINE, 2002). É a partir desse princípio que são realizados estudos que visam obter a otimização do meio de cultivo fermentativo através de alterações nas concentrações dos ingredientes e seus respectivos nutrientes. Abd-allah e El-mehalawy (2002) afirmam que o metabolismo celular do actinomiceto em condições excessivas de nutrientes estimula a produção de massa celular, ao invés de metabólitos secundários, e, quando acontece uma depleção de nutrientes essenciais, ocorre um deslocamento do ciclo celular para a fase

estacionária, sendo esse o período em que os metabólitos primários começam a ser utilizados na produção dos metabólitos secundários.

Na Figura 5.8 observa-se que ocorre um aumento da biomassa da actinobactéria Act-3 no meio ISP-2 durante às primeiras 48 horas (fase exponencial), após esse período a biomassa se mantém constante até 72 horas (fase estacionária) o que indica que cessou o crescimento do micro-organismo e deu início a uma maior produção de metabólitos secundários bioativos, e foi nesse período que a actinobactéria Act-3 inibiu de forma mais eficiente os micro-organismos testes. Porém, a produção inicial de compostos antimicrobianos em todos os meios ocorre, para alguns micro-organismos testes, já com 24 horas de incubação. Entretanto, nos meios utilizados, alguns metabólitos bioativos continuaram sendo produzidos até 120 horas de fermentação. Reddy e colaboradores (2011) encontraram o início da produção de metabólitos antimicrobianos a partir da fermentação de *Streptomyces rochei*, com 48 horas de incubação, um crescimento micelial com 72 horas e foram atingidos os níveis ótimos de atividade após 120 horas de incubação.

Em relação ao pH, é possível observar que não houve uma variação significativa nos diferentes tempos de fermentação, onde em ambos os meios esses pHs oscilaram entre levemente ácido, neutro e levemente alcalino (Figura 5.6, Figura 5.7 e Figura 5.8). O meio ISP-2 manteve o seu pH neutro estável (7,0) durante toda a fermentação, sendo, portanto, 7,0 o pH ótimo de atuação da actinobactéria Act-3, contudo, no meio MPE, os micro-organismos testes foram inibidos de forma mais eficiente com maiores halos de inibição durante 48-72 horas de incubação, com alteração do pH, ou seja, provavelmente são produzidos metabólitos bioativos distintos que atuam de forma melhor em diferentes pHs. Visto que, alterações do pH afetam diversos processos celulares, tais como a regulação e a biossíntese de metabólitos secundários (SOLE *et al.*, 1997). Reddy e colaboradores (2011) também observaram uma influência significativa do pH do meio líquido ao fermentar *Streptomyces rochei* visando à produção de metabólitos bioativos. No seu estudo foi obtido um pH ótimo variando entre 7,5 e 8,0, o qual estimulou a produção de metabólitos bioativos e o crescimento do micélio no meio.

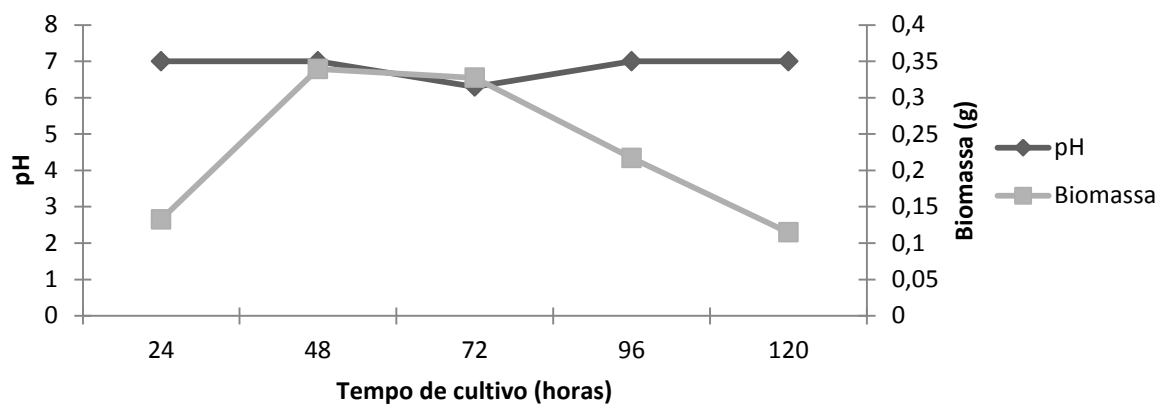


FIGURA 5.6 – Variação do pH e da biomassa x tempo, da actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio MPE.

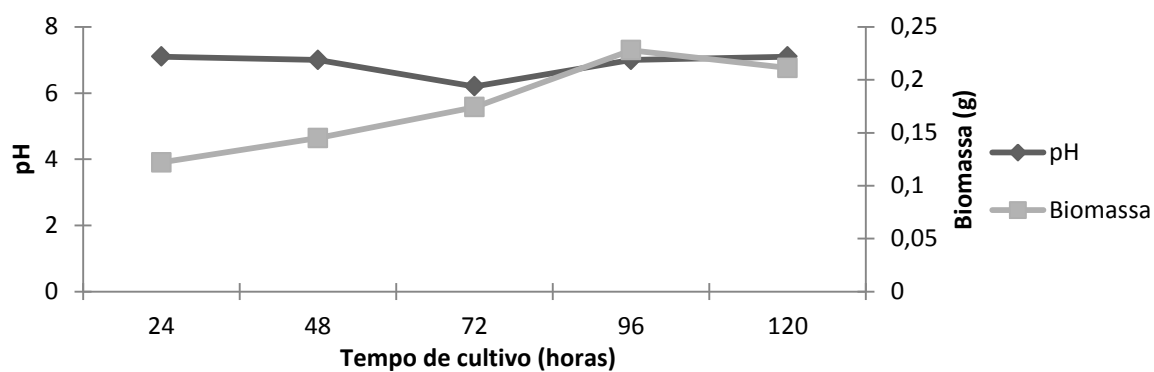


FIGURA 5.7 – Variação do pH e da biomassa x tempo, do actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio M1.

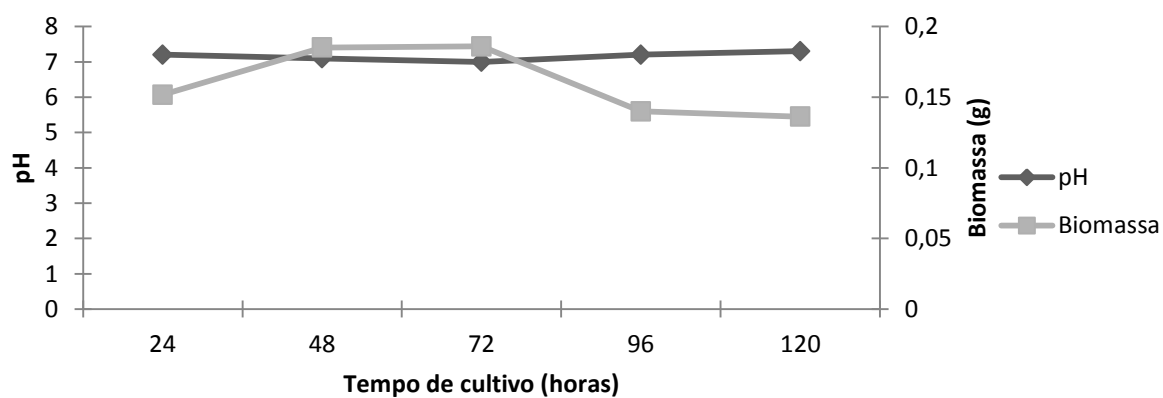


FIGURA 5.8 – Variação do pH e da biomassa x tempo, da actinobactéria Act-3 em fermentação líquida no meio ISP-2.

5.4 Identificação dos Micro-organismos Testes

5.4.1 Identificação dos Fungos Endofíticos

As quatro linhagens de fungos endofíticos que apresentaram os melhores resultados iniciais nos testes realizados foram identificados no Departamento de Micologia da UFPE por microscopia óptica em nível de subespécie e por caracterização macromorfológica, e estes estão citados na Tabela 5.8.

TABELA 5.8 – Identificação das Linhagens de fungos endofíticos isoladas da folha da Aroeira-Vermelha, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.

Isolado	Gênero	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento	Meio de cultivo
F-10	<i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	verde/esporeado	castanho	ausente	Sabouraud
F-100	<i>Aspergillus japonicus</i> Saito	marrom/esporeado	preto	ausente	Sabouraud
F-105	<i>Penicillium oxalicum</i> Currie e Thom	verde escuro/esporeado	castanho	presente	Sabouraud
F-61	<i>Mycelium stereo</i>	marrom/algodonoso	creme	presente	Sabouraud

Estudos realizados com o fungo *Penicillium brevicompactum* constataram a produção de três toxinas que estão presentes em seus esporos e são responsáveis por provocarem respostas tóxicas específicas apresentando toxocinéticas diferentes. Além disso, essas toxinas promovem a indução de respostas inflamatórias significativas em células pulmonares de ratos, assim como uma citotoxicidade induzida pela toxina A brevianamide através do aumento na concentração de LDH e LBA. Isso tudo pode explicar alguns dos efeitos internos decorrentes da associação com exposições de esporos de *Penicillium* em ambientes internos (RAND et al, 2005). Também foram identificados quatro novos compostos ((+)-breviones B, C, D, e E), com atividade antimicrobiana e potenciais agentes alelopáticos, a partir de

extratos fermentativos produzidos pelo *Penicillium brevicompactum* Dierckx (MACÍAS et al, 2000). Vários compostos apresentando atividade de interesse biológico já foram isolados de *Penicillium brevicompactum*, entre eles: ácido micofenólico (BARTMAN et al, 1981), fenóis (ANDERSEN et al, 1991), *N* –(2-metil-3-oxodecanoil) pirrol e *N*- (2-metil-3-oxodec-8-enoil) pirrol, sendo este último responsável por apresentar atividade inseticida (CANTÍN et al, 1998). Bollen e colaboradores (1971) isolaram *Penicillium brevicompactum* a partir de pecíolos senescentes de ciclâmen e constataram uma resistência desse micro-organismo frente aos antifúngicos Benomil, Metil-tiofanato, Tiabendazol e Furidazol.

Aspergillus japonicus Saito, que é um fungo comumente encontrado em solos, também já foi notado como endofítico presente na superfície de algumas sementes de colheitas de cereais. A partir desse micro-organismo foi isolado o ácido secalônico F (SAF), que estimulou o crescimento de plântulas de *Zea mays* L. (milho) (ZENG et al, 2004) e a enzima hidrolítica β -galactosidase (DECKER et al, 2000). Vinokurova e colaboradores (2007) e Facchini e colaboradores (2011), ambos trabalhando com o fungo *Aspergillus japonicus* Saito, observaram a produção do ácido α -ciclopiazônico e de enzimas fibrolíticas, respectivamente. Essas enzimas fibrolíticas, quando otimizadas em meios contendo resíduos agroindustriais com peptona e extrato de levedura, induzem à formação de xilanase e de outras enzimas que apresentam um importante potencial de aplicação na alimentação animal.

O fungo *Penicillium oxalicum* Currie e Thom, por sua vez, também foi isolado como endofítico presente em tecidos de *Coffea arabica*, *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica* (café) coletados na Colômbia, Havaí e em um viveiro de plantas locais, em Maryland (VEGA et al, 2005). Ikotun e colaboradores (1984) observaram a produção de diversos compostos por *Penicillium oxalicum* Currie e Thom: exo-poligalacturonase, endo-poligalacturonase, liase de pectato, celulase C_x , celobiase, B-glucosidase, xilanase, galactanase e arabinanase em cultura e em tecidos infectados de inhame, onde alguns desses atuaram degradando a celulose em glicose e celobiose, assim como a hemicelulose em xilose, galactose e arabinose.

