

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS E DA RIZOSFERA DE
MELÃO-DE-SÃO CAETANO (*Momordica charantia* L.)**

Vânia Teixeira Lima

Recife – 2006

Vânia Teixeira Lima

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ACTINOMICETOS ENDOFÍTICOS E DA RIZOSFERA DE
MELÃO-DE-SÃO CAETANO (*Momordica charantia* L.)**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janete Magali de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Recife - 2006

Lima, Vânia Teixeira

Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos e da rizosfera de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L.) / Vânia Teixeira Lima. – Recife : O Autor, 2006.

80 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2006.

Inclui bibliografia, apêndice e anexos.

1. Biotecnologia de produtos bioativos – Microrganismos. 2. Actinomicetos endofíticos e rizosfera de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L.) – Atividade antimicrobiana – Fermentação e identificação. 3. Bloco de gelose – Teste de difusão em disco. I. Título.

**579.6
579.37**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-322**

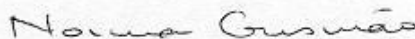
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR VÂNIA TEIXEIRA LIMA AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 09 DE MAIO DE 2006 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. ELZA ÁUREA DE LUNA ALVES LIMA
Departamento de Micologia - UFPE



Dra. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. GLÍCIA MARIA TORRES CALAZANS
Departamento de Antibióticos - UFPE

Quantas vezes...

Quantas vezes pensamos em desistir, deixar de lado o ideal e os sonhos;
Quantas vezes sentimos o peso da responsabilidade sem ter com quem dividir;
Quantas vezes sentimos solidão, mesmo cercado de pessoas;
Quantas vezes lutamos por uma causa perdida;
Quantas vezes voltamos para casa com a sensação de derrota;
Quantas vezes aquela lágrima teima em cair justamente na hora que precisamos
parecer fortes;
Quantas vezes pedimos a Deus um pouco de força, um pouco de luz...
E a resposta vem, seja através de um sorriso, um olhar, um bilhete, um gesto de
amor.

E nós insistimos...

Insistimos em prosseguir, em acreditar, em transformar, em dividir, em estar, em ser.
E Deus insiste em nos mostrar o caminho, aquele mais difícil, mais complicado, mais
bonito...

E nós insistimos em seguir, por ter uma missão: **SER FELIZ!!!**

A minha família,

*Meu porto seguro, meu alicerce, minha referência,
por estar presente em todos os momentos da minha
vida, sempre me apoiando, com tanta dedicação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A minha família, por ser tão preciosa e meu maior orgulho. Amo vocês!

A minha amiga Rosa Elvira, por todos os momentos que vivemos juntas, compartilhando nossas angústias e alegrias, sempre unidas. Amiga, obrigada por tudo e saiba que você é “imensamente” valiosa para mim.

A minha orientadora, prof^a. Janete Magali de Araújo, pela orientação e ensinamento durante o desenvolvimento desta dissertação e, especialmente, pela sua amizade;

A Fabian, por ser tão especial na minha vida;

Aos meus amigos, por torcerem sempre por mim;

Ao pessoal do Laboratório de Genética, pelos momentos de descontração, cooperação e amizade;

Aos colegas e técnicos do Departamento de Antibióticos, especialmente a Fátima Regina, pela amizade e cooperação no decorrer deste trabalho;

A Sueli Cavalcanti, pela presteza e atenção durante todo o curso;

Ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de realização do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:

OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1- Introdução	01
2 - Objetivos	03
2.1 – Objetivo Geral	03
2.2 – Objetivos Específicos	03
3 - Revisão Bibliográfica	04
3.1 – <i>Momordica charantia</i> L. – Melão-de-São Caetano	04
3.2 – Microrganismos Endofíticos	06
3.2.1 – Actinomicetos	09
3.2.1.1 – Aplicações Biotecnológicas	11
3.2.1.2 – Actinomicetos Endofíticos	14
3.2.1.3 – Actinomicetos da Rizosfera	16
4 - Material e Métodos	19
4.1 – Material Biológico	19
4.1.1 – Coleta	19
4.1.2 – Identificação	19
4.2 – Isolamento de Microrganismos	20
4.2.1 – Microrganismos Endofíticos	20
4.2.1.1 – Desinfecção	20
4.2.1.2 – Isolamento	21
4.2.2 – Microrganismos da Rizosfera	21
4.3 – Purificação de Microrganismos Endofíticos e da Rizosfera	22
4.4 – Preservação de Microrganismos Endofíticos e da Rizosfera	22
4.5 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana	23
4.5.1 – Microrganismos-teste	23
4.5.1.1 – Cultivo dos Microrganismos-teste	24
4.5.2 – Seleção Primária em Meio Sólido	24

4.5.2.1 – Teste em Bloco de Gelose	24
4.5.3 – Seleção Secundária em Meio Líquido	25
4.5.3.1 – Pré-inóculo	25
4.5.3.2 – Teste de Difusão em Disco	26
4.6 – Extração de Compostos Bioativos da Massa Celular	27
4.7 – Identificação dos Actinomicetos	27
4.7.1 – Morfologia	27
4.7.2 – Estudo da Parede Celular	28
4.7.2.1 – Hidrólise da Parede Celular	28
4.7.2.2 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	28
5 – Resultados e Discussão	30
5.1 – Isolamento de Microrganismos Endofíticos	30
5.2 – Isolamento de Microrganismos da Rizosfera	32
5.3 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana	33
5.3.1 – Seleção Primária – Bloco de Gelose	33
5.3.1.1 – Ensaio com Actinomicetos Endofíticos	33
5.3.1.2 – Ensaio com Actinomicetos da Rizosfera	36
5.3.2 – Seleção Secundária – Difusão em Disco	38
5.3.2.1 – Ensaio com Actinomicetos Endofíticos	39
5.3.2.2 – Ensaio com Actinomicetos da Rizosfera	41
5.4 – Extração de Compostos Bioativos da Massa Celular	48
5.5 – Identificação dos Actinomicetos	49
6 – Conclusão	53
7 – Perspectivas	54
8 – Referências Bibliográficas	55
9 – Apêndice	71
10 – Anexos	76

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 3.1 – Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i>	10
Figura 4.1 – Melão-de-São Caetano - <i>Momordica charantia</i>	19
Figura 4.2 – Esquema da desinfecção dos tecidos vegetais em hipoclorito de sódio ..	20
Figura 4.3 – Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos de <i>Momordica charantia</i> : a) Amostra de folha; b) Fragmentação do material; c) Fragmentos de raízes	21
Figura 4.4 – Esquema do isolamento de microrganismos da rizosfera	22
Figura 4.5 – Esquema do teste em bloco de gelose	25
Figura 4.6 – Esquema do teste de difusão em disco de papel	26
Figura 5.1 – Isolamento de microrganismos de <i>M. charantia</i> – a) Fragmentos foliares com fungos emergindo; b) Colônias bacterianas isoladas da rizosfera; c) Purificação de actinomicetos	33
Figura 5.2 – Halo de inibição do actinomiceto MCF-65 contra <i>S. aureus</i>	34
Figura 5.3 – Diâmetro dos halos de inibição dos actinomicetos MCF-55 e MCF-65, em bloco de gelose, contra diferentes microrganismos-teste	34
Figura 5.4 – Diâmetro dos halos de inibição dos actinomicetos MCR-80, MCR-100, MCR-103 e MCR-79, em bloco de gelose, contra diferentes microrganismos-teste	35
Figura 5.5 – Halos de inibição do actinomiceto MCR-79 contra: a) <i>Candida</i> sp. (4249); b) <i>Malassezia furfur</i> (4503)	35
Figura 5.6 – Percentual de actinomicetos isolados da rizosfera com atividade para diferentes microrganismos-teste	36
Figura 5.7 – Diâmetro dos halos de inibição de diferentes actinomicetos, em bloco de gelose, contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	37
Figura 5.8 – Diâmetro dos halos de inibição de diferentes actinomicetos, em bloco de gelose, contra linhagens de <i>Candida</i> e <i>Malassezia</i> spp.....	38
Figura 5.9 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCF-55, durante 120 horas de fermentação no meio ISP-2, contra <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>	39
Figura 5.10 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCF-65, durante 120 horas de fermentação no meio M1, contra <i>S. aureus</i> e <i>B. subtilis</i>	40

Figura 5.11 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCR-79, com 96 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste	41
Figura 5.12 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-117*, com 96 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste	42
Figura 5.13 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-13, com 24 horas de fermentação no meio M1, contra diferentes microrganismos-teste	43
Figura 5.14 – Halos de inibição do actinomiceto MCRF-13 nos três meios de cultivo, com 24 horas de fermentação, contra: a) <i>Candida</i> sp. (4224); b) <i>Candida</i> sp. (4249); c) <i>M. sympodialis</i> (4849); d) <i>M. furfur</i> (4498), com 48 horas em meio ISP-2	43
Figura 5.15 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-38, com 72 horas de fermentação no meio MPE, para diferentes microrganismos-teste	44
Figura 5.16 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-88, durante 120 horas de fermentação no meio ISP-2, contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>Candida</i> sp. (4249)	45
Figura 5.17 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-6, durante 96 horas de fermentação no meio MPE, contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>Candida</i> sp. (4224)	46
Figura 5.18 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-121, com 72 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste	46
Figura 5.19 – Micromorfologia dos actinomicetos endofíticos no meio ISP-2: a) MCF-55; b) MCF-65. As setas indicam cadeias de esporos espirais, típicas do gênero <i>Streptomyces</i> (aumento 400X)	50
Figura 5.20 – Micromorfologia dos actinomicetos da rizosfera no meio ISP-2: a) MCRF-6; b) MCRF-88; c) MCRF-117*. As setas indicam cadeias de esporos espirais, típicas do gênero <i>Streptomyces</i> (aumento 400X)	51
Figura 5.21 – Cromatografia em camada delgada da parede celular dos actinomicetos – DAP (LL-DAP e meso-DAP); 1) <i>Nocardia asteroides</i> ; 2) <i>Streptomyces regensis</i> ; 3) MCF-55; 4) MCF-65; 5) MCF-79; 6) MCRF-6; 7) MCRF-13; 8) MCRF-38; 9) MCRF-88; 10) MCRF- 117*; 11) MCRF-121.....	52

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 4.1 – Microrganismos-teste utilizados na atividade antimicrobiana	23
Tabela 5.1 – Frequência de isolamento de microrganismos endofíticos (%)	31
Tabela 5.2 – Halos de inibição dos actinomicetos MCRF-88 e MCRF-121, com os extratos da massa celular em diferentes solventes e tempo de fermentação, contra <i>M. tuberculosis</i>	49
Tabela 5.3 – Características morfológicas dos actinomicetos endofíticos no meio ISP-2	50
Tabela 5.4 – Características morfológicas dos actinomicetos da rizosfera no meio ISP-2	51

RESUMO

As plantas medicinais constituem uma fonte valiosa para o isolamento de microrganismos capazes de produzir diversas moléculas bioativas. *Momordica charantia* L., conhecida popularmente como Melão-de-São Caetano, pertence à família das Cucurbitáceas e é uma planta muito utilizada na medicina popular para o tratamento de várias afecções de origem microbiana. Folhas e raízes de Melão-de-São Caetano foram coletadas e, após a desinfecção, foram fragmentadas e plaqueadas nos meios Batata Dextrose Ágar (BDA) e Caseína Amido Ágar (CAA). A rizosfera foi processada por meio de diluição seriada, seguida de semeadura nos mesmos meios. Foram isolados 289 microrganismos endofíticos, sendo 71 das folhas (72% fungos, 21% bactérias e 7% actinomicetos) e 218 das raízes (55% fungos, 38% bactérias e 7% actinomicetos). Da rizosfera foram isolados 220 microrganismos (5% fungos, 47% bactérias e 48% actinomicetos). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através dos testes de bloco de gelose e de difusão em disco, utilizando os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, quatro linhagens de *Malassezia* spp. e quatro de *Candida* spp. Entre os actinomicetos endofíticos testados em bloco de gelose (ISP-2), 35,2% apresentaram atividade antimicrobiana, sendo 23,5% endofíticos da raiz e 11,7% da folha. Quanto à rizosfera, 63% dos actinomicetos testados foram ativos para um ou mais patógenos. Neste ensaio os halos de inibição variaram entre 10 a 40 mm. As melhores linhagens foram cultivadas nos meios líquidos M1, MPE e ISP-2. Todas as linhagens apresentaram atividade para pelo menos um dos patógenos testados, com halos entre 9 e 30 mm. A maioria dos actinomicetos avaliados foi identificado como pertencente ao gênero *Streptomyces*.

ABSTRACT

Medicinal plants constitute a source valuable for the isolation of microorganisms capable to produce diverse molecules bioactive. *Momordica charantia* L., known commonly as Bitter Melon, belongs to the family Cucurbitaceae and is a plant largely used in popular medicine for treatment of some ailments of microbial origin. Leaves and roots of bitter melon were collected and after the disinfection, were cut into small pieces and plated on Potato Dextrose Agar (PDA) and Casein Starch Agar (CAA) medium. The rhizosphere was processed through seriate dilution and plated in the same media. Were isolated 289 endophytic microorganisms, where 71 of leaves (72% fungi, 21% bacteria and 7% actinomycetes) and 218 of the roots (55% bacteria, 38% fungi and 7% actinomycetes). From rizosphere were isolated 220 microorganisms (5% fungi, 47% bacteria and 48% actinomycetes). The antimicrobial activity was determined by the agar piece method and the plate diffusion method, using the following pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, four strains of *Malassezia* spp. and four of *Candida* spp. From the endophytic actinomycetes tested in the solid media (ISP-2), 35.2% presented antimicrobial activity, being 23.5% of root endophytes and 11.7% leaf endophytes. From the rizosphere, 63% of the actinomycetes were active for one or more pathogens. In this assay the inhibition halos varied between 10 to 40 mm. The best strains were cultivated in liquid media M1, MPE and ISP-2. All strains showed activity against at least one of the tested pathogens, with halos between 9 and 30 mm. The majority of the actinomycetes evaluated were identified as belonging to the genus *Streptomyces*.

1 – INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é uma consequência da adaptação de agentes infecciosos a exposição a antibióticos antibacterianos e antifúngicos usados na medicina humana e veterinária e na agricultura. Embora essas drogas tenham sido muito úteis, a utilização abusiva e indiscriminada tem facilitado o surgimento de microrganismos patogênicos resistentes, limitando os benefícios dessas substâncias no controle de doenças infecciosas.

O uso inadequado de antimicrobianos é o fator mais importante responsável pelo aumento da resistência microbiana (MITEMA *et al.*, 2001; RUBIN e SAMORE, 2002). Há casos em que linhagens microbianas têm se tornado resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos disponíveis (RUSSO e JOHNSON, 2003).

De acordo com Paladino *et al.* (2002) e Cosgrove e Carmeli (2003), a resistência microbiana é um problema tanto médico quanto econômico. Os organismos resistentes causam infecções que são difíceis de tratar, necessitando de drogas que frequentemente não estão prontamente disponíveis, uma vez que são mais caras e às vezes mais tóxicas (HOWARD *et al.*, 2001).

Uma imensa variedade de produtos naturais vem sendo estudada, dos quais grande parte são metabólitos secundários produzidos por microrganismos e plantas. Segundo Fenical e Jensen (1993), metade desses metabólitos é de origem microbiana. Numa pesquisa realizada por Berdy em 1995, dos 12 mil antibióticos conhecidos, 55% foram produzidos por actinomicetos (bactérias filamentosas) pertencentes ao gênero *Streptomyces*, 11% por outros actinomicetos, 12% por bactérias não filamentosas e 22% por fungos filamentosos.

Embora muitos dos microrganismos produtores de metabólitos bioativos conhecidos geralmente tenham sido isolados do solo, a descoberta de *Streptomyces* colonizando os tecidos internos de plantas e formando uma associação íntima, revelou os endofíticos, especialmente Streptomycetes, como uma fonte promissora para a descoberta de novos antibióticos com potenciais farmacológicos.

Os microrganismos endofíticos não produzem substâncias bioativas úteis apenas para fins terapêuticos; eles podem produzir compostos químicos que afetam as plantas hospedeiras de várias maneiras, como: aumentando a resistência da planta a diversos tipos de estresse, aos insetos e a doenças (BUSH *et al.*, 1997; SHIMIZU *et al.*, 2000), melhorando a produtividade (SHIMIZU *et al.*, 2001) e desempenhando atividades herbicidas (PETERS *et al.*, 1998), quando em associação com as plantas.

As plantas são utilizadas no tratamento terapêutico de várias doenças há muito tempo e atualmente inúmeras pesquisas vêm demonstrando que os microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais são capazes de sintetizar produtos bioativos idênticos ou similares aqueles metabólitos bioativos do vegetal (STROBEL, 2003).

Momordica charantia L., conhecida como melão-de-São Caetano, é uma herbácea da família das Cucurbitáceas, muito comum em vários estados brasileiros. Esta planta é utilizada pela medicina popular no tratamento de várias doenças de pele, como eczemas, acne, pano branco, sarna, sendo também usada para diabetes, furúnculos, hemorróidas e vermes intestinais.

Estudos científicos desenvolvidos nas últimas décadas revelaram que *M. charantia* possui várias propriedades medicinais como antidiabética, antiviral, antitumoral, antileucêmica, antibacteriana, antihelmíntica, antimutagênica, antimicobacteriana, antioxidante, antiinflamatória, hipotensiva, imunoestimulante, hipocolesterolêmica, hipotrigliceridêmica, além de propriedade inseticida (NG *et al.*, 1992; RAMAN e LAU, 1996; BASCH *et al.*, 2003).

Devido ao seu uso popular, *M. charantia* foi selecionada como fonte de microrganismos endofíticos pressupondo que algumas das suas propriedades medicinais possam ser devido aos produtos de um ou mais endofíticos, enfatizando também os microrganismos da rizosfera, que podem vir a constituir uma fonte extremamente rica de compostos bioativos.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Isolar e avaliar a atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos e da rizosfera de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L.).

2.2 – Objetivos Específicos

- Isolar microrganismos endofíticos de folhas e raízes de *Momordica charantia*;
- Isolar microrganismos da rizosfera de *Momordica charantia*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos actinomicetos isolados em meio sólido;
- Avaliar os actinomicetos com melhor atividade antimicrobiana em meio líquido;
- Identificar, em nível de gênero, os actinomicetos com melhor atividade antimicrobiana.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – *Momordica charantia* L. – Melão-de-São Caetano

Momordica charantia L., membro da família Cucurbitaceae, é uma planta dispersa por todos os trópicos, particularmente, Ásia, África e América do Sul, sendo frequentemente utilizada na medicina popular de muitos países para o tratamento de várias afecções (GÜRBÜZ *et al.*, 2000; BASCH *et al.*, 2003).

Popularmente conhecida como melão-de-São Caetano ou erva de lavadeira, pode ser encontrada em várias regiões do Brasil, especialmente em cidades interioranas do Nordeste, onde cresce facilmente em cercas, muros e árvores. É uma planta trepadeira com flores amarelas muito finas e delicadas e frutos cor de ouro com espinhos moles na superfície que, quando maduros, abrem-se espontaneamente expondo as sementes vermelhas. Seus frutos são parecidos com um pequeno melão, o que lhe rendeu seu nome.

O melão-de-São Caetano tem várias propriedades medicinais incluindo antidiabético, antiviral, antihelmíntico, antimicrobiano, anticancerígeno, abortivo, contraceptivo, antimalária, imunoestimulante, laxante (YESILADA *et al.*, 1999). Podendo ainda ser usado para tratar úlceras gástricas e ajudar na cicatrização de feridas, além de várias afecções como leucorréia, icterícia, psoríase, sarna, lepra, pneumonia, reumatismo, pedra nos rins (GROVER e YADAV, 2004).

Momordica charantia contém vários compostos biologicamente ativos distribuídos em diferentes grupos químicos que incluem glicosídeos, saponinas, alcalóides, óleos, triterpenos, proteínas, esteróides (RAMAN e LAU, 1996). Destes grupos, diversas substâncias já foram isoladas tais como: momorcharinas, momordenol, momordicilina, momordicinina, momordina, momordolol, charantina, charina, criptoxantina, cucurbitinas, cucurbitacinas, cucurbitanas, cicloartenóis, diosgenina, eritrodiol, ácidos galacturônico, clacosteárico e gentísico, multiflorenol, goiaglicosídeos, goiasaponinas (HUSAIN *et al.*, 1994; XIE *et al.*, 1998; YUAN *et al.*, 1999; PARKASH *et al.*, 2002), distribuídas por todas as partes da planta e com

atividade, principalmente, hipoglicemiante, antiviral e antitumoral (MURAKAMI *et al.*, 2001).

Segundo Marles e Farnsworth (1997), vários constituintes isolados de todas as partes da planta têm mostrado propriedades hipoglicêmicas, mas a combinação de dois glicosídeos esteróides e um polipeptídeo isolado de sementes, denominados charantina e polipeptídeo p, respectivamente, tem despertado interesse maior por apresentar melhor atividade hipoglicemiante.

GÜRBÜZ *et al.* (2000) detectaram alto conteúdo de carotenóides nos extratos etanólicos dos frutos e investigaram seu efeito em úlceras induzidas em ratos para explicar o efeito antioxidante dos carotenóides na atividade anti-ulcerogênica do extrato, uma vez que, como relatado por Kiraly *et al.* (1992), os carotenóides podem atuar como potentes antioxidantes e protetores da mucosa gástrica. Já no trabalho desenvolvido por Yesilada *et al.* (1999), os extratos etanólicos dos frutos apresentaram atividade para *Helicobacter pylori*.

Prabakar e Jebanesan (2004) verificaram a eficiência de extratos metanólicos das folhas no controle de larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus*. Enquanto Omoregbe *et al.* (1996) verificaram a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso, etanólico e metanólico das folhas contra *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenterae*, *Streptomyces griseus* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Khan avaliou a atividade antiprotzoária para *Entamoeba histolytica* a partir do extrato etanólico total da planta. Já Schmourlo *et al.* (2005), em suas pesquisas, confirmaram a atividade antifúngica de *M. charantia* utilizando extratos aquosos de várias partes da planta, que apresentam atividade contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Recentemente, Beloin *et al.* (2005) evidenciaram a atividade antiviral e antihelmíntica de triterpenóides glicosídicos isolados das folhas, classificados de momordicinas I e II, destacando principalmente a eficiente atividade nematicida dessas substâncias.

