

TESE DE DOUTORADO
Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico

Doutorando: Luis Henrique Romano
Orientadores: Prof.^a Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior

São Carlos, 2015

TESE DE DOUTORADO
Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e
Hymenaea courbaril e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse
Biotecnológico**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Doutorando: Luis Henrique Romano

Orientadores: Prof.^a Dra. Cristina Paiva de Sousa

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior

São Carlos, 2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R759bm Romano, Luis Henrique.
Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico / Luis Henrique Romano. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
134 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Biotecnologia. 2. Microorganismos endofíticos. 3. Compostos bioativos. 4. Diversidade microbológica. 5. Citotoxicidade. 6. Cerrados. I. Título.

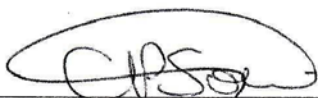
CDD: 660.6 (20^a)

Luis Henrique Romano

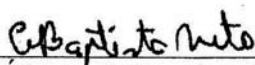
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 28/11/2014

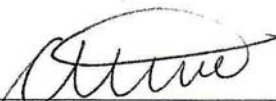
BANCA EXAMINADORA



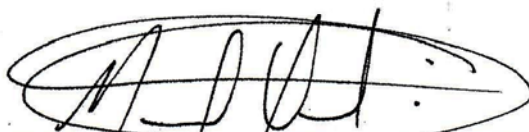
Prof.a. Dra. Cristina Paiva de Sousa (orientadora)



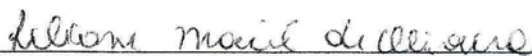
Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto (UNESP)



Prof.^a. Dr.^a. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)



Prof./Dr. Marcel Otavio Cerri (UNESP)



Prof.^a Dr.^a Liliane Maciel de Oliveira (UFSCar)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

Meu obrigado aos orientadores: professora Cristina Paiva de Sousa e professor Alberto Colli Badino Júnior, pelos ensinamentos e pela paciência no decorrer desta caminhada, ao saudoso professor Carlos Osamu Hokka por tornar possíveis os primeiros passos. Sou grato também, pelos mesmos motivos e pelo amor oferecido por minha família, em especial meu pai José Luis, minha mãe Maria Luisa e meu irmão Luis Gabriel Romano.

Agradeço aos amigos e colegas que contribuíram direta e indiretamente com o presente trabalho, em especial a aluna de iniciação científica Ariane Garcia, que colaborou com grande parte desse estudo. Obrigado também ao amigo e mentor Álvaro de Baptista Neto, aos técnicos Beto e Amadeus cujo bom trabalho possibilitou a conclusão desta pesquisa.

Em especial agradeço aos colaboradores deste trabalho e os grupos de pesquisa do Professor Dr. Edison Rodrigues Filho do Departamento de Química da UFSCar, Professor Dr. Flávio Henrique da Silva do Departamento de Genética da UFSCar e a Professora Dra. Cláudia do Ó Pessoa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Finalmente, os agradecimentos ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Damha Golf Club, na figura do seu presidente o Sr. Calos Gonzalez pela permissão para a realização das coletas.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, meus entes queridos que sempre me apoiaram, acreditaram e incentivaram em todos os momentos dessa caminhada e em todas as dificuldades.

Epigrafe

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota” (Theodore Roosevelt).

Sumário

Índice de Ilustrações	8
Lista de tabelas	11
Lista de Abreviações	12
i. Resumo	13
ii. Abstract	14
1 Introdução	15
2 Justificativa	18
3 Objetivos	19
3.1 Objetivos Gerais	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 Revisão Bibliográfica	20
5 Material e Métodos	26
5.1 Isolamento de Microrganismos Endofíticos	26
5.2 Identificação dos Isolados	30
5.2.1 Caracterização Fenotípica e Morfológica	31
5.2.2 Análises Morfotintoriais e Genotípicas	31
5.2.3 Extrações do DNA	31
5.2.4 Amplificação da Região 16S RNA	32
5.3 Testes de Atividades Antimicrobianas	33
5.3.1 Teste de Atividade Antibacteriana	33
5.3.2 Teste de Atividade Antifúngica	33
5.4 Análise da Produção de Ácido Clavulânico	34
5.5 Avaliação do Perfil de Resistência à Antibióticos	34
5.6 Microrganismos	35
5.7 Métodos de Preservação	35
5.8 Meios de Cultura	35
5.9 Determinação da Concentração de Células	37
5.10 Determinação da Concentração de Açúcares	38
5.11 Método de Análise da Produção de Amilases	38
5.12 Análise da Atividade da Produção de Xilanase	38
5.13 Análise da Produção de Celulases	39
5.14 Análise do pH	40

5.15 Métodos de Cultivo em Mesa Incubadora Rotativa	40
5.16 Métodos de Separação dos Compostos	40
5.17 Métodos de Detecção de Atividade Citotóxica	41
5.18 Métodos de Detecção de Atividade Anti- <i>Leishmania</i>	41
5.19 Análises para Identificação do Pigmento	42
6 Resultados.....	43
6.1 Microrganismos Isolados.....	43
6.1.1 Características Fenotípicas e Morfológicas em Meio ISP2.....	45
6.1.2 Características Morfotintórias	64
6.1.3 Identificação dos Isolados por Análise do 16S RNA	64
6.2 Atividade Antimicrobiana	70
6.3 Detecção de Ácido Clavulânico	76
6.4 Perfil de Resistência a Antibióticos.....	76
6.5 Produção de Amilase	82
6.6 Produção de Xilanase	84
6.7 Produção de Celulase.....	85
6.8 Cultivo em Mesa Incubadora Rotativa	85
6.9 Separação dos Principais Compostos	90
6.10 Produção de Substâncias com Atividade Citotóxica	90
6.11 Produção de Substâncias com Atividade Anti- <i>Leishmania</i>	91
6.12 Identificação do Pigmento	91
7 Discussão	101
8 Conclusões.....	103
9 Referências Bibliográficas.....	104
10 Anexos	110
Anexo I	110
Anexo II.....	111
Anexo III.....	120
Anexo IV	125
Anexo V.....	130
Anexo VI	132

Índice de Ilustrações

Figura 1: Estrutura de moléculas de pigmentos produzidas por fungos do gênero <i>Talaromyces</i>	24
Figura 2: Representante da espécie <i>Hymenaea courbaril</i> , com destaque para folhas e fruto.....	27
Figura 3: Representante da espécie <i>Tabebuia aurea</i> – Ipê amarelo, com destaque para folhas e flores	27
Figura 4: Representante da espécie <i>Tabebuia impetiginosa</i> – Ipê roxo, com destaque para folhas e flores	28
Figura 5: Representante da espécie <i>Tabebuia heptaphylla</i> – Ipê Rosa, com destaque para folhas e flores	28
Figura 6: Representante da espécie <i>Tabebuia</i> róseo-alba– Ipê Branco.....	29
Figura 7: Procedimentos para o isolamento de microrganismos endofíticos.....	30
Figura 8: Porcentagem de microrganismos isolados de cada uma das cinco espécies arbóreas.	44
Figura 9: Cultivo em meio sólido de IB1/2, isolado das folhas de Ipê Branco.....	46
Figura 10: Cultivo em meio sólido de IB3, isolado das folhas de Ipê Branco.....	47
Figura 11: Cultivo em meio sólido de IB4, isolado das folhas de Ipê Branco.....	48
Figura 12: Cultivo em meio sólido de IB6, isolado das folhas de Ipê Branco.....	49
Figura 13: Cultivo em meio sólido de IB7, isolado das folhas de Ipê Branco.....	50
Figura 14: Cultivo em meio sólido de IRs1, isolado das folhas de Ipê Rosa	51
Figura 15: Cultivo em meio sólido de IRs2, isolado das folhas de Ipê Rosa.....	52
Figura 16: Cultivo em meio sólido de IRs3, isolado das folhas de Ipê Rosa.....	53
Figura 17: Cultivo em meio sólido de IRx1, isolado das folhas de Ipê Roxo.....	54
Figura 18: Cultivo em meio sólido de IRx2, isolado das folhas de Ipê Roxo.....	55
Figura 19: Cultivo em meio sólido de IA1, isolado das folhas de Ipê amarelo	56
Figura 20: Cultivo em meio sólido de IA2, isolado das folhas de Ipê amarelo	57
Figura 21: Cultivo em meio sólido de IA3, isolado das folhas de Ipê amarelo	58
Figura 22: Cultivo em meio sólido de IA4, isolado das folhas de Ipê amarelo	59
Figura 23: Cultivo em meio sólido de IA5, isolado das folhas de Ipê amarelo	60
Figura 24: Cultivo em meio sólido de IA6, isolado das folhas de Ipê amarelo	61
Figura 25: Cultivo em meio sólido de IA7, isolado das folhas de Ipê amarelo	62
Figura 26: Cultivo em meio sólido de IJ1, isolado das folhas de Jatobá	63
Figura 27: Microscopia com aumento de 400 vezes de IJ1 das folhas de jatobá.....	64
Figura 28: Produção de pigmentos vermelhos em meio ISP2 durante a fase de isolamento do FJ1. ..	66

Figura 29: Porcentagem das espécies isoladas das folhas das 4 espécies de <i>Tabebuia</i> sp. e da <i>Hymenaea courbaril</i>	70
Figura 30: Inibição de <i>E. coli</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B) pelo microrganismo IRS1	72
Figura 31: Inibição de <i>Candida albicans</i> pelo microrganismo IA2.....	73
Figura 32: Inibição de <i>Candida albicans</i> pelo microrganismo IA6.....	73
Figura 33: Inibição de <i>Candida albicans</i> pelo caldo de cultivo dos microrganismos IA1 e IA4.	73
Figura 34: Inibição de <i>Escherichia coli</i> (A) e de <i>Staphylococcus aureus</i> (B) pelo microrganismo IB1/IB2	74
Figura 35: Inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> pelo microrganismo IB1/IB2	75
Figura 36: Inibição de <i>Candida albicans</i> IB1/2	75
Figura 37: Antibiograma de IB1 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	79
Figura 38: Antibiograma de IB3 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	79
Figura 39: Antibiograma de IB6 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	80
Figura 40: Antibiograma de IA2 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	80
Figura 41: Antibiograma de IA3 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	80
Figura 42: Antibiograma de IA7 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	81
Figura 43: Antibiograma de IRx2 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos ..	82
Figura 44: Crescimento em meio Amido de IRx1, IA5 e IA6	83
Figura 45: Crescimento em meio Amido de IB1/IB2, IRs1 e IRs3	84
Figura 46: Concentração de Cx e Absorbância em 510 nm em 72h de cultivo em 9 diferentes meios de cultivo de <i>Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus</i> (IJ1).	86
Figura 47: Perfil de variação de Cx e do pH no decorrer de 96h de cultivo em meio ISP2 de <i>Paenibacillus terrae</i> (IB1/IB2).....	87
Figura 48: Perfil de variação de Cx e da concentração das fontes de carbono no decorrer de 96h de cultivo em meio ISP2 de <i>Paenibacillus terrae</i> (IB1/IB2)	88
Figura 49: Perfil de crescimento, e variação de pH e absorbância obtidos no cultivo em meio ISP2 de <i>Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus</i> (IJ1).....	89
Figura 50: Perfil de Cx e Cs no cultivo de <i>Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus</i> (IJ1)..	89
Figura 51: Análise por Combiflash do pigmento vermelho em extrato aquoso de <i>Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus</i> (IJ1)	92
Figura 52: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) das amostras 1 e 2	92
Figura 53: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) da amostra 16 à 20	93
Figura 54: Análise da RMN 1H (D2O, 400 MHz) da amostra 35 à 37	93
Figura 55: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) detalhe das amostras de 35 à 37	94

Figura 56: RMN 1H (D2O, 400 MHz) detalhe das amostras de 35 à 37	94
Figura 57: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com MeOH na fase móvel.....	95
Figura 58: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com MeOH na fase móvel.....	96
Figura 59: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com H2O na fase móvel	96
Figura 60: Análise de RMN das amostras 16 à 20 utilizando H2O na fase móvel.....	97
Figura 61: Análise de RMN das amostras de 35 à 37 utilizando H2O na fase móvel	97
Figura 62: Morfologia de <i>Penicillium/Talaromyces minioluteum</i> (IJ1) cultivado em meio ISP2	98
Figura 63: Perfil de RMN gerado da análise do exsudato extraído diretamente das colônias	99
Figura 64: Perfil detalhado de RMN gerado da análise do exsudato extraído diretamente das colônias de IJ1.....	99

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição dos meios de cultura, componentes e suas respectivas concentrações	36
Tabela 2: Gêneros e espécies com respectivo percentual de combinação das sequências de nucleotídeos sequenciados por meio da análise da região de RNA 16s	66
Tabela 3: Resultado qualitativo de inibição microbiana pelos endofíticos isolados.	71
Tabela 4: Medida dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por antibióticos contra microrganismos Gram positivos das bactérias isoladas	76
Tabela 5: Medida dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por antibióticos contra microrganismos Gram negativos das bactérias isoladas	78

Lista de Abreviações

% - porcentagem

µl - microlitro

ABS - Absorbância

Cs - Concentração de Substrato

Cx - Concentração Celular

HPLC/CLAE- “High-performance liquid chromatography”/cromatografia líquida de alta pressão

IA1 - Isolado Ipê Amarelo 1

IA2 - Isolado Ipê Amarelo 2

IA3 - Isolado Ipê Amarelo 3

IA4 - Isolado Ipê Amarelo 4

IA5 - Isolado Ipê Amarelo 5

IA6 - Isolado Ipê Amarelo 6

IA7 - Isolado Ipê Amarelo 7

IB1 - Isolado Ipê Branco 1

IB2 - Isolado Ipê Branco 2

IB3 - Isolado Ipê Branco 3

IB4 - Isolado Ipê Branco 4

IB5 - Isolado Ipê Branco 5

IB6 - Isolado Ipê Branco 6

IB7 - Isolado Ipê Branco 7

IJ1 - Isolado Jatobá 1

IRs1 - Isolado Ipê Rosa 1

IRs2 - Isolado Ipê Rosa 2

IRs3 - Isolado Ipê Rosa 3

IRx1 - Isolado Ipê Roxo 1

IRx2 - Isolado Ipê Roxo 2

m₁ - Massa inicial

m₂ - Massa final

ml - mililitro

Pb – Pares de Bases

RMN - Ressonância Magnética

V-Volume

i. Resumo

Os microrganismos, como os pertencentes ao grupo dos *Penicillium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, representam uma fonte importante para produção de metabólitos bioativos com diversas aplicações. A produção destas substâncias está diretamente relacionada ao cultivo em meios de cultura assim como as fontes de carbono e nitrogênio disponíveis, condições de pH, temperatura e trocas gasosas. Dentre os grupos microbianos que mais se destacam nas pesquisas para produção de diversos metabólitos encontram-se os fungos e bactérias que habitam o interior de plantas, os microrganismos endofíticos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar microrganismos endofíticos do cerrado a partir de folhas de quatro espécies de *Tabebuia* spp. e um exemplar de *Hymenaea courbaril* e estudar a produção de metabólitos de interesse biotecnológico das linhagens encontradas. As atividades microbianas estudadas foram: capacidade antibiótica contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, atividade antifúngica, resistência a antibióticos, produção enzimática, atividade antitumoral e produção de pigmentos. Os microrganismos que se destacaram devido a produção de antibióticos, citotoxicidade contra células tumorais e produção de pigmentos foram selecionados e cultivadas em maior escala objetivando o melhoramento da produção do metabólito escolhido por testes bioguiados. Selecionou-se *Paenibacillus terrae* e *Penicillium* complexo *minioluteum*/*Talaromyces* complexo *minioluteus*. O *P. terrae* mostrou-se produtor de metabólitos bioativos contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos leveduriformes, além da inédita atividade citotóxica contra células HTC, SF295 e OVCAR8. Esta bactéria apresentou também inédita atividade anti-*Leishmania*, atuando contra a forma promastigota do parasita. O fungo produziu pigmento de coloração vermelha em grande quantidade e foi selecionado devido à ausência de atividade citotóxica, antifúngica e antibacteriana. Ambos microrganismos selecionados demonstraram potencial de aplicações biotecnológicas e industriais, sugerindo a viabilidade promissora da continuidade dos trabalhos desenvolvidos.

Palavras Chave: Microrganismos Endofíticos, Metabólitos Bioativos, Microdiversidade, Citotoxicidade, Cerrado.

ii. Abstract

Microorganisms, such as those belonging to the groups of *Penicillium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, represent an important source for the production of bioactive metabolites with varied applications. The production of these substances is directly related to the culture media, as well as the available carbon and nitrogen sources, conditions of pH, temperature and agitation (gas exchange). Among the microbial groups most studied about the production of various interest metabolites are the fungi and bacteria that inhabit the interior of plants, the endophytes. Thus, the present study aimed to isolate and identify endophytic microorganisms from leaves of four species of *Tabebuia* spp. and *Hymenaea courbaril* and study the production of interest metabolites by the lineages found. The microbial activities were studied: antibiotic capability against Gram positive and Gram negative bacteria, antifungal, antibiotic resistance, enzyme production, antitumor activity and pigment production. Microorganisms that stood out due to production of antibiotics, cytotoxicity against tumor cells and pigment production. This study selected microorganisms based on their most relevant production, in this case, it was the antibiotics production, pigments production and cytotoxicity, they were cultured in larger scale aiming at the improvement of the production of metabolite chosen according to the results. The selected microorganisms were a bacterium identified as *Paenibacillus terrae* and a fungus identified as *Penicillium minioluteum*/*Talaromyces minioluteus* complex. The *P. terrae* proved producing bioactive metabolites against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, in addition to novel cytotoxic activity against HTC, and OVCAR8 SF295 tumor cells. This bacterium also showed unprecedented anti-*Leishmania* activity, acting against the promastigote form of the parasite. The isolated fungus proved producing a red pigment, in large quantities without cytotoxic, antifungal or antibacterial activity, favoring its industrial applications. Both selected microorganisms demonstrated potential for biotechnological and industrial applications, suggesting the viability of promising continuity of the work performed.