Estes resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho, onde foram observados que estes mesmos micro-organismos isolados apresentaram metabolismo ativo produzindo substâncias com atividades de interesse biotecnológico.

Geralmente os fungos endofíticos isolados que não esporulam são denominados de “micélios *sterilia*, *Micelium stereo* ou micélio estéril” e são agrupados em morfoespécies com base nas semelhanças observadas nas características culturais, tais como: produção de pigmentação e exsudatos, formas da margem, taxa de crescimento e aspecto da superfície do micélio (LACAP et al, 2003). Contudo, existem divergências em relação a essa forma de agrupamento dos micélios *sterilia* em morfoespécies (ARNOLD et al, 2000), visto que essa relação pode não refletir a real filogenia da espécie pois as morfoespécies não são consideradas entidades taxonômicas reais. Portanto, são necessárias técnicas alternativas para elucidar esse problema e identificar esses fungos em nível de família ou gênero, assim como auxiliar na validação do conceito de morfoespécie (GUO et al, 2003). As técnicas moleculares são usualmente utilizadas com sucesso para a identificação filogenética dos fungos endofíticos que apresentam este tipo de micélio (GUO et al, 2000). A linhagem *M. stereo* F-61 foi encaminhada para o Departamento de Micologia da UFPE onde será realizada identificação molecular.

É freqüente o isolamento de fungos endofíticos que apresentam o micélio estéril sem produção de esporos. Guo e colaboradores (2003) isolaram de *Pinus tabulaeformis* 18 fungos do tipo *Micelium stereo* que foram agrupados em morfoespécies e posteriormente identificados a nível molecular. Lacap e colaboradores (2003), enquanto estudavam as folhas de *Magnolia liliifera*, isolaram grande quantidade de fungos endofíticos com micélios estéreis, os quais foram agrupados em até 31 morfoespéceis.

Schulz e colaboradores (2002) isolaram de *Nerium oleander* (loendro) um total de 42 cepas de fungos endofíticos, das quais 21 (50%) apresentaram falta de estruturas de esporulação e foram agrupadas como Micélios *sterilia* spp.. Estes fungos colonizaram as folhas e caules da planta em questão e apresentaram produção de metabólitos secundários. Huang e colaboradores (2009) obtiveram um percentual de 14,5% (4) de fungos *Mycelia sterilia* isolados de plantas medicinais chinesas. No presente trabalho, das quatro espécies identificadas, 25% (1) apresentaram micélio estéril. Promputtha e colaboradores (2005) encontraram fungos endofíticos *Mycelia sterilia* a partir de amostras de pecíolos, nervuras, folhas, ramos e galhos de árvores de *Magnolia liliifera*.

5.4.2 Identificação das Actinobactérias

5.4.2.1 Caracterização Macroscópica e Taxonômica

As 13 actinobactérias isoladas passaram por uma observação macroscópica e as características de seus respectivos micélios aéreos, bem como a produção de pigmentos, foram registradas. Foi utilizada a técnica taxonômica clássica, que permitiu identificar as actinobactérias em nível de gênero a partir da observação da grande variedade morfológica existente nas diferentes estruturas, tais como: formação de micélios aéreos e ramificação do micélio sobre o substrato, como no caso das *Streptomyces* spp., que apresentam micélio ramificado e em forma de espiral (RAJU et al, 2010), arranjos em forma de cocobacilo (*Arthrobacter*), hifas fragmentadas em várias células baciliformes e cocóides (*Nocardia* spp.) (VENTURA et al, 2007), fragmentação do micélio e produção de esporos. Nas espécies produtoras de esporos também são observados o tipo e o número de esporos, assim como o seu arranjo, podendo os esporos ser únicos (*Micromonospora* e *Thermomonospora*), em pares longitudinais (*Microbispora*), localizados no interior de um esporângio (*Actinoplanes* e *Streptosporangio*) e em cadeias de esporos (*Nocardia* e *Streptomyces*) (BULL, 2004).

A coloração mais predominante entre as linhagens isoladas foi o branco e suas derivações com 53,84% dos isolados (7), seguidos de cinza e derivações com 23% (3) e creme e derivações, amarelo e azul, com 7,69% (1) cada (Tabela 5.7).

O gênero *Actinomadura* pode apresentar actinobactérias com micélios aéreos formando várias colorações como marrom, azul, creme, cinza, rosa, vermelho, verde, amarelo ou branco. A ausência do micélio pode implicar em colônias com consistência cartilaginosa (TRUJILLO et al, 1997; BOIROM et al, 1993).

Após a determinação das características macroscópicas de cada linhagem, estas foram investigadas taxonomicamente em microscópio óptico e identificadas em nível de gênero a partir da observação de suas cadeias de esporos. Os dois gêneros identificados entre as linhagens foram: *Streptomyces* (Figura 5.9-A.), normalmente muito assemelhado às bactérias devido à sua morfologia filamentosa. Contudo, distingue-se destas pelo diâmetro reduzido de seu filamento vegetativo. Apresentam micélios com cadeias de esporóforos curtos e espiralados ou cadeias

longas com esporos maduros, além de cadeias com micélio aéreo vegetativo ramificado e bem desenvolvido, não fragmentados (YASHCHUK e MIYAZAKI, 2007). Também possuem semelhanças com fungos filamentosos podendo crescer como hifas ramificadas formando um micélio vegetativo que se dispersa através de esporos (HOPWOOD, 2009), e *Actinomadura* (Figura 5.9-B), que apresenta cadeia de micélio com variadas formas, tais como: linear, em forma de gancho (ligeiramente curvadas) ou espiral. Quando espiral, se assemelham às *Streptomyces*, podendo ser confundidas. A diferença está no tamanho de seus esporos, pois as cepas de *Streptomyces* possuem esporos e hifas com tamanho semelhantes, ao contrário das cepas de *Actinomaduras*, que apresentam cadeias de esporos maiores que suas hifas em até 15 vezes. A análise macroscópica desse gênero permite observar um micélio vegetativo comum, abundante e sem fragmentações (TRUJILLO et al, 1997; BOIROM et al, 1993).

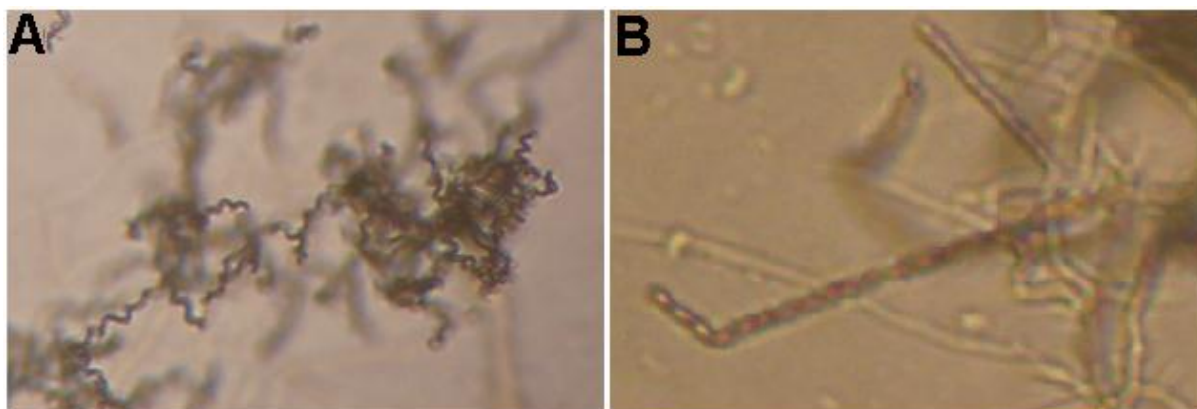


Figura 5.9 – Cadeias de esporos das actinobactérias dos gêneros: *Streptomyces* sp. (cadeias de esporóforos curtos e espiralados) (A) e *Actinomadura* sp. (cadeias retas e pequenas de esporos, sedimentadas e ligeiramente curvadas) (B).

O gênero mais predominantemente encontrado foi o *Streptomyces*, com 76,92% dos isolados (10), seguidos do gênero *Actinomadura*, com 23,07% (3) (Tabela 5.9).

Nonoh e colaboradores (2010) também isolaram uma grande variedade de *Streptomyces* produtoras de pigmentos, presentes no solo de parques florestais no Quênia. Assim como no presente trabalho, foram observados micélios com crescimento filamentoso formando uma rede ramificada com conidióforos, que são características pertinentes aos *Streptomycetos* (WATVE et al, 2001).

A Tabela 5.9 representa as identificações taxonômicas e macroscópicas de cada linhagem de actinobactéria isolada.

TABELA 5.9 – Linhagens de actinobactérias isoladas, com seus respectivos gêneros e características macroscópicas.

Isolado	Gênero	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento	Meio de cultivo
Act. 1	<i>Streptomyces</i> sp.	creme/amarelo	amarelo/laranja	presente	ISP-2
Act. 2	<i>Streptomyces</i> sp.	amarelo	amarelo	presente	ISP-2
Act. 3	<i>Streptomyces</i> sp.	branco	branco	presente	ISP-2
Act. 4	<i>Actinomadura</i> sp.	branco	branco	presente	ISP-2
Act. 5	<i>Streptomyces</i> sp.	branco/amarelo	incolor	ausente	ISP-2
Act. 6	<i>Actinomadura</i> sp.	branco/cinza	castanho	ausente	ISP-2
Act. 7	<i>Streptomyces</i> sp.	cinza/azul	marrom	ausente	ISP-2
Act. 8	<i>Streptomyces</i> sp.	branco	amarelo	presente	ISP-2
Act. 9	<i>Streptomyces</i> sp.	branco	amarelo	presente	ISP-2
Act.10	<i>Streptomyces</i> sp.	cinza	marrom	ausente	ISP-2
Act.11	<i>Streptomyces</i> sp.	azul	castanho	ausente	ISP-2
Act.12	<i>Actinomadura</i> sp.	branco/amarelo	amarelo	presente	ISP-2
Act.13	<i>Streptomyces</i> sp.	cinza	castanho	presente	ISP-2

Legenda: Act.: actinobactéria.

Também foi observado que 61,53% das actinobactérias (8) produziram pigmentação no meio ISP-2, e 38,46% (5) não produziram. As colorações dos pigmentos variaram entre amarelo e marrom. Observa-se na Tabela 5.7 que a predominância da cor do micélio aéreo foi branco e derivados (sete actinobactérias - 53,84%) e cinza (três actinobactérias - 23,07%); Do micélio vegetativo foi amarelo e derivados (5 actinobactérias – 38,46%) seguidos de branco, marrom e castanho, ambos com 15,38%.

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas por produzir uma grande variedade de pigmentos responsáveis por mudar a coloração dos micélios aéreos assim como do substrato (ANDERSON E WELLINGTON, 2001).

Os resultados do presente trabalho são semelhantes, quanto a variedade das colorações dos micélios, com os de Ceylan e colaboradores (2008) que, trabalhando com a rizosfera de plantas da província de Mugla, também isolaram actinobactérias produtoras de pigmentos solúveis no substrato encontrando as seguintes cores: marrom-amarelo, violeta e amarelo. A coloração predominante do micélio aéreo foi a

branca (73,3%), seguidas de cinzento (20%) e violeta (6,6%). A cor dos micélios vegetativos variou entre marrom-amarelo (93,3%) e violeta (6,6%).