Apesar do melão-de-São Caetano ser usado popularmente há décadas no tratamento de afecções de origem tanto bacteriana quanto fúngica, há poucos relatos científicos quanto a sua atividade antimicrobiana, tão pouco quanto aos

microrganismos presentes nesta planta, necessitando de mais pesquisas com esta finalidade.

3.2 – Microrganismos Endofíticos

Endofíticos são microrganismos que passam parte ou todo o seu ciclo de vida colonizando inter e/ou intracelularmente tecidos saudáveis da planta hospedeira, não causando, aparentemente, sintomas de doenças (STURZ *et al.*, 2000). Essas bactérias diferem dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais ao hospedeiro, e dos epifíticos, que vivem na superfície de tecidos vegetais (AZEVEDO, 1998).

Os endofíticos podem penetrar nos tecidos da planta hospedeira tanto por aberturas naturais como estômatos e região de emissão de raízes secundárias, quanto por aberturas artificiais como ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos ocasionados pelo atrito com as partículas do solo (PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002), além de ferimentos causados por insetos e até por estruturas fúngicas como os apressórios (AZEVEDO, 1998).

Segundo Kobayashi e Palumbo (2000), a entrada desses microrganismos na planta geralmente se dá pela raiz, no entanto, pode ocorrer através das partes aéreas como flores e cotilédones e, após a penetração, há uma disseminação sistêmica pela planta podendo colonizar tanto entre como dentro das células vegetais (HALLMANN *et al.*, 1997).

O relacionamento entre o endófito e a planta hospedeira, segundo Strobel e Long (1998), deve se estender desde fitopatogênese latente à simbiose mutualística. Pullen *et al.* (2002) relatam que um microrganismo em particular pode se comportar como um patógeno em uma determinada situação e como um endófito em outra na mesma planta, indicando uma íntima associação entre a patogenicidade e o endofitismo e uma possível co-evolução entre os endofíticos e seus hospedeiros.

Quase todas as espécies de plantas examinadas até hoje foram encontradas abrigando bactérias e fungos endofíticos. Comumente, muitos microrganismos endofíticos podem ser isolados de uma única planta, e entre estes microrganismos, pelo menos um mostra especificidade ao hospedeiro (STURZ *et al.*, 2000).

A população endofítica de uma determinada espécie microbiana é altamente variável. De acordo com Hata *et al.* (1998), as condições ambientais sob a qual o hospedeiro está crescendo podem afetar de forma surpreendente a população microbiana, como em áreas tropicais, onde geralmente a diversidade de microrganismos endofíticos é maior.

Os endofíticos são importantes componentes da diversidade microbiana (CLAY, 1992). A sua presença na planta pode ter papel fundamental no desenvolvimento saudável da planta e sua atividade biológica pode afetar o crescimento vegetal através da assimilação de nutrientes ou através da produção *in situ* de metabólitos secundários (SARDI *et al.*, 1992).

Os fungos são os microrganismos endofíticos mais comumente isolados. Alguns fungos, quando associados às folhas e pecíolos, são importantes produtores de enzimas celulolíticas e lignolíticas, como algumas espécies do gênero *Xilaria*, que atuam degradando a celulose e a lignina após a morte do tecido vegetal (CARROL e CARROL, 1978). Fatores de crescimento, como o hormônio giberelina, produzido pelo endofítico *Fusarium moniliforme*, são exemplos que podem indicar a transferência de genes entre as plantas e os microrganismos, numa verdadeira engenharia genética “*in vivo*” (AZEVEDO, 1998).

Vários fungos endofíticos podem produzir antibióticos e esses produtos naturais têm sido observados inibindo ou matando uma ampla variedade de microrganismos prejudiciais incluindo fitopatógenos, assim como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL *et al.*, 2004). Desde a descoberta do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia* nos Estados Unidos, ambos produtores do potente anticancerígeno Taxol (STIERLE *et al.*, 1995), uma ampla variedade de fungos endofíticos, isolados de diferentes plantas, tem sido relatada como produtores não apenas de Taxol, mas também de outras substâncias bioativas (TAN e ZOU, 2001).

O fungo, *Cryptosporiopsis quercina*, isolado de uma planta medicinal, tem demonstrado excelente atividade antifúngica contra alguns importantes fungos patogênicos humanos como *Candida albicans* e *Trichophyton* spp.. Algumas substâncias como criptocina (LI *et al.*, 2000) e criptocandina (STROBEL *et al.*, 2004) já foram isoladas desse fungo, ambas como atividade antimicótica.

Há um grande número de espécies bacterianas endofíticas encontradas em associação com as plantas. Um dos gêneros mais comuns é *Pseudomonas*, onde algumas espécies produzem compostos fitotóxicos assim como antibióticos. Entre algumas substâncias identificadas, estão presentes as ecomicinas, produzidas por *Pseudomonas viridiflava* (MILLER *et al.*, 1998), com atividade para *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, e as pseudomicinas, peptídeos ativos contra uma ampla variedade de fungos patogênicos de humanos e de plantas (STROBEL *et al.*, 2004).

Muitas bactérias do gênero *Bacillus* também produzem um ou mais antibióticos, principalmente antifúngicos, onde algumas dessas substâncias demonstraram ser ativas contra doenças de plantas (EDWARDS e SEDON, 1991). Inúmeros trabalhos relatam *B. subtilis* como agente para o controle biológico de vários fungos fitopatogênicos, sendo a produção de antibióticos o principal mecanismo de ação destas bactérias (SEIFERT *et al.*, 1987; FERREIRA *et al.*, 1991).

Com raras exceções, os antibióticos produzidos por *Bacillus* spp. pertencem a uma única classe, os peptídeos, os quais apresentam atividade antimicrobiana variada. Muitos são inibidores de bactérias Gram-positivas, alguns como as poliomixinas, inibem bacilos Gram-negativos, outros como as bacilomicinas, são agentes antitumorais de grande importância clínica médica (LANCINI e LORENZETTI, 1993).

Entre as bactérias endofíticas, um grupo em especial, pertencente à família Actinomicetaceae, tem se destacado pela sua capacidade em produzir metabólitos secundários com atividade biológica diversificada. Segundo Schippers *et al.* (1987), vários relatos referem-se à atuação de actinomicetos na proteção da planta hospedeira contra patógenos e a influência de seus produtos metabólicos no crescimento e na fisiologia da planta.

Os actinomicetos endofíticos, particularmente o gênero *Streptomyces*, têm sido fonte de novos antibióticos com atividade contra bactérias, fungos e protozoários. Segundo Cohen e Coffey (1986), na década de 50 os antibióticos estreptomicina e cicloheximida, ambos produzidos por *Streptomyces griseus*, já eram utilizados para controlar doenças de plantas. De acordo com Yamaguchi *et al.*

(1988), inúmeros programas de triagem relataram a atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos de interesse para a agricultura de diversos antibióticos isolados de linhagens de *Streptomyces*.

Pouco se sabe sobre os compostos bioativos presentes em muitos vegetais, particularmente em plantas medicinais, embora o interesse tenha aumentado e mais trabalhos estejam sendo realizados para seu isolamento e caracterização. Porém, é evidente que as plantas medicinais constituem uma fonte variada de microrganismos endofíticos com ampla atividade biológica.

3.2.1 – Actinomicetos

Actinomicetos são bactérias pertencentes à Ordem Actinomycetales cuja característica comum é a formação de micélio aéreo e micélio vegetativo em algum estágio de seu ciclo de vida (MCCARTHY e WILLIAMS, 1990). William e Vickers (1988) definiram esses microrganismos como um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas que superficialmente se assemelham aos fungos filamentosos, mas há diferenças básicas entre os dois grupos, como a organização celular, no qual os actinomicetos são seres procarióticos, enquanto os fungos filamentosos são eucarióticos (PELCZAR, 1997), e o diâmetro das hifas, onde os actinomicetos possuem hifas com no máximo 2µm de diâmetro e os fungos pelo menos o dobro (STANIER *et al.*, 1969).

Estas bactérias são geralmente aeróbias estritas, pertencentes ao grupo das bactérias Gram-positivas com DNA rico em guanina mais citosina (C+G), e com ciclo de vida complexo, onde há a formação de micélio aéreo, micélio vegetativo e esporos. Quando cultivados em laboratório e em meios de cultura favoráveis, o crescimento dos *Streptomyces* spp. se inicia com a formação de um tubo germinativo que se ramifica formando o micélio vegetativo, fortemente aderido ao substrato sólido, seguido pela formação do micélio aéreo, que se diferencia formando a cadeia de esporos (CHATER e JOPWOOD, 1993). A esporulação começa com a formação simultânea de septos na hifa aérea e termina com a liberação de esporos, fechando assim o ciclo de vida (LANCINI e LORENZETTI, 1993) (Figura 3.1).

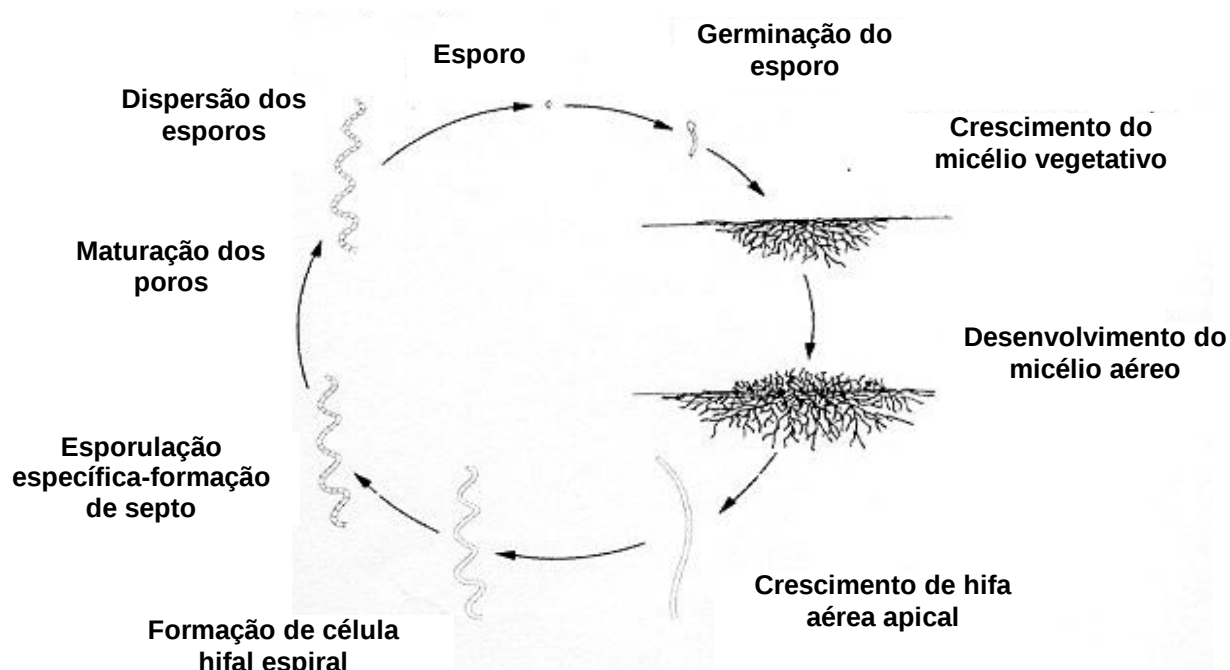


Figura 3.1 – Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* (CHATER e MERRICK, 1979).

Os esporos dos actinomicetos podem ser produzidos individualmente ou em cadeias, livres ou em estruturas especializadas, ou com fragmentação de hifas. Apresentam coloração e ornamentação variadas, podendo ser móveis ou imóveis, o que os torna úteis durante a identificação desse grupo (LOGAN, 1994).

Os actinomicetos estão amplamente distribuídos na natureza, desenvolvendo-se em variados substratos. O solo é o habitat mais comum dessas bactérias, sendo abundante também na rizosfera, mas embora a maioria seja saprófita estrito, alguns podem formar associações parasíticas ou mutualísticas com plantas e animais (GOODFELLOW e WILLIAMS, 1983). Várias investigações revelaram a ocorrência de actinomicetos endofíticos no interior de folhas e raízes de plantas (SARDI, 1992; OKAZAKI *et al.*, 1995; STAMFORD, 1997; MATSUURA, 1998, ARAÚJO *et al.*, 2000; COOMBS e FRANCO, 2003; TAECHOWISAN *et al.*, 2003; CAO *et al.*, 2004).

Comparando a comunidade endofítica e da rizosfera, percebe-se que as populações de endofíticos representam um subgrupo de bactérias da rizosfera (MCINROY e KLOPPER, 1995; GERMIDA *et al.*, 1998; SESSITSCH *et al.*, 2002). Contudo, algumas bactérias não foram encontradas na rizosfera, mas sim em

plantas onde, provavelmente, esses microrganismos já habitavam o interior dos tecidos das plantas como infecções latentes (SESSITSCH *et al.*, 2002).

As populações de actinomicetos são componentes importantes da comunidade microbiana da rizosfera, visto que podem influenciar o desenvolvimento das plantas e proteger as raízes contra patógenos (CRAWFORD *et al.*, 1993). O mesmo ocorre com os actinomicetos endofíticos, que também apresentam efeitos favoráveis no crescimento e desenvolvimento da planta. Sua atividade biológica pode afetar o crescimento ou através do suprimento nutricional (SCHIPPERS *et al.*, 1987), ou pela produção de metabólitos secundários que estimulam ou deprimem o desenvolvimento do vegetal (MISHRA *et al.*, 1987), ou protegendo a planta contra microrganismos fitopatogênicos (ABD-ALLAH, 2001).

3.2.1.1 – Aplicações Biotecnológicas dos Actinomicetos

Os actinomicetos são de grande valor para a Biotecnologia devido à atividade biológica de seus metabólitos secundários e se destacam como importantes produtores de vitaminas, enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores, antiparasíticos, antihelmínticos, antiprotozoários, antivirais, antimicrobianos, além de herbicidas e inseticidas de ampla aplicação na agricultura (SANGLIER *et al.*, 1993; DAMAIN, 1995).

Queener e Day (1986) relataram que 2/3 dos antibióticos de ocorrência natural foram originados de actinomicetos e que dos 6.000 antibióticos de origem microbiana conhecidos, cerca de 60% deles foram produzidos por actinomicetos, enquanto o restante foram metabólitos de fungos e/ou bactérias, confirmando a versatilidade biossintética do metabolismo desses microrganismos.

A Ordem Actinomycetales compreende vários gêneros, dentre eles o gênero *Streptomyces*, responsável por 90% dos compostos bioativos com aplicação prática na medicina humana e veterinária, na agricultura e na indústria de alimentos (OKAMI e HOTTA, 1988).

Actinomicetos em geral, e em particular *Streptomyces* spp., têm sido reconhecidos principalmente pela sua capacidade de interagir com as plantas superiores ou mesmo com outras populações microbianas, mediante a produção de

antibióticos (GAVA *et al.*, 1999; PEREIRA, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000), como é o caso da validamicina A, produzida por linhagens de *Streptomyces higroscopicus* var. *limoneus*, usada no Japão como agente controlador de doenças de arroz (MISATO *et al.*, 1977). Assim como a blasticidina S, produzida por *Streptomyces griseochromogenes* (TAKEUCHI *et al.*, 1957), e a kasugamicina, por *Streptomyces kasugaensis* (UMEZAWA, 1965), ambas utilizadas principalmente contra *Piricularia oryzae*, responsável por várias doenças nesta cultura.

Outros antibióticos já foram identificados como as polyoxinas, isoladas de *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis* com atividade para muitos patógenos de plantas (ISONO, 1965). As polyoxinas D mostraram-se eficientes contra *Rhizoctonia solani*, enquanto as polyoxinas B e L contra *Alternaria kikuchiana* e *Botrytis cinerea* (ISONO, 1989). A fosfolactomicina, produzida por *Streptomyces nigresceus*, também apresentou atividade contra estes fungos (FUSHIMI *et al.*, 1989).

Em 1989, Inukai *et al.* conseguiram isolar uma substância produzida por *Streptomyces*, identificada posteriormente como mureidomicinas, seletivamente ativa contra *Pseudomonas*, incluindo as linhagens resistentes.

Recentemente, mais antibióticos foram obtidos de linhagens de *Streptomyces* como as celastramicinas A e B, produzidas por *Streptomyces* MaB-QuH-8, que apresentaram antagonismo para bactérias como *Mycobacterium vaccae* e *Bacillus subtilis* (PULLEN *et al.*, 2002); as mumumbicinas, isoladas de *Streptomyces* NRRL 30562, com largo espectro contra bactérias Gram-positivas, como *B. anthracis*, e contra *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente e *Plasmodium falciparum* (CASTILLO *et al.*, 2002).

As kakadumicinas, isoladas de *Streptomyces* sp. NRRL 30566, apresentaram atividade antimalárica e antimicrobiana para bactérias Gram-positivas (CASTILLO *et al.*, 2003); Enquanto as coronamicinas, antibióticos peptídicos produzidos por *Streptomyces* sp. MSU-2110, também revelaram atividade antimalárica, além de antifúngica (EZRA, *et al.* 2004).

No trabalho desenvolvido por Shimizu *et al.*, 2004, a linhagem *Streptomyces* sp. R-5, identificada como *Streptomyces galbus*, produziu duas substâncias denominadas actinomicinas X₂ e fungicrominas, ativas contra *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

As substâncias produzidas por *Streptomyces* exibem uma maior diversidade química, contudo, novas estruturas também têm sido isoladas de outros gêneros, principalmente *Actinomadura*, *Actinoplanes* e *Micromonospora* (LAZZARINI *et al.*, 2000). A dapiramicina, produzida por *Micromonospora* sp., revelou-se ativa contra *Rhizoctonia*, *Pyricularia* e *Botrytis* spp. (NISHIZAWA *et al.*, 1984). As cervinomicinas A1 e A2, produzidas por *Micromonospora* sp. M39, também foram antagônicas a fungos fitopatogênicos. Outras substâncias, como as citreamicinas, isoladas de *Micromonospora citrea*, mostraram-se ativas para bactérias anaeróbias, como *Clostridium* sp. (MAIESE *et al.*, 1989; CARTER *et al.*, 1990).

As pramicidinas, produzidas por *Actinomadura hibisca*, mostraram moderada atividade contra fungos e bactérias, sendo mais eficientes para *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (TOMITA *et al.*, 1990; OKI *et al.*, 1990). As macrolactamas, isoladas de *Actinomadura* spp., também mostraram boa atividade para *C. albicans*, mas foram fracamente ativas contra dermatófitos (HEDGE *et al.*, 1992).

A diversidade química de metabólitos bioativos de *Actinoplanes* também tem sido explorada, como o antibiótico purpuromicina, produzido por *Actinoplanes ianthinogenes* (RAMBELLI *et al.*, 1988); lipiarmicina, por *Actinoplanes deccadensis* (CAVALLERI *et al.*, 1988); actagardine, por *Actinoplanes garbadinensis* (MALABARBA *et al.*, 1985).

Várias outras substâncias produzidas por actinomicetos incomuns já foram obtidas como a rifamicina, produzida por *Amycolatopsis mediterranei*; Eritromicina, por *Saccharopolyspora erythraea*; teicoplanina, por *Actinoplanes teichomyceticus*; vancomicina, por *Amycolatopsis orientalis* e a gentamicina, por *Micromonospora purpurea* (LANCINI e LORENZETTI, 1993), todas com atividade antibacteriana.

Novos antibióticos e outros metabólitos secundários bioativos continuam sendo descobertos de fontes microbianas. A probabilidade de descobrir tais compostos depende de uma série de fatores extremamente importantes como o número de microrganismos selecionados e o grau de diversidade, a originalidade e seu potencial em produzir metabólitos, e para isso, é recomendada a exploração de novos solos e habitats (NOLAN e CROSS, 1988).

3.2.1.2 – Actinomicetos Endofíticos

As interações entre plantas e actinomicetos endofíticos têm sido mais extensivamente estudadas para o gênero *Frankia*, que contém espécies fixadoras biológicas de nitrogênio simbióticas de plantas não-leguminosas, capazes de induzir a nodulação em raízes de diversas plantas (BENSON e SILVESTER, 1993). As plantas noduladas por *Frankia* spp. são chamadas de plantas actinorrízicas (TORREY e TJEPKEMA, 1979) e compreendem cerca de 194 espécies distribuídas em 24 gêneros.

As primeiras observações sobre actinomicetos endofíticos foram feitas por Mundt e Hinkle, em 1976, que descreveram o isolamento de 19 gêneros de bactérias do interior de sementes e óvulos de plantas, destacando-se os gêneros *Corynebacterium*, com 35 isolados, seguido por *Nocardia* e *Streptomyces*, ambos com apenas um isolado. Posteriormente, O' Brien *et al.* (1984) isolaram 433 actinomicetos endofíticos, particularmente *Streptomyces* spp., do xilema e floema de *Ulmus americana*.

Em 1992, Sardi *et al.* isolaram 499 linhagens de actinomicetos da superfície esterilizada de amostras de raízes de 28 espécies de plantas nativas da Itália, com a maioria dos isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*, seguido de *Streptoverticillium* e *Nocardia*, e em menor quantidade *Micromonospora* e *Streptosporangium*. Enquanto Matsukama *et al.* (1995) obtiveram actinomicetos isolados de camélia (*Camelia japonica*) e *Citrus*, mas em pouca quantidade.

Petrolini *et al.* (1996) isolaram actinomicetos, particularmente *Actinoplanes* e *Streptomyces*, de raízes de mais de 100 espécies de plantas, enquanto Stamford (1997), em seu trabalho, relatou o isolamento de *Nocardiopsis* sp. em tubérculos de jacatupé (*Pachyrhizus erorus*).

Matsuura (1998) isolou mais de 30 linhagens de actinomicetos de folhas e raízes do feijão Caupi (*Vigna unguiculata*) com predominância de *Streptomyces* e *Nocardiopsis*. Enquanto Brito e Araújo (1998) isolaram 32 linhagens de folhas e raízes do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com a maioria pertencente ao gênero *Microbispora*, seguido por *Streptomyces*.