Keywords: Endophytic Microorganisms, Bioactive Metabolites, Microdiversidade, Cytotoxicity, Cerrado.

1 Introdução

O Cerrado é um dos grandes biomas brasileiros, originalmente relatado com aproximadamente 2 milhões de Km², alcançando desde as proximidades da floresta amazônica até o Estado do Paraná, ocupa grande parte do território nacional e ocorre também em outros países vizinhos, como a Bolívia, Paraguai e Venezuela. As temperaturas nesse bioma variam de 22-27°C e o período de chuvas ocorre na primavera e no verão. A literatura relata duas grandes regiões de divisão desse importante ecossistema, sendo a área de mais elevada concentração vegetal conhecida como nuclear e a porção periférica tem por característica a presença de pequenas áreas dispersas (DIAS, LUZIA E JORGE, 2013).

Segundo RIBEIRO e WALTER (1998), essa grande área sofre várias influências que afeta as fisionomias da vegetação nativa, entre essas influências se encontra a ação do fogo. As pressões seletivas favorecem espécies relatadas como medicinais, mas que estão se perdendo pela falta de técnicas de manejo sustentável e estudos das propriedades das mesmas (SILVA, 2005).

Entre as espécies arbóreas mais encontradas neste bioma estão relatadas as *Qualea grandiflora*, *Eriotheca pubescens*, *Caryocar brasiliense*, *Byrsonima coccolobaefolia*, *Myrsine guianensis*, *Qualea parviflora*, *Dalbergia miscolobium*, *Stryphnodendron adstringens*, *Plathymenia reticulata* e *Lafoensia pacari* (NERI e colaboradores, 2007) *Hymenaea courbaril* e *Tabebuia sp.*, sendo as duas últimas as espécies fonte dos microrganismos estudados nesse trabalho.

Hymenaea courbaril é uma árvore que pertence ao gênero *Hymenaea* que inclui quatorze espécies, de regiões tropicais, com alta qualidade da madeira. É popularmente conhecido Jatobá é tradicionalmente empregada na medicina popular devido a presença de taninos em sua casca (BEZERRA e colaboradores, 2013), com efeitos relatados de seu extrato de casca e folhas de ação antioxidante, antisséptico, expectorante, laxante, estimulante e tônico. Estudos acadêmicos VEGGI e colaboradores (2014) com extratos vegetais dessa espécie demonstram potencial de ação inibitória de *Staphylococcus aureus* metaciclina-resistente, com efeito aprimorado quando combinado com extratos de outra árvore típica do bioma do Cerrado a *Stryphnodendron adstringens* (ALEIXO e colaboradores, 2013).

Existem cerca de 30 espécies conhecidas de Tabebuia, essas árvores podem atingir 20 metros de altura. São frutíferas e seus frutos, assim como sua casca possuem valor na medicina

popular. Os frutos são também utilizados para alimentação, sendo bastante ricos em fibras (DIAS, LUZIA e JORGE, 2013).

As espécies de *Tabebuia sp.* são popularmente conhecidas como ipês, estes podem ser considerados, juntamente com o pau-brasil, símbolos nacionais. São árvores amplamente utilizadas como plantas ornamentais urbanas e correm risco de extinção devido ao extrativismo madeireiro. Árvores de porte alto, raízes profundas e casca grossa originárias do cerrado, contando com três principais colorações de floração amarela, branca e roxa.

Os extratos vegetais possuem aplicação além da conhecida pela medicina popular (uso de chás e infusões). Alguns estudos abrangem o uso desses extratos para o tratamento de doenças como a doença de chagas que atinge mais de 18 milhões de pessoas na América Latina. O Lapachol é uma substância pertencente às naftoquinonas, encontrada nas árvores da família das Bignoniáceas e está relacionado a estudos no combate ao *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* e é extraída da madeira de ipês (MOURA e colaboradores, 2001).

MAHMOUD e colaboradores (2011), testaram 65 extratos de plantas entre elas a *Tabebuia heptaphylla*, da qual o extrato da casca é usado contra cancro, como um depurativo para o estômago, e com efeito bactericida. Todas as espécies analisadas apresentaram atividade citotóxica. Já existem estudos realizados com lapachol e β -lapachona com importante atividade antitumoral *in vitro*, já com testes clínicos pela NCI (EUA).

Outro ipê estudado no combate ao câncer é o ipê roxo. Algumas substâncias presentes nos extratos gerados de partes de ipê roxo possuem atividade citotóxica, apesar de não ser observado um efeito preventivo quanto ao câncer induzido em cobaias (HIGAI e colaboradores, 2011).

Uma vez que algumas propriedades e substâncias bioativas encontradas nas plantas são relatadas na literatura também sendo apresentadas por microrganismos e muitos microrganismos encontram-se associados a plantas, o isolamento dos microrganismos que habitam caules e folhas pode acarretar em um melhoramento da eficiência de uso da bioatividade presente nos extratos vegetais.

Algumas linhagens de microrganismos destacam-se quanto as capacidades de produção de substâncias de interesse biotecnológico. Linhagens bacterianas como *Bacillus sp.* e *Paenibacillus sp.*, assim como linhagens fúngicas *Penicillium sp.* são relatadas na literatura como produtoras de grandes variedades de substâncias.

A exemplo, destaca-se o gênero *Bacillus*, este grupo bacteriano possui importância na alimentação humana devido a características de resistência e capacidade de esporulação que conferem extrema tolerância a variações térmicas, especialmente as com características utilizadas nas indústrias de laticínios (CORDEIRO e colaboradores. 2006). JONGHE e colaboradores (2010) citam essas bactérias como alguns dos principais contaminantes da indústria produtoras de leite, uma vez que são formadoras de esporos e resistente a processos como a pasteurização.

O grupo dos *Paenibacillus*, anteriormente classificado como pertencente aos *Bacillus*, é conhecido como produtor de diversos metabólitos bioativos, sendo que diversas espécies são relatadas com capacidade de produção de moléculas de ação antibacteriana e até antifúngicos (LORENTZ e colaboradores, 2006). LOHANS e colaboradores (2014) obtiveram atividade de *Paenibacillus* contra a bactéria *Campilobacter jejuni*, enquanto WU e colaboradores (2011) observou a capacidade de microrganismos pertencentes aos *Paenibacillus* com potencial de inibição de *Staphylococcus* resistentes a metaciclina. Além da capacidade de produção de bioativos, algumas espécies são capazes de produzir enzimas de interesse. LIANG e colaboradores (2014), descreve o *P. terrae* como bom produtor de enzimas aplicáveis para degradação do complexo celulósico, como as carboximetil celulase (CMCase).

Desde a descoberta de Alexander Fleming os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* são comumente associados a produção de antibióticos como a penicilina. Porém esse grupo de microrganismos também é descrito como produtor de pigmentos de interesse biotecnológico que, uma vez que atendam as características desejadas, podem ser utilizados nas indústrias têxteis, de alimentos, ração animal ou mesmo na coloração de alimentos humanos, a exemplo dos gêneros *Monascus* e *Penicillium* (ARAI e colaboradores, 2013).

Dessa maneira, os microrganismos representam uma fonte importante para produção de metabólitos bioativos com diversas aplicações. A produção destas substâncias está diretamente relacionada aos meios de cultura associados às fontes de carbono e nitrogênio disponíveis, assim como condições como pH, temperatura e agitação que influenciam diretamente reações metabólicas e nas trocas gasosas (ROMANO, 2009).

Saliente-se que poucos relatos foram encontrados na literatura estudos sobre o isolamento de microrganismos endofíticos de *Tabebuia* spp. e de *Hymenaea courbaril*, não foram encontrados também, nas fontes pesquisadas, trabalhos de bactérias isoladas de folhas destas árvores.

Desta forma o presente trabalho objetivou isolar, identificar e estudar microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* com potencial produtor de metabólitos de interesse biotecnológico como a produção de substâncias com ação antibiótica, antifúngica, antiparasitária, de resistência a antibióticos e capacidade anti- β -lactamásica, produção de enzimas de interesse industrial.

2 Justificativa

Observa-se em todos os setores industriais a necessidade do desenvolvimento tecnológico visando o aprimoramento e a otimização de processos, assim como novas fontes de matéria prima. A microbiologia destaca-se atendendo todos esses quesitos para pesquisas e aplicações. Dentre as possibilidades desta ciência encontram-se os microrganismos endofíticos, muitas vezes relacionados a plantas já conhecidas por capacidades bioativas de seus extratos, podendo essas bioatividade estarem associadas a ação dos microrganismos, sendo esses fungos e bactérias, alternativas viáveis para aumento de produção de moléculas de interesse e até mesmo fontes de novas moléculas bioativas.

1. Os microrganismos e seus metabólitos, como algumas enzimas, são hoje uma das alternativas mais viáveis para aceleração e viabilização de processos, tornando-os mais eficientes em termos de energia, matéria prima e tempo de processo e conseqüentemente mais sustentáveis.
2. É crescente o número de pesquisas que buscam novos fármacos devido à resistência bacteriana e dificuldades como a toxicidade de medicamentos para o paciente.
3. Pigmentos produzidos por microrganismos possuem diversas aplicações, entre elas as indústrias farmacêuticas, de alimentos e têxteis, com alto valor agregado, uma vez que se enquadram entre os produtos naturais.
4. Os microrganismos endofíticos muitas vezes são responsáveis pela relatada ação do extrato proveniente de certas plantas.
5. O Brasil possui a mais rica biodiversidade do mundo e esta fonte de bioprodutos ainda pode ser melhor e mais amplamente estudada.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo geral realizar o isolamento e identificação de microrganismos endofíticos provenientes de plantas do Cerrado situado na região da cidade de São Carlos/SP, e detectar a produção de metabólitos que possam ter interesse biotecnológico a partir dos isolados.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar o *screening* de microrganismos endofíticos presentes nas folhas de quatro espécies de *Tabebuia* spp. e um exemplar de *Hymenaea courbaril*, e identificar os isolados das folhas das árvores do Cerrado por testes bioguiados.
2. Avaliar o potencial antibiótico (Gram positivo e negativo), antifúngico, antitumoral, antiparasitário, resistência a antibióticos e produção de outras substâncias bioativas, bem como atividade citotóxica, produção enzimática e de pigmentos pelas linhagens isoladas.
3. Selecionar os produtores de maior interesse levando em consideração o ineditismo, baseado nos relatos da literatura, a quantidade e a variedade de ação das substâncias produzidas, e avaliar o processo de produção, com observação dos dados cinéticos em cultivos em mesa incubadora rotativa.
4. Realizar a identificação e a elucidação das moléculas responsáveis pelas atividades selecionadas.

4 Revisão Bibliográfica

A resistência microbiana é um sério problema que leva a complicações de tratamentos de doenças e a falta de medicamentos eficazes, tornando cada vez mais frequente a necessidade de substituir fármacos por outros cada vez mais potentes e efetivos.

Segundo SADANANDA e colaboradores (2011) a resistência humana a drogas também é um problema quanto ao tratamento do câncer, fazendo necessário o uso de drogas mais potentes, porém com maior especificidade quanto a ação, desta maneira com níveis de toxicidade toleráveis para o paciente.

A busca por novos compostos bioativos se estende desde a síntese química até o estudo dos metabólitos de invertebrados como esponjas do mar, extratos de plantas e moléculas provenientes de organismos microbiológicos.

Grande parte das substâncias com propriedades farmacológicas são de origem natural. Mesmo compostos produzidos por síntese química tendem a se basear na ação de produtos naturais já conhecidos, provenientes principalmente de fungos e bactérias. Desta maneira, a microbiologia mostra-se uma fonte a ser explorada para a busca e descobertas de novos compostos.

Bactérias e fungos estão presentes em praticamente todos os ambientes do planeta, além de desenvolverem relações de parasitismo ou simbiose com animais, habitando seus corpos interna e externamente e, até mesmo, em maior número que as células do hospedeiro. Existem também microrganismos associados a plantas, vivendo externamente, chamados de microrganismos epifíticos, e mesmo internamente nas sementes, raízes, caules e folhas, inter ou intracelularmente, sem causar dano aparente as plantas, sendo denominados como microrganismos endofíticos.

Alguns microrganismos associados a partes das plantas são estudados por seu efeito no desenvolvimento das espécies. BOTELHO, MORAES e MENTEN (2007) relatam a incidência de fungos em sementes sem demonstrar resultados que sugerissem que os fungos encontrados afetassem as plantas negativamente.

RODRIGUES (2010) refere-se aos endofíticos como microrganismos associados a plantas de maneira não danosa, que foram descritos pela primeira vez por Bary em 1866, porém

começaram a ser realmente estudados após a constatação das interações simbióticas com as plantas hospedeiras. Em seu estudo, RODRIGUES (2010) isolou 97 fungos endofíticos, sendo 37 das folhas e 60 das raízes, mas não estudou a atividade biológica dos isolados, apesar de ressaltar a importância desse estudo.

O Brasil representa cerca de 20% de toda a flora mundial, atingindo mais de 40.000 espécies de plantas nativas. O cerrado é um dos mais ricos biomas brasileiros em termos de biodiversidade de espécies e o segundo maior bioma do país, contando com uma área de aproximadamente 2.036.448 quilômetros quadrados (DIAS, LUZIA e JORGE, 2013). É superado em termos de espaço físico apenas pela Floresta Amazônica. Este território predominante de savana conta com enorme variedade de plantas associadas a medicina popular (RATTER *e colaboradores* (2006) e RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997).

Ressalta-se que o território brasileiro não conta apenas com uma vasta biodiversidade, mas inserida nessa grande variedade de espécies existe o potencial pouco explorado e subutilizado dessa diversidade biológica. Tendo em vista esse fato, observa-se que, medicamentos fitoterápicos são aceitos não só pela medicina popular, mas também por indústrias farmacêuticas, demonstrando além dos benefícios a saúde humana, um grande valor econômico agregado (VEGGI *e colaboradores*, 2014).

Como exemplo de espécies com potencial de aplicabilidade a literatura cita a *Hymenaea courbaril*. Essa espécie arbórea pertencente à família Fabaceae pode atingir 20 metros de altura e conta com cerca de 14 espécies, sendo que nove delas são encontradas em território brasileiro. A maioria das espécies possui valor econômico devido a qualidade da madeira e frutas comestíveis. Por nomenclatura popular esta árvore é conhecida como jatobá e é típica da região do Cerrado. A casca do jatobá tem sido empregada na medicina popular, havendo relatos de propriedades e aplicação como antioxidantes, antisséptico, expectorante, laxante, purgativo, sedativo, estimulante e tônico, utilizados também para tratamentos de diarreia, disenteria e câibras intestinais. (BEZERRA *e colaboradores*, 2013 e DIAS, LUZIA e JORGE, 2013).

A literatura traz estudos que identificaram os compostos responsáveis pelas atividades dos extratos vegetais. Entre as moléculas identificadas estão diterpenos, sesquiterpenos, compostos fenólicos como os flavonoides e as procianidinas que favorecem a presença dos compostos fenólicos além de possuir atividades biológicas próprias, e oligossacarídeos, além de 5-

lipoxigenase e policatechin. As aplicações desses compostos vão de medicinais a indústrias de cosméticos (VEGGI e colaboradores, 2014).

Além do Jatobá, outras espécies do Cerrado se destacam por seu potencial biotecnológico inexplorado. O Ipê (*Tabebuia* sp) é, juntamente com o pau-brasil, uma árvore tida como símbolo nacional, tido como planta ornamental, tendo essa característica em especial quando florido, também possuindo aplicação pela indústria madeireira, tendem a atingir de 5 aos 25 metros de altura, pode ser encontrada por grande parte do território nacional e desenvolve-se em diferentes terrenos e agrupamentos florestais. O ipê pertence à família *Bignoniaceae*, além das características citadas, algumas espécies, como o ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*) possuem aplicações medicinais, devido a grandes quantidades de compostos orgânicos de natureza principalmente fenólica e polifenólica, como o lapachol presente em sua casca e caule, que apresentaram atividade biológica contra fungos e bactérias além de propriedades antitumorais (DOUSSEAU e colaboradores, 2008, e SARZI e colaboradores, 2010).

Foram encontrados na literatura trabalhos que relatam atividade proveniente de extratos de casca e folhas de ipê. FENNER e colaboradores (2006) apresentaram uma lista com 409 espécies arbóreas que possuem relatado algum potencial para tratamento de sinais e sintomas de infecções fúngicas. Dentre as espécies listadas neste levantamento bibliográfico se encontram a *Tabebuia Chrysantha*, *Tabebuia Impetiginosa*, *Tabebuia vellosi* e *Tabebuia Heptaphylla*, esta última destacada pelos autores como uma das mais citadas “úteis em sinais e sintomas indicativos de infecções fúngicas”.

OSPINA e colaboradores (2011) ressalta as plantas medicinais como uma alternativa para o tratamento de patologias como processos inflamatórios. Com a extração aquosa e metanólica realizada com folhas de *Tabebuia chrysantha* foi detectado potencial inibidor da inflamação e também um efeito redutor da produção de radicais livres dos extratos obtidos.

O potencial de inibição de extratos vegetais incluindo *Tabebuia impetiginosa*, contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, na formulação de um enxaguante bucal, demonstrando uma sensível melhora na inibição, principalmente contra *S. aureus* e *B. subtilis* (CORDEIRO e colaboradores, 2006). A atividade encontrada no extrato vegetal pode estar associada a presença de microrganismos endofíticos.

A literatura apresenta relatos de microrganismos endofíticos isolados de espécies de *Tabebuia* sp. que apresentaram produção de substâncias com aplicações diversas. Porém os estudos encontrados referem-se unicamente ao isolamento de fungos endofíticos e não foram encontrados trabalhos referentes ao isolamento de bactérias.

