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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Conyza bonariensis* (L) Cronquist. (RABO-DE-RAPOSA)

Rosa Elvira Areias da Silva

Recife – 2006

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Rosa Elvira Areias da Silva

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS E ACTINOBACTÉRIAS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Conyza bonariensis* (L) Cronquist. (RABO-DE-RAPOSA)

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

Orientador: Profª. Drª. Janete Magali de Araújo
Co-orientador: Dr. João Lúcio de Azevedo

Recife – 2006

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Silva, Rosa Elvira Areias da
Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos e actinobactérias endofíticos isolados de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. (Rabo-de-Raposa) / Rosa Elvira Areias da Silva. – Recife : O Autor, 2006.
79 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. Fungos e Actinobactérias endofíticos de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. (Rabo-de-Raposa) – Atividade antimicrobiana – Fermentação e identificação. 3. Bloco de gelose – Teste de difusão em disco. I. Título.

579.6 CDU (2.ed.) UFPE
579.37 CDD (22.ed.) BC2006-323

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *ROSA ELVIRA AREIAS DA SILVA* 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. TÂNIA LÚCIA MONTENEGRO STAMFORD
Departamento de Nutrição - UFPE

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

“Sempre faça o seu melhor, não por que alguém vai aplaudi-lo,
mas para que você cumpra a sua missão;

Que você consiga realizar todo o seu potencial,
porque você é uma pessoa especial
que merece ser feliz e se realizar;

Que você descubra que seus talentos são uma dádiva,
os maiores presentes que você poderia receber;
Faça por merecer;

Evolua sempre, procure se aprimorar para ser digno de suas ações;

Faça sempre o que você achar correto, mesmo que naquele momento,
isso lhe crie problemas com os outros. Mesmo que as pessoas não entendam...

Preocupe-se mais com sua consciência do que com sua imagem.
Se você seguir sua consciência, as pessoas perceberão que você é um
herói de verdade”.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida

A Minha querida mãe que sempre acreditou em mim,
e se empenhou em ver meu sonho realizado.

Ao meu pai de quem tanto sinto falta,
mas que me deixou garra e coragem para enfrentar os desafios.

A Allan, que esteve ao meu lado me dando estímulo.

Ao meu irmão Júnior, que sempre depositou em mim tantas esperanças.

E especialmente aos meus filhos dos quais sacrifiquei tantos momentos
para me dedicar a este trabalho.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Deixo aqui, um imenso e agradecido abraço a todos aqueles que me foram tão queridos e importantes durante a realização deste trabalho:

Vânia, minha amiga desde a graduação em Maceió, que durante estes dois anos me ajudou a enfrentar os desafios do Mestrado. Com ela dividi muitas vezes meus fardos pesados, para deixar minha vida mais leve. Ela me ensinou a ser mais persistente, a não desistir fácil dos meus sonhos.

Meu estimado sogro Izaias Regis e sua família que me receberem em Recife e me oferecerem todas as condições para que eu me sentisse em casa.

A minha orientadora Profª. Janete Magali de Araújo, por tudo que aprendi com sua experiência e sabedoria.

A Chefia, técnicos e funcionários do Departamento de Antibióticos em especial a técnica Fátima Regina pela boa vontade sempre e pela amizade.

Ao colega Cleiton Bispo, que me auxiliou durante o isolamento, e a todos do Laboratório de Genética pelos momentos de descontração.

Ao Engenheiro Agrônomo Manoel Américo por permitir a coleta da planta Rabo-de-raposa em seu sítio.

Ao Departamento de Botânica pela identificação da planta *Conyza bonariensis*.

Ao Departamento de Micologia e a colega Adriana pela identificação dos fungos.

A Maria Suely, secretária deste Mestrado, que foi sempre tão prestativa.

A toda minha família pela torcida, admiração e motivação sempre.

Sem vocês eu não conseguiria...

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE FIGURAS..... *i*

LISTA DE TABELAS..... *v*

RESUMO..... *vi*

ABSTRACT..... *vii*

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 4

2.1 – MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS..... 4

2.1.1 – Interação planta-microrganismo..... 7

2.2 – MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E A DESCOBERTA DE NOVOS METABÓLITOS BIOATIVOS..... 10

2.2.1 – Fungos endofíticos produtores de antibióticos..... 12

2.2.2 – Actinobactérias endofíticas produtoras de antibióticos..... 14

2.3 – *Conyza Bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 16

3. OBJETIVOS..... 18

3.1 OBJETIVO GERAL..... 18

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 18

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 20

4.1 – ISOLAMENTO DOS ENDOFÍTICOS..... 20

4.1.1 – Coleta..... 20

4.1.2. – Desinfecção..... 20

4.1.3 – Isolamento..... 21

4.2 – PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.... 22

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.3 – TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... 23

4.3.1 – Microrganismos-teste..... 23

4.3.2 – Teste preliminar em “bloco de Gelose”..... 24

4.3.3 – Seleção do meio de fermentação..... 25

4.3.3.1 – Pré-inóculo..... 25

4.3.3.2 – Fermentação..... 25

4.3.3.3. – Atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco..... 26

4.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS..... 27

4.4.1 – Identificação da Actinobactéria..... 27

4.4.1.1 – Micromorfologia..... 27

4.4.1.2 – Caracterização da parede celular..... 27

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 30

5.1 – ISOLAMENTO..... 30

5.2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... 34

5.2.1 – Teste da atividade em “bloco de Gelose” 34

5.2.2 – Ensaio de difusão em disco – Fermentação..... 37

5.3 – IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS..... 51

5.3.1 – Identificação dos Fungos..... 51

5.3.2 – Identificação da Actinobactéria..... 51

6 – CONCLUSÃO..... 55

7 – PERSPECTIVAS..... 57

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 59

9 – APÊNDICE Valores dos halos de inibição do teste em “bloco de gelose”..... 71

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10 – ANEXOS..... 73

10.1 - MEIOS DE CULTURA..... 73

10.1.1 – AN : Meio Agar Nutriente..... 73

10.1.2 – BDA (batata-dextrose-ágar) – Mello, *et al*., 1988..... 73

10.1.3 – CAA (Caseína Amido Agar) Kuster; Williams, 196…… 73

10.1.4 – Meio CZAPEK..... 74

10.1.5 – ISP-1: Triptona-extrato de levedura – Pridham; Gottlieb,1948... 74

10.1.6 – ISP-2: Extrato de malte-extrato de levedura – Pridham, *et al*., 1957…….. 74

10.1.7 – ISP-3: Agar – Farinha de Aveia – Kuster; Williams, 1964…….. 75

10.1.8 – ISP-4: Sais inorgânicos-amido-ágar…….. 75

10.1.9 – ISP-7: Ágar Tirosina…….. 75

10.1.10 – MPE : Meio para produção de eurimicina – Kawamura, *et a*l., 1976…….. 76

10.1.11 – Meio Saboraud…… 76

10.1.12 – Meio Saboraud-YE-O…… 76

10.1.13 – TSA – Ágar Soja-Triptona…… 77

10.2 – SOLUÇÕES..... 77

10.2.1 – Antibióticos adicionados aos meios de cultura para o isolamento..... 77

10.2.1.1 – Soluções de Antibióticos para bactérias…..... 77

10.2.1.2 – Soluções de antibióticos para fungos..... 77

10.2.2 – Soluções utilizadas nos meios de cultura 77

10.2.2.1 – Solução I..... 77

10.2.2.2 – Solução II..... 78

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.2.2.3 – Solução de traços de sais..... 78

10.2.3 – Soluções utilizadas na identificação da parede celular 78

10.2.3.1 – Solução de Ácido Clorídrico 6N..... 78

10.2.3.2 – Solução de n-Butanol Saturado..... 78

10.2.3.3 – Solução de Ninhidrina 0,2%..... 79

10.2.3.4 – Solução Padrão de Ácido Diaminopimélico (DAP)..... 79

10.2.3.5 – Solução para Cromatografia – fase móvel..... 79

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1:Folhas (a) e raízes (b) de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 21

Figura 4.2: Esquema da desinfecção..... 21

Figura 4.3: Bactérias endofíticas surgindo de fragmentos de folhas de C*. bonariensis*(**L**.) **Cronquist**..... 22

Figura 4.4: Esquema do ensaio antimicrobiano em ”bloco de gelose”..... 24

Figura 4.5: Esquema do teste de difusão em disco..... 26

Figura 5.1:Curva de isolamento de fungos endofíticos das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. durante 16 dias de incubação..... 31

Figura 5.2**:** Freqüência dos microrganismos endofíticos isolados das folhas e raízes de *C*. *bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 32

Figura 5.3: Curva de isolamento de bactérias endofíticas das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**, após tratamento por cinco minutos com hipoclorito durante 26 dias de incubação..... 33

Figura 5.4: Curva de isolamento de bactérias endofíticas das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**, após tratamento por quinze minutos com hipoclorito durante 26 dias de incubação..... 33

Figura 5.5: Diâmetro dos halos de inibição dos fungos endofíticos das folhas de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. contra os microrganismos testados..... 35

Figura 5.6: Diâmetro dos halos de inibição dos fungos endofíticos das raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. contra os microrganismos testados..... 36

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Figura 5.7: Diâmetro dos halos de inibição da linhagem de actinomiceto EbR49A contra os microrganismos testados..... 36

Figura 5.8:Halos de inibição dos microrganismos endofíticos contra diferentes microrganismos-teste. **a:** Eb5F(1) e EbR27 (2) contra *Candida* sp. (4249); **b:** EbR32 (3) e Eb30F (4) contra *Candida* sp. (1007); **c:** EbR79 (5), EbR83 (6), EbR84 (7) e Eb26F (8) contra *Staphyloccocus aureus* (02); **d:** EbR83 (9) contra *M*alassezia *simpodialis* (4499)..... 37

Figura 5.9: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapek do endófito de Eb26F contra os microrganismos testados..... 38

Figura 5.10: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito de Eb26F contra os microrganismos testados..... 39

Figura 5.11: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito Eb3F contra os microrganismos testados..... 40

Figura 5.12:Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito de Eb30F contra os microrganismos testados..... 40

Figura 5.13: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito EbR32 contra os microrganismos testados..... 41

Figura 5.14: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR32 contra os microrganismos testados..... 42

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Figura 5.15: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 168h de fermentação em meio MPE do endófito EbR83 contra os microrganismos testados..... 43

Figura 5.16: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 120h de fermentação em meio BD do endófito EbR83 contra os microrganismos testados..... 43

Figura 5.17: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR33 contra os microrganismos testados..... 44

Figura 5.18: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio MPE do endófito EbR33 contra os microrganismos testados..... 45

Figura 5.19**:** Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR84 contra os microrganismos testados..... 46

Figura 5.20: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito EbR84 contra os microrganismos testados..... 46

Figura 5.21:Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 96h de fermentação em meio ISP-3 do endófito EbR49A contra os microrganismos testados..... 48

Figura 5.22:Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 96h de fermentação em meio MPE do endófito EbR49A contra os microrganismos testados..... 49

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Figura 5.23: Halos de inibição dos fermentados dos microrganismos endofíticos isolados de *C. bonariensis* (L.) Cronquist contra os microrganismos testados a.1) EbR49A (ISP-2/72h), a.2) Eb3F (Czapeck/120h) X 16 ; b.3) Eb30F X 4249 (Czapeck/120h); c.4) EbR33 (Czapeck/ 72h); c.5) EbR83 (MPE / 72h) X 4499; d.6) EbR33 (Czapeck/ 72h); d.7) EbR83 (MPE / 72h) X 4498; e) EbR84 (MPE /72h) X4249; f.8) EbR33(Czapeck/ 72h); f.9) EbR83(MPE/ 72h) X 4503; g) Eb26F (Czapek/120h) x 1007; h.10) EbR32 (BD/ 120h); h.11) EbR32 (Czapeck /144h) X 4249..... 50

Figura 5.24:Micromorfologia da actinobactéria EbR49A em meio ISP-1. As setas mostram verticilos com filamentos esporulados..... 53

Figura 5.25:Cromatografia em camada delgada da parede celular da linhagem EbR49A: 1)DAP Acido diaminopimélico; 2) *Nocardia* sp; 3) *Streptomyces* sp;. 4) EbR49A..... 53

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil*..... 6

Tabela 2.Relação dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana…… 23

Tabela 3. Melhores condições para a produção de metabólitos bioativos das linhagens de endófitos fermentadas..... 50

Tabela 4. Características da colônia da linhagem EbR49A em meio ISP..... 52

Tabela 5. Média aritmética dos halos de inibição do teste em “Bloco de Gelose” dos fungos endofíticos de raízes de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 71

Tabela 6. Média aritmética dos halos de inibição do teste em ”Bloco de Gelose” dos fungos endofíticos de folhas de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 72

Tabela 7. Média aritmética dos halos de inibição do teste em “Bloco de Gelose” das actinobactérias endofíticas de raízes de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**..... 72

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

RESUMO

Microrganismos endofíticos são encontrados em praticamente todas as plantas na natureza. Estes microrganismos residem no interior dos tecidos vegetais onde podem manter relações simbióticas, produzindo ou contribuindo para a produção de substâncias bioativas que poderão favorecer o desenvolvimento da planta. Essas substâncias, uma vez isoladas e caracterizadas, têm grande potencial para serem utilizadas pela medicina. Na maioria das vezes estas substâncias são produzidas por microrganismos endofíticos isolados de plantas utilizadas na medicina popular. *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**, pertence à família Asteraceae, é popularmente conhecida como rabo-de-raposa. É utilizada pela medicina popular contra micoses superficiais. Foram isolados da planta *Conyza bonariensis* 53 fungos, 126 bactérias e quatro actinobactérias endofíticas. Houve maior ocorrência de bactérias nas raízes (16,33%) enquanto nas folhas houve maior predominância de fungos (10%). As actinobactérias apresentaram freqüência muito baixa (1,3%). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método do "Bloco de Gelose" contra *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans, Malassezia furfur* e *M. simpodialis*. As linhagens que apresentaram melhor atividade foram selecionadas para teste de difusão em disco dos seus fermentados. Eb26F, Eb3F, Eb30F, EbR84 apresentaram melhor atividade em meio Czapek (120h); EbR83 e EbR33, em meio MPE (120h), para a linhagem EbR32 o melhor meio foi BD (120h) e para a actinobactéria EbR49A o meio ISP-3 (72h). Os halos de inibição variaram entre 10mm e 30mm.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are found in practically all plants in the nature. These microorganisms inhabit the interior of tissues of plants where they keep symbiotic relations, producing or contributing for the bioactive compounds production that will be able to favor the development of the plant. These substances, once isolated and characterized, have great potential to be used in Medicine. In several cases these substances are produced by endophytic microorganisms isolated of plants used in the popular medicine. *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**, belongs to the Asteraceae family, and is popularly known as tail-of-fox. It is used by the popular medicine against superficial mycoses. A total of 53 fungi, 126 bacteria and four actinobacteria had been isolated from *Conyza bonariensis*. Was found high occurrence of bacteria in the roots (16,33%) and of fungi in leaves (10%). The actinobacteria were found in very low frequency (1,3%). It was evaluated the antimicrobial activity by the method of the "Block of Gelose" of the fungi and actinobacteria against *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans, Malassezia furfur* and *M. simpodialis*. Strains presenting greater specter had been selected for test of disc diffusion of the metabolities. Eb26F, EbR33, Eb3F, Eb30F, EbR84 presented better activity in Czapek medium (120h); EbR83 and EbR33, in MPE medium (120h) and EbR49A, in ISP-3 (72h). The inhibition halos varied between 10mm and 30mm.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

1 – INTRODUÇÃO

Os antibióticos vêm sendo utilizados a mais de 50 anos, mas nas ultimas duas décadas, o isolamento de novas estruturas e agentes antimicrobianos com novos mecanismos de ação, tem diminuído muito. Inúmeras pesquisas *in vitro* mostram que a descoberta de novos antibióticos ainda é necessária devido ao aparecimento da resistência dos patógenos, à evolução de novas doenças como a AIDS e à toxicidade de alguns produtos que já estão no mercado. Além disso, não só a quimioterapia humana tem interesse por estas descobertas, mas também a agropecuária na intenção de promover um melhor desenvolvimento de animais e para melhorar a proteção de plantios.

Microrganismos endofíticos são encontrados em praticamente todas as plantas na natureza. Estes microrganismos residem no interior dos tecidos vegetais onde podem viver em associações simbióticas produzindo ou contribuindo para a produção de substâncias bioativas que poderão causar alterações fisiológicas que favoreçam o desenvolvimento do vegetal, que pode ser pela produção de nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta como por exemplo a fixação de nitrogênio, pela produção de hormônios vegetais ou ainda pela produção de substâncias que protejam o vegetal de ataques de herbívoros, fitopatógenos e pelo controle de insetos. Essas substâncias, uma vez isoladas e caracterizadas, têm grande potencial para serem utilizadas pela medicina, principalmente como agentes antimicrobianos e antitumorais.

Os compostos bioativos isolados de endofíticos apresentando baixa toxidade são de grande importância uma vez que as plantas são também sistemas eucarióticos no qual o endofítico habita. Portanto os antibióticos produzidos por estes endofíticos podem ter toxicidade celular reduzida caso contrário, a morte do hospedeiro poderia ocorrer. Assim, a própria planta tem ao longo dos tempos servido naturalmente como um sistema de seleção para microrganismos produtores de moléculas bioativas com toxicidade reduzida para organismos superiores.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

A busca por endofíticos específicos capazes de produzir antibióticos, pode ter origem na etnobotânica, que utiliza a medicina popular como fonte para novas descobertas. Possivelmente, as plantas medicinais estão associadas a endófitos capazes de sintetizar produtos bioativos idênticos ou similares aos metabólitos bioativos do vegetal.

Conyza bonariensis (**L**) **Cronquist**. é uma planta perene, de porte herbáceo, pertencente à Família Asteraceae e é popularmente conhecida como: acatóia, capetiçoba, capiçoba, catiçoba, enxota, erva-lanceta, margaridinha-do-campo, rabo-de-foguete, **rabo-de-raposa**, salpeixinho, voadeira. Os compostos desta planta apresentam atividade antifúngica especialmente contra as micoses causadas por *Malassezia furfur* (agente causador do pano branco). O Laboratório de Fitoterapia do Estado de Pernambuco (EBAPE/IPA) comercializa a tintura desta planta para o tratamento de micoses superficiais no programa de “Remédios alternativos”.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

REVISÃO DE LITERATURA

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Existem diferentes possibilidades de associação de microrganismos com vegetais superiores. Eles podem colonizar a rizosfera da planta ou ocorrer como epifíticos. Além disso, as plantas podem servir como um reservatório de um grande número de organismos conhecidos como endofíticos (STROBEL; LONG, 1998; AZEVEDO, *et al*., 2002). Literalmente falando, a palavra endofítico significa “dentro da planta” (*endo* = dentro; *phyton* = planta).

Os microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary em 1866, nesta época não foi dada muita importância a estes microrganismos, pois pouco se conhecia a respeito de sua função. Só no final dos anos 70 do século XX, vários estudos demonstraram que os microrganismos endofíticos vivem em uma associação mutualística com as plantas recebendo nutrientes e proteção do hospedeiro e produzindo compostos químicos que trazem benefícios para o vegetal (PEIXOTO-NETO, *et al*., 2002).

Para Schulz; Boyle (2005), a definição da palavra endófito reporta ao potencial de bactérias, actinobactérias e fungos habitarem o interior de vegetais e algas. Qualquer órgão do hospedeiro pode ser colonizado, e esses microrganismos podem viver nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais ou dentro das células sem que haja nenhum dano para a planta. Portanto para a maioria dos autores os endófitos são aqueles microrganismos os quais a colonização nunca resulta em sintomas visíveis de doenças (AZEVEDO, *et al*., 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005).

A distinção entre microrganismos endofíticos, epifíticos e fitopatogênicos é de ordem puramente didática, pois antes de penetrar o vegetal o microrganismo pode alojar-se na superfície e ser considerado um epifítico, ou quando já é um endofítico e se por acaso ocorrer algum desequilíbrio, este poderá se comportar como um patógeno (PEIXOTO-NETO, *et al*., 2002). Portanto, tudo depende do nicho ocupado pelo microrganismo em determinado estágio da sua interação com o hospedeiro (STROBEL, 2003).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Para Carroll (1988), alguns fitopatógenos são de origem endofítica, pois muitos fungos endofíticos são potenciais patógenos quando o hospedeiro está sob estresse. Os microrganismos endofíticos podem ser encontrados em sementes e transmitidos de forma vertical como ocorre frequentemente em gramíneas (HALLMANN, *et al*., 1997; MARTIN, *et al*., 2003). A transmissão vertical é evolutivamente considerada como uma associação com forte interação mutualística. Segundo Faeth (2002), os endofíticos do gênero *Neotyphodium* (sin. *Acremonium*), apresentam transmissão estritamente vertical.

