



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Caryocar brasiliense*:  
ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ANTIMICROBIANA, LEISHMANICIDA E CO-  
CULTURA COM MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS. ”**

**Pamela Carla Pereira de Assis**

Dissertação 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.

***Orientadores:***

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Prof. José Dalton Cruz Pessoa

**Bolsista CNPq - 130296/2016-3**

**São Carlos - SP  
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAMELA CARLA PEREIRA DE ASSIS

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Caryocar brasiliense*: ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ANTIMICROBIANA, LEISHMANICIDA E CO-CULTURA COM MICRORGANISMOS PATOGENICOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Cristina Paiva de Sousa

Orientador: José Dalton Cruz Pessoa

São Carlos  
2018





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Pamela Carla Pereira de Assis, realizada em 27/02/2018:

---

Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
UFSCar

---

Prof. Dra. Andrea Cristina Bogas  
ESALQ-USP

---

Prof. Dr. Francisco Cuzco Alves  
USP



Dedico este trabalho

Ao Cerrado e a todas as pessoas que lutam para preservá-lo.

O Cerrado resiste.





## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa pela orientação, confiança, aprendizado, paciência, oportunidade e privilégio de tê-la como orientadora;

Ao Prof. Dr. José Dalton Cruz Pessoa pela oportunidade de tê-lo como orientador;

À Universidade Federal de São Carlos -UFSCar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia -PPGBiotec;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq

À Profa. Dra. Fernanda Anibal por ter cedido as amostras de *Leishmania infantum*

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, por todo apoio, dedicação e aprendizado desde o início;

Aos meus pais Matilde e João, que sempre batalharam para que eu tivesse a melhor educação e que mesmo quando não concordaram com os caminhos que escolhi trilhar jamais deixaram de me apoiar. Obrigada pelo amor incondicional;

Ao meu irmão João pelo amor e amizade em todos esses anos;

Ao meu namorado Patrick Biskamp, que desde a graduação vem me apoiando em meus projetos. Meu referenciador e formatador oficial, que não mede esforços para me ver feliz e que muitas vezes acredita mais em meu potencial do que eu mesma. Espero um dia poder retribuir tudo o que você faz por mim;

As minhas filhas felinas, Suki, Dorothy, Frida e Mabel, que passaram madrugadas me fazendo companhia enquanto escrevia a dissertação ou preparava alguma apresentação e que tantas vezes me fazem sorrir com suas estripulias;

Ào Leonardo Seneme Ruy, por ser sempre tão solícito com todos que desejam conhecer o Cerrado da UFSCar e especialmente por ter me auxiliado na busca pelos pequizeiros;

À Michelly Bondância e Eike Campanini, os ICs com os quais aprendi muitas técnicas de laboratório, que tantas vezes me fizeram companhia nos finais de semana e que sempre me socorreram quando precisei;

À Carla Moreira, Rafael Cavicchioli e Bianca Soriano pela amizade dentro e fora do LaMiB. Obrigada por todas as vezes que vocês ouviram minhas lamúrias e por toda ajuda científica e psicológica durante essa jornada;

Ao Douglas Martins, que me apresentou a novas ideias e me ajudou a colocá-las em prática, ainda que para isso tenha precisado passar noites me ajudando no LaMiB;

À Genoveva Flores Lunas, que mesmo com o lindo Gui no colo não hesitou em me ajudar na análise dos dados;

Aos técnicos Paulo Andrade e Beto, sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos e a ajudar todos os Lamibianos;

À técnica Joana Bressolin do Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação pela paciência e cuidado com minhas amostras;

A todos os colegas do LaMiB pela companhia na hora do café, pelas conversas e por estarem sempre dispostos a partilhar conhecimento e experiências.

“Nada na vida é para ser temido, apenas entendido. Agora é o momento de entendermos mais para que possamos temer menos.”

MARIE CURIE



## RESUMO

Microrganismos endofíticos são definidos como aqueles que podem ser isolados de tecidos saudáveis de plantas, e que não causam danos aparentes ao hospedeiro. Esses microrganismos podem beneficiar indiretamente o crescimento de plantas através da produção de metabólitos secundários bioativos, que impedem o crescimento e a atividade de organismos patogênicos através de suas propriedades inseticidas e antimicrobianas. Portanto, são uma fonte de valor inestimável para a prospecção de novas moléculas de interesse biotecnológico. Atualmente, o mercado de enzimas tem movimentado milhares de dólares anualmente, com destaque para as enzimas produzidas por microrganismos. Além, disso o aumento da resistência à antibióticos por linhagens de microrganismos patogênicos tem tornado urgente a necessidade de descoberta e isolamento de novas moléculas com atividade antimicrobiana e antiparasitária. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi isolar endófitos associados à *Caryocar brasiliense*, espécie vegetal nativa do Cerrado brasileiro, comumente utilizada na medicina popular, mas com escassos estudos sobre sua comunidade de microrganismos endofíticos e potencial produção de metabólitos secundários. Foram isolados 42 microrganismos endofíticos de *C. brasiliense*, dos quais um foi identificado como uma actinobateria pertencente ao gênero *Streptomyces*. A avaliação da atividade enzimática demonstrou que 33,3%, 40,1%, 28,6% e 9,5% dos isolados apresentaram resultado positivo para amilase, protease, lipase e esterase, respectivamente. Nos testes preliminares para avaliação de atividade antimicrobiana, seis isolados apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e um isolado, a actinobactéria, apresentou atividade contra *Candida albicans*, o qual foi selecionado para os testes posteriores. A análise da cinética de crescimento de *Streptomyces* spp. demonstrou que o início da produção de substâncias bioativas contra *C. albicans* ocorreu entre 40 e 48 horas. A avaliação da bioatividade do extrato bruto produzido durante o co-cultivo com microrganismos potencialmente patogênicos demonstrou um aumento de 50% na inibição de *C. albicans* e promoveu a inibição de *S. aureus*, a qual não havia sido relatada no cultivo axênico. O ensaio de microdiluição avaliou a bioatividade do extrato bruto liofilizado de *Streptomyces* spp. contra *C. albicans*, o qual apresentou taxa de inibição superior a 90% na concentração 10 mg.L<sup>-1</sup> e 56% a 2 mg.L<sup>-1</sup>. Observou-se também o efeito leishmanicida desse extrato, e os resultados mostraram uma taxa de morte celular de 93% a 10 mg.L<sup>-1</sup> após 24h e 73% após 48h.

**Palavras-chave:** endófito, pequiizeiro, co-cultivo, antimicrobiano, leishmaniose



## ABSTRACT

Endophytic microorganisms are defined as those that can be isolated from healthy plant tissues, superficially disinfected and which do not cause apparent damage to the host. These microorganisms indirectly benefit the growth of plants through the production of secondary bioactive metabolites, which prevent the growth and activity of pathogenic organisms through their insecticidal and antimicrobial properties. Therefore, they are an invaluable source for the prospection of new molecules of biotechnological interest. Currently, the enzyme market has moved thousands of dollars annually, with emphasis on the enzymes produced by microorganisms. In addition, the increase of resistance to antibiotics by strain of pathogenic microorganisms has made urgent the need to develop new molecules with antimicrobial and antiparasitic activity. Hence, the aim of this study was to prospect for endophytes associated with *Caryocar brasiliense*, a plant species native to the Brazilian savannah. Although it is commonly used in folk medicine, there is only few studies about its endophytic community and production of secondary metabolites. Forty-two endophytic microorganisms were isolated from *C. brasiliense*, one was identified as an actinobacteria belonging to the genus *Streptomyces*. The evaluation of the enzymatic activity showed that 33.3%, 40,1%, 28,6% and 9,5% were positive for amylase, cellulase, 28.6% protease, lipase and esterase, respectively. In the preliminary tests for evaluation of antimicrobial activity, six isolates showed activity against *Staphylococcus aureus* and one isolate, the actinobacteria, showed activity against *Candida albicans*, and was selected for the subsequent tests. Analysis of the growth kinetics of *Streptomyces* spp. demonstrated that the beginning of the production of bioactive substances against *C. albicans* started in 40 hours. The bioactivity evaluation of the crude extract produced during co-culture with potentially pathogenic microorganisms demonstrated a 50% increase in inhibition of *C. albicans* and promoted inhibition of *S. aureus*, which had not been reported in axenic culture. The microdilution assay evaluated the bioactivity of lyophilized crude extract against *C. albicans*, which demonstrated an inhibition rate higher than 90% at concentration 10 mg.mL<sup>-1</sup> and 56% at 2 mg.mL<sup>-1</sup>. The leishmanicidal effect of this extract was also observed, and the results showed cell death rate of 93% at 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Keywords:** endophyte, pequiizeiro, co-culture, antimicrobial, leishmaniasis





## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de *C. brasiliense* frente a microrganismos potencialmente patogênicos: *E. coli*, *C. albicans*, *S.aureus*. Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana (+). ..... 43

Anexo A: Avaliação da atividade enzimática de todos os isolados endofíticos de *C. brasiliense*. (+) Presença de atividade, (-) ausência de atividade enzimática..... 73



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microrganismos endofíticos purificados. (A) R1 isolado de ramo; (B) F1 isolado de folha e (C) RZ3 isolado de rizosfera.....	38
Figura 2. Isolado RZ3 identificado fenotipicamente como pertencente ao gênero <i>Streptomyces</i> , observa-se a formação de micélio aéreo e coloração branco acinzentada. (A) Vista anterior das colônias após 7 dias de incubação a 28°C; (B) vista posterior após 7 dias de incubação; (C) Vista anterior das colônias após 20 dias de incubação e (D) vista posterior das colônias após 20 dias de incubação.....	38
Figura 3. Avaliação da atividade enzimática. Os halos identificam a formação de enzimas. (A) celulolítica; (B) amilolítica; (C) proteolítica; (D) lipolítica e (E) esterásica.....	41
Figura 4. Resultado percentual da atividade enzimática pelos isolados endofíticos de <i>C. brasiliense</i> .....	41
Figura 5. Cinética de crescimento bacteriano do isolado identificado como <i>Streptomyces</i> spp. ....	45
Figura 6. A bioatividade do isolado <i>Streptomyces</i> spp. coincidente com o final da fase exponencial (40h) e início da fase estacionária (48h).....	46
Figura 7. Avaliação da bioatividade do extrato bruto de <i>Streptomyces</i> spp. contra <i>C. albicans</i> . (A) início da atividade após 40 horas de cultivo e (B) final da bioatividade após 72 horas. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade.....	47
Figura 8. Co-cultivo de <i>Streptomyces</i> spp. com <i>C. albicans</i> . (A) início da atividade após 24h, (B) atividade após 48h e (C) pico de atividade após 72h de co-cultivo. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade.....	48
Figura 9. Bioatividade do extrato produzido a partir do co-cultivo de <i>Streptomyces</i> spp. com <i>S. aureus</i> . (A) observa-se o início da atividade a partir de 42 horas (B) menor bioatividade após 72 horas de cultivo. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade. ....	48
Figura 10. Gráfico de bioatividade do co-cultivo de <i>Streptomyces</i> spp. com microrganismos indicadores, <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> a cada 24 horas.....	49
Figura 11. Porcentagem de inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> em diferentes concentrações do extrato liofilizado.....	51
Figura 12. Gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função das concentrações do extrato liofilizado obtido a partir de <i>Streptomyces</i> spp. contra a forma promastigota de <i>L. Infantum</i> após 24 horas.....	53

Figura 13. Porcentagem de viabilidade celular em função das concentrações do extrato liofilizado obtido a partir de *Streptomyces* spp contra a forma promastigota de *L. Infantum* após 48 horas..... 54

## SÍMBOLOS E ABREVIações

ATCC: *American Type Culture Collection*

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: Cloreto de cálcio dihidratado

D.O: Densidade ótica

F: Folha

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>: Água destilada deionizada

ISP2: *International Streptomyces Project 2*

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monobásico de potássio

LaMiB: Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: Fosfato de magnésio heptahidratado

MH: *Müller-Hinton*

MSSA: *Meticilin Sensitive Staphylococcus aureus*

MRSA: *Meticilin Resistent Staphylococcus aureus*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: Fosfato de sódio dibásico heptahidratado

NaCl: Cloreto de sódio

NH<sub>4</sub>Cl: Cloreto de amônio

R: Ramo

Rpm: Rotações por minuto

RZ: Rizosfera

TSB: *Tryptic Soya Broth*

UFC.mL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mL

v/v: Volume por volume



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	15
2.1	O Cerrado.....	15
2.2	<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess, o pequizeiro .....	17
2.3	Microrganismos endofíticos.....	19
2.3.1	Atividade Enzimática de microrganismos endofíticos.....	20
2.3.2	Atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos .....	23
2.4	Co-cultivo como estratégia para descoberta de novos compostos bioativos.....	26
2.5	Atividade Leishmanicida .....	27
3	OBJETIVOS .....	29
3.1	Objetivos gerais .....	29
3.2	Objetivos específicos .....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	Isolamento de microrganismos endofíticos.....	30
4.2	Atividade Enzimática .....	31
4.2.1	Atividade celulolítica .....	31
4.2.2	Atividade amilolítica.....	31
4.2.3	Atividade proteolítica .....	32
4.2.4	Atividade lipolítica .....	32
4.2.5	Atividade esterásica .....	32
4.3	Triagem da Atividade Antimicrobiana .....	32
4.4	Cinética de Crescimento .....	33
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco .....	34

4.6	Co-cultivo e avaliação do extrato bruto fresco .....	34
4.7	Ensaio de microdiluição .....	35
4.8	Determinação da atividade leishmanicida.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1	Isolamento de microrganismos endofíticos.....	38
5.2	Avaliação da atividade enzimática .....	40
5.3	Triagem da atividade antimicrobiana .....	43
5.4	Cinética de crescimento e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco .....	44
5.5	Co-cultivo e avaliação do extrato bruto fresco .....	47
5.6	Ensaio de Microdiluição .....	50
5.7	Avaliação do extrato bruto contra a forma promastigota de <i>Leishmania infantum chagasi</i> .....	53
6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58



## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro possui uma das maiores diversidades de fauna e flora do mundo, sendo considerado um hotspot para a conservação da biodiversidade (RATTER, et al., 1997; MYERS, 2000). É classificado como um mosaico de biomas, constituído por uma fitofisionomia única, consequência da ação do fogo natural e antropogênico e um solo pobre em nutrientes, mas rico em alumínio e com alta acidez. Essas características, somadas ao alto grau de espécies vegetais endêmicas tornam o Cerrado um local interessante para a bioprospecção de novas moléculas bioativas (SOUSA, et al., 2017)

Dentre as espécies vegetais que se destacam no Cerrado podemos citar o *Caryocar brasiliense*, popularmente conhecido como pequi ou pequi. Esse é considerado de grande importância econômica e social, é empregado na culinária, pois possui alto valor nutricional, além de ser aplicado para fins medicinais por populações tradicionais, onde emprega-se principalmente o óleo e as folhas no tratamento de problemas respiratórios e abdominais (CHÉVEZ-POZO, 1997; VIEIRA e MARTINS, 2000).