Em 1995, Okazaki *et al.* isolaram *Microbispora* spp. de folhas de milho (*Zea mays*). Posteriormente, Araújo *et al.* (2000) isolaram actinomicetos de raízes e folhas de milho sendo a maioria isolados do gênero *Microbispora* spp., embora *Streptomyces* spp. e *Streptosporangium* spp. foram também representados.

Caruso *et al.* (2000) constataram a presença de *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Kitasatospora*, *Micromonospora* e nocardioformes como endofíticos de plantas pertencentes ao gênero *Taxus*. Actinomicetos também foram obtidos da madeira de três diferentes plantas pertencentes à família Celastraceae, onde uma delas, *Maytenus aquifolia*, conhecida como espinheira-santa, pertence à vegetação no Brasil, e as outras duas, *Putterlickia retrospinoso* e *P. verrugosa*, são típicas do Sul da África (PULLEN *et al.*, 2002).

Coombs e Franco (2003) relataram a presença de actinomicetos em raízes de trigo (*triticum aestivum*), com predominância de *Streptomyces* spp, e em menor número *Microbispora*, *Micromonospora* e *Nocardioides*. Enquanto o trabalho desenvolvido por Uetanabaro (2004) descreveu o isolamento de 47 actinomicetos, todos do gênero *Microbispora*, a partir de folhas de Olho-de-boi (*Tocoyena formosa*).

Várias pesquisas têm mostrado a ocorrência e o potencial dos metabólitos secundários de actinomicetos endofíticos em diferentes espécies de plantas. Trejo-Estrada *et al.* (1998), em seu trabalho, relataram que actinomicetos endofíticos foram encontrados produzindo pelo menos três tipos de substâncias antagonistas em tecidos de plantas, incluindo antibióticos, enzimas e sideróforos.

Liu e Tang (1996) além de isolarem actinomicetos de amostras de raízes de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*), também avaliaram sua atividade fitopatogênica. Enquanto Shimizu *et al.* (2000) obtiveram actinomicetos da superfície esterilizada de folhas, raízes e caules de *Rhododendron* sp. e analisaram seu potencial como agentes biocontroladores contra fungos.

Stamford *et al.* (2001) avaliaram a produção de α -amilase termoestável de actinomicetos endofíticos pertencentes ao gênero *Nocardioopsis* isolados de tubérculos de jacatupé. Posteriormente, Stamford *et al.* (2002) caracterizaram enzimas glicoamilolíticas termoestáveis produzidas por *Streptosporangium* sp., actinomiceto endofítico isolado de folhas de milho. Segundo os mesmos autores,

enzimas de origem microbiana têm sido amplamente utilizadas no processamento de alimentos, fabricação de detergentes, indústrias têxtil e farmacêutica.

Taechowisan *et al.* (2003) isolaram 330 actinomicetos endofíticos de 36 espécies de plantas herbáceas e lenhosas na Tailândia, focalizando a exploração desses microrganismos como excelentes agentes de biocontroles contra fungos fitopatogênicos.

Tian *et al.* (2004) também obtiveram actinomicetos endofíticos, principalmente *Streptomyces*, mas também *Streptoverticillium*, de folhas e raízes de arroz (*Oryza sativa*) que mostraram atividade antagônica aos patógenos desta cultura. Cao *et al.* (2004a) isolaram actinomicetos, sendo a maioria linhagens de *Streptomyces griseorubiginosus*, de raízes e folhas de bananeiras (*Musa acuminata*) e testaram os isolados contra *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*, obtendo resultados promissores para o biocontrole deste fungo, causador da murcha da banana.

Em outro trabalho, Cao *et al.* (2004b) isolaram e caracterizaram actinomicetos endofíticos da superfície esterilizada de raízes de tomate visando a sua aplicação como agente de biocontrole de *Rhizoctonia solani*, causadora da doença no tomate, onde a maioria dos isolados foram identificados como pertencente aos gêneros *Streptomyces*, *Streptoverticillium* e *Nocardia*.

Os actinomicetos estão distribuídos em vários gêneros que são encontrados em diferentes plantas ou até mesmo em uma única planta apenas, podendo estar presentes espécies mais comuns, como as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, assim como gêneros mais raros ou incomuns, como *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Kitasatospora*, *Microbispora*, *Streptoverticillium*, *Nocardia* entre outros. Esta biodiversidade, que está relacionada com fatores intrínsecos da planta e condições sazonais, aumenta as chances de encontrar novas substâncias bioativas.

3.2.1.3 – Actinomicetos da Rizosfera

A rizosfera é a região do solo próxima ao sistema radicular que está diretamente influenciada pela atividade das raízes. Apresenta características bem diferentes dos solos adjacentes, sendo o local onde ocorre a maior parte das interações entre microrganismos e plantas (FOSTER, 1986). A colonização

rizosférica é determinada pela interação de uma série de fatores que variam de acordo com as plantas, os microrganismos e o meio ambiente. É um habitat mutável, onde sua composição e sua estrutura são influenciadas durante o ciclo vegetativo. A planta pode modificar as características químicas do solo nas proximidades de suas raízes através de exsudatos radiculares solúveis, enriquecendo o solo com uma variedade de compostos orgânicos (PEREIRA, 2000).

Os exsudatos se difundem através do meio adjacente representando um micronicho bastante atraente para a comunidade do solo, onde ocorrem interações diretas da microbiota rizosférica com as raízes e entre diferentes populações microbianas do solo (CARDOSO e FREITAS, 1992).

Segundo Foster (1986), as atividades das raízes criam um habitat favorável para o desenvolvimento de populações microbianas, inclusive de actinomicetos, predominando, como relatado por Pereira (2000), os gêneros *Streptomyces* e *Nocardia*. Alguns dados indicam que essas bactérias devem ser relativamente mais abundantes na rizosfera que no solo circundante (MOHAMED, 1982), mas há autores que discordam dessa afirmação (MILLER *et al.*, 1990). Crawford *et al.* (1993) sugerem que as diferenças observadas podem estar simplesmente relacionadas com as diferenças nos tipos de solos e espécies de plantas.

A influência da rizosfera sobre a população de actinomicetos, em geral, é menor do que sobre as populações das demais bactérias e dos fungos, visto que os actinomicetos são microrganismos de crescimento lento com baixa capacidade competitiva, o que dificulta sua colonização em substratos orgânicos nos quais outros microrganismos apresentam capacidade mais elevada de adaptação (PEREIRA *et al.*, 1999).

No trabalho desenvolvido por Filnow e Lockwood (1985), vários actinomicetos foram isolados e avaliados como agentes biocontroladores de *Phytophthora*, fungo fitopatogênico de raízes de soja (*Glycine max*).

Crawford *et al.* (1993) isolaram actinomicetos, particularmente *Streptomyces* spp., da rizosfera de diferentes plantas como dente-de-leão (*Taraxicum officinale*) e trigo (*Triticum aestivum*), e avaliaram sua atividade antagônica para *Pythium ultimum* e outros fungos patogênicos de raízes.

Valois *et al* (1996) isolaram mais de 200 actinomicetos da rizosfera da batata (*Solanum tuberosum*) e avaliaram a atividade enzimática de diferentes glucanases contra *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. através da atuação dessas enzimas na hidrólise da parede celular deste fitopatógeno.

Cheng *et al.* (1996) isolaram e avaliaram uma possível variação na densidade microbiana da rizosfera do tomate (*Lycopersicon esculentum*), supondo que esta variação poderia ser determinada pelo padrão de exsudatos radiculares associados com as diferentes exigências nutricionais e com outros fatores de crescimento específicos exigidos pelos isolados.

Posteriormente, Gava *et al.* (2002) testaram linhagens de *Streptomyces* spp. isoladas da rizosfera do tomate visando a utilização desses microrganismos no controle de *Ralstonia solanacearum*, causador da murcha-bacteriana nesta cultura.

Barakate *et al.* (2002), investigando actinomicetos de solos rizosféricos de diversas plantas em Marrocos, isolaram 131 linhagens de *Streptomyces* e avaliaram sua atividade antimicrobiana para diferentes patógenos. A maioria dos isolados revelou forte antibiose contra *Streptomyces scabies*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Alguns isolados também apresentaram atividade para *Escherichia coli* e *Verticillium dahliae*.

Ismet *et al.* (2004) isolaram linhagens de *Micromonospora* da rizosfera de *Sonneratia* e *Rhizophora* sp., plantas de manguezal, e comprovaram a produção de substâncias antifúngicas por esses microrganismos. Enquanto Agligli *et al.* (2004) obtiveram mais de 100 linhagens de actinomicetos e avaliaram sua atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Verticillium dahliae*.

Inúmeras investigações mostram a importância dos actinomicetos para Biotecnologia uma vez que se destacam com uma fonte promissora para a produção de enzimas, de antibióticos e de outros compostos biologicamente ativos (PEREIRA, 2000).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material Biológico

4.1.1 - Coleta

O material biológico, constituído por folhas saudáveis, raízes e rizosfera de cinco espécimes de melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L.), foi coletado em um sítio no km 38 da BR-101 Norte, no município de Igarassu /PE, em janeiro de 2005 (Figura 4.1). Após a coleta, amostras de folhas e raízes foram armazenadas separadamente em sacos plásticos previamente identificados, enquanto as amostras da rizosfera foram transferidas para tubos Falcon, e conduzidas para o laboratório de Genética do Departamento de Antibióticos/UFPE para o isolamento dos microrganismos.

4.1.2 - Identificação

O material botânico foi identificado pelo Laboratório de Fanerógamos do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, confirmando a espécie *Momordica charantia* L. (Melão-de-São Caetano).



Figura 4.1 – Melão-de-São Caetano- *Momordica charantia* L.

4.2 – Isolamento de Microrganismos

4.2.1 - Microrganismos Endofíticos

4.2.1.1 - Desinfecção

Folhas e raízes de *M. charantia* L. foram submetidas separadamente ao processo de desinfecção para eliminação dos microrganismos epifíticos. A técnica utilizada foi a desinfecção com hipoclorito de sódio (PEREIRA *et al.*, 1993; ARAÚJO *et al.*, 2001). As amostras foram lavadas em água corrente para retirada de resíduos e colocadas sobre papel absorvente para secar. Em seguida, foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 10 cm e submetidas ao tratamento com álcool etílico 70% por um minuto, hipoclorito de sódio 2,6% por cinco minutos, e 15 minutos para o isolamento de actinomicetos incomuns (UETANABARO, 2004), álcool etílico 70% por 30 segundos e água destilada autoclavada por duas vezes. Para verificar a eficiência da desinfecção, alíquotas da última água de lavagem foram plaqueadas em cada meio utilizado para o isolamento (Figura 4.2).

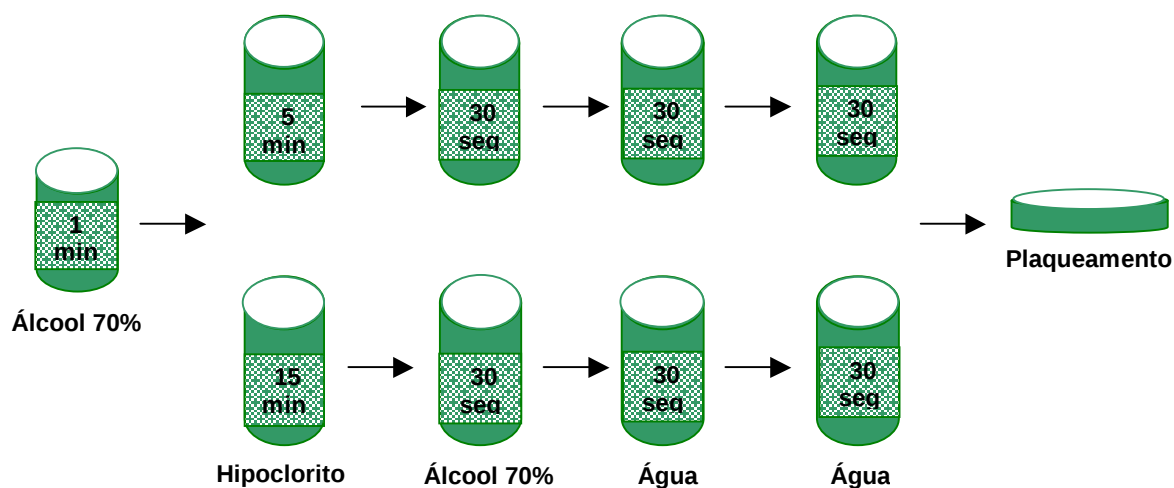


Figura 4.2 – Esquema da desinfecção dos tecidos vegetais em hipoclorito de sódio.

4.2.1.2 – Isolamento

A técnica de isolamento de microrganismos endofíticos utilizada foi isolamento por fragmentação (ARAÚJO *et al.*, 2002). Após a retirada das bordas das folhas e das extremidades das raízes com um estilete esterilizado, o material desinfetado foi cortado em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² e transferido para placas de Petri contendo meios de cultura (Figura 4.3). Para o isolamento de fungos foi utilizado o meio Batata Dextrose Agar (BDA) acrescido de cloranfenicol e tetraciclina (100 µg/mL); enquanto para o isolamento de actinomicetos foi utilizado o meio Caseína Amido Agar (CAA) acrescido de nistatina e cicloheximida (100 µg/mL). O isolamento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas a 30°C por até 30 dias. A frequência de isolamento foi obtida através do número de fragmentos com crescimento microbiano em relação ao número total de fragmentos vegetais (ARAÚJO *et al.*, 2002).



Figura 4.3 – Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos de *Momordica charantia*: a) Amostra de folha; b) Fragmentação do material; c) Fragmentos de raízes.

4.2.2 - Microrganismos da Rizosfera

A técnica utilizada para o isolamento de microrganismos da rizosfera foi diluição em série. Iniciou-se a diluição pesando 10g da amostra da rizosfera e transferindo para Erlenmeyer contendo 90mL de solução tampão PBS. A solução foi mantida sob agitação a 180 rpm por 15 minutos e após este período foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁷. Para o isolamento foram utilizadas apenas as

duas últimas diluições (10^{-6} e 10^{-7}), onde foi semeado 0,1mL de cada diluição em placas contendo os meios BDA e CAA acrescidos de antibióticos, como descrito anteriormente, e incubadas a 30°C por até 20 dias. O procedimento foi realizado para cada amostra coletada da rizosfera (Figura 4.4).

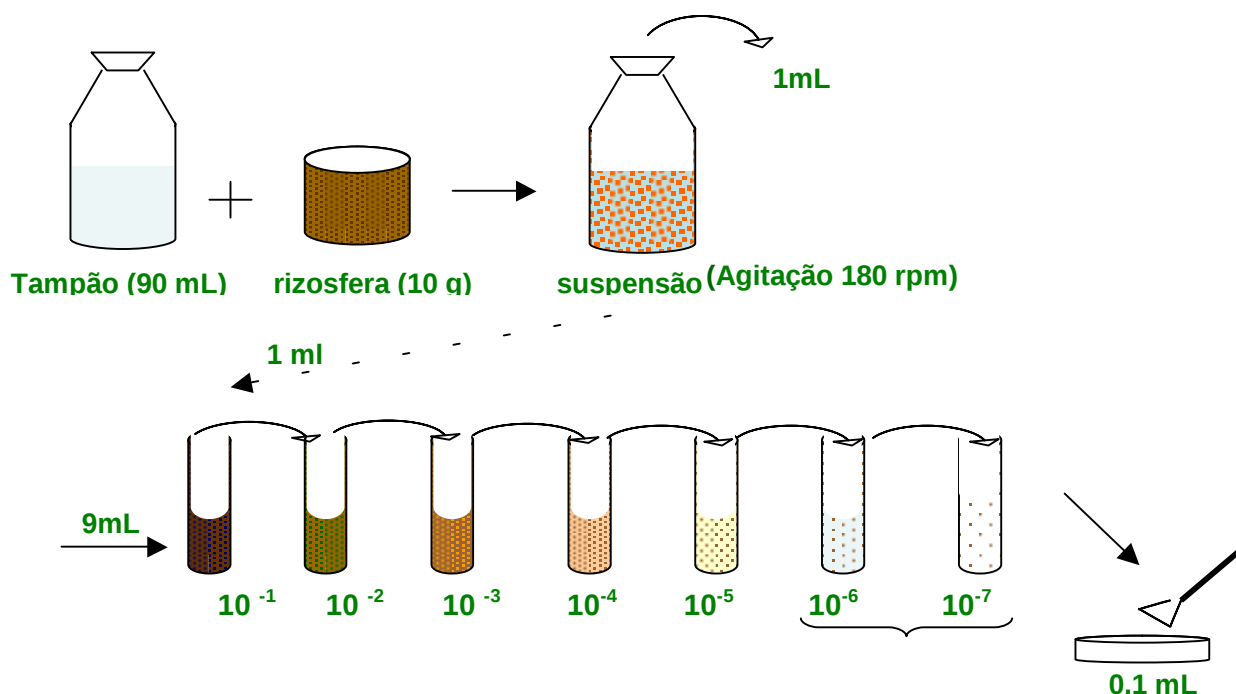


Figura 4.4 – Esquema do isolamento de microrganismos da rizosfera.

4.3 – Purificação de Microrganismos Endofíticos e da Rizosfera

Os microrganismos foram purificados por estrias de esgotamento em meio sólido específico para obtenção de colônias isoladas. O procedimento foi repetido de acordo com a necessidade.

4.4 - Preservação de Microrganismos Endofíticos e da Rizosfera

As técnicas utilizadas para a preservação dos isolados foram repique simples sob refrigeração e método de óleo mineral (MURO e LUCCHI, 1989). Inicialmente, fungos, bactérias e actinomicetos foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado e mantidos sob refrigeração. Para uma preservação mais adequada, as culturas puras foram transferidas para tubos de penicilina, em

triplicata, contendo meio sólido inclinado e adicionado óleo mineral esterilizado. Os tubos foram fechados com rolha de borracha, vedados com selo de alumínio e estocados a temperatura ambiente. Os meios utilizados para o cultivo de fungos, actinomicetos e bactérias foram: Ágar Sabouraud (SAB), Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP-2) e Ágar Soja-Tripton (TSA), respectivamente.

4.5 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana

4.5.1 - Microrganismos-teste

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados 12 patógenos pertencentes à Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) e do Departamento de Micologia (URM) da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Microrganismos-teste utilizados na atividade antimicrobiana.

Microrganismos	UFPEDA*	URM**	Origem
<i>Candida albicans</i>	1007	-----	Cepa 50-IBB NFC-USA
<i>Candida</i> sp.	-----	720	Pacientes imunodeprimidos
<i>Candida</i> sp.	-----	4249	Pacientes com outras infecções
<i>Candida</i> sp.	-----	4224	Pacientes com outras infecções
<i>Malassezia furfur</i>	-----	4498	Isolado do couro cabeludo
<i>Malassezia furfur</i>	-----	4499	Isolado das costas
<i>Malassezia sympodialis</i>	-----	4503	Isolado das costas
<i>Malassezia sympodialis</i>	-----	4849	Isolado do couro cabeludo
<i>Staphylococcus aureus</i>	02	-----	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>	16	-----	W
<i>Escherichia coli</i>	224	-----	ATCC 25922
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	82	-----	Polônia WK

* UFPEDA - Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

** URM – Universidade do Recife de Micologia.

4.5.1.1 – Cultivo dos Microrganismos-teste

A suspensão microbiana foi preparada a partir de culturas puras dos microrganismos-teste. Da suspensão obtida, retirou-se 0,1mL para semeio, com alça de Drigalski, em placas de Petri contendo os meios: Ágar Nutritivo (AN), para as bactérias; TSA, para *M. tuberculosis*; SAB, para *Candida* spp. e SAB acrescido de extrato de levedura e óleo de oliva, para *Malassezia* spp.. As leveduras foram incubadas a 30°C por 48 horas e as bactérias a 37°C por 24 horas.

4.5.2 – Seleção Primária em Meio Sólido

A atividade antimicrobiana dos actinomicetos endofíticos e da rizosfera foi avaliada qualitativamente, em meio sólido, através do método em Bloco de Gelose (ICHIKAWA *et al.*, 1971) modificado, visando selecionar os microrganismos com maior atividade.

4.5.2.1 – Teste em Bloco de Gelose

Os actinomicetos endofíticos e da rizosfera foram semeados em placas de Petri contendo o meio ISP-2 e 0,1mL da suspensão de esporos foi espalhada com alça de Drigalski. As placas foram mantidas por sete dias a 30°C para o crescimento em tapete dos microrganismos. Após o período de incubação dos actinomicetos, foram feitos blocos de gelose circulares de 6 mm de diâmetro com auxílio de um furador de rolha esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo o microrganismo-teste (Figura 4.5). As placas foram incubadas a 30°C para o crescimento de *Candida* spp. e *Malassezia* spp. e a 37°C para as bactérias, e mantidas por 24 a 48 horas para a leitura dos halos de inibição. O teste foi realizado em triplicata e os resultados obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor de cada bloco.

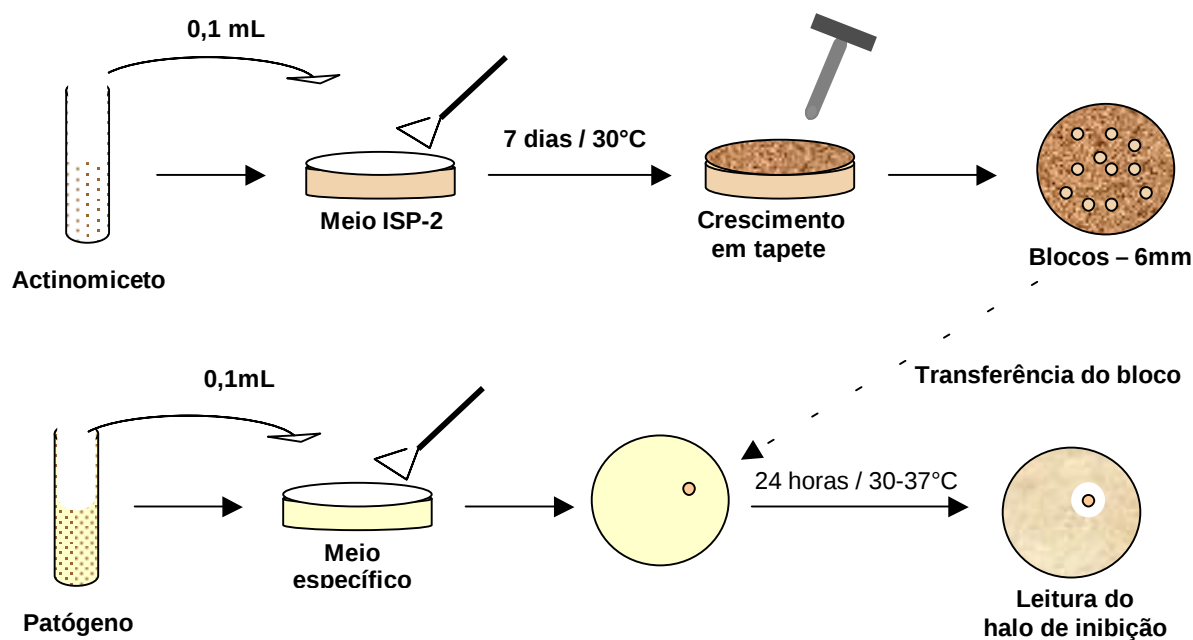


Figura 4.5 – Esquema do teste de bloco de gelose.