A transmissão horizontal como relatada por Saikkonen, *et al*. (2004), ocorre por meio de esporos de fungos presentes no ambiente externo ou pela curta fase de epifitia do microrganismo. Os microrganismos endofíticos podem penetrar a planta por meio de aberturas como os estômatos, ferimentos e também produzir enzimas hidrolíticas que podem degradar a parede celular dos vegetais promovendo a sua penetração (HALLMANN, *et al*., 1997), como por exemplo as enzimas estudadas por Sieber, *et al*. (1991), produzidas pelo fungo endofítico *Melanconium* sp. isolado de *Alnus* spp., que são altamente especializadas na penetração das camadas de cutícula vegetal.

A biodiversidade endofítica vem sendo cada vez mais investigada e em várias espécies de plantas tem sido demonstrada à ocorrência de elevado número de endófitos. Schulz; Boyle (2005) relatam que na década de noventa do século XX foram isolados mais de 6.500 microrganismos endofíticos de cerca de 500 tipos de plantas, desde árvores coníferas, até plantas herbáceas de habitats e temperaturas diferentes. Neste levantamento, observou-se que a maioria dos isolados pertencem a gêneros como *Acremonium, Alternaria, Cladosporium, Fusarium e Phoma* que são facilmente isolados na natureza. Petrini, *et al*. (1992) também isolaram tanto de plantas de clima tropical quanto de plantas de clima temperado, microrganismos endofíticos de *taxa* facilmente encontrados em outros ambientes, como os fungos *Colletotrichum, Fusarium* e *Pestalotiopsis*. Arnold, *et al*. (2003) observaram nas folhas de *Theobroma cacao* uma freqüência de 100% de fungos endofíticos onde a maioria deles, do gênero *Colletotricum*, enquanto Hoff, *et al.* (2004), isolaram de *Pinus ponderosa*, inúmeras espécies de fungos endofíticos.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

De acordo com o levantamento realizado por Peixoto-Neto, *et al*. (2002), no Brasil foram isolados fungos endofíticos de diferentes espécies vegetais. O resultado deste levantamento pode ser observado na Tabela 1. ARAÚJO, *et al*. (2002) isolaram várias espécies de bactérias endofíticas de *Citrus* spp., enquanto Pereira *et al*. (1999) isolaram vários fungos endofíticos de *Musa* entre eles, os gêneros *Humicola, Drechlera, Cordana* e *Epicoccum.* Gao, *et al*. (2005) estudaram a diversidade de endofíticos da planta medicinal *Heterosmilax japonica* e observaram a presença de mais de 50 linhagens diferentes de fungos e bactérias. Já outros trabalhos têm sido direcionados ao isolamento de actinobactérias. Araújo *et al*. (2001) isolaram estes microrganismos de *Citrus*; Stamford (1997) obteve isolados de *Pachystrizus erosus,* enquanto Araújo, *et al*. (2000) isolaram 53 linhagens de actinobactérias de *Zea mays.*

Tabela 1. Fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil*

PLANTA	**FUNGOS ENDOFÍTICOS**	**REFERÊNCIA**
Anacardium occidentale (cajueiro)	*Colletotrichum gloeosporioides, Fusarium solani, Guignardia sp. Pestalotia sp.*	Medeiros (1998) e Oliveira (1999)
Euterpe oleracea (Palmeira)	*Xylaria cubenses, F. sentectum, F. oxysporum, Pestalotia palmarum, Colletotrichum gloeosporioides*	Rodrigues; Carlini (1994) e Rodrigues; Samuels(1999)
Glicine max (soja)	*Ascochyta sp., Cladosporium sp., Colletotrichum sp., Phyllosticta sp., Nodulosporium sp.*	Mendes *et al*. (2001) e Pimentel (2001)
Pachyrrizus erosus (jacatupé)	*Mucor sp. e Rhizopus sp.*	Stamford (1997)
Paullinia cupana (guaraná)	*Guignardia sp. Phomopsis sp., Glomerella cingulada, Xylaria sp.*	Guimarães (1998)

* Adaptado de Peixoto-Neto, *et al*., 2002.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2.1.1 – Interação Planta-Microrganismo

Alguns microrganismos endofíticos são produtores de substâncias bioativas que poderão estar envolvidas na relação planta-endófito causando alterações fisiológicas que favorecem o desenvolvimento da planta pela produção de nutrientes essenciais ao desenvolvimento do vegetal como a fixação de nitrogênio, ou pela produção de fitormônios como o ácido indol acético promotor do crescimento vegetal (AZEVEDO, 1999; SURETTE, *et al*. 2003). Rudgers *et al*. (2004) realizaram estudos sobre as modificações da relação produtividade/diversidade em culturas colonizadas por endófitos, onde observaram que na ausência de microrganismos endofíticos, um aumento na diversidade de plantas de um determinado local poderá causar a redução da produtividade, ou, ainda, se houver aumento da produtividade em cultivares não colonizados por microrganismos endofíticos, poderá ocorrer redução na diversidade de plantas.

Há ainda a importância das substâncias produzidas por estes microrganismos, que protegem o vegetal do ataque de herbívoros, de fitopatógenos e de insetos (LACAVA, *et al*. 2004; SELOSSE, *et al*., 2004). Um exemplo desta atividade está nos fungos produtores de alcalóides. Wolfe, *et al*. (1998) relatam que fungos produtores de alcalóides promovem proteção contra a herbivoria ou estimulam à produção de substâncias tóxicas pela planta através da ativação de genes presentes no vegetal, um papel ecológico importante que permite a prevalência de determinada espécie vegetal em um habitat com consumidores em potencial. Um caso bem estudado é o do fungo endofítico do gênero *Neotypodium* produtor de alcalóides que protegem a planta pelo seu efeito tóxico em herbívoros (STROBEL, 2002). A produção de alcalóides por fungos endofíticos também está relacionada à atividade nematicida e inseticida como relatada por Schulz; Boyle (2005).

Os microrganismos endofíticos induzem o aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos e da tolerância do hospedeiro a substâncias tóxicas presentes no solo como o alumínio (HALLMANN, *et al*., 1997; TAN; ZOU, 2001).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Os endófitos também são importantes para a proteção do vegetal contra os microrganismos fitopatógenos competindo com estes por nutrientes, por meio da produção de substâncias antagônicas ou induzindo a resistência do vegetal aos patógenos. Um exemplo desse tipo de relação é o *Streptomyces* sp. R-5, isolada de *Rhododendron* por Shimizu, *et al*. (2004), capaz de induzir resistência a doenças em cultura de tecidos vegetais.

Muitos endófitos estão relacionados à *taxa* patogênicos dos quais eles provavelmente surgiram. Em Rubiáceas, foram observadas linhagens mutantes de *Colletotrichum magna,* um patógeno causador da necrose nesses vegetais, infectando seus hospedeiros sem causar sintomas e protegendo-os contra outros patógenos, provavelmente pela indução de defesa da planta (SELOSSE, *et al.*, 2004).

Segundo Strobel (2002), além dos microrganismos endofíticos obterem nutrição e proteção da planta hospedeira, algumas substâncias químicas produzidas pelo vegetal são necessárias para que o endofítico complete o seu ciclo de vida, bem como alguns metabólitos da planta podem servir como reguladores para a produção de produtos do metabolismo secundário dos endófitos. A interação metabólica do microrganismo endofítico com o hospedeiro pode favorecer a síntese de metabólitos secundários biologicamente ativos como os isoprenóides, policetídeos, esteróides, xantonas, quinonas e fenóis (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Evidências da associação entre vegetais e microrganismos têm sido observadas em tecidos fossilizados de caules e folhas de vegetais superiores (STROBEL, 2002) levando a compreensão de que estas relações tenham começado a centenas de milhares de anos atrás. Para Faeth (2002), comunidades endofíticas vêm sendo mantidas devido a combinações genotípicas com o hospedeiro por meio de pressões seletivas como competição, herbivoria e fatores abióticos. Como resultado desta associação é possível imaginar que alguns destes microrganismos endofíticos puderam dividir sistemas genéticos através da transferência de genes ao longo de milhares de anos (STIERLE, *et al*., 1993; STROBEL, *et al*., 1999; SULLIVAN; FAETH, 2004).

Enquanto alguns microrganismos podem se tornar endofíticos de forma acidental ou oportunista, outros se relacionam com seus hospedeiros em uma

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

interação que representa especificamente preferência ou exclusividade. Deverá haver uma adaptação do hospedeiro ao endófito e vice-versa. Entre os micrirganismos endofíticos de um hospedeiro em particular geralmente estão incluídos uma grande quantidade de espécies que estão adaptados àquele vegetal, como as espécies de *Lophodermium* que são isolados com alta freqüência de folhagens de *Pinus strobus* (DECKERT *et al*., 2001).

Em trabalhos com a inoculação de endofíticos de *Phaseolus vulgaris* em plantas não-hospedeiras, Schulz *et al.* (2003) observaram que nas raízes de *P. vulgaris* a taxa de inoculação foi maior do que nas raízes das plantas não-hospedeiras. Além disso, todas as plantas não-hospedeiras depois de inoculadas com os endófitos de *P. vulgaris* desenvolveram sintomas de doenças.

Peters, *et al*. (1998) observaram a interação do endófito com o hospedeiro por meio de metabólitos secundários liberados em culturas de *callus* do hospedeiro, resultando em uma resposta positiva no crescimento dos *callus* ou no aumento da biomassa. Neste trabalho, foi utilizada também uma cultura de *callus* de uma planta não-hospedeira onde os metabólitos do endófito não causaram estímulo positivo ao crescimento nem ao aumento da biomassa. A partir desses resultados, Peters, *et al*. (1998) concluíram que a interação que ocorre entre endófito-hospedeiro não é mera coincidência causada por um oportunista acidental em seu hospedeiro e sim o resultado de uma adaptação ao longo da evolução entre endófito-planta sinalizando especificidade nas relações.

Tan; Zou (2001) relatam que tanto o endófito quanto o hospedeiro excretam metabólitos tóxicos um para o outro, como alguns fungos endofíticos que produzem metabólitos secundários com atividade herbicida. Diante desta observação, surge a dúvida sobre como fungos endofíticos sintetizam metabólitos com potencial toxicidade para seus hospedeiros, já que até então os relatos nos indicam uma associação benéfica entre endófito-planta. Para Peters, *et al*. (1998), esta relação é um antagonismo mútuo, pois em pesquisa com culturas de *callus* de plantas hospedeiras e culturas de seus respectivos microrganismos endofíticos, observou-se que estes microrganismos excretam metabólitos herbicidas não-específicos causando necrose, inibição do crescimento e morte da cultura de *callus* do hospedeiro. Enquanto que no cultivo de *callus* observou a excreção de metabólitos

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

antifúngicos não-específicos. Estes resultados levam alguns pesquisadores como Schulz, *et al*. (1999), defenderem a hipótese de que a interação endofítico-hospedeiro pode ser um antagonismo patógeno-hospedeiro balanceado.

2.2 – MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E A DESCOBERTA DE NOVOS METABÓLITOS BIOATIVOS

Para a maioria dos microbiologistas, os metabólitos secundários desempenham um papel *in vivo* que pode ser importante para numerosas interações metabólicas entre fungos e seus hospedeiros, tais como sinalização, defesa e regulação da simbiose (SCHULZ; BOYLE, 2005). Entretanto, os metabólitos secundários de microrganismos endofíticos têm sido frequentemente isolados e caracterizados visando sua aplicação biotecnológica (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ, *et al*., 2002; STROBEL, 2003).

Tan; Zou (2001) revisaram a diversidade de metabólitos de varias classes de compostos que têm sido isolados de fungos endofíticos. Da classe dos alcalóides, a phomopsicalasina é uma citocatalisina extraída da cultura do fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado da planta *Salix gracilostyla*, que apresenta atividade contra *S. aureus*, *B. subtillis*, *Salmonella gallinarum* e *C. albicans*.

Alguns derivados de alcalóides indóis produzidos pelos fungos endofíticos *Neotyphodium lolli* e *Epichloë festucae* isolados das plantas *Lollium perene* e *Festuca* spp. apresentam atividade contra mamíferos e insetos herbívoros, da mesma forma que o inseticida rugulosina, do grupo das quinonas produzido por *Hormonema dematioides*, fungo endofítico do bálsamo (*Larix laricina*).

Dois novos esteróides extraídos do líquido fermentado de *Colletotrichum* sp. fungo endofítico isolado de *Artemisia annua*, apresentam atividade antifúngica contra alguns patógenos de culturas de arroz, aveia e trigo (TAN; ZOU, 2001).

Metabólitos promotores do crescimento de vegetal como novos derivados do ácido indol acético são extraídos de culturas de fungos como *Hypoxylon serpens* isolado do Tabaco.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Da classe dos diterpenóides, podem ser citados o subglutinol A e B que são substâncias com atividade imunossupressora produzida pelo fungo *Fusarium subglutinans*, um endófito da planta *Tripterygium wilfordii*. Este composto não apresenta toxicidade e portanto há grandes perspectivas quanto ao seu uso clínico.

Schulz, *et al*. (2002) relatam que 80% dos fungos endofíticos isolados, produzem compostos biologicamente ativos em testes de atividade contra bactérias e fungos, além de apresentarem atividade herbicida. Segundo Schulz, *et al*. (2002), a proporção de novas estruturas sintetizadas por endofíticos (51%) é maior que a produzida por microrganismos isolados do solo (38%), demonstrando que os endofíticos são realmente uma boa fonte de novos metabólitos secundários.

Miller, *et al*. (1998) isolaram a bactéria endofítica *Pseudomonas viridiflava* das folhas de várias espécies de gramíneas, capaz de produzir ecomicina, um composto da família dos lipopeptídeos que atua contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*.

Schulz, *et al*. (1999) realizaram uma triagem dos metabólitos secundários com atividade algicida, antimicrobiana e herbicida de fungos endofíticos isolados de aproximadamente 1250 plantas (árvores coníferas e plantas herbáceas) da Alemanha, obtendo atividade em 78% dos microrganismos testados, resultados até então inéditos na literatura.

A busca por novos microrganismos endofíticos e seus produtos secundários em geral, está direcionada a plantas que comumente servem a populações nativas como produtos medicinais alternativos. Os microrganismos dessas plantas podem produzir os mesmos produtos naturais bioativos, ou derivados que às vezes são mais ativos que aqueles dos seus hospedeiros (STROBEL, 2002).

O interesse pelo potencial dos endófitos para a produção de novos fármacos pode ser ilustrado pelo exemplo do taxol. Esta substância extraída da árvore conífera *Taxus brevifolia* é caracterizada como um composto do grupo dos diterpenóides, utilizado como medicamento no combate ao câncer de mama e de útero. Stierle, *et al.* (1993) isolaram de *Taxus brevifolia,* o fungo *Taxomyces andreanea* endofítico capaz de sintetizar o taxol como forma de proteção do vegetal contra fungos fitopatogênicos. Li, *et al*. (1996) observaram que o taxol também é produzido por *Pestalotiopsis microspora*, fungo endofítico isolado do pinheiro

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

cipreste. Esta descoberta indica grande vantagem na solução de problemas ecológicos, além de possibilitar a produção de compostos com mais rapidez e em maior quantidade (STROBEL; LONG,1998).

A biodiversidade de plantas com propriedades medicinais conhecidas e outras tantas das quais se desconhece os efeitos terapêuticos, abrigam um grande número de microrganismos com potencial para produzir substâncias bioativas, indicando que pesquisas envolvendo o isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos, constituem uma fonte inesgotável de novos metabólitos bioativos.

2.2.1 – Fungos endofíticos produtores de antibióticos

Considerando que seis entre 20 dos medicamentos mais comumente prescritos são de origem fúngica e apenas aproximadamente 5% dos fungos da natureza foram descritos, estes microrganismos oferecem um enorme potencial para a descoberta de novos medicamentos. Segundo Ganley, *et al*. (2004), a diversidade global de fungos endofíticos pode estar em torno de 1 milhão de espécies ou quatro endofíticos para cada espécie vegetal uma vez que existem 250.000 espécies de plantas.

De acordo com Tyler (1998), cerca de 85% dos antibióticos utilizados mundialmente são produzidos por actinobactérias, 11% por fungos e 4% por outras bactérias. Entretanto, mais de 70% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos são inéditas (SCHULZ, *et al*., 2002; STROBEL, 2003). Para Strobel, *et al*. (2004), os fungos endofíticos são os microrganismos mais comumente isolados e se apresentam como uma fonte de novos agentes bioativos naturais, embora ainda sejam poucos os estudos realizados nesta área (HUANG, *et al*. 2001; WIYAKRUTTA, *et al*., 2004).

Strobel, *et al*. (1999) demonstraram que o fungo endofítico *Cryptoriopsis quercina* isolado de *Tripterigeum wilfordii* uma planta medicinal nativa da Eurásia, produz uma substância denominada criptocandina que apresenta atividade contra *Candida albicans* e *Trichophyton* spp.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Rodrigues, *et al*. (2000) isolaram fungos endofíticos de *Spondias mombin*, com produção de substâncias ainda não caracterizadas, que inibem bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e actinombactérias. Wagenaar, *et al*. (2000) isolaram fungos endofíticos do gênero *Rhinocladiella* que produzem compostos denominados citocatalisinas com atividade antimicrobiana. Brady; Clardy (2000) isolaram a substância CR377, um pentacetídeo com atividade antifúngica, produzido pelo fungo endofítico *Fusarium* sp. isolado de *Selaginella pallescens*.

Huang, *et al*. (2001) observaram que fungos endofíticos do gênero *Paecilomyces* isolados de *Taxus marei, Cephalotaxus fortunei e Torrea grandis*, apresentam grande atividade antifúngica no teste de seus fermentados.

Ezra; Strobel (2003) descreveram o fungo endofítico *Muscodor albus*, isolado de *Cinnamomum zeylanicum* que inibe e mata outros fungos e bactérias pela emissão de compostos voláteis com propriedades antibióticas. Kim, *et al*. (2004) observaram a atividade antibacteriana das substâncias periconicina A e B produzida por *Periconia* sp. fungo isolado de *Taxus cuspidata*. Já Ma, *et al*. (2004) isolaram de *Cynodon dactylon,* planta utilizada na medicina chinesa, o fungo endofítico *Rhizoctonia* sp. o qual produz ácido rizoctônico que apresenta atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pilori*.

Tian, *et al*. (2004), isolaram de folhas e raízes do arroz, fungos e actinbactérias endofíticos, capazes de inibir microrganismos fitopatogênicos comuns em plantações de arroz no sul da China, como *Rhizoctonia solani*, *Xanthomonas oryzae*, *Fusarium moniliforme* e *Magnaporthe grisea*. Neste trabalho, mais de 50% dos isolados apresentaram atividade contra os microrganismos testados. Além disso, observou-se que plantas de onde foram isolados os fungos *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*, apresentam resistência maior a doenças causadas por fitopatógenos; das actinobactérias isoladas, cerca das 50% apresentaram antagonismo contra estes fitopatógenos.

Singh, *et al*. (2001) caracterizaram um novo diterpenóide produzido por fungo endofítico ainda não identificado, isolado de *Daphnopsis americana* que apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus* resistentes a meticilina e *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Enquanto Liu, *et al*. (2001), obervaram a atividade antifúngica de um pentacetídeo produzido pelo endofítico

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Fusarium sp. isolado de *Selaginella pallescens*. Em *Artemisia anua*, o mesmo autor obteve 39 isolados de fungos, alguns destes, potentes inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos, sendo portanto um potencial para aplicação em controle biológico.

2.2.2 – Actinobactérias endofíticas produtoras de antibióticos

As Actinobactérias compreendem um grupo de bactérias filamentosas que apresentam hifas semelhantes aos fungos. Estão amplamente difundidos na natureza principalmente no solo onde são ativos na decomposição de tecidos vegetais e reciclagem do Carbono e Nitrogênio (MADIGAN, *et al*., 2004), e são também conhecidas por desempenharem um papel importante como biocontroladores de fungos fitopatogênicos (TAECHOVISAN, *et al*., 2003).

Até os anos 90, as actinobactérias do solo foram uma fonte importantíssima de compostos bioativos como agentes antitumorais, antibióticos, antivirais e substâncias agrobiológicas (SANGLIER, *et al*., 1993). Além disso, desempenham um papel significante para o futuro da Biotecnologia por que são importantes produtores de vitaminas e enzimas. Segundo Sanglier, *et al*. (1993), entre 1988 e 1992 mais de cem novas moléculas originárias de actinobactérias foram descobertas. Aproximadamente 75% destas substâncias são produzidas pelo gênero *Streptomyces*. Cerca de 5.000 compostos bioativos documentados são conhecidos como sendo produzidos por este gênero (DEMAIN, 1999).

