



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS



CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ENDOFÍTICOS DE *POLYGALA PANICULATA* POR ABORDAGEM OSMAC E PERFIL ENZIMÁTICO NO CONTROLE DE PATÓGENOS DE INTERESSE CLÍNICO

HECTOR ARIEL VENTURA MEJIA

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Professora Dra. Cristina Paiva de Sousa

Co Orientadora: Dra. Andréa Cristina Bogas

Bolsista (CNPq)- 134206/2019-3

São Carlos

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HECTOR ARIEL VENTURA MEJIA

AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DE ENDOFÍTICOS DE *POLYGALA PANICULATA* POR ABORDAGEM OSMAC E PERFIL ENZIMÁTICO NO CONTROLE DE PATÓGENOS DE INTERESSE CLÍNICO

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Professora Dra. Cristina Paiva de Sousa

Co Orientadora: Dra. Andréa Cristina Bogas

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Hector Ariel Ventura Mejia, realizada em 08/10/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Prof. Dr. José Dirceu Vollet Filho (IFSC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMIENTOS

À minha mãe Maria Elena Ventura Mejia por todos os ensinamentos, paciência e apoio incondicional, ao meu pai José Adolfo Ortega por todo bom exemplo de perseverança.

Agradeço à minha esposa, Lizeth Bustillo, por sua colaboração, risadas e apoio em todos os momentos durante esta etapa.

Meus amigos incondicionais Luis, Karen, Alberto, Camilo.

Agradeço à minha orientadora, Professora Cristina Paiva de Sousa pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Felipe de Paula por cada ajuda e gesto que me motivou a não desistir.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, CNPq e CAPES pelo financiamento da pesquisa, caso contrário não seria possível.

RESUMO

O gênero *Polygala* spp. ocorre naturalmente no Brasil, e apresenta de compostos alcalóides, flavonóides, terpenos, entre outros relatadas em espécies deste gênero, com propriedades farmacológicas, incluindo a antimicrobiana. Microrganismos endofíticos não causam danos aparentes aos seus hospedeiros, podendo ser isolados de tecidos vegetais sadios. Devido a crescente resistência microbiana, a prospecção de novos antimicrobianos é necessária. Este estudo objetivou caracterizar fenotipicamente, analisando micro e macroscopicamente, dois isolados bacterianos endofíticos (UNK3 e ROXO16) de *Polygala paniculata*, e avaliá-los quanto à produção de antimicrobianos e enzimas para o controle de patógenos clínicos. As colônias isoladas apresentavam crescimento lento, bordas irregulares, superfície lisa ou rugosa, e morfologia de bacilos longos/curtos e Gram positivos. Os isolados foram genotipicamente identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. O isolado UNK3 apresentou atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella* (isolada clinicamente) e *Candida albicans* ATCC 10231. O isolado ROXO16 apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. A avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em disco usando os extratos obtidos por bipartição com acetato de etila revelou que o isolado UNK3 iniciou a produção de substâncias bioativas no terceiro dia de cultivo contra os patógenos *E. coli*, *Salmonella*; no sexto dia contra *P. aeruginosa*, e no nono dia para *S. aureus*. Já o isolado ROXO16 apresentou atividade no terceiro dia contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella*, e ausência de atividade para *S. aureus* e *Candida albicans*. Na análise qualitativa enzimática o isolado UNK3 teve atividade celulolítica, amilolítica, pectinolítica e proteolítica, enquanto o isolado ROXO16 produziu celulase e protease. Utilizando a metodologia OSMAC (*One Strain Many Compounds*), na qual foram alteradas as fontes de carbono e nitrogênio, os endofíticos apresentaram maior bioatividade contra os microrganismos avaliados neste estudo, do que cultivados em condições de fermentação sem alterações. Os resultados obtidos até o momento demonstram o potencial promissor das bactérias endofíticas *Bacillus*

sp. UNK3 e ROXO16 de *P. paniculata* para a produção de antimicrobianos no controle de patógenos clínicos, e também para futuras aplicações industriais.

Palavras chave: Endofíticos, Metabólitos Secundários, Antimicrobianos, Enzimas, *Polygala* spp., Resistência Microbiana.

ABSTRACT

The genus *Polygala spp.* occurs naturally in Brazil. The presence of alkaloids, flavonoids, terpenes, among others were reported in species of this genus. The anti-inflammatory, anxiolytic, trypanocidal and antimicrobial activities stand out. Endophytic microorganisms do not cause apparent damage to their hosts and can be isolated from healthy plant tissues and superficially disinfected. Endophytes have been considered a source of natural products, including those with antimicrobial activity for the control of pathogens. Considering the growing microbial resistance, bioprospection of new antimicrobials are necessary. This study aimed to characterize phenotypically, through micro and macroscopic analyzes, two endophytic bacterial isolates (UNK3 and ROXO16) of *Polygala paniculata*, and to evaluate them for the production of antimicrobials and enzymes for the control of clinical pathogens. Phenotypic analyzes showed typical colonies of *actinomycetes* with slow growth, irregular borders with smooth or rough surface and Gram positive bacilli of different shapes, being short or long. The evaluation of antimicrobial activity revealed that the UNK3 isolate has relative activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella* (clinically) and *Candida albicans* ATCC 10231. It was observed activity for *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* and negative for *E. coli* and *Salmonella*. An analysis of the bipartition of the extract with ethyl acetate, followed by the antimicrobial evaluation by the disk diffusion method, revealed that the UNK3 set started the production of bioactive substances on the third day; *E. coli*, *Salmonella*, on the sixth day for *P. aeruginosa*, and for *S. aureus* on the ninth day. ROXO16 isolate, the onset of activity was on the third day against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Salmonella* and negative for *S. aureus* and *C. albicans*. Qualitative enzymatic analysis consolidated that the UNK3 isolate had cellulolytic, amylolytic, pectinolytic and proteolytic activity, while the ROXO16 isolate produced cellulase and protease. Using the OSMAC methodology, it was determined that endophytic microorganisms present an increase in the production of metabolites, the modification of the carbon source and the nitrogen source resulted in greater bioactivity and even against new microorganisms, than those incubated under normal conditions. introduce you. The results obtained so far demonstrate the promising potential of the endophytic bacteria UNK3 and ROXO16 from *P.*

paniculata for the production of antimicrobials and also for future industrial applications.

Keywords: Antimicrobials, Endophytes, Metabolites, Polygalaceae, Enzymatic potential, microbial resistance

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Características fenotípicas do isolado *Bacillus* sp. (UNK3). (A e B) Morfologia das colônias em meio de cultura. (C) Morfologia celular (100X)31
- Figura 2:** Características fenotípicas do isolado *Bacillus* sp. (ROXO16). (A e B) Morfologia das colônias em meio de cultura. (C) Morfologia celular (100X). 31
- Figura 3:** Identificação molecular, porcentagem de concordância de 100% para o gênero *Bacillus*,..... 32
- Figura 4:** Atividades enzimáticas do endofítico *Bacillus* sp. (UNK3). (A) Celulolítica; (B) Amilolítica (C); Pectinolítica e (D) Proteolítica 33
- Figura 5:** Atividades enzimáticas do endofítico *Bacillus* sp. (ROXO16). (A) Celulolítica; e (B) Proteolítica.
- Figura 6:** Curva de cinética de crescimento dos endofíticos *Bacillus* sp. (UNK3) e *Bacillus* sp. (ROXO16).....35
- Figura 7** Atividades antimicrobianas do endofítico *Bacillus* sp. (UNK3), verificadas por meio da formação de halos de inibição contra os microrganismos patogênicos (A) *S. aureus*; (B) *P. aeruginosa*; (C) *E. coli*; (D) *C. albicans*; (E) *Salmonella*.....36
- Figura 8:** Atividades antimicrobianas do endofítico *Bacillus* sp. (ROXO16), verificadas por meio da formação de halos de inibição contra os microrganismos patogênicos (A) *S. aureus*; (B) *P. aeruginosa* e (C) *C. albicans*..... 37
- Figura 9:** Atividades antimicrobianas dos extratos com acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados do endofítico *Bacillus* sp. (UNK3) após 3, 6, 9 e 12 dias contra *P. aeruginosa*; (B) *E. coli*; e (C) *Salmonella* 38
- Figura 10:** Atividades antimicrobianas dos extratos com acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados do endofítico *Bacillus* sp. (ROXO16)

após 3, 6, 9 e 12 dias contra (A) *Salmonella*; (B) *P. aeruginosa*; e (C) *E. coli*...39

Figura 11: Halos de inibição do crescimento dos patógenos (A) *E. coli*. (B), *P. aeruginosa* (C), *Salmonella sp* (D) e *C. albicans*. produzidos pela atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação das concentrações de glicose para o endofítico *Bacillus sp* (UNK3) após 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo 41

Figura 12: Atividades antimicrobianas dos extratos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação das concentrações de glicose para o endofítico *Bacillus sp*. (ROXO 16) 42

Figura 13: Atividades antimicrobianas dos extratos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação das concentrações de NH₄Cl para o endofítico *Bacillus sp*. (UNK3) 44

Figura 14: Atividades antimicrobianas dos extratos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação das concentrações de NH₄Cl para o endofítico *Bacillus sp*. (ROXO16) 45

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Sequenciamento do gene 16S do RNA ribossômico, formato fasta...32

Tabela 2. Resultados percentuais das atividades enzimáticas das bactérias endofíticas *Bacillus sp*. (UNK3) e *Bacillus sp*. (ROXO16) 33

Tabela 3: Curva de cinética de crescimento dos endofíticos *Bacillus sp* UNK3 e *Bacillus sp* ROXO16 quantificação de UFC.mL⁻¹ a cada 24 horas..... 35

Tabela 4: Atividades qualitativas antimicrobianas dos endofíticos *Bacillus sp* UNK3 e *Bacillus sp* ROXO16 avaliadas por meio do teste de sobrecamada ...36

Tabela 5: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados sem modificação no meio para *Bacillus sp* (UNK3) contra patógenos, *S. aureus*; *P. aureginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar 38

Tabela 6: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados sem modificação no meio para para *Bacillus sp* (ROXO16) contra patógenos *S. aureus*; *P. aureginosa*; *E. coli*; *C.*

<i>albicans</i> ; <i>Salmonella</i> , determinados pela técnica de difusão em ágar.....	39
Tabela 7: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de glicose para <i>Bacillus</i> sp (UNK3), contra os patógenos, <i>S. aureus</i> ; <i>P. aureginosa</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>Salmonella</i> , determinados pela técnica de difusão em ágar	40
Tabela 8: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de glicose para <i>Bacillus</i> sp (ROXO16) contra patógenos, <i>S. aureus</i> ; <i>P. aureginosa</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>Salmonella</i> , determinados pela técnica de difusão em ágar	42
Tabela 9: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de Cloreto de Amônio (NH ₄ Cl) para <i>Bacillus</i> sp (UNK3), contra os patógenos, <i>S. aureus</i> ; <i>P. aureginosa</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>Salmonella</i> , determinados pela técnica de difusão em ágar	43
Tabela 10: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de Cloreto de Amônio (NH ₄ Cl) para <i>Bacillus</i> sp (ROXO16)), contra os patógenos, <i>S. aureus</i> ; <i>P. aureginosa</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>C. albicans</i> ; <i>Salmonella</i> , determinados pela técnica de difusão em ágar	44

SÍMBOLOS E ABREVIações

ATCC: *American Type Culture Collection*

CaCl₂.2H₂O: Cloreto de cálcio dihidratado

D.O: Densidade ótica

H₂O_{dd}: Água destilada deionizada

ISP2: *International Streptomyces Project 2*

KH₂PO₄: Fosfato monobásico de potássio

MgSO₄.7H₂O: Fosfato de magnésio heptahidratado

MH: *Müller-Hinton*

MRSA: *Meticilin Resistent Staphylococcus aureus*

Na₂HPO₄.7H₂O: Fosfato de sódio dibásico heptahidratado

Na₂HPO₄.7H₂O: Hidrogenofosfato dissódico heptahidratado

NaCl: Cloreto de sódio

NH₄Cl: Cloreto de amônio

Rpm: Rotações por minuto

TSB: *Tryptic Soya Broth*

UFC.mL⁻¹: Unidade formadora de colônia por mL

v/v: Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Mata Atlântica	15
2.2. <i>Polygala</i> spp. e propriedades medicinais.....	15
2.3. Microrganismos endofíticos.....	16
2.4. Aplicações Biotecnológicas de Microrganismos Endofíticos	17
2.5. Atividade Antimicrobiana.....	19
2.6. Abordagem OSMAC	22
3. OBJETIVOS	23

3.1.	Objetivo Geral.....	23
3.2.	Objetivos específicos.....	23
4.	MATERIAI E MÉTODOS	24
4.1.	Material Biológico.....	24
4.2.	Identificação fenotípica das bactérias endofíticas.....	24
4.3.	Identificação genotípica das bacterias endofíticas.....	25
4.4.	Avaliação da atividade enzimática.....	26
4.4.1.	Atividade amilolítica.....	26
4.4.2.	Atividade celulolítica.....	27
4.4.3.	Atividade Pectinolítica.....	27
4.4.4.	Atividade lipolítica.....	27
4.4.5.	Atividade esterásica.....	27
4.4.6.	Atividade proteolítica.....	28
4.5.	Cinética de crescimento das bacterias endofíticas.....	28
4.6	Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana.....	28
4.7	Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos abordagem OSMAC	29
4.7.1	Alteração da concentração de glicose.....	29
4.7.2	Adição de cloreto de amônio (NH ₄ Cl).....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Análises fenotípicas.....	31
5.2	Identificação genotípica das bacterias endofíticas.....	32
5.3	Avaliação da atividade enzimática.....	33
5.4	Cinética de crescimento.....	35
5.5	Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana.....	36
6.	Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos mediante abordagem OSMAC.....	40
6.1	Alteração da concentração de glicose ROXO16 e UNK3.....	40
6.2	Adição de cloreto de amônio (NH ₄ Cl) ROXO16 e UNK3.....	43
7.	CONCLUSÕES	46
8.	BIBLIOGRAFIA	47

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Polygala* spp. é conhecido pela presença abundante de salicilato de metila e é amplamente utilizado para o tratamento de lesões e entorses (Klein-Júnior *et al.*, 2013). Outros estudos relevantes mostram que compostos como alcalóides, flavonóides, terpenos, ligninas e cumarinas também foram encontrados nestas plantas. Vários efeitos farmacológicos têm sido relatados para os extratos brutos de *P. cyparissias* e *P. sabulosa*, tais como anti-inflamatório, atividade tripanocida, antinociceptivo e atividade antimicrobiana em *P. myrtifolia* (Lacaille-Dubois *et al.*, 2020; Nucci-Martins *et al.*, 2016; M G Pizzolatti *et al.*, 2003).