Há relatos na literatura de atividade antibacteriana, antitumoral e leishmanicida de extrato hidroetanólico de pequi (PAULA-JUNIOR, et al., 2006, CARDOSO, et al., 2012). Todavia, apesar dos inúmeros benefícios promovidos por essa espécie vegetal, os relatos de estudo de sua comunidade endofítica são escassos.

Endofíticos são microrganismos que crescem no interior de tecidos vegetais sem causar dano aparente às plantas (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007). São uma fonte natural de metabólitos secundários que podem ser empregados com os mais diferentes fins biotecnológicos, desde aditivo de detergentes até a indústria farmacêutica e como suplemento médico.

As enzimas produzidas por microrganismos endofíticos são de grande interesse industrial. Trata-se de uma alternativa sustentável, verde, em comparação aos processos tradicionais que, em geral, exigem condições mais extremas de pH, temperatura e pressão, o que os torna mais onerosos, além

de haver a geração de resíduos potencialmente poluentes (ADRIO E DEMAIN, 2014).

Além disso, os endofíticos são uma interessante fonte para a bioprospecção novas moléculas com atividade antibacteriana e antiparasitária, pois naturalmente produzem moléculas capazes de inibir microrganismos fitopatogênicos. Outro benefício dos metabólitos secundários produzidos pelos endofíticos é o fato dessas moléculas apresentarem maior “droga-semelhança”, biocompatibilidade (SOUSA et al., 2017) e similaridade biológica do que as moléculas totalmente sintéticas (KOEHN e CARTER, 2005), o que os tornam bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos (BALUNAS e KINGHORN, 2005; DRAHL et al., 2005).

Na busca de novas moléculas com atividade antimicrobiana, o co-cultivo tem sido amplamente aplicado como metodologia que visa aumentar a produção de metabólitos secundários por endofíticos. O co-cultivo consiste em cultivar dois ou mais microrganismos em conjunto na tentativa de produzir interações que levem a expressão de genes outrora silenciados devido as condições do cultivo axênico e, conseqüentemente, a produção de novos metabólitos secundários (MARMANN, et al., 2014, VINALE, et al., 2014).

Tendo em vista o potencial biotecnológico de *C. brasiliense*, o presente trabalho visou isolar microrganismos endofíticos provenientes das folhas, ramos e solo rizosférico, bem como avaliar a produção de enzimas e a bioatividade desses isolados frente a microrganismos potencialmente patogênicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Cerrado

As savanas cobrem 20% da superfície terrestre e são caracterizadas pela presença de uma camada contínua de vegetação herbácea, um dossel descontínuo de arbustos e árvores e pelo padrão pluviométrico anual, constituído de uma estação seca e uma chuvosa. A maior parte desse ecossistema está situada entre os Trópicos de Câncer e Capricórnio, e portanto são denominadas savanas tropicais, as quais possuem uma vasta diversidade de fauna e flora (GOEDERT; WAGNER; BARCELLOS, 2008; MMA, 2017 ).

O Cerrado brasileiro é a savana tropical mais rica do mundo do ponto de vista da diversidade biológica, uma vez que, possui 1.627 mil espécies de plantas, 180 espécies de répteis, 150 espécies de anfíbios, 1.200 espécies de peixes, aproximadamente 837 espécies de aves e 199 espécies de mamíferos (KLINK e MACHADO, 2008).

É considerado um dos *hotspots* mundiais para conservação da biodiversidade devido ao alto número de espécies endêmicas. O grau de endemismo é de 28% para anfíbios, 17% para répteis e 44% para plantas superiores (MYERS, 2000; MMA, 2017).

Apesar de ser conhecido popularmente como um bioma, o Cerrado é na realidade um mosaico de biomas (BATALHA, 2011). É um mosaico vegetacional que vai do campo limpo ao cerradão, com o predomínio de três formações vegetais: florestais, onde prevalecem as espécies arbóreas e ocorre formação de dossel contínuo em algumas regiões; savânica, na qual não há formação de dossel, pois as árvores e arbustos distribuem-se de maneira esparsa sobre um estrato graminoso; e áreas de campo formadas, principalmente, por espécies herbáceas e arbustivas (COUTINHO, 2006; SANO et al., 2008; SILVA JÚNIOR et al., 2014)

O Cerrado brasileiro engloba mais de 204 milhões de hectares, o que corresponde à 24% do território do País. É encontrado nos estados de Goiás, Tocantins, Distrito Federal, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso do Sul,

Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo, e ao norte dos estados do Amapá, Amazônia, Pará e Roraima. Essa ampla distribuição explica as variações de domínio em relação ao relevo, solo e atributos climáticos (WALTER, 1998; ALMEIDA et al, 1998; SANO, et al., 2010).

O clima predominante do Cerrado é o tropical sazonal, com um período chuvoso que dura de outubro a março seguido por um período seco de abril a setembro. A média anual de precipitação é de 1.500mm e as temperaturas são amenas ao longo do ano, sendo a variação média entre 22 e 27°C (KLINK e MACHADO, 2005; LOPES, 2008).

Aproximadamente 46% dos solos do Cerrado são do tipo Latossolo, que tem como características a profundidade e a coloração que varia do vermelho para o amarelo. Além disso, tratam-se de solos porosos, permeáveis e bem drenáveis. São intensamente lixiviáveis, sendo, portanto, pobres em nutrientes. É um solo rico em alumínio, o que o torna muito ácido com o pH variando entre 4 e 5. (KLINK e MACHADO, 2005).

Essas características do solo, somadas aos períodos de seca e aos incêndios naturais e antropogênicos fazem com que o Cerrado possua uma fitofisionomia singular. Sua flora é composta por gramíneas, ervas e plantas lenhosas, sendo esta geralmente recoberta por um indumento espesso, além de arbustos e árvores que possuem troncos e galhos contorcidos com cascas grossas e resistentes ao fogo, folhas coriáceas e raízes profundas que permitem acesso aos lençóis freáticos (GUARIM NETO, 1996; FANK-DE-CARVALHO, et al., 2015).

A flora do Cerrado possui grande potencial medicinal tanto pela sua diversidade taxonômica quanto pelas suas características morfológicas, uma vez que, apresentam estruturas como cascas, que acumulam reservas e frequentemente possuem substâncias farmacologicamente ativas. (PEREIRA et al., 2007).

No entanto, trata-se de uma área negligenciada que está sendo amplamente degradada. As principais ameaças à biodiversidade no Cerrado

estão na expansão da agricultura, com destaque para as monoculturas de soja, milho e cana-de-açúcar, e da pecuária, que juntas perfazem 67% das instalações agrícolas do Cerrado e se consolidam com uso significativo de intensa mecanização e emprego de alta tecnologia com agroquímicos, dentre esses, os herbicidas (CUNHA et al., 2008, QUEIROZ, 2009; RIBEIRO et al., 2014)

Assim, o Cerrado deve ser considerado como uma promissora área de pesquisa de plantas medicinais e recursos microbianos naturais associados.

## **2.2 *Caryocar brasiliense* Cambess, o pequizeiro**

*C. brasiliense*, popularmente conhecido como pequizeiro, é uma espécie arbórea, nativa dos Cerrados brasileiros pertencente à família Caryocaraceae (ARAÚJO, 1995). É uma das árvores símbolo do Cerrado, recebendo a alcunha de “ouro do Cerrado” devido à sua importância nutricional, social e econômica. Sua distribuição abrange os Estados da Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo e Tocantins (ALMEIDA et al., 1998).

O pequizeiro está presente no Cerrado sentido restrito, Cerradão e Campo sujo (GUIMARÃES, 2017). Os indivíduos dessa espécie apresentam altura variável, entre 4 e 11 m, característica que pode estar relacionada a diferentes fatores, como características químicas do solo com reduzida fertilidade ou ainda a fatores genéticos (LOPES et al., 2006; CARVALHO, 2009).

É uma heliófita seletiva, xerófita, semidescídua. Suas folhas caem parcialmente no final do período chuvoso. O tronco e os ramos são tortuosos, grossos e possuem casca externa de cor acinzentada, com fissuras e cristas sinuosas e descontínuas (CARVALHO, 2009). As folhas são compostas, trifolioladas e opostas; os folíolos são denteados, obovais de ápice obtuso, pilosos, com nervuras abaxiais salientes que podem medir até 20 cm de comprimento e 15 cm de largura (CARVALHO, 2009).

As flores são hermafroditas, actinomorfas e compostas por múltiplos estames brancos. A coloração varia entre o esverdeado e o branco, o que associado ao seu forte odor e ao néctar produzido ao entardecer sugere que essa seja uma espécie polinizada, principalmente, por morcegos (OLIVEIRA et al., 2008). A floração ocorre de junho a janeiro.

O fruto do pequi, o pequi, é do tipo drupáceo, composto por casca de cor verde-acinzentada, mesocarpo amarelado e sementes envoltas por endocarpo duro, lenhoso e espinuloso. A casca do fruto maduro representa cerca de 84% do peso, enquanto a polpa corresponde apenas a 10% do peso total (MORAIS et al, 2016). A frutificação ocorre de outubro a fevereiro e serve como alimento para os animais do Cerrado.

O nome popular pequi é derivado dos espinhos presentes no endocarpo, uma vez que, em tupi-guarani “*py*” significa pele e “*qui*” espinho, ou seja, casca espinhenta (SOUZA e SALVIANO, 2002). O fruto é amplamente utilizado na culinária regional, onde tanto o mesocarpo quanto a amêndoa são consumidos. A polpa do pequi é rica em vitamina A, ácidos graxos e compostos bioativos (GARCIA et al., 2007; VERA et al., 2007; ROESLER et al., 2008).

Além do uso culinário as populações tradicionais costumam utilizar o pequi para fins farmacológicos. O óleo extraído da polpa do pequi é administrado no tratamento de bronquites, gripes, resfriados, edemas e queimaduras (CHÉVEZ- POZO, 1997; VIEIRA; MARTINS, 2000). As folhas do pequi são consideradas adstringentes, pois possuem capacidade de estimular a produção de bÍlis (CHÉVEZ-POZO, 1997). Em estudo etnoecológico realizado em uma comunidade quilombola de Minas Gerais, Pinto *et al.*, (2016) constatou que 17% da população utilizava o pequi para fins medicinais, por meio da infusão de folhas jovens, com o objetivo de combater gripe, dores abdominais e problemas renais.

O extrato hidroetanólico de folhas de *C. brasiliense* possui atividade antibacteriana e antitumoral (PAULA-JUNIOR, et al., 2006). Além disso, um estudo realizado por Cardoso et al., (2012) demonstrou que este tipo de extrato

possui atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Apesar do grande número de benefícios relacionados à utilização do óleo e das folhas do pequizeiro há poucos relatos na literatura sobre a população de endofíticos associada a *C. brasiliense*, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas, visto que os endofíticos apresentam grande potencial biotecnológico.

### **2.3 Microrganismos endofíticos**

O desenvolvimento das plantas no ambiente depende de sua interação com outros seres vivos. Evolutivamente a interação mutualística entre plantas e microrganismos possibilitou o desenvolvimento de complexos mecanismos adaptativos (PEIXOTO NETO, AZEVEDO e CAETANO, 2004). Dentre essas relações destacam-se as realizadas com microrganismos endofíticos.

Os microrganismos endofíticos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866), que os considerou assintomáticos, ou seja, não produziam efeitos prejudiciais nem benéficos as suas plantas hospedeiras, sendo, portanto, pouco estudados até a década de 70, época em que verificou-se que havia uma relação benéfica entre planta e endofítico observada por meio da proteção contra insetos – praga, microrganismos patogênicos e herbívoros.

De acordo com Azevedo e Araújo (2007), define-se como microrganismo endofítico fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico ao hospedeiro, trata-se de uma relação simbiótica, na qual a planta hospedeira fornece recursos vitais para o microrganismo endofítico e este produz metabólitos bioativos que tem efeito de proteção para a planta contra o ataque de fitopatógenos, além de auxiliarem seu crescimento.

Mendes e Azevedo (2007) dividiram os endófitos em dois tipos: tipo I são os microrganismos que não produzem estruturas externas à planta e tipo II são

os que desenvolvem estruturas externas às plantas. Esses microrganismos podem ser isolados de várias partes das plantas, como flores, sementes, folhas, frutos, raiz e caule (SANTOS, 2016; SOUSA et al., 2017; ALVES et al., 2017; NERIS et al., 2017).

Existem aproximadamente 300.000 espécies de plantas na Terra e cada uma delas deve ser hospedeira de pelo menos um microrganismo endofítico (STROBEL e DAISY, 2003). Os ecossistemas com maior diversidade de espécies vegetais devem, também, possuir a maior diversidade de microrganismos endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003). A variedade de biomas presentes no Brasil reflete a riqueza da flora e da fauna brasileira, sendo o país com a maior diversidade vegetal do mundo (PLOTKIN, 1991; FUNBIO, 2006; SOUSA et al., 2017), tornando-o promissor para o estudo destes microrganismos.

Dentre os Biomas brasileiros para bioprospecção de microrganismos endofíticos destaca-se o Cerrado devido a suas características singulares, como a fitofisionomia, o alto grau de endemismo vegetal e o solo pobre em nutrientes, mas rico em alumínio e com alta acidez (PIZA et al., 2016).

### **2.3.1 Atividade enzimática de microrganismos endofíticos**

Enzimas são, em sua maioria, proteínas capazes de diminuir a energia de ativação de determinadas reações químicas, sendo, portanto, catalisadores biológicos. As enzimas possuem alta especificidade com seu substrato e não são consumidas durante a reação. Estão presentes em todos os seres vivos e são de suma importância para a manutenção da vida. Além disso, são fundamentais na degradação da matéria orgânica, nos processos infecciosos e na deterioração dos alimentos (NELSON e COX, 2014).