Pullen, *et al*. (2002) isolaram *Streptomyces* (MaB.QuH-8) de plantas da família Celastraceae, que produz um novo cloropirrol com alta atividade contra uma série de bactérias multiresistentes e micobactérias. Taechowisan, *et al*. (2005) isolaram varias espécies de actinobactérias de *Zingiber officinale,* entre elas a linhagem *Streptomyces aureofaciens* (CMUAc130) – isolada da raiz – que apresenta atividade contra *Colletotrichum musae* e *Fusarium oxysporum*, através da produção dos compostos 5,7-dimetoxi-4-p-metoxifenilcumarina e 5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina.

As munumbicinas A, B, C e D, antibióticos de largo espectro inclusive para *Plasmodium falciparum* (mununbicina D), são produzidos pelo endofítico

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Streptomyces (NRRL 3052) isolado por Castillo, *et al*. (2002), de *Kenedia nigriscans*, planta medicinal utilizada por aborígines na Austrália. Já a linhagem de Streptomyces (NRRL 30566), isolada por Castillo, *et al*. (2003), das folhas de *Grevillea pteridifolia,* produz as cacadumicinas, antibióticos com atividade contra bactérias Gram-positivas particularmente *B. anthracis* e também contra *Plasmodium falciparum* (IC_{50} de 7.04 ± 0.12 ng ml^{-1}). Ezra, *et al*. (2004) observaram atividade contra *Cryptococcus neoformans* a partir da substância denominada coranamicina, antibiótico peptídeo produzido pela linhagem *Streptomyces* sp. (MSU-2110), endofítico isolado de *Monstera* sp, planta da Amazônia peruana. Esta substância apresentou também atividade contra o parasito da malária *Plasmodium falciparum* (IC_{50} de 9.0 ng ml^{-1}).

O antibiótico metilabonousina foi obtido a partir da fermentação de *Streptomyces albus*, endófito isolado da planta *Lolium perenne* (STROBEL, *et al*., 2004). Pesquisas realizadas por Shimizu, *et al*. (2004), mostraram a produção dos antibióticos actinomicina X_2 e fungicromina por *Streptomyces* R-5, endofítico isolado de *Rhododendron*. Sacramento, *et al*. (2004), em trabalho realizado com plantas da floresta tropical brasileira, isolaram actinobactérias do gênero *Streptomyces* capazes de produzir substâncias com atividade antiviral e antimicrobiana que apresentaram MIC de 20 μg/ml contra *Pythium ultimum* e 2μg/ml contra *Streptococcus pneumoniae*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

2.3 – *CONYZA BONARIENSIS* (**L.**) **CRONQUIST**

A espécie *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist** antes denominada *Erigeron bonariensis* L. é uma planta perene, amplamente difundida no Brasil. Tem porte herbáceo, pertence à Família Asteraceae e recebe várias denominações populares como: acatóia, capetiçoba, capiçoba, catiçoba, enxota, erva-lanceta, margaridinha-do-campo, rabo-de-foguete, **rabo-de-raposa**, salpeixinho e voadeira.

A infusão das partes aéreas desta planta é utilizada na medicina popular como anti-séptico e anti-espasmódico. Grupos quilombolas no Brasil utilizam a *C. bonariensis* como analgésico e anestésico (RODRIGUES; CARLINI, 2004).

Na medicina popular do Egito utiliza-se as inflorescências da planta como anti-espasmódico e diurético (EL-DARIER, *et al.*, 2001). Barbosa, *et al*. (2005) estudaram os componentes do óleo essencial deste vegetal verificando a presença de 29,6% de limoneno em suas folhas, enquanto Andrade, *et al*. (2000) observaram a presença de (E)-β-Farneseno ao qual foi atribuída atividade terapêutica contra febre em banhos com as folhas deste vegetal.

Alguns trabalhos apontam o uso desta planta como vermífugo e no tratamento de hemorróidas e da diarréia (TZAKOU, *et al*., 2005). Esta planta tem em seus compostos, efetivo poder antifúngico especialmente contra as micoses causadas por *Malassezia fufur* (agente causador do pano branco). Arora, *et al*. (2003) observaram a atividade antifúngica desta espécie contra fitopatógenos. Já Macedo, *et al*. (1997) estudaram a atividade larvicida contra *Aedes fluviatilis* dos extratos das partes aéreas desta planta e Mendes, *et al*. (1999) relatam a sua atividade moluscicida.

Esta espécie atualmente está entre as plantas que fazem parte do programa de “Remédios alternativos” do Laboratório de Fitoterapia do Estado de Pernambuco, e é comercializada na forma de tinturas com indicação antifúngica (EBAPE/IPA).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

OBJETIVOS

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Isolar e a avaliar o potencial antimicrobiano dos fungos e actinobactérias endofíticos da planta *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist** (rabo-de-raposa).

3.2. – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolamento de microrganismos endofíticos de folhas e raízes de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**;

Avaliação preliminar (“Triagem”) dos fungos e actinobactérias endofíticos com atividade antimicrobiana;

Avaliação da atividade antimicrobiana dos microrganismos endofíticos bioativos em diferentes meios de fermentação para conhecer o tempo e o pH em que o antibiótico será produzido;

Identificação em nível de gênero por meio das características micromorfológicas e fenotípicas, dos fungos e actinobactérias que apresentaram melhor atividade antimicrobiana.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

MATERIAL E MÉTODOS

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – ISOLAMENTO DOS ENDOFÍTICOS

4.1.1 – Coleta

A coleta foi realizada em Novembro de 2004, em uma propriedade rural, situada no Km 38, às margens da Br 101-Norte que dá acesso ao município de Igarassu – PE. Foram coletadas aleatoriamente folhas e raízes de cinco indivíduos saudáveis. Todo material botânico foi etiquetado e armazenado em sacos plásticos sob refrigeração até a desinfecção. A planta foi identificada no Laboratório de fanerógamos do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco.

4.1.2. – Desinfecção

As folhas e raízes (Fig 4.1) coletadas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de microrganismos epifíticos e de resíduos de solo e poeira. Após a lavagem o material foi seco em papel absorvente e submetido ao tratamento em etanol a 70% v/v por um minuto, hipoclorito de sódio (3% v/v de Cl ativo) por cinco minutos (PEREIRA, *et al*., 1993; ARAÚJO, *et al*., 2002) e também por 15 minutos (UETANABARO, 2004), seguido de etanol 70% v/v por 30 segundos. Em seguida, o material foi lavado em água destilada esterilizada por duas vezes (Fig. 4.2). A última água de lavagem das folhas e raízes de cada indivíduo foi semeada em placas com os meios BDA e CAA e estas, incubadas a 30°C por sete dias para que fosse analisada a eficiência da técnica de desinfecção. Após a desinfecção, as bordas das folhas e extremidades das raízes foram retiradas com estilete esterilizado e em seguida foram feitos fragmentos de aproximadamente 5,0 mm^2 pelo método de Gamboa, *et al*. 2002.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Figura 4.1 Folhas (a) e raízes (b) de *Conyza bonariensis.*

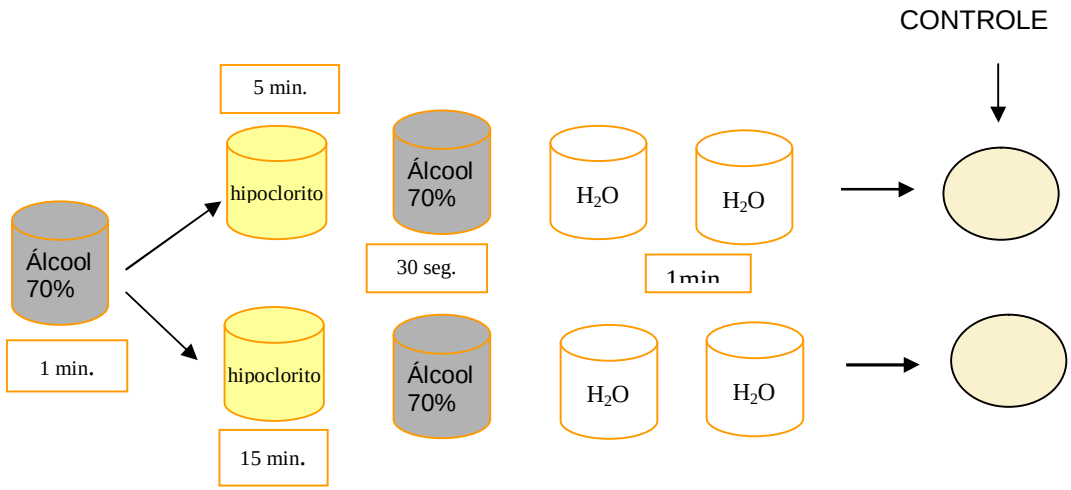

Figura 4.2 Esquema da desinfecção

4.1.3 – Isolamento

Os fragmentos foram inoculados em meio específico para fungos e actinobactérias, à temperatura de 30°C. Para o isolamento das actinobactérias foi utilizado o meio CAA - caseína-amido-agar (Anexos, item 10.1.3) onde foram adicionados os antifúngicos nistatina e ciclohexamida nas concentrações de 100□g/mL (Anexos, item 10.2.1.2). Para o isolamento dos fungos foi utilizado o meio BDA - batata-dextrose-ágar (Anexos, item 10.1.2) contendo os antibióticos

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

cloranfenicol e tetraciclina na concentração de 100□g/mL (Anexos, item 10.2.1.1). O tempo máximo de incubação foi de 30 dias.

A medida que as colônias dos endofíticos foram surgindo nos fragmentos (Fig.4.3), foram sendo transferidas para novas placas contendo os mesmos meios e submetidos ao processo de purificação por estrias de esgotamento (MADIGAN *et al*., 2004).

A freqüência dos microrganismos foi determinada segundo a metodologia descrita por Araújo, *et al*. (2002), onde $F = \frac{\text{Nº de fragmentos}}{\text{Nº. total de fragmentos}} \times 100$

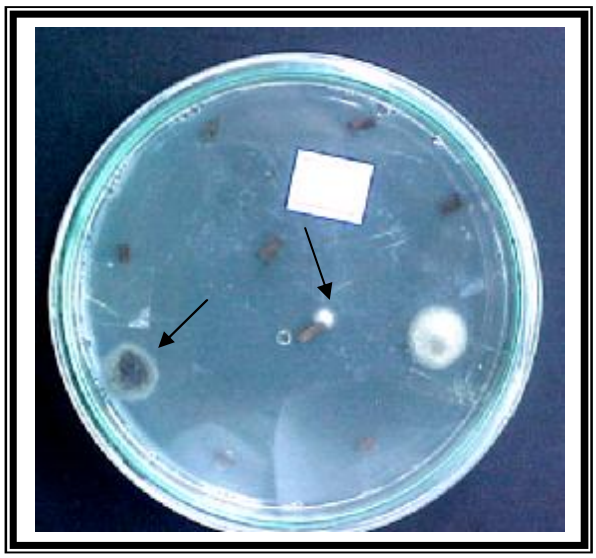

Figura 4.3 Bactérias endofíticas surgindo de fragmentos de folhas de *C. bonariensis*

4.2 – PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Após a purificação, as culturas de bactérias foram transferidas para tubos tipo penicilina contendo meio TSA – Triptic Soy Agar (Anexos, item 10.1.13) inclinado e cobertas com óleo mineral esterilizado, lacrados e armazenados a temperatura ambiente (± 30°C). Quanto aos fungos, estes além de serem mantidos em duplicata em tubos com meio BDA sob refrigeração, também foram preservados pelo método

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

de Castellani (ARAÚJO, *et al*., 2002), que consiste na transferência de blocos de meio BDA onde os fungos foram cultivados, para frascos tipo penicilina com água destilada estéril e armazenados a temperatura ambiente (±30°C), em duplicata.

4.3 – TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.1 – Microrganismos-teste

Foram utilizadas leveduras causadoras de micoses oportunistas e de micoses superficiais como *Candida* e *Malassezia* respectivamente. Além destas, foram acrescentadas aos testes, bactérias que pudessem representar os grupos de Gram positivas, Gram negativas e micobactérias (Tabela 2).

Tabela 2. Relação dos microrganismos utilizados nos testes de atividade antimicrobiana

Microrganismos	Nº de registro	Meio de cultivo†
Staphylococcus aureus	UFPEDA 02*	AN
Bacillus subtilis	UFPEDA 16*	AN
Escherichia coli	UFPEDA 224*	AN
Mycobacterium tuberculosis	UFPEDA 82*	TSA
Candida albicans	UFPEDA 1007*	SAB
Candida sp.	URM 720**	SAB
Candida sp.	URM 4224**	SAB
Candida sp.	URM 4249**	SAB
Malassezia furfur	URM 4503**	SAB + YE + O
Malassezia furfur	URM 4849**	SAB + YE + O
Malassezia simpodialis	URM 4498**	SAB + YE + O
Malassezia simpodialis	URM 4499**	SAB + YE + O

† As composições dos meios de cultura encontram-se em Anexos, item 10.1.1.

*Coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco **Coleção de fungos do Departamento de Micologia da Universidade do Recife – UFPE.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.3.2 – Teste primário em “bloco de gelose”

Neste teste descrito por Ichikawa *et al*., (1971), 0,5 ml das suspensões dos microrganismos endofíticos foram espalhadas com alça de Drigalski sobre placas contendo meio BDA para os fungos e meio ISP-2 para as actinobactérias, seguindo-se a incubação por sete dias a 30°C para a formação do tapete. Após este período, foram retirados blocos de 6 mm de diâmetro com o auxílio de furador de rolha. Estes blocos foram transferidos para placas semeadas com 0,1 ml da suspensão de cada microrganismo-teste, com turbidez igual ao da escala 0,5 de Mcfarland e em seguida incubadas a 30°C e 37°C (leveduras e bactérias respectivamente) por 24 a 48 horas. Após este período os halos de inibição quando observados, foram medidos em mm. Neste teste foram realizadas três repetições. A figura 4.4 representa o esquema do teste em “bloco de gelose”.

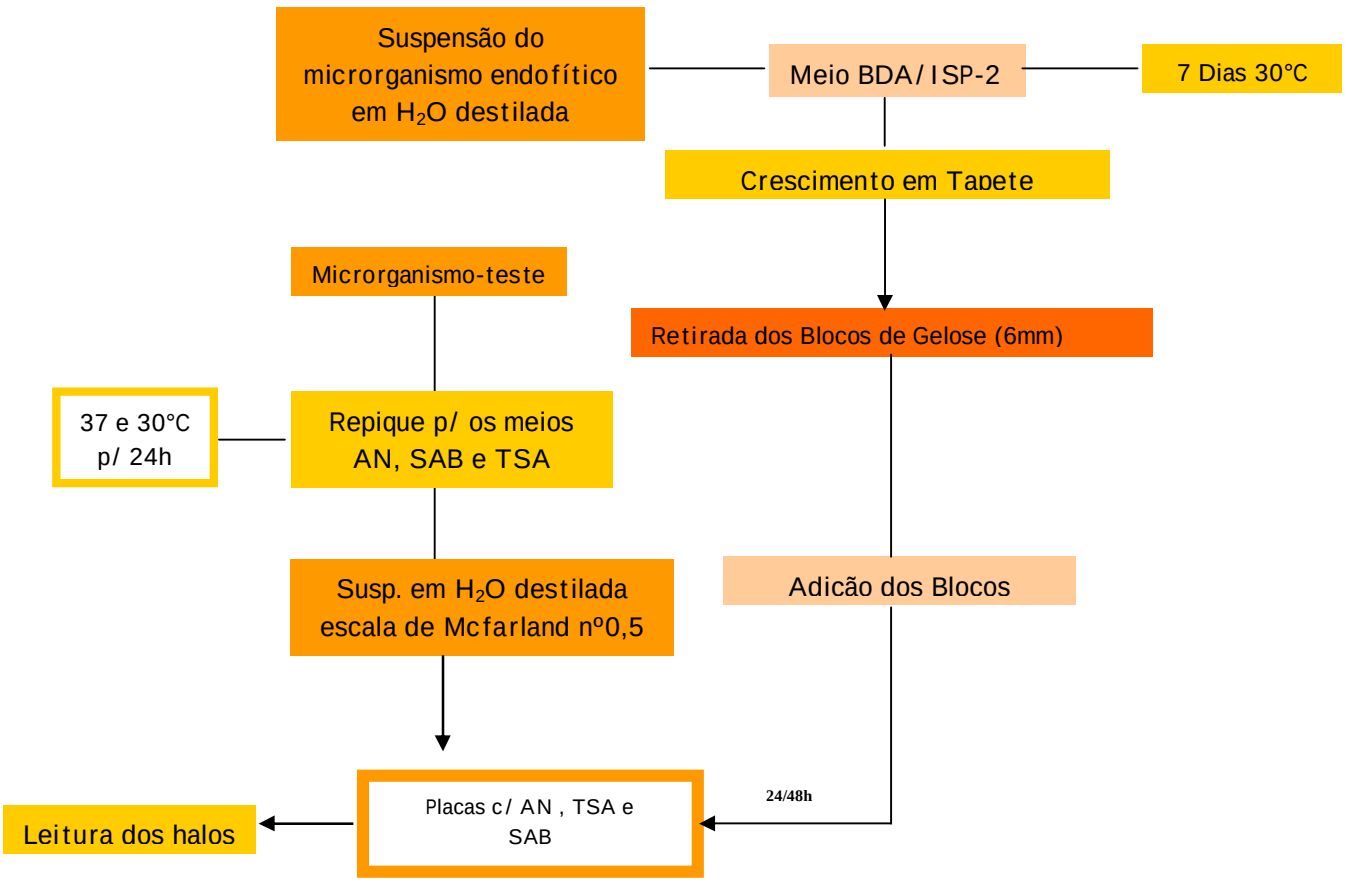

Figura 4.4 Esquema do ensaio antimicrobiano em ”bloco de gelose”.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.3.3 – Seleção do meio de fermentação

Nesta etapa, as linhagens de fungos e actinobactérias que apresentaram melhor atividade contra os microrganismos-teste no ensaio primário foram cultivados em diferentes meios líquidos de fermentação para que fossem selecionados os melhores produtores de metabólitos bioativos, pelo teste de difusão em disco, determinando assim o melhor meio e o melhor tempo para a produção do antibiótico.

4.3.3.1 – Pré-inóculo

Foram inoculados três blocos de gelose do endófito em Erlenmeyer de 250 ml contendo 50mL de meio líquido. Para os fungos foi utilizado o meio BD – Batata-dextrose (Anexos, item 10.1.2) e para as actinobactérias utilizou-se o meio ISP-2 (Anexos, item 10.1.6). Estes foram mantidos sob agitação de 180 rpm durante 48 horas a temperatura de 28°C $^{+}_{-}$ 2°C.

4.3.3.2 – Fermentação

Foram utilizados três meios de cultura diferentes para a fermentação. Os fungos foram fermentados em meio BD, MPE – Meio para Produção de Eurimicina (Anexos, item 10.1.10) e CZAPECK (Anexos, item 10.1.4). Para a actinobacteria foram utilizados os meios ISP-2, ISP-3 (Anexos, item 10.1.7) e MPE. Nesta etapa, foram inoculados 10% do volume do pré-inóculo em Erlenmeyers contendo 50 mL dos meios selecionados. As condições de cultivo utilizadas para o pré-inóculo foram mantidas na fermentação. O tempo de fermentação variou de 24 a 168 horas.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.3.3.3. – Atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em disco

Para o teste de atividade do líquido metabólico, a cada 24 horas uma alíquota do fermentado foi coletada e transferida para eppendorfs, centrifugou-se por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi separado da massa celular e o pH do líquido aferido. Discos de papel de 6 mm de diâmetro foram embebidos em 20 µL do líquido fermentado e depois de secos colocados na superfície de meios semeados com os microrganismos-teste (BAUER, *et al*., 1966) de forma semelhante ao teste em "bloco de Gelose". As placas foram incubadas a 30°C (leveduras) e 37°C (bactérias), por 24 e 48 horas, seguida da leitura dos halos de inibição. A figura 4.5 apresenta o esquema utilizado neste processo, que foi realizado em triplicata.