Alguns estudos (Ratti, 2009; Serrano *et al.*, 2012) têm demonstrado que os tecidos vegetais representam uma importante fonte de substâncias naturais de interesse farmacêutico e biotecnológico. A maioria desses compostos é produzida por microrganismos que vivem em íntima interação com a planta hospedeira sem causar danos, portanto, são conhecidos como endófitos .

Endófitos são definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas, estabelecendo com estas relação de simbiose. Assim, através da produção de antimicrobianos, enzimas e outros metabólitos secundários, eles inibem o crescimento e a atividade de patógenos e promovem o crescimento vegetal (Vandana *et al.*, 2021).

Os microrganismos endofíticos produzem não apenas novos compostos bioativos, como também os mesmos produzidos por suas plantas hospedeiras (dos Santos & Varavallo, 2011). Assim, endófitos são considerados uma fonte natural de metabólitos secundários bioativos que podem ser empregados para os mais diferentes fins biotecnológicos.

As enzimas produzidas por microrganismos endofíticos são de grande interesse industrial. Trata-se de uma alternativa sustentável aos processos tradicionais que, em geral exigem condições mais extremas de pH, temperatura e pressão, o que os torna mais custosos, além de haver a geração de resíduos potencialmente poluentes (Adrio & Demain, 2010).

Antimicrobianos são outra importante classe de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos (Christina *et al.*, 2020), e estudos

têm demonstrado significativa atividade no controle de patógenos de interesse em saúde pública (Wu *et al.*, 2018; Sebastianes *et al.*, 2012).

Considerando que o crescente aumento da resistência microbiana é um dos principais problemas relacionados ao cuidado à saúde da atualidade, pois impacta diretamente nas opções de tratamento, no aumento da mortalidade, no controle de infecção e nas questões econômicas (Founou *et al.*, 2017), pesquisas por novas drogas antimicrobianas efetivas tem sido necessárias.

Assim, estudos de bioprospecção de microrganismos endofíticos são promissores para a descoberta de novas substâncias usadas na terapêutica humana, pois naturalmente os endófitos produzem moléculas capazes de inibir microrganismos fitopatogênicos (G. A. Strobel, 2002, 2003). Outro benefício dos metabólitos secundários produzidos pelos endofíticos é o fato dessas moléculas apresentarem maior “droga-semelhança” e similaridade biológica do que as moléculas totalmente sintéticas (Koehn & Carter, 2005) o que os tornam bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Apesar de ser uma rica fonte de produtos naturais, o potencial dos endófitos, em geral, ainda é pouco explorado (Lacava e Azevedo, 2014). Um exemplo é o fato de que há um dos poucos trabalhos relacionado a produção de antimicrobianos por bactérias endofíticas de *Polygala* spp. e que, inclusive, apresentaram amplo espectro de ação contra patógenos multirresistentes (Nogueira Cruz, 2018). Isso demonstra, mais uma vez, o potencial promissor dos endófitos e como a investigação das bactérias de *Polygala* spp. pode trazer resultados inovadores, principalmente levando em conta que podem produzir os mesmos compostos bioativos da planta hospedeira. A abordagem “One Strain Many Compounds” (OSMAC), que consiste em promover pequenas mudanças no cultivo, pode mudar completamente o perfil metabólico em várias cepas (Romano *et al.*, 2018).

Assim, este estudo caracterizou fenotipicamente e identificou molecularmente dois isolados bacterianos de *P. paniculata*, e avaliou o potencial destes endófitos para a produção de antimicrobianos contra patógenos humanos, e também para a produção de enzimas de interesse biotecnológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mata Atlântica

O território brasileiro apresenta uma imensa biodiversidade, que representa cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Nesse contexto, o país tem grande potencial na busca e no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos e na expansão da propriedade intelectual (Joly *et al.*, 2011).

Em termos de biodiversidade, o Brasil é um país privilegiado, pois possui grandes biomas como a Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado Tropical Brasileiro que, juntos, respondem por quase 80% do território (Lacava & de Sousa, 2016). Por esse motivo, a Mata Atlântica é considerada um dos 25 *hotspots* para a conservação da biodiversidade em todo o mundo, (Myers *et al.*, 2000; E. C. Santos *et al.*, 2014). O bioma da Mata Atlântica está localizado na costa leste da América do Sul, que compreende um grande complexo de tipos florestais, geralmente extensos, chuvosos, tropicais e subtropicais, onde a variedade de formações e composições florísticas são modeladas por influências climáticas (Agnello, 2007). Plantas e endófitos mais promissores para aplicações biotecnológicas são aqueles que crescem em áreas de alta biodiversidade ou, ainda, que possuem diferentes estratégias de sobrevivência ou possuem histórico de uso popular.

2.2 *Polygala* spp. e propriedades medicinais

O gênero *Polygala* é o maior da família *Polygalaceae*. São ervas e subarbustos caracterizados por seus racemos simples, flores zigomórficas, frutos da cápsula de ródio, sementes com endosperma e embrião contínuo ou invaginado. Sua distribuição é pantropical, e um grande número de espécies está concentrado na América e na África (Marques, 2003).

Uma característica marcante em muitas espécies do gênero *Polygala*, como *P. cyparissias* e *P. paniculata*, é o acúmulo de salicilato de metila em suas raízes, sendo o principal composto responsável pelas características organolépticas dessas espécies (Victório *et al.*, 2011). Além disso, outras espécies de *Polygala* têm sido relatadas há muito tempo no controle ou tratamento de várias doenças, e muitos estudos têm mostrado a presença de

uma variedade de compostos fitoquímicos nessas espécies, como xantonas (Pinheiro *et al.*, 1998) saponinas (Nagai *et al.*, 2001; Moacir Geraldo Pizzolatti *et al.*, 2004) alcalóides (Baoyuan & Jeonghill, 1993) flavonóides glicosilados (Rao & Raman, 2004), cumarinas e estirilpirona (de Paula Nogueira Cruz *et al.*, 2021)

2.3 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por de Bary (1866), que considerou que eles não produziam efeitos prejudiciais nem benéficos às suas plantas hospedeiras. De acordo com Mendes e Azevedo (2007), os endófitos podem ser classificados em tipo I, que não produzem estruturas externas à planta, e tipo II que desenvolvem estruturas externas às plantas.

Os endófitos foram pouco estudados até a década de 70, época em que verificou-se que havia uma relação benéfica entre esses microrganismos e a planta hospedeira, observada por meio da proteção contra insetos praga, fitopatógenos e herbívoros, já que possuem a capacidade de produzir compostos naturais bioativos para inibir o crescimento destes organismos e, assim, prover vantagem seletiva para a planta hospedeira (Cruz *et al.*, 2020; Pacifico *et al.*, 2019).

De acordo com Hallmann *et al.* (1997), endófitos podem ser isolados do interior de tecidos e órgãos vegetais após desinfecção superficial. Assim, já foram isolados de flores, sementes, folhas, frutos, raiz e caule (de Sousa *et al.*, 2017; Neris *et al.*, 2017). Uma grande variedade de espécies bacterianas pode ser isolada a partir de uma única planta (Kobayashi & Palumbo, 2000). Existem aproximadamente 300.000 espécies de plantas na terra e cada uma delas deve ser hospedeira de pelo menos um microrganismo endofítico (Strobel & Daisy, 2003).

Por meio da relação de simbiose, endófitos podem produzir as mesmas substâncias químicas da planta hospedeira (Silva Santos *et al.*, 2013). Foi principalmente após a descoberta do taxol, um antitumoral produzido por *Taxomyces andreanae*, fungo endofítico associado à *Taxus brevifolia* (Stierle *et al.*, 1993) que os microrganismos endofíticos passaram a ser mais explorados

para diversos fins biotecnológicos para aplicações na agricultura, medicina e indústria (Khan *et al.*, 2017.; Martinez-Klimova *et al.*, 2017).

2.4 Aplicações Biotecnológicas de Microrganismos Endofíticos

O mercado global de enzimas possui uma especulação positiva, sendo previsto um crescimento anual de 4,7% entre os anos de 2016 a 2021, quando se estima o alcance do valor de US\$ 6,3 bilhões (Dewan, 2017). De acordo com (Adrio & Demain, 2010) cerca de 150 processos industriais utilizam enzimas provenientes de microrganismos ou processos microbianos.

Enzimas são, em sua maioria, capazes de diminuir a energia de ativação de determinadas reações químicas, sendo, portanto, catalisadores biológicos com alta especificidade pelo substrato, podendo aumentar a velocidade das diversas reações bioquímicas que ocorrem nas células. Estão presentes em todos os seres vivos e são de suma importância para a manutenção da vida. Além disso, as enzimas são fundamentais na degradação da matéria orgânica, nos processos infecciosos e na deterioração dos alimentos (Nelson & Cox, 2018). Dessa forma, suas atividades podem ser estendidas aos diversos processos biotecnológicos, que se estendem desde a indústria alimentícia até a farmacêutica.

As enzimas mais estudadas para aplicações biotecnológicas são de origem animal ou vegetal (Orlandelli *et al.*, 2012). No entanto, o interesse por enzimas produzidas por microrganismos tem aumentado, principalmente em função da alta capacidade de produção em grande escala, da facilidade de manipulação genética e do baixo custo, que conferem vantagens frente aos processos químicos tradicionais (Adrio & Demain, 2010; Johnson, 2013).

Dentre os microrganismos de interesse para a produção de enzimas destacam-se os microrganismos endofíticos, amplamente aceitos como um importante recurso econômico para a bioprospecção de novas moléculas e enzimas, uma vez que são considerados um reservatório para novos metabólitos secundários com grande potencial de aplicação nas indústrias agrícola, farmacêutica e alimentícia (Lacava & Azevedo, 2014; Pimentel *et al.*, 2011; Strobel & Daisy, 2003).

As amilases podem ser utilizadas como aditivo de detergentes, na sacarificação do amido, e na indústria de papel, têxtil e fermentação (Reis, 2015), empregadas também nos processos de hidrólise parcial ou completa do amido. Essa classe de enzimas é utilizada, principalmente, na indústria de alimentos, onde é empregada na preparação de geléias, cervejas e obtenção de glicose (Rodrigues *et al.*, 2015).

As celulasas são um homopolímeros composto por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4). Essas enzimas catalisam a quebra das ligações glicosídicas entre resíduos de D-glicose na molécula de celulose ou de seus derivados solúveis, e é a principal constituinte das paredes celulares, o componente mais abundante dos vegetais e também do planeta (Koblitz, 2000; SILVA JÚNIOR, 2014). Historicamente, as celulasas são amplamente utilizadas na indústria de papel e celulose, bem como na indústria têxtil. Nos últimos anos têm sido muito utilizadas em outros setores como nas indústrias de alimentos, ração para animais, produção de reagentes químicos, e mais recentemente têm sido empregadas com sucesso na sacarificação da biomassa lenhocelulósica pré-tratada para a produção de biocombustíveis de segunda geração e nas indústrias de detergentes (Franco-Cirigliano *et al.*, 2013; Kuhad *et al.*, 2011)

As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930 e, somente a partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, é que os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente (Kashyap *et al.*, 2000). Durante as duas últimas décadas, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose, também são utilizadas para reduzir o de amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e b-glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extravirgem e reduz a indução ao ranço (Uenojo & Pastore, 2007)

As lipases e esterases, denominadas “enzimas lipolíticas”, são amplamente distribuídas na natureza, estando presente em animais, vegetais e microrganismos. Trata-se de um grupo de hidrolases capaz de catalisar a quebra

e a formação de ligações éster. A diferença entre essas enzimas está no fato das lipases terem como substrato acilgliceróis de cadeia longa, com cadeia acila composta por mais de 10 carbonos, e as esterases serem capazes de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia curta, ou seja, inferior a 10 carbonos, (Lopes *et al.*, 2011; Ghaly *et al.*, 2010; Jaeger *et al.*, 1997; Verger, 1997) Na indústria são amplamente empregadas em processos que envolvem síntese orgânicas, como fabricação de detergentes, papel e celulose, na síntese de biopolímeros e biodiesel (Cortez *et al.*, 2017).

As proteases correspondem aproximadamente a 60% do mercado mundial de enzimas e são capazes de clivar as ligações peptídicas e por isso participam de inúmeros processos fisiológicos. (Adrio & Demain, 2014). As principais utilizações estão na indústria de detergentes, onde uma alcalase produzida pelo *Bacillus licheniformis*, foi empregada pela primeira vez em 1956 (Pandey *et al.*, 2000). Também são empregadas na indústria alimentícia, principalmente para a produção de queijos, e também nas indústrias de bebidas, processamento de pele e couro, indústria farmacêutica, de amaciamento e têxtil (Ladeira *et al.*, 2010; Merheb, 2007).