SADANANDA e colaboradores (2011) realizaram o isolamento de fungos endofíticos presentes em *Tabebuia argentea* e foram destacadas duas espécies de fungos identificadas como *Aspergillus niger* e *Alternaria alternate*. Essas linhagens demonstraram capacidade de produção de naphthoquinona e capacidade de inibição microbiana para fungos e bactérias patogênicos.

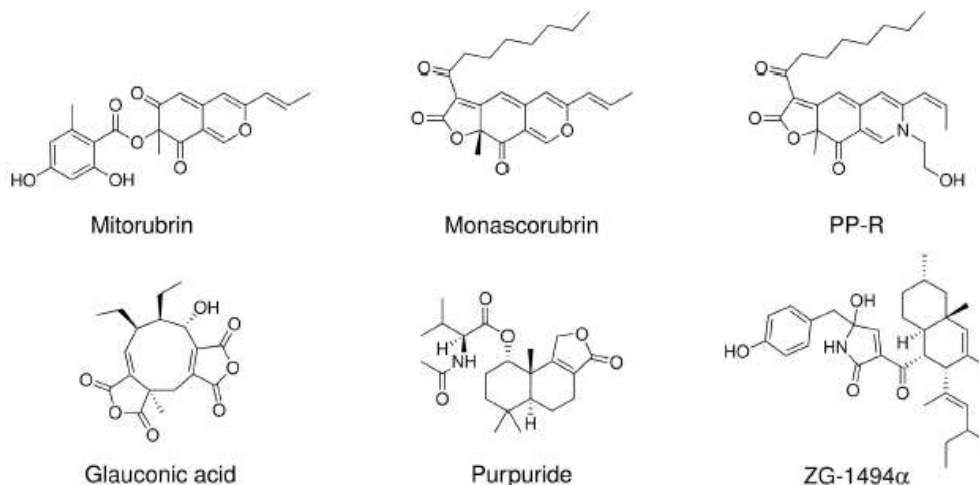
Dentre os compostos extraídos de material vegetal e encontrados também em cultivos microbianos estão os pigmentos. Antes dos avanços microbiológicos, os pigmentos eram extraídos exclusivamente de material vegetal, como o urucum e o pau brasil. Com a exigência de maiores quantidades das substâncias acarretado após o marco da revolução industrial, ficou evidente a necessidade de processos menos impactantes ao ambiente, abrindo espaço para produções sintéticas e microbiológicas, está última com especial cuidado e aplicabilidade na área industrial alimentar, uma vez que os pigmentos de origem natural possuem aspecto mais saudável quando comparados aos sintéticos (DALLAGO e colaboradores, 2005 e MEINICKE, 2008).

Essas moléculas, com poder de coloração possuem aplicabilidade em indústrias farmacológicas, alimentícias e cosméticas. Algumas linhagens fúngicas são conhecidos produtores dessas substâncias, destacando-se devido a qualidade e quantidade dos metabólitos de interesse, inclusive os corantes. Entre esses microrganismos evidenciam-se os fungos do gênero *Monascus* e *Talaromyces*.

Os fungos pertencentes ao gênero *Talaromyces* são relatados como produtores de diversas moléculas com capacidade corante, entre elas encontram-se a monascorubina, purporidina, a mitorubina, PP-R, ZG149 α e o ácido glaucanóico. Essas moléculas estão representadas na Figura 1 e possuem aplicação até mesmo na coloração de arroz para consumo humano (FRISVAD e colaboradores, 2013).

Figura 1: Estrutura de moléculas de pigmentos produzidas por fungos do gênero

Talaromyces



Fonte: FRISVAD *e colaboradores*, 2013.

O gênero *Paenibacillus* foi proposto em 1993. Anterior a este momento, essas bactérias eram classificadas como *Bacillus* devido a semelhanças na morfologia (WANG *e colaboradores*, 2011). Dentre os locais de isolamento mais comuns dos *Paenibacillus* não patogênicos, encontra-se o solo, ambiente que dá nome ao *Paenibacillus terrae*, bactéria que é reportada como produtora da paenicidina, antibiótico de ação contra bactérias Gram positivas, e estudos sobre a produção de metabólitos com ação anti-*Campylobacter*, bactéria Gram positiva causadora de infecções gastrointestinais e sanguíneas humanas. LOHANS *e colaboradores* (2014) identificaram a produção de paenicidina A e B, com similares espectros de inibição de Gram positivos e negativos, além da caracterização de tridecaptanin A, composto efetivo contra *Campilobacter jejuni*, contaminante de importância alimentar.

Algumas moléculas são características de um grupo de microrganismo, como por exemplo as penicilinas produzidas pelo gênero *Penicillium*. Dentre as moléculas que a literatura relata como de produção característica do gênero *Paenibacillus* encontra-se a paenemacrolidina, um composto da classe das macrolidinas, com ação antibiótica eficaz contra *Staphylococcus* resistentes a metaciclina. (WU *e colaboradores*, 2011).

A bactéria *P. terrae* é comumente relatada como produtoras de enzimas de interesse, por exemplo as CMCases e as xilanases, enzimas estudadas para aplicação na produção de biocombustíveis e nas indústrias de papel e celulose (SHIM *e colaboradores*, 2012, e LIANG *e colaboradores*, 2014).

As bactérias do gênero *Paenibacillus* são conhecidas devido a produção de metabólitos de interesse, além da produção de enzimas, a literatura ressalta a capacidade de gerar metabólitos com diversas bioatividades. Além do *P. terrae* isolado nesse trabalho, outras espécies também possuem importância biotecnológica como possíveis ferramentas de controle microbiológico. *Paenibacillus chibensis*; *P. koreensis*; *P. illinoiensis*; *P. validus*; *P. pabuli*; *P. brasilensis* são produtores de antibacterianos, enquanto *P. peoriae* é produtor de antifúngicos (LORENTZ e colaboradores, 2006).

Outros integrantes do gênero também são relatados como produtores de antibióticos conhecidos. Destaca-se como produtor de uma variedade de substâncias com poder antibiótico o *Paenibacillus polymyxa*, microrganismo com diversos relatos de isolamento do solo, que dentre os compostos destacados como produzidos por ele, encontram-se o polymyxin A à E, paenibacillin, jolipeptin, gavaserin, saltavalin, fusaricidin A à D e gatavalin (WU e colaboradores, 2011).

Além das capacidades citadas de produção de metabólitos de interesse, a linhagem *Paenibacillus beijingensis*, isolada por WANG e colaboradores (2013), demonstrou a capacidade de facilitar a fixação de Nitrogênio, que é de extremo interesse para a agricultura biotecnológica. Ressalta-se que outros microrganismos desse mesmo gênero possuem essa mesma característica, como exemplo o *P. polymyxa*.

A busca por novos fármacos é de extrema importância para a manutenção da qualidade de vida humana. Uma vez que a resistência microbiana vem crescendo devido a seleção de microrganismos resistentes, promovida pelo uso indiscriminado de antibióticos. Um exemplo de mecanismo de resistência é o da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Esta bactéria pode produzir enzimas β -lactamases (KUBOYAMA, 2009), essas enzimas podem clivar o Anel β -lactâmico de antibióticos como a penicilina.

São somados as das atividades descritas, como importantes moléculas de interesse biotecnológico, os compostos com ação antitumoral são importantes metabólitos microbianos, e como indicio de sua produção, é verificada a capacidade antifúngica, como descrito para diversos integrantes do gênero *Paenibacillus*. Observa-se que cerca de 25% das drogas em uso para o tratamento do câncer são provenientes de fontes microbiológicas, um fator importante no uso dos microrganismos para a produção de antitumorais é sua produtividade elevada quando comparada a outras fontes desses compostos (GRANATO e colaboradores, 2013).

Ainda quanto a produção de moléculas de interesse, algumas derivadas de microrganismos podem ser usadas para combater doenças ainda negligenciadas quanto ao tratamento como a Leishmaniose. Macrorganismos já são relatados como produtores de substâncias inibidoras. MOURA *e colaboradores* (2006), identificou a capacidade da esponja marinha *Cliona varians* inibir a forma promastigota do parasita *Leishmania*. Ressalta-se assim como nas plantas, microrganismos associados a animais, podem ter relação com as bioatividade apresentadas por eles.

Como referência de microrganismo associados a organismos como esponjas do mar, SUBRAMANI e colaboradores (2013), isolou fungos do gênero *Penicillium*, isolados de esponjas do mar provaram-se capazes de produzir citrinina composto com atividade citotóxica contra larvas de camarão (passo da triagem realizado para verificar a viabilidade de estudos com drogas candidatas).

Uma vez que a busca por novos fármacos e compostos de interesse humano inicia-se com o estudo e seleção de linhagens, o presente trabalho objetivou o isolamento e identificação de microrganismos endofíticos, devido a sua potencialidade apontada pela literatura na produção de inúmeras biomoléculas. Foram observadas as atividades biológicas (antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antiparasitária, enzimas de interesse e pigmentos) produzidas para a seleção dos microrganismos de maior interesse quanto ao ineditismo da atividade pela linhagem e eficiência na produção em escala laboratorial.

5 Material e Métodos

5.1 Isolamento de Microrganismos Endofíticos

Foi realizada a coleta de folhas de uma espécie de *Hymenaea courbaril* (Figura 2), conhecida popularmente como jatobá, e de quatro espécies de *Tabebuia* spp: *Tabebuia aurea* – Ipê amarelo (Figura 3), *Tabebuia impetiginosa*– Ipê roxo (Figura 4), *Tabebuia heptaphylla*– Ipê Rosa (Figura 5), *Tabebuia róseo-alba* – Ipê Branco (Figura 6).

Figura 2: Representante da espécie *Hymenaea courbaril*, com destaque para folhas e fruto



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Jatob%C3%A1>

Figura 3: Representante da espécie *Tabebuia aurea* – Ipê amarelo, com destaque para folhas e flores



Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Starr_070402-6239_Tabebuia_aurea.jpg

Figura 4: Representante da espécie *Tabebuia impetiginosa* – Ipê roxo, com destaque para folhas e flores



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Handroanthus_impetiginosus

Figura 5: Representante da espécie *Tabebuia heptaphylla*– Ipê Rosa, com destaque para folhas e flores



Fonte: http://es.wikipedia.org/wiki/Handroanthus_heptaphyllus

Figura 6: Representante da espécie *Tabebuia* róseo-alba– Ipê Branco



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/mauroguanandi/3805718724/>

As folhas foram armazenadas em sacos de coleta próprios para material vegetal. O material foi obtido no Parque Eco Esportivo Damha, localizado na Rodovia SP 318, Km 234, cidade de São Carlos, São Paulo. As folhas foram coletadas em 15 de março de 2015, em latitude 21° 57' 02.20" S e longitude 047° 53' 51.42" W. A coleta do material vegetal foi devidamente autorizada (Anexo I).

Foram utilizadas 25 gramas de amostra de folhas de cada árvore. Previamente aos procedimentos para o isolamento, foi realizada a lavagem do material com bucha e sabão para redução da população epifítica. A desinfecção das folhas seguiu-se com a submersão das folhas em álcool 70%v/v por 1 min., hipoclorito de sódio 2% m/v por 6 minutos, álcool 70% v/v por 30 segundos e lavagem com água destilada esterilizada. Foram retiradas e plaqueadas alíquotas da água utilizada nesta última lavagem para avaliar a eliminação da população epifítica (PIZA, HOKKA e SOUSA, 2015).

Após esse processo de remoção da população epifítica, as folhas tratadas foram picotadas e maceradas com a ajuda de pinças, pilão e cadinho previamente esterilizados e adição de 250ml

de solução salina (0,85%) esterilizada. Alíquotas do caldo de folhas foram dispostas em tubos com 10ml de água peptonada, para diluições seriais de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Foram retirados desses tubos 200 μ l da solução homogeneizada e plaqueados em meio ISP2 (Becton Dickinson & Co) para observação do crescimento de colônias. Ressalta-se que o meio ISP2 foi escolhido por favorecer o crescimento de Actinomicetos, conhecidos produtores de metabólitos de interesse. As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias.

Após 10 dias de incubação, as colônias que se desenvolverem foram novamente plaqueadas em meio ISP2, separadamente pelo método de esgotamento por estrias para obtenção de colônias isoladas e, conseqüentemente, culturas puras como ilustrado na Figura 7.

Figura 7: Procedimentos para o isolamento de microrganismos endofíticos



Fonte: Autor

5.2 Identificação dos Isolados

Foi realizada a identificação das linhagens isoladas utilizando métodos de identificação fenotípicos, baseados nas características macro e microscópicas e genotípicos, baseados na comparação da região 16sRNA.

5.2.1 Caracterização Fenotípica e Morfológica

As cepas foram caracterizadas através de análises de características morfológicas (exame microscópico dos esporos e micélio e coloração de Gram), macroscópicas (coloração e aspectos das colônias) e fisiológicas indicadas pela formação de pigmentos, produção enzimática e de metabolitos bioativos de acordo com FISHER *e colaboradores* (2003).

5.2.2 Análises Morfotintoriais e Genotípicas

As colônias de todas as linhagens foram observadas quanto à forma, tamanho, coloração, produção de pigmentos, resultados da aplicação da técnica de coloração de Gram, além da produção de metabólitos característicos de determinadas linhagens para que pudesse ser realizada a identificação dos microrganismos.

Para maior confiabilidade na identificação dos isolados, além do uso de microscopia e das análises morfológicas das colônias, foi realizada a identificação através do sequenciamento da região 16S rRNA, para esse fim foram utilizados *primers* específicos para o material genético bacteriano.

5.2.3 Extrações do DNA

Para possibilitar a extração do material genético bacteriano, os microrganismos foram cultivados em placa de Petri com o meio ISP2 ágar em cultivo *overnight* (18 horas). Após o crescimento das linhagens, foram coletadas amostras de colônias isoladas de cada microrganismo em seguida depositando-se a amostra coletada em tubos cônicos de 50 ml contendo 5ml de meio ISP2 líquido, os tubos foram incubados por 24 horas à 28 °C e 200 rpm.

Para comparação das identificações genotípicas nos bancos de dados de referência, foi realizada a amplificação do material genético de cada uma das linhagens. Para realizar a extração do DNA bacteriano, foi utilizado o kit *Metagenomic DNA from Environmental Water Samples* (Epicentre, WI, USA). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% m/v. A quantificação foi realizada no equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo

Scientific, DE, USA), no Departamento de Genética da UFSCar, no laboratório do professor Flávio Henrique da Silva.

5.2.4 Amplificação da Região 16S RNA

A amplificação da região 16S rRNA foi realizada com a utilização da técnica de PCR. Primeiramente foi realizado o sequenciamento sem o processo de extração do DNA. A análise foi realizada com aproximadamente 25ng de DNA molde, 200µM de cada dNTP, 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase; 1,5 mM de MgCL₂; Tampão para PCR 1x; 10 pmol de cada oligonucleotídeo e água esterilizada para completar um volume final de 25 µl.

Foi utilizado o termociclador PTC-100 (“MJ Research, INc”), utilizando 1 ciclo de 5 minutos à 94 °C para o processo de desnaturação, 35 ciclos à 94 °C por 1 minuto, para extensão, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos para amplificação. Após esses processos foi mantida uma etapa final de 72 °C por 20 minutos.

Foi realizada a análise do material genético amplificado através de eletroforese em gel de agarose 1% m/v, e visualização sob luz UV após coloração com brometo de etídio. As bandas com o tamanho esperado (~1500 pb) foram cortadas do gel e purificadas com o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, MADISON, WI)”, seguindo as orientações do fabricante. As bandas tratadas foram analisadas em gel de agarose 1% m/v e mensuradas em Nanodrop.

Os *primers* específicos utilizados para amplificar a região 16S rRNA, com o intuito de identificar taxonomicamente as espécies foram o 27F - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (GIOVANNONI, 1991) e 1492R - 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' (LANE, 1991), amplificando uma região de aproximadamente 1500 pb. O *primer* de sequenciamento utilizado foi o 338F 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (LANE, 1991), que se estende da região hipervariável V3 do 16S rRNA.

As regiões amplificadas foram sequenciadas e analisadas pelo programa Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparação com sequências disponíveis e possível identificação das linhagens isoladas. Ressalta-se que mais que uma linhagem bacteriana pode ser compatível com a mesma porcentagem de combinação. As análises foram realizadas no Departamento de Genética da UFSCar, no laboratório do professor Flávio Henrique da Silva.

5.3 Testes de Atividades Antimicrobianas

Para a detecção da capacidade de produção de substâncias com atividade antimicrobiana, foram realizados bioensaios utilizando a metodologia de teste de sobrecamada. Não houve tentativa de quantificar a produção de substâncias antimicrobianas, uma vez que este teste é considerado qualitativo para compostos bioativos de acordo com ROSADO e SELDIN (1993).

5.3.1 Teste de Atividade Antibacteriana

Colônias de cada um dos microrganismos isolados foram diluídas em solução salina (0,85%), e três alíquotas de 10µl foram transferidas para a superfície de placas contendo meio Ágar ISP2. Estas placas foram incubadas por 5 dias à 28 °C. Após o crescimento das colônias, 1mL de clorofórmio foi adicionado na superfície interna da tampa de cada placa para inativação microbiana, com 20 min de tempo de exposição com as placas fechadas. Posteriormente, mais 30 minutos foram utilizados com as placas semiabertas, para eliminação dos resíduos de clorofórmio.

Foram utilizados como microrganismos indicadores *Staphylococcus aureus* ATCC 25922e *Escherichia coli* ATCC-25923, reativados em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”) por 24h e 200µl foram transferidos para tubos contendo 10ml de meio BHI semissólido (ágar [] 0,3%). As soluções preparadas foram vertidas na superfície de placas contendo o endofítico inativado. As placas foram incubadas (37 °C por 24 horas) para verificar a presença ou ausência de halos de inibição (PIZA, HOKKA e SOUSA, 2015).