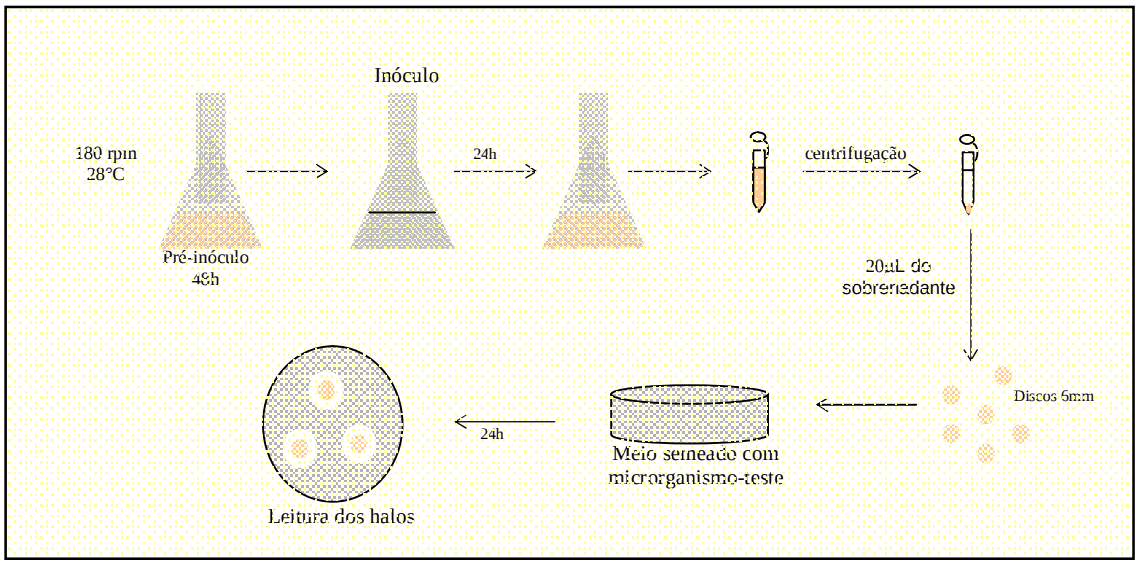

Figura 4.5 Esquema do teste de difusão em disco.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

4.4 – IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Os fungos que apresentaram melhor atividade no teste de “difusão em ágar” foram identificados com base em suas características macro e micromorfológicas das estruturas vegetativas e reprodutivas, no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. A actinobactéria que apresentou melhor atividade foi identificada de acordo com as características micromorfológicas e estudo da parede celular (SHIRLING; GOTTLIEB, 1996; CROSS, 1994).

4.4.1 – Identificação da actinobactéria

4.4.1.1 – Micromorfologia

A linhagem foi cultivada nos meios sólidos ISP-1 (Anexos, item 10.1.5), ISP-2, ISP-3, ISP-4 (Anexos, item 10.1.8) e ISP-7 (Anexos, item 10.1.9) e incubada a 30°C por 21 dias, após este período foram observadas as características micromorfológicas como presença ou ausência de cadeias de esporos, forma da cadeia de esporos e a presença de esporângio. Além destas características observou-se a produção de pigmentos e a coloração do micélio aéreo e do substrato (SHIRLING; GOTTLIEB, 1996; CROSS, 1994; SHIMIZU, *et al.*, 2000).

4.4.1.2 – Caracterização da parede celular

A caracterização do tipo de parede celular da actinobactéria foi determinada pela identificação dos isômeros do ácido diaminopimélico (DAP), LL-DAP e *meso*-DAP, pelo método de Staneck; Roberts (1974).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

O microrganismo foi cultivado em meio ISP-2 a 30°C por 72 horas. Passado este período, a massa celular foi separada do líquido fermentado e então seca em estufa a 50°C por duas horas. Foram transferidos para um tubo rosqueado (10 x 90 mm), 30 mg da massa seca da actinobactéria, onde se adicionou 1,0 ml de solução de HCl 6N (Anexos, item 10.2.3.1). Em seguida foi levado à estufa com temperatura de 100°C por 16 horas para a hidrólise da parede celular. Após esta etapa, o material foi ressuspendido em 1ml de água destilada, filtrado e submetido a evaporação em rotaevaporador para a eliminação do ácido remanescente. Para isto sucessivas lavagens foram efetuadas. Após total eliminação do ácido, foi acrescentado ao material 0,1 ml de água destilada, seguida da realização da cromatografia em camada delgada (CCD).

A fase móvel foi composta por metanol-água-ácido clorídrico 6N - piridina (80:26:4:10, v/v) (Anexos, item 10.2.3.5) e a fase fixa por placas de celulose (Merck nº 5716). Na fase fixa foram aplicadas, lado a lado, 2 μL do padrão do DAP (Anexos, item 10.2.3.4), 2 μL do material de hidrólise da actinobactéria desconhecida e 2 μL do material de hidrólise de duas linhagens padrões: *Streptomyces* e *Nocardia*.

A cuba foi saturada por 2 horas e a corrida ocorreu por aproximadamente 5 horas. A placa foi seca em câmara e borrifada com uma solução de ninhidrina a 0,2% m/v (Anexos, item 10.2.3.3) esta foi aquecida por 5 minutos em estufa a 100°C e então foi observada a presença ou ausência dos isômeros de DAP (LL-DAP e *meso*-DAP).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – ISOLAMENTO

Foram isolados 53 fungos endofíticos (quatro leveduras e 49 fungos filamentosos) das cinco plantas analisadas de *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. Apesar de o isolamento ter ocorrido em um período de 30 dias, os fungos só emergiram dos fragmentos até o 16º dia de cultivo, onde foi observado que na primeira semana o número de fungos emergindo dos fragmentos de folhas foi maior que nos dias subseqüentes. Enquanto nos fragmentos das raízes, emergiu maior quantidade de fungos nas duas primeiras semanas, com picos de isolamento no 6º e 13º dias (Fig. 5.1). Este fato pode está relacionado com a oxidação rápida das folhas ocasionando a diminuição do número de isolados e do tempo de isolamento. O que também foi observado por Souza, *et al.* (2004) durante o isolamento de fungos endofíticos em *Palicourea longiflora* uma planta tóxica da Amazônia.

Foram isolados 30 fungos de fragmentos de folhas e 23 de fragmentos de raízes correspondendo às freqüências de 7,6% e 10% respectivamente (fig. 5.2). Os fungos foram agrupados por semelhança morfológica das colônias, obtendo-se assim, 15 diferentes morfotipos. Os antibióticos utilizados durante o isolamento apresentaram boa eficácia já que não foram isolados fungos dos fragmentos inoculados em meios seletivos para bactérias e vice-versa.

Souza, *et al*. (2004) isolaram de *Strychnos cogens* planta tóxica da Amazônia, um total de 59 fungos, onde a freqüência de fungos endofíticos nas folhas (66,6%) também foi maior do que nas raízes (15%). Huang, *et al*. (2001) obtiveram em meio BDA 107 fungos isolados de *Taxus mairei*, 30 de *Cephalataxus fortunei* e 35 de *Torreya grandis*. Liu *et al*. (2001) isolaram 39 fungos endofíticos de *Artemisia annua* e Castillo, *et al*. (2003), no isolamento de endofíticos de *Kennedia nigriscans*, obtiveram 24 fungos. Estes resultados mostram que o número de isolados de fungos endofíticos é variável de planta para planta em decorrência do procedimento de isolamento, espécie vegetal e da região climática.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

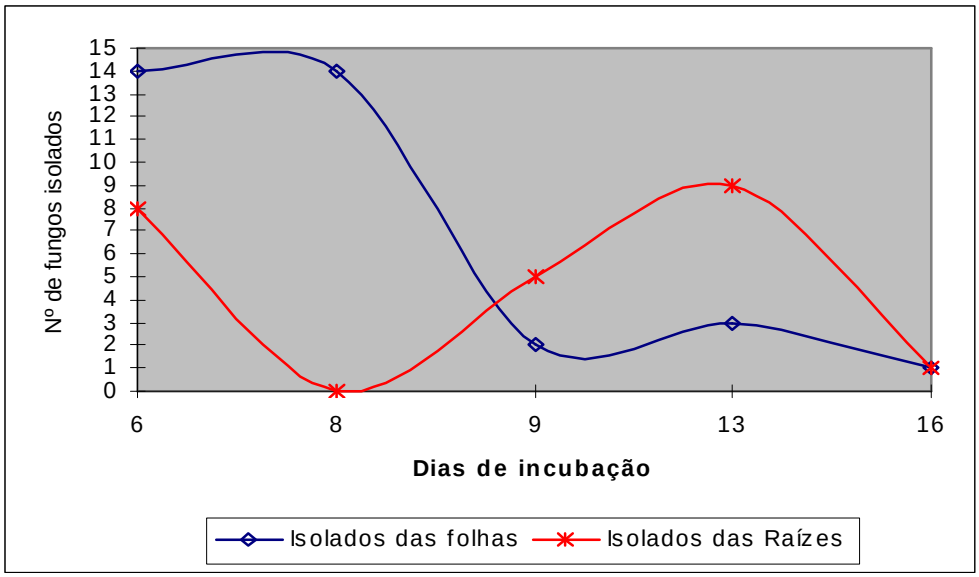

Figura 5.1: Curva de isolamento de fungos endofíticos das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. durante 16 dias de incubação.

As actinobactérias apareceram apenas nos fragmentos das raízes apresentando uma freqüência muito baixa (1,3%). Trabalhos que relatam o baixo número de actinobactérias endofíticas isoladas são freqüentes. Nos resultados obtidos por Maitan (1998), a freqüência de actinobactérias endofíticas foi 6,35% em macerado das folhas de *Solanum lycocarpum* uma planta do cerrado, popularmente conhecida como lobeira que apresenta propriedades medicinais. Entretanto, Araújo, *et al*. (2000) obtiveram resultados melhores com *Zea mays* de onde isolaram 53 actinobactérias, sendo 31 das folhas e 22 das raízes; Taechowisan, *et al.* (2003) no isolamento de actinobactérias de plantas da Tailândia encontraram uma freqüência de 18,6% nas folhas de *Amomum siamense* e de 21,3% nas folhas de *Alpinia galanga* enquanto Cao, *et al*. (2004) obtiveram 58 linhagens de actinobactérias isoladas de raízes de *Lycopersicon esculentum* (tomate). Freqüências maiores no isolamento de actinobactérias em algumas plantas podem estar relacionadas não apenas ao meio de cultura utilizado, mas também ao tipo de planta, ao período de coleta, e ao local. Lima (2006), obteve 21 linhagens de actinobactérias isoladas de *Momordica charantia*, planta popularmente conhecida como Melão-de-São Caetano, coletada do mesmo local que a *C. bonariensis*, e sob as mesma condições de

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

isolamento utilizadas neste trabalho; indicando portanto que a espécie vegetal tem grande influencia na ocorrência de microrganismos como as actinobactérias.

Quanto às bactérias, apesar de não terem sido o alvo principal deste trabalho, foram consideradas devido ao número expressivo de isolados. Como pode ser observado na figura 5.2, houve maior freqüência de bactérias nas raízes (16,33%) que nas folhas (7%). As bactérias foram purificadas e transferidas para tubos tipo penicilina contendo meio TSA e preservadas sob óleo mineral para possíveis trabalhos no futuro.

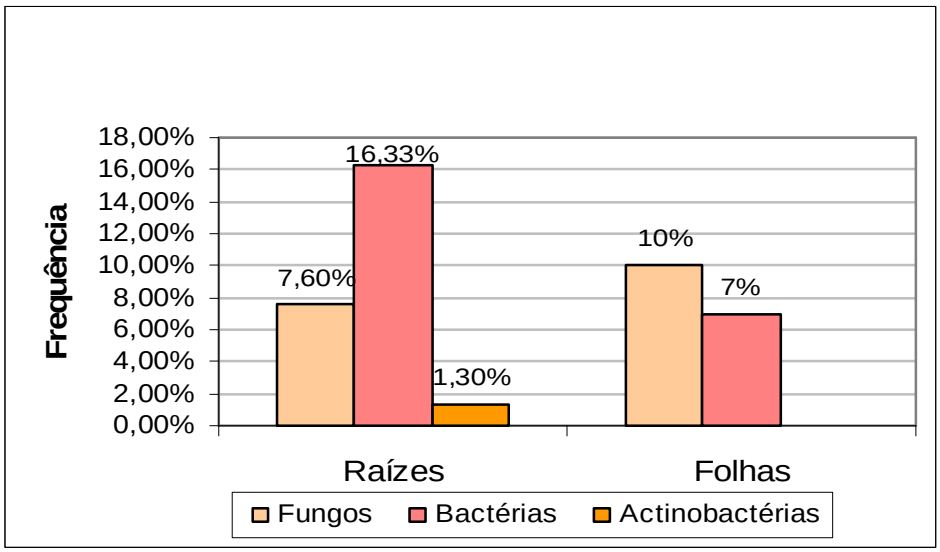

Figura 5.2**:** Freqüência dos microrganismos endofíticos isolados das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L.**) **Cronquist**.

Não houve diferença significativa na ocorrência de bactérias entre os tempos de desinfecção com hipoclorito por cinco e 15 minutos nas folhas, entretanto nas raízes o número de bactérias com a desinfecção por cinco minutos foi 45% maior que na desinfecção por 15 minutos (Figuras 5.3 e 5.4). Para as actinobactérias o maior tempo de desinfecção (15 min.) não foi eficiente neste isolamento com os meios utilizados, uma vez que apenas uma linhagem da raiz foi isolada por este tratamento. Já Uetanabaro (2004) observou que a desinfecção por 15 minutos de tecidos de *Tocoyema formosa*, que no cerrado brasileiro é popularmente conhecida como Marmelo preto, contribuiu para o isolamento de 47 actinobactérias do gênero *Microbispora*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

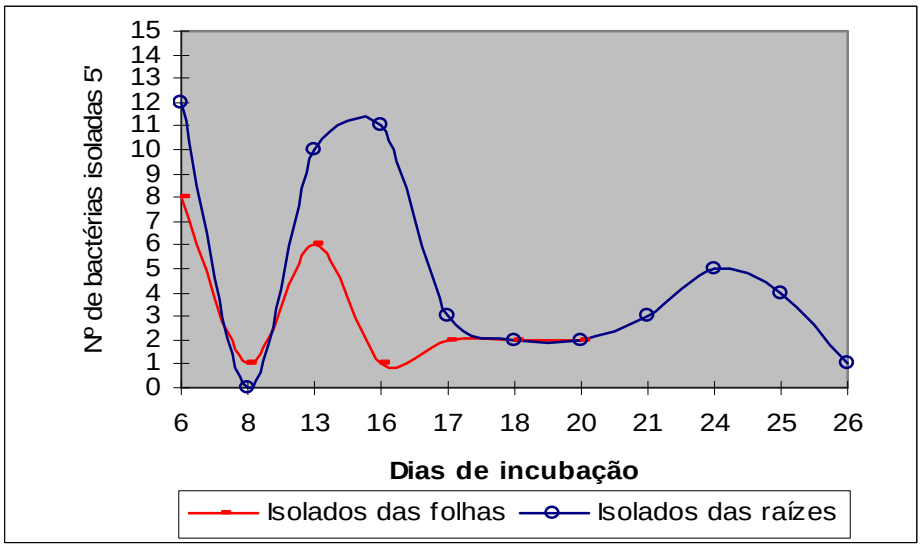

Figura 5.3: Curva de isolamento de bactérias endofíticas das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L.**) **Cronquist**., após tratamento por cinco minutos com hipoclorito durante 26 dias de incubação.

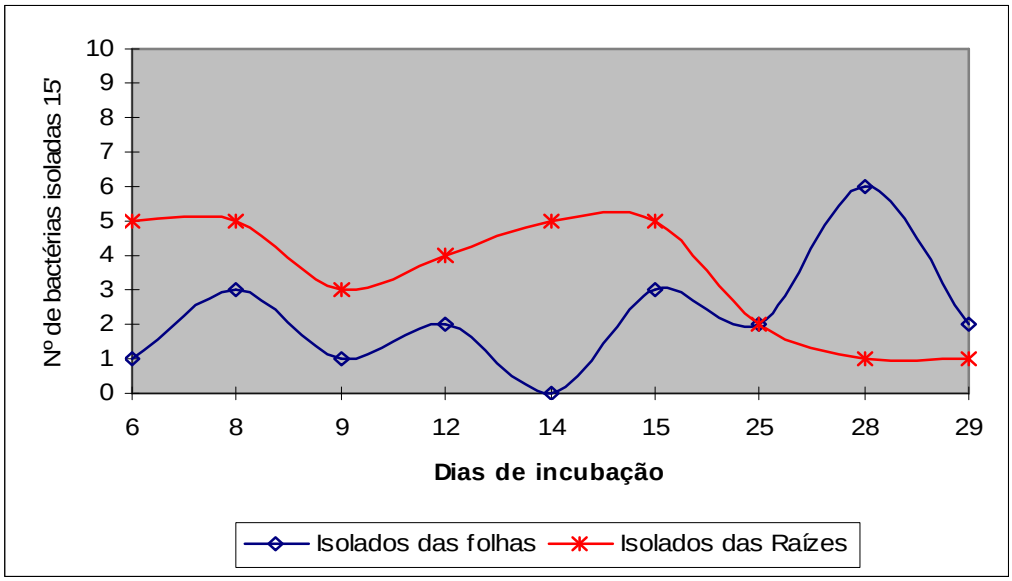

Figura 5.4: Curva de isolamento de bactérias endofíticas das folhas e raízes de *C. bonariensis* (**L.**) **Cronquist**., após tratamento por quinze minutos com hipoclorito durante 26 dias de incubação

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

5.2 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.2.1 – Teste de atividade em “bloco de gelose”

Este teste permitiu selecionar os microrganismos que apresentaram halos de inibição contra os microrganismos-teste utilizados. Dos 49 fungos endofíticos ensaiados, 28 apresentaram atividade contra pelo menos um dos microrganismos-teste.

Na figura 5.5 pode ser observada a atividade dos fungos endofíticos provenientes das folhas que apresentaram halos de inibição variando entre nove e 26 mm. A linhagem Eb3F apresentou o melhor espectro de ação uma vez que inibiu nove dos 12 microrganismos-teste, entre eles as duas espécies de Malassezias (*M. furfur* e *M. simpodialis*). As linhagens Eb27F, Eb20F, Eb22FB e Eb18FB, apresentaram atividade para apenas um dos microrganismos. Destas, apenas a linhagem Eb22FB apresentou halo de inibição (10 mm) para *E. coli* (224) e nenhuma atividade para os demais microrganismos utilizados. Talvez a ação do antibiótico desta linhagem seja apenas contra bactérias gram-negativas, sendo portanto necessários testes com outras bactérias deste grupo. A linhagem Eb26F apresentou atividade contra *Malassezia* spp. com halos de inibição de 20 mm, e para *M. tuberculosis* apresentou halo de 12 mm, inferior ao da linhagem Eb5F, que foi de 14 mm.

Os resultados apresentados na figura 5.6 mostram que dos 23 fungos endofíticos isolados das raízes, 16 apresentaram atividade antimicrobiana. Dentre eles cinco (EbR75, EbR78, EbR73, EbR79 e EbR77) apresentaram atividade para pelo menos um dos microrganismos-teste, enquanto nove linhagens (EbR67, EbR80, EbR78, EbR27, EbR33, EbR67, EbR79, EbR84, EbR83) apresentaram atividade contra *M. tuberculosis*, podendo ser destacada à linhagem EbR78 com halo de inibição de 19 mm. Foi observado que as linhagens EbR33 e EbR83 apresentaram boa atividade para todos os microrganismos exceto para *E. coli*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Das quatro actinobactérias testadas, a linhagem EbR49A apresentou halos de inibição variando de 10 a 22 mm contra 11 dos 12 microrganismos testados (Figura. 5.7), enquanto que as linhagens EbR63 e EbR64 apresentaram atividade apenas contra *B. subtilis*. A linhagem EbR48 não apresentou atividade antimicrobiana. A figura 5.8 ilustra os resultados obtidos neste ensaio. As tabelas que deram origem aos gráficos a seguir (Figuras 5.5, 5.6 e 5.7), estão no apêndice, item 9.