5.4.2.2 Identificação Molecular

Após o processo de extração do DNA da actinobactéria Act-3, foi realizada a amplificação do gene DNA 16S através de uma reação de PCR. Após a confirmação da amplificação, foi realizado um sequenciamento da amostra.

A análise da sequência do código genético de *Streptomyces* sp. Act-3. Gerou um fragmento de 1500 pb que apresentou 96% de identidade com *S. kunmingensis* (NBRC 14463).

Actinobactérias pertencentes à espécie *S. kunmingensis* já foram citadas como endofíticos colonizadores de tecidos vegetais. Li e colaboradores (2012) isolaram de raízes de *Artemisia annua* L., coletadas na província de Yunnan, sudoeste da China, três estirpes de actinobactérias filamentosas que foram agrupadas, a partir de análises moleculares, como *Streptomyces kunmingensis* NBRC 14.463 (T), com 98,5-98,6% de similaridade. Essas cepas apresentaram micélio substrato extensivamente ramificado, com hifas aéreas abundantes que se diferenciam em esporos. Essas características estão de acordo com as observadas na *S. kunmingensis* Act-3 isolada da Aroeira-Vermelha, no presente estudo.

Alguns autores citaram o *Streptomyces kunmigensis* como uma actinobactéria endofítica detentora de atividade antimicrobiana. Slack e colaboradores (2008) comprovaram essa atividade ao testar *S. kunmigensis*, isolada de *Palicourea longifolia*, frente a micro-organismos patogênicos. De acordo com seu estudo, essa linhagem se mostrou como potencial produtora de substâncias bioativas ao inibir, juntamente com outras espécies de actinobactérias endofíticas, pelo menos, 90% do crescimento de seis patógenos testados. No presente estudo, a *S. kunmigensis* Act-3 demonstrou atividade frente a 60% dos micro-organismos testes.

Duangmal e colaboradores (2004), em pesquisas realizadas com as plantas *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz e *Gynura pseudo-chian* DC. var. hispida THV, isolaram actinobactérias endofíticas, das quais uma linhagem apresentou 97% de

similaridade com *Streptomyces kunmingensis* NBRC 14463. Testes antimicrobianos realizados com 54 cepas, novamente determinaram o potencial antimicrobiano apresentado por essa classe de micro-organismos, uma vez que foi observada que 58% das cepas foram ativas contra, pelo menos, um micro-organismo teste. Em comparação com os resultados obtidos no ensaio primário com os isolados da Aroeira-Vermelha, no presente trabalho, foi observado que 84,61% das actinobactérias endofíticas apresentaram atividade frente a, pelo menos, um micro-organismo teste.

Esses resultados reafirmam a presença de actinobactérias em plantas hospedeiras, incluindo a *S. kunmigenensis* Act-3, com produção de metabólitos bioativos com vasto potencial antimicrobiano.

5.5. Extração do Princípio Ativo

5.5.1. Biomassa e Líquido Metabólico (*Mycelium stereo* F-61)

A partir da análise dos resultados obtidos na fermentação líquida, a linhagem endofítica *Mycelium stereo* F-61 foi fermentada no meio MPE em pH 7,0, sob agitação de 180 rpm por 48 horas. Em seguida foi realizada a extração utilizando solventes miscíveis (acetona, etanol e metanol) e não miscíveis (acetato de etila, clorofórmio e éter de petróleo) em água, em diferentes pHs, e os extratos foram testados contra micro-organismos patogênicos. Os resultados estão expressos na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Resultados dos halos de inibição, em mm, dos extratos brutos do isolado *Mycelium stereo* F-61, obtidos a partir da extração com diferentes solventes e pHs, contra micro-organismos patogênicos.

Solventes	Sa.			Ec.			SaM.		
BIOMASSA - ACETONA PH 2	15	15	15	10	10	10	0	0	0
BIOMASSA - ACETONA PH 7	7	7	6	7	8	7	0	0	0
BIOMASSA - ACETONA PH 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROLE - ACETONA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - ETANOL PH 2	13	13	12	8	8	9	10	9	9
BIOMASSA - ETANOL PH 7	0	0	0	0	0	0	10	10	11
BIOMASSA - ETANOL PH 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROLE - ETANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - METANOL PH 2	14	15	15	12	12	12	13	12	13
BIOMASSA - METANOL PH 7	15	15	15	12	13	12	14	13	14
BIOMASSA - METANOL PH 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROLE - METANOL	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LME - ACETATO DE ETILA PH2	12	13	12	12	11	12	10	11	10
EXT - ACETATO DE ETILA PH2	13	14	15	15	15	15	18	17	18
LME - ACETATO DE ETILA PH7	16	14	15	0	0	0	0	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH7	13	13	13	12	12	13	12	11	12
LME - ACETATO DE ETILA PH9	20	20	21	11	11	11	20	19	18
EXT - ACETATO DE ETILA PH9	10	10	10	12	13	12	0	0	0
CONTROLE - ACETATO DE ETILA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFORMIO PH2	20	19	18	19	17	18	22	24	23
EXT - CLOROFÓRMIO PH2	10	10	11	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFORMIO PH7	28	29	27	22	21	21	21	22	23
EXT - CLOROFÓRMIO PH7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFÓRMIO PH9	28	27	28	20	20	18	24	25	26
EXT - CLOROFÓRMIO PH9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONTROLE - CLOROFÓRMIO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH2	28	29	29	23	24	23	20	19	21
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH7	12	13	13	0	0	0	0	0	0
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH7	20	20	20	23	22	23	23	23	23
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH9	21	20	19	8	9	8	13	12	13
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH9	0	0	0	16	17	16	14	15	14
CONTROLE - ÉTER DE PETRÓLEO	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: LME: Líquido Metabólico Esgotado; EXT: Extrato Bruto; Sa.: *S. aureus*; Ec.: *E. coli*; SaM.: *S. aureus* multirresistente.

Os dados expressos na Tabela 5.10 evidenciam que o éter de petróleo atuando em pH 7,0 foi o que melhor extraiu o princípio bioativo do líquido metabólico produzido pelo *Mycelium stereo* F-61, uma vez que inibiu os três micro-organismos patogênicos (*S. aureus*, *E. coli* e *S. aureus* MRSA) com halos superiores a 20 mm. Vale observar que não extraiu por completo todo o antibiótico, pois foram evidenciados halos de inibição em seu líquido metabólico esgotado, quando testado contra *S. aureus*. Nos pHs 2,0 e 9,0, o éter de petróleo não foi eficiente na extração. Os outros solventes miscíveis em água utilizados extraíram o princípio ativo em alguns pHs, de forma não satisfatória. Em relação aos solventes utilizados para a extração na biomassa, todos conseguiram extrair o princípio, atuando em pH 2,0. Contudo, os melhores halos de inibição foram obtidos quando a extração foi realizada em metanol no pH 7,0.

Maria e colaboradores (2005) determinaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de acetato de etila a partir de fungos endofíticos isolados de manguezais da costa sudoeste da Índia e cultivados no meio SSF, frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Enterococcus* sp.), bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *Salmonella typhi*) e ao fungo (*C. albicans*). Dos nove fungos endofíticos testados, oito (88,88%) inibiram pelo menos uma bactéria Gram-positiva, cinco (55,55%) apresentaram atividade frente à, pelo menos, uma bactéria Gram-negativa e dois (22,22%) inibiram o fungo, sendo os maiores halos de inibição de 15,2 mm para *P. aeruginosa*, 11,3 mm para *S. aureus* e 12,3 mm para *C. albicans*. Esses resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo quanto à extração realizada com éter de petróleo. Os maiores halos de inibição observados foram de 20 mm, 23 mm e 20 mm para: *S. aureus*, *E. coli* e *S. aureus* MRSA, respectivamente. Estes mesmos autores, utilizando o meio FSm, testaram o extrato bruto de acetato de etila de quatro fungos endofíticos frente à *E. coli* e obtiveram um percentual de inibição de, apenas, 25% (um endofítico), sendo o halo de inibição de 7,6 mm. No nosso trabalho, todos os extratos apresentaram halos de inibição para os três micro-organismos testados.

Tayung e colaboradores (2012) testaram extratos brutos de acetato de etila dos líquidos metabólicos de fungos endofíticos isolados de *Ipomoea carnea* (algodão-bravo) contra seis bactérias (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *P. fluorescens* e *Shigella dysenteriae*) e três fungos (*Trichophyton rubrum*, *Aspergillus*

fumigatus, *Trichophyton* sp.). De todos os isolados testados, 15 cepas (21,74%) apresentaram atividade inibitória, dos quais, 46,6% demonstrou potencial antibacteriano e antifúngico. Entretanto, a maioria dos fungos patogênicos apresentou resistência.

No presente trabalho o extrato com acetato de etila apresentou halos de inibição para *S. aureus* e *E. coli* variando entre 10-16 mm e 11 – 15 mm, respectivamente. O extrato com éter de petróleo inibiu os mesmo micro-organismos com halos de inibição variando entre 16 – 24 mm para *E. coli*., e de 20mm para *S. aureus*. A maioria dos halos de inibição foi superior aos obtidos por Maria e colaboradores (2005).

Xing e colaboradores (2011) realizaram fermentação, em meio líquido de batata dextrose, com 53 fungos endofíticos isolados de duas espécies de orquídeas: *Dendrobium devonianum* e *Dendrobium thyrsiflorum*, e testaram seus extratos etanólicos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. 23% e 43,5% dos fungos isolados de *D. devonianum* e *D. thyrsiflorum*, respectivamente, apresentaram extratos com atividade antimicrobiana. Assim como no presente trabalho, estes autores observaram que os melhores fungos endofíticos demonstraram forte antagonismo para *S. aureus* e *E. coli*. Os halos de inibição observados para esses patógenos foram de: 7 - 20,8 mm e 7,1 – 20,2 mm, obedecendo a essa ordem.

5.5.2. Biomassa e Líquido Metabólico (*S. kunmingensis* Act-3)

O meio utilizado para a fermentação do *S. kunmingensis* Act-3 foi o ISP-2 em pH 7,0, sob agitação de 180 rpm, durante 48 horas. Os solventes que melhor extraíram o princípio ativo do líquido metabólico e da biomassa da linhagem testada podem ser observados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Resultados dos halos de inibição, em mm, dos extratos brutos do isolado *S. kunmingensis* Act-3, obtidos a partir da extração com diferentes solventes e pHs, contra micro-organismos patogênicos.

Solvente	Sa.			SaM.		
BIOMASSA - ACETONA PH 2	21	22	22	15	15	15
BIOMASSA - ACETONA PH 7	25	25	25	17	17	17
BIOMASSA - ACETONA PH 9	23	21	22	0	0	0
CONTROLE - ACETONA	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - ETANOL PH 2	23	23	23	14	13	14
BIOMASSA - ETANOL PH 7	24	24	24	11	11	11
BIOMASSA - ETANOL PH 9	12	12	12	0	0	0
CONTROLE - ETANOL	0	0	0	0	0	0
BIOMASSA - METANOL PH 2	20	22	22	17	17	17
BIOMASSA - METANOL PH 7	20	23	22	17	17	17
BIOMASSA - METANOL PH 9	21	21	21	18	17	16
CONTROLE - METANOL	0	0	0	0	0	0
LME - ACETATO DE ETILA PH2	0	0	0	0	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH2	27	29	27	21	22	22
LME - ACETATO DE ETILA PH7	0	0	0	0	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH7	28	27	29	20	20	20
LME - ACETATO DE ETILA PH9	0	0	0	0	0	0
EXT - ACETATO DE ETILA PH9	28	26	27	21	20	20
CONTROLE - ACETATO DE ETILA	0	0	0	0	0	0
LME - CLOROFORMIO PH2	0	0	0	11	11	11
EXT - CLOROFÓRMIO PH2	26	27	27	19	19	19
LME - CLOROFORMIO PH7	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH7	26	25	26	19	19	19
LME - CLOROFÓRMIO PH9	0	0	0	0	0	0
EXT - CLOROFÓRMIO PH9	26	25	26	19	19	19
CONTROLE - CLOROFÓRMIO	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH2	24	24	24	19	19	19
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH2	0	0	0	0	0	0
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH7	24	24	24	17	18	17
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH7	11	12	12	12	12	12
LME - ÉTER DE PETRÓLEO PH9	24	23	24	17	17	17
EXT - ÉTER DE PETRÓLEO PH9	0	0	0	0	0	0
CONTROLE - ÉTER DE PETRÓLEO	0	0	0	0	0	0

Legenda: LME: Líquido Metabólico Esgotado; EXT: Extrato Bruto; Sa.: *S. aureus*; SaM.: *S. aureus* multirresistente.