4.5.3 - Seleção Secundária em Meio Líquido

Os actinomicetos endofíticos e da rizosfera que apresentaram os melhores halos de inibição no teste em Bloco de Gelose foram cultivados em diferentes meios líquidos para, através da técnica de Difusão em Disco (BAUER *et al.*, 1966), selecionar o melhor meio de cultivo e o melhor tempo de fermentação para a produção de compostos bioativos.

4.5.3.1 – Pré-inóculo

Os actinomicetos selecionados foram cultivados em Erlenmeyer de 250 mL com o meio ISP-2 líquido. Neste meio foram inoculados três blocos de gelose do actinomiceto, seguido de agitação a 180 rpm, por 48 horas, a temperatura ambiente (28-30°C).

4.5.3.2 – Teste de Difusão em Disco

Após o período de incubação do pré-inóculo, 10% v/v (5mL) do mesmo foi adicionado a Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido para fermentação. Os meios utilizados foram M1, MPE (Meio para Produção de Eurimicina) e ISP-2 e a fermentação foi mantida por 96 horas sob agitação de 180 rpm. A cada 24 horas de cultivo, alíquotas dos meios fermentados foram retiradas e centrifugadas para separar o líquido metabólico da massa celular. Os discos de papel de 6 mm de diâmetro foram umedecidos com 20µL do líquido metabólico, transferidos para placas contendo o microrganismo-teste, seguida da incubação a 30°C ou 37°C, de acordo com a necessidade do patógeno, por 24 e 48 horas (Figura 4.6). O teste foi realizado em triplicata e os resultados obtidos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição. A variação do pH foi acompanhada nos diferentes tempos de fermentação.

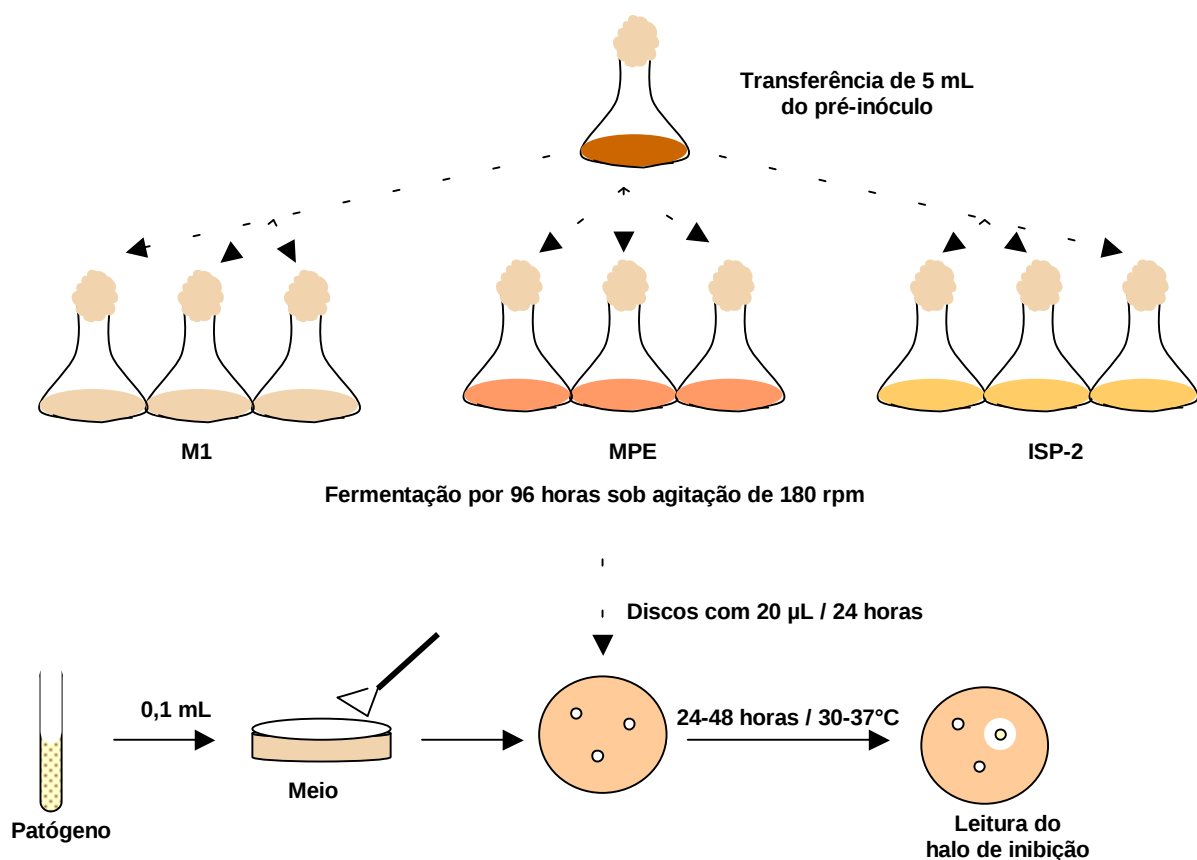


Figura 4.6 - Esquema do teste de difusão em disco de papel.

4.6 – Extração de Compostos Bioativos da Massa Celular

A massa celular foi tratada com os solventes aquosos: acetona, metanol e etanol para a extração do princípio ativo. A cada 10 mL de solvente foi adicionado 0,2 g de peso úmido da massa celular e colocado sob agitação por 15 minutos para a desidratação das células e extração dos produtos bioativos intracelulares. Após este período, o material foi filtrado para separar a massa do solvente contendo o princípio ativo extraído. Discos de papel foram umedecidos com 20 µL de cada solvente e realizado o ensaio antimicrobiano como citado anteriormente.

4.7 - Identificação dos Actinomicetos

Os actinomicetos avaliados no teste de difusão em disco foram selecionados para a identificação taxonômica, em nível de gênero, através de observações macro e micromorfológicas e do estudo da parede celular.

4.7.1 – Morfologia

Para a análise morfológica dos actinomicetos foi utilizada a metodologia descrita por Shirling e Gottlieb (1966). Os microrganismos foram cultivados no meio ISP-2 e incubados a 30°C por 21 dias. Lamínulas foram inseridas parcialmente no meio de cultura, em posição inclinada, para o crescimento de hifas sobre sua superfície. Após o período de incubação, foram observadas características culturais tais como coloração e pigmentação, e características micromorfológicas, através do microscópio óptico, como presença ou ausência de esporos, forma da cadeia de esporos ou a presença de esporângio.

4.7.2 – Estudo da parede celular

O estudo da parede celular dos actinomicetos foi determinado através da avaliação dos isômeros do ácido diaminopimérico (DAP), LL- ou meso-DAP, de acordo com a metodologia descrita por Staneck e Roberts (1974).

4.7.2.1 – Hidrólise da parede celular

Os actinomicetos foram cultivados em meio ISP-2 a 30°C, por 72 horas, para obtenção de massa celular. Após o período de incubação, a massa celular obtida foi filtrada a vácuo com papel de filtro e seca em estufa a 50°C por 2 horas. Em seguida, foi transferido 30 mg da massa seca para tubo rosqueável, no qual foi adicionado 1mL de solução de HCl 6N e levado para estufa a 100°C por 16 horas para a hidrólise da parede celular. O material insolúvel foi removido utilizando um eppendorf furado contendo lã de vidro e lavado com 1mL de água destilada. O filtrado foi transferido para balão de fundo redondo e levado ao rotaevaporador para a retirada de todo o ácido remanescente. Este procedimento foi efetuado até a retirada total do ácido. O material livre do ácido foi retomado em 0,1 mL de água destilada, transferido para tubos eppendorf e armazenados em freezer até a realização da corrida em cromatografia em camada delgada (CCD).

4.7.2.2 – Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada do hidrolisado da parede celular foi realizada para a identificação dos isômeros do ácido diaminopimérico (LL-DAP ou meso-DAP) presente na parede celular de actinomicetos. A fase móvel foi composta por metanol-água-ácido clorídrico 6N-piridina (80:26:4:10, v/v) e a fase fixa por placas de celulose (Merck nº 5716 20x20). Na fase fixa foram aplicados 2µL do padrão do ácido diaminopimérico (DAP) a 0,19% p/v, 2µL das amostras e 2µL dos padrões: *Streptomyces regensis* (DAUFPE-3053) e *Nocardia asteroides* (DAUFPE-

3503), representando os isômeros LL-DAP e Meso-DAP, respectivamente. A cuba foi previamente saturada por 2 horas e a corrida ocorreu por aproximadamente 5 horas. Quando o “front” do solvente atingiu o topo da placa, a mesma foi retirada e deixada secar na capela de exaustão. A placa seca foi revelada borrifando uma solução de ninhidrina a 0,2% p/v em butanol saturado com água, e em seguida aquecida a 100°C por 5 minutos para a visualização dos isômeros de DAP (LL-DAP e meso-DAP). Inicialmente as manchas se apresentaram verdes, tornando-se amarelas após algumas horas.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Isolamento de Microrganismos Endofíticos

A utilização do hipoclorito de sódio foi eficiente para desinfecção da superfície de folhas e raízes de *Momordica charantia* L., uma vez que não se detectou o crescimento de microrganismos após o plaqueamento da água de lavagem destes tecidos.

Os meios de cultivo BDA e CAA foram eficientes para o isolamento de fungos e actinomicetos, respectivamente, de folhas e raízes. A adição dos antibacterianos cloranfenicol e tetraciclina ao meio BDA evitou o desenvolvimento de microrganismos invasivos, não sendo observada a ocorrência de bactérias resistentes, assim como a adição dos antifúngicos nistatina e cicloheximida ao meio CAA suprimiu o crescimento de fungos, o que favoreceu o desenvolvimento dos actinomicetos. No meio CAA, como não foi adicionado antibiótico antibacteriano, foi observada a ocorrência de bactérias não-filamentosas.

O desenvolvimento de colônias bacterianas e fúngicas emergindo dos fragmentos de folhas e raízes foi visualizado a partir de 96 horas até o 15º dia de cultivo. Enquanto as colônias de actinomicetos começaram a emergir apenas após 10 dias de incubação, havendo desenvolvimento bacteriano até o 27º dia. À medida que as colônias surgiram, foram isoladas e purificadas (Figura 5.1).

A frequência de microrganismos endofíticos pode ser observada na tabela 5.1, onde a frequência de microrganismos isolados das raízes foi maior que das folhas. O tempo de desinfecção de 15 minutos diminuiu a frequência de bactérias não filamentosas. Quanto aos actinomicetos, este maior tempo de tratamento favoreceu o surgimento dessas bactérias, sendo mais significativa para o isolamento de actinomicetos das raízes que das folhas, onde a frequência foi de 4,33% e 1,0%, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido por Uetanabaro (2004), onde o tratamento de 15 minutos em hipoclorito aumentou a frequência de isolamento de actinomicetos. Para o isolamento de fungos foi utilizado apenas o tratamento de 5 minutos em hipoclorito.

Tabela 5.1 – Frequência de Isolamento de Microrganismos Endofíticos (%).

Frequência de Endofíticos (%)						
Microrganismos	5 minutos			15 minutos		
	Folha	Raiz	Total	Folha	Raiz	Total
Actinomicetos	0,66	1,0	1,66	1,0	4,33	5,33
Bactérias	3,33	29,0	32,33	1,66	11,0	12,66
Fungos	17,0	27,33	44,33	NR	NR	NR

NR - Não Realizado

Foram isolados 71 microrganismos endofíticos das folhas, onde os fungos foram os maiores representantes com 72% (51/71), seguido pelas bactérias com 21% (15/71) e apenas 7% (5/71) de actinomicetos isolados. Elevado percentual de fungos endofíticos de folhas também foi obtido por Souza *et al.* (2004) a partir das plantas *Palicourea longiflora* (89.8%) e *Strychnos cogens* (67.8%).

As folhas, quando mergulhadas em hipoclorito, não sofreram rápida oxidação, o que possivelmente favoreceu o surgimento em maior quantidade de microrganismos endofíticos. A mesma observação foi feita por Souza *et al.* (2004) durante o isolamento de endofíticos de duas plantas tóxicas da Amazônia, onde uma delas, *P. longiflora*, teve uma redução na quantidade de isolados devido ao rápido escurecimento dos fragmentos foliares, enquanto em *S. cogens*, a oxidação não foi tão rápida, ocorrendo um aumento no número de microrganismos isolados.

Quanto às raízes, foram isolados 218 microrganismos, ocorrendo uma maior incidência de bactérias 55% (120/218) que de fungos 38% (82/218) e apenas 7% (16/218) de actinomicetos isolados. Sardi *et al.* (1992) ressaltaram em seu trabalho que isolados endofíticos foram mais frequentemente obtidos de raízes que de outras partes da planta. Contudo, a presença de endofíticos em folhas, mesmo em quantidades inferiores, pode ser vista em relatos anteriores (OKAZAKI *et al.*, 1995; SHIMIZU *et al.*, 2000).

Os microrganismos endofíticos isolados de raízes foram mais diversificados que os isolados das folhas. De acordo com Tian *et al.* (2004), a grande diversidade microbiana nas raízes deve ser causada pelo contato direto com a rizosfera.

5.2 – Isolamento de Microrganismos da Rizosfera

O crescimento de colônias bacterianas e fúngicas teve início a partir de 96 horas de cultivo até o 15º dia de cultivo. As colônias de actinomicetos surgiram após sete dias até o 30º dia de cultivo. A microbiota isolada da rizosfera foi purificada da mesma forma que os microrganismos endofíticos (Figura 5.1).

Foram isolados 220 microrganismos da rizosfera de *M. charantia*, onde 48% (106/220) correspondem a actinomicetos, enquanto 47% (103/220) e 5% (11/220) são bactérias e fungos, respectivamente. Segundo Sardi *et al.* (1992), os actinomicetos são relativamente mais abundantes na rizosfera, região rica em exsudatos radiculares, onde eles devem influenciar no crescimento da planta e proteger suas raízes contra a invasão de microrganismos patogênicos.

Entre os microrganismos isolados da rizosfera, foi observada maior incidência de actinomicetos com um total de 106 isolados. De acordo com Holt *et al.* (1994), os meios de cultivo contendo amido podem ser mais eficientes no isolamento de actinomicetos, uma vez que o amido é uma fonte de carbono complexa capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos e com isso favorecer o surgimento de actinomicetos, já que estes possuem crescimento lento. Como observado neste trabalho, uma grande quantidade de actinomicetos da rizosfera (10^7 a 10^8 UFC/g de solo) foi obtida utilizando o meio CAA, o que comprova a eficiência deste meio para o isolamento dessas bactérias.

Em trabalhos anteriores também foi possível observar densidades elevadas de actinomicetos na rizosfera, como no milho, ervilha, algodão, rabanete, cenoura, tomate e pimentão, variando de 10^5 a 10^6 UFC/g de solo rizosférico (YUAN e CRAWFORD, 1995; GAVA *et al.*, 1999).

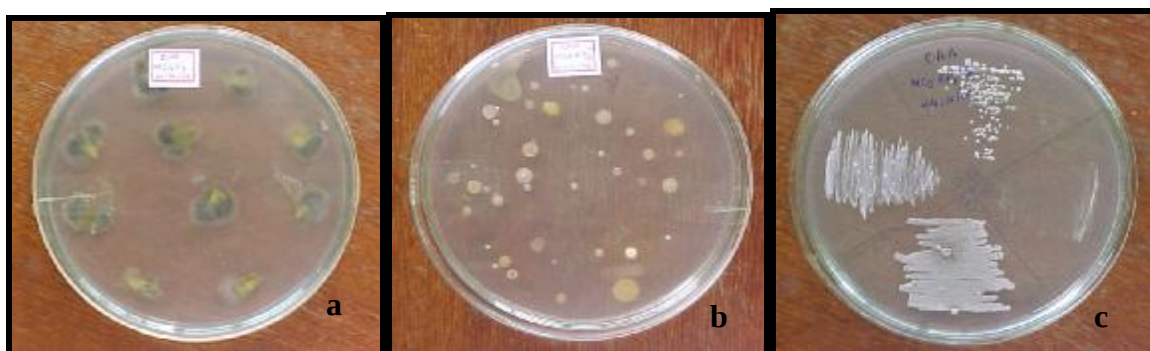


Figura 5.1 – Isolamento de microrganismos de *Momordica charantia*: a) Fragmentos foliares com fungos emergindo; b) Colônias bacterianas isoladas da rizosfera; c) Purificação de actinomicetos.

5.3 – Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana em meio sólido foram utilizados 117 actinomicetos, sendo 17 endofíticos, onde 12 foram isolados das raízes e cinco das folhas, e 100 isolados da rizosfera. Apenas 10 actinomicetos isolados, sendo quatro endofíticos e seis da rizosfera, não foram testados devido à dificuldade de crescimento nos meios de cultura utilizados. As bactérias não filamentosas e os fungos isolados, endofíticos e da rizosfera, serão avaliados em trabalhos futuros.

5.3.1 – Seleção Primária – Bloco de Gelose

5.3.1.1. – Ensaio com Actinomicetos Endofíticos

Entre os 17 actinomicetos endofíticos utilizados no teste em bloco de gelose, 35,2% (6/17) apresentaram atividade antimicrobiana para pelo menos um dos 12 patógenos testados, sendo 23,5% (4/17) das raízes e 11,7% (2/17) das folhas. Os actinomicetos bioativos das folhas foram isolados no tempo de desinfecção de 5 minutos, enquanto as linhagens bioativas das raízes foram no tempo 15 minutos.

Os resultados apresentados nas figuras 5.2 e 5.3 mostram a atividade antimicrobiana das linhagens MCF-55 e MCF-65 para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* com halos de inibição variando entre 23 a 27 mm. A linhagem MCF-65 também foi ativa para *Mycobacterium tuberculosis* e *Malassezia sympodialis* (4849), com halos de 22 e 14 mm, respectivamente.

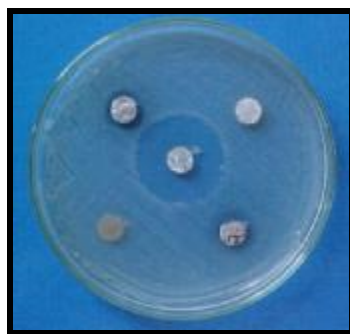


Figura 5.2 – Halo de Inibição do actinomiceto MCF-65 contra *Staphylococcus aureus*.

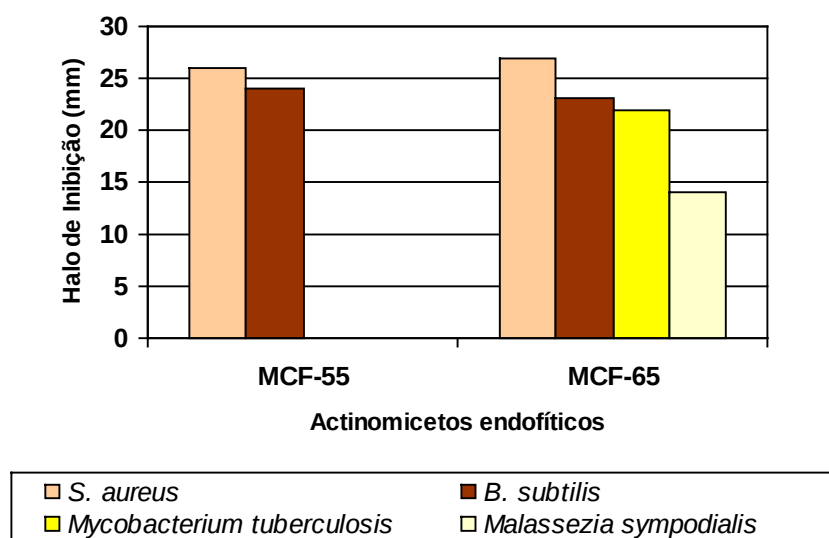


Figura 5.3 – Diâmetro dos halos de inibição dos actinomicetos MCF-55 e MCF-65, em bloco de gelose, contra diferentes microrganismos-teste.

A atividade antimicrobiana das linhagens MCR-80, MCR-100, MCR-103 e MCR-79 pode ser observada na figura 5.4. As linhagens MCR-100 e MCR-103 apresentaram atividade para *B. subtilis*, ambas com halos de 23 mm, e para

Candida sp. (4249), com halos de 12 e 13 mm, respectivamente. A linhagem MCR-80 foi antagonista para *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis* com halos entre 11 e 14 mm. Enquanto a linhagem MCR-79 mostrou atividade antibiótica para todas as linhagens de *Candida* spp. e *Malassezia* spp., mas não foi ativa para as bactérias testadas, exceto para *M. tuberculosis*, onde apresentou halo de 14 mm (Figura 5.5).