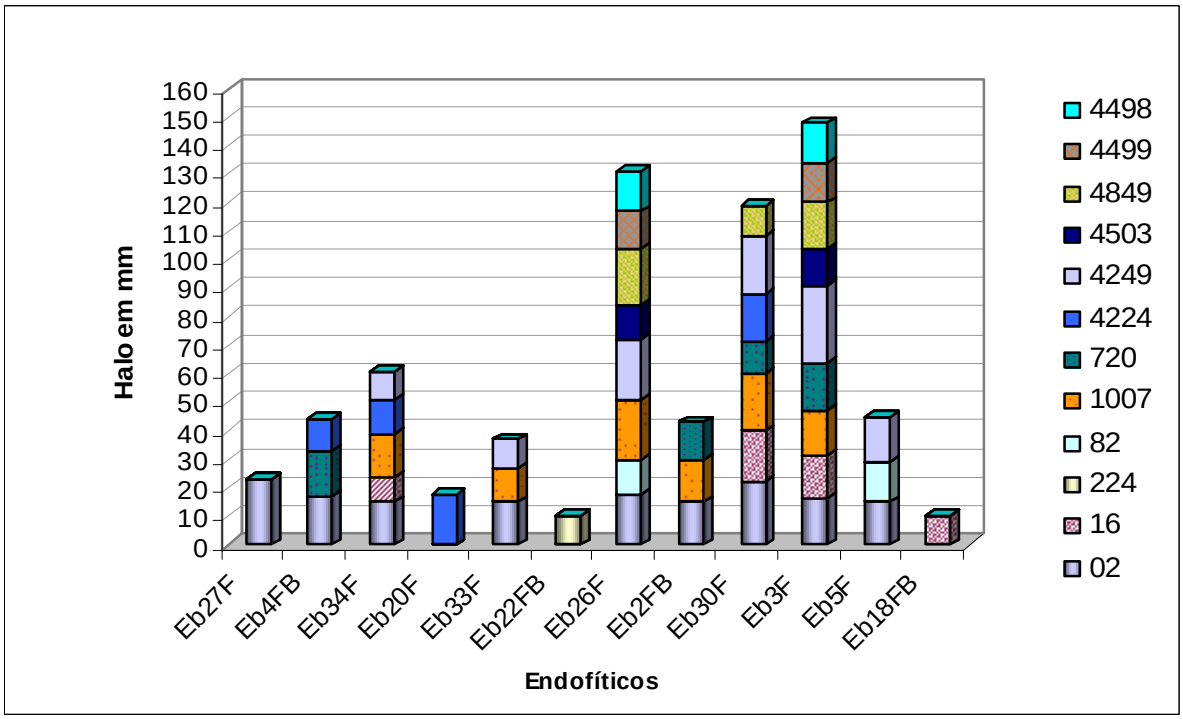

Figura 5.5: Diâmetro dos halos de inibição dos fungos endofíticos das folhas de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

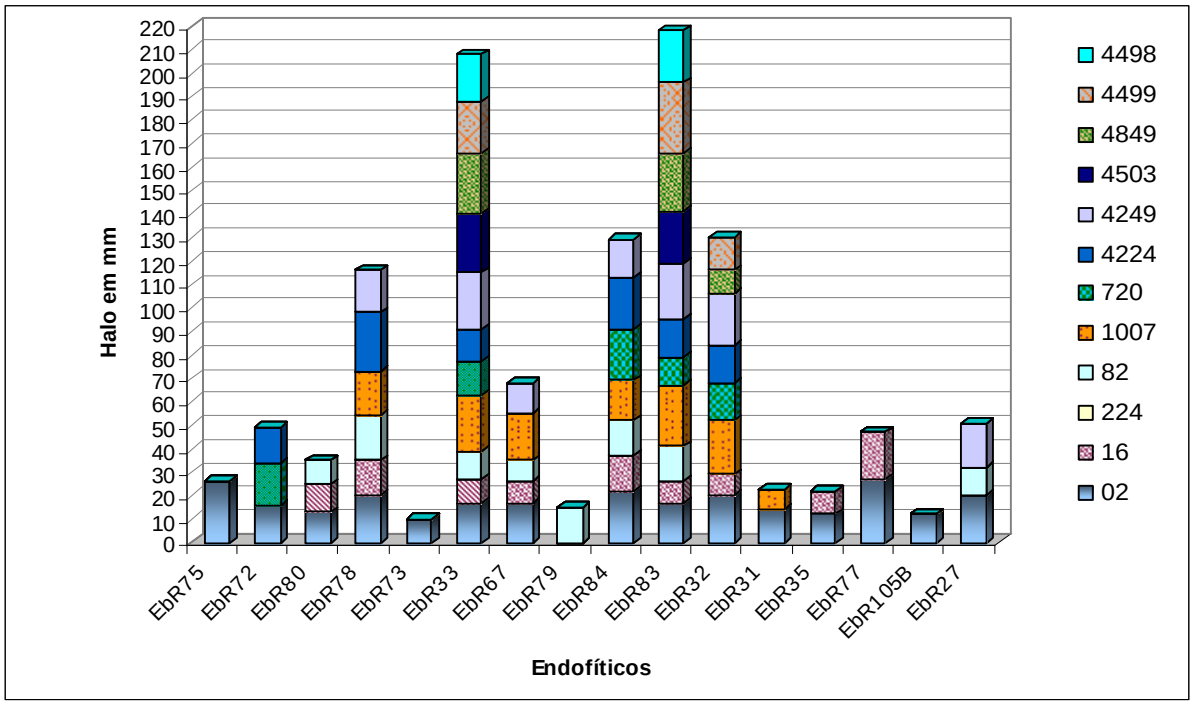

Figura 5.6: Diâmetro dos halos de inibição dos fungos endofíticos das raízes de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. contra os microrganismos testados.

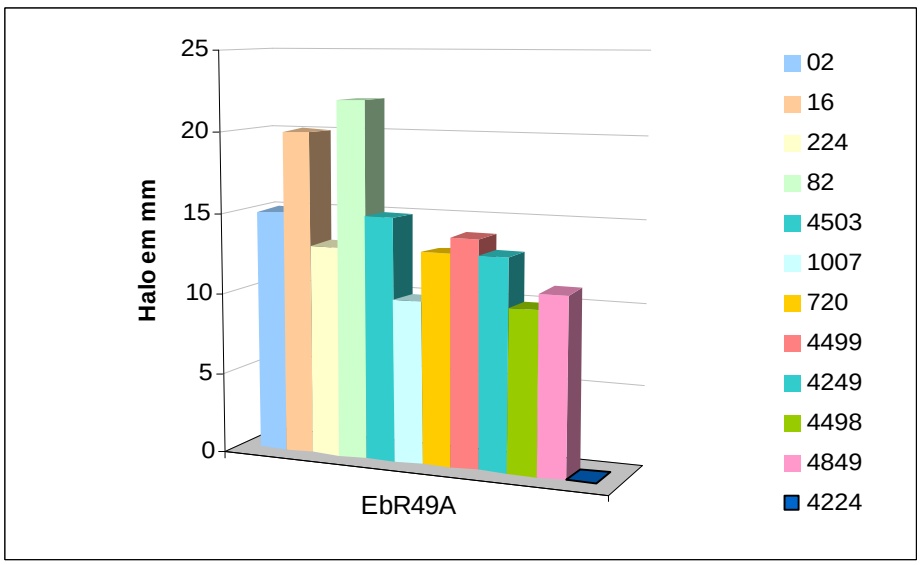

Figura 5.7: Diâmetro dos halos de inibição da linhagem de actinomiceto EbR49A contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

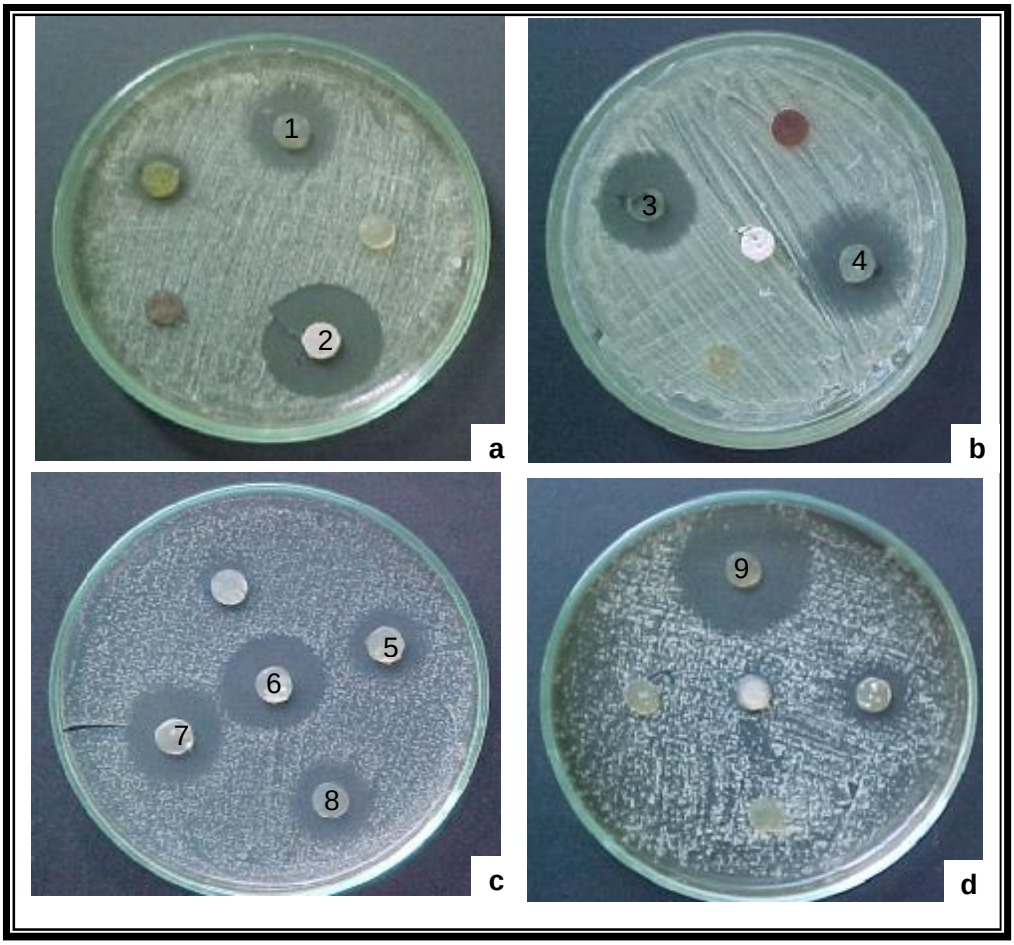

Figura 5.8:Halos de inibição dos microrganismos endofíticos contra diferentes microrganismos-teste.**a:** Eb5F(1) e EbR27 (2) contra *Candida* sp. (4249); **b:** EbR32 (3) e Eb30F (4) contra *Candida* sp. (1007); **c:** EbR79 (5), EbR83 (6), EbR84 (7) e Eb26F (8) contra *Staphylococcus aureus* (02); **d:** EbR83 (9) contra *Malassezia simpodialis* (4499).

5.2.2 – Ensaio de difusão em disco - Fermentação

Após a seleção primária em “bloco de gelose” os microrganismos que apresentaram maior espectro foram selecionadas para o ensaio de difusão em disco, que teve como objetivo investigar o melhor meio líquido para a produção de metabólitos bioativos. Foram selecionados os fungos Eb26F, Eb3f e Eb30F de folhas, e EbR32, EbR83, EbR33 e EbR84 de raízes. Das actinobactérias testadas, apenas a linhagem EbR49A foi selecionada.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Os resultados apresentados na figura 5.9 mostram os halos de inibição e a variação de pH do fungo endofítico Eb26F ao longo de 144 horas de fermentação no meio Czapeck. Os halos de inibição foram observados a partir de 72 horas, atingindo a melhor atividade com 120 horas de fermentação para *S. aureus* (02) *M. tuberculosis* (82), *Candida albicans* (1007) e *Candida* sp. (4249) com halos de inibição variando de 10 a 22 mm. O pH inicial do meio era 6,6 e em 120 horas ficou estabilizado em 6,0 onde ocorreu maior produção do metabólito bioativo. Entretanto, apesar de ter apresentado atividade contra todos os microrganismos testados, os halos de inibição não foram superiores aos observados no teste em bloco de gelose. O meio MPE não foi eficiente para a produção de metabólitos bioativos por esta linhagem, enquanto no meio BD apresentou atividade apenas contra *M. furfur* (4849) e *M. simpodialis* (4499) com halo variando entre 10 e 15 mm, a partir de 120 horas em pH 6,0 (Figura 5.10).

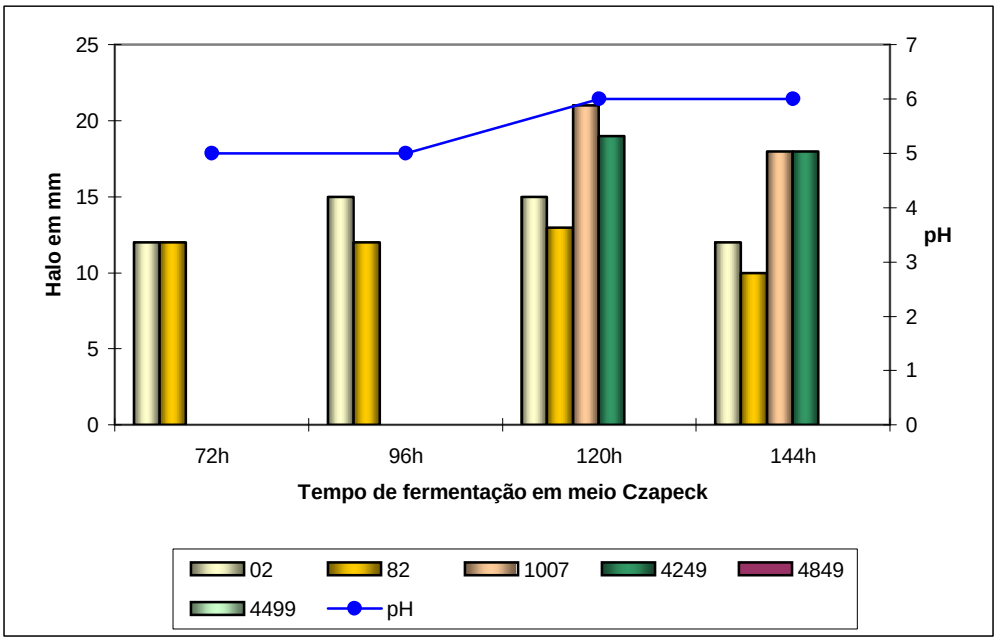

Figura 5.9: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito de Eb26F contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

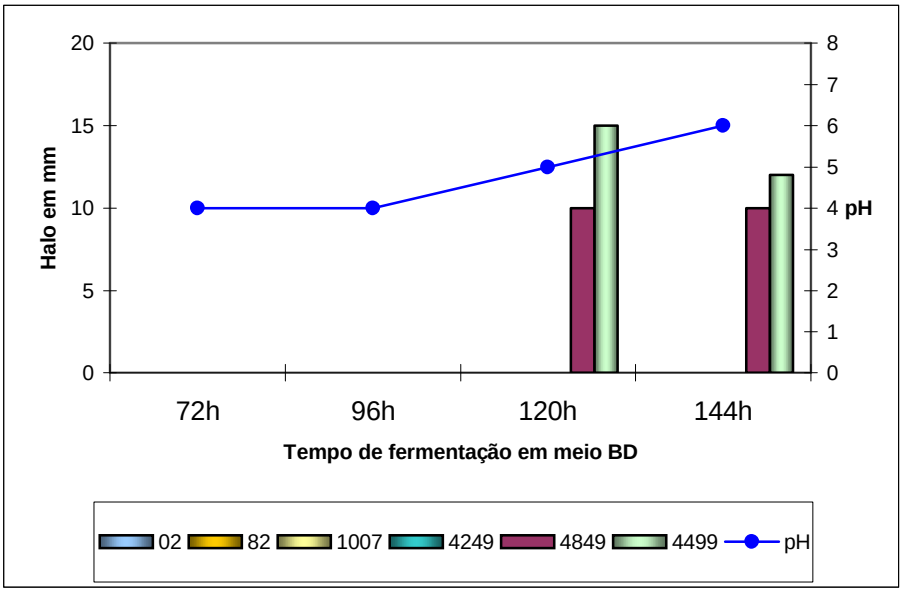

Figura 5.10: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito de Eb26F contra os microrganismos testados.

A linhagem Eb3F começou a apresentar atividade contra *S. aureus* (02) *B. subtilis* (16), *Candida albicans* (1007) e *Candida* sp. (4249), a partir de 72 horas de fermentação, embora o pico de atividade tenha ocorrido em 120 horas. O meio que ofereceu melhor condição para a produção de antibiótico foi o meio Czapeck no qual a linhagem apresentou atividade contra todos os microrganismos testados, inclusive para *Malassezias* spp. com halos superiores a 20 mm. Neste meio, a partir de 96 horas de fermentação, o pH se manteve ácido (pH 5,0), até 144 horas (figura 5.11).

A figura 5.12 mostra a atividade do líquido fermentado do fungo endofítico Eb30F em meio Czapeck, onde os halos de inibição começaram a aparecer a partir de 96 horas de fermentação, embora a melhor atividade tenha sido observada com 144 horas. O pH se manteve em 5,0. Nesta fermentação os halos de inibição contra *Candida* spp. variaram de 10 a 30 mm. Não foi observada atividade antimicrobiana das fermentações nos meios BD e MPE com 168 horas.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

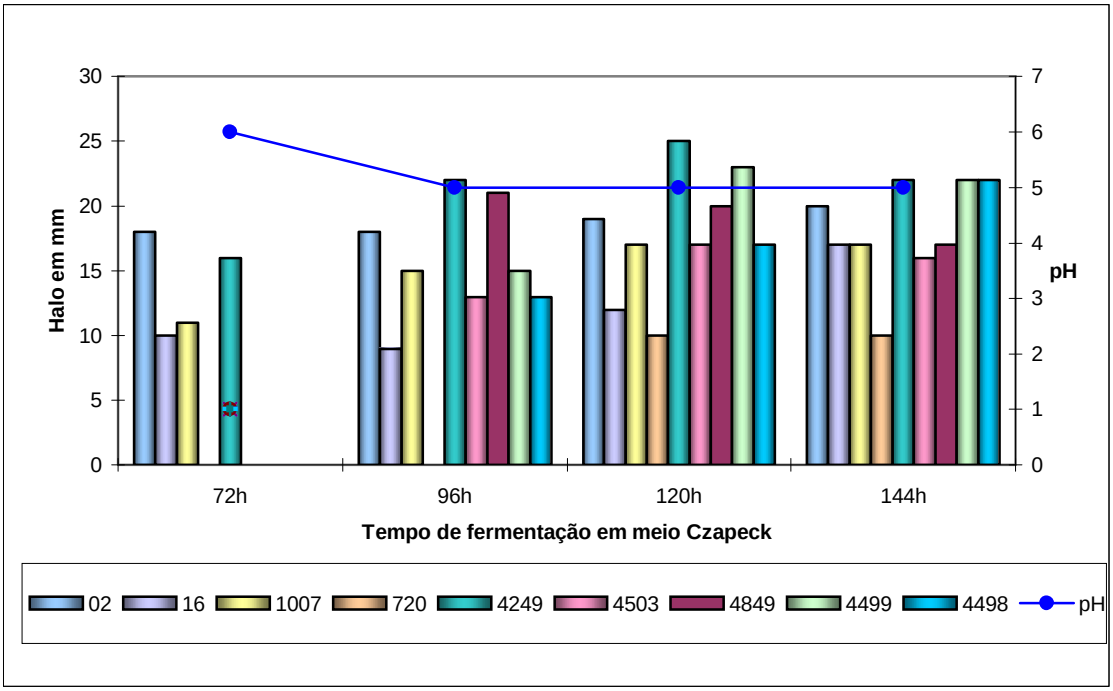

Figura 5.11: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito Eb3F contra os microrganismos testados.