Os resultados apresentados na Tabela 5.11. mostram que o acetato de etila e o clorofórmio extraíram, de forma eficiente, em todos os pHs, o princípio ativo presente no líquido metabólico do *S. kunmingensis* Act-3 pois o líquido esgotado não apresentou nenhuma atividade contra os micro-organismos testes. Todos os halos de inibição formados com o extrato do acetato de etila superam 20 mm. O éter de petróleo apenas conseguiu extrair o princípio ativo quando testado em pH 7,0. Entretanto, halos de inibição foram observados no líquido esgotado tratado nesse pH, o que implica que este solvente não foi capaz de extrair todo o princípio ativo.

Os três solventes utilizados para a biomassa conseguiram extrair compostos ativos. No entanto, o que apresentou os melhores halos de inibição para os dois micro-organismos testes foi a acetona em pH 7,0.

Qin e colaboradores (2009) trabalhando com actinobactérias endofíticas isoladas de plantas medicinais de florestas tropicais chinesas também obtiveram resultados expressivos em relação à atividade antimicrobiana de extratos etanólicos oriundos do caldo de fermentação desses micro-organismos, onde cada extrato foi testado frente às bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, contra a levedura patogênica *Candida albicans*. Dos 46 isolados testados, 24 (52,2%) apresentaram atividade contra, no mínimo, um dos micro-organismos patogênicos testados, 12 (26,1%) inibiram *B. Subtilis*, 10,9% inibiram *P. Aeruginosa*, enquanto que 19,6% e 17,4% apresentaram atividade frente a *S. aureus* e *C. Albicans*, nessa ordem, e quatro linhagens inibiram *C. albicans*, *S. aureus* e *P. Aeruginosa*, simultaneamente. No presente estudo, todos os extratos apresentaram atividade frente a *S. aureus* e a *S. aureus* MRSA.

Vimal e colaboradores (2009) utilizando como solvente o éter de petróleo conseguiram extrair o princípio ativo de isolados de actinobactérias com atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-negativas: *E.coli* (20 mm), *P. aeruginosa* (18 mm) e *K. Pneumoniae* (15 mm) e às bactérias Gram positivas: *E. faecalis* (20 mm) e *B. cereus* (13mm), sendo essa atividade equivalente a padrões de estreptomicina (25: g/ disco). Os halos de inibição para as bactérias Gram-positivas, incluindo a resistente à meticilina, oriundos do extrato da Aroeira-Vermelha, que apresentaram melhor atividade variaram entre 20-29 mm, superando os apresentados anteriormente.

Já o extrato de acetato de etila apresentou uma elevada atividade frente ao *Aspergillus fumigatus* (23 mm), *A. flavus* (15 mm) e *A. niger* (12 mm) quando comparado a padrões de anfotericina-B (25: g / disco) (Vimal e colaboradores, 2009). A atividade antifúngica do extrato bruto superou a atividade registrada pela anfotericina-B. O extrato bruto do clorofórmio apresentou uma atividade antifúngica bastante eficaz frente às leveduras *Candida cruzi* (18 mm), *C. tropicalis* (15 mm) e *C. albicans* (14 mm) quando comparado com o antifúngico estreptomicina (25: g / disco). No presente trabalho o éter de petróleo não conseguiu extrair completamente o princípio bioativo presente na biomassa do *S. kunmingensis* Act-3. O clorofórmio e o acetato de etila conseguiram extrair totalmente todo o princípio bioativo apresentando, nos testes antimicrobianos, halos de inibição superiores para bactérias Gram-positivas *S. aureus* (25 – 29 mm) e *S. Aureus* MRSA (11 – 22 mm). BERDY e colaboradores (2005) fermentaram actinobactérias do gênero *Nocardiopsis* sp. e também conseguiram extrair o princípio ativo de seu líquido metabólico com acetato de etila e com o éter de petróleo, obtendo atividade antimicrobiana contra diversos patógenos.

Gurung e colaboradores (2009) trabalhando com amostras de actinomicetos isoladas do solo de Kalapatthar, na região do Monte Everest, apesar de observarem atividade antimicrobina, em 34,18% dos 79 actinomicetos isolados, frente às bactérias Gram-positivas (*S. Aureus*, *B. Subtilis*, *S. typhi* e *S. Paratyphi*), Gram-negativas (*E. Coli*, *K. Pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Shigella* spp, *Pseudomonas vulgaris* e *P. mirabilis*) nos ensaios primários e secundários, a mesma eficiência não foi observada nos testes de extração realizados com os solventes: n-butanol, acetato de diclorometano, clorofórmio e metanol, sendo que esses dois últimos também foram utilizados no presente estudo e apresentaram resultados satisfatórios.

Após a realização dessa etapa, foram selecionados os melhores solventes para extração em grande quantidade, os quais estão representados na Tabela 5.12.

TABELA 5.12 - Representação dos melhores solventes e pHs escolhidos para a extração do princípio ativo do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3.

<i>S. kunmingensis</i> Act-3	Solvente	pH
Biomassa	Metanol	7,0
Líquido metabólico	Éter de petróleo	7,0
<i>Mycelium stereo</i> F-61		
Biomassa	Acetona	7,0
Líquido metabólico	Acetato de etila	7,0

Foram realizadas extrações com 3 litros dos meios: MPE líquido (*Mycelium stereo* F-61) e ISP-2 líquido (*S. kunmingensis* Act-3) para obtenção dos extratos brutos. Os rendimentos totais estão expressos na Tabela 5.13.

TABELA 5.13 - Rendimentos dos extratos brutos concentrados do *Mycelium stereo* e do *S. kunmingensis* Act-3.

Micro-organismo	Líquido metabólico	Solvente	Biomassa	Solvente
<i>Mycelium stereo</i> F-61	1,799 g	3,0 L	5 g	400 ml
<i>S. kunmingensis</i> Act-3	2,302 g	3,0 L	1,7138 g	200 ml

5.6. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A análise de amostras de extratos biológicos é um modo rápido de se identificar compostos com atividade inibitória. Dessa forma, foram testados quatro extratos oriundos do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3 contra Bactérias Gram positivas, Gram negativas e uma linhagem MRSA. Os resultados das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas estão expressos na Tabela 5.14.

TABELA 5.14 - Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos do *Mycelium stereo* F-61 e do *Streptomyces kunmingensis* Act-3 frente a micro-organismos patogênicos.

Micro-organismo	Linhagem	Extrato	<i>S. aureus</i>		<i>S.aureus</i> MRSA		<i>E.coli</i>	
			CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Mycelium stereo</i> F-61	F-61	Éter de Petróleo (LM)	125	250	500	1000	500	1000
	F-61	Metanol (Biom.)	250	500	1000	>1000	1000	>1000
<i>S. kunmingensis</i> (NBRC 14463)	ACT-3	Acetato de etila (LM)	62	125	125	250	-	-
	ACT-3	Acetona (Biom.)	250	500	250	500	-	-

Legenda: CMI (concentração mínima inibitória); CMB (concentração mínima bactericida); MRSA (*S. aureus* multirresistente); - (não foi realizado o teste); LM (líquido metabólico) e Biom. (biomassa).

De acordo com a Tabela 5.14., para *S. aureus* foi observado que dos quatro extratos testados quanto à CMI e CMB o melhor resultado foi apresentado pelo extrato de acetato de etila do líquido metabólico do *S. kunmingensis* (NBRC 14463) (CMI: $62 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CMB: $125 \mu\text{g mL}^{-1}$), e os resultados da CMI e CMB para esse micro-organismo teste variaram entre $62 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $125 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A CMI e a CMB para *S. aureus* MRSA variaram entre $125 - 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $250 - >1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e o extrato de acetato de etila do líquido metabólico do *S. kunmingensis* (NBRC 14463) também apresentou os melhores valores para essa bactéria: (CMI: $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CMB: $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) foram testados, apenas, os extratos etéreo e metanólico do *Mycelium stereo* F-61, sendo que o primeiro apresentou os melhores resultados para a CMI ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) e CMB ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Phongpaichit e colaboradores (2006) testaram extratos brutos de acetato de etila de 18 fungos quanto à CMI e CMB e observaram que para *S. aureus* os valores oscilaram entre $32 - >1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $64 - > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que 13 (72,22%) apresentaram valores maiores que 250 (CMI) e 500 (CMB) $\mu\text{g mL}^{-1}$. No presente trabalho, 75% dos extratos testados para o mesmo micro-organismo teste obtiveram concentrações inferiores a essas. Em relação ao *S. aureus* MRSA, os mesmos

autores encontraram valores de CMI variando entre 64 – 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de CMB 128 – 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, neste mesmo estudo, foram observados valores maiores variando entre 125 - >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Vale salientar que estes autores obtiveram 18,6% de caldos fermentativos com atividade antimicobiana, dos quais apenas 0,9 – 1,9% dos extratos de acetato de etila inibiram alguns dos micro-organismos testes. Diferente dos resultados observados no presente trabalho, os quais evidenciaram inibição dos quatro extratos utilizados frente a todos os micro-organismos testados.

Tayung e colaboradores (2012) analisaram extratos de acetato de etila oriundos de fungos endofíticos isolados de *Ipomoea carnea* (algodão bravo) e obtiveram CMI de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra a bactéria Gram-positiva *B. subtilis*. No presente trabalho, a bactéria Gram-positiva testada (*S. aureus*) apresentou CMI variando entre 62 - 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ quando testada com os extratos do *Mycelium stereo* F-61 e do *S. kunmingensis* Act-3.

Ramos e colaboradores (2010) obtiveram extratos com acetato de etila, n-butanol e etanol, de dois fungos endofíticos (*Papulaspora immersa* e *Arthrinium arundinis*) isolados de *Smallanthus sonchifolius* (batata) e os testaram quanto as suas concentrações mínimas inibitórias (CMI). Os extratos de acetato de etila da *P. immersa* apresentaram CMI de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S.aureus* e ausência de atividade para *E. coli*. O extrato de n-Butanol inibiu a *E. coli* com CIM de 190 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto não apresentou atividade para *S. aureus*. Em relação ao fungo *A. arundinis* os extratos de n-butanol e etanol não inibiram a *S. aureus*, contudo, apresentaram CIM de 190 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 260 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para *E. coli*. Nenhum dos extratos etanólico apresentou atividade inibitória.

5.7. Prospecção Química

5.7.1. *Mycelium stereo* F-61

A prospecção química realizada com os extratos brutos do *Mycelium stereo* F-61 sugere a presença de compostos fenólicos, triterpenos e esteróides e mono/sesquiterpenos no líquido metabólico desse micro-organismo, e de açúcares

redutores e compostos fenólicos em sua biomassa. Os resultados estão apresentados na tabela abaixo.