São amplamente utilizadas em processos industriais por apresentarem muitas vantagens frente aos processos químicos tradicionais, tais como atuação sob condições de operação mais brandas (temperatura, pH e pressão),



aplicabilidade sobre moléculas térmica e quimicamente instáveis a altas temperaturas, elevado controle estereo-, quimio- e regioseletivo, além de reduzida geração de subprodutos (JOHNSON, 2013; ADRIO e DEMAÏN, 2014).

As enzimas mais estudadas são de origem animal ou vegetal. No entanto, o interesse por enzimas produzidas por microrganismos está aumentando, principalmente, em função da alta capacidade de produção em larga escala, da facilidade de manipulação genética e do baixo custo. De acordo com Adrio e Demain (2014), cerca de 150 processos industriais utilizam enzimas provenientes de microrganismos ou processos microbianos.

Dentro os microrganismos de interesse, destacam-se os microrganismos endofíticos, que são 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, apresentando, assim, grande potencial de aplicação nas indústrias, agrícola, farmacêutica e alimentícia (STROBEL, 2003; PIMENTEL, 2011; LACAVALA e AZEVEDO, 2014).

A celulose é a principal constituinte das paredes celulares, sendo o componente mais abundante dos vegetais e também do planeta (KOBBLITZ, 2010). Trata-se de um polímero composto apenas por monômeros de glicose, homopolímero, unidos por ligações glicosídicas $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (SILVA, 1997). As celulasas são enzimas que catalisam a quebra dessas ligações glicosídicas entre resíduos de D-glicose na molécula de celulose ou de seus derivados solúveis (SILVA, 1997). Historicamente, são enzimas 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 tem sido empregadas com sucesso na sacarificação da biomassa lenhocelulósica pré-tratada para a produção de biocombustíveis de segunda geração e nas indústrias de detergentes (BHAT, 2000; HESS, 2008; KUHAD, 2011). Organismos celulolíticos são ubíquos na natureza e correspondem principalmente a fungos e bactérias (FRANCO-CIRIGLIANO et al., 2013).

As amilases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas presentes no amido, glicogênio e sacarídeos derivados, sendo empregadas 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). Além disso, podem ser utilizadas como aditivo de detergentes, na sacarificação do amido, e na indústria de papel, têxtil e fermentação (SAXENA *et al.*, 2007; PANDEY *et al.*, 2000; CUZZI *et al.*, 2011)

As proteases correspondem aproximadamente a 60% do mercado mundial de enzimas (ADRIO e DEMAIN, 2014). São enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas e por isso participam de inúmeros processos fisiológicos. As principais utilizações ocorrem na indústria de detergentes, onde uma protease de origem bacteriana foi empregada pela primeira vez em 1956, era uma alcalase produzida pelo *Bacillus licheniformis* (ADRIO e DEMAIN, 2014), e na alimentícia, principalmente para a produção de queijos. As proteases também são utilizadas na produção de bebidas, processamento de pele e couro, indústria farmacêutica e têxtil (MERHEB, 2007; LADEIRA *et al.*, 2010).

As lipases e esterases são denominadas “enzimas lipolíticas”. Trata-se de um grupo de hidrolases capaz de catalisar a quebra e a formação de ligações éster (LOPES, *et al.*, 2011). São enzimas amplamente distribuídas na natureza, estando presente em animais, vegetais e microrganismos. 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 (VERGER, 1997; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; GHALY *et al.*, 2010, MESSIAS; 2011). Na indústria são amplamente empregadas em processos que envolvem síntese orgânicas, como fabricação de detergentes, papel e celulose, na síntese de biopolímeros e biodiesel (ATESLIER; METIN, 2006; SOLIMAN *et al.*, 2007, CORTEZ *et al.*, 2017).

### 2.3.2 Atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos

Os antibióticos foram uma das maiores invenções do século XX. Descobertos por acaso, por Alexander Fleming, em 1928, quando esse esqueceu uma placa com *Staphylococcus aureus* aberta em seu laboratório, e ao retornar para o local de trabalho percebeu que um fungo, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, era capaz de inibir o crescimento do microrganismo patogênico. Assim, a substância responsável pela inibição que recebeu o nome de penicilina, tornou-se o primeiro antibiótico do mundo e alterou para sempre a história da humanidade.

Todavia, antibióticos tendem a perder sua eficácia com o passar do tempo devido ao surgimento e disseminação de resistência entre agentes patogênicos (ROSSOLINI, et al., 2014). A resistência à antibióticos 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 por fim gera questões econômicas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 90% das linhagens bacterianas são resistentes à drogas de primeira escolha. Portanto, a busca por novas moléculas com atividade antimicrobiana é urgente.

Em fevereiro de 2017 a OMS liberou sua primeira lista de agentes patogênicos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos na qual a *E. coli* foi classificada como prioridade crítica e *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) foi classificado como prioridade alta (WHO, 2017). Além disso, a resistência da levedura *C. albicans* aos fungicidas atuais também tem aumentando nos últimos anos (SANGLARD, 2016). Tais fatores tornam esses microrganismos interessantes objetos de estudo.

A levedura *C. albicans* é um microrganismo eucarioto, diploide, que se multiplica por brotamento, mas que também pode desenvolver tubo germinativo (VIEIRA e SANTOS, 2017). É uma das componentes da microbiota humana, podendo habitar o trato gastrointestinal, pele, e mucosa do trato respiratório. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos, esse microrganismo comensal

pode tornar-se um agente promotor de infecção. Infecções causadas por *C. albicans* são o quarto tipo de infecção mais comum em hospitais, sendo fatais em um percentual muito elevado, 42% dos casos (GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003).

O aumento do 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 (FORD et al., 2015). 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 (VIEIRA e SANTOS, 2017).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo, e, portanto, possui cápsula polissacarídica revestindo a camada externa da parede celular. É constituinte da microbiota humana e cerca de 30% da população mundial é colonizada por *S. aureus*, sendo encontrada principalmente na pele e mucosas (WERTHEIM et al., 2005). Todavia, *S. aureus* é o principal causador de bacteremia e endocardite infecciosa em indivíduos imunossuprimidos (TONG, et al., 2015).

Até a década de 50 as infecções causadas por *S. aureus* eram tratadas com penicilina, entretanto, com o desenvolvimento de cepas resistentes fizeram-se necessário o desenvolvimento de novos medicamentos, assim, surgiu e metilina, desenvolvida em laboratório, tendo como mecanismo de ação baseado no anel beta lactâmico modificado (HAUSER, 2009). No entanto, a partir da década de 60 surgiram os primeiros relatos de cepas resistentes a metilina, que foram denominadas *S. aureus* metilina resistentes (MRSA).

Inicialmente, o MRSA ficou restrita ao ambiente hospitalar, mas em 1990 uma nova linhagem denominada *S. aureus* resistente à metilina associado à comunidade (CA-MRSA) passou a ser reportada em indivíduos que não apresentavam fatores de risco (BOYCE, 2008; WONG, et al., 2017). Tais eventos elevaram o uso de vancomicina no tratamento de infecções causadas por *S.*

*aureus*, e em 1997, no Japão, foi relatado o primeiro caso de uma cepa resistente a esse medicamento (LIMA et al., 2015).

A bactéria *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo que normalmente é encontrada no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos (ALVES et al., 2017), incluindo o ser humano. Representa cerca de 80% da microbiota aeróbia e participa da síntese de vitamina K (KORB, et al., 2013). No entanto, em indivíduos vulneráveis esse microrganismo pode tornar-se patogênica, sendo responsável por até 90% dos casos de infecção urinária e 50% das infecções nosocomiais (KARLOWSKY e TRENDS, 2002; PALAU et al., 2011).

A falta de informação e de acompanhamento no uso de antibióticos fez com que muitas bactérias conferissem resistência a eles, assim, na década de 90 a resistência de *E. coli* à amoxicilina e à ampicilina chegou a 40%. (LINDGREN, KARLSSON e DIARMAID, 2003).

Tendo em vista o aumento da resistência microbiana aos antibióticos empregados atualmente, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o combate das infecções causadas por esses microrganismos. Os microrganismos endofíticos apresentam uma fonte promissora, para a prospecção de antimicrobianos, uma vez que, trata-se de uma fonte rica em metabólitos secundários e, conseqüentemente, de novos compostos biológicos (STROBEL, 2003; DAS, PATRA e BAEK 2016).

Em trabalho realizado por Carrim et al. (2016) 7 dos 10 dos isolados endofíticos de *Jacarranda decurrens* Cham (carobinha-do-campo), apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos uma das 15 cepas indicadoras usadas no estudo.

Bactérias endofíticas isoladas de plantas medicinais do Irã foram testadas contra sete espécies de microrganismos potencialmente patogênicos e 16 dos 23 isolados endofíticos apresentaram atividade antibacteriana (BEIRANVAND, et al., 2017).

## 2.4 Co-cultivo como estratégia para descoberta de novos compostos bioativos

As interações entre os microrganismos, seus hospedeiros e o ambiente que habitam constituem forças para a produção de metabólitos secundários (OH, 2007). Assim, os cultivos microbianos, e conseqüentemente a produções de metabólitos secundários, são afetados pelas condições experimentais, nas quais estão ausentes interações do tipo competição, antagonismo e até mesmo simbiose, o resultado, frequentemente, é o re-isolamento de metabólitos já conhecidos (SUNG, GROMEK e BALUNAS, 2017, VINALE, et.al., 2017). Todavia, replicar essa miríade de interações tem sido um desafio na bioprospecção de novas moléculas (OH, 2007; GONTANG et al., 2010).

O co-cultivo, também conhecido como “cultivo misto” é uma abordagem ecológica que tenta mimetizar as condições naturais do habitat do microrganismo alvo, por meio da criação de uma comunidade microbiana mais ou menos complexa, que permite que o mesmo seja exposto a uma multiplicidade de sinais químicos que são trocados entre as diferentes espécies que compõem o cultivo (MARMANN, et al., 2014).

Análises de sequenciamento genômico tem demonstrado que, apesar de abundantes, os *clusters* de genes biossintéticos capazes de produzir metabólitos secundários não são transcritos quando expostos às condições laboratoriais (RUTLEDGE e CHALLIS, 2015). Portanto, a indução da competitividade entre os microrganismos componentes do co-cultivo é provocada de maneira deliberada como uma tentativa de promover a ativação dos genes que ficam silenciados no cultivo axênico aumentando, assim, a possibilidade de transcrição de metabólitos secundários ainda não descritos (MARMANN, et al., 2014).

Um total de 112 cepas de actinobactérias isoladas de amostras de solo coletadas no Japão foram submetidas a co-cultivo com a bactéria Gram-positiva *Tsukamurella pulmonis* (ONAKA 2017). Após 7 dias de cultivo, os caldos de cultura foram extraídos e analisados em HPLC. Os picos de HPLC correspondentes foram comparados entre culturas puras e culturas combinadas,

e os resultados apontaram que 99 de 112 cepas apresentaram mudanças nos padrões de metabolismo secundário na cocultura. Entre essas cepas, 41 produziram novos metabólitos somente na cultura combinada, 87 cepas apresentaram aumento ou diminuição das quantidades de metabólitos e 12 cepas não apresentaram alterações significativas na cultura combinada. Estes resultados revelaram que *T. pulmonis* alterou o metabólito secundário de actinomicetos com alta eficiência de 88%.

## 2.5 Atividade Leishmanicida

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças causadas por parasitas e bactérias, que atingem mais de um bilhão de pessoas no mundo são doenças que afetam o desenvolvimento físico e cognitivo e atingem principalmente a população de baixa renda dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (CDC, 2017). Dentre as DTNs pode-se destacar as leishmanioses.

As leishmanioses são um grupo de zoonoses provocadas por parasitas do gênero *Leishmania* pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que são transmitidos através da picada fêmeas hematófagas de flebotomíneos infectadas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae).

A OMS define três tipos principais de leishmaniose: a cutânea, a mucocutânea e a visceral, sendo esse último o tipo mais letal. São estimados aproximadamente 300.000 casos de leishmaniose visceral (LV) por ano, dos quais 6% são fatais (WHO, 2015). Em 2015 mais de 90% dos casos reportados à OMS ocorreram em 7 países: Etiópia, Índia, Brasil, Quênia, Sudão e Sudão do Sul. Na América do Sul 96% dos casos reportados de LV ocorreram no Brasil (PAHO, 2017).

Os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B são as drogas mais utilizadas para o tratamento da leishmaniose. Todavia, o fato de terem sido descobertos há mais de 70 anos, conferem desvantagens significativas,

principalmente em termos de eficácia, tempo de tratamento, baixa capacidade de produção e o alto custo, caracteres esses que, somados, muitas vezes tornam esses remédios inacessíveis a população (WHO, 2011; CONTI e PINTO JUNIOR 2015).

Portanto, a busca por novas opções que contribuam para controle das leishmanioses, principalmente da LV é de grande importância para a saúde pública mundial.

Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos têm sido empregados em testes *in vitro* contra leishmaniose. Santiago et al. (2012), isolaram 564 fungos endofíticos de duas espécies de angiospermas provenientes da Antártida, dos quais 19 apresentaram atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. amazonensis*. No entanto, não foram encontrados estudos relatando a atividade de metabólitos secundários produzidos por actinobactérias contra *Leishmania infantum chagasi*, espécie que causa LV, o que a torna um interessante objeto de estudo.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Realizar a produção de metabólitos secundários bioativos produzidos pelas comunidades de microrganismos endofíticos isolados de *Caryocar brasiliense* (pequizeiro) nativa do Cerrado de São Carlos - SP.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Isolar bactérias endofíticas de folha, caule e rizosfera de *C. brasiliense*;

Avaliar a atividade enzimática das bactérias endofíticas isoladas de *C. brasiliense*;

Verificar a ocorrência de antagonismo dos isolados frente as bactérias *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* e ao fungo leveduriforme *Candida albicans*;

Avaliar a bioatividade do extrato produzido por meio de co-cultivo com microrganismos potencialmente patogênicos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolamento de microrganismos endofíticos

Foram coletadas folhas, ramos e solo rizosférico de *C. brasiliense* localizados na área de Cerrado no campus da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - São Carlos - SP, Brasil. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar. Foram selecionados os tecidos vegetais saudáveis, sem manchas ou lesões causadas por patógenos ou outros agentes, os quais foram processados em um intervalo máximo de duas horas (ARAÚJO, et al., 2002) até o início das análises.