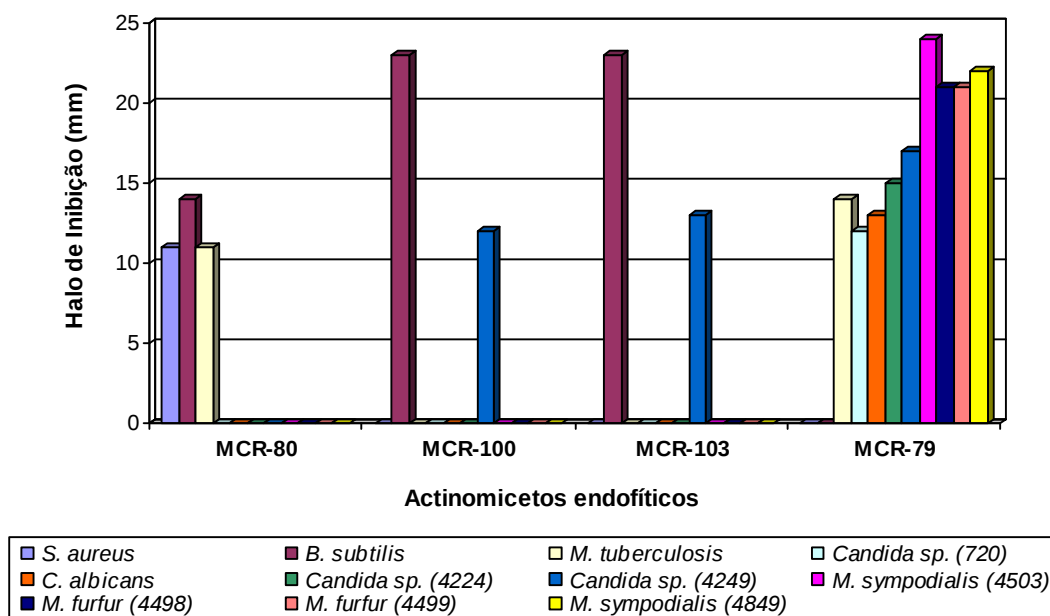


Figura 5.4 – Diâmetro dos halos de inibição dos actinomicetos MCR-80, MCR-100, MCR-103 e MCR-79, em bloco de gelose, contra diferentes microrganismos-teste.

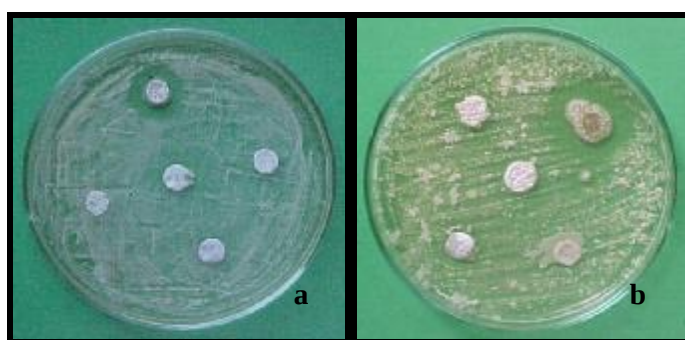


Figura 5.5 – Halos de inibição do actinomiceto MCR-79 contra: a) *Candida* sp. (4249); b) *Malassezia furfur* (4503).

Nenhum dos actinomicetos endofíticos testados apresentou antagonismo para *Escherichia coli*. Segundo Vaara (1993), aproximadamente 90% dos antibióticos

naturais não conseguem inibir organismos Gram-negativos tal como *E. coli*. As razões para isso incluem, principalmente, a membrana externa presente nessas bactérias, que contém canais que retardam a entrada na célula até mesmo de pequenos compostos hidrofílicos, e a presença de um lipopolissacarídeo, que reduz a difusão transmembrana de antibióticos lipofílicos (NIKAIDO, 1996).

5.3.1.2 – Ensaio com Actinomicetos da Rizosfera

Entre os 100 actinomicetos isolados da rizosfera utilizados no teste em Bloco de Gelose, 63% (63/100) apresentaram atividade para pelo menos um dos patógenos testados. O maior percentual de actinomicetos com atividade antibiótica foi para *M. tuberculosis* (68%), seguido por *S. aureus* (65%) e *B. subtilis* (60%). Para *Candida* spp., o percentual de actinomicetos bioativos variou de 19 a 33%, enquanto para *Malassezia* spp. este percentual variou de 22 a 30% (Figura 5.6).

Trabalhos com actinomicetos bioativos contra bactérias gram-positivas têm sido frequentemente publicados (SABAOU *et al.*, 1998), entretanto com atividade para Gram-negativas e para fungos o índice de publicação tem sido bem menor, como enfatizado por Lamari *et al.* (2002).

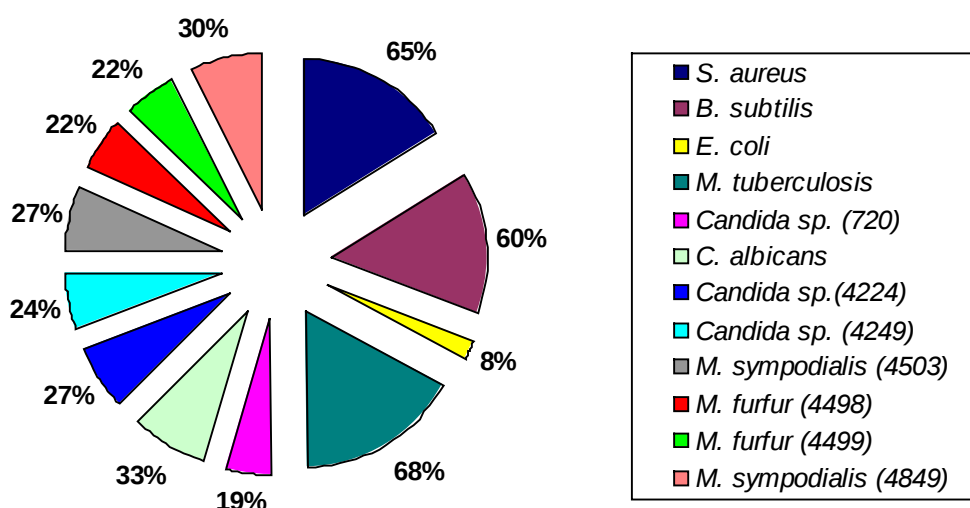


Figura 5.6 – Percentual de actinomicetos isolados da rizosfera com atividade para diferentes microrganismos-teste.

Os resultados observados na figura 5.7 destacam os actinomicetos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana para *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*. As linhagens MCRF-131, MCRF-101, MCRF-6, MCRF-88, MCRF-8, MCRF-86, MCRF-81, MCRF-97*, MCRF-81* e MCRF-105* mostraram os maiores halos de inibição para a maioria das bactérias testadas, que variaram de 20 a 40 mm. Dentre estas linhagens, MCRF-6 apresentou o maior halo, 40 mm, para *M. tuberculosis*.

Apenas cinco actinomicetos isolados, MCRF-103, MCRF-88, MCRF-8, MCRF-81 e MCRF-82, apresentaram atividade antimicrobiana para *E. coli* com halos entre 10 e 13 mm.

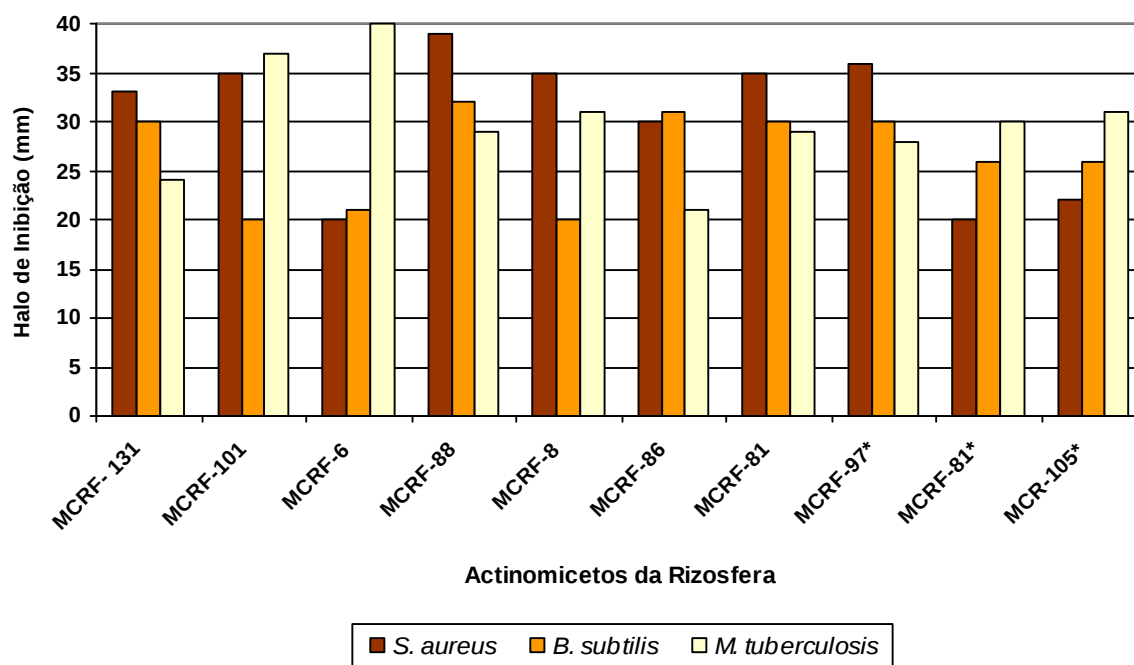


Figura 5.7 – Diâmetro dos halos de inibição de diferentes actinomicetos, em bloco de gelose, contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*.

A figura 5.8 mostra os actinomicetos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana para as diferentes linhagens de *Candida* e *Malassezia*. As linhagens MCRF-117*, MCRF-117, MCRF-121, MCRF-38, MCRF-13 e MCRF-86 revelaram os maiores halos de inibição para a maioria das leveduras testadas, que variaram de 20

a 39 mm. A linhagem MCRF-13 apresentou o maior halo de inibição para *M. furfur* (4849), de 39 mm.

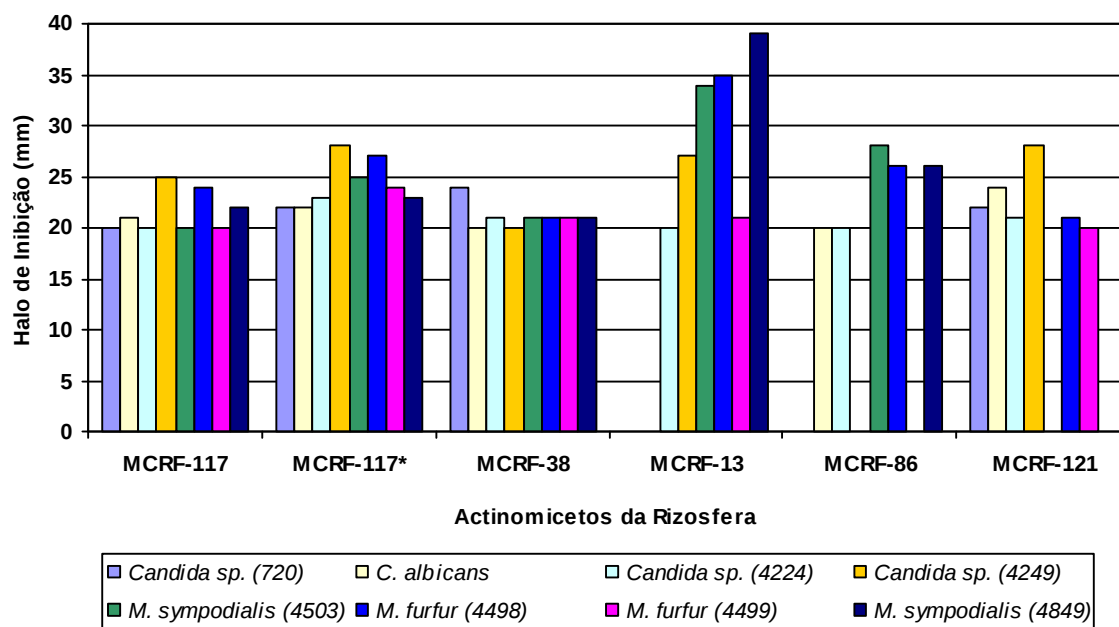


Figura 5.8 – Diâmetro dos halos de inibição de diferentes actinomicetos, em bloco de gelose, contra linhagens de *Candida* e *Malassezia* spp..

Para Normansell (1986), o método em bloco de gelose apresenta baixa resolução na detecção de antibióticos produzidos em pequenas concentrações. Já Tanaka (1992), revela que este método é o mais eficiente para uma seleção primária de agentes antimicrobianos, pois podem ser testadas várias amostras em um pequeno espaço de tempo. Neste trabalho, foi possível observar um amplo espectro de atividade antimicrobiana sobre os microrganismos-teste utilizados, mostrando-se ser um método eficiente para uma triagem inicial.

5.3.2 – Seleção Secundária – Teste de Difusão em Disco

Nove actinomicetos, sendo três endofíticos e seis da rizosfera, que apresentaram os melhores halos de inibição e espectro de ação no teste em bloco

de gelose, foram selecionados para o teste de difusão em disco. Foram escolhidos para a fermentação três meios de cultura com diferentes fontes de carbono e nitrogênio: M1, MPE e ISP-2, visando avaliar o melhor meio, tempo de cultivo e pH para produção dos metabólitos bioativos.

5.3.2.1 – Ensaio com Actinomicetos Endofíticos

Neste ensaio antimicrobiano, três actinomicetos endofíticos foram avaliados, dos quais dois isolados da folha e um da raiz. O actinomiceto endofítico MCF-55 apresentou os maiores halos de inibição, 23 e 19 mm, para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente, no tempo de 120 horas de fermentação no meio ISP-2 (Figura 5.9). Nos meios M1 e MPE esta linhagem também apresentou atividade para as mesmas bactérias, porém o maior halo foi de 14 mm, com pH entre 6,0 e 8,0. Durante a fermentação no meio ISP-2 o pH permaneceu em torno de 7,0. Estes resultados confirmam o ensaio em bloco de gelose, onde foi observado halo apenas para as bactérias Gram-positivas testadas.

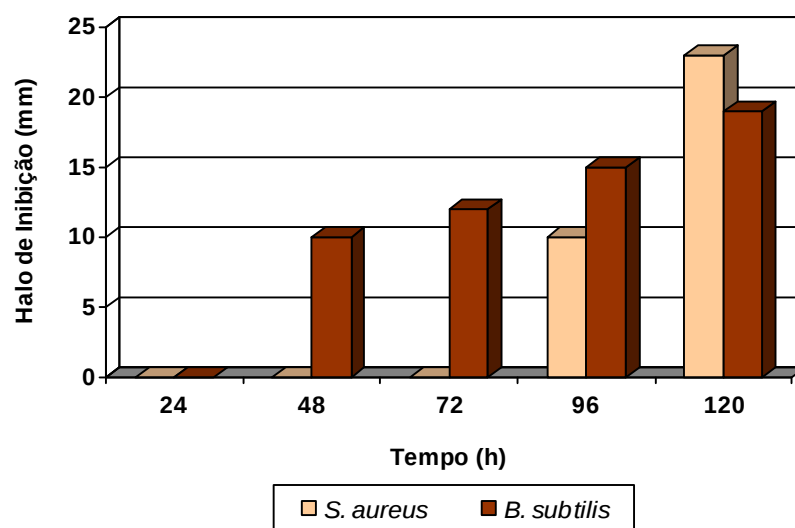


Figura 5.9 – Diâmetro dos halos de inibição do endofítico MCF-55, durante 120 horas de fermentação no meio ISP-2, contra *S. aureus* e *B. subtilis*.

A atividade antimicrobiana do actinomiceto endofítico MCF-65 está representada na figura 5.10. Esta linhagem não apresentou atividade para *M. tuberculosis* e *M. sympodialis* (4849) em nenhum dos meios líquidos utilizados, entretanto, mostrou atividade antibiótica relevante para *B. subtilis*, com halo de 20 mm no meio M1, com 48 horas de fermentação, em pH neutro, e baixa atividade para *S. aureus*, onde o maior halo foi de 12 mm com 48 e 72 horas. A linhagem MCF-65 não apresentou atividade no meio ISP-2 para os microrganismos testados, diferentemente do ensaio em bloco de gelose, onde apresentou halo de inibição para diferentes patógenos. Neste meio o pH variou de 7,2 a 5,0 ao longo da fermentação, sugerindo que o pH ácido pode inibir a produção de compostos bioativos.

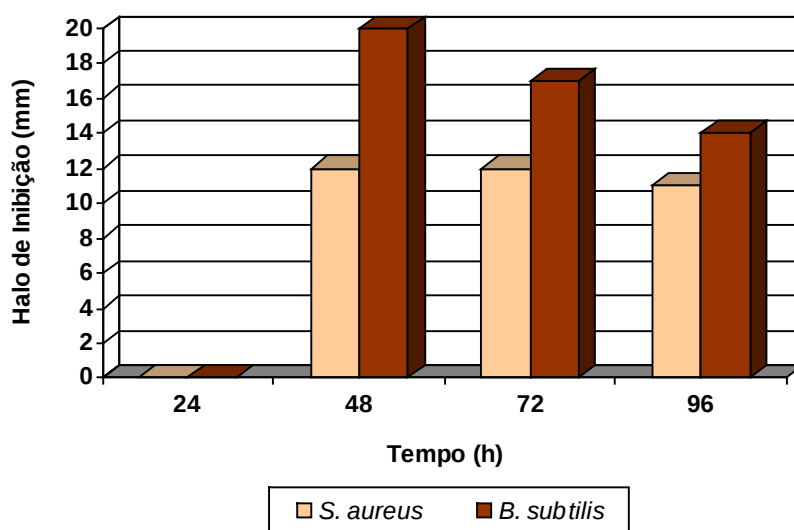


Figura 5.10 – Diâmetro dos halos de inibição do endofítico MCF-65, durante 120 horas de fermentação no meio M1, contra *S. aureus* e *B. subtilis*.

A linhagem MCR-79 apresentou amplo espectro de ação, semelhante ao teste em bloco de gelose, mostrando atividade antimicrobiana nos três meios de cultivo utilizados. Entretanto o melhor meio para fermentação foi ISP-2, nos tempos 72 e 96 horas, com halos de inibição entre 13 a 19 mm para *Candida* spp. e 16 e 17 mm para *Malassezia* spp., enquanto para *M. tuberculosis* o halo foi de 14 mm com 96

horas de fermentação (Figura 5.11). O pH no meio ISP-2 permaneceu em torno de 7,0.

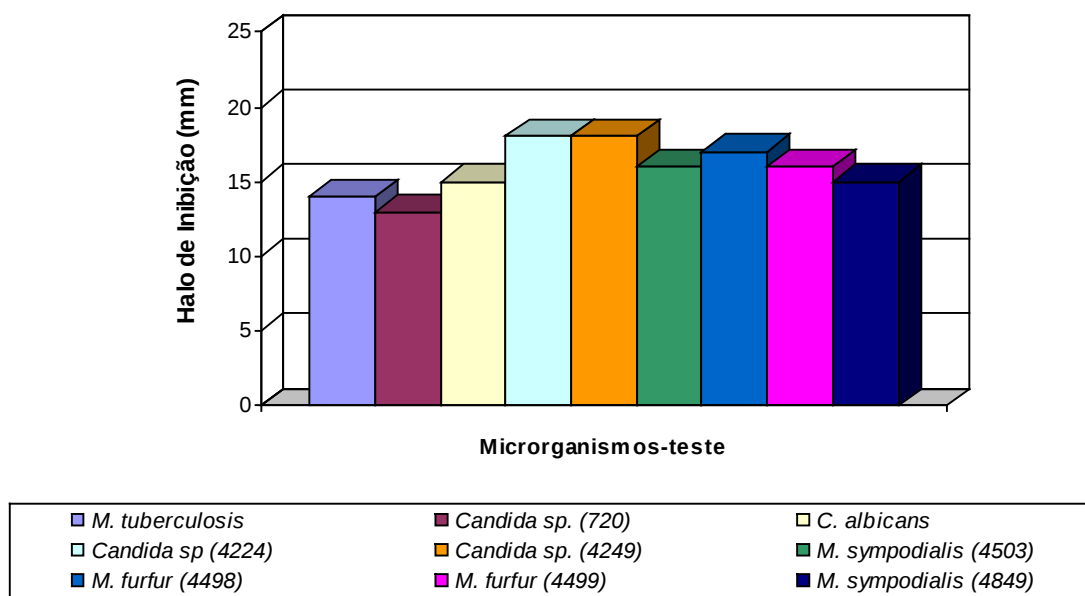


Figura 5.11 – Diâmetro dos halos de inibição do endofítico MCR-79, com 96 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste.

5.3.2.2 – Ensaio com Actinomicetos da Rizosfera

Seis actinomicetos foram avaliados no ensaio de difusão em disco. A fermentação em meio ISP-2 da linhagem MCRF-117* apresentou atividade para todas as leveduras testadas com halos de inibição variando de 11 a 21 mm (Figura 5.12). A partir de 96 horas de fermentação em meio ISP-2 foi possível detectar maior atividade antimicrobiana para os diferentes patógenos, indicando a necessidade de um maior tempo de fermentação ou até mesmo outros meios de cultivo para que ocorra uma melhor produção do antibiótico. O pH deste meio permaneceu em torno de 7,0. No trabalho realizado por Sardi *et al.* (1992), foi observado que alguns actinomicetos apresentaram atividade antimicrobiana após 10 dias de cultivo sob agitação. Praticamente não houve atividade nos meios M1 e MPE. Novas condições de cultivo precisam ser testadas para uma melhor avaliação desta linhagem.

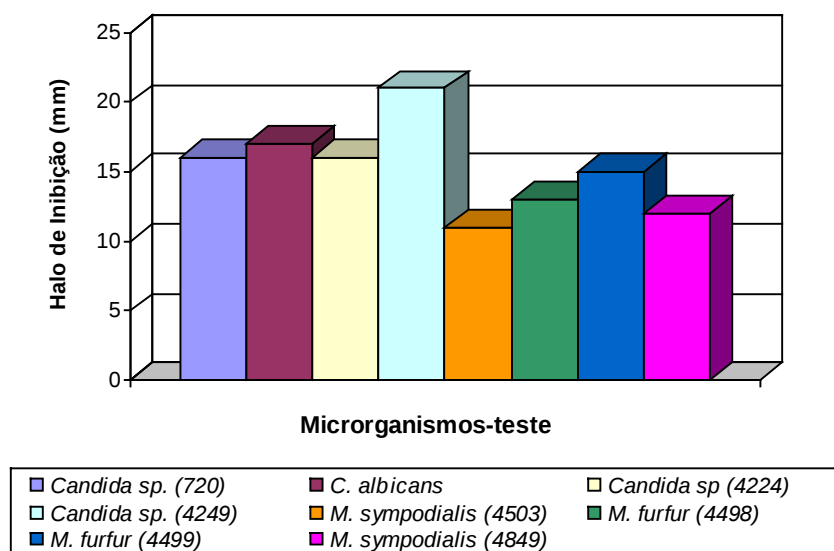


Figura 5.12 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-117*, com 96 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste.