5.3.2 Teste de Atividade Antifúngica

Os procedimentos utilizados para observação da produção de substâncias com ação antifúngica foram os mesmos procedimentos realizados nos testes para detecção de produção de substâncias com ação antibacteriana. Foi utilizado como microrganismo indicador o fungo leveduriforme *Candida albicans* ATCC 10231, reativados em caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) por 24h à 37 °C. Após o crescimento a levedura foi inoculada (200µl) em 10ml de meio

BHI semissólido (ágar em [] de 0,3%). O meio BHI inoculado foi homogeneizado e depositado na superfície da placa contendo cada um dos microrganismos teste inativados. As placas foram incubadas à 37 °C por 48h e foi observada a formação de halos indicativos da capacidade de inibição (PIZA, HOKKA e SOUSA, 2015).

5.4 Análise da Produção de Ácido Clavulânico

Para verificar a produção de substâncias com ação anti- β -Lactamásica, foi utilizado o método de Bird e colaboradores (1982), para detecção da produção de ácido clavulânico. Amostras provenientes dos cultivos das linhagens isoladas (realizado em meio ISP2, 200rpm, 72h.) foram centrifugadas (rotação de 10.000 X g), filtradas (0.22 μ m) e analisadas em espectrofotométrico a 311nm com prévia reação com uma solução de imidazol de 60g/L, que se baseia na derivatização do ácido clavulânico, como descreve a metodologia citada.

5.5 Avaliação do Perfil de Resistência à Antibióticos

A avaliação da resistência microbiana com linhagens selvagens de microrganismos endofíticos foi realizada como técnica à auxiliar e complementar na identificação das linhagens, devido a características de resistência relatadas na literatura para algumas linhagens. O conhecimento das capacidades de resistência microbiana pode contribuir para estudos da resistência microbiana em linhagens selvagens localizadas longe de ambientes hospitalares, ou seja, sem provável contato com antibióticos que poderiam atuar de maneira seletiva.

O perfil de resistência à antimicrobianos foi obtido utilizando a metodologia de BAUER-KIRBY (BAUER e colaboradores. 1966). As bactérias isoladas foram inoculadas em meio ISP2 líquido, nas condições de cultivo de 28 °C, 200rpm por 24 horas. Após esse tempo, uma amostra de 100 μ l foi inoculada em meio Ágar ISP2, espalhada pela placa de Petri uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. Em seguida foram colocados nas placas, para antibiogramas da marca LABORCLIN[®], contendo os antibióticos para verificar a resistência microbiana. As substâncias do disco antagônicas contra bactérias Gram negativas foram: ampicilina (AMP), cefalotina (CFO), gentamicina (GEN), eritromicina (ERI), sulfazotrim (SUT) e vancomicina (VAN). Os antibióticos contidos no disco contra bactérias Gram negativas foram:

tetraciclina (TET), clorafenicol (CLO), aztreonam (ATM), netilmicina (NET), gentamicina (GEN), amoxicina (AMI).

Após o período de incubação (28 °C por 24h), os halos de inibição foram observados e mensurados. Os microrganismos, independentemente de terem sido identificados como Gram negativos ou positivos, foram testados contra as duas categorias de antibióticos.

5.6 Microrganismos

Foram utilizados neste trabalho 19 bactérias isoladas a partir das folhas das 4 espécies de *Tabebuia* sp., sendo estes 07 isolados de ipê branco (IB1 à IB7), 7 isolados de ipê amarelo (IA1 à IA7), 2 isolados de ipê roxo (IRx1, IRx2 e IRx3) e 3 isolados de ipê rosa (IRs1 e IRS2).

Foi utilizado também 1 microrganismo endofítico, identificado macroscopicamente como um fungo filamentososo, isolado das folhas de *Hymenaea courbaril*.

Como microrganismos teste para os testes antagônicos de crescimento foram utilizadas as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

5.7 Métodos de Preservação

Os estoques de trabalho dos microrganismos foram preparados e preservados em meio Ágar ISP2 (LEE, 2009), em tubo inclinado (slants), armazenados em refrigerador à 4°C pelo período de três meses.

O armazenamento das linhagens por longos períodos (mais de um ano), foi realizado em criotubos estocados em ultrafreezer da marca Forma Scientific®. As células foram suspensas em uma solução de meio de cultura com glicerol a 20% e mantidas a uma temperatura de -80°C.

5.8 Meios de Cultura

Para o isolamento dos microrganismos foi utilizado o meio Ágar ISP2. Este mesmo meio de cultura também foi utilizado para estudo da produção de metabólitos e preservação das

linhagens, uma vez que propiciou crescimento de todos os isolados sem aparentemente prejudicar o desenvolvimento bacteriano.

Foi utilizado para o crescimento das linhagens indicadoras nos bioensaios o meio comercial BHI (*Brain Infusion Heart*), da marca HI-Media. Os demais meios de cultura foram utilizados para verificar a produção enzimática (Meio Amido, e meios para detecção de CMCase e Xilanase estes últimos consistindo no meio ISP2 com os respectivos indutores, CMC e xilano, substituindo a glicose). Para detectar a produção dos pigmentos visualizados no cultivo do fungo endofítico isolado de jatobá, todos os meios encontram-se descritos na Tabela 1. Ressalta-se que para os meios utilizados em estado líquido, a composição foi a mesma, porém não adicionou-se a concentração correspondente de Ágar.

Tabela 1: Composição dos meios de cultura, componentes e suas respectivas concentrações

Componentes do meio em g/l	MEA	ISP2	Meio Amido	Malte 2%	CYA	DG18	CZAPEK
Glicose	20,0	4,0				10	
Extr. de Levedura		4,0	2,0		5,0		5,0
Extr. de Malte	20,0	10		20,0			
Amido solúvel			10,0				
Peptona	1,0		5,0			5,0	
MgSO ₄			0,5			0,5	0,050
NaCl			0,5				
CaCl ₂			0,15				
Sacarose							30,0
FeSO ₄							0,001
NaNO ₃							0,3
KCl							0,5
CuSO ₄						0,005	0,0005
ZnSO ₄						0,01	0,001
HCl							
K ₂ HPO ₄					1,0	1,0	1,0

Solução Metálica					1,0		
Conc. de Czapek					10,0		
Dichloran						0,002	
Chlortetracycline						0,05	
Chloramphenicol						0,05	
Ágar Bacteriológico	20,0	20,0	10,0	15,0	15,0	15	15
pH	5,8	7,0	7,0	7,0	5,2	5,6	7,3

Fonte: Autor

***Solução de traços metálicos:** 4.36 g Na₂ EDTA • 2H₂O e 3.15 g FeCl₃ 6 H₂O em 900 mL de água destilada.

Os meios de cultura PDA e Sabouraud utilizados foram meios comerciais obtidos da marca HI-Media, com a composição:

***PDA:** 4,0 g/L de Extrato de batata, 20 g/L de dextrose, 15,0 g/L de ágar

***Sabouraud:** 10,0 g/L de neopeptona, 40,0 g/L de dextrose e 2,0 g/L.

5.9 Determinação da Concentração de Células

Foi determinada a concentração celular (Cx) das linhagens *P. terrae* e *P. minioluteum*/T. *minioluteus* em cultivos em shaker. A Cx foi obtida através do processo de avaliação da massa seca resultante dos cultivos. Durante os cultivos foram retiradas amostras de volume conhecido (V) estabelecido em 20ml. As amostras foram centrifugadas nas condições de 12.000 g, a 4 °C, por 15 min., para promover a precipitação celular. O precipitado foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. Foi utilizada a centrífuga da marca Eppendorf, rotor com suporte para 6 tubos.

Após os procedimentos preparatórios descritos, a massa final obtida foi colocada em estufa a temperatura de 60 °C durante 24h em um recipiente de massa conhecida (m₁). A massa do conjunto após secagem foi determinada (m₂), possibilitando a determinação da concentração celular com a aplicação da Equação 1.

$$Cx = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

Equação 1: Determinação da Massa Celular.

5.10 Determinação da Concentração de Açúcares

As concentrações de glicose e maltose do meio ISP2 provenientes do ensaio em shaker foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna Shodex KS-802 (Lonpak, divisão da Millipore) e água ultra pura (Milli-Q) como eluente. O equipamento foi operado nas seguintes condições: 80°C, 1 mL.min⁻¹. Os picos foram detectados no medidor do índice de refração W410 (Waters). A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão do composto a ser analisado, com concentrações 4g.L⁻¹ de glicose e 10g.L⁻¹ de maltose, açúcar mais encontrado no extrato de malte.

5.11 Método de Análise da Produção de Amilases

Para avaliação da atividade enzimática, os isolados foram incubados em meio Amido líquido (descrito na Tabela 1) por 24 horas, em seguida, inoculou-se 10µl do caldo de cultivo em meio Ágar Amido, em três pontos equidistante da placa de Petri (28°C por 72 horas). A leitura foi realizada macroscopicamente e os isolados que apresentaram halos claros, indicativos de degradação do amido, ao redor da colônia foram considerados positivos para a produção de amilase.

As medições do diâmetro dos halos produzidos foram realizadas com um paquímetro. A atividade amilásica foi realizada segundo a metodologia descrita por HANKIN E ANAGNOSTAKIS (1975).

5.12 Análise da Atividade da Produção de Xilanase

Para tentativa de obtenção da enzima xilanase, foi realizado cultivo em shaker (200 rpm, 28 °C por 72 horas). Ao final, o caldo de cultivo foi centrifugado (12000 g por 15 minutos) e o sobrenadante do caldo do cultivo de cada um dos isolados foi utilizado.

A atividade da xilanase foi determinada com a dosagem dos açúcares redutores liberados do substrato (xilano em solução de 10 mg/mL), usando o ácido-dinitro-salicílico, em uma adaptação da metodologia de MILLER (1959) de análise com ADNS.

Foram colocados para reação 10 µl de enzima e 90 µl da solução de xilano em tampão com pH 5 para a enzima. A mistura enzima-substrato foi incubada por 5 minutos, à 55 °C. Para parar a reação foram adicionados 100 µl de ADNS em temperatura de 100 °C de por 5 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro e foi utilizado o comprimento de onda de 540 nm.

Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como uma reação de enzima 1 µ mole de redução de açúcar de xilano por minuto nas condições citadas (LI e colaboradores, 2006 e BAILEY e colaboradores 2006).

5.13 Análise da Produção de Celulases

Para tentativa de observação da atividade da enzima CMCase, seguiram-se os mesmos procedimentos realizados para detecção de xilanase. Foi realizado cultivo em shaker (200 rpm, 28 °C por 72 horas), o caldo de cultivo foi centrifugado (12000 g por 15 minutos) e o sobrenadante do caldo do cultivo de cada um dos isolados foi utilizado.

A atividade da CMCase foi determinada com a dosagem dos açúcares redutores liberados do substrato (CMC em solução de 10 mg/mL), usando o ácido-dinitro-salicílico, em uma adaptação da metodologia de MILLER (1959) de análise com ADNS.

Foram colocados para reação 10 µl de enzima e 90 µl da solução de CMC em tampão com pH 5 para a enzima. A mistura enzima-substrato foi incubada por 5 minutos, à 55 °C. Para parar a reação foram adicionados 100 µl de ADNS em temperatura de 100 °C de por 5 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro e foi utilizado o comprimento de onda de 540 nm.

Uma unidade de atividade de CMCase foi definida como uma reação de enzima 1 µ mole de redução de açúcar de CMC por minuto nas condições citadas (LI, *et.al*, 2006).

5.14 Análise do pH

O pH dos meios de cultura e dos caldos de cultivo foram medidos utilizando pHmetro de bancada da marca Orion YSP310.

5.15 Métodos de Cultivo em Mesa Incubadora Rotativa

Para os cultivos em mesa incubadora rotativa (shaker), foi utilizado um volume de trabalho de 50 mL para a propagação em frascos erlenmeyers com capacidade para 500 mL. As condições de cultivo em mesa incubadora de agitação orbital foram de 200 rpm e temperatura de 28 °C com um tempo de cultivo de 72 horas (GUIMARÃES, 2005), para as bactérias e 96 horas para o fungo. No cultivo de *P. terrae* (IB1/2) e *P. minioluteum*/*T. minioluteus* (FJ1) foram retiradas amostras para análise da concentração celular, de substrato residual e análise de substâncias de interesse a cada 8h.

Os cultivos foram realizados em mesa incubadora rotativa da marca New Brunswick Scientific Inc. Modelo G25, com controle de temperatura e agitação.

5.16 Métodos de Separação dos Compostos

Para tentativa de separação dos compostos optou-se pelo processo de separação líquido-líquido. Primeiramente foi realizada a separação com acetato de etila, para isso foram utilizados 100 ml do caldo bruto, previamente centrifugado e filtrado, e 100 ml de acetato de etila.

Foi utilizado um funil para separação, a mistura foi invertida 3 vezes. Após decorrido o tempo de 20 minutos para recolher separadamente as fases formadas. A fase de baixo (extrato aquoso ou fase aquosa) foi coletada. O procedimento foi repetido mais 2 vezes, utilizando para isso o extrato aquoso e igual volume de acetato de etila, enquanto a fase de cima de cada processo de separação foi guardada para secagem.

Após as 3 separações utilizando acetato de etila, iniciou-se com a fase aquosa a separação com N-Butanol. Para este procedimento utiliza-se 100 ml do extrato aquoso tratado (proveniente

do caldo bruto centrifugado, filtrado e separado com acetato de etila três vezes), e 100 ml de N-Butanol.

Assim como realizado com acetato de etila, foi utilizado funil para separação, a mistura de N-Butanol e extrato aquoso foi invertida 3 vezes. Após espera de cerca de 20 minutos as fases formadas foram recolhidas separadamente. A fase de baixo (extrato aquoso) foi coletada. O procedimento foi repetido mais 2 vezes, utilizando para isso o extrato aquoso e igual volume de butanol, enquanto a fase de cima de cada processo de tentativa de separação foi guardada para secagem.

5.17 Métodos de Detecção de Atividade Citotóxica

Nos experimentos para detecção de atividade antitumoral realizados com o caldo resultante dos cultivos em shaker das linhagens *P. terrae* (IB1/2) e *P. minioluteum/T. minioluteus* (FJ1) coletadas no tempo de cultivo de 72h.

Os caldos obtidos de cultivos em skaker dos dois microrganismos após o termino do cultivo foram centrifugados para a remoção das células. O sobrenadante obtido foi seco em “Spped-Vac” e enviado para o Laboratório de Oncologia Experimental da UFC em Fortaleza para a determinação das atividades citotóxicas. Foram utilizadas as seguintes células para análise: SF-295 (Sistema Nervoso Central), HCT-8 (Cólon) e MDA-MB435 (Melanoma). Detalhes da metodologia estão descritos no Anexo III.

5.18 Métodos de Detecção de Atividade Anti-Leishmania

Foi utilizado o caldo de cultivo obtido com o cultivo do microrganismo *P. terrae* (IB1/IB2). O caldo obtido de cultivo em shaker do microrganismo após o termino do cultivo foi centrifugado para a remoção das células. O sobrenadante obtido foi seco em “Spped-Vac” e enviado para o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Morfologia e Parasitologia (DMP) da UFSCar.

A metodologia utilizou 100 µL do extrato bruto (com concentração de 500 a 31,25 µg/mL), e 10µL de parasitos (em concentração de $6,3 \times 10^4$). Controle positivo: Glucantime® e controle negativo com cultura das formas promastigotas em meio 199 completo. A Contagem do

número total de promastigotas vivas, após 24h de incubação a 26 °C, em câmara de Neubauer em aumento de 400X em Triplicata (Anexo VII).

5.19 Análises para Identificação do Pigmento

Foi escolhido para identificação o pigmento vermelho produzido pelo fungo isolado devido a quantidade aparente de substância secretada. Não foram encontrados trabalhos com estudo da aplicação e identificação de pigmento e produção com esse microrganismo.

O caldo de cultivo (ISP2, 72 h, 28 °C, 200 rpm) contendo o pigmento vermelho, foi submetido a uma partição líquido-líquido com ACoEt: H₂O (1:1 v/v) na tentativa de identificar o constituinte responsável pela coloração. Para esse experimento de determinação foi utilizado somente a fase aquosa do caldo de *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* na qual o pigmento foi encontrado.

Primeiramente foram analisadas por CLAE-UV utilizando uma coluna PHENOMENEX Phenyl-Hexyl 5 μ 100A 250x4,6 mm PART NUMBER 00G-4257-E0 S/No 376691-3, em fase normal. Equipamento: SHIMADZU LC-10AD com um detector de ultravioleta SCL-10A (SHIMADZU).

As condições de análise utilizadas: Fluxo: 1,0 mL/min.; Volume de injeção: 10 μ L; UV: 190-800 nm / monitorado: 210 e 504 nm (corante máximo); Meio de cultura: ISP2; Fungo (FJ1): *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus*.

Foram realizados dois métodos cromatográficos:

1° metodologia-A:B (H₂O: ACN), variando a porcentagem de B

%B	Tempo
50	0.01
50	25.00
100	28.00
100	38.00
50	40.00 (para limpeza da coluna)

2º metodologia –A:B (H₂O:MeOH), variando a porcentagem de B

%B	Tempo
5	0.01
5	10.00
100	20.00
100	30.00
5	32.00 (limpeza da coluna)

Em seguida, os cromatogramas foram processados através do software SHIMADZU CLASS-VP.

Também foi realizada a extração do ágar foi realizada através do corte de 6 plugs da placa do microrganismo com o auxílio de um fura rolha com diâmetro interno de 1 cm e extração em banho de ultrassom por 60 minutos com 6 mL de mistura de metanol-diclorometano-acetato de etila 1:2:3 em tubo cônico de 15 mL. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, filtrada com algodão e transferida para frasco limpo. O extrato foi deixado em capela para evaporação dos solventes e armazenado a -20 °C até o momento da análise.