Foram pesados 10 g de cada tecido vegetal saudável coletado, os quais foram submetidos ao procedimento de desinfecção superficial com o objetivo de eliminar os microrganismos epifíticos. Nesse processo as folhas foram sequencialmente imersas em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 3% por 1 minuto, etanol 70 % por 30 segundos. Já os ramos foram imersos na mesma sequência por 1 minuto, 3 minutos e 1 minuto nos agentes desinfetantes. Por fim, foram realizados dois enxágues em água destilada esterilizada, sendo que 100 uL da segunda água de enxágue foi plaqueado em meio TSB acrescido de 15g.L<sup>-1</sup> de ágar para garantir a eficiência do processo de desinfecção.

Em seguida as folhas e os ramos foram cortados, assepticamente, em pedaços de 0,1-0,5 cm, os quais foram colocados em 15 mL de tampão PBS e levados para shaker orbital a 150 rpm por 2 horas. Após esse procedimento inoculou-se 100 uL da solução de PBS contendo folhas e ramos em ágar TSB e ISP2(10g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 2,5g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 6g.L<sup>-1</sup> de glicose; 15g.L<sup>-1</sup> de ágar a pH 7,0) as placas foram incubadas a 20°C por 15 dias

Para as amostras de solo rizosférico, foram pesados 10 g das amostras e adicionados em 90 mL de tampão PBS, os quais foram mantidos em shaker orbital a 150 rpm por 2 horas. Então, a solução de PBS contendo rizosfera foi

submetida à diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$  -  $10^{-4}$ ), que foram plaqueadas em meio TSB (ágar) e ágar ISP2, por fim foram incubadas na mesmas condições descritas acima.

## **4.2 Atividade Enzimática**

Para a avaliação qualitativa da produção das enzimas amilase, celulase, protease, lipase e esterase, a placa de Petri foi dividida em nove sessões e em cada uma delas foi semeado um isolado endofítico. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Abaixo, são apresentadas as composições de cada um dos meios utilizados nos ensaios enzimáticos:

### **4.2.1 Atividade celulolítica**

Fórmula por Litro de H<sub>2</sub>Odd: 10g de Carboximetilcelulose; 5g de Extrato de Levedura; 12,8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7h<sub>2</sub>O; 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g de NaCl; 1g de NH<sub>4</sub>Cl; 5g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 15g 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 foram lavadas depois de 15 minutos com NaCl (5 mol.L<sup>-1</sup>). A presença de halo amarelado ou alaranjado em torno da colônia, indicou atividade celulolítica.

### **4.2.2 Atividade amilolítica**

Fórmula por Litro de H<sub>2</sub>Odd: 10g de Amido solúvel; 5g de Extrato de levedura; 12,8g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7h<sub>2</sub>O; 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g de NaCl; 1g de NH<sub>4</sub>Cl; 5g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,01g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 15g de Ágar. O pH foi ajustado para 7,2. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10 mL de solução de iodo (1%) na placa, que foi lavada quase imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase.

#### **4.2.3 Atividade proteolítica**

A formulação do meio para 900 mL H<sub>2</sub>Odd: 10g de peptona; 5 g de extrato de levedura; 1g de glicose; 5g de NaCl e 15g 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.

#### **4.2.4 Atividade lipolítica**

Fórmula para 990 mL H<sub>2</sub>Odd: 10g de Peptona; 5g de extrato de levedura; 5g de NaCl; 0,1g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; e 15g de Agar. O pH foi ajustado para 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A presença de halos cristalizados ao redor da bactéria indicou atividade lipolítica.

#### **4.2.5 Atividade esterásica**

Fórmula para 990 mL H<sub>2</sub>Odd: 10g de Peptona; 5g de extrato de levedura; 5g de NaCl; 0,1g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; e 15g de ágar. O pH foi ajustado para 7,4 a. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado. A presença de halos cristalizados ao redor da bactéria indicou atividade lipolítica.

### **4.3 Triagem da Atividade Antimicrobiana**

O teste do bloco de gelose (Ichikawa et al., 1971) foi utilizado como bioensaio qualitativo para detectar produção de compostos bioativos. Os microrganismos endofíticos foram crescidos em caldo TSB ou ISP2 por 48 horas, em seguida foram semeados em forma de tapete, com auxílio de *swab* esterilizado, em placas contendo 10mL de ágar TSB ou ISP2 e foram incubados a 28°C por 48 horas.

Foram utilizados, como microrganismos indicadores, cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Estas cepas foram reativadas em tubo contendo caldo 5 ml de caldo TSB e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período os microrganismos foram semeados em placa contendo ágar Müller-Hinton (MH) e incubados nas mesmas condições anteriormente citadas. Então, prepararam-se os inóculos dos microrganismos indicadores em solução salina 0,85% ajustando para 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a densidade óptica de 0,08 a 0,1 no comprimento de onda de 625nm para *E. coli* e *S. aureus* e 530 nm para *C. albicans* (ANVISA, 2002; ANVISA 2003). Por fim, esses microrganismos foram semeados em forma de tapete, com auxílio de *swab* em placa com ágar MH.

Discos de 7mm de diâmetro foram cortados das placas de ágar contendo os microrganismos endofíticos e então foram depositados no centro das placas com ágar MH contendo os microrganismos indicadores. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior avaliação da formação de halos de inibição.

#### **4.4 Cinética de Crescimento**

O meio de inóculo foi preparado transferindo-se duas alçadas do microrganismo endofítico selecionado para Erlenmeyer com capacidade para 100 mL contendo 20 mL de caldo ISP2 e pérolas de vidro em quantidade suficiente para cobrir o fundo do frasco. O cultivo foi mantido por 48 horas a 28°C e 250 rpm em *shaker* orbital.

Após esse período o meio de inóculo foi transferido para tubos cônicos de 15mL e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 10 ml de solução salina 0,85%, e então foi mais uma vez centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos, esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes e por fim o inóculo foi ressuspensionado com 10 ml de ISP2. Então, 10% (v/v) do inóculo, densidade óptica 0,8-1,0 e comprimento de onda 600 nm (Serrano, 2009) foi adicionado ao Erlenmeyer com capacidade para

um litro contendo 400 mL de caldo ISP2 e pérolas de vidro. Esse meio foi incubado a 28°C em *shaker* orbital a 250 rpm por 5 dias. O crescimento do microrganismo foi mensurado por meio da medição da densidade ótica do meio de cultivo, realizada a cada 8 horas, bem como pelas diluições seriadas da cultura que foram plaqueadas em ágar ISP2 e incubadas a 28°C por 48-72 horas.

#### **4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco**

A avaliação da bioatividade do extrato bruto fresco foi realizada pelo método de difusão em disco. As amostras avaliadas foram coletadas do cultivo da cinética de crescimento a cada 8 horas, durante 5 dias. Em cada período coletou-se 1mL do meio de cultivo, que foi então centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e 500 µL do sobrenadante foram pipetados em microtubo cônico de 1,5 mL e acondicionados em freezer a -80°C. Filtros de papel com 5 mm de diâmetro foram depositados, com auxílio de uma pinça esterilizada, sobre placa contendo ágar MH e previamente semeadas com *E. coli*, *C. albicans*, e *S. aureus* e, posteriormente, 10 µL do extrato bruto de cada período foram depositados sobre esses filtros. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para verificar a formação de halos de inibição. Os bioensaios foram realizados em triplicata e para controle foram utilizados os antibióticos de uso comercial Cloranfenicol 30 mcg, para *E. coli*, Oxacilina 1mcg, para *S. aureus* e hipoclorito de sódio 3% para *C. albicans*.

#### **4.6 Co-cultivo e avaliação do extrato bruto fresco**

O microrganismo endofítico foi cultivado em meio ISP2 nas condições já citadas anteriormente para obtenção do inóculo. Os microrganismos potencialmente patogênicos *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* foram incubados em 5 ml de caldo ISP2, em estufa 37°C por 24 horas. Três Erlenmeyers com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio ISP2 e pérolas de vidro, foram inoculados com 10% (v/v) do inóculo do microrganismo endofítico e 0,1% (v/v)

do microrganismo indicador (IGARASHI, 2005 adaptado). Os frascos foram incubados a 28°C e 250 rpm por 72 horas em *shaker* orbital. Foi avaliada a bioatividade das amostras dos extratos coletados a cada 24 horas. Os bioensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.7 Ensaios de microdiluição**

O método de diluição em meio líquido foi realizado preparando-se o inóculo da levedura *C. albicans*, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:100, seguida por outra de 1:20 para obtenção de uma suspensão de  $2,5 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> em meio MH suplementado com 2% de glicose (ANVISA, 2002)

A diluição seriada do extrato bruto liofilizado, foi feita em tubos cônicos de 50 mL, concentrações testadas foram de 10, 8, 6, 4 e 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Após o preparo das diluições, o passo seguinte foi preencher a microplaca de 96 poços, de modo que, nos poços do controle positivo adicionou-se 100 µl da suspensão de microrganismos e 100 µl do meio de cultura; nos poços de teste do composto, adicionou-se 100 µl da diluição desejada e 100 µl da suspensão de microrganismo; por fim, para o controle negativo, adicionou-se 100µl da suspensão de microrganismo e 100µl de hipoclorito. Para os brancos foram utilizados 100µl de meio de cultura acrescido de 100µl da diluição de extrato diluído.

A microplaca foi incubada em estufa à 37 °C por 48 horas para levedura. Após o período de incubação, foram adicionados 20 µl do revelador resazurina (Alamar Blue®) a 0,01% diluída em tampão fosfato salino (PBS) em cada orifício. O tempo de espera para a redução da resazurina (cor azul) para resorufina (cor rósea) foi de 30 min. Em seguida as placas foram submetidas a leitura de absorbância a 540nm, em espectrofotômetro de fluorescência (SPECTRAMAX M3).

#### 4.8 Determinação da atividade leishmanicida

Para a determinação da atividade leishmanicida foram utilizadas cepas de *L. infantum chagasi* sensíveis a óxido nítrico (NO), cedidas pelo Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para o ensaio foi utilizado o meio de cultura 199 suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, 5% de antibiótico penicilina e estreptomicina e 3,042 mL de L-glutamina para cada 1000 mL. As células foram cultivadas em frasco T para cultura celular (de 75 cm<sup>2</sup>, no qual foi adicionado 5 ml de meio suplementado e a cepa de *L. infantum chagasi*. O frasco T foi acondicionado em local protegido da luz à 23 °C e o crescimento celular e viabilidade foram avaliados pela contagem com o corante vital Tripán Blue e pela observação no microscópio durante o tempo necessário para a troca do meio e passagens até atingir a quantidade celular desejada.

As concentrações do extrato bruto liofilizado utilizadas para a determinação da atividade leishmanicida foram 10 mg.mL<sup>-1</sup>; 5 mg.mL<sup>-1</sup>; 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> e 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A concentração celular utilizada foi de 1x10<sup>5</sup> cels/mL, e a partir desta diluição, pipetou-se 100 µl nos orifícios da microplaca e 100 µl das diluições do composto. Nos orifícios do controle positivo, pipetou-se apenas meio 199 e *Leishmania* e como controle negativo utilizou-se hipoclorito de sódio a 3%. As placas foram incubadas a 23 °C (SIFA- OUI et al, 2014), por 24 e 48 horas em shaker a 90 rpm.

Após o primeiro período de 24 horas, utilizou-se novamente a resazurina para o teste colorimétrico, foram pipitados 20 µl do corante diluído em água ultrapura tipo Milli-Q na concentração de 1,5 mM em cada poço, esse procedimento foi repetido na placa de 48h. As placas foram mantidas em recipiente de alumínio protegido da luz com a concentração de CO<sub>2</sub> mantida entre 5 e 10% com o auxílio de uma vela.



A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 650 nm.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de microrganismos endofíticos

Foram isolados 42 bactérias endofíticas a partir de *C. brasiliense*, das quais duas eram de folha, 17 do ramo e 23 da rizosfera (Figura 1).



Figura 1. Microrganismos endofíticos purificados. (A) R1 isolado de ramo; (B) F1 isolado de folha e (C) RZ3 isolado de rizosfera.

Dentre os microrganismos isolados apenas um apresentou características fenotípicas de actinobactéria do gênero *Streptomyces* (Figura 2). HOPWOOD (2007) descreve as colônias de *Streptomyces* como inicialmente macias, de bordas regulares, de coloração branco acinzentada e que se tornam pulverulentas à medida que se desenvolvem o micélio aéreo e os esporos.

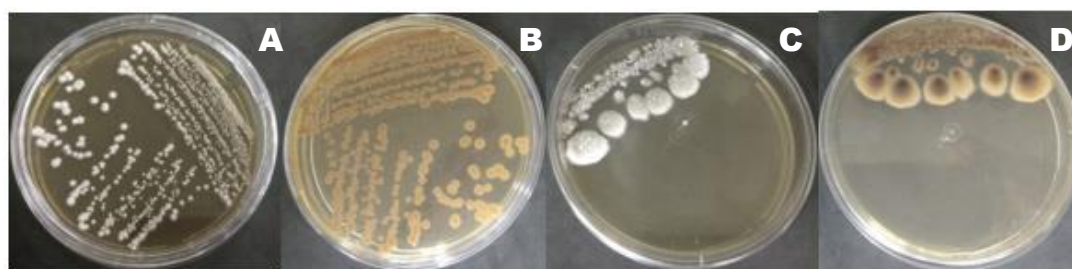


Figura 2. Isolado RZ3 identificado fenotipicamente como pertencente ao gênero *Streptomyces*, observa-se a formação de micélio aéreo e coloração branco acinzentada. (A) Vista anterior das colônias após 7 dias de incubação a 28°C; (B) vista posterior após 7 dias de incubação; (C) Vista anterior das colônias após 20 dias de incubação e (D) vista posterior das colônias após 20 dias de incubação.