O actinomiceto MCRF-13 não apresentou atividade nos meios líquidos M1, MPE e ISP-2 para *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*, apesar de ter sido observado halo de inibição em bloco de gelose no meio ISP-2, principalmente para *M. tuberculosis*, onde foi detectado halo de 29 mm. Os resultados apresentados na figura 5.13 mostram o melhor tempo de fermentação desta linhagem, onde se observa que com 24 horas no meio M1 foi obtida atividade para todas as leveduras testadas, com halos de inibição de até 25 mm (Figuras 5.14). O pH neste meio estava em torno de 7,0. O actinomiceto MCRF-13 permaneceu ativo até 48 horas de cultivo, porém apenas nos meios ISP-2 e MPE, com atividade para a maioria das leveduras. Posteriormente, deve-se tentar intervalos menores de cultivo para determinar melhor o tempo de fermentação desta linhagem.

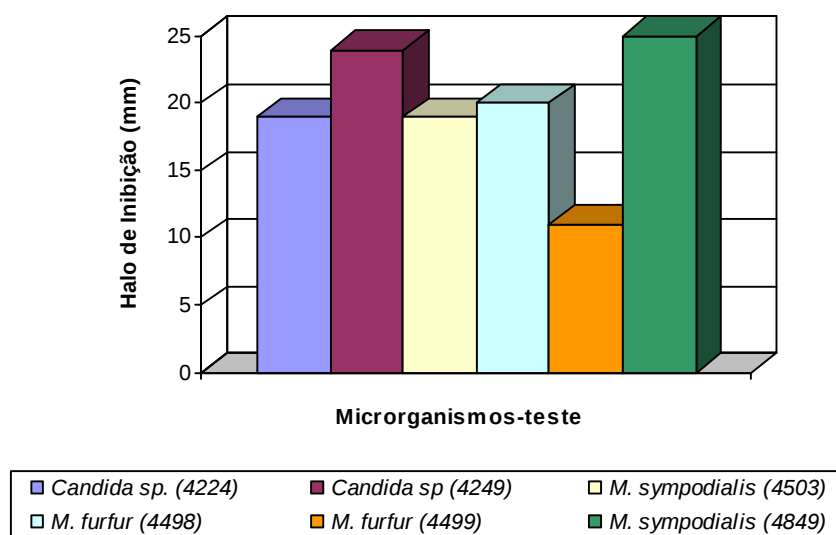


Figura 5.13 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-13, com 24 horas de fermentação no meio M1, contra diferentes microrganismos-teste.

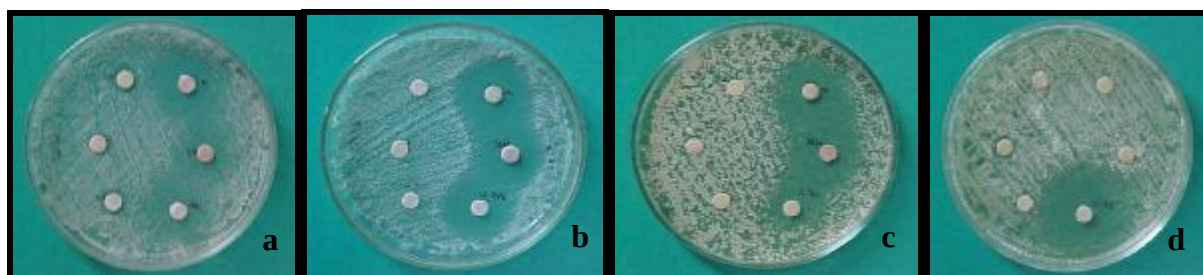


Figura 5.14 – Halos de Inibição do actinomiceto MCRF-13 nos três meios de cultivo, com 24 horas, contra: a) *Candida sp.* (4224), b) *Candida sp.* (4249), c) *M. sympodialis* (4849) e d) contra *M. furfur* (4498) com 48 horas de fermentação no meio ISP-2.

A fermentação da linhagem MCRF-38 nos meios M1, MPE e ISP-2 não foi muito eficiente para a produção de metabólitos bioativos, uma vez que não apresentou atividade para *S. aureus* e revelou pouco antagonismo para *Candida* spp. e *Malassezia* spp.. A fermentação no meio MPE apresentou halos que variaram de 10 a 16 mm com 72 horas de fermentação, em pH alcalino (Figura 5.15), exceto para *Candida sp.* (4224), que mostrou halo de 18 mm no meio ISP-2, com 96 horas, em pH neutro.

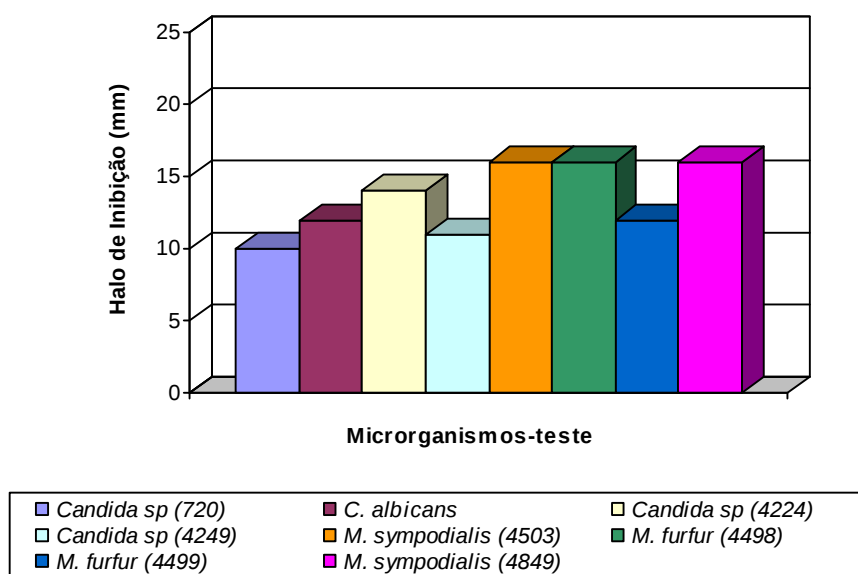


Figura 5.15 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-38, com 72 horas de fermentação em meio MPE, contra diferentes microrganismos-teste.

Os resultados apresentados na figura 5.16 mostram os halos de inibição observados durante 120 horas de fermentação da linhagem MCRF-88, no meio ISP-2, onde os halos mais expressivos foram de 30 e 24 mm para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente, com pH em torno de 7,0. A atividade para *Candida sp.* (4249) não foi significativa, apresentando halo de apenas 10 mm. Houve pouca variação de pH nos diferentes meios, permanecendo entre 7,0 e 8,0. Esta linhagem apresentou atividade antimicrobiana significativa nos três meios utilizados e nos diferentes tempos de fermentação para *S. aureus* e *B. subtilis*. Entretanto não revelou antagonismo para *E. coli*, *M. tuberculosis* e *C. albicans*, diferentemente do teste em bloco de gelose, onde foi ativa para todas as bactérias testadas, como também para *C. albicans* e *Candida sp.* (4249).

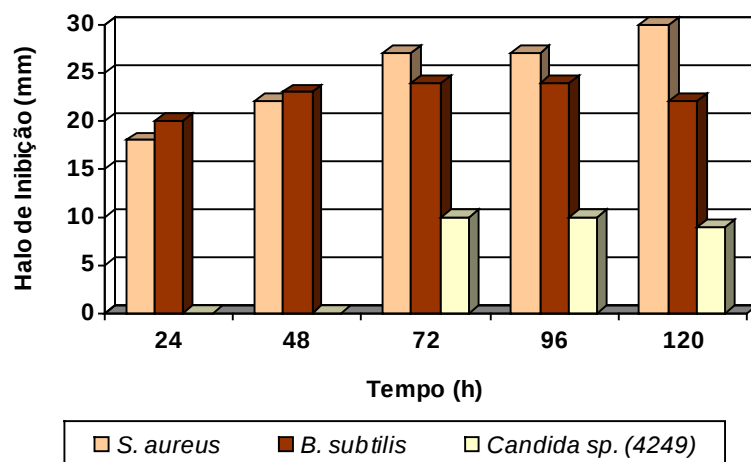


Figura 5.16 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-88, durante 120 horas de fermentação no meio ISP-2, contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *Candida sp. (4249)*.

A figura 5.17 mostra os halos de inibição da linhagem MCRF-6 no meio MPE durante 96 horas de fermentação para *S. aureus*, *B. subtilis* e *Candida sp. (4224)*, onde os halos mais expressivos foram de 26, 17 e 21 mm, respectivamente. Esta linhagem apresentou atividade nos meios M1 e MPE para *S. aureus*, *B. subtilis* e *Candida sp. (4224)*, com halos variando de 10 a 26 mm e pH de 7,0 a 8,0, entretanto não foi ativa para *M. tuberculosis*, *C. albicans* e *Candida sp. (720)* em nenhum dos meios utilizados. Não foi detectada atividade no meio ISP-2 para nenhum dos patógenos testados, diferindo do teste em bloco de gelose, onde neste meio foi observado halo de 40 mm para *M. tuberculosis*. Possivelmente a ausência de atividade esteja relacionada ao pH deste meio que se manteve ácido (pH 4,0) durante a fermentação, visto que os melhores halos foram obtidos com pH variando entre 7,0 e 8,0.

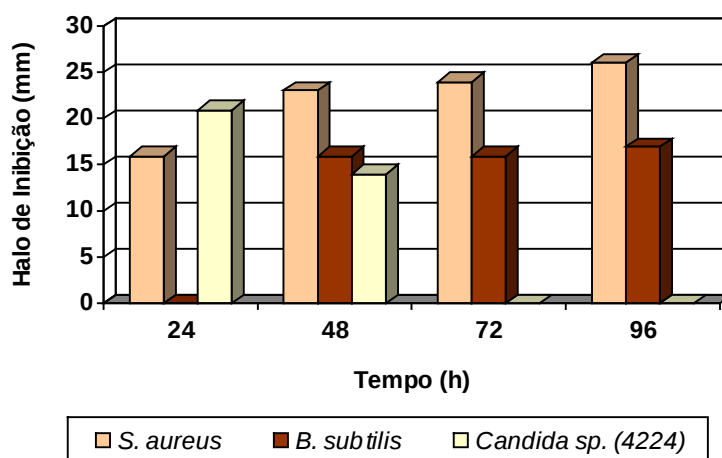


Figura 5.17 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-6, durante 96 horas de fermentação no meio MPE, contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *Candida sp. (4224)*.

Os resultados da atividade antimicrobiana apresentada pelo actinomiceto MCRF-121 podem ser vistos na figura 5.18, onde os melhores halos de inibição – 15 a 22 mm – foram observados para *Candida spp.* com 72 horas de fermentação no meio ISP-2. Esta linhagem não apresentou atividade para *M. tuberculosis* e *Malassezia sympodialis* (4849) durante a fermentação, além de pouco antagonismo para *S. aureus* e *B. subtilis*. O pH neste meio permaneceu em torno de 7,0 durante a fermentação.

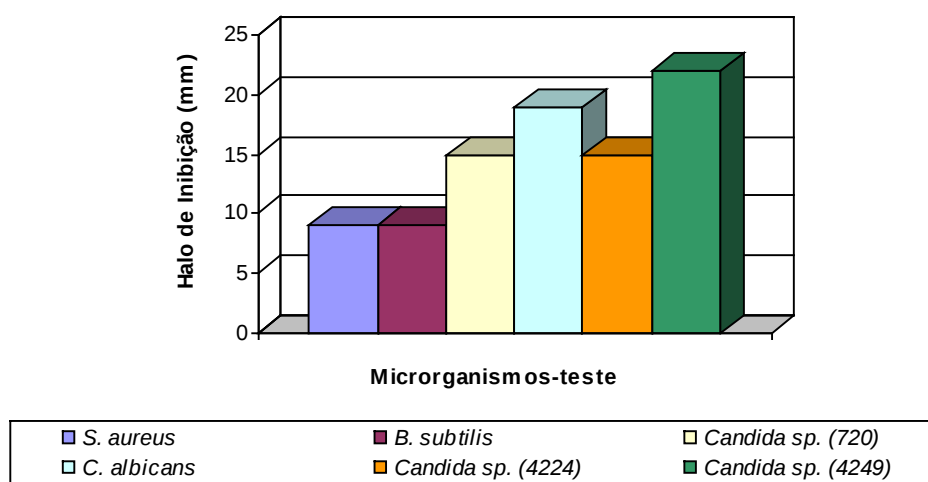


Figura 5.18 – Diâmetro dos halos de inibição do actinomiceto MCRF-121, com 72 horas de fermentação no meio ISP-2, contra diferentes microrganismos-teste.

Sardi *et al.* (1992) relatam que a composição do meio líquido muitas vezes pode não estimular a biossíntese dos antibióticos, como também seja necessário aumentar o tempo de cultivo sob agitação. O mesmo foi visto no trabalho de Mukhopadhyay (1996), o qual enfatiza que o meio de cultura e o tempo de fermentação influenciam a produção de metabólitos secundários por microrganismos.

A glicose geralmente é uma fonte disponível de carbono para o crescimento de microrganismos, contudo, estudos têm mostrado que a glicose pode interferir na biossíntese de muitos antibióticos, não sendo frequentemente usada para crescimento e produção de compostos bioativos de certos actinomicetos (HUCK *et al.*, 1991), sendo utilizados nestes casos, polissacarídeos ou oligossacarídeos, que têm se revelado como melhor fonte de carbono que a glicose.

Neste trabalho, a maioria dos actinomicetos endofíticos e da rizosfera apresentou melhor atividade antimicrobiana no meio ISP-2, que tem como fontes de carbono glicose e amido e fontes de nitrogênio extrato de levedura e de malte. Ismet *et al.* (2004) constataram que a combinação de diferentes fontes de carbono aumentou a atividade antimicrobiana quando comparada com uma única fonte, e que o aumento da produção da substância bioativa foi observado ser dependente da fonte de nitrogênio adicionada ao meio. Huck *et al.* (1991) evidenciaram que a utilização de extrato de levedura, farinha de soja e de outras matérias-primas complexas podem ser usadas como fonte de nitrogênio para melhorar a produção de antibióticos por actinomicetos.

Entretanto, alguns dos actinomicetos avaliados neste trabalho mostraram-se mais ativos nos meios MPE ou M1, ambos constituídos por farinha de soja e glicose, como únicas fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, diferindo apenas na concentração, onde o primeiro meio contém glicose e nitrogênio a 2%, enquanto no meio M1 estes constituintes estão a 1%.

Quanto ao pH do líquido metabólico, para a maioria das linhagens, manteve-se em torno de 7,0, indicando que o pH neutro é o ideal para a produção de metabólitos bioativos por estes actinomicetos.

Em nossa pesquisa foi possível observar que alguns actinomicetos apresentaram atividade tanto para fungos quanto para bactérias patogênicas.

Entretanto, no trabalho desenvolvido por Taechowisan *et al.* (2003), todos os actinomicetos testados apresentaram atividade antimicrobiana para um ou outro microrganismo, mas não para ambos. Segundo Gonzales *et al.* (1999), a detecção simultânea de atividade contra fungos e bactérias sugere a ação de mais de um antibiótico com diferentes alvos; ou a possível presença de uma nova substância capaz de atravessar a parede celular bacteriana e fúngica (TSVETANOVA e PRICE, 2001).

O fato de algumas linhagens não apresentarem atividade antibiótica detectável em meio líquido não significa que estas não sejam capazes de produzir antibiótico. Novos ensaios utilizando outros meios de cultivo para o crescimento de actinomicetos podem ser utilizados visando melhorar a detecção do antibiótico.

5.4 – Extração de Compostos Bioativos da Massa Celular

Alguns actinomicetos produzem antibióticos que podem permanecer intracelular, sendo necessário realizar sua extração com solventes aquosos para desidratação da célula. As linhagens MCRF-6, MCRF-88 e MCRF-121 não apresentaram atividade para *M. tuberculosis* durante a fermentação, como tinha sido observado no ensaio em bloco de gelose, dessa forma, foi realizada a extração da massa celular desses actinomicetos utilizando os solventes: etanol, metanol e acetona. Pullen *et al.* (2002) e Tian *et al.* (2004) relatam o uso de solventes para a extração do metabólito intracelular quando este não foi excretado para o meio.

Com este tratamento foi possível obter atividade para *M. tuberculosis* a partir da extração da massa celular obtida com 72 a 120 horas de fermentação no meio ISP-2, exceto a linhagem MCRF-6. Os resultados na tabela 5.2 mostram diferentes halos de inibição, onde pode ser observado que o metanol extraiu melhor o antibiótico da massa celular da linhagem MCRF-88, formando halo de 28 mm com 120 horas de cultivo; enquanto para o extrato da massa celular do actinomiceto MCRF-121, o resultado foi igual para os três solventes, com halos de 20 mm nos tempos de 72 e 96 horas.

Tabela 5.2 – Diâmetro dos halos de Inibição dos actinomicetos MCRF-88 e MCRF-121, com os extratos da massa celular em diferentes solventes e tempos de fermentação, contra *M. tuberculosis*.

Solventes	Actinomicetos (Halos de Inibição em mm)			
	MCRF-88		MCRF-121	
	96	120	72	96
Etanol	20	25	20	20
Metanol	24	28	20	20
Acetona	17	18	20	20

5.5 - Identificação dos Actinomicetos

Os actinomicetos endofíticos e da rizosfera avaliados no teste de difusão em disco foram selecionados para a identificação taxonômica, em nível de gênero, através de observações macro e micromorfológicas e do estudo da parede celular.

As características morfológicas das linhagens foram determinadas através da análise da cor do micélio aéreo, do micélio vegetativo e cor e forma da cadeia de esporos, como pode ser observado nas tabelas 5.3 e 5.4. Após 21 dias de cultivo no meio ISP-2 foi possível observar, através da microscopia óptica, tipos de cadeias de esporos crescidos sobre a superfície da lamínula.

As linhagens MCF-55 e MCF-65, isoladas das folhas, mostraram esporóforos espiralados (Figura 5.19), enquanto a linhagem MCR-79, isolada das raízes, apresentou cadeia de esporos reta e flexível. Estas características indicam que as linhagens pertencem ao gênero *Streptomyces*. A predominância deste gênero entre actinomicetos endofíticos também foi observada por outros autores, como Sardi *et al.* (1992); Coombs e Franco (2003); Taechowisan *et al.* (2003); Cao *et al.* (2004). A presença de endofíticos pertencentes ao gênero *Streptomyces* tem importante papel em relação ao desenvolvimento e a saúde da planta, pois suas atividades biológicas podem influenciar no crescimento da planta ou através da assimilação de nutrientes, ou pela produção de metabólitos secundários (SARDI *et al.*, 1992).

Tabela 5.3 – Características morfológicas dos actinomicetos endofíticos no meio ISP-2.

Actinomiceto	Coloração do Micélio Aéreo	Coloração do Micélio vegetativo	Forma da Cadeia de esporos*
MCF-55	Cinza azulado	Marrom acastanhado	S
MCF-65	Branco	Marrom acastanhado	S
MCR-79	Branco	Castanho médio	RF

(*) – RA (retinaculiaperti) = ondeado; RF (rectiflexibiles) = reto flexível; S (spirales) = espiral.

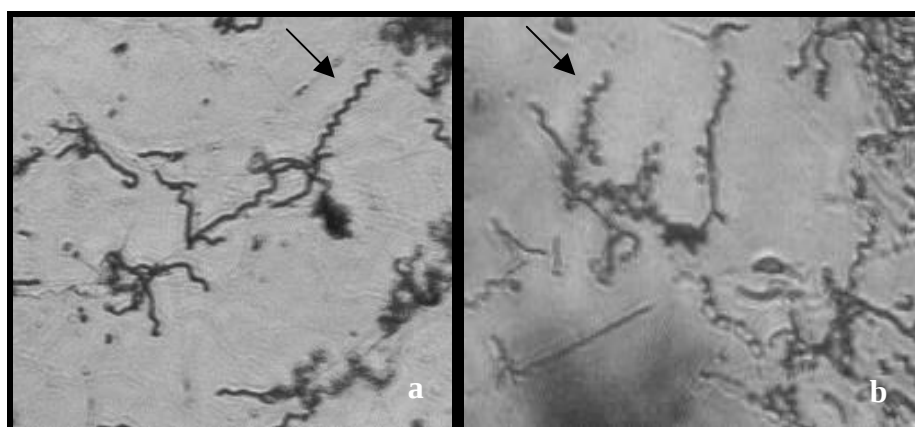


Figura 5.19 – Micromorfologia dos actinomicetos endofíticos no meio ISP-2: a) MCF-55; b) MCF-65. As setas indicam cadeias de esporos espirais, típicas do gênero *Streptomyces*. (Aumento 400X).

Entre os actinomicetos da rizosfera, as linhagens MCRF-6, MCRF-88 e MCRF-117* apresentaram micélios ramificados não fragmentados e esporóforos espiralados (Figura 5.20), enquanto a linhagem MCRF-38 apresentou cadeia de esporos reta e ondeada; características típicas do gênero *Streptomyces*. Quanto à linhagem MCRF-13, a observação microscópica mostrou a formação de micélio aéreo longo, ramificado e fragmentado, enquanto a linhagem MCRF-121 apresentou micélio aéreo com cadeia de esporos curta, não se tratando do gênero *Streptomyces* (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Características morfológicas dos actinomicetos da rizosfera no meio ISP-2.

Actinomiceto	Coloração do Micélio Aéreo	Coloração do Micélio vegetativo	Forma da Cadeia de esporos*
MCRF-6	Cinza azulado	Marrom	S
MCRF-88	Cinza	Marrom	S
MCRF-117*	Cinza azulado	Marrom	S
MCRF-13	Cinza azulado	Marrom acastanhado	Micélio fragmentado
MCRF-38	Branco	Castanho claro	S e RA
MCRF-121	Branco	Marrom	Cadeias de esporos curtas

(*) – RA (retinaculiaperti) = ondeado; RF (rectiflexibiles) = reto flexível; S (spirales) = espiral.