2.5 Atividade Antimicrobiana

Os antibióticos foram uma das maiores descobertas do século XX. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, é um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da medicina e da farmácia. Se conjugarmos a inovação científica com os benefícios ao nível da saúde pública e, conseqüentemente, os ganhos no plano da economia civilizacional, podemos afirmar que a descoberta da penicilina foi a conquista mais relevante da história da ciência novecentista, que verificou a inibição de *Staphylococcus aureus* por um fungo posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium sp.* Assim, a penicilina, tornou-se o primeiro antibiótico do mundo e alterou para sempre a história da humanidade, (Pereira & Pita, 2018).

A resistência aos antibióticos é um dos principais problemas relacionados ao cuidado à saúde da atualidade, pois impacta diretamente nas opções de tratamento, e tem como conseqüências, o aumento da morbidade, mortalidade

e da internação hospitalar, o prolongamento das doenças, a perda da produtividade, o aumento dos custos e maior risco de complicações no aumento da mortalidade, no controle de infecção e também nas questões econômicas. (Pereira & Pita, 2018).

Os antibióticos tendem a perder sua eficácia com o passar do tempo devido ao surgimento e disseminação de resistência pelos agentes patogênicos (Rossolini *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 90% das linhagens bacterianas são resistentes à drogas de primeira linha e, portanto, a busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana é urgente (Cirino, 2014).

Entre os microrganismos que apresentando resistência a drogas, destacam-se a levedura *Candida albicans*, e as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona* e *Salmonella* (Sanglard, 2016). Dentre os mecanismos de resistência estão a mutação e recombinação mitóticas, a super expressão de bombas de efluxo de íons e a formação de biofilmes, (Cantón & Morosini, 2010).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo constituinte da microbiota humana em cerca de 30% da população mundial. Coloniza principalmente pele e mucosas, e tem sido considerado o principal causador de bacteremia e endocardite infecciosa em indivíduos imunossuprimidos (Tong *et al.*, 2015; Wertheim *et al.*, 2005).

Até a década de 1950 as infecções causadas por *S. aureus* eram tratadas com penicilina. Entretanto, com o surgimento de cepas resistentes, fizeram-se necessários o desenvolvimento de novos medicamentos. Assim, surgiu a meticilina, desenvolvida em laboratório, tendo seu mecanismo de ação baseado no anel beta lactâmico modificado (HAUSER, 2009). A partir da década de 1960 surgiram os primeiros relatos de cepas resistentes a meticilina, que foram denominadas *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA). Inicialmente, os casos ficaram restritos ao ambiente hospitalar, até que em 1990 uma nova linhagem denominada *S. aureus* resistente à meticilina associado à comunidade (CA-MRSA) passou a ser reportada em indivíduos que não apresentavam fatores de risco (Boyce, 2008).

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que normalmente é encontrada no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, incluindo o ser

humano. Representa cerca de 80% da microbiota aeróbia e participa da síntese de vitamina K (Alves *et al.*, 2017; Korb *et al.*, 2013). A falta de informação e de acompanhamento no uso de antibióticos fez com que muitas bactérias tornassem-se resistentes a eles, sendo responsável por até 90% dos casos de infecção urinária e 50% das infecções nosocomiais (CUNHA, 2019). Assim, na década de 90 a resistência de *E. coli* à amoxicilina e à ampicilina chegou a 40%. (Assis, 2018).

A levedura *C. albicans* é um microrganismo eucarioto, diploide, que se multiplica por brotamento, mas que também pode desenvolver tubo germinativo (Vieira & Santos, 2017). Fazendo parte da microbiota humana, pode habitar o trato gastrointestinal, pele, e mucosa do trato respiratório. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, esse microrganismo comensal pode tornar-se um agente infeccioso, podendo ser fatal em 42% dos casos (Abreu, 2010). O uso indiscriminado de antifúngicos, somado ao fato que esses medicamentos, incluindo o fluconazol, não têm ação micocida, tem contribuído para o desenvolvimento de cepas droga-resistentes (Assis, 2018).

P. aeruginosa é um dos patógenos nosocomiais globalmente dominantes, produz uma ampla gama de infecções, algumas tão severas como pneumonia ou bacteremia, quadro que se complica mais ainda devido a sua resistência intrínseca a diversos antibióticos. Sua notável capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência associada com elevados índices de mortalidade, a colocam como um sério problema de saúde pública e de grande importância para indivíduos imunocomprometidos (Turner *et al.*, 2014). No Brasil, este patógeno é um dos principais agentes em infecções hospitalares e pode provocar diversos tipos de processos clínicos. Atualmente, um dos maiores desafios é a resistência apresentada diante de inúmeros antimicrobianos. Além da resistência intrínseca, facilmente desenvolve mecanismos de resistência adicionais, através de mutações e da aquisição de elementos genéticos móveis, por exemplo. Dessa forma, *P. aeruginosa* é considerada um patógeno multirresistente, o que limita as alternativas terapêuticas capazes de combatê-lo. (I. de A. L. Santos *et al.*, 2015)

Salmonella spp., em conformidade com a definição geral da família Enterobacteriaceae, são bactérias Gram negativas, geralmente móveis (flagelos peritricosos), facultativamente anaeróbicas, colônias de cerca de 2–4 mm de

diâmetro. (Popoff & Le Minor, 2015). São entéricas, sendo responsáveis por graves intoxicações alimentares, e um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (Chávez-de la Peña *et al.*, 2001).

Tendo em vista o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos clínicos, os microrganismos endofíticos apresentam-se como uma fonte promissora para a prospecção de novos antimicrobianos (Das *et al.*, 2017).

2.6 Abordagem OSMAC

O método tradicional de cultura única pode restringir a atividade das vias metabólicas dos microrganismos e, como resultado, muitos metabólitos podem não ser sintetizados (Wei *et al.*, 2010). Uma forma de ampliar e investigar a diversidade de metabólitos secundários é o uso da abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds*). Esse método busca, basicamente, imitar as condições enfrentadas pelo microrganismo em seu habitat natural, mudando, assim, a composição do meio de cultura, luminosidade, período de cultivo, pH, temperatura, salinidade entre outros, afim de maximizar a diversidade de metabólitos produzidos por uma única linhagem de cepa cultivada (Bode *et al.*, 2002).

Estudos já constataram que por condições naturais a produção de metabólitos produzidos por endófitos pode ser inconsistente com o sequenciamento de genes de biossíntese nesses organismos (ROMANO *et al.*, 2018), e que o uso da OSMAC possibilitou um efeito real na expressão gênica e, conseqüentemente, na produção de uma variedade de metabólitos (LI *et al.*, 2016).

Serrano *et al.* (2012) usaram a abordagem OSMAC para estudar metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzidos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. O extrato total proveniente do caldo de fermentação foi utilizado para pesquisa e isolamento de novos antimicrobianos contra patógenos clínicos. Os autores destacaram que a concentração inicial de glicose teve grande influencia na produção dos metabólitos pelo endofítico, demonstrando que esta abordagem é importante para o desenvolvimento de estratégias para modular a produção de moléculas antimicrobianas por *P. polymyxa* RNC-D. (Vu *et al.*, 2019; Chandrakar & Gupta, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de enzimas e metabólitos secundários bioativos produzidos por bactérias endofíticas associadas à *Polygala paniculata*.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterização macro e micro morfológica dos microrganismos endofíticos UNK3 e ROXO16

2. Avaliar a atividade enzimática das bactérias endofíticas UNK3 e ROXO16.

3. Avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana de extratos bioativos produzidos pelas das bactérias endofíticas UNK3 e ROXO16, por meio de fermentação em meios de cultura sem modificações frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Salmonella* (origem clinica), Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 10231, potencialmente patogênicas.

4. Avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana de extratos bioativos produzidos pelas das bactérias endofíticas UNK3 e ROXO16, por meio de fermentação em meios de cultura com modificações das fontes de carbono e nitrogênio frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella* (origem clinica), Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* potencialmente patogênicas.

4 MATERIAI E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Todos os microrganismos usados neste estudo estão depositados na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar, São Carlos/SP.

Foram usadas as cepas bacterianas endofíticas códigos Roxo16 e UNK3 isoladas de *P. paniculata* coletadas na cidade de Peruíbe - SP (Latitude: -24° 19' 12" /Longitude: -46° 59' 54") (Cruz, 2018). A confirmação desta espécie foi realizada no Departamento de Botânica da UFSCar (Linnaeus 1759, Marques & Gomes, 2002), e depositada nos herbários da Universidade e do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, estando registrada no Sistema Brasileiro de Recursos genéticos (SisGen AF1A75A) (Cruz *et al.*, 2021).

As cepas patogênicas de importância médica utilizadas foram *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 11775, *P. aeruginosa* ATCC-27853, *Salmonella* (isolada clinicamente) e *C. albicans* ATCC 10231.

4.2 Identificação fenotípica das bactérias endofíticas

Para a análise fenotípica, baseada em análises micro e macroscópicas, as bactérias estocadas em glicerol e mantidas em freezer à -80 °C foram inicialmente reativadas em caldo ISP2 (Extrato de levedura 4,0 g, extrato de malte 10,0 g, Dextrose 4,0 g, Água destilada 1,000 ml, pH 7.2) por 24 horas à 28 °C. Em seguida as bactérias foram semeadas pelo método de esgotamento de estrias em placas Petri contendo o meio de cultura ISP2, e estas placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C.

Na análise macroscópica foram observados os aspectos morfológicos da colônia como forma da borda, textura, presença ou ausência de pigmentos (Sousa *et al.*, 2013). Já para a análise microscópica, foi utilizado o método coloração de Gram e avaliados a classificação das células quanto à composição da parede celular (Gram positivo e Gram negativo), e as formas, tais como bacilos, cocos, diplococos e até mesmo grupos como paliçadas e aglomerados.

(Murray *et al.*, 2017) As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon MODELYS2-H.

4.3. Identificação genotípica das bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas foram identificadas pela amplificação e sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal. O DNA foi isolado de acordo com Aljanabi & Martinez (1997) usando uma cultura de 2 dias. O DNA foi eluído em 50-100 µL de H₂O ultrapura e incubado a 37 ° C para reidratação. O conjunto de iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1500R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') foi utilizado na amplificação do gene 16S rRNA. A mistura de reação de 30 µL continha 1x tampão de reação de alta fidelidade, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mistura de dNTP, 2 U de *Taq High Fidelity Pol* (5U / µL) (Cellco Biotec), de 25 a 50 ng de DNA e um pmol de cada primer. As condições da PCR foram uma desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 min, seguida de 35 ciclos a 94 ° C durante 1 min, 50 ° C durante 1 min, 72 ° C durante 2 min e uma extensão final a 72 ° C por 20 minutos. O amplicon de PCR de 400 pb, foi então examinado por eletroforese em gel de agarose 0,7% e purificado usando um kit de purificação de PCR QIAquick®, de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos das reações (cerca de 400 pb) foram analisados em gel de agarose (1 % p/v) em tampão TAE 1X e corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, juntamente com o marcador de peso molecular 1Kb (KASVI, Itália), e analisados em fotodocumentador (Gel Doc EZ System – Bio - Rad).

O sequenciamento parcial do gene 16S rDNA foi realizado no setor de sequenciamento de DNA do centro de pesquisa sobre genoma humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo – USP/São Paulo, usando o

conjunto de iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1500R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

As sequências foram analisadas através da ferramenta de pesquisa de similaridade local básica (BLASTn) (Altschul, Gish, Miller, Myers & Lipman, 1990) do banco de dados National Center for Biotechnology Information Search (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.4 Avaliação da atividade enzimática

Para a avaliação qualitativa da produção das enzimas amilase, celulase, pectinase (pH 5 e 8) protease, lipase e esterase, as bactérias estocadas em glicerol e mantidas em freezer à -80 °C foram inicialmente reativadas em caldo ISP2 por 24 horas à 28 °C. Em seguida as bactérias foram semeadas pelo método de esgotamento de estrias em placas Petri contendo o meio de cultura ISP2, e estas placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C.

O inóculo foi preparado transferindo-se duas alçadas de cada bactéria endofítica para um tubo de vidro com capacidade de 20 mL contendo 10 mL de caldo ISP2, seguido de incubação por 24 horas a 28° C e 120 rpm em shaker orbital. Um inóculo de 10 ml foi ajustado (D.O. 0,3-0,6; em comprimento de onda de 600 nm) e 5 µL foram transferidos em placas de Petri contendo os meios necessários para a análise enzimática. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata (Specian *et al.*, 2016) .

Abaixo estão descritas a composição de cada um dos meios utilizados nos ensaios enzimáticos.

4.4.1 Atividade amilolítica

Fórmula por Litro de H₂Odd: 10 g de Amido solúvel; 5g de Extrato de levedura; 12,8g de Na₂HPO₄.7H₂O; 3g KH₂PO₄; 0,5g de NaCl; 1g de NH₄CL; 5g de MgSO₄.7H₂O; 0,01g CaCl₂.2H₂O; 15g de Ágar. O pH foi ajustado para 7,2. Após os crescimentos bacterianos foram adicionados 10 mL de solução de iodo (1%) na placa de Petri, que foi lavada quase imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase.