TABELA 5.15 – Representação dos compostos químicos presentes nos extratos: etéreo e metanólico do *Mycelium stereo* F-61.

Metabólitos	Extrato Bruto Etéreo	Extrato Bruto Metanólico
Alcalóides	-	-
Açúcares redutores	-	+
Compostos fenólicos	+	+
Taninos Hidrolizáveis	-	-
Triterpenos e Esteróides	+	-
Mono/Sesquiterpenos	+	-

Vários compostos biologicamente ativos são frequentemente observados em extratos brutos de culturas de micro-organismos endofíticos. Entre esses compostos, os fenóis e os ácidos fenólicos são usualmente encontrados e pronunciados como antimicrobianos. Um exemplo desse composto é o Ácido 2-hidroxi-6-metilbenzoico isolado do endofítico *Pezicula* sp. e que possui comprovada atividade antifúngica (SCHULZ et al, 1995). Essa classe de compostos pode se enquadrar em inúmeras categorias como: cumarinas, flavonóides, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), taninos condensados e hidrolisáveis, fenóis simples, ligninas e estilbenos (NACZK et al, 2004).

Huang e colaboradores (2009) determinaram a presença de compostos fenólicos (alcalóides, terpenóides fenólicos, quinonas e compostos alifáticos) em extratos oriundos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais chinesas. Esses compostos apresentam diversas atividades de interesse biotecnológico e podem ter influência direta nas propriedades características dessas plantas. Estes mesmos autores verificaram que os compostos fenólicos dos fungos endofíticos contribuem significativamente para a atividade antioxidante encontrada nas plantas

em questão. Fu e colaboradores (2005) observaram a produção de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados da planta *Nerium oleander* L., que é uma planta conhecida por apresentar propriedades medicinais, entre elas: atividade antibacteriana, anti-leprótica, anti-inflamatória, anti-cancerígena, anti-plaquetária, inseticida, citotóxicas e atividades de agregação. Os extratos oriundos do *Mycelium stereo* F-61 isolado da Aroeira-Vermelha também apresentaram atividade antibacteriana, provavelmente em decorrência da presença desses compostos.

Dentre as inúmeras classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural destacam-se os compostos fenólicos, especialmente pela sua capacidade de inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM et al, 1996). Esses compostos já foram citados como estimulantes no crescimento de plantas, fato que foi observado por LEADIR et al, (1997) ao testarem o efeito do ácido p-cumárico, ácido p-hidroxibenzóico e quercetina, que foram colonizados e examinados no *Trifolium repens* L. cv. Ladino (trevo branco) e no *Sorghum bicolor* L. Moench (sorgo), e estimularam um subsequente crescimento das plantas.

Huang e colaboradores (2007) testaram extratos brutos de um total de 42 cepas de fungos endofíticos, isolados de *N. oleandre*, quanto à atividade antimicrobiana e observaram a inibição de alguns micro-organismos patogênicos (*C. krusei*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. annatum*). A análise desses extratos caracterizou a presença de metabólitos secundários incluindo os ácidos fenólicos e os seus derivados, flavonóides, terpenóides fenólicos, constituintes voláteis e compostos alifáticos. Estes mesmos autores constataram que os metabólitos bioativos podem ser produzidos simultaneamente pelo fungo endofítico e pela planta hospedeira, uma vez que observaram a presença de terpenóides, compostos alifáticos e constituintes voláteis fermentados, em ambos os extratos. Neste estudo, os extratos: etéreo e metanólico também inibiram a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e a Gram-negativa *E. coli*. Entretanto, tal atividade não foi observada no extrato oriundo da planta.

Os esteróides, por sua vez, também foram citados como detentores de atividade antimicrobiana visto que foram observados em extrato de éter de petróleo do fungo *Fusarium* sp. isolado a partir de rizomas da planta *Paris polyphylla*

var. yunnanensis Hand.-Mazz (herb paris), que inibiram diversos micro-organismos patogênicos (HUANG et al, 2009). Na presente pesquisa, o extrato de éter de petróleo também foi capaz de extrair esteróides do líquido metabólico do *Mycelium stereo* F-61, que possivelmente apresentaram relação com a atividade antimicrobiana apresentada por este fungo. Zhao e colaboradores (2011) obtiveram esteróides a partir do extrato de acetato de etila de um fungo endofítico isolado de uma esponja Pleosporaceae, com atividade anti-incrustante para a larva *Balanus amphitrite* frequentemente encontrada em cascas de crustáceos.

Zanardi e colaboradores (2012) isolaram quatro sesquiterpenos de extratos brutos de acetato de etila oriundos do fungo endofítico *Phomopsis cassiae* e comprovaram a atividade antifúngica desses compostos frente aos fungos fitopatógenos: *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e atividade anticolinesterásica. Os monoterpenos raramente foram citados como constituintes de fungos em geral ou em compostos marinhos, entretanto uma exceção, o (1S, 2S, 3S, 4R)-3-cloro-4-(2-hidroxiopropano-2-il)-1-metilciclo-hexano-1,2-diol (1), foi encontrado no caldo de fermentação do fungo endofítico *Tryblidiopycnis* sp. isolado do tecido lenhoso de *Kandelia* (mangue), planta típica em Hong Kong (HUANG et al, 2006). Ainda neste trabalho, também foi determinada a produção de mono e sesquiterpenos no extrato etéreo do líquido metabólico do *Mycelium stereo* isolado da Aroeira-Vermelha, e nele é possível observar, haja vista os resultados obtidos, que os testes realizados com metabólitos bioativos oriundos de fungos endofíticos fornecem informações de base promissora para a descoberta e para o uso biotecnológico desses compostos, sejam como agentes antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatório ou contendo quaisquer propriedades de interesse análogo.

5.8. Comparação dos metabólitos bioativos do extrato da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-Vermelha) e dos metabólitos bioativos dos endofíticos.

Todos os extratos brutos (Líquido metabólico e biomassa do *S. kunmingensis* Act-3 e do *Mycelium stereo* F-61), submetidos à bioautografia em camada delgada,

mostraram-se ativos frente às linhagens testes de *S. aureus* e *S. aureus* MRSA. O extrato de acetato de etila das folhas da *S. terebinthifolius* Raddi não apresentou atividade antimicrobiana. A tabela 5.16. apresenta os valores dos Rfs dos halos de inibição dos extratos testados frente aos micro-organismos testes.

TABELA 5.16 – Valores dos Rfs (cm) dos halos de inibição apresentados pelos extratos do *S. kunmingensis* Act-3 e do *Mycelium stereo* F-61 frente aos micro-organismos testes.

Micro-organismos	Linhagem	Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> MRSA
			Rf	Rf
<i>Mycelium stereo</i> F-61	F-61	Éter de petróleo	0,65	0,6
	F-61	Metanol	0,125	0,15
<i>S. kunmingensis</i> (NCBR 14463)	ACT-3	Acetato de etila	0,575	0,5
	ACT-3	Acetona	0,625	0,55
<i>S. terebinthifolius</i> RADDI				
		Acetato de etila	-	-

Legenda: MRSA (*S. aureus* MRSA); - (sem atividade); Rf (Índice de Retenção).

A análise das zonas de inibição de Rf dos extratos dos micro-organismos endofíticos mostrou que os compostos bioativos presentes nos extratos do *S. kunmingensis* Act-3 e no extrato etéreo do *Mycelium stereo* F-61 possuem maior afinidade com a fase móvel utilizada (acetato de etila:metanol – 9:1) do que com a fase estacionária (coluna de sílica). O oposto foi observado no extrato metanólico do *Mycelium stereo*. Os extratos do *S. kunmingensis* Act-3 apresentaram halos de inibição com Rfs muito próximos para ambos os micro-organismos testados, o que sugere que existam semelhanças entre ambos os princípios ativos. Os valores dos Rfs dos extratos etéreo e metanólico do fungo endofítico indicam que os princípios ativos presentes nesses extratos possuem polaridades distintas, sendo, portanto, compostos diferentes. Melo e colaboradores (2009), ao testarem frações de extratos brutos oriundos do fungo endofítico *Bacillus pumilus* frente a fungos patogênicos observaram zonas de inibição de Rf variando entre 0,25 a 0,89, que demonstram compostos com polaridades e princípios bioativos diferentes.

Apesar de diversos autores atribuírem atividade antimicrobiana aos extratos da Aroeira-Vermelha, por exemplo: atividade frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* (GUERRA et al, 2000), *Cryptococcus neoformans*,

Sporothrix schenckii (JOHANN et al, 2007) e *Flavobacterium columnare* (CASTRO et al, 2008), no presente estudo, foi utilizado o extrato de acetato de etila das folhas da *S. terenbinthifolius* RADDI não apresentando atividade frente à *S. aureus* e a *S. aureus* MRSA na bioautografia em camada delgada. Essa ausência de inibição frente aos micro-organismos testes sugere que, provavelmente, não existe uma relação direta entre os metabólitos secundários bioativos produzidos pelos endofíticos: *Mycelium stereo* F-61 e *S. kunmingensis* Act-3 frente ao *S. aureus* e *S. aureus* MRSA e os produzidos pela planta, visto que, no mesmo sistema cromatográfico testado, foi observada atividade antimicrobiana apenas nos extratos oriundos dos endofíticos. Esses resultados demonstram a imensa diversidade de metabólitos secundários produzidos por endofíticos, com propriedades de interesse biotecnológico, que podem ser estudados na busca de novos antibióticos.

6.0. CONCLUSÕES

- As folhas de *S. terebenthifolius* Raddi se apresentam como hospedeira de diversos micro-organismos endofíticos com grande potencial para a bioprospecção.
- Os micro-organismos endofíticos que apresentaram os melhores resultados no ensaio primário de atividade antimicrobiana foram identificados como: *Mycelium stereo* F-61 e *Streptomyces kunmingensis* Act-3, respectivamente.
- O *Mycelium stereo* F-61 e o *Streptomyces kunmingensis* Act-3 apresentaram atividade antagônica frente às bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos patogênicos.
- Os extratos oriundos do *Mycelium stereo* F-61 são constituídos principalmente por compostos fenólicos, mono/sesquiterpenos, triterpenos, esteróides e açúcares redutores.
- Os extratos obtidos a partir do *Mycelium stereo* F-61 demonstraram potencial no controle das bactérias: *E. coli*, *S. aureus* e *S. aureus* (MRSA) resistente à metilicina.
- Os extratos oriundos de *Streptomyces kunmingensis* Act-3 inibiram o crescimento de *S. aureus* e *S. aureus* (MRSA).
- Nas condições em que foi realizada a bioautografia em camada delgada, os metabólitos bioativos presentes nos extratos do *Mycelium stereo* F-61 e do *Streptomyces kunmingensis* Act-3 não foram quimicamente relacionados com os compostos presentes no extrato das folhas de *Schinus terebenthifolius* Raddi.
- Os metabólitos bioativos produzidos pelos micro-organismos endofíticos isolados da *S. terebenthifolius* Raddi apresentam potencial para a descoberta de nova substância bioativa de interesse biotecnológico.

7.0. REFERÊNCIAS

AFFONSO, C. R. G.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, J. M. G. de; MARTINS, M. C. C. M.; LIMA, S. G. de; JÚNIOR, G. R. S. de; FERNANDES, M. Z. L. C. M. F.; ZANINI, S. F.; Efeitos do óleo essencial de frutos de *Schinus terebinthifolius* RADDI (Anacardiaceae) em funções reprodutivas em ratos machos. **J. Braz. Chem. Soc.** São Paulo, v.23, n.1, 2012.