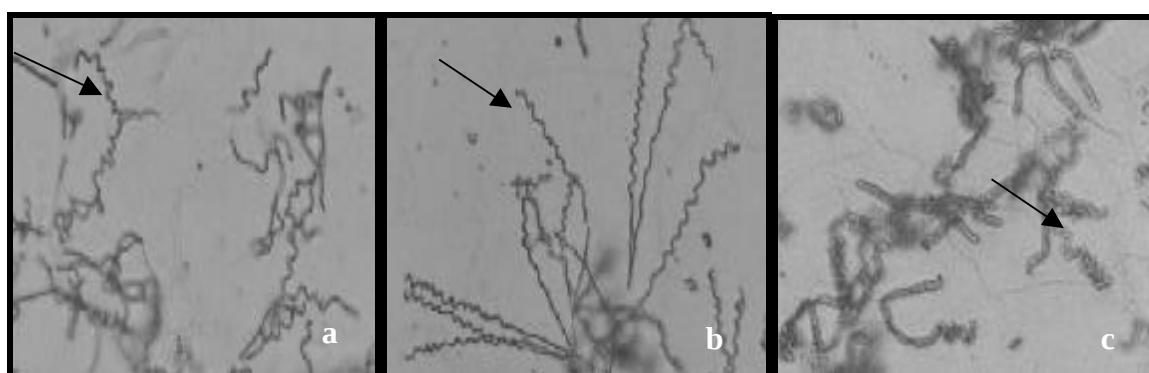


Figura 5.20 – Micromorfologia dos actinomicetos da rizosfera no meio ISP-2: a) MCRF-6; b) MCRF-88 e c) MCRF-117*. As setas indicam cadeias de esporos espirais típicas de *Streptomyces* spp. (Aumento 400X).

A identificação dos actinomicetos endofíticos e da rizosfera foi confirmada pelo tipo de ácido diaminopimélico (DAP) presente na parede celular do microrganismo, através da cromatografia em camada delgada, onde os actinomicetos endofíticos MCF-55, MCF-65 e MCR-79, e as linhagens isoladas da rizosfera MCRF-6, MCRF-38, MCRF-88 e MCRF-117*, apresentaram o isômero LL-DAP, característico do gênero *Streptomyces*, como observado na figura 5.21.

A linhagem MCRF-13 apresentou a forma meso-DAP, típica de outro grupo que não *Streptomyces*. Apesar das características micromorfológicas e da análise da parede celular apontar para o gênero *Nocardiopsis*, estudos mais detalhados deverão ser efetuados visando a sua identificação. Não foi possível visualizar o tipo de isômero da linhagem MCRF-121, sendo necessária a repetição da cromatografia, além da utilização de outros métodos para sua possível identificação.

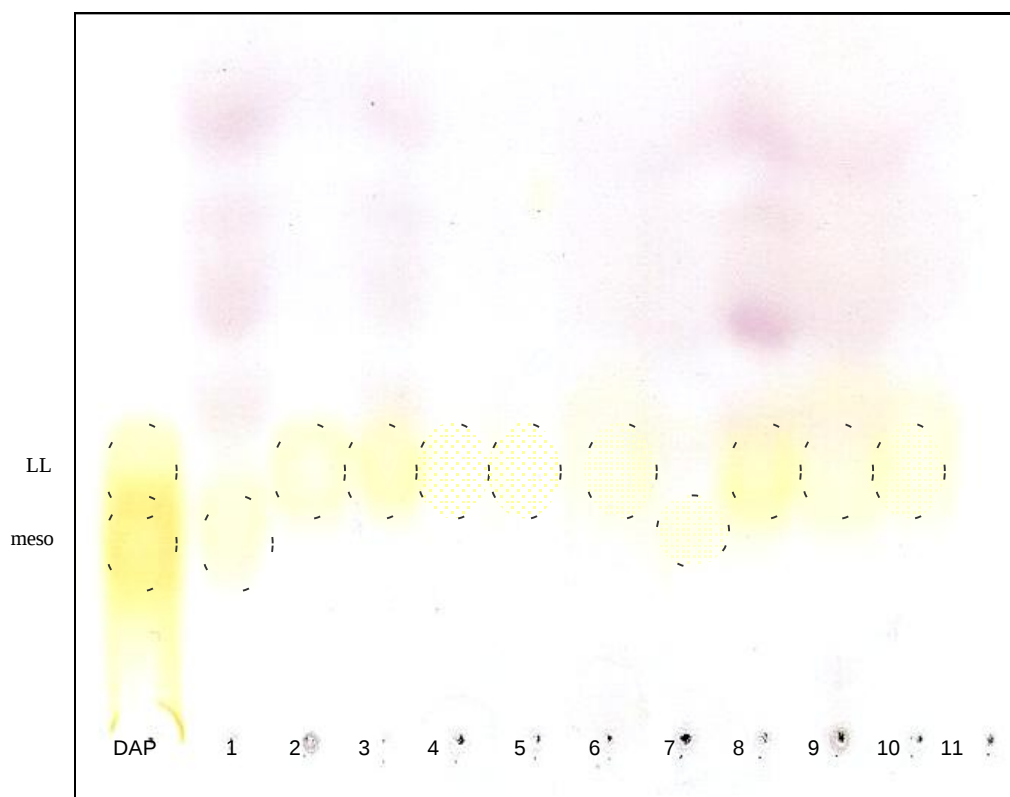


Figura 5.21 - Cromatografia em camada delgada da parede celular dos actinomicetos. DAP (LL-DAP e meso-DAP); 1) *Nocardia asteroides*; 2) *Streptomyces regensis*; 3) MCF-55; 4) MCF-65; 5) MCR-79; 6) MCRF-6; 7) MCRF-13; 8) MCRF-38; 9) MCRF-88; 10) MCRF-117*; 11) MCRF-121.

6 – CONCLUSÃO

ü Os meios de cultura batata dextrose ágar (BDA) e caseína amido ágar (CAA) foram eficazes para o isolamento de fungos e actinomicetos, respectivamente.

ü A técnica de desinfecção com 15 minutos em hipoclorito de sódio foi eficiente para o isolamento de actinomicetos.

ü Entre os actinomicetos endofíticos testados em bloco de gelose, as linhagens MCF-55 e MCF-65 apresentaram os melhores halos de inibição para as bactérias Gram-positivas, enquanto a linhagem MCR-79 foi mais ativa para *Candida* spp. e *Malassezia* spp.

ü Os actinomicetos MCRF-131, MCRF-101, MCRF-6, MCRF-86, MCRF-88, MCRF-8, MCRF-81, MCRF-81*, MCRF-97*, MCRF-105*, isolados da rizosfera, apresentaram os maiores halos de inibição para bactérias Gram-positivas e *Mycobacterium tuberculosis*.

ü As linhagens MCRF-86, MCRF-13, MCRF-38, MCRF-121, MCRF-117 e MCRF-117* se destacaram com maior atividade para *Candida* spp. e *Malassezia* spp. em bloco de gelose.

ü O actinomiceto endofítico MCF-55 apresentou melhor atividade para *Staphylococcus aureus* no meio líquido ISP-2, enquanto a linhagem MCF-65 foi mais bioativa para *Bacillus subtilis* no meio líquido M1; a linhagem MCR-79 revelou maior espectro de ação para *Candida* spp. e *Malassezia* spp. no meio líquido ISP-2.

ü A linhagem MCRF-88 apresentou melhor atividade para *Staphylococcus aureus* durante a fermentação, onde o meio líquido ISP-2 foi o mais eficiente para a produção do antibiótico, enquanto a linhagem MCRF-13 revelou melhor atividade para *Candida* spp., no meio M1, e a linhagem MCRF-121 para *Malassezia* spp., no meio ISP-2.

ü Os actinomicetos endofíticos bioativos MCF-55, MCF-65 e MCR-79 pertencem ao gênero *Streptomyces*, assim como os actinomicetos bioativos da rizosfera MCRF-6, MCRF-38, MCRF-88 e MCRF-117*.

7 – PERSPECTIVAS

Este trabalho representa a etapa inicial para o estudo dos microrganismos associados a *Momordica charantia* L.. A partir dele, vários estudos poderão ser realizados com os microrganismos isolados visando sua aplicação biotecnológica como:

- Realizar estudos químicos e comparar os compostos bioativos produzidos pelos endofíticos com os metabólitos secundários da planta;
- Isolar, caracterizar e identificar os compostos bioativos produzidos pelos actinomicetos endofíticos;
- Realizar ensaios antimicrobianos com os fungos endofíticos e identificar os microrganismos bioativos com o intuito de conhecer a biodiversidade endofítica da planta;
- Estudar os microrganismos isolados visando outras aplicações, como sua capacidade de biodegradação e como agentes biocontroladores.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLAH, E. F.. *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. **Folia Microbiologica**, v. 46, p. 309-314, 2001.
- AGLIGLI, S. G. H.; SHAHIDI, B.; SAADOUN, I. First report of antifungal properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (Strains 101) against four Iranian phytopathogenic isolates of *Verticillium dahliae*. **Biotechnology**, v. 3, p. 90-97, 2004.
- ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J.L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 447-451, 2000.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual de Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba, 2002, 86p.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L.. Variability and Interaction between Endophytic Bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 229–236, 2001.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1998, 117-137p.
- BARAKATE, M.; OUHDOUCH, Y.; OUFDOU, KH.; BEAULIEU, C. Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 49-54, 2002.
- BASCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health and Systemic Pharmacology**. v. 65, p. 356-359, 2003.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BELOIN, N.; GBEASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON, J.; SOUSSAM K.; KOUMAGLO, K.; ARNASON, J. T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 49-55, 2005.
- BENSON, D. R.; SILVESTER, W. B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 293-319, 1993.

BERDY, J. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? **Proceedings of the 9 th International Symposium on the Biology of Actinomycetes**. New York: Allerton Press, 1995, p. 3-23.

BRITTO, B.; ARAÚJO, J. M. **Isolamento e Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Endofíticos do Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Monografia de Graduação. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1998, 40 p.

BUSCH, E.; GABARDI, S.; ULBRICHT, C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. **American Journal of Health-System Pharmacists**, v. 60, p. 356-359, 2003.

BUSH, K. Antimicrobial agents. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, p. 169 - 175, 1997.

CAO, L.; QIU, Z.; DAÍ, X.; TAN, H.; LIN, Y.; ZHOU, S. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 501-504, 2004a.

CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 425-430, 2004b.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. **A Rizosfera**. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (eds.). **Microbiologia dos Solos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992, p. 41-58.

CARROL, G. C.; CARROL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3014-3043, 1978.

CARTER, G. T.; NIETSCH, J. A.; WILLIAMS, D. R.; BORDERS, D. B. Citreamicins, novel antibiotics from *Micromonospora citrea*: isolation, characterization, and structure determination. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 504-512, 1990.

CARUSO, M.; COLOMBO, A. L.; PAVESI, A.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; VENTRELLA, G. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 3-13, 2000.

CASTILLO, U. F.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E. J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVAR, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 183-190, 2003.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAVAR, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by

Streptomyces NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans* **Microbiology**, v. 148, p. 2675-2685, 2002.

CAVALERRI, B.; ARNONE, M. R.; DI MODUGNO, E.; NASINI, G.; GOLDSTEIN, B. P. Structure and biological activity of lipiarmycin B. **The Journal of Antibiotics**, v. 41, p. 308-315, 1988.

CHATER, K. F.; HOPWOOD, D. A. *Streptomyces*. In: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. **Bacillus subtilis and others Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics**. Washington: American Society for Microbiology, 1993.

CHATER, K. F.; MERRICK, M. J. Streptomycetes. in: PARISH, J. H. (ed.). **Developmental Biology of Prokaryotes**. Oxford, Blackwell scientific publications, 1979.

CHENG, W.; ZHANG, A.; COLEMAN, D. C.; CARROL, C. R.; HOFFMAN, C. A. Is available carbon limiting microbial respiration in the rhizosphere? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 1283-1288, 1996.

CLAY, K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. **Natural Toxins**, v. 1, p. 147-149, 1992.

COHEN, Y.; COFFEY, M. D. Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 311-318, 1986.

COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5603-5608, 2003.

COSGROVE, S. E.; CARMELI, Y. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. **Clinical Infectious Disease**, v. 36, p. 1433-1437, 2003.

CRAWFORD, D.L.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M.; QUSLEY, M.A. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3899-3905, 1993.

DEMAIN, A. L., Why do microorganisms produce antimicrobials? In: HUNTER, P. A.; DARBY, G. K.; RUSSELL, N. J. (eds.). **Fifty Years of Antimicrobials: Past, Prospective and Future Trends**. Cambridge: University Press, p. 205-228, 1995.

EDWARDS, S. G.; SEDDON, B. Development of a new selective medium the retrieval of *Bacillus brevis* from the environment. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 42-57, 1991.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, A. M.; TELOW, D. B.; SEARS, JOSEPH, S.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER. Coronamycins, peptide

antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp.. **Microbiology**, v. 150, p. 785-793, 2004.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. In: ATTAWAY D. H., ZABORSKY, O. R. (eds.), **Marine Biotechnology I: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products**. New York: Plenum, 1993.

FERREIRA, J. H. S.; MATHER, F. N.; THOMAS, A. C. Biological control of *Eutypa lata* on grivipine by an antagonistic strain of *bacillus subtilis*. **Phytophatology**, v. 81, p. 283-287, 1991.

FILNOW, A.B.; LOCKWOOD, J.L. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochoytrium catenoides* as biocontrol agents of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, v. 69, p.1033-1036, 1985.

FOSTER, R. C. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 211-234, 1986.

FUSHIMI, S.; NISHIKAWA, S.; SHIMAZU, A.; SETO, M. Studies on new phosphate ester antifungal antibiotics phoslactomycins: taxonomy, fermentation, purification and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 42, p. 1019-1025, 1989.

GAVA, C. A. T.; PERREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P. Effects of Streptomyces inoculation on seed germination and growth in tomato. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 3-11, 1999.

GAVA,C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDES, M. C.; NEVES, M. C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1373-1380, 2002.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO S. D.; DE FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GONZALES, I.; NIEBLA, A.; LEMUS, M.; GONZALES, L.; OTERO, I.; IZNAGA, Y.; PEREZ, M. E.; VALLIN, C. Ecological approach of macrolide-lincosamides-streptogramin producing Actinomyces from Cuban soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 147-150, 1999.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of Actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 189-216, 1983.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 123-132, 2004.

GÜSBÜZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 7, p. 77-82, 2000.

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

HAMADA, M.; KONDO, S.; YOKOYAMA, T.; IRUMA, K.; YAMAMOTO, H.; MAEDA, K. TAKENCHI, T.; UMEZAWA, H. Minosaminomycin, a new antibiotic containing myo-inosamine. **The Journal of Antibiotics**, v. 27, p. 81-83, 1974.

HATA, K.; FUTAI, K.; TSUDA, M. Seasonal and needle age-dependent changes of the endophytic mycobiota in *Pinus thunbergii* and *Pinus densiflora* needles. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 245, 1998.

HEDGE, Y.; PATEL, M.; HORAN, A.; GULLO, V.; MARQUEZ, J.; GUNNARSON, I.; GENTILE, F.; LOEBENBERG, D.; KING, A. Macrolactams: a novel class of antifungal antibiotics produced by *Actinomadura* spp. SCC 1776 and SCC 1777. **The journal of Antibiotics**, v. 45, p. 524-632, 1992.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1994.

HOWARD, D.; CORDELL, R.; MCGOWAN, J. E.; PACKARD, R. M.; SCOTT, R. D. SOLOMON, S. L. Measuring the economic costs of antimicrobial resistance in hospital settings. **Clinical Infectious Disease**, v. 33, p. 1573-1578, 2001.

HUCK, T. A.; PORTER, N.; BUSHELL, M. E. Positive selection of antibiotic-producing soil isolates. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2321-2329, 1991.

HUSAIN, J.; TICKLE, I. J.; WOOD, S. P. Crystal structure of momordina, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. **FEBS Letters**, v. 342, p. 154-158, 1994.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing strain by the agar piece method and prototroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, p. 218-224, 1971.

INUKAI, M.; ISONO, F.; TAKAHASHI, S.; ENOKITA, R.; SAKAIDA, Y.; HANEISHI, T. Mureidomycins A-D, novel peptidyl nucleoside antibiotics with spheroplast forming activity – 1. Taxonomy, fermentation and physico-chemical properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 662-666, 1989.

ISMET, A.; VIKINESWARY, S.; PARAMASWARI, S.; WONG, W. H.; WARD, A.; SEKI, T.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. Production and chemical

characterization of antifungal metabolites from *Micromonospora* sp. M39 isolated from mangrove rhizosphere soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 523-528, 2004.

ISONO, K.; NAGATSU, J.; KOBINATA, K.; SAKI, K.; Suzuki, S. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics: (I) isolation and characterization of polyoxins A e B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, p. 848-854, 1965.

ISONO, F.; INUKAI, M.; TAKAHASHI, S.; HANEISHI, T. Mureidomycins A-D, novel peptidynucleoside antibiotics with spheroplast forming activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 42, p. 667-673, 1989.

KHAN, M. R. *Momordica charantia* and *Allium sativum*: broad-spectrum antibacterial activity. **Korean Journal of Pharmacognosy**, v. 29, p. 155-158, 1998.

KIRALY, A.; SUTO, G. VINCZE, A.; TOTH, G.; MATUS, Z.; MOZSIK, G. Correlation between the cytoprotective effect of β -carotene and its gastric mucosal level in indomethacin-treated rats with or without acute surgical vagotomy. **Acta Physiologica**, v. 80, p. 213-218, 1992.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**, New York: Marcel Dekker, p. 659-674. 2000.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, v. 202, p. 928-929, 1964.

LAMARI, L.; ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; BADJI, B.; SABAOU, N.; LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; SEGUIN, E.; TILLEQUIN, F. New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233, I. Taxonomy, production, isolation and biological properties, **The Journal of Antibiotics**, v. 55, p. 702-707, 2002.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of Antibiotics and other Bioactive Microbial Metabolites**. New York: Plenum, 1993.

LAZZARINI, A.; CVALETTI, L.; TOPPO, G.; MARINELLI, F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399-405, 2000.

LI, J. Y.; STROBEL, G.A.; HARPER, J. K.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v. 23, p. 767-770, 2000.

LIMA, O. G.; MACHADO, M. P.; MACIEL, M. G.; SILVA, E. Algumas observações sobre a ação antifúngica de um *Streptomyces* sp. (cepa 233-IAUR). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, p. 3-9, 1958.

LIU, S.; TANG, W. The study on endophytic *Streptomyces* of cotton. In: TANG, W. (ed.). **Advances in Biological Control of Plant Diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996, p. 212-213.

LOGAN, N. A. The Actinomycetes. In: **Bacterial Systematics**. Blackwell Sci Publications, 1994, p. 211-231.

MAIESE, W. M.; LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. A.; KORSHALLA, L.; GOODMAN, J.; WILDEY, M. J.; KUCK, N.; GREENSTEIN, M. LL-E19085 α , a novel antibiotic from *Micromonospora citrea*: taxonomy, fermentation and biological activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 42, p. 846-851, 1989.

MALABARBA, A.; LANDI, M.; PALLANZA, P.; CAVALLERI, B. Physico-chemical and biological properties of actagardine and some acid hydrolysis products. **The Journal of Antibiotics**, v. 8, p. 1506-1511, 1985.

MARLES, R.; FARNSWORTH, N. Antidiabetic plants and their active constituents: an up-date. **Phytomedicine**, 2: 137-139, 1997.

MATSUKUMA, S.; OKUDA, T.; WATANABE, S. Isolation of actinomycetes from pine litter layer. **Actinomycetologica**, v. 8, p. 57-65, 1995.

MATSUURA, T. **Ocorrência de Actinomicetos Endofíticos Produtores de Antibióticos Isolados de Folhas e Raízes de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1998, 69 p.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S.T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology**. London: Academic, v. 22, 1990.

MCINROY, J. C.; KLOPPER, J. W. Survey of indigeous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

MELLO, B. R. **Catalogo da Coleção de Microrganismos**, 2 ed., Recife: Universitária, 1988, 140p.

MILLER, J. J.; LILJEROTH, E.; WILLWMSSEN-DE KLEIN, M. J. E. I. M.; VAN-VEEN, J. A. The dynamics of actinomycetes and fluorescent pseudomonads in wheat rhizoplane and rhizosphere. **Symbiosis**, v. 9, p. 389-391, 1990.

MILLER, R. V.; MILLER, C. H.; GARTON-KINNEY, D.; REDGRAVE, B.; SEARS, J.; CONDRON, M.; TELOW, D. E.; STROBEL, G. A. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. **Journal Applied of Microbiology**. v. 84, p. 937-944, 1998.

MISATO, T.; KO, K.; YAMAGUCHI, I. Use of antibiotics in agriculture. **Advances in Applied Microbiology**, v. 21, p. 55-58, 1977.

MISHRA, S. K.; TAFT, W. H.; PUTNAM, A. R.; RIES, S. K. Plant growth regulatory metabolites from novel actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulations**, v. 6, p. 75-84, 1987.

MITEMA, E. S.; KIKUVI, G. M.; WEGENER, H. C.; STOHR, K. Assessment of antimicrobial consumption in food producing animals in Kenya. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v. 24, p. 385-390, 2001.

MOHAMED, Z. K. Physiological and antagonistic activities of Streptomyces in rhizosphere of some plants. **Egypt Journal Phytopathology**, v. 14, p. 121-128, 1982.

MUKHOPADHYAY, T.; GARRISON, N. K.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; KHUSH, G. S.; PECK, H. D.; DATA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v. 134, p. 151-159, 1996.

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32, p. 694-698, 1976.

MURAKAMI, T.; EMOTO, A.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides, goyaglycosides-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, and -h, and new oleanane-type triterpene saponins, goyasapopins I, II, and III, from the fresh fruit of Japanese *Momordica charantia* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 54-63, 2001.

MURO, M.; LUCCHI, M. **Preservação de Microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Toselo", 1989.

NG, T. B.; CHAN, W. Y.; YEUNG, H. W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. **General Pharmacology**, v. 23, p. 579-590, 1992.

NIKAIDO, H. Multidrug effluxpumps of gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 107-112, 1996.