4.4.2 Atividade celulolítica

Fórmula por Litro de H₂O_{dd}: 10 g de Carboximetilcelulose; 5 g de Extrato de Levedura; 12,8 g Na₂HPO₄·7H₂O; 3g KH₂PO₄; 0,5 g de NaCl; 1 g de NH₄CL; 5 g de MgSO₄·7H₂O; 0,01 g CaCl₂·2H₂O; 15 g de Ágar. O pH foi ajustado para 7,2. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL do corante vermelho congo (1%). As placas de Petri foram lavadas depois de 15 minutos com NaCl (5 M). A presença de um halo amarelado ou alaranjado em torno da colônia indicou atividade celulolítica.

4.4.3 Atividade Pectinolítica

Fórmula por Litro de H₂O_{dd}: 10 g de Carboximetilcelulose; 5 g de Extrato de Levedura; 12,8 g Na₂HPO₄·7H₂O; 3g KH₂PO₄; 0,5 g de NaCl; 1 g de NH₄CL; 5 g de MgSO₄·7H₂O; 0,01g CaCl₂·2H₂O; 15 g de Ágar. O pH foi ajustado para 7,2. Após o período de incubação foram adicionados 10 mL de solução de lugol na placa de Petri, que foi lavada quase imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de pectinase.

4.4.4 Atividade lipolítica

Fórmula para 990 ml H₂O_{dd}: 10 g de Peptona; 5 g de extrato de levedura; 5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂·2H₂O; e 15 g de Agar. O pH foi ajustado para 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionada 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A presença de halos cristalizados ao redor da bactéria indicou atividade lipolítica.

4.4.5 Atividade esterásica

Fórmula para 990 ml H₂O_{dd}: 10 g de Peptona; 5 g de extrato de levedura; 5 g de NaCl; 0,1 g de CaCl₂·2H₂O; e 15 g de ágar. O pH foi ajustado para 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionada 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado. A presença de halos cristalizados ao redor da bactéria indicou atividade lipolítica.

4.4.6 Atividade proteolítica

A formulação do meio para 900 ml H₂Odd: 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 1 g de glicose; 5 g de NaCl e 15 g de Agar. O pH foi ajustado para 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100 mL de leite desnatado. A formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

4.5 Cinética de crescimento das bactérias endofíticas

As bactérias estocadas em glicerol e mantidas em *freezer* à -80 °C foram inicialmente reativadas em caldo ISP2 por 24 horas à 28 °C. Em seguida as bactérias foram semeadas pelo método de esgotamento de estrias em placas Petri contendo o meio de cultura ISP2, e estas placas foram incubadas por 24 horas à 28 °C. Os inóculos foram preparados transferindo-se duas alçadas de cada bactéria endofítica para um tubo de vidro com capacidade de 20 mL contendo 10 mL de caldo ISP2, seguido de incubação por 24 horas a 28 °C e 120 rpm em *shaker* orbital. A partir de um inóculo de 10 mL foi ajustado (D.O. 0.3-0.6; em comprimento de onda de 600 nm) foi feita uma diluição (1:10) em Erlenmeyers de 500 ml com 200 mL de caldo ISP2, seguindo-se com incubação à 28° C e 180 rpm. O crescimento microbiano foi mensurado através de diluições 1:10 seriadas da cultura com água peptonada 1%, com um intervalo de 24 horas. Um mL das diluições 5, 6, 7 foram plaqueadas em ágar *Plate Count* pela técnica do *Pour-Plate* e incubadas à 28 °C por 48 - 72 h. As quantificações foram conduzidas em triplicata e os resultados expressos em log UFC. mL⁻¹

4.6 Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana

Os microrganismos foram reativados em caldo ISP2 por 24 horas à 28 °C. O teste da sobrecamada (*Overlay Assay*) foi utilizado como bioensaio qualitativo para detectar a produção de antimicrobianos (Rojas-Rojas *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2017). Três colônias de cada bactéria endofítica foram diluídas em água peptonada 0,1%, e alíquotas de 5 µL foram transferidas para a superfície de placas de Petri contendo meio ISP2. As placas foram incubadas à 28 °C por 24 - 48 h). Os patógenos clínicos (*S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 11775, *P.*

aeruginosa ATCC-27853, *Salmonella* (origem clínica) e *C. albicans* ATCC 10231,) foram inicialmente cultivados em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas. Posteriormente, foi feita uma diluição (1:10) em BHI ajustado por D.O de 0,3 a 0,6 com o comprimento de onda de 600 nm, e 5 ml foram transferidos para 45 mL de ágar BHI semi-sólido. As soluções resultantes foram vertidas por triplicata na superfície de placas de Petri contendo as bactérias endofíticas. As placas foram incubadas à 28 °C por 24 - 48 h para verificar a ocorrência de halos de inibição.

4.7 Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos mediante abordagem OSMAC

A metodologia para a produção de antimicrobianos pelas bactérias endofíticas de *P. paniculata* através da abordagem OSMAC foi adaptada de estudos com fungos (Wei *et al.*, 2010). Inicialmente, as bactérias endofíticas foram reativadas no meio ISP2 e cultivadas conforme descrito no item 4.2. As bactérias foram, então, submetidas à fermentação sob diferentes condições experimentais, sendo mantidas em *sheaker* orbital com 120 rpm à 28 °C por 3-6, 9 e 12 dias. Posteriormente o caldo fermentado foi centrifugado a 10,000 rpm por 15 minutos e uma bipartição com acetato de etila com o caldo de fermentação centrifugado (50/50 % V/V) foi realizada em funil de separação. As frações acetato de etila foram mantidas por 6 horas em banho Maria à 28°C, dentro de uma capela de exaustão, para volatilização do solvente. Posteriormente, estas frações foram solubilizadas em acetato de etila e utilizadas em bioensaios.

4.7.1 Alteração da concentração de glicose

Para o primeiro experimento, os isolados estoques foram reativados da mesma forma usada no item 4.2. Todos os componentes dos meios de cultura foram autoclavados a 121 °C durante 15 minutos, exceto a solução de glicose, que foi autoclavada a 112 °C por 15 minutos e transferida assepticamente ao frasco contendo os demais componentes. As concentrações de glicose testadas foram 5, 10, 15, 20 g.L⁻¹. *Erlenmeyers* contendo 100 mL de caldo ISP2 com os microrganismos foram mantidos sob agitação (120 rpm) por 3, 6, 9 e 12 dias, à

28 °C. O controle consistiu em 1 *Erlenmeyers* contendo 100 mL de caldo ISP2 sem inóculo. Após período de fermentação e bipartição com acetato de etila/caldo de fermentação centrifugado (50/50 v/v), volatilização em capela e conservação em geladeira, os produtos foram utilizados para os testes de atividade antimicrobiana.

4.7.2 Adição de cloreto de amônio (NH₄Cl)

Para o segundo experimento, os isolados estoques foram reativados com a mesma forma usada 4.2. Cada cultura foi inoculada em *Erlenmeyers* contendo 100 mL de ISP2 com adição de 0,5 g.L de cloreto de amônio (NH₄Cl) (Ferreira, 2018). O sal foi adicionado juntamente ao preparo dos meios e, assim, autoclavado. *Erlenmeyers* contendo 100 mL de meio de cultura de ISP2 com os microrganismos foram mantidos sob agitação (120 rpm) por 3, 6, 9 e 12 dias, à 28 °C. O controle consistiu em meios de cultura sem inóculo. Após período de fermentação e bipartição com acetato de etila / caldo de fermentação centrifugado (50/50 v/v), volatilização em capela e conservação em geladeira, os produtos foram utilizados para os testes de atividade antimicrobiana.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a atividade enzimática e antimicrobiana das bactérias endofíticas UNK3 e ROXO16 de *P. paniculata*.

5.1 Análises fenotípicas

As bactérias endofíticas estudadas apresentaram em meio de cultura colônias típicas do *Bacillus* sp. O isolado endofítico UNK3 apresentou colônias isoladas com diâmetro de 0,5 a 1 centímetro, de cor branca, bordas irregulares e superfície rugosa (Figuras 1A e 1B). A análise microscópica de coloração de Gram mostrou células Gram-positivas na forma de bacilos longos (Figura 1C).

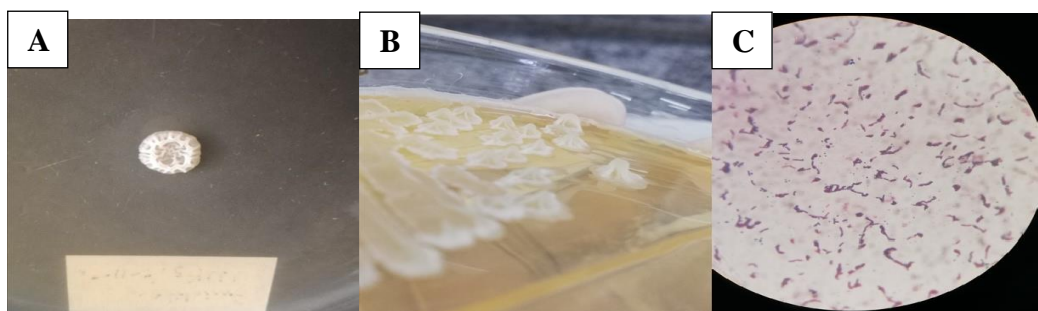


Figura 1: Características fenotípicas do isolado *Bacillus sp* UNK3. (A e B) Morfologia das colônias em meio de cultura. (C) Morfologia celular (100X).

Já o isolado *Bacillus sp* ROXO16 apresentou colônias isoladas com diâmetro de 1,5 a 2 centímetros, de cor bege, bordas irregulares, superfície lisa e textura cremosa (Figuras 2A e 2B). A análise microscópica de coloração de Gram mostrou células Gram-positivas na forma de bacilos curtos (Figura 2C)

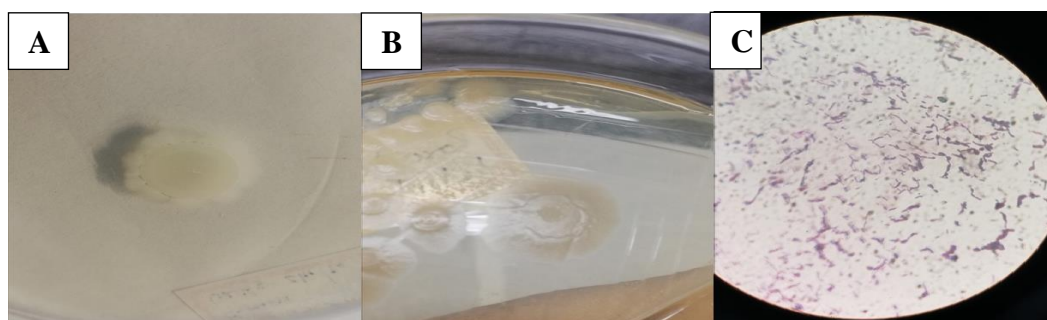


Figura 2: Características fenotípicas do isolado ROXO16. (A e B) Morfologia das colônias em meio de cultura. (C) Morfologia celular (100X).

Observa-se nas Fig 1 e 2 as características morfológicas dos isolados UNK3 e ROXO16. Características morfológicas auxiliam na identificação do microrganismo estudado, apresentando a conformação, tipo, tamanho de colônia, coloração de Gram, dentre outras observações. Em outros trabalhos observa-se resultados similares na identificação de endofíticos (da Silva et al., 2016) .

5.2 Identificação genotípica das bactérias endofíticas

Os microrganismos foram identificados como *Bacillus sp*, por amplificação e sequenciamento parcial do gene 16SrDNA. As sequências analisadas usando a ferramenta BLASTndo banco de dados NCBI, mostrou que as sequências obtidas apresentam 100% de identidade com bactérias do gênero *Bacillus*.

Tabela 1. Sequenciamento do gene 16SrDNA no formato fasta.

```
>14GTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATAC
GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTT
ACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCA
ACGATGCGTACCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACA
```

	Descrição	Nome científico	Pontuação máxima	Pontuação total	Capa de Consulta	Valor E	Por Ident	Acc Len	Adesão
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus velezensis cepa CBMB205 cromossomo, genome completo	Bacillus velez...	617	5478	100%	2e-173	99,41%	3923792	NZ_CP011637.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus siamensis KCTC 13613 cepa KCTC 13613 (T) contig43, sequência shotgun...	Bacillus siam...	612	612	100%	9e-172	99,12%	4692	NZ_AJVF01000043.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Antriracter gilvus cepa CFH 30434 s. 30434, Contig44, sequência shotgun do geno...	Antriracter gil...	612	612	100%	9e-172	99,12%	730	NZ_QXTH01000044.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardioides terrigena cepa KCTC 19217 KCTC 19217, Contig22, sequência shotg...	Nocardioides...	612	612	100%	9e-172	99,12%	1542	NZ_PZY01000021.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 genome completo	Bacillus subtil...	612	3098	100%	9e-172	99,12%	4215606	NZ_OC0664.3
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus cabrialesii cepa TE3 NODE_29_length_1026_cov_39045, sequência shotg...	Bacillus cabri...	600	600	100%	4e-170	98,03%	1626	NZ_R_V901000032.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus nakamurai cepa NRRL B-41091 Bacillus-sp-B-41091, contig_34, sequência...	Bacillus naka...	606	606	100%	4e-170	98,83%	4766	NZ_LSAZ01000028.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus atropheus subsp. cromossomo BSS ca cepa globigii	Bacillus atrop...	606	4804	100%	4e-170	98,83%	4175060	NZ_CP007640.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloquefaciens cepa WF02 cromossomo, genome completo	Bacillus amyli...	606	5461	100%	4e-170	98,83%	4025648	NZ_CP053376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus mojavensis cepa UCMB5075 cromossomo, genome completo	Bacillus moja...	606	3051	100%	4e-170	98,83%	4031121	NZ_CP051464.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Sphingomonas mosephila cepa SYSUP0001 SYSUP0001, Contig8, sequência shot...	Sphingomona...	606	606	100%	4e-170	98,83%	710	NZ_QWDF01000008.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus halotolerans cepa Z3201702 cromossomo, genome completo	Bacillus halot...	606	3040	100%	4e-170	98,83%	4154245	NZ_CP029364.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus rugosus cepa SP37 NODE_36_length_1623_cov_621732143, sequência s...	Bacillus rugo...	601	601	100%	2e-168	98,53%	1623	NZ_JABUX001000041.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium azilense cepa G42 Ga0314514_133, sequência shotgun do genome co...	Rhizobium az...	601	601	100%	2e-168	98,53%	5925	NZ_SMBJ01000033.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus vallismortis cepa do cromossomo Bac111, genome completo	Bacillus valis...	601	5990	100%	2e-168	98,53%	3950372	NZ_CP033052.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis cepa FA-CR0015 cromossomo, genome completo	Bacillus tequil...	601	3012	100%	2e-168	98,53%	4012371	NZ_CP048852.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 6633 = cromossomo JCM 2499 cepa ATCC...	Bacillus subtil...	601	3012	100%	2e-168	98,53%	4045538	NZ_CP034943.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Paracoccus endophyticus cepa SYSUP0003 s.C4002, Contig59, sequência shotgun...	Paracoccus e...	584	584	95%	2e-163	99,06%	537	NZ_QLLV01000059.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Nocardioides sediminis cepa KCTC 19271 KCTC 19271, Contig31, sequência shot...	Nocardioides...	584	584	95%	2e-163	99,06%	510	NZ_PZY201000031.1

Figura 3. Porcentagem de concordância é de 100% para o gênero Bacillus,

5.3 Avaliação da atividade enzimática

Os isolados endofíticos foram avaliados quanto à atividade enzimática, e 100% deles apresentaram atividades celulolítica e proteolítica, 50% atividade amilolítica, 50% atividade pectinolítica, e nenhum apresentou atividades lipolítica e esterásica (Tabela 1).