ALLIMUDDIN; WIDADA, J.; MUSTOFA, W. A.; Antifungal Production of a Strain of *Actinomycetes* spp Isolated from the Rhizosphere of *Cajuput* Plant: Selection and Detection of Exhibiting Activity Against Tested Fungi. **Indonesian journal of Biotechnology**, v.16, n.1, p.1-10, 2011.

ALLAH, A. N. A.; MEHALAWY, E. A. A.; Antifungal producing actinomycetes as biocontrol agents for plant pathogenic fungi. *Alazhar. Journal of Microbiology*, v.58, p.51-60, 2002.

AMORIM, M. M. R. de; SANTOS, L. C.; Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.

ANDERSEN, B.; Consistent production of phenolic compounds by *Penicillium brevicompactum* for chemotaxonomic characterization, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.60, n.2, p.115-123, 1991.

ANDERSON, A. S.; WELLINGTON, M. H. E.; The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, p.797-814, 2001.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J. K.; LAÇAVALA, P.T.; **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**, Piracicaba, ESALQ, 2002.

ARAUJO, J. M. de; SILVA, ADILSON C. da; AZEVEDO, J. L.; Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 43, n. 4, 2000.

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

ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M.T.; Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, R.J, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Rio de Janeiro, v.14, p.301-315, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; **Microrganismos Endofíticos: Ecologia Microbiana**. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, ed.1, v.1, p.117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P. S.; Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. **Microrganismos e agrobiodiversidade**. Guaíba: Agrolivros, v. 01, p. 211-232, 2008.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; **Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Quím. Nova, v. 30, n.8, p.1959-1965, 2007.

BARRETI, P. B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, A. A. A.; POZZA, E. A.; CARVALHO, J. G. de; SOUZA, J. T. Increased nutritional efficiency of tomato plants inoculated with growth-promoting endophytic bacteria. **Rev. Bras. Ciênc.** Solo, Viçosa, v.32, n.4, 2008.

BARRETI, P. B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, E. A.; Endophytic bacteria as agents of plant growth promotion in tomato and inhibition *in vitro* of *Ralstonia solanacearum*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.32, n.3, 2008.

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

BASHYAL, B. P.; BURNS, A. M.; LIU, M. X.; PARANAGAMA, P. A.; SELIGA, C. J.; TURBYVILLE, T. J.; WIJERATNE, E. M. K.; ZHAN, J.; GUNATILAKA, M. K.; ARNOLD, A. E.; FAETH, S. H.; WHITESELL, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; Discovery of small molecule bioactive agents from endophytic fungi of the Sonoran Desert. **Grassland Research and Practice Series**. Nova Zelândia, v.13, p.211-214, 2007.

BARTMAN, C. D.; DOERFLER, D. L.; PÁSSARO, B. A.; REMALEY, E. M.; PAZ, J. N.; CAMPBELL.; Produção de ácido micofenólico por *Penicillium brevicompactum* em meios sólidos. **Appl. Environ. Microbiol.**, Pittsburgh, v.41, n.3, p.729-736, 1981.

BERDY J.; Bioactive microbial metabolites: a personal view. **Journal of Antibiotics**, v.58, n.1, p.1–26, 2005.

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

BOLLEN, G. J.; Resistance to benomyl and some chemically related compounds in strains of *Penicillium* species. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.77, n.6, p.187-193, 1971.

BULL, A. T.; **Microbial Diversity and Bioprospecting**. 1ªEdição. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, 2004.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G.; Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v.49 n.3, 2006.

CARVALHO, M. C.R. D. de; BARCA, F. N. T. V.; LIMA, L. F. A.; MEDEIROS, S. R. B. de; Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, n.3, p.185–191, 2003.

CASTILLO, U. F.; GARY, A. S.; KIRBY, M.; MARGARET, M. C.; DAVID, B. T.; VINCENZO, F.; MONICA, G.; ROSALIA, F.; LUISA, M.; STEPANIE, V.; MARISSA, C.; RICHARD, R.; HEIDE, P.; JAMES, J.; Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. **FEMS Microbiology Letters**, v.255, n.2, p.296–300, 2006.

CASTRO, S. B. R.; LEAL, C. A. G.; FREIRE, F. R.; CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA, D. F.; FIGUEIREDO, H. C. P.; Antibacterial activity of plant extracts from Brazil against fish pathogenic bacterial. **Braz. J. Microbiol**, São Paulo, v. 39, n. 4, 2008.

CATIN, A.; MOYA, P.; MIRANDA, M. A.; PRIMO, J.; YÚFERA, E. P.; Isolation of *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl) pyrrole and *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl) pyrrole, Two New Natural Products from *Penicillium brevicompactum*, and Synthesis of Analogues with Insecticidal and Fungicidal Activity **J. Agric. Food Chem**, v.46, n.11, p.4748–4753,1998.

CERUKS, M. et al.; Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebentifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**. v. 30, n.3, p. 507-599, 2007.

CESÁRIO, L. F.; GAGLIANONE M. C.; Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta bot. bras**. V.22, n.3, p.830-831, 2008.

CEYLAN, O.; OKMEN, G.; UGUR, A.; Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. **EurAsian Journal of BioSciences**, Mugla, v.2, p.72-82, 2008.

COÊLHO, M. M.; NOZAWA, M. S. F.; NOZAWA, S. R.; SANTOS, A. L. W.; Isolation of endophytic bacteria from arboreal species of the Amazon and identification by

sequencing of the 16S rRNA encoding gene. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.4, p.676-680, 2011.

CORNELI, J.; Avaliação de promotores de crescimento alternativos em substituição aos convencionais sobre o desempenho, características de carcaça e morfometria intestinal em frangos de corte. **Dissertação de mestrado em Zootecnia**. Universidade Federal de Santa Maria. p.46, 2004.

CUI, J. L.; GUO, S. X.; XIAO, P. G.; Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang**, v.12, n.5, p.385-392, 2011.

CUNHA, I.G. B.; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, R. E. A.; AMORIM, E. L. C.; ARAUJO, J. M.; Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.2, p.120 – 123, 2009.

DAS, S.; WARD, L. R.; BURKE, C.; Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.3, p.419-429, 2008.

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

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P.; β -Glucosidases from Five Black Aspergillus Species: Study of Their Physico-Chemical and Biocatalytic Properties. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, n.10, p.4929–4936, 2000.

DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M.; Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciênc.agrotec.**, Lavras, v.29, n.3, Jun. 2005.

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

DUANGMAL, K.; MINGMA, R.; BUNYOO, C.; THAMCHAIPENET, A.; AREE, W. P.; Isolation of actinomycetes from *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz and *Gynura pseudo-chian* DC. var. *hispida* Thv. and their antimicrobial activities. 2005.

ELLAIAH, P.; RAJU, K. V.; ADINARAVANA, K.; ADINARAVANA, G.; SAISHA, V.; MADHAVI, S.; PREMKUMAR, J.; Bioactive actinomycetes from Krishna River sediments of Andhra Pradesh. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v.44, n.1-4, p.8-16, 2002.

EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T.; Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in egypt. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.5265-5270, 2009.

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

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n.8, p. 1027-1038, 2011.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ, Z. U. F.; NETO, V. B.; COURI, S.; Avaliação de Diferentes Resíduos Agroindustriais como Substratos para a Produção de Celulases por Fermentação Semi-sólida. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 22 – EMBRAPA**, p.17, 2008.

FENNER, R. et al.; Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Brás. Cienc. Farm.** v. 42, n.3, p.369-394, 2006.

FERNANDES, M. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; NETO, C. M. C.; HEINRICH, T. A.; ALENCAR, S. M. de; LIMA, M. A. de; IKEGAKI, M.; Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternate* isolated from *Coffea arabica* L.. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v.45 n.4, 2009.

FREIRES, I. A.; ALVES, L. A.; JOVITO, V. C.; CASTRO, R. D. de; Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*. **Rev. Odontológica do Brasil Central**, v.20, n.52, 2011.

FRIES, L. L. M.; PACOVSKY, R. S.; SAFIR, G. R.; SIQUEIRA, J. O.; Plant Growth and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization Affected by Exogenously Applied Phenolic Compounds. **Journal of Chemical Ecology**, v.23, n.7, p.1755-1767, 1997.

FU, L.; ZHANG, S.; LI, N.; WANG, J.; ZHAO, M.; SAKAI, J.; HASEGAWA, T.; MITSUI, T.; KATAOKA, S.; OKA, S.; KIUCHI, M.; HIROSE, K.; ANDO, M.; Three new triterpenes from *Nerium oleander* and biological activity of the isolated compounds. **J. Nat. Prod.**, v.68, p.198–206, 2005.

GONG, L. J.; GUO, S. X.; Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity, **African Journal of Biotechnology**, Beijing, v. 8, n.5, p.731-736, 2009.

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

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P.; Sucos de frutas. *Em* : Godfrey, T., Oeste, S. (orgs.). **Enzimologia industrial**, Londres, p.225-264, 1996.

GUERRA, M. J. M., BARREIRO, M. L., RODRIGUEZ, Z. M., RUBACALBA, Y., Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* raddi (copal). **Rev Cubana Plant. Med.**, Havana v.5 n.1, 2000.

GUERREIRO, S. M. C.; PAOLI, A. A. S.; Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em desenvolvimento. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo, v.22, n.1, 1999.

GUNDEL, P. E.; MARTÍNEZ, G. M. A.; BATISTA, W. B.; GHERSA, C. M.; Dynamics of Neotyphodium endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. **Annals of Applied Biology**, p.199-209, 2010.

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

GUO, L. D.; HUANG, G. R.; WANG, Y.; HE, W. H.; ZHENG, W. H.; HYDE, K. D.; Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulae formis*. **Mycological Research**, v.107, p.680-688, 2003

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y.; Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, v.147, p.617-630, 2000.

GURUNG, T. D.; SHERPA, C.; AGRAWAL, V. P.; LEKHAK, B.; Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. **Nepal Journal of Science and Technology**, Nepal, v.10, p.173-182, 2009.

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

HALMMAN et al; Bacterial endophytes in agricultural crops. **Journal Microbiology**, Canadá, v. 43, p. 895-914, 1997.

HALLMANN, J.; SIKORA, R. A.; Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and Soil Borne Plant Pathogenic Fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p. 155-162, 1996

HARBONE, J. B.; In: HARBONE, J.B., **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. Nova York: Chapman and Hall, 1998.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L.; A thermotolerant -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v.67, p.61–69, 2009.

HASLAM, E.; Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible mode of actions. **J. nat. prod.**, v.59, p.205-215, 1996.

HILARINO, M. P. A.; SILVEIRA, F. A. O.; OKI, Y.; RODRIGUES, L.; SANTOS, J. C.; CORREA, A. J.; FERNANDES, G. W.; ROSA, C. A.; Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.4, 2011.

HECTH, S. T.; CAUSEY, W. A.; Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes related bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, v.4, p.284-287, 1976.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A.; Direct bioautography in thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **J Chromatogr**, v.51, p.327-329, 1970.

HOPWOOD, D. A.; Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part A: Overview Articles and Peptides. **Methods in Enzymology**, v.458, 2009.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y.; Natural Phenolic Compounds From Medicinal herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n.1, p.1-20, 2009.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, J.; LI, X.; CHEN, Q.; Antimicrobial compounds from the endophytic fungus *Fusarium* sp. Ppf4 isolated from the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Nat. Prod. Commun.**, Beijing, v.4, n.11, p.1455-8, 2009.

HUANG, Z. X.; CAI,.; SHAO, C. Z.; SHE, X.; XIA, Y.; CHEN, J.; YANG, S.; ZHOU, Y.; LIN.; **Phytochemistry**, v.69, p.1604-1608, 2008

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M.; Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.9, p.1253-1263, 2007.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W.; Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.31, n.2, p.163–167, 2006.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W.; Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.31, n.2, p.163-167, 2001.