NISHIZAWA, N.; KONDO, Y.; KOYAMA, M.; OMOTO, S.; IWATA, M. ET AL. Studies on a new nucleoside antibiotic, Dapiramicin II. Isolation, Physico-chemical and biological characterization. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 1-5, 1984.

NOLAN, R. D.; CROSS, T. Isolation and screening of actinomycetes. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. M. (eds.). **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic, 1988, p. 1-32.

NORMANSELL, I. D. Isolation of *Streptomyces* mutants improved for antibiotic production. In: GUNSALUS, I. C. **The bacteria: a Treatise on Structure and Function**. London: Academic, 1986, p. 74.

O'BRIEN, J. G.; BLANCHETTE, R. A.; SURTHERLAND, J. B. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of dutch elm disease. **Plant Disease**, v. 68, p. 104-106, 1984.

OKAMI, Y.; HOTTA, K. Search and discovery of new antibiotics. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. M. (eds.). **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic, 1988, p. 33-67.

OKAZAKI, T.; TAKAHASHI, K.; KIZUKA, M.; ENOKITA, R. Studies on Actinomycetes isolated from plant leaves. **Annual Report of Sankyo Research Laboratories**, v. 47, p. 97-106, 1995.

OKI, T.; TENMYO, O.; HIRANO, M.; TOMATSU, K.; KAMEI, H. Pramycin A, B and C: new antifungal antibiotics – (II) *in vitro* and *in vivo* biological activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 763-770, 1990.

OMOREGBE, R. E.; IKUEBE, O. M.; IHIMIRE, I. G. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. **African Journal of Medical Science**, v. 25, p. 373-375, 1996.

PALADINO, J. A.; SUNDERLIN, J. L.; PRICE, C. S.; SCHENTAG, J. J. Economic consequences of antimicrobial resistance. **Surgical Infectious Disease**, v. 3, p. 259-267, 2002.

PARKASH, A.; NG, T. B.; TSO, W. W. Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome inactivating peptide from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds. **Journal of Peptide Research**, v. 59, p. 197-202, 2002.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociências e Desenvolvimento**, nº29, 2002.

PELCZAR Jr., Joseph Michael. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, vol. 2, 2 ed., São Paulo: Editora Makron Books, 1997.

PEREIRA, J. C. **Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000, 15p.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Influência do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1183-1190, 2000.

PEREIRA, J. O.; VIEIRA, C.; AZEVEDO, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 37-40, 1999.

PETERS, S.; DAMMEYER, B.; SCHULZ, B. Endophytic-host interactions: Plant defense reactions to an endophytic and a pathogenic fungus. **Symbiosis**, v. 25, p. 193-211, 1998.

PETROLINI, B.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; SARDI, P. Studies on the streptomycetes population inhabiting plant roots. **Actinomycetes**, v. 2, p. 56-65, 1996.

PRABAKAR, K.; JEBANESAN, A. Larvicidal efficacy of some Cucurbitaceous plant leaf extracts against *Culex quinquefasciatus* (Say). **Bioresource Technology**, v. 95, p. 113-114, 2004.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENECICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1957.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D.D.V.; LOHMANN, S.; FRANÇA, S. de C.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MOLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRAFE, U.; LEISTNER, E.; New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. **Planta**, v. 216, p. 162-167, 2002.

QUEENER, S. W.; DAY, L. E. Antibiotic-producing *Streptomyces*. In: GUNSALUS, I. C. (ed.). **The Bacteria**. Orlando: Academic Press, 1986, v. IX, p. 3-4.

RAMAN, A.; LAU, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v. 2, p. 349-362, 1996.

RAMBELLI, F.; BRIGOTTI, M.; ZAMBONI, M.; DENARO, M.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Effect of the antibiotic purpuromycin on cell-free protein-synthesizing systems. **Biochemical Journal**, v. 259, p. 307-310, 1998.

RUBIN, M. A.; SAMORE, M. H. Antimicrobial use and resistance. **Current Infectious Disease Report**, v. 4, p. 491-497, 2002.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Medical and economic impact of extra intestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. **Microbiology and Infectious**, v. 5, p. 449-456, 2003.

SABAOU, N.; BOUDJELLA, H.; BENNADJI, A.; MOSTEFAOUI, A.; ZITOUNI, A.; LAMARI, L.; BENNADJI, H.; LEFEBRVE, G.; GERMAIN, P. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques, **Sécheresse**, v. 9, p. 147-153, 1998.

SANGLIER, J. J.; HAAG, H.; HUCK, T.A.; FEHR, T. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). **Research in Microbiology**, v. 144, p. 633-642, 1993.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONORI, G. E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surfaces sterilized roots. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 58, p. 2691-2693, 1992.

SCHIPPERS, B., BAKKER, A. W. & BAKKE, P. A. H. M.. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of crooping practices. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 339-358, 1987.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, p. 563-568, 2005.

SEIFERT, K. A. Evaluation of *Bacillus subtilis* C186 as a potential biological control of sapstain and mould on unseasoned lumber. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1102-1107, 1987.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in threes potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S RNAr genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 23-32, 2002.

SHIMIZU M.; FUJITA, B.; NAKAGAWA, Y.; NISHIMURA, T.; FURUMAI,T.; IGARASHI,Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Disease resistance of tissue-cultured seedlings of *Rhododendron* after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. **Journal General Plant Pathology**, v. 67, p. 325-332, 2001.

SHIMIZU M.; IGARASHI, Y.; FURUMAI, T.; ONAKA, H.; KUNOH, H. Identification of endophytic *Streptomyces* sp. R-5 and analysis of its antimicrobial metabolites. **Journal General Plant Pathology**, v. 70, p. 66-68, 2004.

SHIMIZU M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity. **Journal General Plant Pathology**, v. 66, p. 360-366, 2000.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO M. L.; SARQUIS, I. M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

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

STAMFORD, T. L. M. **Isolamento e Identificação de Microrganismos Endofíticos, Seleção, Caracterização de Actinomicetos Produtores de Enzimas Amilolíticas**. Tese (Doutorado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1997, 110 p.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardiosis* sp. endophyte of yambean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

STANECK, J.; ROBERTS, G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 226-231, 1974.

STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. **Mundo dos Micróbios**. 2 ed., São Paulo: Edgard Blücher, 1969.

STROBEL, G. A., and LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potencial. **ASM News**, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

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

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1995.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.

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

TAKEUCHI, S.; KIRAYAMA, K.; VIDA, K.; SAKAI, H.; YONETARA, H. Blastocidin, S., a new antibiotic. **The Journal of Antibiotics**, v. 11, p. 1-5, 1957.

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

TANAKA, Y. Antifungal agents. In: OMURA, S. (ed.). **The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms**. New York: Springer-Verlag, 1992, p. 32-35.

TIAN, X.L.; CAO,L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q. G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q. and ZHOU, S.N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1-7, 2004.

TOMITA, K.; NISHIO, M.; SAITOH, K.; YAMAMOTO, H.; HOSHINO, Y., OHKUMA, H.; KONISHI, M.; MIYAKI, T.; OKI, T. Pramycin A, B and C: new antifungal antibiotics – (1) taxonomy, production, isolation and physico-chemical properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 755-762, 1990.

TORREY, J. G.; TJEPKEMA, J. D. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants. **Botanical Gazette**, v. 140, p. 1-2, 1979.

TREJO-ESTRADA, S.R., PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D.L. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 81-90, 1998.

TSVETANOVA, B. C.; PRICE, N. P. J. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of tunicamycin-type antibiotics. **Analytical Biochemistry**, v. 289, p. 147-156, 2001.

UETANABARO, A. P. T. **Taxonomia e Triagem da Atividade Antimicrobiana e Antitumoral de Actinomicetos Raros Isolados de *Tocoyema Formosa* (cham. et Sch) K. Shum**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004, 110 p.

UMEZAWA, H.; OKAMI, Y.; HASHIMOTO, T.; SUHARA, Y.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T. A. A new antibiotic, Kasugamicin. **The Journal of Antibiotics**, v. 18, p. 101-103, 1965.

VAARA, M. Antibiotic-supersusceptible of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2255-2260, 1993.

VALOIS, D.; FAYAD, K.; BARASUBIYE, T.; GARON, M.; DERY, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1630-1635, 1996.

WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. Detection of Actinomycetes in the natural environment-problems and perspectives. In: OKAMI, Y.; BEPPU, T.; OGAWARA, H. (eds.). **Biology of Actinomycetes**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1988, p. 265-270.

XIE, H.; HUANG, S.; DENG, H.; WU, Z.; JI, A. Study on chemical components of *Momordica charantia*. **Zhong Yao Cai**, v. 21, p. 458-459, 1998.

YAMAGUCHI, H.; UCHIDA, K. RI 331, a new antifungal antibiotic. **Annual of the New York Academy of Sciences**, v. 3, p. 188-190, 1988.

YESILADA, E.; SEZIK, E. HONDA, G.; TAKAISHI, Y.; TAKEDA, Y.; TANAKA, T. Traditional medicine in Turkey IX: folk medicine in north-west Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 199-206, 1999.

YUAN, Y. R.; HE, Y. N.; XIONG, J. P.; XIA, Z. X. Three-dimensional structure of beta-momorcharin at 2.55 Å resolution. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 55, p. 1144-1151, 1999.

YUAN, W. M.; CRAWFORD, D. L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC 108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 61, p. 3119-3128, 1995.

9 – APÊNDICE

Tabela 01 – Diâmetro dos halos de Inibição dos actinomicetos isolados da rizosfera de *Momordica charantia*, em bloco de Gelose, contra diferentes microrganismos-teste.

Actinomiceto da Rizosfera	Microrganismo-teste (Diâmetro do Halo de Inibição em mm)											
	02	16	224	82	720	1007	4224	4249	4503	4498	4499	4849
MCRF-79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
MCRF-90	-	-	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-18	-	-	-	35	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-103	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-46	22	-	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-146	-	21	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-5	-	15	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-
MCRF-84	15	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-131	33	30	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-97	23	23	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-17	13	12	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-81*	20	26	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-142	14	11	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-101	35	20	-	37	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-105	12	11	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-122	17	15	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-143	-	11	-	-	-	-	-	-	17	-	-	14
MCRF-36	14	13	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
MCRF-135	18	19	-	26	-	14	-	-	-	-	-	-
MCRF-132	14	10	-	12	-	15	-	-	-	-	-	-
MCRF-141	11	13	-	-	-	-	-	-	15	15	-	-
MCRF-124	15	14	-	15	-	14	-	-	-	-	-	-
MCRF-139	-	13	-	12	-	-	-	-	15	-	-	15
MCRF-105*	22	26	-	31	-	-	-	14	-	-	-	-
MCRF-116	28	18	-	23	-	-	-	-	-	-	-	13
MCRF-100	-	11	-	25	-	-	-	-	19	14	-	16
MCRF-107	12	14	-	-	-	-	-	-	19	16	-	18
MCRF-85	15	-	-	13	11	13	11	-	-	-	-	-
MCRF-110	-	-	-	15	-	-	-	-	20	15	22	16
MCRF-16	13	16	-	23	-	16	16	-	-	-	16	-
MCRF-119	13	-	-	19	-	-	-	-	12	13	12	12
MCRF-6	20	21	-	40	11	12	11	-	-	-	-	-
MCRF-158	18	13	-	16	-	-	-	20	12	-	11	-
MCRF-92	15	16	-	26	12	15	-	15	-	-	-	-
MCRF-88	39	32	12	29	-	15	-	15	-	-	-	-
MCRF-8	35	20	11	31	14	13	12	20	-	-	-	-
MCRF-86	30	31	-	21	-	20	20	-	28	26	-	26
MCRF-117	-	-	-	-	20	21	20	25	20	24	20	22
MCRF-117*	-	-	-	-	22	22	23	28	25	27	24	23
MCRF-94	13	20	-	14	-	-	11	-	20	19	14	17
MCRF-121	11	14	-	26	22	24	21	28	-	21	20	-
MCRF-81	35	30	11	29	14	16	11	19	-	-	-	-

Continuação

MCRF-97*	36	30	10	28	13	16	12	18	-	-	-	-
MCRF-13	12	11	-	29	-	-	20	27	34	35	21	39
MCRF-38	10	-	-	-	14	24	20	21	21	22	21	23
MCRF-93	-	23	-	16	-	14	17	14	17	14	16	14
MCRF-159	12	11	-	30	13	12	11	13	14	12	13	11
MCRF-82	17	-	10	14	15	13	13	17	12	12	11	11

Tabela 02 – Diâmetro dos halos de inibição (em mm) dos actinomicetos endofíticos MCF-55, MCF-65 e MCR-79, durante a fermentação, contra diferentes microrganismos-teste.

Patógeno	Meio	Actinomiceto Endofítico / Tempo de fermentação												
		MCF-55					MCF-65				MCR-79			
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	24	48	72	96
02	M1	-	-	12	11	-	-	12	12	11				
	MPE	-	-	13	11	-	-	10	10	-				
	ISP-2	-	-	-	10	23	-	-	-	-				
16	M1	13	13	13	14	-	-	20	17	14				
	MPE	10	13	14	14	-	-	13	12	10				
	ISP-2	-	10	12	15	19	-	-	-	-				
82	M1						-	-	-	-	-	-	-	9
	MPE						-	-	-	-	-	-	-	11
	ISP-2						-	-	-	-	-	-	-	14
720	M1										-	-	9	-
	MPE										-	9	12	10
	ISP-2										9	9	13	13
1007	M1										9	10	9	-
	MPE										8	12	13	11
	ISP-2										12	10	16	15
4224	M1										15	13	13	10
	MPE										13	15	19	13
	ISP-2										19	14	19	18
4249	M1										11	11	10	10
	MPE										10	12	15	12
	ISP-2										14	13	17	18
4503	M1										-	-	9	10
	MPE										-	-	14	12
	ISP-2										-	-	15	16
4498	M1										-	-	9	10
	MPE										-	-	10	13
	ISP-2										-	-	11	17
4499	M1										9	11	10	10
	MPE										10	10	16	12
	ISP-2										13	14	17	16
4849	M1						-	-	-	-	9	-	-	-
	MPE						-	-	-	-	9	10	14	11
	ISP-2						-	-	-	-	10	10	16	15

- = sem atividade em meio líquido

Espaço vazio = sem atividade em ambos os ensaios

Tabela 03 – Diâmetro dos halos de inibição (em mm) dos actinomicetos da rizosfera MCRF-117*, MCRF-13 e MCRF-38, durante a fermentação, contra diferentes microrganismos-teste.

Patógeno	Meio	Actinomiceto da Rizosfera / Tempo de fermentação											
		MCRF-117*				MCRF-13				MCRF-38			
		24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
02	M1					-	-	-	-	-	-	-	-
	MPE					-	-	-	-	-	-	-	-
	ISP-2					-	-	-	-	-	-	-	-
16	M1					-	-	-	-				
	MPE					-	-	-	-				
	ISP-2					-	-	-	-				
82	M1					-	-	-	-				
	MPE					-	-	-	-				
	ISP-2					-	-	-	-				
720	M1	-	-	-	-					-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-					-	-	10	-
	ISP-2	-	8	11	16					-	-	-	-
1007	M1	-	-	-	-					-	8	-	-
	MPE	-	-	-	-					-	10	12	-
	ISP-2	-	-	14	17					-	9	-	-
4224	M1	-	-	-	-	19	-	-	-	10	13	9	10
	MPE	-	-	-	-	14	-	-	-	10	13	14	13
	ISP-2	-	8	11	16	14	15	-	-	10	12	11	18
4249	M1	10	10	9	-	24	-	-	-	-	9	-	-
	MPE	-	8	-	-	18	18	-	-	-	11	11	9
	ISP-2	-	12	15	21	20	16	-	-	-	9	9	10
4503	M1	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	12	-	-	-	-	10	16	-
	ISP-2	-	-	-	11	16	17	-	-	-	-	-	-
4498	M1	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	17	-	-	-	-	10	16	14
	ISP-2	-	-	-	13	14	20	-	-	-	-	-	-
4499	M1	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	12	10
	ISP-2	-	-	-	15	-	10	-	-	-	10	10	10
4849	M1	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	19	10	-	-	-	-	16	-
	ISP-2	-	-	-	12	16	20	-	-	-	-	-	-

- = sem atividade em meio líquido

Espaço vazio = sem atividade em ambos os ensaios

Tabela 04 – Diâmetro dos halos de inibição (em mm) dos actinomicetos da rizosfera MCRF-88, MCRF-6 e MCRF-121, durante a fermentação, contra diferentes microrganismos-teste.

Patógeno	Meio	Actinomiceto da Rizosfera / Tempo de fermentação												
		MCRF-88					MCRF-6				MCRF-121			
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	24	48	72	96
02	M1	15	20	22	23	26	13	13	17	20	-	-	-	-
	MPE	13	16	18	18	19	16	23	24	26	-	-	8	9
	ISP-2	18	22	27	27	30	-	-	11	14	-	-	9	9
16	M1	18	22	23	21	21	-	11	11	13	-	-	-	10
	MPE	15	19	19	18	16	-	16	16	17	-	8	8	8
	ISP-2	20	23	24	24	22	-	-	-	-	-	9	9	8
224	M1	-	-	-	-	-								
	MPE	-	-	-	-	-								
	ISP-2	-	-	-	-	-								
82	M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ISP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
720	M1						-	-	-	-	10	10	11	13
	MPE						-	-	-	-	10	13	13	14
	ISP-2						-	-	-	-	9	13	15	12
1007	M1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	14	16	17
	MPE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	15	16	16
	ISP-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	16	19	18
4224	M1						17	10	-	-	10	10	10	13
	MPE						21	14	-	-	9	11	11	13
	ISP-2						-	-	-	-	8	14	15	11
4249	M1	-	-	-	-	-					16	18	18	19
	MPE	-	-	-	-	-					17	19	19	19
	ISP-2	-	-	10	10	9					13	21	22	21
4849	M1										-	-	-	-
	MPE										-	-	-	-
	ISP-2										-	-	-	-

- = sem atividade em meio líquido

Espaço vazio = sem atividade em ambos os ensaios

Tabela 05 – Variação de pH durante a fermentação dos actinomicetos.

Actinomicetos	Meios	Tempo de Fermentação (Horas)					
		0	24	48	72	96	120
MCF-55	M1	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	MPE	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	ISP-2	7,2	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0
MCF-65	M1	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0	8,0
	MPE	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0	8,0
	ISP-2	7,2	6,0	5,0	5,0	5,0	5,0
MCR-79	M1	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0	-
	MPE	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0	
	ISP-2	7,2	7,0	6,0	7,0	7,0	
MCRF-117*	M1	7,0	6,0	8,0	8,0	8,0	-
	MPE	7,0	6,0	8,0	8,0	8,0	
	ISP-2	7,2	6,0	6,0	7,0	7,0	
MCRF-13	M1	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	-
	MPE	7,0	6,0	8,0	8,0	8,0	
	ISP-2	7,2	7,0	6,0	6,0	7,0	
MCRF-38	M1	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0	-
	MPE	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0	
	ISP-2	7,2	7,0	6,0	6,0	7,0	
MCRF-88	M1	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	MPE	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	ISP-2	7,2	6,0	7,0	7,0	7,0	7,0
MCRF-6	M1	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	MPE	7,0	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0
	ISP-2	7,2	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
MCRF-121	M1	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	MPE	7,0	7,0	8,0	8,0	8,0	8,0
	ISP-2	7,2	6,0	7,0	7,0	7,0	7,0

10 – ANEXOS

01 - Meios de Cultura

Ágar Batata Dextrose (BDA) – (MELO *et al.*, 1988)

Infusão de batata	200 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 6,0

Ágar Caseína Amido (CAA) - (KÜSTER e WILLIAMS, 1964)

Amido	10 g
Caseína	0,3 g
Nitrato de potássio	2 g
Cloreto de sódio	2 g
Fosfato hidrogenado dipotássico	2 g
Sulfato de magnésio	0,05 g
Carbonato de cálcio	0,02 g
Sulfato ferroso	0,01 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,2

Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP-2) – (PRIDHAM *et al.*, 1957).

Extrato de levedura	4 g
Extrato de malte	10 g
Glicose	4 g
Amido	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,2

Ágar Nutritivo (AN)

Peptona	10 g
Extrato de carne	3 g
Cloreto de sódio	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 6,9 ~ 7,1

Ágar Sabouraud (SAB)

Peptona	10 g
D(+)glicose	40 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 5,6

Ágar Sabouraud (SAB) Modificado

Peptona	10 g
D(+)glicose	40 g
Extrato de levedura	10 g
Óleo de oliva	5 mL
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH ~7,0

Ágar Soja-Triptona (TSA)

Triptona	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,3

Meio 1 (M1) – (LIMA *et al.*, 1958)

Farinha de soja	10 g
Glicose	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Carbonato de cálcio	1 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,0

Meio para Produção de Eurimicina (MPE) – (HAMADA *et al.*, 1974)

Farinha de soja	20 g
Glicose	20 g
Cloreto de sódio	5 g
Carbonato de cálcio	2 g
Água destilada	1000 mL

pH 7,0

Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. O pH, quando necessário, foi ajustado com soluções de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico.

02 – Soluções

Solução de Ácido Clorídrico 6N

Ácido clorídrico	18,4 mL
Água destilada	100 mL

Solução de n-Butanol Saturado

n-Butanol	110 mL
Água destilada	30 mL

Solução de Ninhidrina 0,2%

Ninhidrina	0,2 g
Butanol saturado	100 mL

Solução Padrão de Ácido Diaminopimérico (DAP)

Ácido Diaminopimérico	1,9 mg
Água destilada	1 mL

Solução para Cromatografia – fase móvel

Álcool metílico	80 mL
Ácido clorídrico 6N	4 mL
Piridina	10 mL
Água destilada	26 mL

Solução Tampão PBS

Cloreto de sódio	8 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Fosfato hidrogenado dissódico	1,44 g
Fosfato diidrogenado de potássio	0,24 g
Água destilada	1000 mL

03 – Produção Científica

Estudo da Diversidade Microbiana Endofítica de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia*) e Atividade Antimicrobiana. In: Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental (WIMA) – “Desafios e Oportunidades na América do Sul”, realizado no período de 19 a 21 de setembro de 2005, Campinas /SP.