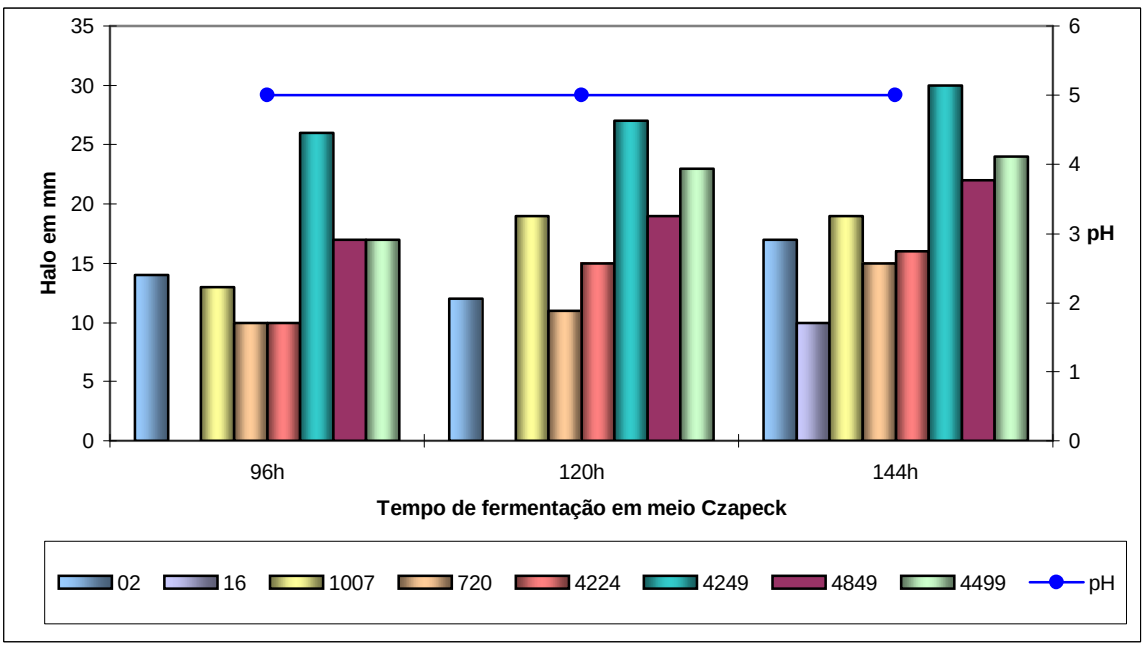

Figura 5.12:Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito de Eb30F contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

A linhagem EbR32 não mostrou atividade antimicrobiana durante a fermentação em meio MPE cujo pH não variou, mantendo-se em 8,0 durante as 144 horas de fermentação. A análise dos gráficos (fig. 5.13 e 5.14) mostra que a fermentação no meio BD apresentou melhor atividade que a fermentação no meio Czapeck. Na figura 5.13, pode-se observar halo de inibição de 23 mm para *Candida* sp. (4249) e de 20 mm para *Candida* sp. (1007) após 120 horas de fermentação no meio BD. Para os demais microrganismos testados, os halos de inibição variaram de 10 a 15 mm. No meio Czapeck (fig. 5.14), a melhor atividade antimicrobiana ocorreu após 144 horas de fermentação em pH ácido (5,0), onde os maiores halos (20 mm) foram para *Candida* sp. (4249) e *Candida* sp. (1007).

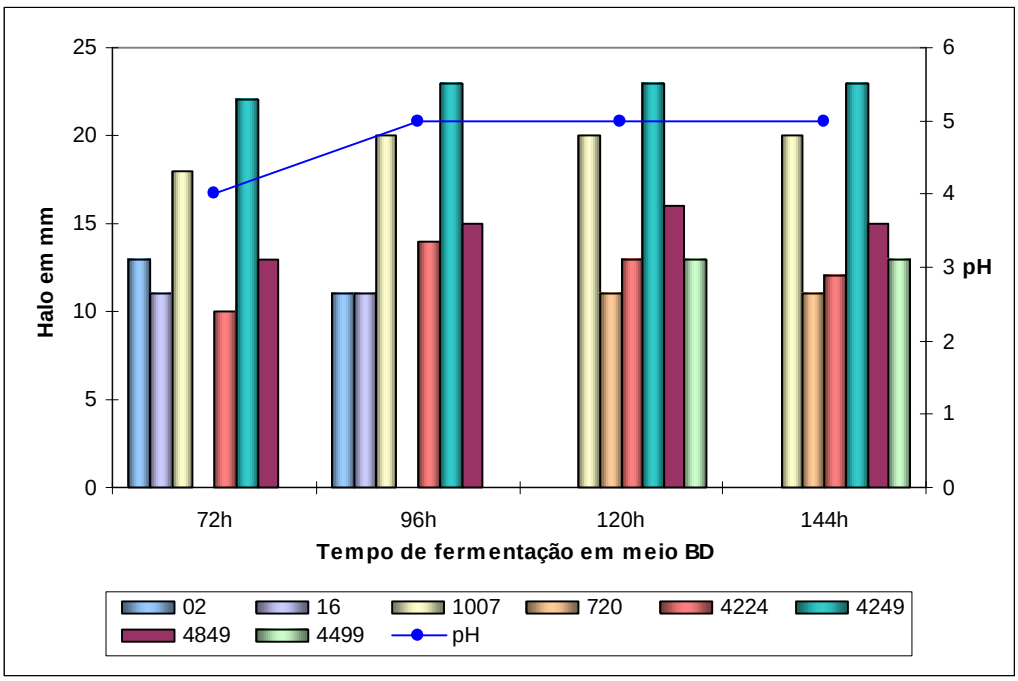

Figura 5.13: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito EbR32 contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

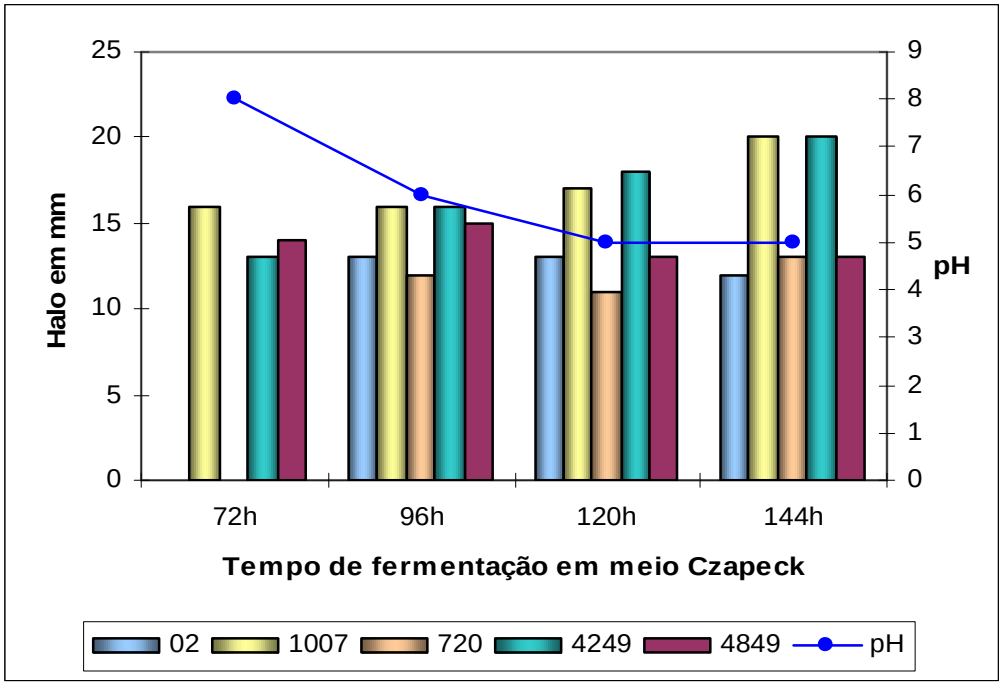

Figura 5.14: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR32 contra os microrganismos testados.

O resultado apresentado na figura 5.15 mostra a atividade do fermentado da linhagem EbR83 no meio MPE, onde destaca-se a atividade significativa contra *M. furfur* e *M. simpodialis* a partir de 72 horas de fermentação. Este processo fermentativo se estendeu até 168 horas na tentativa de se obter resultados satisfatórios contra as bactérias e para *Candida* spp, entretanto neste período só foi observada atividade contra *B. subtilis* (16) onde o halo de inibição foi de 14 mm. O pH desta fermentação, se manteve alcalino – pH 8,0 – após 72 horas. O tempo onde foi observada melhor atividade antimicrobiana foi 120 horas, com halos de inibição que variaram de 10 a 20 mm para os microrganismos testados.

A fermentação da linhagem EbR83 em meio BD durante120 horas (Fig. 5.16) mostrou atividade apenas contra *S. aureus* (02), *B. subtillis* (16) e *Malassezia simpodialis* (4498) a partir de 72 horas. O pH neste meio se manteve ácido - pH 4,0. Possivelmente, esta baixa atividade esteja relacionada ao pH uma vez que em pH alcalino foi observada maior atividade. Em meio Czapeck não houve atividade contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

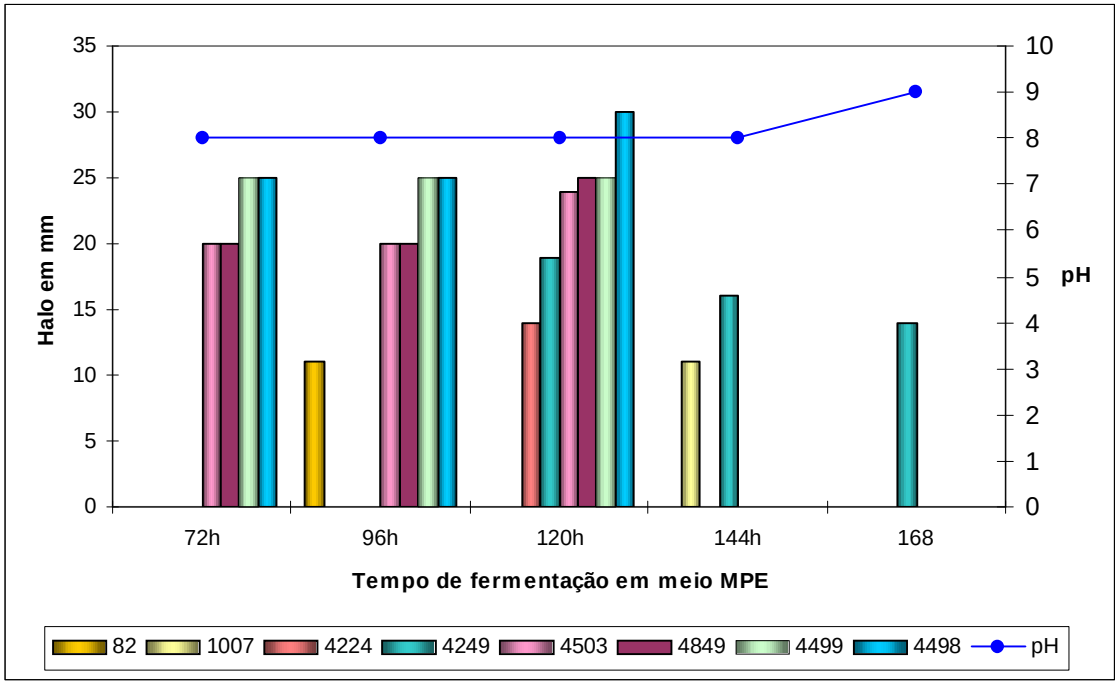

Figura 5.15: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 168h de fermentação em meio MPE do endófito EbR83 contra os microrganismos testados.

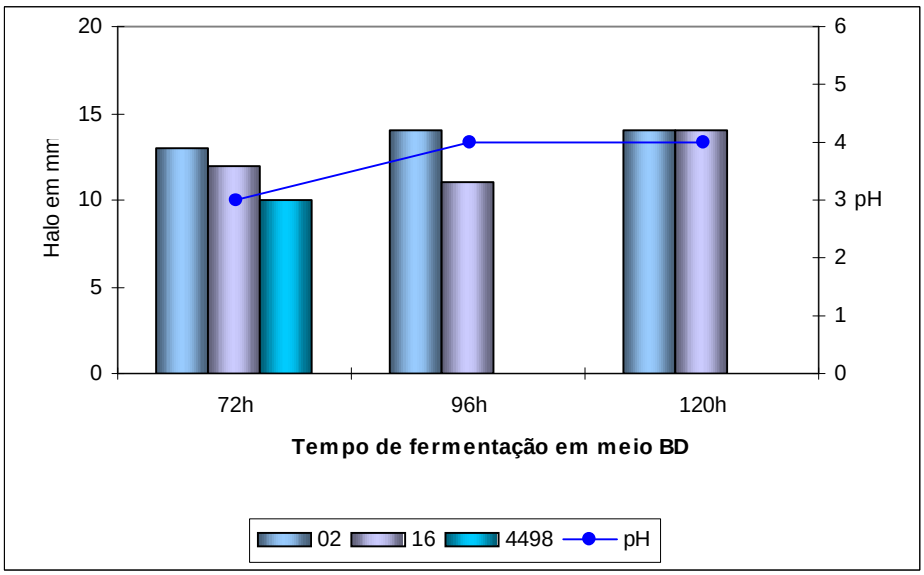

Figura 5.16: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 120h de fermentação em meio BD do endófito EbR83 contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

A fermentação em meio Czapeck para o fungo endofítico EbR33, (Fig. 5.17) mostra que o fermentado apresentou halo de inibição para todos os microrganismos-teste utilizados. Com 120 horas de fermentação foi observado maior halo de inibição (30 mm) para *Candida albicans* (1007). De 72 a 120 horas de fermentação o pH se manteve em 5,0 caindo para 4,0 com 144 horas, quando diminuiu a atividade antimicrobiana. Em meio MPE (Fig. 5.18), o pH se manteve alcalino – 8,0 – onde foi observado maior pico de atividade com 96 horas de fermentação com halo de inibição de 30 mm para *M. furfur* e *M. simpodialis*. Neste meio não foi observada atividade contra as bactérias e contra *Candida* spp., testadas. Estes resultados sugerem que a linhagem EbR33 possivelmente produz dois tipos de antibióticos: um de amplo espectro que é sintetizado em pH ácido e outro de espectro mais restrito, com atividade para *Malassezia* spp. sintetizado em pH básico. Estudos posteriores serão realizados visando esclarecer a produção destes metabólitos bioativos. Em meio BD, houve maior atividade contra *S. aureus* (02) e *B. subtilis* (16) em 72 horas de fermentação com halos de 20 e 18 mm respectivamente (dados não mostrados).

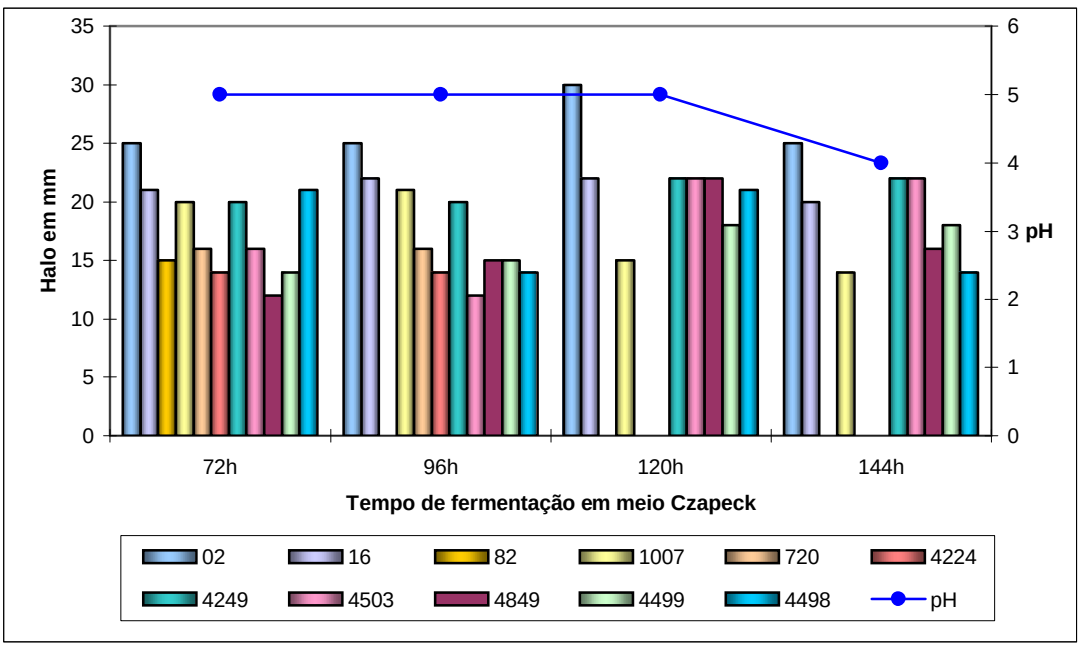

Figura 5.17: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR33 contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

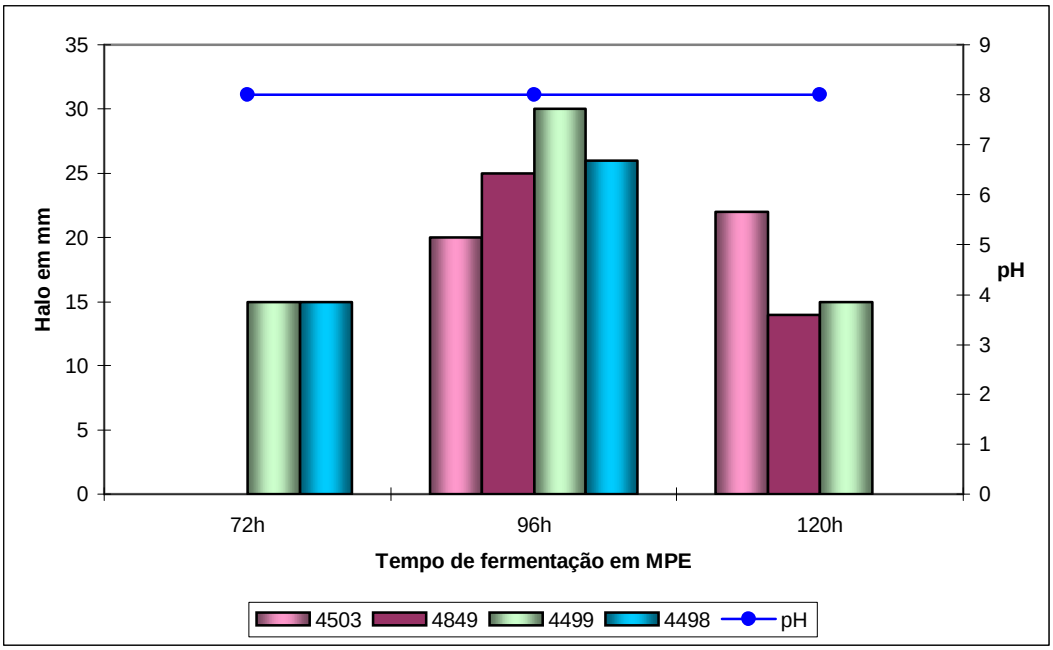

Figura 5.18: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio MPE do endófito EbR33 contra os microrganismos testados.

A figura 5.19 mostra os halos de inibição da fermentação do fungo endofítico EbR84 em meio Czapeck, onde pode ser observado que o melhor tempo para a produção de antibiótico foi 96 horas em pH 6,0 e o maior halo (28 mm) para *Candida* sp. (4249). A fermentação em meio BD proporcionou atividade equivalente ao da fermentação em meio Czapeck após 72 horas, sendo observada maior atividade com 120 horas de fermentação. Foi observada inibição contra *Candida albicans* (1007) e *Candida* spp. (4224 e 4249) com halos variando de 13 a 25 mm. O pH da fermentação variou entre 4,0 e 6,0 entretanto, o pH 5,0 foi melhor para a produção do metabólito bioativo.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

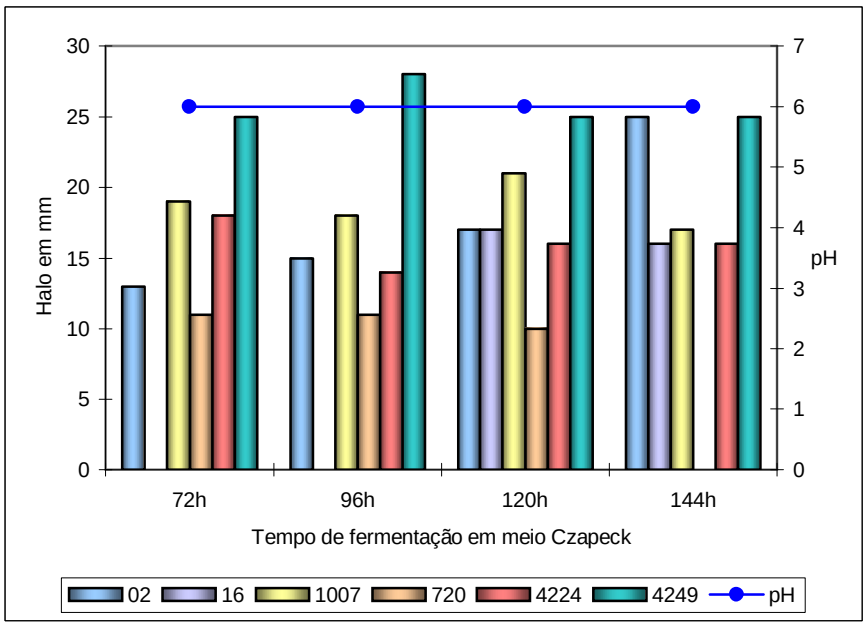

Figura 5.19**:** Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio Czapeck do endófito EbR84 contra os microrganismos testados.