Também foi possível coletar o exsudato do microrganismo através de pipetagem direta das gotículas vermelhas e alaranjadas formadas em cima do micélio. Estas amostras foram colocadas em tubos cônicos de volume de 2 ml e armazenadas a -20 °C até o momento da análise.

6 Resultados

Os experimentos qualitativos foram realizados com todos os microrganismos isolados para possibilitar a seleção das linhagens com capacidades diferenciadas e/ou inéditas para aplicações biotecnológicas.

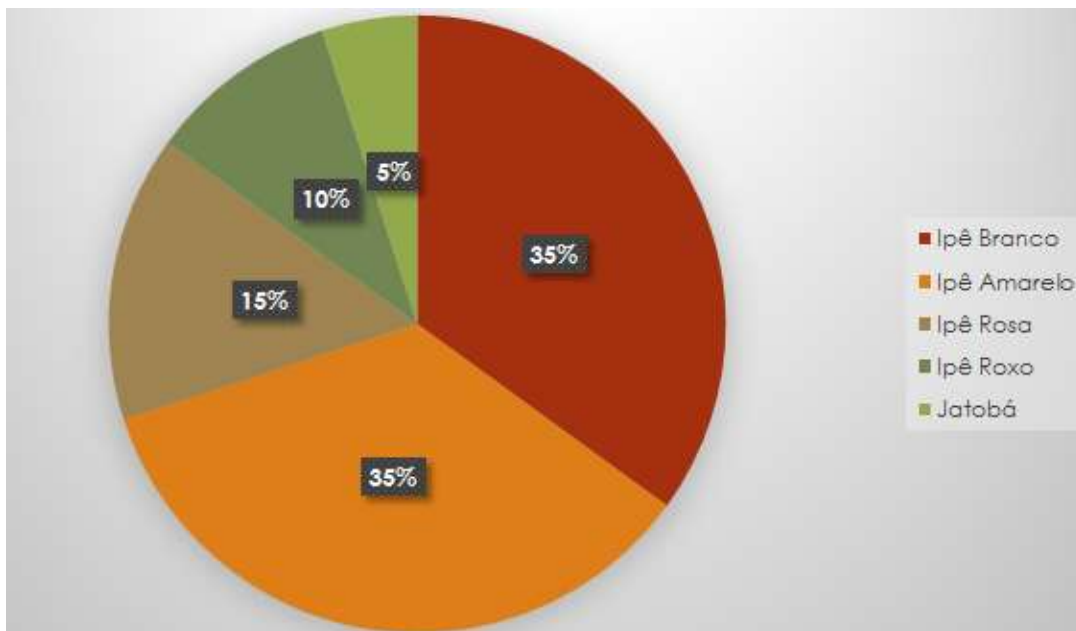
6.1 Microrganismos Isolados

Foram isolados das folhas das 5 espécies arbóreas 20 microrganismos que diferiam entre si em morfologia macroscópica das colônias, de maneira que:

- 7 microrganismos foram isolados das folhas de Ipê Branco, denominados antes da identificação como IB1, IB2, IB3, IB4, IB5, IB6 e IB7.
- 3 microrganismos foram isolados das folhas de Ipê Rosa denominados antes da identificação como IRs1, IRs2 e IRs3.
- 2 microrganismos foram isolados das folhas de Ipê Roxo denominados antes da identificação como IRx1 e IRx2.
- 7 microrganismos foram isolados das folhas de Ipê Amarelo, denominados antes da identificação como IA1, IA2, IA3, IA4, IA5, IA6 e IA7.
- 1 microrganismo foi isolado das folhas de Jatobá, denominado antes da identificação como FJ1.

A porcentagem de quantos microrganismos foram isolados de cada espécie arbórea encontra-se representada na Figura 8. Observa-se que, uma vez isolados, os microrganismos foram preservados conforme descrito no item 5.7.

Figura 8: Porcentagem de microrganismos isolados de cada uma das cinco espécies arbóreas.



Fonte: Autor.

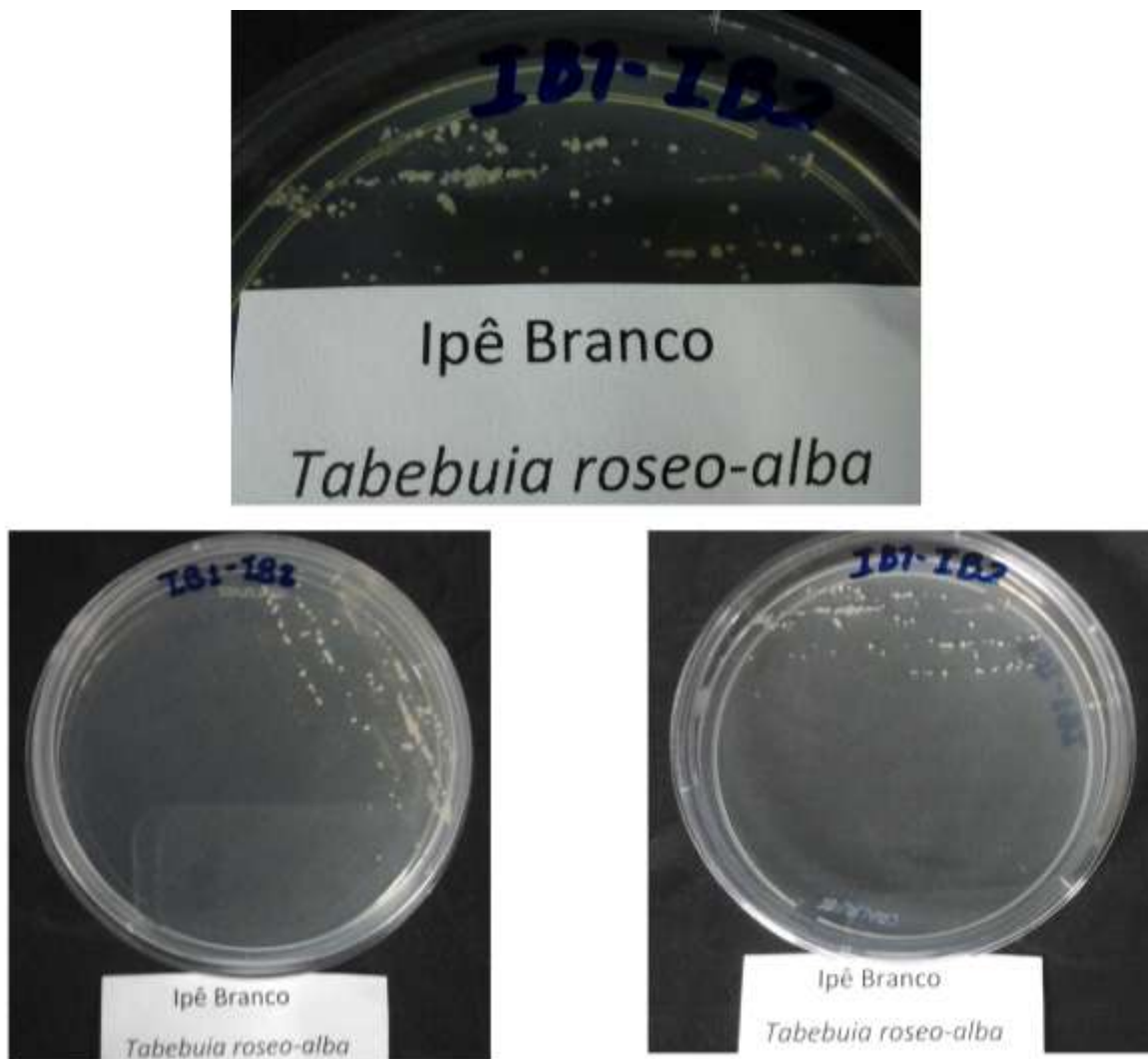
6.1.1 Características Fenotípicas e Morfológicas em Meio ISP2.

Todos os isolados dos quatro exemplares de ipês e do espécime de jatobá, tiveram suas devidas características descritas. Para essa finalidade o crescimento se deu em meio Ágar ISP2 com incubação pelo período de 10 dias em temperatura de 28 °C.

6.1.1 a) Microrganismos Isolados das Folhas de Ipê Branco

- IB1 colônias leitosas, brancas no centro, com as bordas irregulares e transparentes, superfície rugosa, colônias de 1,5mm à 2,5mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 9).
- IB2 colônias leitosas, beges no centro, com as bordas irregulares e esbranquiçadas, superfície rugosa, colônias de 1mm à 3,5mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo. A linhagem denominada IB2 apesar de apresentar colônias macroscopicamente diferenciadas das colônias de IB1, mostraram-se idênticas após 15 dias de crescimento em placa, sugerindo assim que IB1 e IB2 poderiam ser a mesma bactéria (Figura 9).

Figura 9: Cultivo em meio sólido de IB1/2, isolado das folhas de Ipê Branco



Fonte: Autor

- IB3 colônias cremosas, brancas, com as bordas lisas, superfície irregular, colônias de 1mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 10).

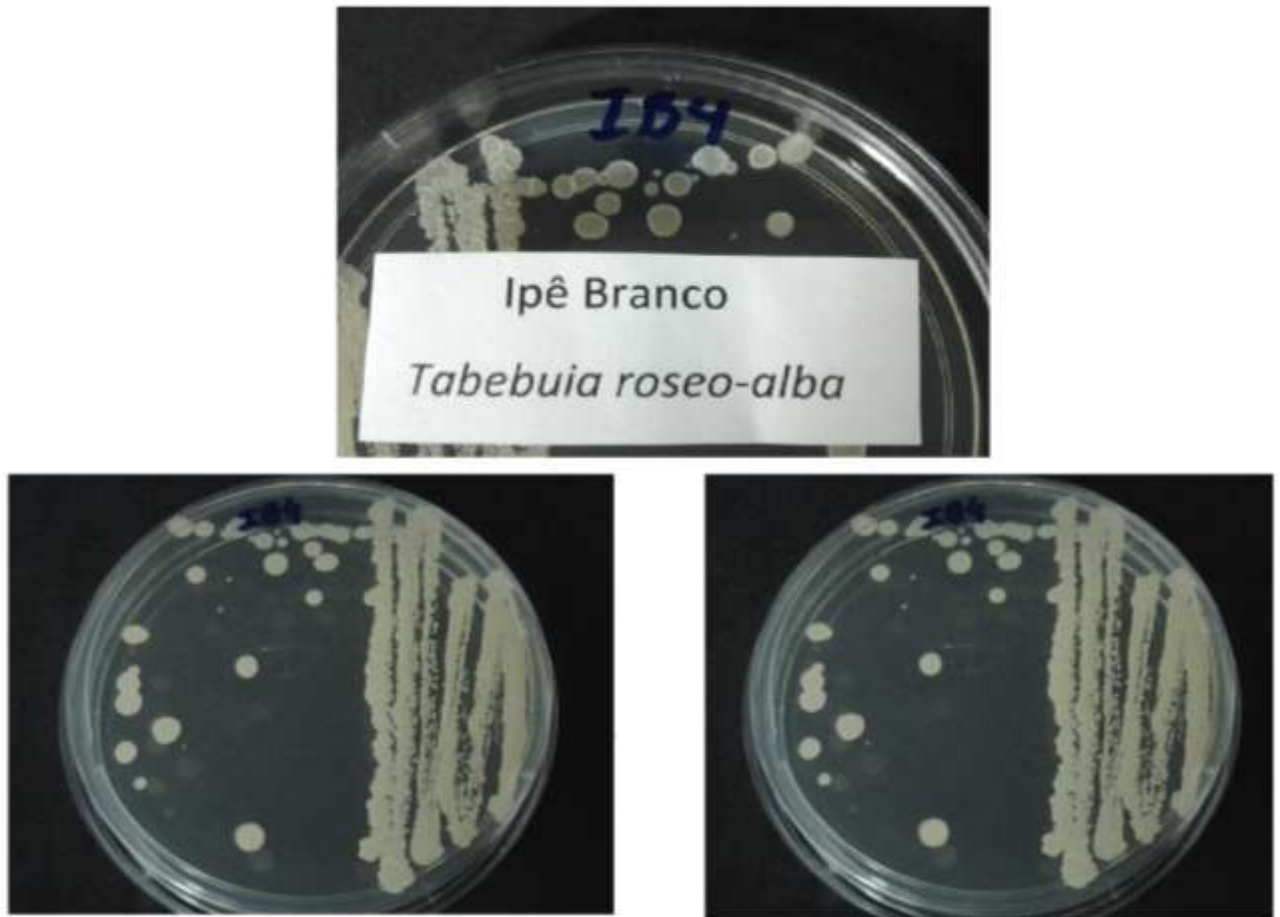
Figura 10: Cultivo em meio sólido de IB3, isolado das folhas de Ipê Branco



Fonte: Autor

- IB4 colônias brancas, com as bordas lisas, superfície rugosa, colônias de 2mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 11).

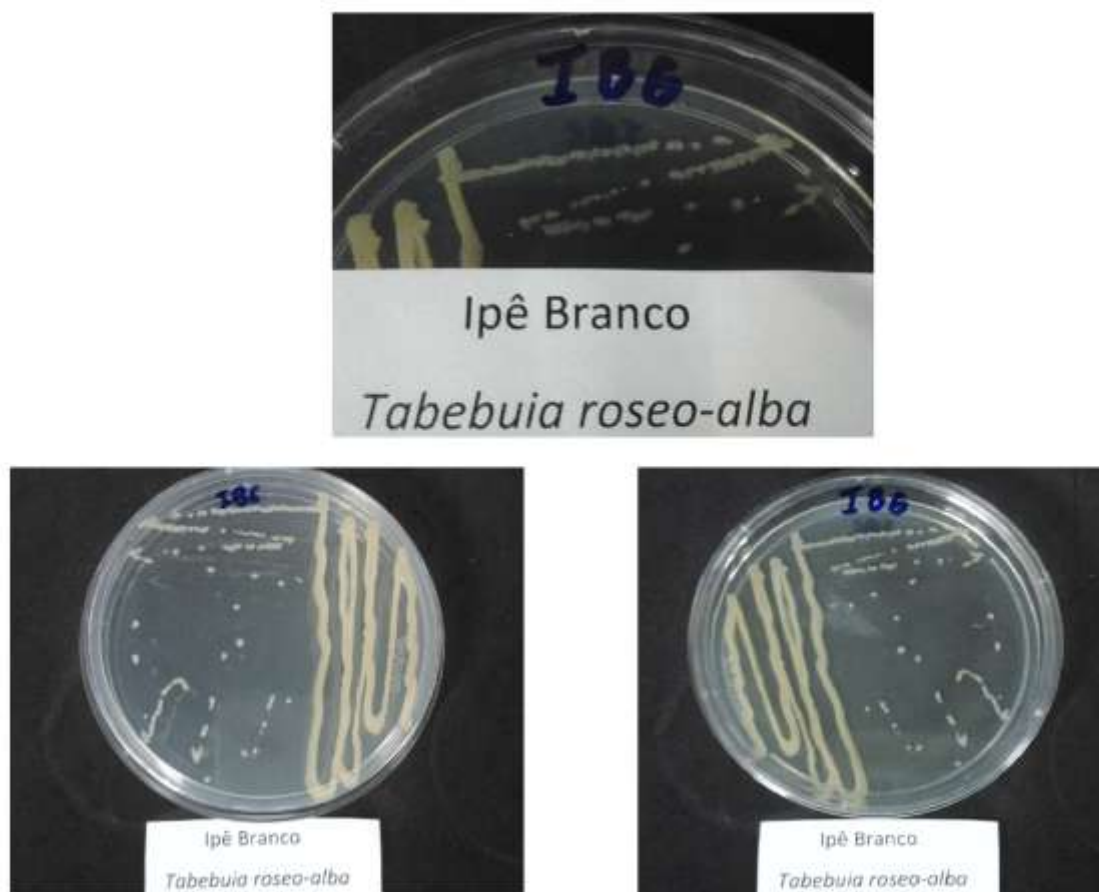
Figura 11: Cultivo em meio sólido de IB4, isolado das folhas de Ipê Branco



Fonte: Autor

- IB5 colônias brilhantes, amarelas, com as bordas lisas, superfície lisa, colônias convexas de 0,5mm à 1mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo, essa bactéria demonstrou com crescimento também em meio Ágar Sal Manitol.
- IB6 colônias bege-amareladas, brilhantes, com as bordas lisas, superfície lisa, convexa, colônias de 1mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 12).

Figura 12: Cultivo em meio sólido de IB6, isolado das folhas de Ipê Branco



Fonte: Autor

- IB7 colônias brancas, brilhantes, com as bordas lisas, colônias de 0,5mm à 1mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 13).