HUNG, P. Q.; ANNAPURNA, K.; Isolation and characterization of endophytic bacteria in Soybean (*Glycine* sp.). **Omonrice**, v.12, p.92-101, 2004.

ICHIKAWA. T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A.; A improvement of kasugamycin – Producing Strain by the Agar Piece Method and Prototroph Method. **Folia Microbiológica**, v.16, p.218-224, 1971.

IKOTUN, T.; Cell wall-degrading enzymes produced by *Penicillium oxalicum* Curie et Thom. **Mycopathologia**, v.88, n.1, p 15-21, 1984.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A.; Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots, **Canadian Journal of Botany**, v.63, n.7, p.1262-1265, 1985.

JALGAONWALA R. E.; MOHITE B. V.; MAHAJAN R. T.; Plant associated endophytic fungi Microbiology. **Journal Natural products. Biotech. Res.** v.1, n.2, p.21-32, 2011.

JESUS, S. de; FILHO, E. L. A. M.; Frugivoria por aves em *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Myrsine coriacea* (Myrsinaceae). **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.15, n.4, p.585-591, 2007.

JIMÉNES, M. B.; AGUILAR, F. S.; DEL, V. M. V.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E.; Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.167-172, 2001.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A. R. S.; CISALPINO, P. S.; COTA, B. B.; ALVES, T. M. A.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v.9, p.30, 2010.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, G.; DONNICI, C. L.; RESENDE, M. A. de; Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.38, n.4, 2007.

KATO, K.; Occurrence of penicillin-nucleus in culture broths. **J. Antibiot.**, v.6, p.130–136, 1953.

KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPPEU, T.; ARIMA, K. Antiviral Antibiotic 515-1. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. **The journal of antibiotics**, Tokio, v.29, n.3, p.242-247, 1976.

KHALED, F.; EL-MASSRY,; EL-GHORAB, A. H.; SHAABAN, H. A.; SHIBAMOTO, T.; **J. Agric. Food Chem.** v.57, p.5265, 2009.

KHAN, Z.; DOTY, S. L.; Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. **Plant and Soil**, v.322, n.1-2, p.197-207, 2009.

KIRBY, W. M. M. A. W.; BAUER, J. C.; SHERRIS, M. T.; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-499, 1966.

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

KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI K. A. A.; AZEVEDO, J. L.; Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, n.12, p.1244-1251, 2004.

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

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D.; Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.3614-3621, 1997.

LAATSCH, H.; A Data Base for Rapid Structural Determination of Microbial Natural Products, and annual updates, Chemical Concepts, Weinheim, Germany; see <http://wwwuser.gwdg.de/~ucoc/laatsch/AntiBase>, 2007.

LACAP, D. C.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y.; An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, v.12, p.53-66, 2003.

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

LEE, J. Y.; HWANG, B. K.; Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.5, p.407-417, 2002.

LENZI, M.; ORTH, A. I.; Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.17, n.2, p.67-89, 2004.

LI, J.; ZHAO, G. Z.; ZHU, W. Y.; HUANG, H. Y.; XU, L. H.; ZHANG, S.; LI, W. J.; Streptomyces sp endophyticus. novembro, um actinomiceto endofítico isolado de *Artemisia annua* L.. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.63, n.1, p.224-9, 2012

LI, Y.; SUN, Z.; ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S.; LI, M.; Research progress on microbial herbicides. **Crop. Protec**, v.22, p.247-252, 2003.

LENZI, M.; ORTH, A. I.; Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v.17, n.2, p.67-89, 2004.

LIN, Z. T; ZHU, Y; FANG, Q. G. U. W.; ZHU,; **Phytochemistry**, v.69, p.1273-1278, 2008.

LIMA, J.S.; Diversidade genética e RNA df de isolados de *Colletotrichum* ssp. endofíticos da planta medicinal *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, 2008.

LIMA, M. R .F. *et al.*; Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethno pharmacology**, v.105, n.1-2, p.137-147, 2006.

LIMA, M. R.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C.; SANT'ANA, A. E.; GENET, J. P.; MARQUEZ. E.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N.; Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p.137-147, 2006.

LLOYD, H. A.; JAOUNI, T. M.; EVANS, S. L.; MORTON, J. F.; Terpenos de *Schinus terebinthifolius*. **Phytochem**, v.16, p.1301-1302, 1977.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. V. D.; Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.21, n.6, p.583-606, 2002.

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Ed. Instituto Plantarum, Maddox ed.4, v. 1, p.24, 2002.

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras: manual de Identificação de e Cultivo de Plantas Nativas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, v.2, p.352, 1998.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum, p.352, 1992.

LUCENA, L. H. de; FILHO, J. M. R.; MAZZA, M.; CZECHKO, N. G.; DIETZ, U. A.; NETO, M. A. C.; HENRIQUES, G. S.; SANTOS, O. J. dos; Evaluation of the aroreira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats Periguari. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, 2006.

LYRA, F. D. A.; GONÇALVES, L. O.; COELHO, J. S. B.; ALBUQUERQUE, M. M. F.; MACIEL, G. M.; OLIVEIRA, L. L.; MACIEL, M. C. N.; Ciclamicina e ciclacidina, dois novos antibióticos produzidos pelo *Streptomyces capoamus* nov. sp. **Anais Acad. Bras. De Ciências**, v.36, n.3, p.323-334, 1964.

MACÍAS, F. A.; VARELA, R. M.; SIMONET, A. M.; CUTLER, H. G.; STEPHEN, J. C.; DUGAN, F. M.; HILL, R. A.; Novel Bioactive Breviane Spiroditerpenoids from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. **J. Org. Chem.**, New Zeland, v.65, n.26, p.9039–9046, 2000.

MADIGAN, M. T.; **Microbiologia de Brock**. 12^a Ed. Porto Alegre: Artmed, p 459-451, 2010.

MAGALHÃES, W. C. S.; MISSAGIA, R. V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M.; Diversidade de fungos endofíticos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.). **Mac LeishCerne**, v.14, n.3, p.267-273, 2008.

MAGNANI, G. S.; Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**, 2005.

MARIA., G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S.; Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, 2005.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI, C.; Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **Int. J. Antimicrob Agents**.Jul., v.34, n.1, p.50-9, 2009.

MARTINES, M. J.; ALONSO, N.G.; BETANCOURT, J. B.; Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Rev. Cuba. Plantas med**; v.1, n.3, p.37-39, 1996.

MASMEH, Y .M.; Streptomyces in Jordan; distribut ion and antibiotic activity. **Tese de Doutorado**. Department of Biology, Yarmouk University, Irbid, Jordan.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C.; PEREIRA, F. V.; SCUTTI, J. A. B.; MASSAOKA, M. H.; TRAVASSOS, L. R.; SARTORELI, P.; LAGO, J. H. G.; α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.411, n.2, p.449-454, 2011.

MC INROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. A.; survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plantandsoil**, v.173, 1995.

MELO, F. M. P.; FIORE, M. F.; MORAES, L . A. B.; STENICO, M. E. S.; SCRAMIN, S.; TEIXEIRA, M. A. de; MELO, I. S.; Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4a. **Sci. agric.**, Piracicaba, v.66 n.5 Piracicaba 2009.

MENTEN, J.F.M. Probióticos, prebióticos e aditivos fitogênicos na nutrição de aves. **In: simpósio sobre ingredientes na alimentação animal**, Uberlândia, p.251-276, 2002.

METZ, H, Thin-layer chromatography for rapid assays of enzymic steroid transformations. **Natur wissen schaften**, v. 48, p. 569-570, 1961.

MONEAM, N. M. A.; GHONEIM, T.; **J. Chromatogr.**, v.361, p.391, 1986.

MOTA, B. C. F.; SOUZA, L. M.; MERCADANTES, S. M. O.; FERNANDES, M. F. G.; SANTOS, H. C. M.; Atividade Antifúngica e Antibacteriana de Metabólitos Secundários de Plantas. **III Fórum gestão, pesquisa, ensino, extensão da Universidade Estadual de Montes Claros**, p.23-25, 2009.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B.; Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular General Genetics**, v.233, p.1-9, 1992.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NAIR, M. G.; BURKE, B. A.; A new fatty acid methyl ester and other biologically active compounds from *Aspergillus niger*. **Phytochemistry**, v.27, p.3169-73, 1988.

NEDIALKOVA, D.; NAIDENOVA, M.; Screening the Antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. **Journal of Culture Collections**, v.4, p.29-35, 2005.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, p.62-76, 2002.

NEWMAN, D. K. B. J. F.; Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v. 296, n.10, p.1071-1078, 2002.

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

NONOH, J. O.; LWANDE, W.; MASIGA, D.; HERRMANN, R.; PRESNAIL, J. K.; SCHEPERS, E.; OKECH, M. A.; BAGINE, R.; MUNGA, P.; BOGA, A. B. N. H. I.; Isolation and characterization of *Streptomyces* species with antifungal activity from selected national parks in Kenya. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.9, p.856-864, 2010.

OKAFOR, N.; Modern industrial microbiology and biotechnology. **Science Publishers, Enfield, NH, USA**. cap. 5 e 9. 2007.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N.; Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. **Sci. Prog.** v.87, p.79-99, 2004.

PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; MORAIS, L. C. S. L. de; ANDRADE, F. B. de; SANTOS, H. B.; (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1, p.68-76, 2009.

PELAEZ, F.; Biological activities of fungal metabolites. In: AN, Z. Handbook of industrial mycology. **Mycology series**, New York, v. 22, p. 49–92, 2004.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, Y.; SAKAYAROJ, J.; Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.48, n.3, p.367–372, 2006.

PILEGGI, S. A. V.; Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Paraná – Ciências Biológicas – Programa de Pós-graduação em Genética, Curitiba, 2006.

PIMENTEL, I. C., et al.; Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 49, n. 5, 2006.

PIMENTEL, I. C.; FIGURAL, G.; AUER, C. G.; Endophytic fungi associated to *Pinus taeda* needles. **Summa phytopathol.** Botucatu, v.36, n1, 2010.

PINTO, L. D.; Atividade Antimicrobiana e Caracterização Molecular de Microrganismos Endofíticos Isolados de Folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.), *Malme (rabo-de-macaco)*. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, 2003.

PROMPUTTHA, I.; JEEWON, R.; LUMYONG, S.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D.; Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae). **Fungal Diversity**, v.20, p.167-186, 2005.

QUEIRES, L. C. *et al.*; Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius Raddi*) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer Research**, v.26, n1A, p.379-387, 2006.

QIN.; LI, J.; CHEN, H. H.; ZHAO, G. Z.; ZHU, W. Y.; JIANG, C. L.; XU, L. H.; LI, W. J.; Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Environ. Microbiol.**, v.75, n.19, p.6176-6186, 2009.

QUI, S. L.; LI, J. L.; CHEN, H. H.; ZHAO, G. Z. L.; ZHU, W. Y. L.; JIANG, C. L. L.; XU, L. H. L.; LI, W. J. L.; Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in China.

RAHMAN, M. A.; MOHAMMAD, Z. I.; Md. Anwar Ul Islam¹. Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. **Biotechnology Research International**, 2011.

RAMOS., H. P.; BRAUM, G. H.; PUPO, M. T.; SAID, S.; Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Braz. arch. biol. Technol.**, Curitiba, v.53, n.3, 2010.

RAND, T. G.; GILES, S.; FLEMMING, J.; MILLER, J. D.; PUNIANI.; EVA.; Inflammatory and Cytotoxic Responses in Mouse Lungs Exposed to Purified Toxins from Building Isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *P. chrysogenum* Thom. **Oxford Journals Life Sciences e Medicin Toxicological Sciences**, v.87, n.1, p.213-222, 2005.