Tabela 2. Resultados percentuais das atividades enzimáticas das bactérias endofíticas *Bacillus* sp. (UNK3) e *Bacillus* sp. (ROXO16).

Microrganismo	Celulolítica	Amilolítica	Pectinolítica	Lipolítica	Esterásica	Proteolítica
	Colônia/Halo	Colônia/Halo	Colônia/Halo	Colônia/Halo	Colônia/Halo	Colônia/Halo
UNK3	0,4mm/13mm	0,4mm/12mm	10mm/15mm	Negativo	Negativo	0,8mm/20mm
ROXO	0,4mm/10mm	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	10mm/14mm
	2 de 2	1 de 2	1 de 2	0 de 2	0 de 2	2 de 2

Os resultados foram visualizados por meio da formação de halos de degradação ao redor da colônia bacteriana (Figuras 3 e 4).

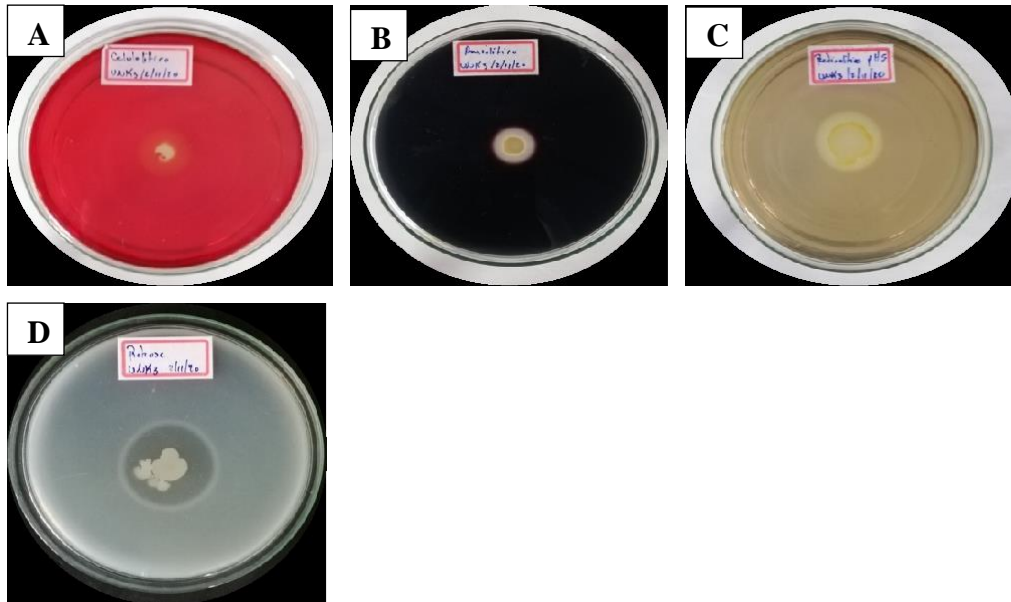


Figura 4: Atividades enzimáticas do endofítico *Bacillus* sp UNK3. (A) Celulolítica; (B) Atividade Amilolítica (C); Pectinolítica e (D) Proteolítica.

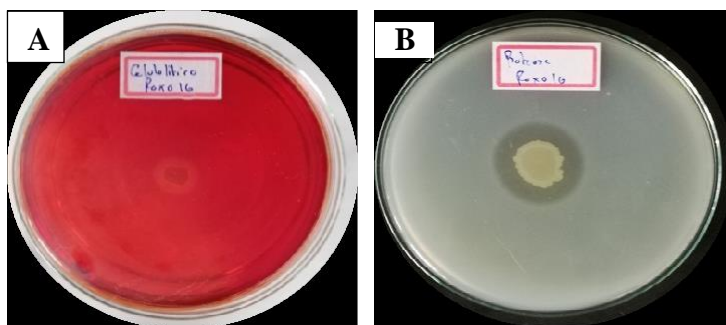


Figura 5: Atividades enzimáticas do endofítico *Bacillus sp* ROXO16. (A) Celulolítica; e (B) Proteolítica.

Em alguns trabalhos, estudando atividade enzimática, foram observadas a produção de celulase produzida por *Bacillus sp* (Quispe et al., 2019) e amilase (Zavaleta et al., 2016). Essas diferenças na produção enzimática podem ser característica do microrganismo, do ambiente de isolamento, dentre outras, que confirma a capacidade de produzir enzimas por microrganismos *Bacillus sp* UNK3 e *Bacillus sp* ROXO16

Os organismos celulolíticos são principalmente bactérias e fungos de natureza ubíqua. O gênero *Bacillus*, que são bactérias filamentosas Gram positivas do solo, são conhecidas por sua capacidade de decompor moléculas complexas, em particular os componentes de lignocelulose, que os tornam agentes importantes em processos de decomposição (Franco-Cirigliano et al., 2013). Estes dados corroboram com os achados do presente trabalho, no qual o maior percentual dos isolados (100%) apresentaram atividade celulolítica.

5.4. Cinética de crescimento

A biocarga do inóculo foi quantificada na ordem de 1.50×10^6 UFC.mL⁻¹ para UNK3 e 1.4×10^6 UFC.mL⁻¹ para ROXO16. O endofítico UNK3 apresentou máximo crescimento no dia 5 (3.9×10^9 UFC.mL⁻¹), enquanto o microrganismo ROXO 16 no dia 4 (4.5×10^9 UFC.mL⁻¹) (Tabela 3) (Figura 6).

Tabela 3: Quantificação de UFC.mL⁻¹ a cada 24 horas

Dia	<i>Bacillus sp</i> UNK3	<i>Bacillus sp</i> ROXO16
12 hrs	6.0X10 ⁸ UFC.mL ⁻¹	1.4X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
1	1.5X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	2.1X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
2	2.5X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	3.7X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
3	3.6X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	4.3X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
4	3.8X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	4.5.X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
5	3.9X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	3.0X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
6	3.3X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	2.1X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
7	2.6X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	1.1X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
8	1.2X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	1.0X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹
9	1.1X10 ⁹ UFC.mL ⁻¹	9.4X10 ⁸ UFC.mL ⁻¹
10	5.9X10 ⁸ UFC.mL ⁻¹	8.9X10 ⁸ UFC.mL ⁻¹
11	5.4X10 ⁷ UFC.mL ⁻¹	8.3X10 ⁷ UFC.mL ⁻¹
12	6.8X10 ⁷ UFC.mL ⁻¹	7.1X10 ⁶ UFC.mL ⁻¹

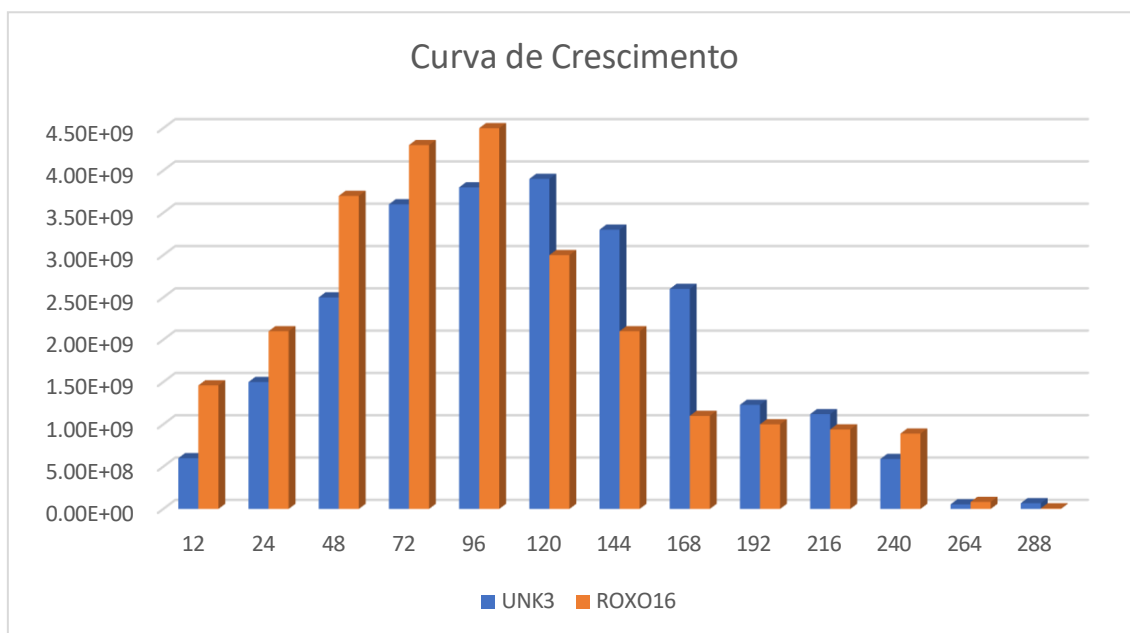


Figura 6: Curva de cinética de crescimento dos endofíticos *Bacillus sp.* (UNK3) e *Bacillus sp.* (ROXO16).

5.5. Avaliação com o teste sobrecamada, a atividade antimicrobiana dos microrganismos endófitos contra os patógenos clínicos.

Os isolados endofíticos *Bacillus sp* UNK3 e *Bacillus sp* ROXO16, testados por meio do teste sobrecamada para cada um dos microrganismos potencialmente patogênicos *S. aureus*(A), *Pseudomona*(B), *E. coli* (C), *Candida albicans*(D) e *Salmonella*(E), produziram antimicrobianos. O microrganismo UNK3 apresentou atividade antimicrobiana contra todos os patógenos, enquanto o ROXO16 apresentou atividade antimicrobiana apenas para *S. aureus*, *Pseudomonas* e *C. albicans* (Tabela 4).

Tabela 4: Atividades qualitativas antimicrobianas dos endofíticos *Bacillus sp* UNK3 e *Bacillus sp* ROXO16 avaliadas por meio do teste de sobrecamada pela formação de um halo (positivo) e ausência de um halo (negativo).

Microrganismo	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Salmonella</i>
UNK3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ROXO16	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo

Esses resultados foram verificados qualitativamente por meio da produção de halos de inibição (Figuras 7 e 8).

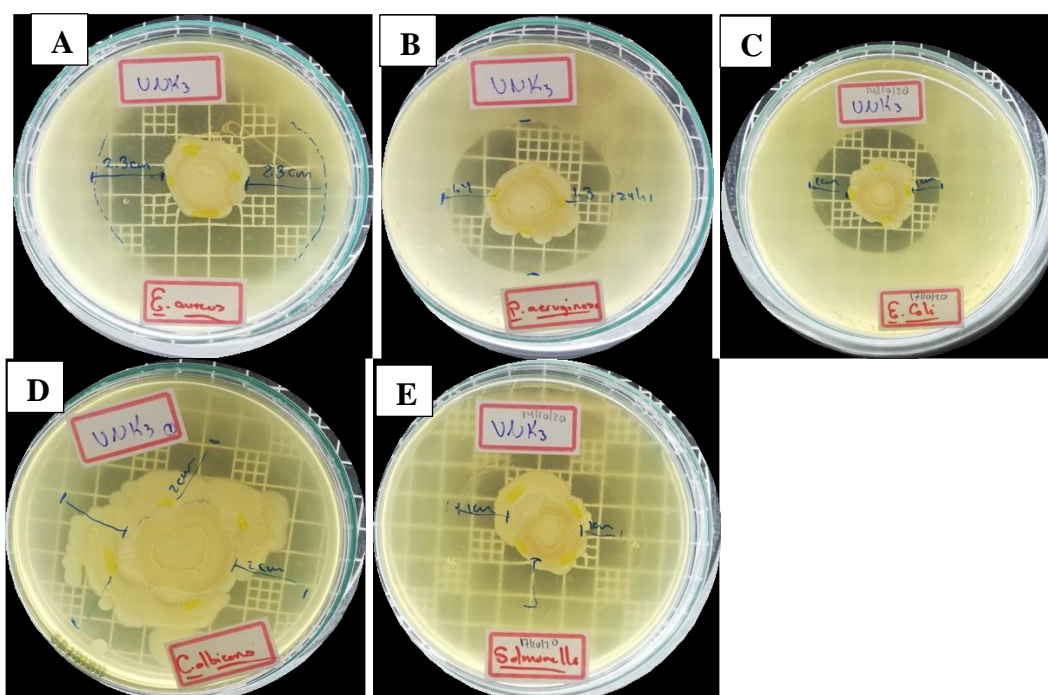


Figura 7: Atividade antimicrobiana do endofítico *Bacillus sp* (UNK3), avaliada por meio do teste de sobrecamada pela formação de um halo de inibição (positivo) e ausência de um halo (negativo), contra os microrganismos patogênicos (A) *S. aureus*; (B) *P. aureginosa*; (C) *E. coli*; (D) *C. albicans*; (E) *Salmonella*.