As actinobactérias representam um grupo diversificado e mundialmente conhecido pela capacidade em produzir inúmeros compostos bioativos como os antibióticos e enzimas. Devido ao seu grande potencial biotecnológico e o interesse na produção de substâncias bioativas com atividade contra organismos eucariotos observada nos testes preliminares, foi selecionado o isolado de actinomiceto caracterizado como *Streptomyces* spp. para os testes posteriores.

Em trabalho realizado por Ratti (2009) utilizando folhas e caules da espécie *Solanum lycocarpum*, St. Hill (lobeira) coletados em área de Cerrado presente na UFSCar, foi isolado um microrganismo com características fenotípicas similares às das bactérias pertencentes ao gênero *Streptomyces* spp., posteriormente identificada genotipicamente como *Streptomyces tubercidicus*.

Favoretto (2010) isolou 26 microrganismos a partir de folhas de diferentes espécies vegetais do Cerrado da UFSCar, sendo seis de *Butia capitata* var *capitata* (Coquinho-azedo), cinco de *S. lycocarpum*, quatro da *Stryphnodendron polyphyllum* (Barbatimão), seis de *Miconia albicans* (Quaresmeira-branca) e cinco de *Aegiphila lhotzkiana* (Tamanqueira). Após análise das características fenotípicas foram identificadas duas linhagens que apresentaram características típicas de *Streptomyces* spp., microrganismo pertencente ao Filo das actinobactérias.

A prospecção de endofíticos em espécies nativas do Cerrado foi avaliada por Vieira et al. (2014), os quais isolaram nove microrganismos de *Acrocomia aculeata* (Macaúba), 12 microrganismos de *Eugenia dysenterica* (Cagaita), cinco microrganismos *S. lycocarpum*, seis microrganismos de *C. brasiliense*, 9 microrganismos de *Genipa americana* (Jenipapo) e 10 microrganismos de *Guazuma ulmifolia* Lam (Mutamba). A macaúba foi considerada a mais promissora no isolamento de actinobactérias com um total de três isolados, seguido do pequi e mutamba com dois isolados cada e lobeira com um isolado. Esses dados corroboram com os achados deste presente trabalho, o qual também foi isolado espécime de actinomicetos em *C. brasiliense*.

Camargo et al. (2017) em estudo de isolamento e caracterização de bactérias endofíticas de *Sterculia striata* (chichá-do-Cerrado), obtiveram 18 isolados a partir de caules e folhas desse vegetal.

Uma nova linhagem de *Streptomyces* foi isolada de solo do Cerrado brasileiro, tendo como nome proposto *Streptomyces odonnellii* sp. nov. (PEREIRA, et al., 2017). Segundo Sousa et al. (2017), solos savânicos com plantas nativas possuem microbiota com população de actinobactérias superior a 75%, na qual há predominância do gênero *Streptomyces*.

Há escassos relatos na literatura sobre isolamento de microrganismos endofíticos de *C. brasiliense*, justificando assim a necessidade de mais pesquisas nesta área.

## **5.2 Avaliação da atividade enzimática**

Os 42 isolados endofíticos foram avaliados para atividade enzimática, sendo que 14 apresentaram atividade amilolítica, 16 apresentaram atividade celulolítica, 12 apresentaram atividade proteolítica, 12 apresentaram atividade lipolítica e 4 apresentaram atividade esterásica (Anexo- A1)

A figura 3 exemplifica a produção de enzimas, verificada por meio da formação de halos ao redor das colônias.

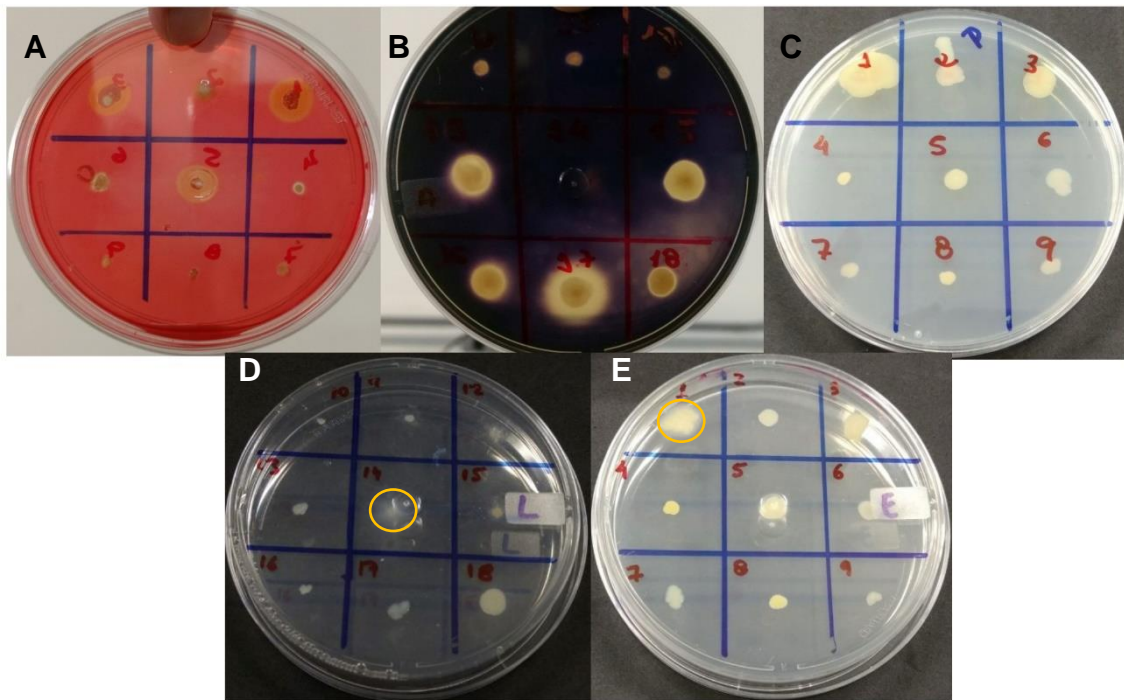


Figura 3. Avaliação da atividade enzimática. Os halos identificam a formação de enzimas. (A) celulolítica; (B) amilolítica; (C) proteolítica; (D) lipolítica e (E) esterásica.

Portanto, a avaliação da atividade enzimática demonstrou que 33,3% dos isolados produziram para amilase, 40,5% celulase, 28,6% protease, 28,6% lipase e apenas 9,5% esterase (Figura 4).

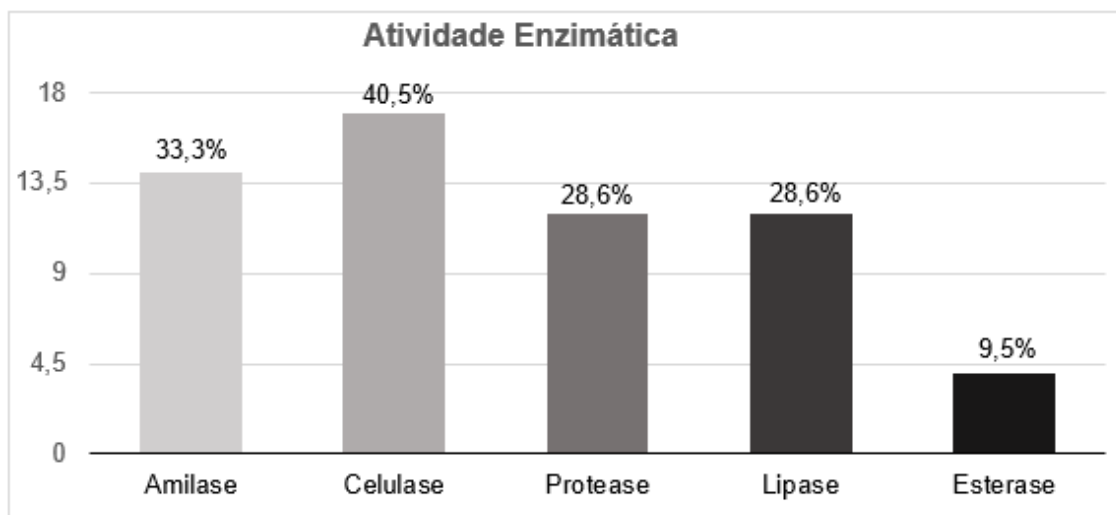


Figura 4. Resultado percentual da atividade enzimática pelos isolados endofíticos de *C. brasiliense*.

Os organismos celulolíticos são principalmente bactérias e fungos de natureza ubíqua. As actinobactérias 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-CRIGLIANO et al. 2013). Estes dados corroboram com os achados do presente trabalho, no qual o maior percentual dos isolados (40,5%) apresentou atividade celulolítica, entre eles o isolado do gênero *Streptomyces*.

Barbosa et al. (2015) analisaram a capacidade de síntese de enzimas de interesse biotecnológico (amilase, lipase, esterase, pectinase, protease e celulase) por microrganismos endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Cheirosa). Os isolados apresentaram a capacidade de produzir pelo menos uma das enzimas prospectadas, sendo que, 28% apresentaram atividade amilolítica, 33% esterásico, 20% apresentaram atividade lipolítica, 46,1% e 33,3% hidrolisaram caseína e colágeno, respectivamente, na determinação da atividade proteolítica e apenas um isolado apresentou atividade pectinolítica.

Em estudo sobre bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* sp. (Ipê) e *S. saponaria* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico, Romano (2015) avaliou a produção de enzimas (amilase, xilanase e celulase) pelos isolados. Foi verificado que todas as linhagens produziram amilase, porém, não houve produção das outras enzimas avaliadas. As amilases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas presentes no amido, glicogênio e sacarídeos e apresentam uma grande importância de aplicação biotecnológica, principalmente nos processos de liquefação e sacarificação nas indústrias de fermentação, de alimentos, têxtil e papel (RANA et al., 2013).

### 5.3 Triagem da atividade antimicrobiana

Dos 42 isolados endofíticos testados para cada um dos três microrganismos potencialmente patogênicos, por meio do teste do bloco de gelose, apenas cinco inibiram *S. aureus*, um inibiu *C. albicans* para *E. coli* não foi observada nenhuma atividade (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de *C. brasiliense* frente a microrganismos potencialmente patogênicos: *E. coli*, *C. albicans*, *S.aureus*. Ausência de atividade (-), presença de atividade antimicrobiana (+).

Isolados	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
R1	-	-	+
R3	-	-	+
R5	-	-	+
R18	-	-	+
R19	-	-	+
RZ3	-	+	-

A atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de carobinha-do-campo foi avaliada por Carrim et al. (2016), os quais observaram que a atividade antimicrobiana apresentada pelos isolados foi maior frente as bactérias indicadoras Gram-positivas. Em estudo para determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de Cerrado goiano, Azevedo et al., (2004) observaram a produção de moléculas bioativas contra bactérias Gram-positivas, porém, não foi verificada a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e fungos. Esses resultados comprovam os encontrados neste trabalho, o qual não foi verificada a atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-negativa (*E. coli*), porém, obeservou-se a produção de

moléculas com bioatividade contra bactérias Gram-positivas e antifúngica contra *C. albicans*.

Oliveira et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de actinomicetos oriundos do solo do Cerrado goiano e Mata Atlântica capixaba, frente a cepas-padrão de *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e um *S. aureus* metilicina resistente de origem hospitalar. De um total de 11 isolados de actinomicetos testados, 10 (90,9%) apresentaram atividade frente a *S. aureus*, *S. aureus* (MRSA) e *B. subtilis*., porém, nenhum dos isolados apresentaram atividade frente a *E. coli*.

Um actinomiceto endofítico isolado de quaresmeira branca (PIZA et al., 2015), vegetal do Cerrado brasileiro, foi estudado para avaliação da sua atividade antimicrobiana. O microrganismo foi identificado como *Amycolatopsis orientalis* e mostrou potencial antimicrobiano, verificado por halos antagonistas, contra *S. aureus*, *C. albicans*, *Shigella sonnei* e *Enterococcus faecalis* medindo 3,50 cm, 3,35 cm, 3,20 e 3,15 cm de diâmetro, respectivamente, não apresentando bioatividade contra *E. coli* e *Serratia marcescens*.

#### **5.4 Cinética de crescimento e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco**

A Figura 5 apresenta a curva de crescimento de *Streptomyces* spp. em caldo ISP2 a 28°C por 5 dias a 250 rpm.



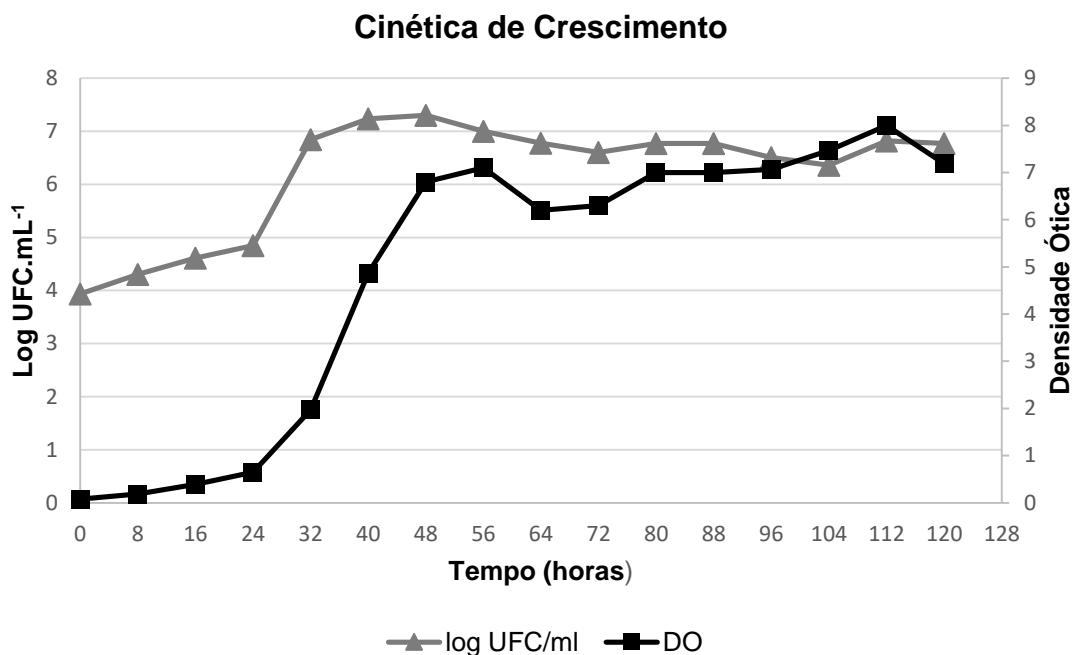


Figura 5. Cinética de crescimento bacteriano do isolado identificado como *Streptomyces* spp.