REDDY, N. G.; RAMAKRISHNA, D. P. N.; RAJAGOPAL, S. V.; Optimization of culture conditions of *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) for the production of antimicrobial metabolites. **Egyptian Journal of Biology**, Egito, v.13, p.21-29, 2011.

RIBAS, M. O. et al.; Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto Cienc.** – Fac. Odonto/PUCRS, v.21, n.53, p.245-252, 2006.

ROBERTSON, E. A. H.; CARTWRIGHT, R. A.; OLDSCHOOL, M. Phenolic substances of manufactured tea. I. fraction and paper chromatography of water-soluble substances. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 72-80, 1956.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA, F. A. P. S.; FERREIRA, F. A.; Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v.27, n.3, p.507-513, 2009.

RUBALCAVA, M. M. L.; HERNANDEZ, B. B. H.; ESTRADA, M. J.; GONZALEZ, M. C.; GLENN, A. E.; HANLIN, R. T.; ORTEGA, S. H., GARCIA, A. S., GONZALEZ, J. M. M., ANANYA, A. L.; **Phytochemistry**, v.69, p.1185-1196. 2008.

RUBY, J. E.; RAGHUNATH, M. T.; Bacterial Endophytes and their Bioprospecting. **Journal of Pharmacy, Research**, v.4, n.3, p.795-799, 2011.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p.417, 1989.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L.; Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzym. Technol.** v.31, p.895-906, 2002.

SANTANA, J. S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G.; MATSUO, A. L.; Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quím. Nova**. São Paulo, v.35, n.11, 2012.

SANTOS, M. R. A. et al., Atividade inseticida do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre *Acanthoscelides obtectus* Say e *Zabrotes subfasciatus* Boheman, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da EMBRAPA**, Ago, 2007.

SANTOS, O. J.; RIBAS, F. J. M.; CZECHKO, N. G.; CASTELO, B. N. M. L.; NAUFEL, J. C.; FERREIRA, L. M.; CAMPOS, R. P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R. D.; DOBROWOLSKI, S.; Evaluation of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) extract on the healing process of gastroraphy in rats. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 2, p.39-45, 2006.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K.; Endophytic Fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106 p.996-1004 , september 2002.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D.; Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v.99, n.8, p.1007-1015, 1995.

SESSITSCH, A.; REITER, B. E. G.; BERG.; Comunidades bacterianas endofíticas de plantas crescidas no campo de batata e sua fábrica de promoção do crescimento e habilidades antagônicas. **J. Microbiol**, v.50, p.239 -249, 2004.

SHARMA, O. P.; DARWRA, R. K.; Thin layer chromatographic separations of lantadenes, the pentacyclic triterpenoids from lantana (*Lantana camara*) plant. **Journal of Chromatography**, v. 567, p 351-354, 1991.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D.; Methods for characterization of *Streptomyces* species. Intern. **Journal Syst. Bacteriol**, v.16, p. 313-340, 1966.

SIDDIQUI, R. R.; ZAFAR, U.; CHAUDHRY, S. S.; AHMAD, H.; Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius*, *sempervirens* Cypress, *Citrus limon*, *assafoetida* *Ferula* . **Pak J. Ind Sci Res**, v.38, p.358-361, 1995.

SILVA, M. A. da; PESSOTI, B. M. S.; ZANINI, S. F.; COLNAGO, G. L.; NUNES, L. C.; RODRIGUES, M. R. A.; FERREIRA, L.; Essential oil from Brazillian red pepper as an additive in broiler diet. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.4, p.676-681, 2011.

SILVA, S. C.; FERMINO, S. A. C.; SILVA, G. M.; Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. **Sci Agric**, Piracicaba, v.65, p.50-55, 2008.

SILVA, R. E. A.; Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Fungos e Actinobactérias Endofíticos Isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (rabo-de-raposa). **Revista de Biologia Tropical, Rev. Biol. Neotrop.**, v.3, n.2, p.181-182. 2006.

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

SIQUEIRA, V. M. de; CONTI, R.; ARAUJO, J. M. de; MOTTA, C. M. S.; Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v.53, n.2, p.89-95, 2011.

SLACK, C. A. B.; MA, C.; MOORE, E.; BABBS, B.; FENN, K.; GREENE, J. S.; HANN, B. D.; KEEHNER, J.; SWIFT, E. G. K.; KEMBAIVAN, V.; Multiple, Novel Biologically Active Endophytic *Actinomycetes* Isolated from Upper Amazonian Rainforests. **Microbial Ecology**, v.58, n.2, p.374-383, 2009.

SOARES, D. G. S.; et al.; Atividade Antibacteriana in vitro da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. **Pesq. Brás. Odontoped. Clin. Integr.**, v.7, n.3, p.253-257, 2007.

SOLE, M.; FRANCA, A.; RIUS, N.; LORÉN, J. G.; The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p.81-84, 1997.

SONASHIA, V. P.; KAMAT, N. M.; Antimicrobial Screening of Actinobacteria using a Modified Cross-Streak Method. **Indian J. Pharm. Sci.**, v.73, n.2, p.223-228.

SOUZA, A. Q. L. et al.; Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 34, n. 2, 2004 .

STROBEL, G., DAISY, B. H., CASTILLO, U., HARPER, J.. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products.**, v.67, n.2, p.257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 240-244, 2006.

STURTZ, A. V.; NOWAK, J.; Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v.15, n.2, p.183-190, 2000.

THAKUR, D.; YADAV, A.; GOGOI, B. K.; BORA, T.C.; Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 17, p. 242-249, 2007.

TALORA, D. C.; MORELATTO, P. C.; Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, V.23: P. 13-26, 2000.

TAYUNG, K.; SARKAR, M.; BARUAH, P.; Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v.55, n.5, 2012.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARA KAVA, R.; Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.

TONIAL, F.; Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira). **Tese de Mestrado**. Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), 2010.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. Editora Artmed, ed.8, 2005.

YAN, X. N.; SIKORA, I. R.; ZHENG, J. W.; Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Univ.-Sci. B., **Biomed. & Biotechnol**, v.12, n.3, p.219-225, 2011.

VEGA, F. E.; PAVA, R. M.; POSADA, B. J. S.; Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L.: **Journal Basic Microbiol**, v.45, n.5, p.371-380, 2005.

VEGA, F. E.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; GIANFAGNA, T. J.; CHAVES, F.; *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin a production. **Mycologia**, v.98, n.1, p.31-42, 2005.

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

VERMA, V. V.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C.; Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-microbial Activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p.749-756, 2009.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K.; Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

VIMAL, V.; RAJA, B. M.; KANNABIRAN; Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467)., **Asian Journal of Medical Sciences**, Tamil Nadu, v.1, n.2, p.57-63, 2009.

VINOKUROVA, N. G.; IVANUSHKINA, N. E.; KHMEL, N. I. I.; ARINBASAROV, M. U.; Synthesis of α -cyclopiazonic acid by fungi of the genus *Aspergillus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.43, n.4, p.435-438, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S.; **Plant drug analysis – Athin layer chromatography atlas**, Munich: Springer, 1996.

WALS, J. L.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; SANGALANG, A. E.; BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; PETROVIC, T.; *Fusarium*: two endophytic novel species from tropical grasses of northern Australia. **Fungal Diversity**, v.44, n.1, p.149-159, 2010.

WATVE, M. G.; TICKOO, R.; JOG, M. M.; BHOLE, B. D.; How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. **Archives of Microbiology**, v.176, n.5, p.386-390, 2001.

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R.; Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS. Microbiology Ecology**, v. 35, p.137- 144, 2001.

WILLAMS, D. A.; OVERHOLT, W. A.; CUDA, J. P.; HUGHES, C. R.; Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology**, v.14, n.12, p.3643-3656, 2005.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G.; **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York, v. 4, 1989.

XING, Y. M.; CHEN, J.; CUI, J. L.; CHEN, X. M.; GUO, S. X.; Antimicrobial Activity and Biodiversity of Endophytic Fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Current Microbiology**, v.62, n.4, p.1218-1224, 2011.

ZANARDI, L. M.; VANDERLAN, S. B.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C.; ARAUJO, A. R.; SILVA, G. H.; TELES, H L.; YOUNG, M. C. M.; sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Quim. nova**, v.35, n. 11, p.2233-2236, 2012.

ZENG, R.; LUO, S.; SHI, Y.; Allelopathic effects of secalonic acid F produced by *Aspergillus japonicus* on *Zea mays*. **The Journal of Applied Ecology / Zhongguo**, v.15, n.1, p.145-148, 2004.

ZIN, N. M.; NIM, S. N.; GHADIN, D. F.; BASRI, N. M.; SIDIK, W. M.; HESS, G. A.; STROBEL.; Bioativos estreptomicetos endofíticas da Península Malaia. **FEMS Microbiol.** v.274, p.83-88, 2007.

ZHANG, L., A. N. R.; WANG, J.; SUN, N.; ZHANG, S. H. U, J.; Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. **Curr. Opin. Microbiol**, v.81, p.8-276, 2005.

ZHAO, K.; SUN, X. P.; HAN, L.; ZHENG, C. J.; CHEN, M.; SHAO, C. L.; SHE, Z. G.; WANG, C.Y.; The Steroids and Their Bioactivities of a Sponge-Derived Fungus *Pleosporaceae* sp.. **Periodical of Ocean University of China**, Qingdao, 2011.

APÊNDICES

Tabela 1: Composição dos meios de cultura

Componentes	SAB	BDA	ISP-2	ALA	MH
<i>Extrato de levedura</i>	-	-	4 g	-	-
<i>Extrato de malte</i>	-	-	10 g	-	-
<i>Glicose</i>	40 g	20 g	4 g	1 g	-
<i>L-arginina</i>	-	-	-	0,3 g	-
<i>Glicerol</i>	-	-	-	1 g	-
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	-	-	-	0,2 g	-
<i>K₂HPO₄</i>	-	-	-	0,3 g	-
<i>Batata</i>	-	200 g	-	-	-
<i>Peptona</i>	10 g	-	-	-	-
<i>Infusão de carne bovina</i>	-	-	-	-	30 g
<i>Peptona de caseína ácida</i>	-	-	-	-	17,5 g
<i>Amido</i>	-	-	-	-	1,5 g
<i>Cloreto de sódio</i>	-	-	-	0,3 g	-
<i>Levedura</i>	-	-	-	1 g	-
<i>Nistatina</i>	-	-	100 mg	100 mg	-
<i>Cloranfenicol</i>	100 mg	100 mg	-	-	-
<i>Ágar</i>	15 g	15 g	15 g	15 g	15 g
<i>Água destilada</i>	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Tabela 2: Composição dos meios líquidos

Componentes	MPE	M1	YmA
<i>Extrato de levedura</i>	-	-	-
<i>Extrato de malte</i>	-	-	-
<i>Glicose</i>	40 g	20 g	-
<i>NaNO₃</i>	-	-	2 g
<i>FeSO₄.7H₂O</i>	-	-	2 g
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	-	-	0,5 g
<i>K₂HPO₄</i>	-	-	1 g
<i>Batata</i>	-	200 g	-
<i>Peptona</i>	10 g	-	-
<i>Sacarose</i>	-	-	30 g
<i>Cloreto de sódio</i>	-	-	0,5 g
<i>Água destilada</i>	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Tabela 3: Composição do Tampão Fosfato de Potássio

Componentes	TAMPÃO
<i>K₂HPO₄</i>	3,4836 g
<i>KH₂PO₄</i>	2,7218 g
<i>ÁGUA DESTILADA</i>	1000 ml