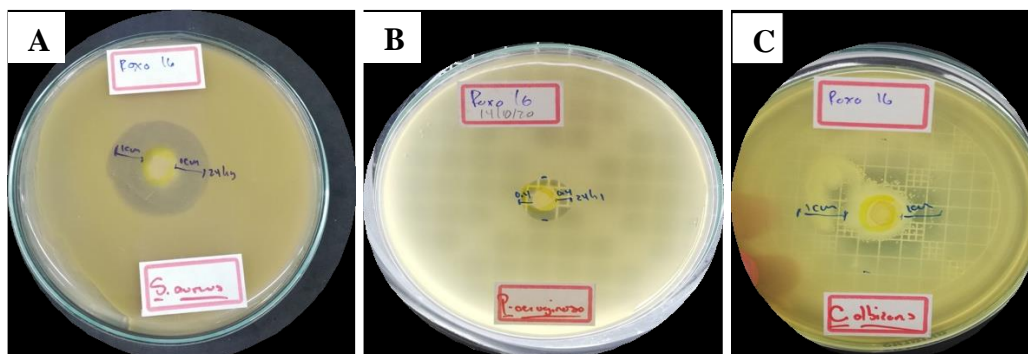


Figura 8: Atividades antimicrobianas do endofítico *Bacillus sp.* (ROXO16), verificadas por meio da formação de halos de inibição contra os microrganismos patogênicos (A) *S. aureus*; (B) *P. aureginosa* e (C) *C. albicans*.

Estudos anteriores mostraram que os microrganismos endofíticos têm uma alta capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Segundo (Piza *et al.*, 2015), um microrganismo isolado de tecidos vegetais no cerrado brasileiro e identificado como *Amycolatopsis orientalis* mostrou potencial antimicrobiano, verificado por halos antagonistas, contra *S. aureus*, *C. albicans*, *Shigella sonnei* e *Enterococcus. Faecalis*.

Existem estudos que confirmam que os metabólitos secundários produzidos por microrganismos do gênero *Bacillus* podem ser utilizados em diferentes áreas, inclusive no controle de contaminantes em alimentos. (Sánchez *et al.*, 2016)

Bactérias endofíticas isoladas de carobinha-do-campo foi avaliada por Carrim *et al.* (2016), apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas e Gram negativos. Esses, entre outros estudos, demonstram a capacidade dos microrganismos endofíticos na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (Guzmán Flor, 2018) o que torna as bactérias endofíticas UNK3 e ROXO16 de *P. paniculata* promissoras no controle de patógenos Gram positivos e Gram negativos.

5.5 Atividade antimicrobiana do extrato obtido da partir da partição com acetato de etila.

A atividade antimicrobiana foi mensurada pelo método de difusão em ágar, contra os microrganismos indicadores *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *Salmonella sp.* Esses resultados foram validados com os controles negativos acetato de etila (A), que foi adicionada a filtros esterilizados, e ausência de acetato de etila ou extrato (N) (Tabelas 5 e 6) (Figuras 9 e 10).

Tabela 5: Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados sem modificação no meio para *Bacillus sp.* (UNK3) contra patógenos, *S. aureus*; *P. aureginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar

Microrganismo	Dia	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Salmonella</i>
UNK3	3	Negativo	Negativo	0,5mm	Negativo	0,5 mm
	6	Negativo	0,3 mm	0,5 mm	Negativo	0,5 mm
	9	0,5 mm	0,3 mm	0,5 mm	Negativo	0,5 mm
	12	0,5 mm	0,3 mm	0,5 mm	Negativo	0,5 mm

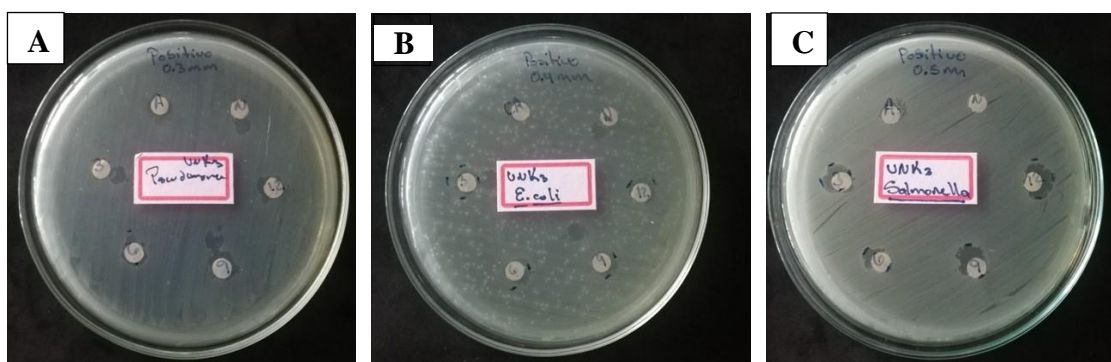


Figura 9: Atividades antimicrobianas dos extratos com acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados do endofítico *Bacillus sp.* (UNK3) após 3, 6, 9 e 12 dias contra *P. aeruginosa*; (B) *E. coli*; e (C) *Salmonella*

Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados sem modificação no meio para para

Bacillus sp (ROXO16) contra patógenos *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar.

Microrganismo	Dia	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomona</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Salmonella</i>
ROXO16	3	Negativo	0,1 mm	0,2 mm	Negativo	0,3 mm
	6	Negativo	0,1 mm	0,2 mm	Negativo	0,3 mm
	9	Negativo	0,1 mm	0,2 mm	Negativo	0,3 mm
	12	Negativo	0,1 mm	0,2 mm	Negativo	0,3 mm

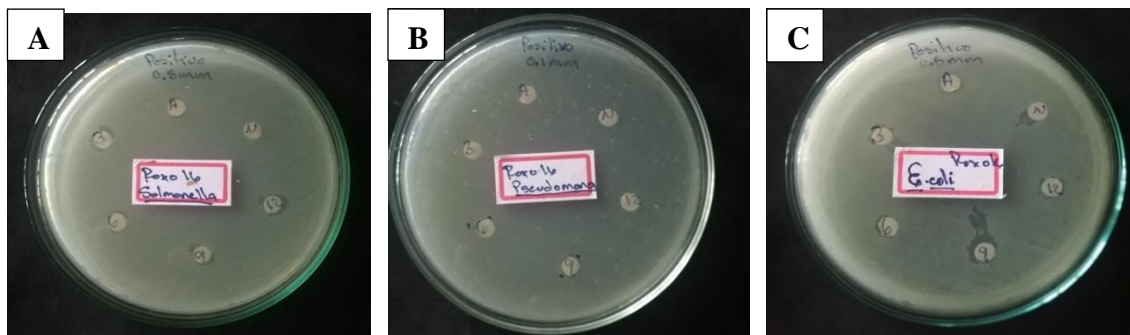


Figura 10: Atividades antimicrobianas dos extratos com acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados do endofítico *Bacillus sp.* (ROXO16) após 3, 6, 9 e 12 dias contra (A) *Salmonella*; (B) *P. aeruginosa*; e (C) *E. coli*

As Tabelas 5 e 6, e as Figuras 8 e 9 apresentam os dados da avaliação da atividade antimicrobiana. Tanto para UNK3 quanto para ROXO16 foram observados a formação de pequenos halos de inibição. O isolado UNK3, inibiu *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, e *Salmonella*. O isolado ROXO16, por sua vez, inibiu *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Esses dados são similares aos observados por Piza *et al.*, 2015. E que concordam com a capacidade de microrganismos endofíticos do género *Bacillus* para inibição dos microrganismos patogênicos (Guzmán Flor, 2018)

6 Avaliação qualitativa da produção de antimicrobianos mediante abordagem OSMAC

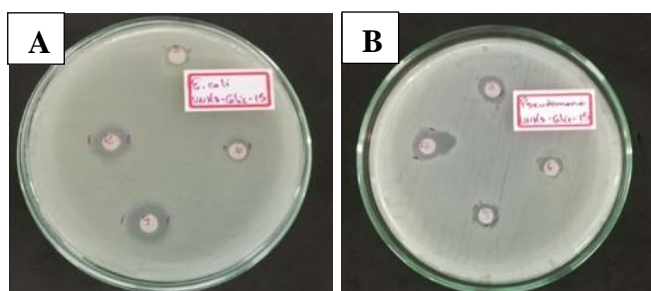
6.1 Alteração da concentração de glicose.

Sabe-se que microrganismos endofíticos têm a capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários em condições normais que podem ser usados em diferentes áreas (Sarti, 2019), e que também que podem produzir uma quantidade variável de acordo com a modificação do ambiente, modificações como fonte de carbono (Ramírez Rojano & RAMIREZ ROJANO, 2016).

A tabela 7, figura 11 apresentam os dados da avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários obtidos a partir da bipartição com acetato de etila, após modificação na concentração da fonte de carbono (Glicose). Para *Bacillus sp* (UNK3) foram observados halos de inibição de alguns patógenos.

Tabela 7. Atividade antimicrobiana dos metabólitos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de glicose para *Bacillus sp* (UNK3), contra os patógenos, *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar.

Conc. Glicose	5 g/L	10 g/L	15 g/L	20g/L
<i>E. coli</i>	0,9 cm dia 6	1,0 cm dia 3	1,1 cm dia 9	0,8 cm dia 12
<i>P. aeruginosa</i>	0,6 cm 4 dias	0.7 dia 12	0.9 cm dia 12	0.6 cm 4 dias
<i>Salmonella</i>	0,6 cm 4 dias	0.7 cm dia 12	1,1 cm dia 12	0,9 cm dia 3
<i>C. albicans</i>	---	---	0.6 cm dia 9	0,7 cm dia 12
<i>S. aureus</i>	---	---	---	---



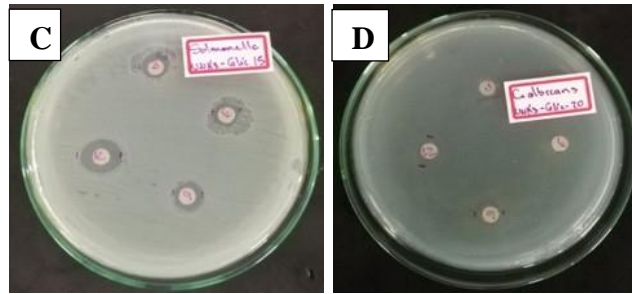


Figura 11: Halos de inibição do crescimento dos patógenos (A) *E. coli*. (B), *P. aeruginosa* (C), *Salmonella sp* (D) e *C. albicans*. produzidos pela atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação das concentrações de glicose para o endofítico *Bacillus sp* (UNK3) após 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo.

As condições ótimas de produção dos metabólitos, determinado pela presença de halos maiores, foram detectadas para UNK3 nos dias 9 e 12 com uma concentração de glicose de 15 g/L contra *P. aeruginosa* e *E. Coli*; nos dias 6, 9 e 12 contra *Salmonella sp*, em uma concentração de 15 g/L e uma leve atividade no dia 12 contra *C. albicans* com concentração de 20 g/L. Fazendo uma comparação das atividades antimicrobianas, os halos de inibição foram maiores na abordagem OSMAC com a modificação da concentração da glicose (Tabela 7; Figura 11) do que nos primeiros resultados obtidos sem modificação da fonte de carbono na seção 5.5 (Figura 9; Tabela 5), passando de uma média de 0,4 mm para uma média de 10,0 mm.

A tabela 8 e a figura 12 apresentam os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos produtos da bipartição com acetato de etila, após modificação na concentração da fonte de carbono (Glicose). Para o *Bacillus sp* (ROXO16) foram observados a formação de halos de inibição.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos produtos obtidos a partir da partição com acetato de etila dos caldos fermentados com modificação da concentração de glicose para *Bacillus sp* (ROXO16) contra patógenos, *S. aureus*; *P. aureginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar.