Figura 13: Cultivo em meio sólido de IB7, isolado das folhas de Ipê Branco

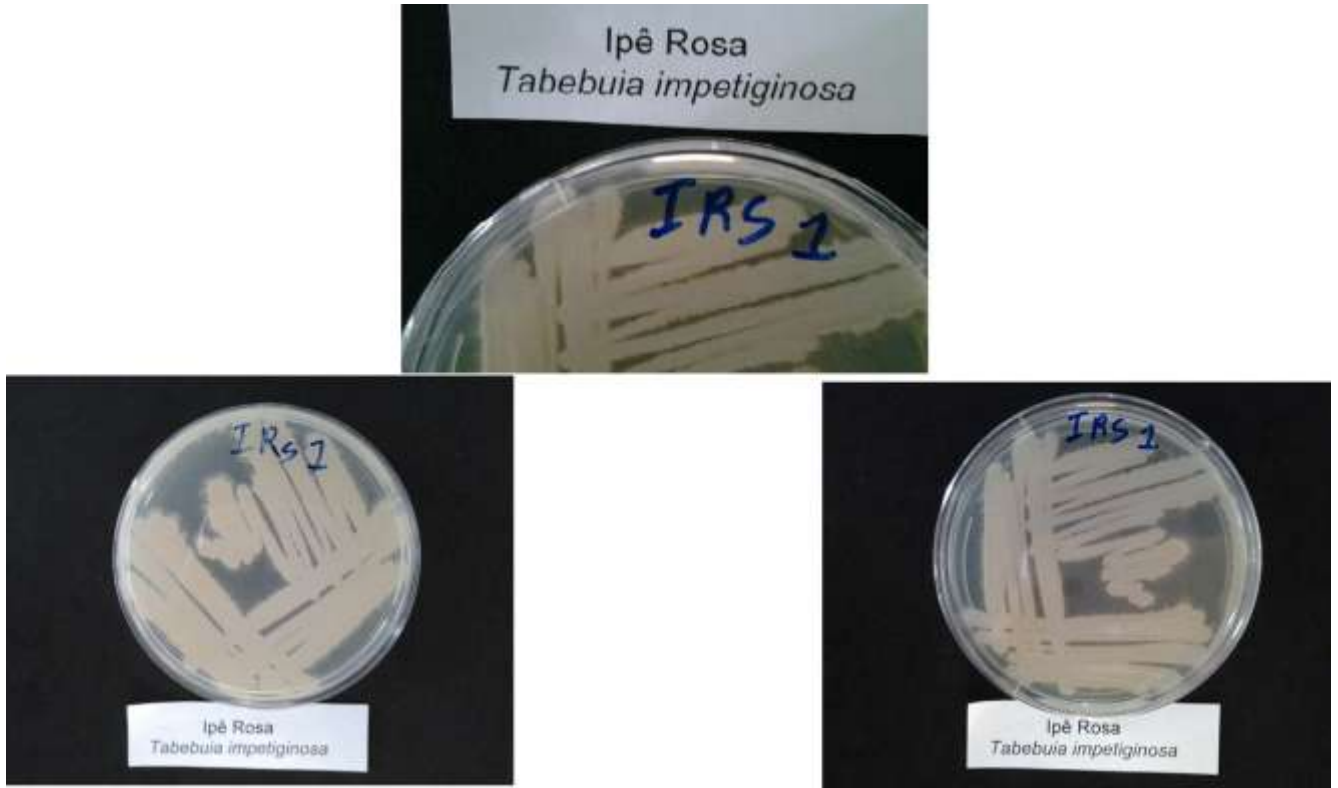


Fonte: Autor

6.1.1 b) Microrganismos Isolados das Folhas de Ipê Rosa:

- IRs1 colônias brancas leitosas, com as bordas lisas e transparentes, superfície lisa, colônias de 0,6mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 14).

Figura 14: Cultivo em meio sólido de IRs1, isolado das folhas de Ipê Rosa



Fonte: Autor

- IRs2 colônias bege-claras brilhantes, com as bordas lisas, superfície lisa, colônias de 1,5mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 15).

Figura 15: Cultivo em meio sólido de IRs2, isolado das folhas de Ipê Rosa



Fonte: Autor

- IRs3 colônias brancas sem brilho, com as bordas rugosas mais claras, superfície rugosa, colônias de 1mm à 4mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 16).

Figura 16: Cultivo em meio sólido de IRS3, isolado das folhas de Ipê Rosa



Fonte: Autor

6.1.1 c) Microrganismos Isolados de Ipê Roxo:

- IRx1 colônias brancas, com as bordas lisas com alguma transparência, superfície lisa convexa, colônias de 1mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 17).

Figura 17: Cultivo em meio sólido de IRx1, isolado das folhas de Ipê Roxo



Fonte: Autor

- IRx2 colônias beges leitosas tornando-se brancas após uma semana de cultivo (podendo ser esporos), com as bordas lisas, superfície lisa tornando-se rugosa após a primeira semana de crescimento, colônias de 0,8mm à 3mm, sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 18).

Figura 18: Cultivo em meio sólido de IRx2, isolado das folhas de Ipê Roxo



Fonte: Autor

6.1.1 d) Microrganismos Isolados de Ipê Amarelo:

- IA1 colônias leitosas, esbranquiçadas, com as bordas lisas, superfície lisa, colônias de 1,0mm à 1,5mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 19).

Figura 19: Cultivo em meio sólido de IA1, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA2 Colônias beges leitosas, com as bordas lisas e superfície lisa, colônias de 1,0mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 20).

Figura 20: Cultivo em meio sólido de IA2, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA3 branca leitosa, com as bordas lisas e superfície lisa, colônias de 1,0mm à 2,0mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 21).

Figura 21: Cultivo em meio sólido de IA3, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA4 Brancas brilhantes, com as bordas lisas e superfície convexa (e rugosas), colônias de 1,0mm à 1,5mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 22).

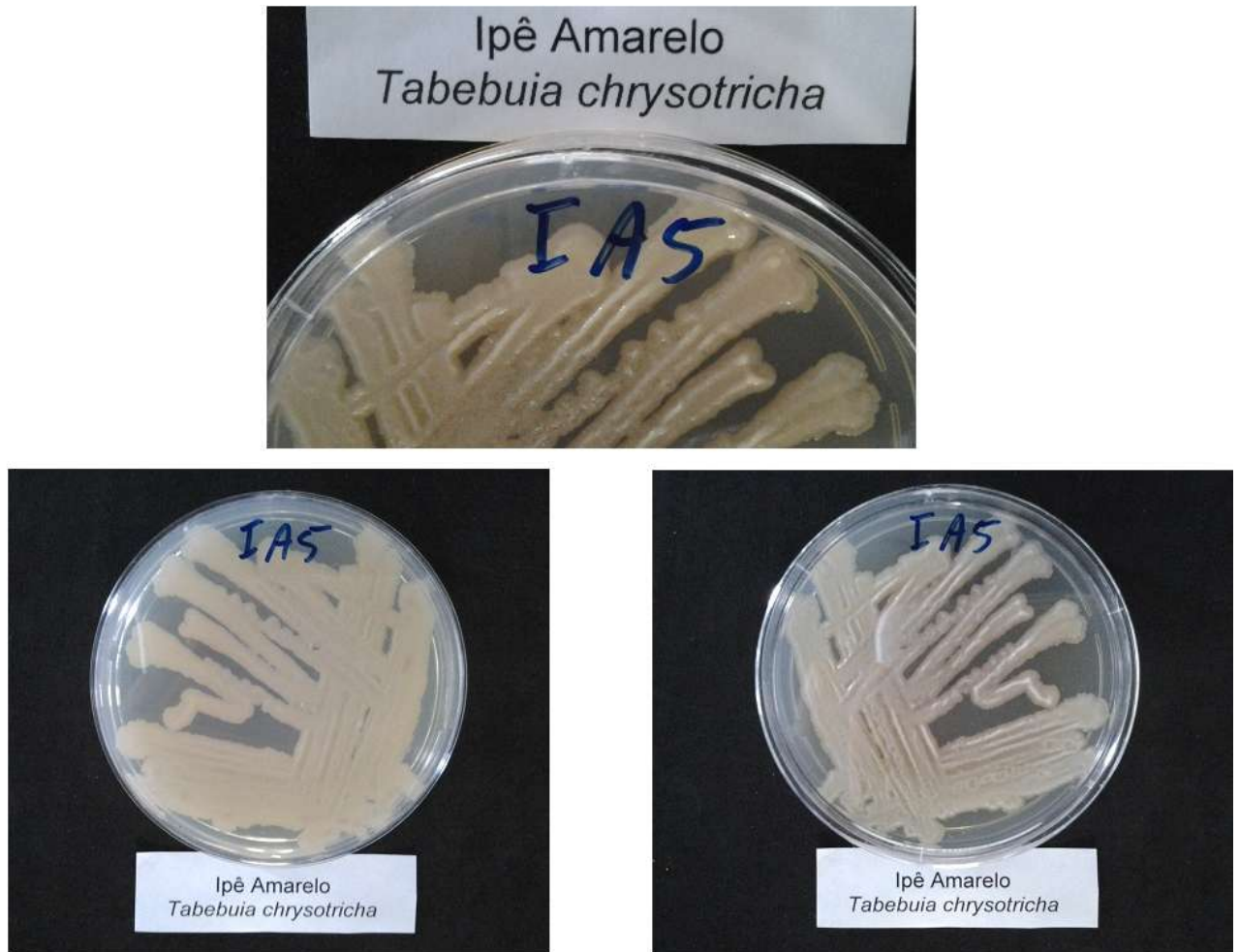
Figura 22: Cultivo em meio sólido de IA4, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA5 Brancas brilhantes, com as bordas lisas e superfície convexa, colônias de 1,0mm à 3mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (
- Figura 23).

Figura 23: Cultivo em meio sólido de IA5, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA6 Bege amareladas, com as bordas lisas, superfície convexa, colônias de 1,0mm à 2,0mm, aparentemente produtora de esporos (brancos). Produção de substância viscosa e amarelada nesse meio de cultivo (Figura 24).

Figura 24: Cultivo em meio sólido de IA6, isolado das folhas de Ipê amarelo



Fonte: Autor

- IA7 branca opaca, com as bordas rugosas, superfície lisa, colônias de 1,0mm à 2,0mm. Sem aparente produção de pigmento nesse meio de cultivo (Figura 25).

Figura 25: Cultivo em meio sólido de IA7, isolado das folhas de Ipê amarelo

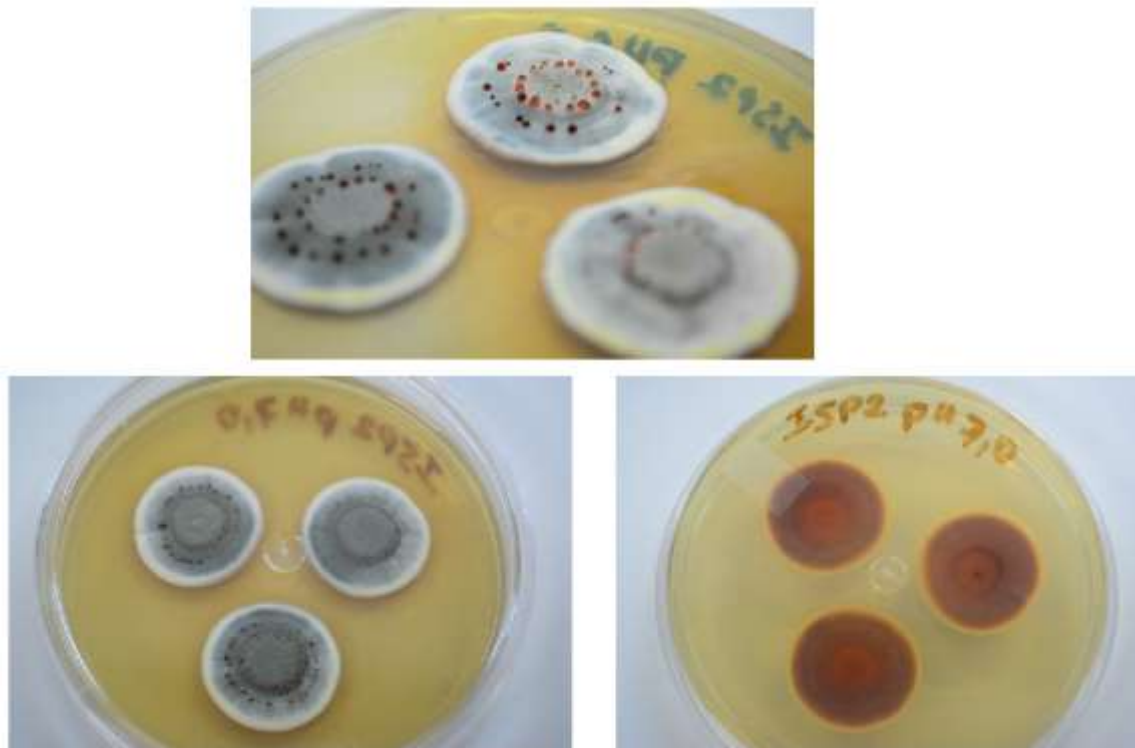


Fonte: Autor

6.1.1 e) Microrganismo Isolado de Jatobá:

- FJ1 Fungo produtor de esporos, colônias inicialmente brancas, na fase em que esporulam as colônias tornam-se verdes. Colônias com bordas lisas, superfície convexa, medindo de 1mm à 1cm. Produtor de pigmento vermelho em meio ISP2 (Figura 26).

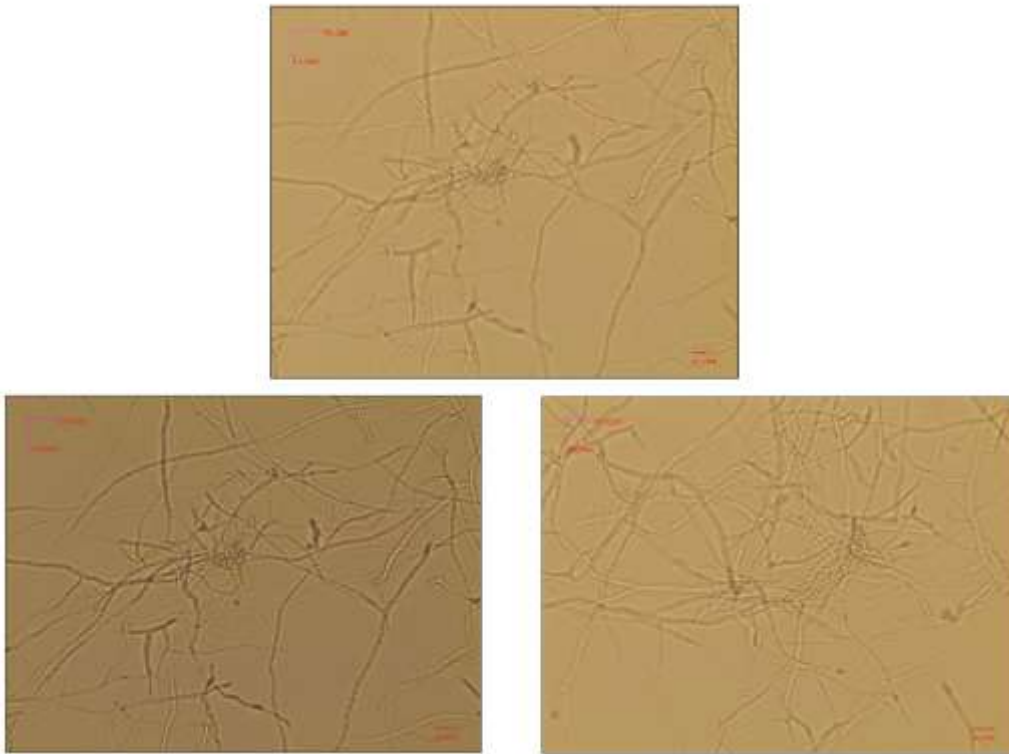
Figura 26: Cultivo em meio sólido de IJ1, isolado das folhas de Jatobá



Fonte: Autor

Também foram feitas fotos com o uso de microscopia do fungo isolado, para colaborar na tentativa de identificação primária do microrganismo (Figura 27). O aumento utilizado foi de 400 vezes.

Figura 27: Microscopia com aumento de 400 vezes de IJ1 das folhas de jatobá.



Fonte: Autor

O aumento de 400 vezes possibilitou a observação de características das hifas do fungo isolado e demais características microscópicas pertinentes a identificação da linhagem.

6.1.2 Características Morfotintoriais

Os testes de coloração de Gram foram realizados em triplicata para conferir maior confiabilidade aos resultados, uma vez que todas as bactérias isoladas das folhas das quatro espécies de *Tabebuia* foram caracterizadas como microrganismos Gram positivos.

6.1.3 Identificação dos Isolados por Análise do 16S RNA

A identificação genética dos microrganismos isolados foi realizada mediante ampliação e sequenciamento da região 16s RNA. Algumas bactérias puderam ser amplificadas sem a extração do material genético (amplificação direta), essas bactérias foram: IB3, IB5, IB7, IA2, IA3, IRs2,

IRx1 e IRx2. As demais linhagens só puderam ter seu material genético amplificado mediante a extração do mesmo.

Após extração do material genético (quando necessário) e a aplicação da técnica de PCR foram obtidas as sequências da porção 16S do RNA dos isolados que se encontram descritas no Anexo II.

As sequências de DNA bacteriano para identificação foram analisadas através do programa Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), possibilitando a comparação com o banco de dados. Os gêneros e espécies indicados pelo programa seguem descritas com suas respectivas porcentagens de similaridade na Tabela 2.

Encontra-se também na Tabela 2 a identificação do Fungo endofítico FJ1. Ressalta-se que o fungo isolado das folhas de *Hymenaea courbaril*, foi identificado inicialmente como um *Penicillium* spp. devido a suas características macroscópicas e produção de pigmentos. Dentre as características apresentadas, as colônias fúngicas apresentaram crescimento rápido, inicialmente de coloração esbranquiçada assumindo depois de 48/72 horas de crescimento tom verde-oliva, sendo o reverso da colônia de coloração amarelada. Microscopicamente foram observadas hifas septadas e organização das fiáldes na ponta de conidióforos na forma de característica conhecida como penicilli (pincel), típico do gênero.

A identificação do material genético não foi realizada juntamente a das bactérias, devido a necessidade de primers específicos para mais de uma região do DNA fúngico, dessa maneira foi contatado o laboratório CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) para essa análise. Após identificação genética da linhagem isolada, constatou-se que se tratava de *Talaromyces minioluteus*, que encontra-se em fase de reclassificação e, assim como diversas espécies de *Talaromyces*, recebe o nome de *Penicillium*, neste caso *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (Figura 28) o processo adotado pelo CPQBA segue descrito no Anexo IV. Esses resultados de identificação foram confirmados em parceria com o laboratório da UFLA (Universidade Federal de Lavras), como pode ser observado no Anexo V.

Figura 28: Produção de pigmentos vermelhos em meio ISP2 durante a fase de isolamento do FJ1.