A biocarga do inóculo foi quantificada na ordem de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> e o endofítico apresentou máximo crescimento em 48 horas (log 7,30 UFC.ml<sup>-1</sup>). O início da produção de substâncias bioativas correspondeu ao final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento do endofítico. O gráfico também demonstra uma boa correlação entre os valores mensurados de densidade ótica do cultivo e a contagem microbiana em log UFC.mL<sup>-1</sup>, justificando assim, o uso da D.O como medida indireta para avaliação do crescimento microbiano.

Santos et al. (2018) avaliaram a produção e caracterização de um biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolado da região amazônica e verificou durante a cinética de crescimento do microrganismo que a fase exponencial ocorreu nas primeiras 24h e que o início da fase estacionária e a produção de biossurfactante ocorreram após 48h.

Durante a cinética de crescimento também foi avaliada a bioatividade do extrato bruto fresco produzido durante o cultivo de *Streptomyces* spp. (Figura 6).

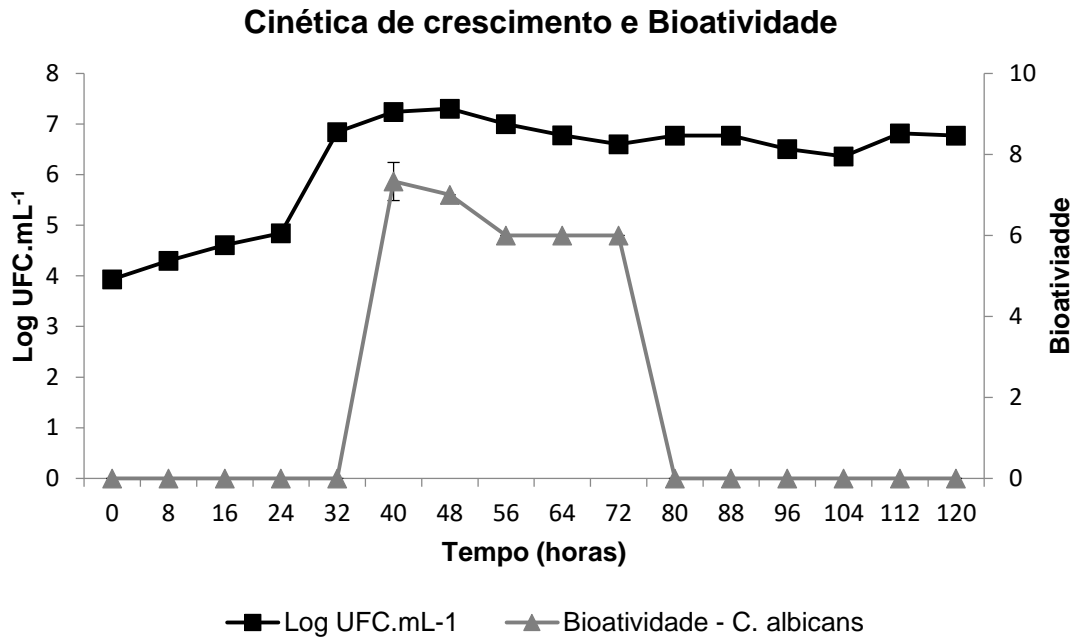


Figura 6. A bioatividade do isolado *Streptomyces* spp. coincidente com o final da fase exponencial (40h) e início da fase estacionária (48h).

A atividade antimicrobiana do extrato de cultivo foi mensurada pelo método de difusão em ágar, contra os microrganismos indicadores *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. O gráfico aponta o início da produção de substâncias bioativas a partir de 40h de cultivo, apresentando um halo de inibição com média de 7,33 mm para *C. albicans* (Figura 7), porém, não foi verificada atividade contra *E. coli* e *S. aureus* durante as 120 horas de cultivo.

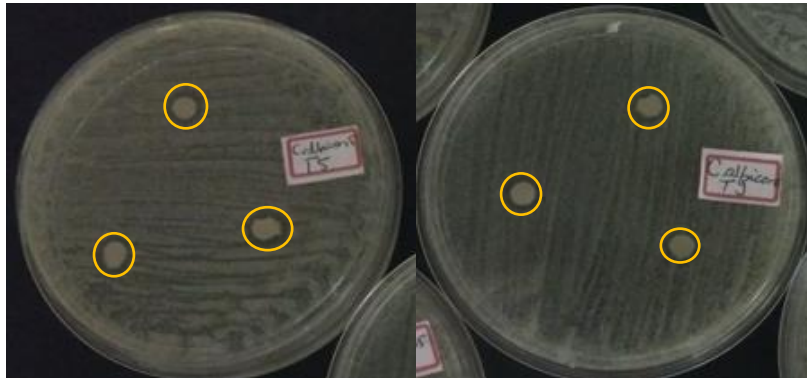


Figura 7. Avaliação da bioatividade do extrato bruto de *Streptomyces* spp. contra *C. albicans*. (A) início da atividade após 40 horas de cultivo e (B) final da bioatividade após 72 horas. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade.

### 5.5 Co-cultivo e avaliação do extrato bruto fresco

O co-cultivo do *Streptomyces* spp. com *C. albicans* iniciou a produção de substâncias bioativas em 24 horas, ou seja, antecipadamente ao cultivo axênico, no qual a bioatividade teve início em 40 horas. O pico de produção de substâncias ocorreu em 72 horas, com formação de halo de inibição de 12,6 mm (Figura 8). Portanto, 5,3 mm maior do que o diâmetro do maior halo de inibição do cultivo axênico (7,3mm, 40 horas).

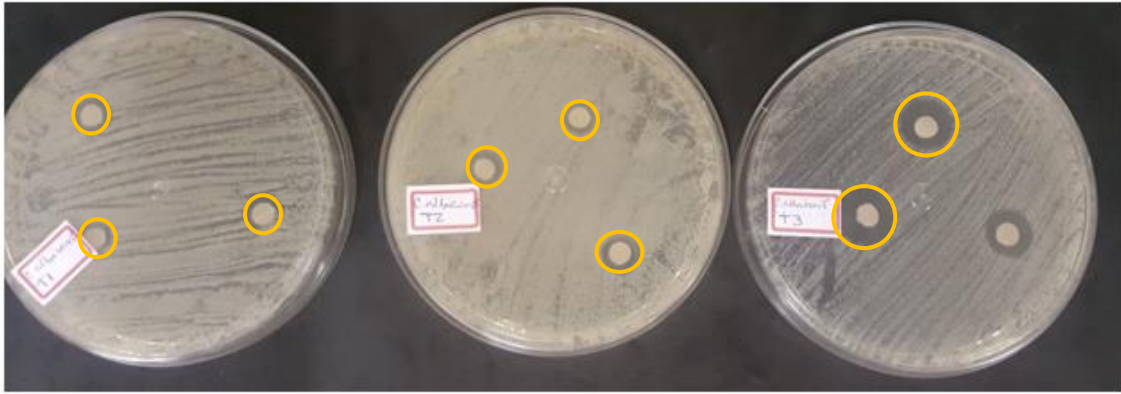


Figura 8. Co-cultivo de *Streptomyces* spp. com *C. albicans*. (A) início da atividade após 24h, (B) atividade após 48h e (C) pico de atividade após 72h de co-cultivo. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade.

Além disso, o actinomiceto apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* em 48 horas com formação de halo de inibição de 10,1mm e 5,5mm em 72 horas, atividade, esta, não apresentada no cultivo regular (Figura 9).

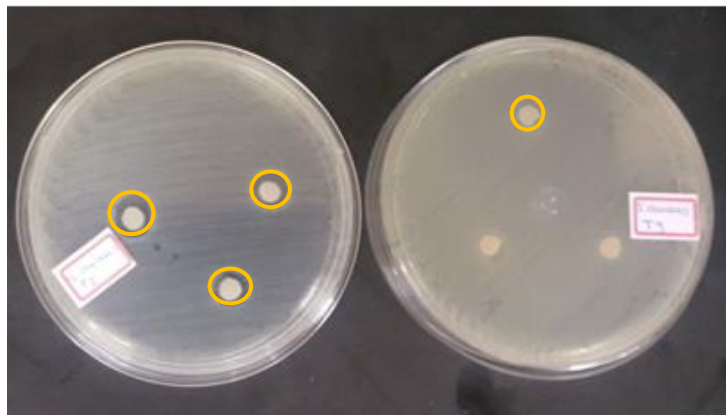


Figura 9. Bioatividade do extrato produzido a partir do co-cultivo de *Strptomyces* spp. com *S. aureus*. (A) observa-se o início da atividade a partir de 42 horas (B) menor bioatividade após 72 horas de cultivo. Os círculos destacam os halos que caracterizam a bioatividade.

No co-cultivo com *E. coli*, assim como no cultivo axênico, não houve produção de substâncias inibitórias em até 72 horas de cultivo.

A Figura 10 apresenta a bioatividade dos extratos do co-cultivo a cada 24 horas.

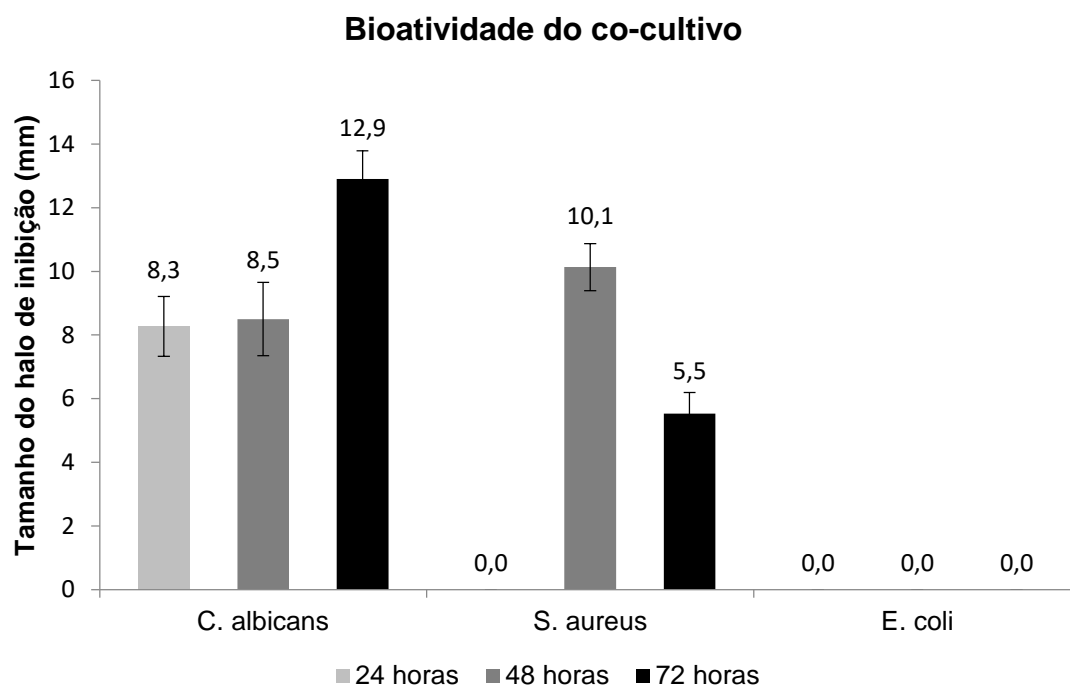


Figura 10. Gráfico de bioatividade do co-cultivo de *Streptomyces* spp. com microrganismos indicadores, *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* a cada 24 horas.

Haque et al. (2015), em estudo sobre modulação de atividade antibacteriana de actinomicetos marinhos em co-cultivo com bactérias patogênicas observaram o aumento da atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, em três dos quatro co-cultivos testados, sendo que um dos isolados teve um aumento de 100% da atividade inibitória contra *S. aureus*. No presente trabalho verificou-se a produção de substâncias bioativas contra *S. aureus*, somente durante o co-cultivo, o que indica que a presença do patógeno no meio de cultura durante o cultivo do endofítico pode influenciar diretamente na produção de substâncias bioativas.

Apesar de inúmeros esforços para descobrir novos produtos bioativos produzidos por microrganismos, diversos compostos conhecidos são frequentemente reisolados. Neste sentido, Park et al. (2017) avaliaram a estratégia do co-cultivo de microrganismos para facilitar a descoberta de novos compostos bioativos. Um novo policetideo glicosídeo, denominado ácido gordônico, foi isolado da cultura mista de duas bactérias Gram-positivas, *Gordonia* sp. e *Streptomyces tendae*, sendo que a molécula demonstrou atividade antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*.

Sung et al. (2017) realizaram co-cultivo de *Streptomyces* sp., isolado de ambiente marinho, com os microrganismos potencialmente patogênicos *S. aureus* (MSSA), *S. aureus* (MRSA), *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e obtiveram o aumento da produção de antimicrobianos em todos os co-cultivos. Estes resultados validam o emprego do co-cultivo como uma ótima estratégia para isolamento e descoberta de novos compostos bioativos.

## **5.6 Ensaio de Microdiluição**

Os resultados dos ensaios de microdiluição das concentrações do extrato bruto liofilizado de *Streptomyces* spp., foram representados em gráficos de inibição do crescimento microbiano.

A figura 11 mostra que todas as concentrações utilizadas nesse estudo foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*.