Conc. Glicose	5 g/l	10 g/l	15 g/l	20 g/l
<i>E. coli</i>	---	0.6 cm dia 12	1,1 cm dia 6	0.4 cm 4 dias
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	0.7 cm dia 12	0.6 cm dia 3
<i>Salmonella sp</i>	---	---	---	0.7 cm dia 12
<i>C. albicans</i>	---	1.1 cm dia 12	---	1.1 cm dia 6
<i>S. aureus</i>	0.6 cm 4 dias	0.9 cm dia 12	0.7 cm dia 6	0.6 cm dia 3

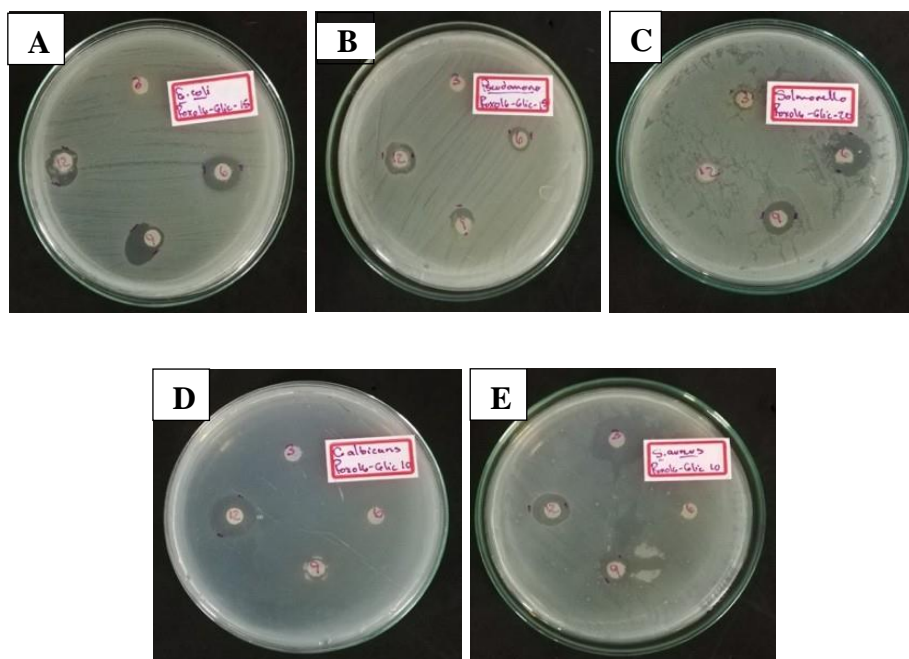


Figura 12: Atividades antimicrobianas dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação das concentrações de glicose para o endofítico *Bacillus sp* (ROXO16) após 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo contra (A) *E. coli*. (B) *P. aeruginosa* (C) *Salmonella sp* (D) *C. albicans*. (E) *S. aureus*. Os halos ao redor dos discos indicam a inibição dos patógenos.

Bacillus sp. (ROXO16), apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa* com concentração de 15 g/L nos dias 6, 9 e 12, para *Salmonella sp.* nos dias 6 e 9 na concentração de 20 g/L, e para *C. albicans* e *E. coli* com uma concentração ideal de 10 g/L no dia 9. Estes resultados são semelhantes aos observados por Serrano et al. (2012), que usaram a abordagem OSMAC para estudar metabólitos secundários com atividade antimicrobiana produzidos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

Considerando que no início dos testes feitos com os extratos do meio sem modificação da concentração da fonte de carbono os halos de bioatividade de *Bacillus sp* (ROXO16) contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella sp* tinha uma média de 0,2 mm (Tabela 4, Figura 8), o aumento foi muito acentuado ao se obter

halos de 1,0 cm em média contra os mesmos patógenos, observando-se uma nova atividade contra *C. albicans*, *S. aureus* (Figura 12. D e E).

Há na literatura existem outros estudos em que a abordagem OSMAC apresentou efeitos variáveis na produção de antimicrobianos (Vu et al., 2019; Chandrakar & Gupta, 2018), com aumento da bioatividade de extratos de microrganismos endofíticos por meio de modificações no ambiente, do possibilitando um melhor ciclo de replicação ou causando níveis de estresse que os obrigam a aumentar a bioatividade (Vega Oliveros, 2016).

6.2 Adição de cloreto de amônio (NH₄Cl)

Sabe-se que microrganismos endofíticos têm a capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários em condições normais que podem ser usados em diferentes áreas (Sarti, 2019), e sabe-se também que podem produzir uma quantidade variável de acordo com a modificação do ambiente, modificações como fonte de nitrogênio (Cloreto de amônio-NH₄Cl). (Salazar Marroquín, 2016)

Na tabela 9 e a figura 13 apresentam os dados observados para avaliação da atividade antimicrobiana dos produtos da bipartição com acetato de etila, depois de fazer uma modificação na concentração da fonte de nitrogênio (NH₄Cl). Para o *Bacillus sp* (UNK3), foram observados a formação de halos de inibição

Tabela 9. Atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação da concentração de Cloreto de Amônio (NH₄Cl) para *Bacillus sp* (UNK3), contra os patógenos, *S. aureus*; *P. aeruginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar.

Conc. NH ₄ Cl	0.5 g/L	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
<i>E. coli</i>	0,6 cm dia 9	0,5 cm 4 dias	0,5 cm dia 3	---
<i>P. aeruginosa</i>	0,6 cm 4 dias	1,0 cm dia 12	---	---
<i>Salmonella sp</i>	0,5 cm 4 dias	0,6 cm dia 9	---	---
<i>C. albicans</i>	---	---	---	---
<i>S. aureus</i>	---	---	---	---

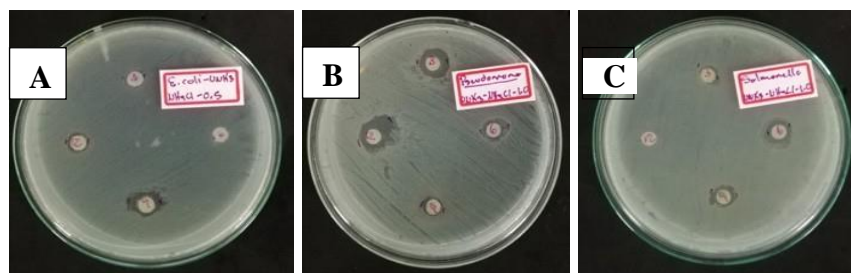


Figura 13: Atividades antimicrobianas dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação das concentrações de cloreto de amonio (NH_4Cl) para o endofítico UNK3 após 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo contra (A) *E. coli*. (B) *P. aeruginosa* (C) *Salmonella sp.* Os halos ao redor dos discos indicam a inibição dos patógenos.

Condições ótimas de produção dos metabólitos secundários foram detectadas para o endofítico *Bacillus sp* (UNK3) no dia 9 com uma concentração de NH_4Cl de 0,5 g/L contra *E. Coli*, no dia 12 com uma concentração de 1,0 g/L contra *P. Aeruginosa*, e nos dias 6 e 9 com uma concentração de 1,0 g/L contra *Salmonella sp.* Fazendo uma comparação da atividade, a formação do halo de inibição foi maior na abordagem OSMAC do que nos resultados mostrados na seção 5.5 (Tabela 5; Figura 9) já que anteriormente os halos tinham uma média de 0,4 mm sem modificação da fonte de nitrogênio e depois uma média de 0,8 mm com a modificação da fonte de nitrogênio.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação da concentração de Cloreto de Amônio (NH_4Cl) para *Bacillus sp* (ROXO16)), contra os patógenos *S. aureus*; *P. aureginosa*; *E. coli*; *C. albicans*; *Salmonella*, determinados pela técnica de difusão em ágar.

Conc. NH_4Cl	0.5 g/L	1.0 g/L	1.5 g/L	2.0 g/L
<i>E. coli</i>	0,6 cm dia 12	0,5 cm dia 12	0.5 cm dia 6	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	0,6 cm dia 9	0,9 cm dia 6	0,8 cm dia 3
<i>Salmonella sp</i>	---	---	---	---
<i>C. albicans</i>	---	---	---	---
<i>S. aureus</i>	---	---	---	---

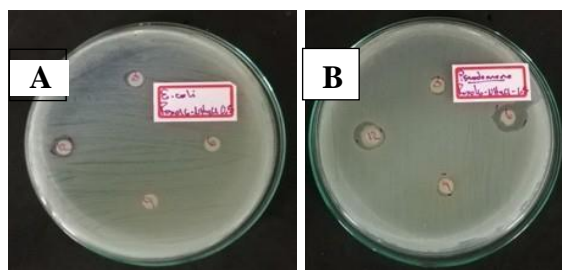


Figura 14: Atividades antimicrobianas dos extratos acetato de etila obtidos a partir da partição dos caldos fermentados com modificação das concentrações de cloreto de amonio (NH_4Cl) para o endofítico ROXO16 após 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo contra (A) *E. coli*. (B) *P. aeruginosa*. Os halos ao redor dos discos indicam a inibição dos patógenos.

Para o isolado ROXO16, foi observada atividade antimicrobiana no dia 12 contra com concentração de 1,0 g/L contra *E. coli*, e no dia 6 com concentração de 1,5 g/L contra *P. Aeruginosa*. Considerando que no início dos testes feitos com os extratos do meio sem modificação da concentração da fonte de nitrogenio o halo de bioatividade de *Bacillus sp* (ROXO16) na seção 5,5 (Tabelas 6; Figura 10) contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella sp* tinha uma média de 0,2 mm, com a abordagem OSMAC houve um aumento acentuado ao se obter halos de 0,7mm em média.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo caracterizamos fenotipicamente e genotipicamente as bactérias endofíticas *Bacillus sp* (UNK3) e *Bacillus sp* (ROXO16) de *P. Paniculata*.

O isolado *Bacillus sp* (UNK3) apresentou atividades celulolítica, milolítica, pectinolítica e proteolítica, enquanto *Bacillus* (ROXO16) apresentou atividades celulolítica e proteolítica.

Bacillus sp. (UNK3) e (ROXO16) produziram antimicrobianos com ação contra os patógenos de importância clínica *P. aeruginosa* ATCC-27853, *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 29213, *Salmonella* (isolada clinicamente) e *C. albicans* ATCC 10231.

A abordagem OSMAC, usando modificações das fontes de carbono e nitrogênio no meio de fermentação, melhorou a atividade antimicrobiana dos endófitos contra os patógenos clínicos.

Os resultados gerados neste estudo demonstram o potencial promissor das bactérias endofíticas *Bacillus sp.* UNK3 e ROXO16 de *P. Paniculata* para aplicações biotecnológicas industriais e também para a descoberta de novas drogas. Otimizações das condições de cultivo ainda podem ser realizadas visando potencializar a produção dos antimicrobianos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, J. R. A. M. de. (2010). *Infecções fúngicas análise estatística e terapêutica: 2003-2008 Unidade de Queimados Hospitais da Universidade de Coimbra*.
- Adrio, J.-L., & Demain, A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, 1(2), 116–131.
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139.
- Agnello, S. (2007). *Composição, estrutura e conservação da comunidade de aves da Mata Atlântica no parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Cubatão, São Paulo*. Universidade de São Paulo.
- Alves, H., de Cruz, F., de Assis, P., Pessoa, J. D. C., Trevelin, L., de Leal, A. O., & de Sousa, C. (2017). Antibiotic resistance among *Escherichia coli*: Isolates and novel approaches to the control of *E. coli* infections. *Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications London (UK): Intech Open*, 99–122.
- Assis, P. C. P. de. (2018). *Bactérias endofíticas isoladas de Caryocar brasiliense: atividade enzimática, antimicrobiana, leishmanicida e co-cultura com microrganismos patogênicos*.
- Baoyuan, J., & Jeonghill, P. (1993). Studies on the alkaloidal components of *Polygala tenuifolia* Willd. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 18(11), 675–677.
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, 3(7), 619–627.
- Bogas, A. C.; Torres, F. L.; Sousa, C.P. ; Lacava, P. T. Bioactivity of Endophytes from the Brazilian Tropical Savannah. *ACTA SCIENTIFIC MICROBIOLOGY*, v. 3, p. 24-38, 2020.
- Boyce, J. M. (2008). *Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus as a Cause of Health Care—Associated Infection*. The University of Chicago Press.
- Cantón, R., & Morosini, M. I. (2010). Microorganismos multirresistentes en los hospitales: un riesgo amenazante. *GH Continuada*, 9(5).
- Chandrakar, S., & Gupta, A. K. (2019). Actinomycin-producing endophytic *Streptomyces parvulus* associated with root of aloe vera and optimization of conditions for antibiotic production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3), 1055–1069.
- Chávez-de la Peña, M., Higuera-Iglesias, A. L., Huertas-Jiménez, M. A., Báez-Martínez, R., Morales-de León, J., Arteaga-Cabello, F., Rangel-Frausto, S., & Ponce de León-Rosales, S. (2001). Brote por *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pública de México*, 43, 211–216.
- Cirino, I. C. da S. (2014). *Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em linhagens de Staphylococcus aureus*.
- Cortez, D. V, Castro, H. F. de, & Andrade, G. S. S. (2017). Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova*, 40(1), 85–96.
- Cruz, F. de P. N. (2018). *Isolation of the endophytic and rhizospheric microbiome associated to Polygala spp.: Evaluation of the biotechnological potential and antimicrobial activity*.