Fonte: Autor

Tabela 2: Gêneros e espécies com respectivo percentual de combinação das sequências de nucleotídeos sequenciados por meio da análise da região de RNA 16s

Isolado –RNA 16S	Ez-Taxon	% Similaridade
IB1	<i>Paenibacillus terrae</i>	99,45
IB2	<i>Paenibacillus terrae</i>	100
IB3	<i>Bacillus safensis</i>	98,58
	<i>Bacillus pumilus</i>	98,58
IB4	<i>Bacillus flexus</i>	99,81
	<i>Bacillus megaterium</i>	99,81
IB5	<i>Staphylococcus aureus subsp. Aureus</i>	99,76
	<i>Staphylococcus simiae</i>	99,76
	<i>Staphylococcus aureus subsp. Anaerobius</i>	99,76

IB6	<i>Bacillus safensis</i>	100
	<i>Bacillus pumilus</i>	100
IB7	<i>Bacillus safensis</i>	99,81
	<i>Bacillus pumilus</i>	99,81
IA1	<i>Bacillus safensis</i>	100
	<i>Bacillus pumilus</i>	100
IA2	<i>Bacillus safensis</i>	99,65
	<i>Bacillus pumilus</i>	99,65
IA3	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
	<i>Bacillus mycoides</i>	100
	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	100
	<i>Bacillus anthracis</i>	100
	<i>Bacillus cereus</i>	100
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	100
IA4	<i>Bacillus flexus</i>	99,14
	<i>Bacillus megaterium</i>	99,14
IA5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99,76
IA6	<i>Pantoea vagans</i>	100
	<i>Pantoea brenneri</i>	100
IA7	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	99,48
	<i>Bacillus anthracis</i>	99,48
	<i>Bacillus mycoides</i>	99,48
	<i>Bacillus gaemokensis</i>	99,48
	<i>Bacillus cereus</i>	99,48

	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,48
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99,48
IRX1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98,98
	<i>Bacillus mycoides</i>	98,98
	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	98,98
	<i>Bacillus anthracis</i>	98,98
	<i>Bacillus cereus</i>	98,98
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	98,98
IRX2	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	99,01
	<i>Bacillus anthracis</i>	99,01
	<i>Bacillus mycoides</i>	99,01
	<i>Bacillus cereus</i>	99,01
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99,01
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,01
IRS1	<i>Bacillus pseudomycooides</i>	99,66
	<i>Bacillus anthracis</i>	99,66
	<i>Bacillus mycoides</i>	99,66
	<i>Bacillus gaemokensis</i>	99,66
	<i>Bacillus cereus</i>	99,66
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99,66
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99,66
IRS2	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	99,69
IRS3	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99,34
FJ1	<i>T. minioluteum/P. minioluteus</i>	100

Fonte: Autor

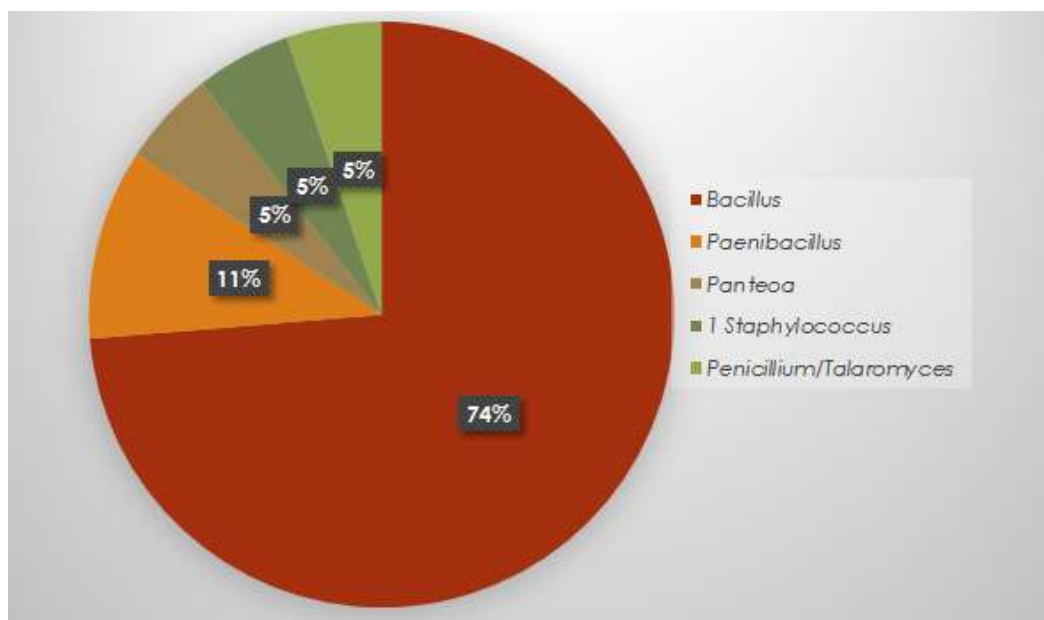
As linhagens que apresentaram alguma atividade considerada de interesse, seja pela quantidade aparente de produto ou pela ampla ação dos mesmos, foram buscados na literatura de acordo com suas características de produção, resistência a antibióticos e morfologia, possibilitando uma maior certeza sobre qual linhagem foi isolada.

A linhagem IB5 foi identificada como pertencente ao gênero *Staphylococcus*. Uma vez que esse gênero é conhecido como um agente contaminante comum esta linhagem foi armazenada porém, observa-se que após busca na literatura, foi encontrado registro deste gênero isolado como Endofítico, isolado por AZEVEDO e colaboradores. (2000).

Espécies de *Penicillium/Talaromyces* são conhecidas por sua capacidade de produção de pigmentos vermelhos, porém não possuem muitas aplicações biotecnológicas devido ao fato que também produzem micototoxinas que inviabilizam sua aplicação em indústrias como as de alimentos.

Observa-se que foram identificadas 19 bactérias isoladas, sendo que 15 pertenciam ao gênero *Bacillus* spp., duas foram *Paenibacillus* spp. e uma bactéria pertencia ao gênero *Pantoea* spp. demonstrando assim a microdiversidade bacteriana presentes em quatro espécies de *Tabebuia* a porcentagem das espécies isoladas, incluindo a *H. courbaril* encontra-se ilustrada na Figura 29.

Figura 29: Porcentagem das espécies isoladas das folhas das 4 espécies de *Tabebuia* sp. e da *Hymenaea courbaril*.



Fonte: Autor.

O gênero *Bacillus* foi o mais encontrado nos isolamentos deste trabalho. Durante a fase de identificação através da análise de RNA 16s, alguns microrganismos foram compatíveis com mais de uma linhagem disponível nos bancos de dados com mais de 97% de semelhança, não possibilitando que a identificação ocorresse até o nível de espécie. Esse fato porém merece maior atenção, uma vez que pode indicar mutação ou mesmo novas espécies bacterianas.

As bactérias IB1 e IB2, apesar de aparentemente diferentes no isolamento inicial, foram identificadas como a mesma bactéria *Paenibacillus terrae*, que juntamente com o *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1), foram as linhagens que mais se destacaram uma na produção de bioativos e outra por produção de pigmento sem atividade tóxica encontrada.

6.2 Atividade Antimicrobiana

Após a realização dos testes para atividade antimicrobiana dos isolados com os três microrganismos teste, foi observada a presença de halos indicativos da inibição nas placas de cultivo. Os microrganismos teste foram escolhidos para incluir as duas classes de organismos

diferenciados pela coloração de Gram e um exemplar dos fungos leveduriformes com relevância para a saúde humana, sendo eles:

- Microrganismo Gram negativo: *Escherichia coli* ATCC-25923;
- Microrganismo Gram positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC-25922;
- Fungo leveduriforme: *Candida albicans* ATCC-10231.

O teste teve objetivo qualitativo, uma vez que visava direcionar a continuidade dos experimentos com os isolados que apresentassem resultados mais promissores. Os resultados encontram-se descritos na

Tabela 3, de maneira que + indica a formação de halos de inibição e – indica que não ocorreu a formação de halos.

Tabela 3: Resultado qualitativo de inibição microbiana pelos endofíticos isolados.

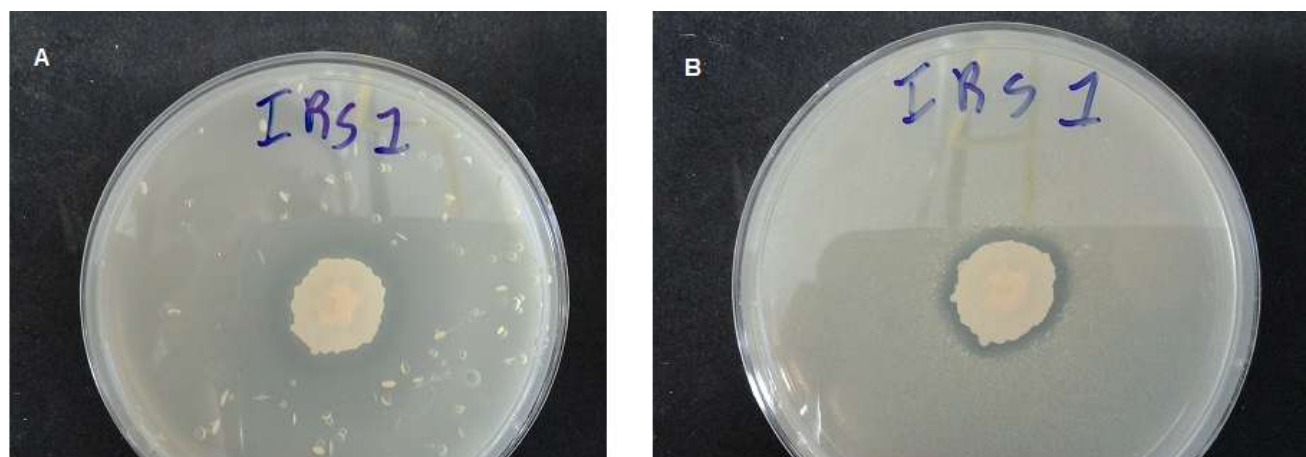
Microrganismo Isolado	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
IB1	+	+	+
IB2	+	+	+
IB3	-	+	-
IB4	-	+	-
IB5	-	-	-
IB6	-	-	-
IB7	+	+	-
IRs1	-	+	-
IRs2	-	-	-
IRs3	+	-	-
IRx1	-	-	-
IRx2	+	-	-
IA1	-	-	+
IA2	+	-	+

IA3	-	-	-
IA4	+	-	+
IA5	+	+	-
IA6	-	-	+
IA7	-	-	+

Fonte: Autor

Os microrganismos com resultados mais promissores foram selecionados de acordo com o tamanho dos halos e a capacidade de inibir o maior número dos microrganismos teste. Apesar de vários resultados positivos de inibição de bactérias, a maioria dos halos formados eram pequenos como pode ser visto na Figura 30.

Figura 30: Inibição de *E. coli* (A) e *S. aureus* (B) pelo microrganismo IRS1



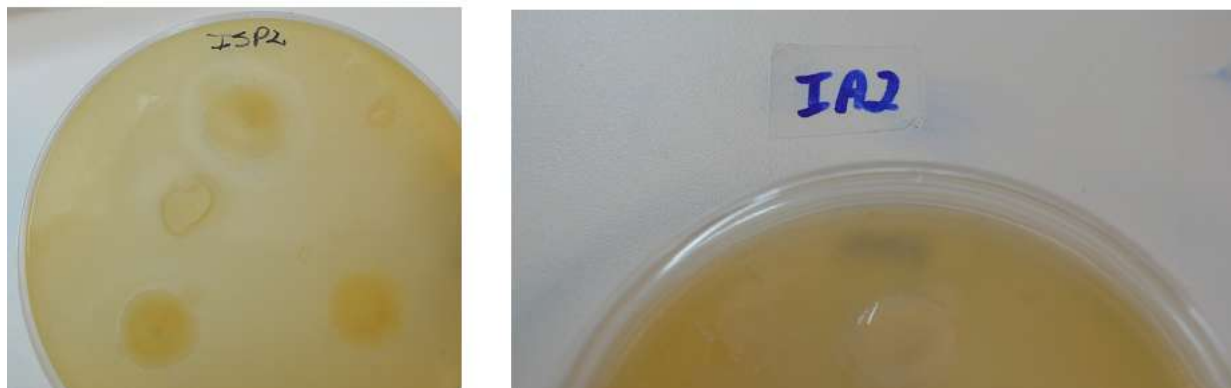
Fonte: Autor

O grupo de microrganismo que apresentou maior incidência de inibição do fungo leveduriforme foram os isolados de Ipê Amarelo, IA1, IA2, IA4 e IA6. Todos estes apresentaram alguma capacidade de formação de halos, sendo que os halos mais visíveis foram dos isolados IA2 e IA6 (Figura 31 e Figura 32 respectivamente).

Os halos formados contra *Candida albicans* pelos microrganismos IA1 e IA4 foram muito pequenos e os testes foram repetidos utilizando apenas o caldo de cultivo colocados em poços nas

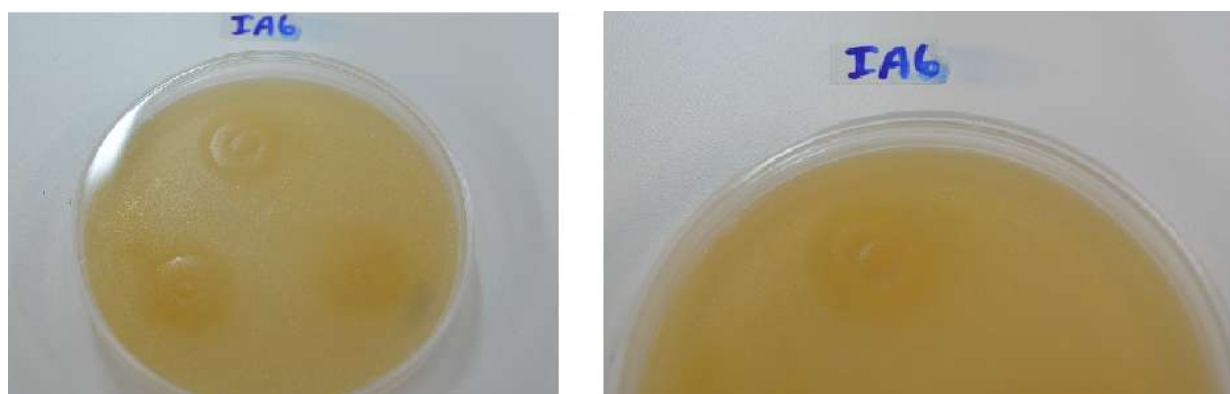
placas com o microrganismo teste (Figura 33), o teste foi realizado com os demais isolados também, porém, sem resultado positivo.

Figura 31: Inibição de *Candida albicans* pelo microrganismo IA2



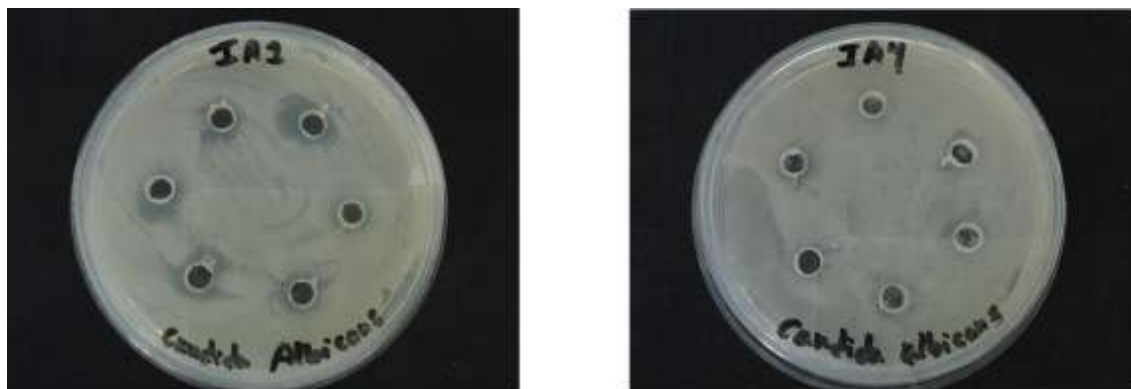
Fonte: Autor

Figura 32: Inibição de *Candida albicans* pelo microrganismo IA6



Fonte: Autor

Figura 33: Inibição de *Candida albicans* pelo caldo de cultivo dos microrganismos IA1 e IA4.



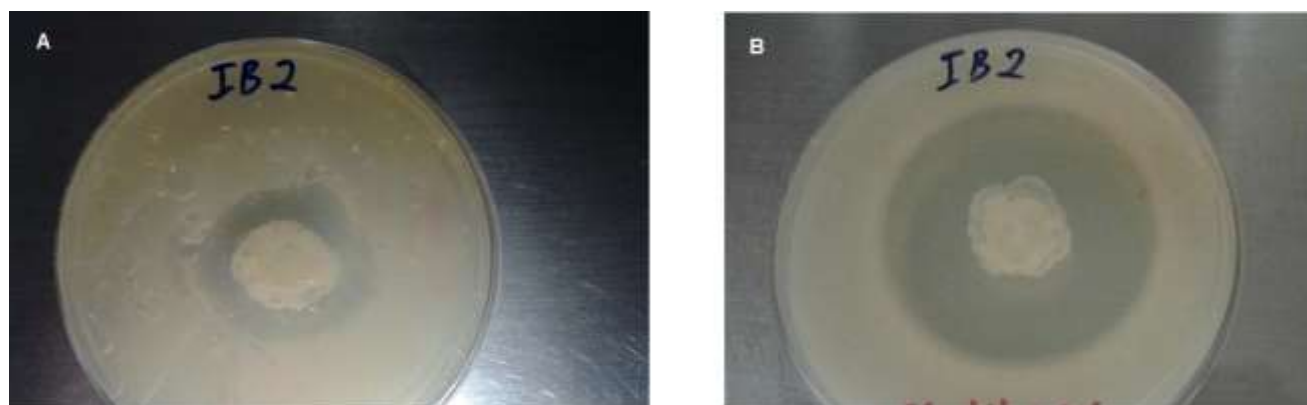
Fonte: Autor

Observa-se que IA2 e IA4 apresentaram pequenas áreas de clareamento ao redor das colônias, porém os mesmos não se destacaram nas fotos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Durante os experimentos a linhagem isolada *Paenibacillus terrae* (IB1/IB2) apresentou halos de inibição bastante visíveis contra as duas bactérias contra as quais foi testada: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (

Figura 34 e Figura 35).