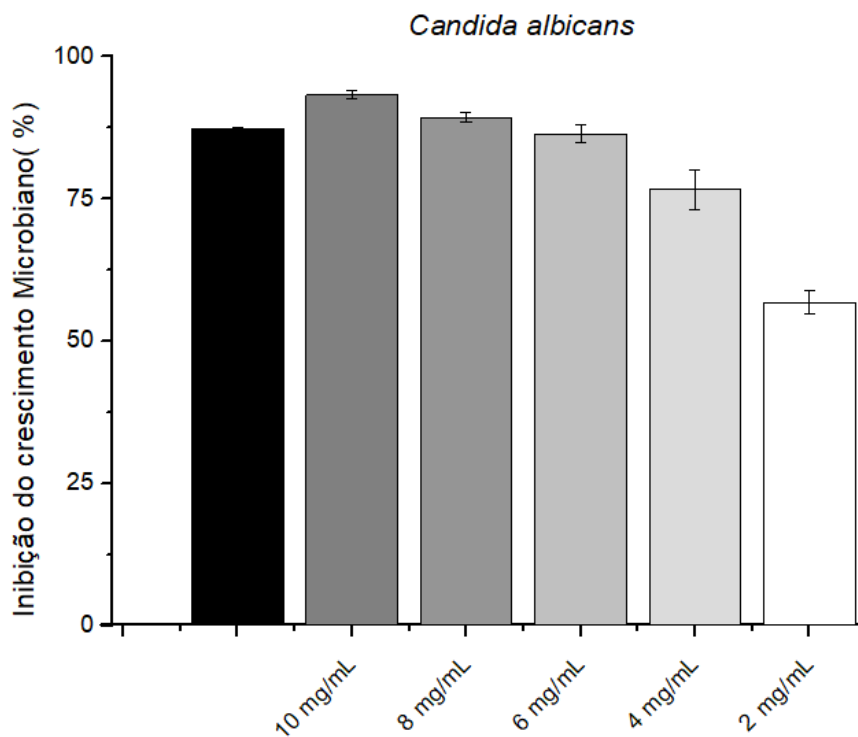


Figura 11. Porcentagem de inibição do crescimento de *C. albicans* em diferentes concentrações do extrato liofilizado.

A figura 11 demonstra que na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> a taxa de inibição do microrganismo foi superior a 90%, enquanto as concentrações de 8 e 6 mg.L<sup>-1</sup> as taxas foram de 89 e 86%, respectivamente, a 4 mg.mL<sup>-1</sup> houve uma inibição de 76%, por fim a concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> inibiu o crescimento de 56% dos microrganismos.

Choi et al. (2012) verificaram que o extrato bruto em acetato de etila de *Streptomyces* sp. BCNU 1001, isolado do solo de uma região da Coréia apresentou concentração inibitória mínima de 125 µg.mL<sup>-1</sup>.

A baixa concentração utilizada pelos autores comparada aos valores testados no presente estudo pode estar relacionada ao fato desse extrato estar particionado, o que leva a eliminação de resíduos e conseqüentemente ao aumento da concentração dos metabólitos bioativos.

Assim, os valores obtidos no ensaio microdiluição com extrato bruto liofilizado são bastante promissores e novos estudos serão conduzidos a fim de purificar e identificar o composto com o objetivo de potencializar sua bioatividade antifúngica.



### 5.7 Avaliação do extrato bruto contra a forma promastigota de *Leishmania infantum chagasi*

A figura 12 apresenta a porcentagem de viabilidade celular de *L. infantum chagasi* quando testada com concentrações que variaram de 10 mg.mL<sup>-1</sup> a 1 mg.mL<sup>-1</sup> após 24h de incubação.

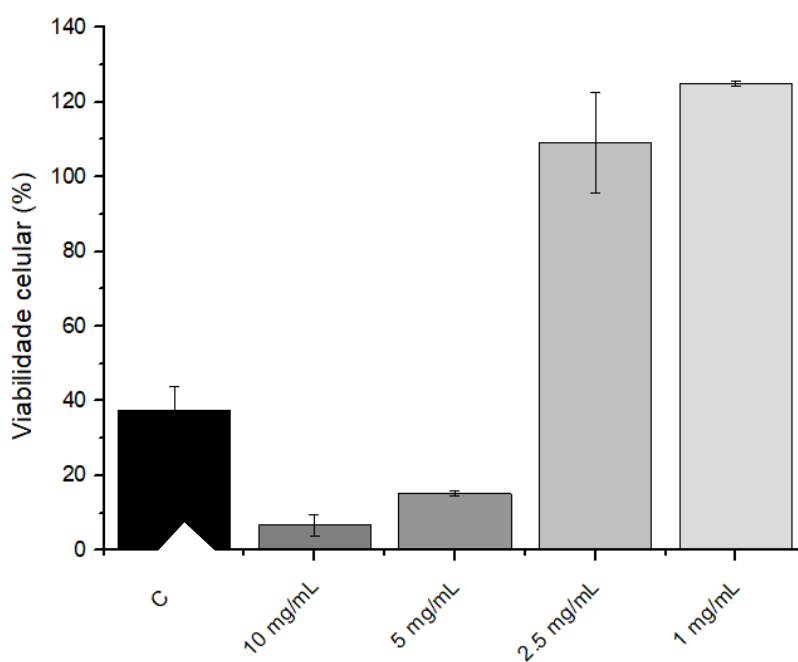


Figura 12. Gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função das concentrações do extrato liofilizado obtido a partir de *Streptomyces* spp. contra a forma promastigota de *L. Infantum* após 24 horas.

Os resultados demonstraram que o extrato apresentou viabilidade celular inferior a 10% na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e 15% na concentração de 5mg.mL<sup>-1</sup>.

A figura 13 apresenta a porcentagem de viabilidade celular de *L. infantum chagasi* quando testada com concentrações que variaram de 10 mg.mL<sup>-1</sup> a 1 mg.mL<sup>-1</sup> após 48h de incubação.

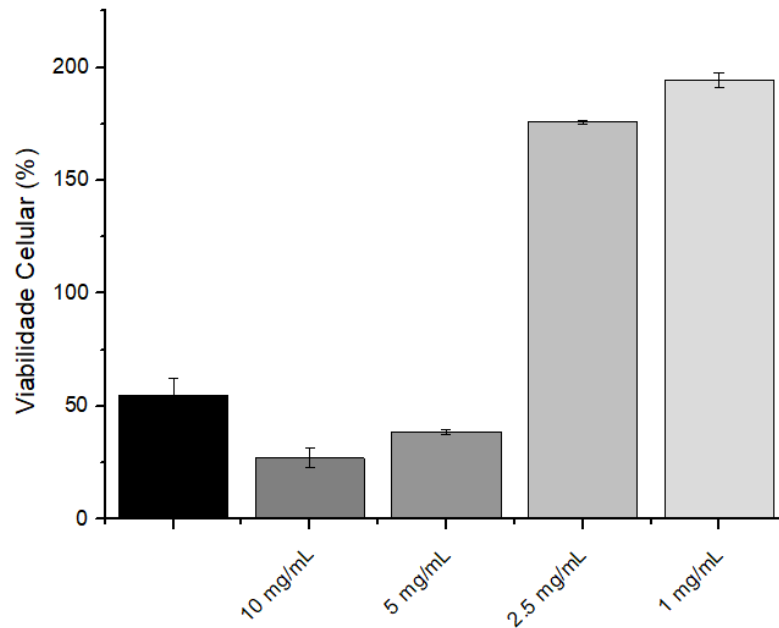


Figura 13. Porcentagem de viabilidade celular em função das concentrações do extrato liofilizado obtido a partir de *Streptomyces* spp contra a forma promastigota de *L. Infantum* após 48 horas.

Os resultados demonstraram que o extrato apresentou atividade sobre a viabilidade celular de 26% na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e 38% na concentração de 5mg.mL<sup>-1</sup>.

Paula-Junior et al. (2006) testaram extrato etanólico produzido a partir de folhas de *C. brasiliense* sobre a forma amastigota de *L. amazonensis*, obtendo efeito leishmanicida sobre as mesmas, o qual foi significativamente superior aos efeitos de Glucantime, fármaco comercial utilizado no tratamento.

O extrato bruto liofilizado obtido a partir de *Streptomyces* spp. isolado da rizosfera associada ao pequiheiro produziu efeito leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. infantum chagasi*. Não foram encontrados dados sobre metabólitos secundários de actinobactérias contra *Leishmania* spp., o que demonstrou a importância desse estudo.

## 6 CONCLUSÕES

Foram isolados 42 bactérias endofíticas de *C. brasiliense*, sendo duas provenientes da folha, 17 de ramos e 23 da rizosfera, de onde foi isolada uma bactéria identificada como *Streptomyces* spp.

A avaliação da atividade enzimática demonstrou que 33,3% dos isolados apresentaram resultado positivo para amilase, 50,5% para celulase, 28,6% para protease, 28,6% para lipase e 9,5% para esterase.

Os resultados da triagem de atividade antimicrobiana realizada por meio do teste do bloco de gelose demonstrou que 6 isolados foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, enquanto apenas o actinomiceto promoveu a inibição do crescimento de *C. albicans*.

Esses resultados sugerem que *C. brasiliense* é uma fonte promissora para o isolamento de microrganismos endofíticos e conseqüentemente de metabólitos secundários.

A análise da bioatividade do extrato bruto produzido pelo *Streptomyces* spp. apresentou resultado positivo para a inibição de *C. albicans* a partir de 40 horas de cultivo mantendo até 72 horas.

A produção de extrato bruto por meio de Co-cultivo do isolado endofítico *Streptomyces* spp. com microrganismos potencialmente patogênicos demonstrou um aumento de 50% na atividade contra *C. albicans*, além da inibição ter se iniciado antecipadamente com 24 horas, quando comparado ao cultivo axênico.

No co-cultivo com *S. aureus* o isolado de *Streptomyces* spp. passou a apresentar atividade contra esse potencial patógeno em 48 horas, atividade, esta, que não foi identificada anteriormente nos testes preliminares e no cultivo axênico.

O ensaio de microdiluição para avaliação da bioatividade do extrato bruto liofilizado produzido por *Streptomyces* spp. Demonstrou taxas de inibição de crescimento superior a 90% em 10 mg.mL<sup>-1</sup> e 56% a 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

Obteve-se também resultados promissores na avaliação da atividade leishmanicida do extrato bruto liofilizado, com taxa de morte celular na concentração de  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  93% em 24 horas e 73% em 48 horas.

Assim, os dados sugerem que esse extrato possui atividade antibacteriana e leishmanicida.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J; DEMAIN, A. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, Basel, v. 4, n. 1, p.117-139, 16 jan. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom4010117>.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p

ALVES, H. C. et al. Antibiotic Resistance among *Escherichia coli* Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. In: Amidou Samie. (Org.). **Antibiotic Resistance among *Escherichia coli***: Isolates and Novel Approaches to the Control of *E. coli* Infections. 1ed.Rijeka, Croatia: InTech Open Scienc, 2017, v. 1, p. 99-122.

ANVISA. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica**. 2. ed. Pennsylvania: Nccls, 2002. 51 p. NCCLS document M27-A2.

ANVISA. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada**. 6. ed. Pennsylvania: Nccls, 2003. 81 p. Reproduzido mediante autorização; parte da publicação M7-A6 do NCCLS.

ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, Bronx, v. 49, p. 40-48, 1995.

ARAÚJO, W L de; LIMA, A O S; AZEVEDO, João Lúcio de; *et al.* **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. [S.l: s.n.], 2002.

ATEŞLIER, Z. Burcu Bakır; METIN, Kubilay. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 38, n. 5, p.628-635, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.015>

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed) Fungi: multifaceted microbes. **Boca Raton: CR Press**, 2007. P. 189-207.

AZEVEDO, R. C. L. S., PIMENTA, F. C., VIEIRA, J.D.G. Determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de Cerrado goiano e efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. **Revista de Patologia Tropical** v. 33, p.217-226, 2004. DOI: <https://doi.org/10.5216/rpt.v33i2.3447>

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*, v. 78, n.5, p. 431-441, 2005

BARBOSA, E. C., et al. Isolamento, Identificação e Avaliação das Atividades Enzimática e Antibacteriana de Microrganismos Endofíticos de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 11, n. 22, p.3036-3055, 1 dez. 2015. Centro Científico Conhecer.

[http://dx.doi.org/10.18677/enciclopedia\\_biosfera\\_2015\\_021](http://dx.doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2015_021).

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. W. Engelmann, Leipzig, 1866. 316p.

BATALHA, M. A. O Cerrado não é um bioma. **Biota Neotrop**. v. 11, n. 1, mar. 2011

<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/abstract?article+bn0XX11012011>

ISSN 1676-0603.

BEIRANVAND, M., et al. Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations Isolated from Medical Plants of Iran. **Iranian Journal of Microbiology** v. 9. n. 1. p.11–18. 2017

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, V. 18, p. 355-383, 2000.

BOYCE, J. M.. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Cause of Health Care--Associated Infection. **Clinical Infectious**

**Diseases**, [s.l.], v. 46, n. 6, p.795-798, 15 mar. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/528717>

CAMARGOS, Í. M. F., et al. Isolamento e Caracterização de Bactérias Endofíticas de *Sterculia striata* (Chichá). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFNMG, 6. Almenara. **Anais do VI Seminário de Iniciação Científica do IFNMG**. Almenara: 2017.

CARDOSO, L.; JÚNIOR, W. P.; SANTOS, R. R. M Efeito dos extratos aquosos de folhas e mesocarpo externo de caryocar brasiliensis cambess sobre o progresso de lesões incitadas por *Leishmania amazonensis*. **Unimontes Científica**. v. 14, n. 2, p. 30, 2012.

CARVALHO, P. E. R. Comunicado Técnico nº 230, de 2009. **Pequizeiro: Caryocar brasiliense**.

CARRIM, A. J. I. et al. Atividade Antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de *Jacaranda decurrens* Cham. (carobinha-do-campo). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p. 1374, 2016. DOI: 10.18677/Enciclopedia\_Biosfera\_2016\_122

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHÉVEZ-POZO, O. V. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado no Norte de Minas Gerais**. 1997. 97f. Dissertação (Mestrado em Administração Rural) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1997

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, [s.l.], p.85-96, 30 ago. 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160163>.

COUTINHO, L .M. O conceito de bioma. **Acta Bot. Bras.** V. 20, n.1 p.1-11. 2006



CUNHA, N.R.S. et al. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. Piracicaba/SP. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.46, n.2, p.291-323, 2008.

CUZZI C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D. C (ASTERACEAE). **GI. Sci. Technol**, v. 4, n. 2, p. 47-54. ISSN 1984-3801, 2011.

DAS, G.; PATRA, J. K.; BAEK, K. 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**, v. 14, n. 1, p.50-58, jan. 2017. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2016.2192>.

DEUS, T. N. **Extração e Caracterização de Óleo do Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) para o Uso Sustentável em Formulações Cosméticas Óleo/Água (O/A)**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ecologia e Produção Sustentável, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2008.

DRAHL C.; CRAVATT B. F.; SORENSEN E. J. Protein-reactive natural products. **Angewandte Chemie** v. 44,n. 36 p. 5788-5809, 2005.