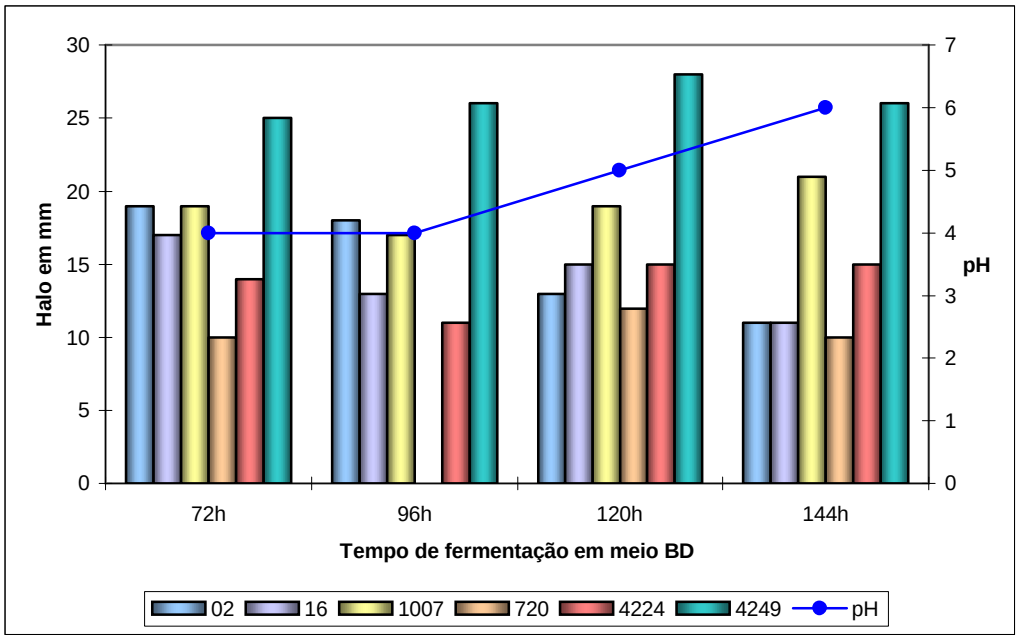

Figura 5.20: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 144h de fermentação em meio BD do endófito EbR84 contra os microrganismos testados.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Durante o processo de fermentação foi possível observar que os fungos endofíticos das raízes EbR32, EbR33, EbR83 e EbR84 de *C. bonariensis* (**L.**) **Cronquist.** apresentaram maior espectro de ação que os fungos das folhas Eb3F, Eb26F, Eb30F. Já Galvão (2002) em trabalho realizado com microrganismos endofíticos isolados de *Capraria biflora* **L**. constatou que os fungos isolados da folha mostraram ser mais ativos que os isolados da raiz.

Todas as linhagens apresentaram halos de inibição superiores a 15 mm para pelo menos um dos microrganismos-teste utilizados. O tempo de fermentação que apresentou melhores resultados foi variável, dependendo do meio e das condições de cultivo. Liu *et al*. (2001) realizaram fermentações com fungos endofíticos durante dez dias e observaram atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos em 60% dos microrganismos endofíticos testados, enquanto Castillo, *et al*. (2002) obtiveram maior atividade antimicrobiana quando cultivou os fungos endofíticos em meio BD sem agitação durante três semanas.

A composição dos meios de cultura e as condições de cultivo são variáveis que devem ser investigadas com maior profundidade a fim de se determinar os melhores parâmetros para uma melhor produção do metabólito bioativo.

O melhor meio para a produção de metabólitos bioativos para a maioria dos fungos endofíticos testados (Eb3F, Eb26F, Eb30F, EbR84, EbR33) foi o meio Czapeck. Meios de cultura quimicamente definidos são muito empregados em fermentações onde o objetivo final é a produção de antibióticos. Wiyakrutta *et al*. (2004), em trabalho realizado com fungos endofíticos isolados de plantas medicinais da Tailândia, obtiveram atividade contra *M. tuberculosis* em fermentação com meio Czapeck por 21 dias, em 26% dos fungos fermentados; Anisuzzaman *et al*. (2001) obtiveram em meio Czapeck com oito dias de fermentação, atividade contra gram-positivas, gram-negativas e varias espécies de *Candida*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Os resultados apresentados na figura 5.21 mostram a atividade da actinobactéria endofítica EbR49A isolada da raiz, fermentada em meio ISP-3 durante 96 horas onde foram observados halos de inibição variando de 22 a 25 mm para as bactérias Gram-positivas, enquanto para os demais microrganismos testados os halos variaram de 12 a 16 mm durante toda a fermentação. O pH, 7,0 não sofreu variação. Durante as 96 horas de fermentação só houve atividade do líquido metabólico do meio ISP-2 contra *S. aureus* e *B. subtillis* (Figura 5.22). A fermentação em meio MPE, apresentou resultados semelhantes aos obtidos com o meio ISP-3 para *S. aureus* (02), *B. subtilis* (16), *Candida albicans* (1007), *Candida sp*. (720 e 4249), *M. furfur* (4503 e 4849) *e M. simpodialis* (4499 e 4498).

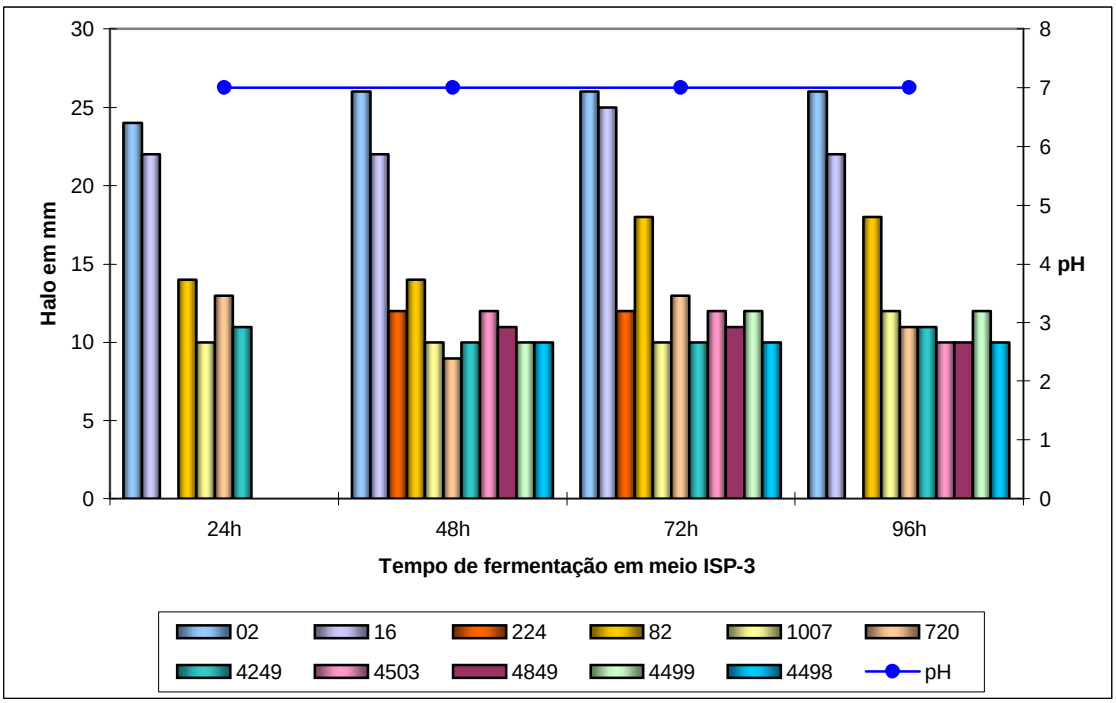

Figura 5.21: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 96h de fermentação em meio ISP-3 do endófito EbR49A contra os microrganismos testados

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

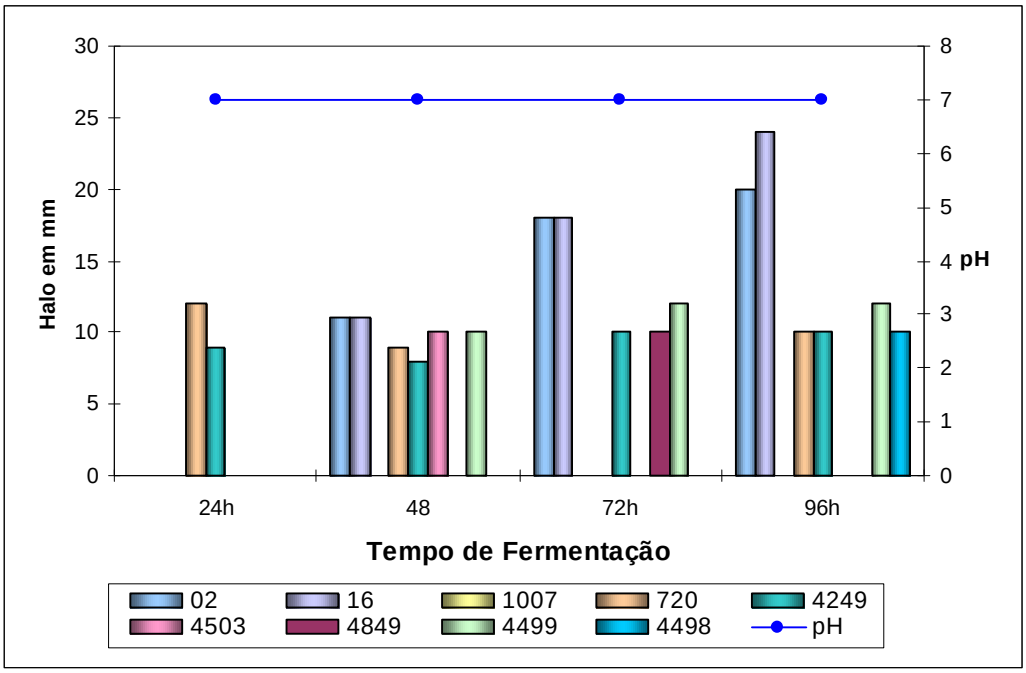

Figura 5.22: Diâmetro dos halos de inibição e variação de pH durante 96h de fermentação em meio MPE do endófito EbR49A contra os microrganismos testados.

O potencial antimicrobiano de actinobactérias endofíticas vem sendo comprovado em inúmeros trabalhos como o de Shimizu *et al*. (2004), onde obtiveram 10 isolados de actinobactérias de *Rhododendron* sp. com atividade confirmada por halos de inibição superiores a 20 mm contra os fitopatógenos *Phytophthora cinnamomi* e *Pestalotiopsis sydowiana*, *Candida* sp. e *S. aureus*, com 72 horas de fermentação.

Todas as linhagens testadas no processo de fermentação apresentaram boa atividade antimicrobiana em pelo menos um dos meios utilizados. A tabela 3 mostra o melhor meio e o melhor tempo de fermentação para cada linhagem endofítica estudada, enquanto a figura 5.23, ilustra os halos de inibição obtidos no teste de difusão de disco.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

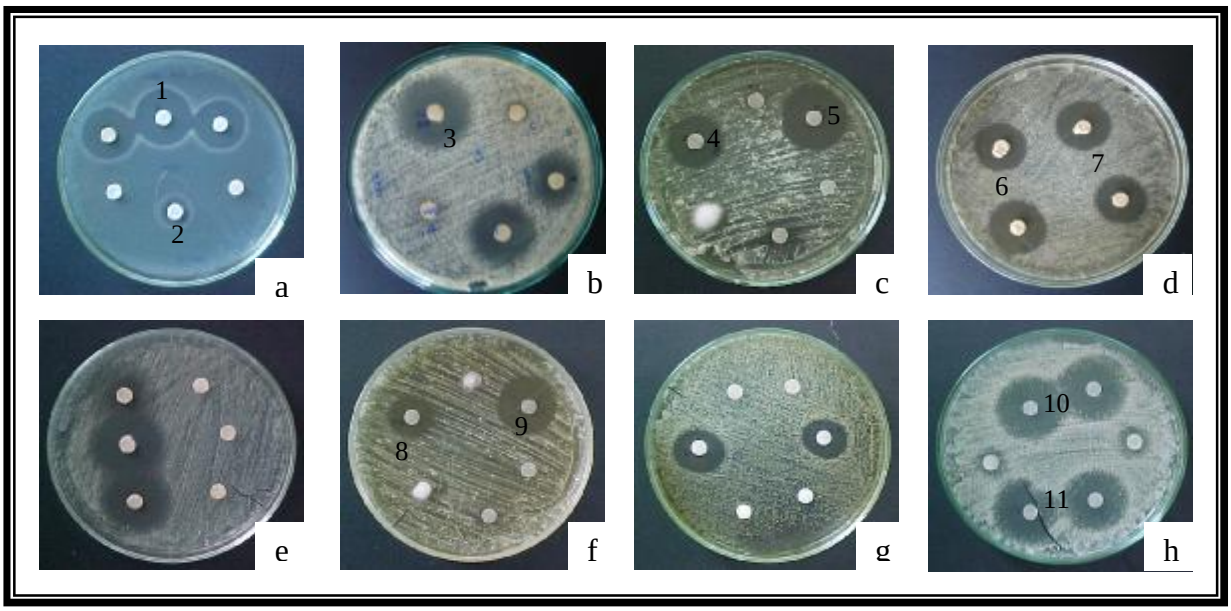

Figura 5.23:Halos de inibição dos fermentados dos microrganismos endofíticos isolados de *C. bonariensis* (**L**.) **Cronquist** contra os microrganismos testados a.1) EbR49A (ISP-2/72h), a.2) Eb3F (Czapeck/120h) X 16 ; b.3) Eb30F X 4249 (Czapeck/120h); c.4) EbR33 (Czapeck/ 72h); c.5) EbR83 (MPE / 72h) X 4499; d.6) EbR33 (Czapeck/ 72h); d.7) EbR83 (MPE / 72h) X 4498; e) EbR84 (MPE /72h) X4249; f.8) EbR33(Czapeck/ 72h); f.9) EbR83(MPE/ 72h) X 4503; g) Eb26F (Czapeck/120h) x 1007; h.10) EbR32 (BD/ 120h); h.11) EbR32 (Czapeck /144h) X 4249.

Tabela 3. Melhores condições para a produção de metabólitos bioativos das linhagens de endófitos fermentadas.

Linhagens	Meio	pH	Tempo (h)
Eb3F	Czapeck	5,0	120
Eb26F	Czapeck	6,0	120
Eb30F	Czapeck	5,0	144
EbR32	BD	5,0	120
EnR33*	MPE	8,0	120
EbR83	MPE	8,0	120
EbR84	Czapeck	5,0	96
EbR49A	ISP-3	7,0	72

* para atividade contra *Malassezia* spp.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

5.3 – IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

5.3.1 – Identificação dos fungos

As linhagens EbR33, EbR83 e EbR84 foram identificadas como *Trichoderma* sp.; e as linhagens Eb3F e Eb26F como *Aspergillus* sp. As linhagens EbR32 e Eb30F não apresentaram estruturas reprodutivas e, portanto não foram identificadas.

Alguns trabalhos relatam o isolamento de fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* em várias espécies de plantas.

Souza, *et al*. (2004) isolaram da planta *Strychnos cogens*, planta tóxica da Amazônia, fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* com atividade antimicrobiana, contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *S. aureus*, e *Aspergillus flavus*, com halos de inibição superiores a 20 mm. Fungos do gênero *Aspergillus*, também foram isolados da mesma planta, apresentando atividade contra *E. coli*, *Bacillus* spp e *S. aureus.*

Fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* também foram isolados de plantas tropicais como *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota* por Galvão (1998); da planta *Stylosantes guianensis* (Pereira, *et al*. 1993) e de *Musa* spp. por Pereira, *et al.* (1999).

Huang, *et al* (2001) isolaram de *Taxus mairei, Trichoderma* sp. com atividade antitumoral e atividade antifúngica. Tian, *et al*. (2001) isolaram de culturas de arroz, fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* com atividade contra fitopatógenos *Magnoporthe grisea, Rhizoctonia solani* e *Fuzarium moniliforme*.

5.3.2 – Identificação da actinobacteria

As características fenotípicas da colônia de actinobactéria endofítica EbR49A estão apresentadas na tabela 4, enquanto a micromorfologia da cadeia de esporóforos em forma verticilada, pode ser observada na figura 5.24. A análise dos compostos da parede celular revelou que a linhagem EbR49A contém o ácido diaminopimélico do tipo L-DAP. Com base nas características químicas da parede

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

celular e características micromorfológicas observadas, a linhagem EbR49A foi identificada como sendo do gênero *Streptoverticillium.*

O isolamento de actinobactérias endofíticas do gênero *Streptoverticillium* não é muito freqüente. Tian, *et al*. isolaram de culturas de arroz, 274 actinobactérias endofíticas. Destas, apenas seis linhagens são do gênero *Streptoverticillum*. Ezra *et al*. (2004) isolaram da planta *Monstera* sp., a linhagem endofítica *Streptoverticillum* (MSU-2110), produtora do antibiótico coranamicina, ativo contra *Cryptoccocus neoformans* e contra *P. falciparum*.

Tabela 4. Características da colônia da linhagem EbR49A em meio ISP

Meio	Micélio aéreo	Micélio Vegetativo	Pigmento Difuso no Meio	Esporulação
ISP-1	Cresceu pouco; Rosa escuro	Cresceu pouco; Rosa claro	Não	Não
ISP-2	Crescimento abundante; Laranja; pulverulenta	Vermelho	Não	Não
ISP-3	Crescimento abundante; Branco Algodonosa	Vinho	Não	Não
ISP-4	Crescimento abundante; Branco Algodonosa	Rosa	Não	Não
ISP-5	Crescimento bom; Branco Algodonosa	Vinho	Não	Não
ISP-7	Melanina negativa	Vinho	Não	Sim

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Figura 5.24: Micromorfologia da actinobactéria EbR49A em meio ISP-1. As setas mostram verticilos com filamentos esporulados.

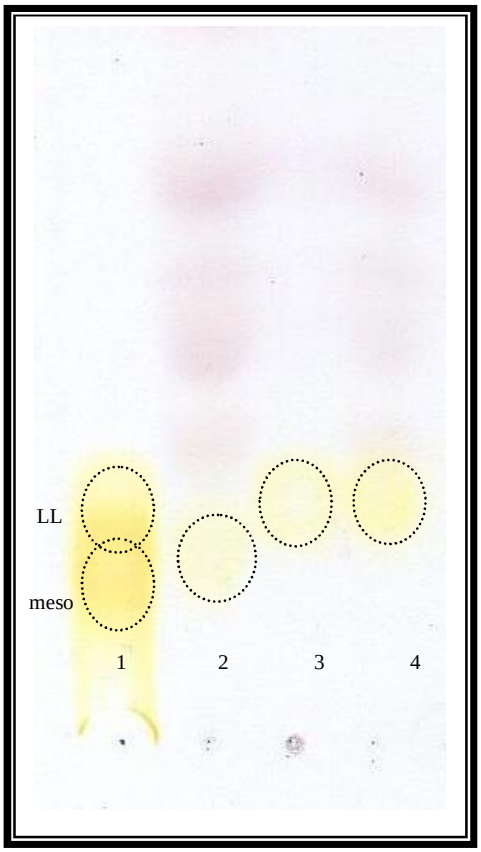

Figura 5.25: Cromatografia em camada delgada da parede celular da linhagem EbR49A: 1)DAP Acido diaminopimélico; 2) *Nocardia* sp; 3) *Streptomyces* sp;. 4) EbR49A

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

6 – CONCLUSÃO

- A diversidade de fungos endofíticos em *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist** é expressiva, sendo as folhas o local que abriga uma quantidade maior de fungos endofíticos cultiváveis.

- A diversidade de actinobactérias endofíticas foi muito baixa nas condições de isolamento utilizadas.

- A técnica de desinfecção com hipoclorito por 15 minutos para o isolamento de actinobactéria não foi eficiente.

- Os fungos endofíticos isolados das raízes apresentaram maior espectro de ação do que os isolados das folhas.

- Apenas as linhagens EbR49A e Eb22FB apresentaram atividade contra bactéria Gram negativa.

- O melhor meio de fermentação para as linhagens de fungos EbR84, Eb3F, Eb26F e Eb30F foi o meio Czapeck.

- O meio MPE foi o que proporcionou melhor atividade para as linhagens de fungos EbR33 e EbR83 contra *Malassezia* spp.

- A actinobactéria EbR49A apresentou maior espectro de ação no meio de fermentação ISP-3.

- Os fungos endofíticos EbR83 e EbR33 apresentaram melhor atividade contra *Malassezia furfur* e *M. simpodialis* no meio de fermentação MPE.

- A linhagem de fungo EbR33 produz dois antibióticos distintos. Um de largo espectro que é produzido em meio Czapeck em pH ácido e outro que tem

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

atividade específica para *Malassezia* spp., produzido em meio MPE com pH alcalino.