- Cruz, F. de P. N., Bogas, A. C., & de Sousa, C. P. (2020). Plant-Associated Microorganisms as a Potent Bio-Factory of Active Molecules against Multiresistant Pathogens. In *Antimicrobial Resistance*. IntechOpen.
- CUNHA, J. N. B. (2019). *INFECÇÕES URINÁRIAS NO ESTADO DO PIAUÍ: bactérias causadoras e perfil de sensibilidade a antimicrobianos*.
- da Costa Lopes, T., Gonçalves, J. de R. S., Souza, N. S., Moraes, D. F. C., do Amaral, F. M. M., & Rosa, I. G. (2011). AVALIAÇÃO MOLUSCICIDA E PERFIL FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. *Cadernos de Pesquisa*, 18(3).
- da Silva Santos, L., Rhoden, S. A., de Barros, I. T., Tonini, R. C. G., Marques, R. M., de Souza, V. H. E., & Pamphile, J. A. (2013). A INTERAÇÃO HARMÔNICA ENTRE FUNGOS E PLANTAS: ASPECTOS DA RELAÇÃO ENDÓFITO/HOSPEDEIRO. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 8(1).
- Das, G., Patra, J. K., & Baek, K.-H. (2017). Antibacterial properties of endophytic bacteria isolated from a fern species *Equisetum arvense* L. against foodborne pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(1), 50–58.
- de Bary, A. (1866). *Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten*. Engelmann.
- de Paula Nogueira Cruz, F., Ferreira de Paula, A., Nogueira, C. T., Marques de Andrade, P. H., Borges, L. M., Lacava, P. T., Baratella da Cunha Camargo, I. L., Aníbal, F. de F., & Paiva de Sousa, C. (2021). Discovery of a Novel Lineage *Burkholderia cepacia* ST 1870 Endophytically Isolated from Medicinal *Polygala paniculata* Which Shows Potent In Vitro Antileishmanial and Antimicrobial Effects. *International Journal of Microbiology*, 2021.
- de Sousa, C. P., Serrano, N. F. G., & Lacava, P. T. (2017). Endophytic microorganisms of the tropical savannah: a promising source of bioactive molecules. In *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics* (pp. 57–70). Springer.
- Dewan, S. S. (2017). *Global Markets for enzymes in Industrial Applications.[SI]: BCC Research*.
- dos Santos, T. T., & Varavallo, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e Da Saúde*, 32(2), 199–212.
- Fadare, J. O., Ogunleye, O., Iliyasu, G., Adeoti, A., Schellack, N., Engler, D., Masseur, A., & Godman, B. (2019). Status of antimicrobial stewardship programmes in Nigerian tertiary healthcare facilities: findings and implications. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 132–136.
- Franco-Cirigliano, M. N., Rezende, R. de C., Gravina-Oliveira, M. P., Pereira, P. H. F., Do Nascimento, R. P., Bon, E. P. da S., Macrae, A., & Coelho, R. R. R. (2013). *Streptomyces misionensis* PESB-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. *BioMed Research International*, 2013.
- Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S., & Budge, S. (2010). Production of biodiesel by enzymatic transesterification. *Am J Biochem Biotechnol*, 6(2), 54–76.
- Guo, J., Shang, E., Duan, J., Tang, Y., & Qian, D. (2011). Determination of ligustilide in the brains of freely moving rats using microdialysis coupled with ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Fitoterapia*, 82(3), 441–445.

- HAUSER, A. R. (2009). Antibióticos na Prática Clínica: Fundamentos para escolha do agente antibacteriano correto. *Porto Alegre, Artmed*, 328.
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Schimossek, K., Zonta, A., & Reetz, M. T. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3(1–4), 3–12.
- Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 503–517.
- Joly, C. A., Haddad, C. F. B., Verdade, L. M., Oliveira, M. C. de, Bolzani, V. da S., & Berlinck, R. G. S. (2011). Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista Usp*, 89, 114–133.
- Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A., & Tewari, R. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a Bacillus sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 277–282.
- Klein-Júnior, L. C., Santin, J. R., Lemos, M., Silveira, A. C. de O., Rocha, J. A. R., Beber, A. P., Wagner, T. M., Bresolin, T. M. B., Bella-Cruz, A., & Cechinel-Filho, V. (2013). Role of gastric mucus secretion, oxinitergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(5), 767–776.
- Kobayashi, D. Y., & Palumbo, J. D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial Endophytes*, 19, 199–233.
- Koblitz, M. G. B. (2000). *Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), 206–220.
- Korb, A., Nazareno, E. R., Mendonça, F. A., & Dalsenter, P. R. (2013). Perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em infecções do trato urinário em pacientes ambulatoriais. *Rev Biol Ciênc Terra*, 13(1), 72–79.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011.
- Lacaille-Dubois, M.-A., Delaude, C., & Mitaine-Offer, A.-C. (2020). A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112417.
- Lacava, P. T., & Azevedo, J. L. (2014). Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In *Advances in Endophytic research* (pp. 231–256). Springer.
- Lacava, P. T., & de Sousa, C. P. (2016). Role of endophytic actinomycetes in crop protection: plant growth promotion and biological control. In *Plant Growth Promoting Actinobacteria* (pp. 147–160). Springer.
- Ladeira, S. A., Andrade, M. V. V., Delatorre, A. B., Perez, V. H., & Martins, M. L. L. (2010). Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*, 33(2), 324–328.
- Marques, M. do C. M. (2003). *Polygala bevilacqua* Marques (Polygalaceae), uma nova espécie endêmica de São Paulo, Brasil. *Hoehnea*, 30, 213–215.
- Merheb, C. W. (2007). *Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico Thermoascus aurantiacus*.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2017). *Microbiologia médica*.

- Elsevier Health Sciences.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, *403*(6772), 853–858.
- Nagai, T., Suzuki, Y., Kiyohara, H., Susa, E., Kato, T., Nagamine, T., Hagiwara, Y., Tamura, S., Yabe, T., & Aizawa, C. (2001). Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and diphtheria–pertussis–tetanus vaccines. *Vaccine*, *19*(32), 4824–4834.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora.
- Neris, D. M., Luna, G. L. F., de Almeida Rodolpho, J. M., Urbaczek, A. C., de Oliveira Correia, R., Feitosa, K. A., Serrano, N. F. G., de Sousa, C. P., & de Freitas Anibal, F. (2017). Cytotoxic Effects and Production of Cytokines Induced by the Endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D In Vitro. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *18*(9), 758–768.
- Nucci-Martins, C., Nascimento, L. F., Venzke, D., Brethanha, L. C., Sako, A. V. F., Oliveira, A. S., Brighente, I. M. C., Micke, G. A., Pizzolatti, M. G., & Santos, A. R. S. (2016). Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: Evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. *Phytomedicine*, *23*(5), 429–440.
- Orlandelli, R. C., Specian, V., Felber, A. C., & Pamphile, J. A. (2012). Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, *7*(3).
- Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Lo Schiavo, F., Muresu, R., Carimi, F., & Zottini, M. (2019). The role of the endophytic microbiome in the grapevine response to environmental triggers. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1256.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *31*(2), 135–152.
- Pereira, A. L., & Pita, J. R. (2018). Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). *História: Revista Da Faculdade de Letras Da Universidade Do Porto*, *6*.
- Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2011). The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*, *2011*.
- Pinheiro, T. R., Cechinel Filho, V., Santos, A. R. S., Calixto, J. B., Delle Monache, F., Pizzolatti, M. G., & Yunes, R. A. (1998). Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. *Phytochemistry*, *48*(4), 725–728.
- Piza, A. C. M. T., Hokka, C. O., & de Sousa, C. P. (2015). Endophytic actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) triana (Melastomataceae) and evaluation of its antimicrobial activity. *Journal of Scientific Research and Reports*, 281–291.
- Pizzolatti, M G, Koga, A. H., Grisard, E. C., & Steindel, M. (2003). Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, *10*(5), 422–426.
- Pizzolatti, Moacir Geraldo, Cunha Jr, A., Pereira, W. S., & Delle Monache, F. (2004). A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, *32*(6), 603–606.
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. E. (2015). Salmonella. *Bergey's Manual of*

- Systematics of Archaea and Bacteria*, 1.
- Rao, M. S., & Raman, N. V. (2004). A novel flavonoid from *Polygala chinensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4(32), 447–448.
- Ratti, R. P. (2009). *Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por Streptomyces tubercidicus, endofítico isolado de Solanum lycocarpum St. Hill (Lobeira) do cerrado de São Carlos-SP*.
- Reis, A. A. dos. (2015). *Produção e caracterização de amilases bacterianas: α -amilase e ciclodextrina glucanotransferase (CGTase)*.
- Rodrigues, M. L. F., da Silva, E. A., Borba, C. E., Oliveira, A. C. D., Kruger, C., Raimundo, R. W., Silva, L. P., Rodrigues, M. L. F., & Stuaní, B. T. (2015). PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS PELO FUNGO ENDOFÍTICO. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 4, 129–145.
- Rojas-Rojas, F. U., Salazar-Gómez, A., Vargas-Díaz, M. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Hirsch, A. M., De Mot, R., Ghequire, M. G. K., Ibarra, J. A., & Estrada-de Los Santos, P. (2018). Broad-spectrum antimicrobial activity by *Burkholderia cenocepacia* TAtl-371, a strain isolated from the tomato rhizosphere. *Microbiology*, 164(9), 1072–1086.
- Romano, S., Jackson, S. A., Patry, S., & Dobson, A. D. W. (2018). Extending the “one strain many compounds”(OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*, 16(7), 244.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56–60.
- Sanglard, D. (2016). Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3, 11.
- Santos, E. C., Armas, E. D., Crowley, D., & Lambais, M. R. (2014). Artificial neural network modeling of microbial community structures in the Atlantic Forest of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 101–109.
- Santos, I. de A. L., Nogueira, J. M. da R., & Mendonça, F. C. R. (2015). *Mecanismos de resistência antimicrobiana em Pseudomonas aeruginosa*.
- Sebastianes, F. L. S., Cabedo, N., El Aouad, N., Valente, A. M. M. P., Lacava, P. T., Azevedo, J. L., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Cortes, D. (2012). 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Current Microbiology*, 65(5), 622–632.
- Serrano, N. F. G., Rodrigues, L., Hokka, C. O., Sousa, C. P., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2012). Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. *Chemical Papers*, 66(12), 1111–1117.
- SILVA JÚNIOR, M. C. (2014). *Guia do observador de árvores: tronco, copa e folha*. Brasília: Rede de sementes do cerrado.
- Song, L., Jenner, M., Masschelein, J., Jones, C., Bull, M. J., Harris, S. R., Hartkoorn, R. C., Vocat, A., Romero-Canelon, I., & Coupland, P. (2017). Discovery and biosynthesis of gladiolin: a *Burkholderia gladioli* antibiotic with promising activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*, 139(23), 7974–7981.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335.
- Specian, V., Costa, A. T., Felber, A. C., Polonio, J. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2016). Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. *Genetics and Molecular Research*, 15(2).
- Strobel, G. A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical*

- Reviews in Biotechnology*, 22(4), 315–333.
- Strobel, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5(6), 535–544.
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.
- Turner, K. H., Everett, J., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., & Whiteley, M. (2014). Requirements for Pseudomonas aeruginosa acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS Genet*, 10(7), e1004518.
- Uenojo, M., & Pastore, G. M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30(2), 388–394.
- Vandana, U. K., Rajkumari, J., Singha, L. P., Satish, L., Alavilli, H., Sudheer, P. D. V. N., Chauhan, S., Ratnala, R., Satturu, V., & Mazumder, P. B. (2021). The Endophytic Microbiome as a Hotspot of Synergistic Interactions, with Prospects of Plant Growth Promotion. *Biology*, 10(2), 101.
- Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32–38.
- Victório, C. P., Carriço, J. B., & Lage, C. L. S. (2011). Polygala paniculata: um recurso de salicilato de metila produzido por cultura de tecidos vegetais. *Revista Ceres*, 58(3), 269–272.
- Vieira, A. J. H., & Santos, J. I. (2017). Mecanismos de resistência de Candida albicans aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, 49(3), 235–239.
- Vu, T. H. N., Nguyen, Q. H., Le, T. T. H., Chu-Ky, S., & Phi, Q. T. (2019). OPTIMAL FERMENTATION CONDITIONS FOR ANTIBIOTIC PRODUCTION BY ENDOPHYTIC Streptomyces cavourensis YBQ59 ISOLATED FROM Cinnamomum cassia Presl. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 57(3B), 144.
- Wei, H., Lin, Z., Li, D., Gu, Q., & Zhu, T. (2010). OSMAC (one strain many compounds) approach in the research of microbial metabolites--a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao= Acta Microbiologica Sinica*, 50(6), 701–709.
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751–762.
- (da Silva et al., 2016) da Silva, T. da L., Kock, K., Scherer, A. J., Navroski, D., Barreiros, M. A. B., & Grange, L. (2016). Diversidade morfológica de Bacillus spp. obtidas de solos do oeste do Paraná sob diferentes sistemas de cultivo e natural. *Varia Scientia Agrárias*, 5(2), 109–123.
- Guzmán Flor, D. A. (2018). *Análisis químico del antibiótico producido por Bacillus megaterium aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas.*
- Quispe, I. J. S., Llanos, A. Z., Calero, J. N., Villena, C. F., & Cabrera, R. C. (2019). Caracterización enzimática de una celulasa producida por Bacillus sp.(GCB-13) para la degradación de sustratos lignocelulósicos. *Ciencia & Desarrollo*, 25, 61–67.

- Ramírez Rojano, M., & RAMIREZ ROJANO, M. (2016). *Extracción y caracterización de metabolitos secundarios a partir de Bacillus thuringiensis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Salazar Marroquín, E. L. (2016). *Detección y caracterización de bacteriocinas producidas por cepas de bacillus thuringiensis y su potencial como agentes antibacterianos*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda, L. (2016). Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos: un patógeno importante no controle microbiológico dos alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230–242.
- Sarti, G. C. (2019). *Metabolitos con actividad antifúngica producidos por el Género Bacillus*.
- Vega Oliveros, C. (2016). Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de Pleurotus y su uso potencial en un alimento de tipo funcional. *Departamento de Agronomía*.
- Zavaleta, R. A., Díaz, L. L., & Vega, R. S. (2016). Aislamiento y selección de cultivos nativos de Bacillus sp. productor de amilasas a partir de residuos amiláceos del mercado La Hermelinda, Trujillo, Perú. *REBIOL*, 36(2), 16–26.
- Guzmán Flor, D. A. (2018). *Análisis químico del antibiótico producido por Bacillus megaterium aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas*.