FANK-DE-CARVALHO, S. M. et al. Plant Structure in the Brazilian Neotropical Savannah Species. **Biodiversity In Ecosystems - Linking Structure And Function**, 17 abr. 2015. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/59066>.

FAVORETTO, N. B. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos – SP**. 53f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

FORD, C. B. et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 4, 3 fev. 2015. ELife Sciences Organisation, Ltd.. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.00662>

FRANCO-CIRIGLIANO, M. N. et al. *Streptomyces misionensis* PESB-25 Produces a Thermoacidophilic Endoglucanase Using Sugarcane Bagasse and Corn Steep Liquor as the Sole Organic Substrates. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-9, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/584207>.

FUNBIO. **Documento de salvaguardas socioambientais. Projeto Nacional de Ações Integradas Público-Privadas para Biodiversidade**. Fundo Brasileiro para a Biodiversidade. 2006. 91f.

GARCIA, C.C. et al. Thermal stability studies of some Cerrado plant oils. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 87, n. 3, p. 645-648, 2007

GHALY, A. E. et al. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 6, p. 54-76, 2010.

GOEDERT, W. J.; WAGNER, E.; BARCELLOS, A. de O. Savanas Tropicas: dimensão, histórico e perspectivas. In: DF. FÁBIO FELAPE FALEIRO. (Ed.). **Savanas: Desafios e estratégias para equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina. Embrapa Informação Tecnológica, 2008. Cap. 2. p. 48-77.

GONTANG, E. A. et al. Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, n. 8, p.2487-2499, 12 fev. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02852-09>.

GUARIM NETO, G. **Plantas medicinais do Estado do Mato Grosso**. Brasília ABEAS, 1996. 110 p.

GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 9, p.1172-1177, 1 nov. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/378745>

GUIMARÃES, R. N. **Propagação Vegetativa do Pequiheiro (*Caryocar brasiliense Camb.*) por Estaquia.** 2017. 75 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Agronomia, Univerisdade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

HAQUE, M. U. et al. Modulation of antibacterial activity of actinomycetes by co-culture with pathogenic bacteria. **Bangladesh Pharmaceutical Journal**, v.18, n. 1, p.61-65, 1 jun. 2015. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/bpj.v18i1.23517>

HAUSER, A.R. **Antibióticos na prática clínica:** fundamentos para a escolha do agente antimicrobiano correto, Porto Alegre, Artmed, 2009.

HESS, M. Thermoacidophilic proteins for biofuel production. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.414-419, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.06.001>.

HOPWOOD, D. A. Therapeutic treasures from the deep. **Nat. Chem. Biol.** v. 3, n. 8 p.457-458, 2007.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol**, v. 1, n. 3, p.218-224, 1971.

IGARASHI, Y. Antibiotic Production in *Streptomyces* Induced in Co-culturing System. **Research Grant**, p.54-55, 2005.

JAEGER, K. E. et al. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 3-12, 1997.

JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts- the ascomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 503–517. 2013

KARLOWSKY, J. A. et al. Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of *Escherichia coli* from Female Outpatients in the United States. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p.2540-2545, 1 ago. 2002. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.8.2540-2545.2002>.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Df, v. 1, n. 1, p.147-155, jul. 2005.

KOBLITZ, M. G. B. Bioquímica de Alimentos: teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p.206-220, 2005.

KORB, A. et al. Perfil de Resistência da Bactéria *Escherichia coli* em Infecções do Trato Urinário em Pacientes Ambulatoriais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, São Cristóvão, v. 13, n. 1, p.72-79, abr. 2013.

KUHAD, R. C. et al. A microbial celulases and their industrial applications. **Enzyme research**, 2011.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LADEIRA, S. A. et al. 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**, v. 33, n. 2, 324-328, 2010.

LIMA, et al., *Staphylococcus aureus* and Nosocomial Infections - Literature Review. **UNINGÁ Review**, V. 21, n.1, p.32-39 Mar 2015

LINDGREN, P. K.; KARLSSON, A.; HUGHES, D.. Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p.3222-3232, 23 set. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.47.10.3222-3232.2003>.

LOPES, A. S.; DAHER, E. Agronegócio e Recursos Naturais no Cerrado: desafios para a coexistência harmônica. In: FALEIRO, F. G.; FARIA NETO, A. L. (Ed.) **Savanas**: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade,

agronegócio e recursos naturais. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológico, 2008. p. 173-209.

LOPES, P, S. N. et al. Pequi. In VIEIRA, R. F., COSTA, T. S. A.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (ed.) **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 248-247, 2006.

LOPES, T. C. da, L. et al. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. 3, p.23-30, 2011

MACHADO, R. B. et al. Caracterização da Fauna e Flora do Cerrado. In: FÁBIO FELAPE FALEIRO (Ed.). **Savanas: Desafios e estratégias para equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais**. Planaltina: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. Cap. 9. p. 284-300.

MARMANN, A. et al. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p.1043-1065, 17 fev. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md12021043>.

MARTINS, D. M. **Atividade anti-*Helicobacter pylori* de extratos de cultura de bactérias endofíticas *Paenibacillus polymyxa* RNC-D e *Streptomyces tubercidicus* RND-C isoladas de plantas do Cerrado Brasileiro**. 76f. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Centro Universitário Central Paulista, 2012.

MAZINI, A. C. M. **O Cerrado como Berço de Cura: Plantas Medicinais sob a Ótica do Conhecimento e da Tradição de Erveiros no Campus da UFSCar**. 2016. 110 f. TCC (Graduação) – Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In : MAIA, L. C. ; MALOSSO, E. ; YANP-MELO, A. N. (Orgs). **Micologia : avanços no conhecimento**. 1 ed. Recife : Editora Universitária da UEPE, 2007.

MERHEB, C. W. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus***. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)– Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2007.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.213-234, 30 set. 2011. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/Cerrado>>. Acesso em: 06 out. 2017

MORAIS, M. J. de et al. Caracterização da Casca de Pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.) para sua Utilização como Biomassa. In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG, 3., 2016, Pirenópolis. **Trabalho submetido ao CEPE**. Pirenópolis: UEG, 2016. p. 1 - 7.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [s.l.], v. 403, n. 6772, p.853-858, fev. 2000. Springer Nature.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2014. 1336p.

NERIS, D. M. ; et al. Cytotoxic Effects and Production of Cytokines Induced by the Endophytic *Paenibacillus polymyxa* RNC-D In Vitro. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 18, p. 1562-1578, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75 n. 3 p. 311-335, 2012

OH, D. et al. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. **Journal Of Natural**

**Products**, v. 70, n. 4, p.515-520, abr. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np060381f>.

OLIVEIRA, B. F. R. et al. Atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes por actinomicetos isolados de solos. **XXI ALAM Congresso Latinoamericano de Microbiologia**. Santos, 2006. <http://www.sbmicrobiologia.org.br/cdlatino/resumos/R1541-1.html>

OLIVEIRA, M.E.B. et al. **Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 32 p. Documentos, no. 113. 2008.

ONAKA, H. Novel antibiotic screening methods to awaken silent or cryptic secondary metabolic pathways in actinomycetes. **The Journal Of Antibiotics**, [s.l.], v. 70, n. 8, p.865-870, 26 abr. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2017.51>.

PALOU, J et al. Etiología y sensibilidad de los uropatógenos identificados en infecciones urinarias bajas no complicadas de la mujer (Estudio ARESC): implicaciones en la terapia empírica. **Medicina Clínica**, V. 1, n. 1, pp.1-7. 2011

PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PAPPAS, P. G. et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 5, p.634-643, 1 set. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/376906>.

PARK, H. B. et al. Gordonic Acid, a Polyketide Glycoside Derived from Bacterial Coculture of *Streptomyces* and *Gordonia* Species. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 80, n. 9, p.2542-2546, 28 ago. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00293>.

PAULA-JUNIOR, W. et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliensis* leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.16, p. 625-630, 2006.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.29, p.62-76, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p.69-72, 2004

PEREIRA, P. H. F. et al. *Streptomyces odonnellii* sp. nov., a proteolytic streptomycete isolated from soil under Cerrado (savanna) vegetation cover. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 12, p.5211-5215, 1 dez. 2017. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002446>.

PEREIRA, Z. V. et al. Levantamento das Plantas Mediciniais do Cerrado Sensu Stricto da Fazenda Paraíso–Dourados MS. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p.. 249-251, 2007.

PIMENTEL, M.R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v.2011, 2011.

PINTO, L. C. L. et al. Traditional knowledge and uses of the *Caryocar brasiliense* Cambess. (Pequi) by “quilombolas” of Minas Gerais, Brazil: subsidies for sustainable management. **Brazilian Journal Of Biology**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.511-519, jun. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.22914>

PIZA, A. C. M. T., HOKKA, C. O., SOUSA, C. P. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*) and Evaluation of Its



Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research e Reports**. v. 4, n. 4 p.281-291, 2015. DOI : 10.9734/JSRR/2015/13237

PLOTKIN, M. J. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. New York: Cambridge University Press, 1991. p. 53-64.

QUEIROZ, F. A. Impactos da sojicultura de exportação sobre a biodiversidade do Cerrado. **Sociedade e Natureza**, Uberlândia, v. 21, n. 2, p. 193-209, 2009.

RANA, N.; WALIA, A.; GAUR, A.  $\alpha$ -amylases from microbial sources and its potential applications in various industries. **National Academy Science Letters**, v. 36, n. 1, p. 9-17, 2013. <https://doi.org/10.1007/s40009-012-0104-0>

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RATTI, R. P. **Bioprospecção e purificação de substâncias bioativas produzidas por *Streptomyces tubercidicus*, endofítico isolado de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Lobeira) do Cerrado de São Carlos – SP**. 113f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

RIBEIRO, D. M. FERNANDES, D. C.; ALVES, A. M.; NAVES, M. M. V. Carotenoids are related to the colour and lipid content of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp from the Brazilian Savanna. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 34, n. 3, p. 507- 512, 2014.

RODRIGUES, M. L. F. et al. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. Isolado das folhas de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, n.2, 2015.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p.711-717, 2008.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico.** 134f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, 2015.

ROSSOLINI, G. M. et al. Update on the antibiotic resistance crisis. **Current Opinion In Pharmacology**, v. 18, p.56-60, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>.

RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L.. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p.509-523, 29 jun. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3496>.

SALAMONI, S.P. et al. Preliminary characterization of some *Streptomyces* species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. **World J Microbiol Biotechnol** v. 26, n. 10, p.1847-1856, 5 mar. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0366-y>.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers In Medicine**, v. 3, 15 mar. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2016.00011>.

SANO, E. E. et al. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p.153-156, jan. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2008000100020>.

SANTOS, A.P.P. et al. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 51, n. 2, p.1-10, 11 dez. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20176657>.

SANTOS, C. M. Prospecção enzimática e atividade antagonística in vitro de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil, 2016.

SAXENA, R. K. et al. Highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology**. V. 98, n. 2, p. 260-265, 2007.

SERRANO, N. F. G. **Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endofítico isolado de Prunus spp.** 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão **TECNICO Bol.SBCTA**, v. 31, n. 2, p.249-260, 1997

SILVA JÚNIOR, M. C. Et al. **Guia do Observador de Árvores**: tronco, copa e folha. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2014. 252 p.

SOUSA, C. P. de; SERRANO, N. F. G.; LACAVA, P. T. Endophytic Microorganisms of the Tropical Savannah: A Promising Source of Bioactive Molecules. **Diversity And Benefits Of Microorganisms From The Tropics**, p.57-70, 2017. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_4).

SOUZA, I; SALVIANO, A. Fruticultura. **A cultura do pequi**. EMATER, Minas Gerais, Mai. 2002

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 7, p.491-502, 2003.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p.603-661, 27 maio 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00134-14>.

VERA, R. et al. Caracterização física e química de frutos do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) oriundos de duas regiões no estado de Goiás, Brasil. **Pesq Agropec Trop**, v.37, n.2, p.93-99, 2007.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, p.32-38, 1997.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017. Revista Brasileira de Análises Clínicas. <http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>.

VIEIRA, M. L.a. et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian Journal Of Microbiology**, Ottawa, v. 60, n. 12, p.847-856, dez. 2014. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-0449>.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 3, n.1, p.13-36, 2000.

VINALE, F. et al. Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive Metabolites. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, 30 out. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14569-5>

WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p.751-762, dez. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(05\)70295-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(05)70295-4).

WHO. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: World Health Organization, 2017. 7 p.

WONG, E. S. et al. A 10-Year Review of Ocular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Cornea, Maringá**, v. 36, n. 1, p.92-97, jan. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ico.0000000000001048>.

Anexo A: Avaliação da atividade enzimática de todos os isolados endofíticos de *C. brasiliense*. (+) Presença de atividade, (-) ausência de atividade enzimática.

Isolado	Amilase	Celulase	Protease	Lipase	Esterase
F11	-	-	-	+	-
F12	+	-	-	+	-
R1	-	+	-	+	+
R2	-	-	-	-	-
R3	-	+	-	+	+
R4	-	-	-	-	-
R5	-	-	-	+	-
R6	-	+	-	-	-
R7	-	-	-	-	-
R8	-	+	-	-	-
R9	-	+	-	-	-
R10	-	-	-	-	-
R13	+	-	-	-	-
R14	-	-	-	+	-
R15	+	-	-	+	-
R16	-	-	-	-	-
R17	+	-	-	-	-
R18	+	-	-	-	-
R19	-	-	-	-	-
RZ1a	-	-	+	-	-
RZ1b	-	+	+	-	-
RZ2	+	+	+	-	-
RZ3	-	+	-	-	-
RZ4a	-	+	+	-	-
RZ4b	-	+	-	-	-
RZ5	+	+	+	-	-
RZ6	+	+	+	+	-
RZ7	+	+	+	-	-
RZ8	+	-	+	+	-
RZ9	-	-	-	+	-
RZ10	-	-	-	-	-
RZ12	-	-	+	-	-
RZ13	-	-	+	+	+
RZ14	+	+	-	-	-
RZ15	+	-	+	-	+
RZ18	+	-	-	-	-
RZ22a	+	-	-	-	-
RZ24	-	-	-	-	-
RZ27	-	+	-	+	-
RZ29	-	+	-	-	-
RZ30	-	-	-	-	-
RZ31	-	+	+	-	-