* A linhagem de EbR49A pertence ao gênero *Streptoverticillium*, as linhagens EbR33, EbR83 e EbR84, pertencem ao gênero *Trichoderma* enquanto que as linhagens Eb3F e Eb26F, são do gênero *Aspergillus*.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

7 – PERSPECTIVAS

- Investigar os metabólitos bioativos produzidos pelas linhagens fermentadas visando a sua caracterização química e estrutural;

- Comparar os compostos químicos produzidos pelas linhagens endofíticas fermentadas, com os produzidos pela planta *C. bonariensis*;

- Identificar as demais linhagens isoladas a fim de se conhecer a biodiversidade endofítica da planta;

- Ampliar os testes de atividade a outros patógenos de interesse médico e agrícola;

- Investigar o potencial biotecnológico das bactérias e fungos isolados quanto à capacidade de degradação de moléculas complexas e sua aplicação em biorremediação;

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E. H. A., RIBEIRO, F. A., SILVA, M. H. L., ZOGHBI, M. G. B., MAIA, J. G. S. Plantas medicinais aromáticas usadas pelas populações tradicionais do Caxiuamã. CBO_15- Estação Científica Ferreira Pena. 2000.

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**, 43: 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.; MARCON,J.; MACCHERONI, JR.; W., ELSAS; J. D.; VUURDE, J.; AZEVEDO, J. L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in *Citrus* Plants **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 4906–4914, 2002.

ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **PNAS National Academic of Sciences**, 100: 15649-15654, 2003.

ARORA, C.; KAUSHIK, R. D.; KUMAR, A.; GARG, G. K. Fungicidal potencial of Kumaon and Tarai region plants against mushroom fungal pathogens. **Allelopathy Journal**, 11: 63-69, 2003.

AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: L.A. Serafini; N.M. Barros e J.L. Azevedo. **Biotecnologia, Avanços na Agricultura e na Industria.** Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2002. Cap. 8, p. 233-265.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, 22: 225-229, 1999.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

BARBOSA, L. C. A.; PAULA, V. F.; AZEVEDO, A. S. SILVA, A. M.; NASCIMENTO, A. A. Essential oil composition from some plant parts of *Conyza bonariensis* (**L**.) **Cronquist**. **Flavour and Fragrance Journal**, 20: 39-41, 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics sucebility test by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45:493-496, 1966.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a New Pentaketide Antifungal Agent Isolated from an Endophytic Fungus. **Journal of Natural Products**, 63: 1447-1448, 2000.

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**, 39: 425-430, 2004.

CARROL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualitic symbiont. **Ecology**, 69:2-9, 1988.

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.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, 148: 2675-2685, 2002.

CASTILLO, U. F.; HARPER, J.K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALESI, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVER, 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**, 224:183-190, 2003.

CROSS, T. GROWTH AND EXAMINATION OF ACTINOMYCETES – SOME GUIDELINES IN: HOLT, J. G.; KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A, STALEY J.T.; WILLIANS, S.T. **Berguey's Manual of Determination Bacteriology**. 9. ed. Baltmore: Willian e Wilkins, 1994.

DEMAIN, A. L., Pharmaceutically active secondary metabolities of microorganisms. **Applied Microbial Biotechnology**, 52: 455-463, 1999.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

DECKERT, R. J.; MELVILLE, L.; PETERSON R. L. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic lifecycle in the foliage of *Pinus strobus*. **Mycological Research**, 105: 991-997, 2001.

EL-DARIER, S. M.; KAMAL, S. A.; YOUSEF, R. S. Diuretic plant ecology and medicine in the western Mediterranean coastal region of Egypt. **The Sciences**,1: 258-266, 2001.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, 165:1229–1238, 2003.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, A. M.; TEPLOW, 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**, 150: 785-793, 2004.

FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **OIKOS**, 98: 25-36, 2002.

GALVÃO, K. D., Isolamento e atividade antifúngica de microrganismos endofíticos de folhas e raízes de *Capraria biflora* **L**. (*Schrophulariacea*). **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Antibióticos, UFPE**. Recife, 2002.

GALVÃO, R. M. S. Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais freqüentes, isolados de *Theobroma grandiflorum, Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*. **Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade da Amazônia*/* Universidade Federal de São Carlos**. Manaus, Amazonas. 1998. 151p.

GAMBOA, M.A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P.; Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, 156: 41–45, 2002.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **PNAS Nacional Academy of Sciences**, 101(27): 10107-10112, 2004.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

GAO, X-X.; ZHOU, H.; XU, D-Y.; YU, C-H.; CHEN, Y-Q.; QU, L-H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth reveled by cultivation-indepentdent approach. **FEMS Microbiology Letters**, 249: 255-266, 2005.

GUIMARÃES, V. C. Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paullinia cupana* H.B.K. var. sorbilis (Mart.) Ducke. e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD no endófito *Glomerella cingulata*. **Dissertação de Mestrado, Fundação Universidade da Amazônia/ Universidade Federal de São Carlos**. Manaus, 1998. 123p.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 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**, Tokyo, 127:81-83, 1974.

HOFF, J. A.; KLOPFENSTEIN, N. B.; MCDONALD, G. I.; TONN, J. R.; KIM, M. S; ZAMBINO, P. J.; HESSBURG, P. F.; ROGERS, J. D.; PEEVER,T. L.; CARRIS, L. M. Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) **Pathology**, 34 :255–271, 2004.

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

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

KAWAMURA, T.; TAGO, K.; BEPEU, T.; ARIMA,. Taxonomy of the producing strain and study conditions for production of the antibiotic. **The journal of Antibiotics**, Tokyo, 29: 242-247, 1976.

KIM, S.; SHIN, D-S.; LEE, T.; OH, K-B. Periconicins, Two new Fusicoccane Diterpenes produced by an Endophytic fungus *Periconia* sp. With Antibacterial Activity. **Journal of Natural Products**, 67: 448-450, 2004.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of *Streptomycetes*. **Nature**, London, 202: 928-929, 1964.

LACAVA, P.T. ARAÚJO W.L., MARCON, J., MACCHERONI JR.,W., AZEVEDO, J.L., Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology** 39: 55–59, 2004.

LI, J. Y.; STROBEL, G.A.; SIDHU, R.; HESS, W. M.; FORD, E. Endophytic taxol producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum*. **Microbiology** 142: 2223-2226, 1996.

LIMA, V. T. Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos e da rizosfera de Melão-de-são Caetano (*Momordica charantia* **L**.), **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Antibióticos, UFPE**. Recife, 2006.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology** 88: 277-282, 2001.

MA, Y. M.; LI, Y.; LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* **Fitoterapia**, 75: 451-456, 2004.

MACÊDO, M. E., CONSOLI, R. A., GRAND, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B.; MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; ZANI, C. L. Screening of Asteracea (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 92: 565-570, 1997.

MADGAM, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10ª ED. 2004. Prentice Hall. 608p.

MAITAN, V. R. Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira) **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás**. Goiânia, Goiás, 1998. 122p.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

MARTIN, M.; VILA-AIUB M.; MARTINEZ-GHERSA A. Evolution of herbicide resistance in weeds: vertically transmitted fungal endophytes as genetic entities **Evolutionary Ecology**, 17: 441–456, 2003.

MEDEIROS, S. A. F. Microflora da folhagem do cajueiro *Anacardium occidentale* (L.) e controle biológico do agente da antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. *In vitro* **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife – PE, 1998. 106p.

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

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; GRAND, T. S. M.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B ZANI, C. L. Screening of *Asteracea* (*Compositae)* plant extracts for molluscicidal activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94: 411-412, 1999.

MENDES, R.; KUKLISNKY-SOBRAL, J.; GERALDI, I.O.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Monitoring soybean endophytic fungal community associated with glyphosate. In: **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, (21-25 Out. 2001). Anais, Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo. p. 242.

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

OLIVEIRA, F.C.O. Fungos endofíticos de folhas de cajueiro, Anacardium occidentale L. Propriedades antagônicas a Colletotrichum gloeosporioides (penzig) Sacc. Avaliação enzimática através de eletroforese e substratos específicos. **Dissertação de Mestrado. Universidade Rural de Pernambuco.** Recife, PE, 1999. 79p.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, N.29, 2002.

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

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

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

PETERS, S.; AUST, H-J.; DRAEGER, S. A.; SCHULZ, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant *calli*. **Mycologia**, 90: 360-367, 1998.

PETRINI, O.; SIEBER, T.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite, production, and substrat utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, 1: 185-196, 1992.

PIMENTEL, I. C. Fungos endofíticos do milho (*Zea mays* L.) e da soja (*Glicine max* L.) e seu potencial valor biotecnológico no controle de pragas agrícolas. **Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná.** Curitiba, Paraná, 2001. 154p.

PRIDHAM, T. G.; GOTTILIEB, D. The ulilization of carbon compounds by some *Actinomycetes* as an aid for species determination. **Journal of Bacteriology**, 56: 107-114, 1948.

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**, New York, 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**, 216: 162–167, 2002.

RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, 40: 261-267, 2000.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, 39: 131-135, 1999.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. **Mycologia**, 86: 376-385, 1994.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

RODRIGUES, E.; CARLINI E. A. Plants used by a quilombola group in Brazil with potencial central nervous system effects. **Phytotherapy Research,** 18: 748-753, 2004.

RUDGERS, J. A.; KOSLOW, J. M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. **Ecology Letters**, 7: 42-51, 2004.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte–plant symbioses. **TRENDS in Plant Science**, 9: 2004.

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

SCHULZ, B. RÖMMERT, A-K.; DAMMANN, U.; AUST, H-J.; STRACK, D. The endophyte-host interection: a balanced antagonism? **Mycology Research**,103: 1275-1283, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; SIEGFRIED D.; ANNE-KATRIN, R. O; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycology Research**, 106: 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, 109: 661-686, 2005.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants **Comptes Rendus Biologies**, 327: 639–648, 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 of Genetic Plant Pathology**, 66: 360-366, 2000.

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

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

SIEBER, T. N.; SIBER-CANAVESI, F.; PETRINI, O.; EKRAMODDOULLAH, A. K.; DORWORTH, C. E. Characterization of Canadian and European *Melanconium* from some *Agnus* spp. By morphological cultural and biochemical studies. **Canadian Journal of Botany**, 69: 2170-2176, 1991.

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* (**aub**l.) **rich** e *Strychnos cogens* **bentham**. **Acta Amazônica**, 34 (2): 185-195, 2004.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International **Journal of Systematic Bacteriology**, 16: 313-340, 1996.

STAMFORD, T. L. M. Isolamento e identificação de microrganismos endofíticos, seleção caracterização de actinomicetos produtores de enzimas amilolíticas. **Tese de Doutorado**. **Departamento de Nutrição. Universidade Federal de Pernambuco.** Recife, 1997. 110p.

STANECL; ROBERTS, Simplified approach to identification of aerobic *actinomycetes* by thinlayer chromatography. **Applied Microbiology**, 28: 226-231, 1974.

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

SINGH, S. B.; ZINK, D.; POLISHOOK, J.; VAENTINO, D.; SHAFIEE, A.; SILVERMAN, K.; FELOCK, K.; TERAN, A.; VILELLA, D.; HAZUDA, D. J..; LINGHAM, R. B. A new diterpenoid produced by endophytic fungi of *Daphnopsis americana*. **Tetrahedron Letters**, 40: 8775-8779, 2001.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic Microbes Embody Pharmaceutical Potencial. **ASM News**, 64: 263-268,1998.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MILLER C.; CONDRON, M.; TEPLOW, D. B; HESS, W. M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, 145, 1919-1926, 1999.

STROBEL, G. A. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22: 315-333, 2002.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

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

STROBEL, G., DAISY, B. CASTILLO, U. HARPER, JAMES. Natural products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, 67:257-268, 2004.

SULLIVAN, T.J.; FAETH, S.H. Gene flow in the endophyte *Neotyphodium* and implications for coevolution with *Festuca arizonica*. **Molecular Ecology**, 13: 649-656, 2004.

SURETTE, A. M.; STURZ, V.; LADA, R. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, 253: 381-390, 2003.

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

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. Secondary metabolities from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**, 151: 1691-1695.

TAN, R. X.; ZOU, W. X., Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Report**, 18: 448-459, 2001.

TIAN, X.L.; CAO,L.X.; TAN, H.M.; ZENG, Q. G.; JIA, Y.Y.; HAN, W.Q.; 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 & Biotechnology**, 18: 1-7, 2004.

TYLER, V. E.; SPEEDIE, M. K.; ROBBERS, J. E. **Farmacognosia, Farmacobiotecnologia**. Ed. Premier, São Paulo. 1998, 372p.

TZAKOU, O.; VAGIAS, C.; GANI, A.; YANNITSAROS, A. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, 20:425-428, 2005.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

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 de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos**, **Universidade Estadual de Campinas**. São Paulo, 2004.

WAGENAAR, M., CORWIN, J., STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, 63: 1693-1695, 2000.

WOLFE, B. A.; BUSH, M.; MONFORT, S. L., MUNFORD, S. L.; PESSE, A.; MONTALI, R. J. Abdominal lipomatosis attributed to tall fescue toxicosis in deer. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 213: 1783-1786, 1998.

WIYAKRUTTA, S.; NONGLUKSUN, S.; WATTAN, P.; NUNTAWAN, T.; KANNAWAT, D.; NIJSIRI, R. and VITHAYA, M. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 20: 265-272, 2004.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

APÊNDICE E
ANEXOS

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

9 – APÊNDICE
Valores dos halos de inibição do teste em "bloco de gelose"

Tabela 5. Média aritmética dos halos de inibição do teste em "Bloco de Gelose" dos fungos endofíticos de raízes de *Conyza bonariensis* **(L.) Cronquist**

ENDÓFITO	Microrganismo-teste (halo em mm)											
	02	16	224	82	1007	720	4224	4249	4503	4849	4499	4498
EbR75	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR72	16	-	-	-	-	18	15	-	-	-	-	-
EbR80	13	12	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR78	20	15	-	19	19	-	25	18	-	-	-	-
EbR27	20	-	-	12	-	-	-	19	-	-	-	-
EbR73	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR33	17	10	-	12	24	14	14	24	25	26	22	20
EbR67	17	9	-	9	20	-	-	13	-	-	-	-
EbR79	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR84	22	15	-	15	17	22	22	16	-	-	-	-
EbR83	17	9	-	15	26	12	16	24	22	25	30	22
EbR32	20	9	-	-	23	16	16	22	-	10	14	-
EbR31	14	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-
EbR35	12	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR77	27	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR105B	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Tabela 6. Média aritmética dos halos de inibição do teste em "Bloco de Gelose" dos fungos endofíticos de folhas de *Conyza bonariensis* (**L.**) **Cronquist**

ENDÓFITO	Microrganismo-teste (média dos halos em mm)											
	02	16	224	82	1007	720	4224	4249	4503	4849	4499	4498
Eb27F	23		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eb4FB	17		-	-	-	16	11	-	-	-	-	-
Eb34F	15	9	-	-	15	-	12	10	-	-	-	-
Eb20F	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-
Eb33F	15	-	-	-	12	-	-	10	-	-	-	-
Eb22FB	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eb26F	18	-	-	12	21	-	-	21	12	20	13	14
Eb2FB	15	-	-	-	15	13	-	-	-	-	-	-
Eb30F	22	18	-	-	20	11	17	20	-	11	-	-
Eb3F	16	15	-	-	16	17	-	27	13	16	14	14
Eb5F	15	-	-	14	-	-	-	16	-	-	-	-
Eb18FB	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 7. Média aritmética dos halos de inibição do teste em "Bloco de Gelose" das actinobactérias endofíticas de raízes de *Conyza bonariensis* (**L.**) **Cronquist**

ENDÓFITO	Microrganismo-teste (média dos halos em mm)											
	02	16	224	82	1007	720	4224	4249	4503	4849	4499	4498
EbR48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR49A	17	18	13	22	10	13	-	13	15	11	14	10
EbR63	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EbR64	-	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10 - ANEXOS

10.1 - MEIOS DE CULTURA

10.1.1 – AN : Meio Agar Nutriente

Extrato de carne.....	3,0 g
Peptona.....	5,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 6,8

10.1.2 – BDA (batata-dextrose-ágar) – Mello *et al*., 1988.

Infusão de 200g de batata.....	500 ml
Glicose.....	20,0 g
Agar*	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 6,0

*p/ o meio BD exceto o ágar

10.1.3 – CAA (Caseína Amido Agar) Kuster; Williams, 1964.

Amido.....	10,0g
Caseína.....	0,3g
Nitrato de potássio.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	2,0g
Fosfato hidrogenado dipotássico.....	2,0g
Sulfato de Magnésio.....	0,05g
Carbonato de Cálcio.....	0,02g
Sulfato ferroso.....	0,01g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,0 – 7,4

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.1.4 – Meio CZAPEK

NaNO3.....	2,0g
K_2HPO_4.....	1,0g
$MgSO_4.7H_2O$.....	0,5g
KCl.....	0,5g
FeSO4.....	0,01g
Sacarose.....	30,0g
Água destilada.....	1000 ml

pH 6,6

10.1.5 – ISP-1: Triptona-extrato de levedura – Pridham; Gottlieb,1948

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,0 – 7,2

10.1.6 – ISP-2: Extrato de malte-extrato de levedura – Pridham *et al*., 1957

Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose.....	4,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml

pH 7,2

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.1.7 – ISP-3: Agar – Farinha de Aveia – Kuster; Williams, 1964

Farinha de aveia.....	20,0 g
Solução de traços de sais.....	1,0 ml
Agar.....	18,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 7,2	

10.1.8 – ISP-4: Sais inorgânicos-amido-ágar

Amido solúvel (solução I).....	20,0 g
K_2HPO_4.....	2,0 g
$MgSO_4.7H_2O$.....	2,0 g
NaCl.....	2,0 g
(NH_4). 2 SO_4.....	4,0 g
$CaCO_3$.....	4,0 g
Solução de traços de sais.....	2,0 ml
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 7,0 – 7,4	

10.1.9 – ISP-7: Ágar Tirosina

Glicerol.....	15 g
L-tirosina.....	0,5 g
L-asparagina.....	1,0 g
Fosfato hidrogenado dipotássico.....	0,5 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Cloreto de sódio.....	0,5 g
Solução de traços de sais.....	1,0 ml
Sulfato de ferroso.....	0,01g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 7,3	

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.1.10 – MPE : Meio para produção de eurimicina – Kawamura, *et al*.,1976

Farinha de soja.....	20,0 g
Glicose.....	20,0 g
NaCl.....	5,0 g
$CaCO_3$.....	2,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 6,7 – 7,0	

10.1.11 – Meio Saboraud

Glicose.....	10,0 g
Peptona.....	10,0g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 5,6	

10.1.12 – Meio Saboraud-YE-O

Glicose.....	10,0 g
Peptona.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Óleo de oliva.....	5,0ml
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 5,6	

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.1.13 – TSA - Ágar Soja-Triptona

Peptona de soja	5,0 g
Triptona.....	
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Agar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH 5,6	

10.2 – SOLUÇÕES

10.2.1 – Antibióticos adicionados aos meios de cultura para o isolamento

10.2.1.1 – Soluções de Antibióticos para bactérias

Tetraciclina 100mg/ml de etanol.....	Concentração de uso no meio 100µg/ml
Cloranfenicol 100mg/ml de água.....	Concentração de uso no meio 100µg/ml

10.2.1.2 – Soluções de antibióticos para fungos

Nistatina 100mg/ml de água.....	Concentração de uso no meio 100µg/ml
Cicloexamida 100mg/ml de água.....	Concentração de uso no meio 100µg/ml

10.2.2 – Soluções utilizadas nos meios de cultura

10.2.2.1 – Solução I

Amido .....20 g

Água destilada .....500 mL

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.2.2.2 – Solução II

Fosfato hidrogenado dipotássico .....2 g
Sulfato de magnésio .....2 g
Cloreto de sódio .....2 g
Sulfato de amônio .....4 g
Carbonato de cálcio .....4 g
Água destilada .....500 mL

10.2.2.3 – Solução de traços de sais

Sulfato ferroso .....0,1 g
Cloreto de magnésio .....0,1 g
Sulfato de zinco ..... 0,1 g
Água destilada .....100 mL

10.2.3 – Soluções utilizadas na identificação da parede celular

10.2.3.1 – Solução de Ácido Clorídrico 6N

Ácido clorídrico .....18,4 mL
Água destilada .....100 mL

10.2.3.2 – Solução de n-Butanol Saturado

n-Butanol .....200 mL
Água destilada .....50 mL

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

10.2.3.3 – Solução de Ninhidrina 0,2%

Ninhidrina ..... 0,2 g
Butanol saturado .....100 mL

10.2.3.4 – Solução Padrão de Ácido Diaminopimélico (DAP)

Ácido Diaminopimélico .....1,9 g
Água destilada .....100 mL

10.2.3.5 – Solução para Cromatografia – fase móvel

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

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com