Figura 34: Inibição de *Escherichia coli* (A) e de *Staphylococcus aureus* (B) pelo microrganismo IB1/IB2



Fonte: Autor

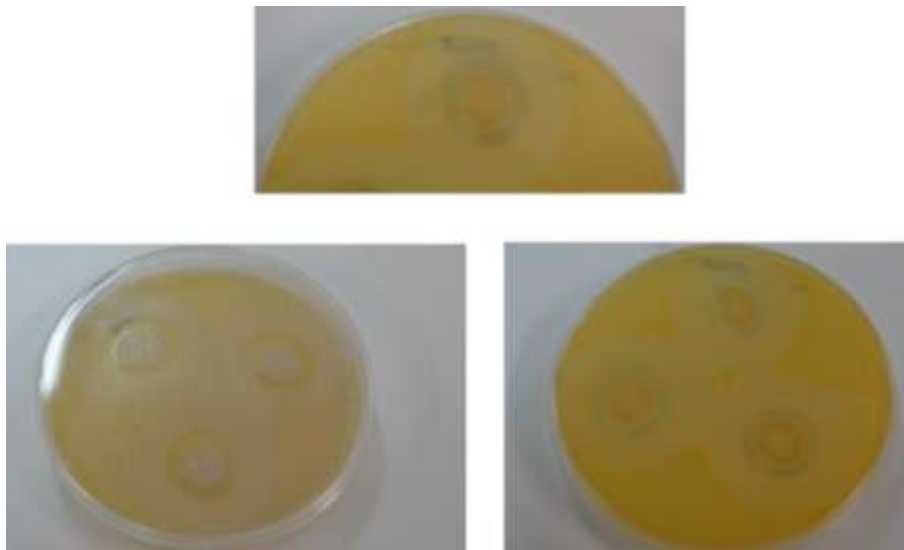
Figura 35: Inibição de *Staphylococcus aureus* pelo microrganismo IB1/IB2



Fonte: Autor

Além da capacidade de inibição dos dois representantes dos grupos bacterianos testados, o microrganismo *Paenibacillus terrae* (IB1/2) gerou também halos bastante visíveis de inibição contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* (Figura 36).

Figura 36: Inibição de *Candida albicans* IB1/2



Fonte: Autor

A inibição gerada pelo microrganismo IB1/2, também contra o fungo leveduriforme despertou interesse para maiores estudos com o caldo de cultivo desta linhagem isolada. Uma vez que o microrganismo *Candida albicans* pertence ao grupo dos Eucariotos, com características mais próximas das células humanas do que bactérias, desta maneira, sua inibição mostra relevância da substancia para a realização de testes antitumorais.

6.3 Detecção de Ácido Clavulânico

Com a utilização da metodologia por Bird para detecção da produção de ácido clavulânico, não foi detectada a produção de ácido clavulânico pelas linhagens isoladas, sendo a leitura de absorbância em imidazol sempre menor que a leitura da absorbância com água, exceto pela linhagem IRS3, porém com um índice positivo de apenas 0,010, ficando dentro do que é considerado faixa de erro experimental.

6.4 Perfil de Resistência a Antibióticos

Os resultados dos testes de resistência a antibióticos foram obtidos através da medida dos halos de inibição dos isolados por determinados antibióticos. Na Tabela 4 seguem descritos os resultados obtidos com o uso de antibióticos comumente utilizados para inibição de bactérias

Gram positivas: Tetraciclina (TET), Clorafenicol (CLO), Aztreonam (ATM), Netilmicina (NET), Gentamicina (GEN) e Amoxicina (AMI).

Tabela 4: Medida dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por antibióticos contra microrganismos Gram positivos das bactérias isoladas

Microrganismo Isolado	TET	CLO	ATM	NET	GEN	AMI
IB1	7,0	14,0	6,5	3,5	4,0	6,0
IB2	6,0	14,0	8,5	4,0	5,0	4,0
IB3	11,0	8,0	0,0	5,0	4,0	4,0
IB4	9,5	13,5	1,0	2,5	3,0	4,0
IB6	11,0	8,0	0,0	6,5	5,0	5,0
IB7	10,5	7,0	0,0	4,5	4,0	5,5
IRs1	7,0	9,0	2,0	0,0	3,0	4,0
IRs2	11,0	10,0	4,0	0,0	5,0	3,5
IRs3	9,5	11,5	4,0	3,5	4,0	4,0
IRx1	7,0	11,0	0,0	4,0	2,0	4,0
IRx2	5,0	13,0	2,0	0,0	2,0	3,5
IA1	5,5	10,0	7,5	2,0	2,0	3,0
IA2	7,5	10,0	4,0	0,5	4,0	3,5
IA3	7,0	9,0	3,0	1,0	2,0	4,0
IA4	8,5	12,0	1,0	0,5	4,0	3,5
IA5	9,0	9,0	1,5	1,0	2,5	3,0
IA6	8,5	10,0	1,0	1,0	3,0	3,5
IA7	7,5	10,5	0,0	3,0	3,0	3,0

Fonte: Autor

Observa-se que o antibiótico que gerou maiores halos de inibição foi CLO, atingindo 13,5mm contra IB4 e 14 mm contra IB1/IB2, enquanto ATM e NET foram os antibióticos que as linhagens mais toleraram.

Apesar de todos os isolados terem sido identificados como microrganismos Gram positivos, foram realizados também testes com antibióticos de ação contra bactérias Gram

negativas: Vancomicina (VAN), Ampicilina (AMP), Eritromicina (ERI), Sulfazotrim (SUT), Gentamicina (GEN) e Cefalotina (CFO). Mediante os resultados, observou-se a ação antibiótica mesmo com diferenciação da parede celular (Tabela 5).

As medidas marcadas com (*) são de microrganismos que apesar da formação de halos de inibição, apresentaram crescimento de colônias satélites dentro do raio do halo.

Tabela 5: Medida dos halos de inibição ($D_{\text{Halo-inibição}}$ mm) por antibióticos contra microrganismos Gram negativos das bactérias isoladas

Microrganismo Isolado	VAN	AMP	ERI	SUT	GEN	CFO
IB1	4,5	0,0	7,0	0,0	1,0	0,0
IB2	8,0	0,0	6,5	5,0*	2,5	8,0*
IB3	5,5	3,5	6,5	11,5	1,5	5,0*
IB4	5,0	0,0	4,0	0,0	2,0	2,0
IB6	4,0	3,0	7,0	10,0	1,0	6,0*
IB7	5,0	0,0	6,5	9,0	3,0	0,0
IRs1	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
IRs2	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IRs3	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	3,0
IRx1	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
IRx2	1,0	0,0	0,5	0,0	0,0	1,0
IA1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IA2	5,5	0,0	2,0	7,0*	3,0	4,0*
IA3	4,0	0,0	2,0	0,0	1,0	3,0*
IA4	4,0	0,5	3,0	0,5	1,0	3,5
IA5	4,0	3,0	5,0	0,0	0,5	2,0

IA6	0,0	0,0	0,0	1,0*	2,5	0,0
IA7	4,0	0,0	5,0	0,0	0,5	0,0

Fonte: Autor

As linhagens apresentaram alguma sensibilidade também contra antibióticos de ação Gram negativa, em especial as linhagens IB6 e IB3 que foram inibidas pela maior variedade de antibióticos e com os maiores halos de inibição (11,5mm e 10mm respectivamente pelo antibiótico SUT).

Os resultados dos testes de resistência aos antibióticos com os dois grupos microbianos alvo encontram-se representados na Figura 37 à Figura 43, exemplificando que os dois grupos de antibióticos podem exercer efeito sobre os isolados.

Foram observados halos de inibição tanto de antibióticos com efeito sobre bactérias Gram positivas quanto dos antibióticos com ação contra microrganismos Gram negativos nos antibiogramas que utilizaram os microrganismos IB1 (Figura 37), IB3 (Figura 38), IB6 (Figura 39) e IA2 (Figura 40).

Figura 37: Antibiograma de IB1 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



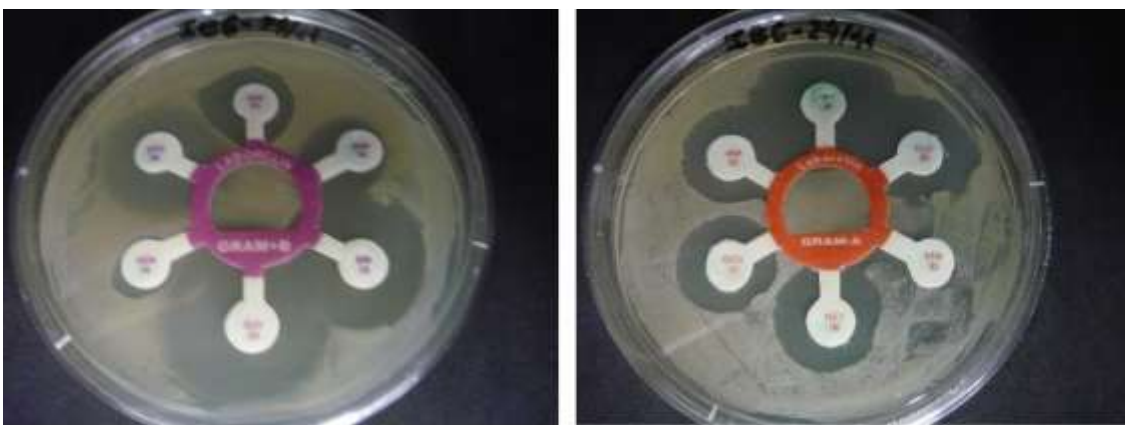
Fonte: Autor

Figura 38: Antibiograma de IB3 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



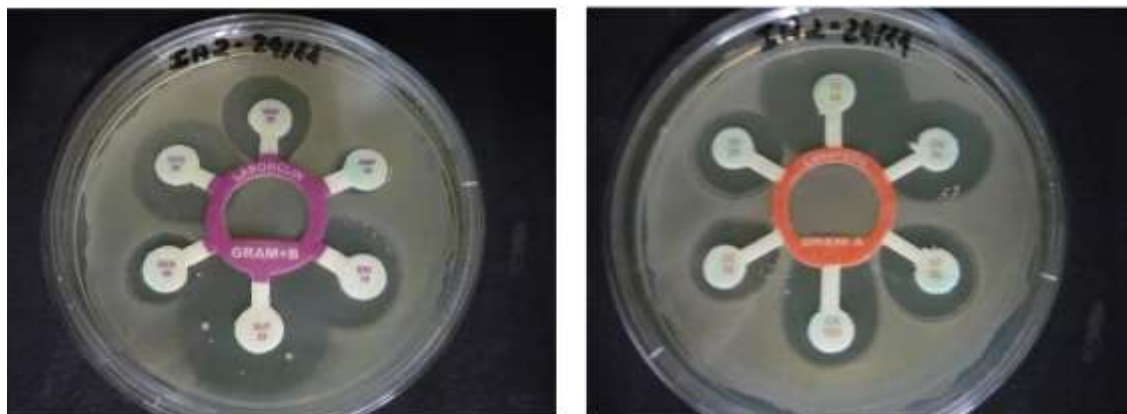
Fonte: Autor

Figura 39: Antibiograma de IB6 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



Fonte: Autor

Figura 40: Antibiograma de IA2 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



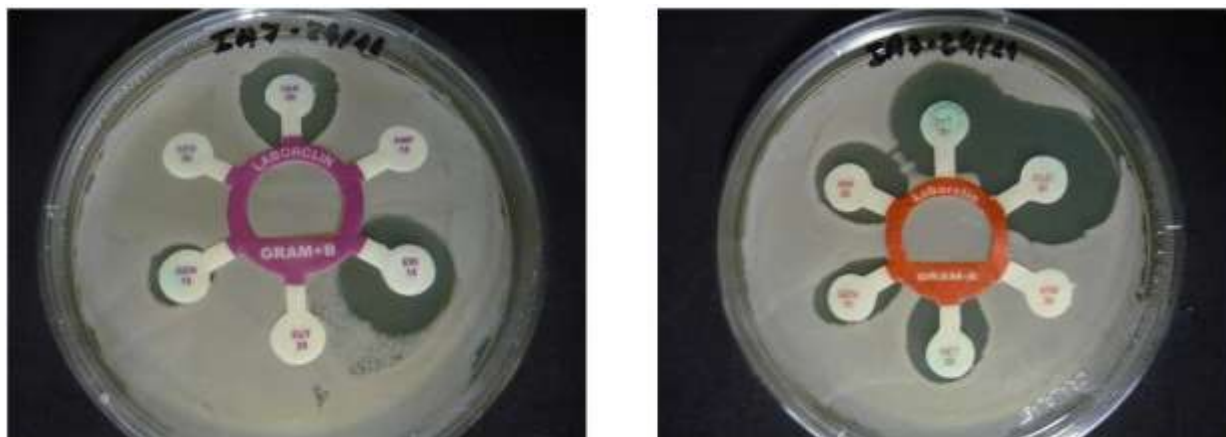
Fonte: Autor

Figura 41: Antibiograma de IA3 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



Fonte: Autor

Figura 42: Antibiograma de IA7 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



Fonte: Autor

Figura 43: Antibiograma de IRx2 com antibióticos contra Gram positivos e contra Gram negativos



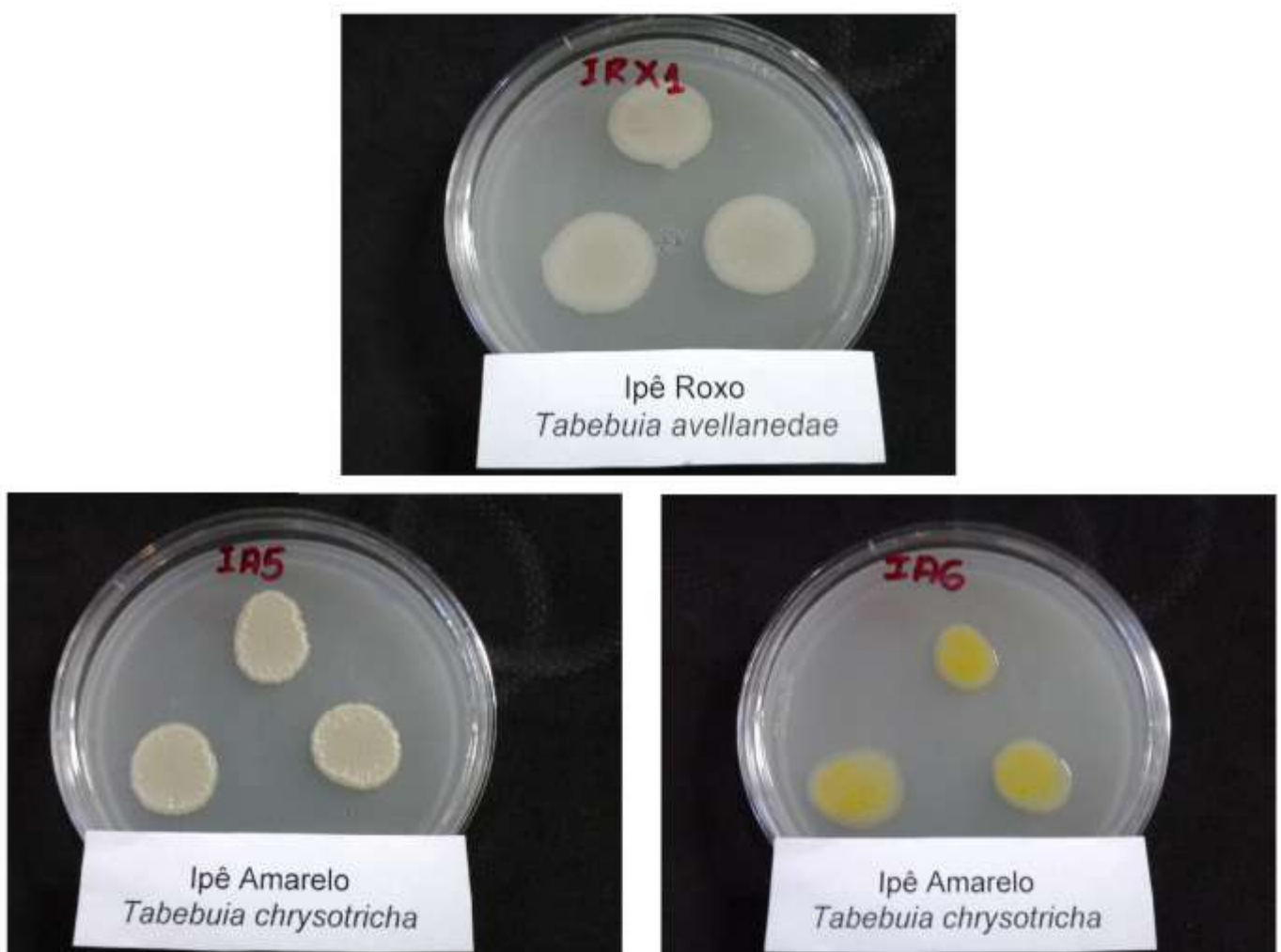
Fonte: Autor

Observa-se especialmente no caso do microrganismo IA3 (Figura 41), IA7 (Figura 42) e IRX2 (Figura 43) que a inibição ocorreu por mais antibióticos e com halos maiores quando o disco para antibiogramas continhas os antibióticos contra bactérias Gram negativas.

6.5 Produção de Amilase

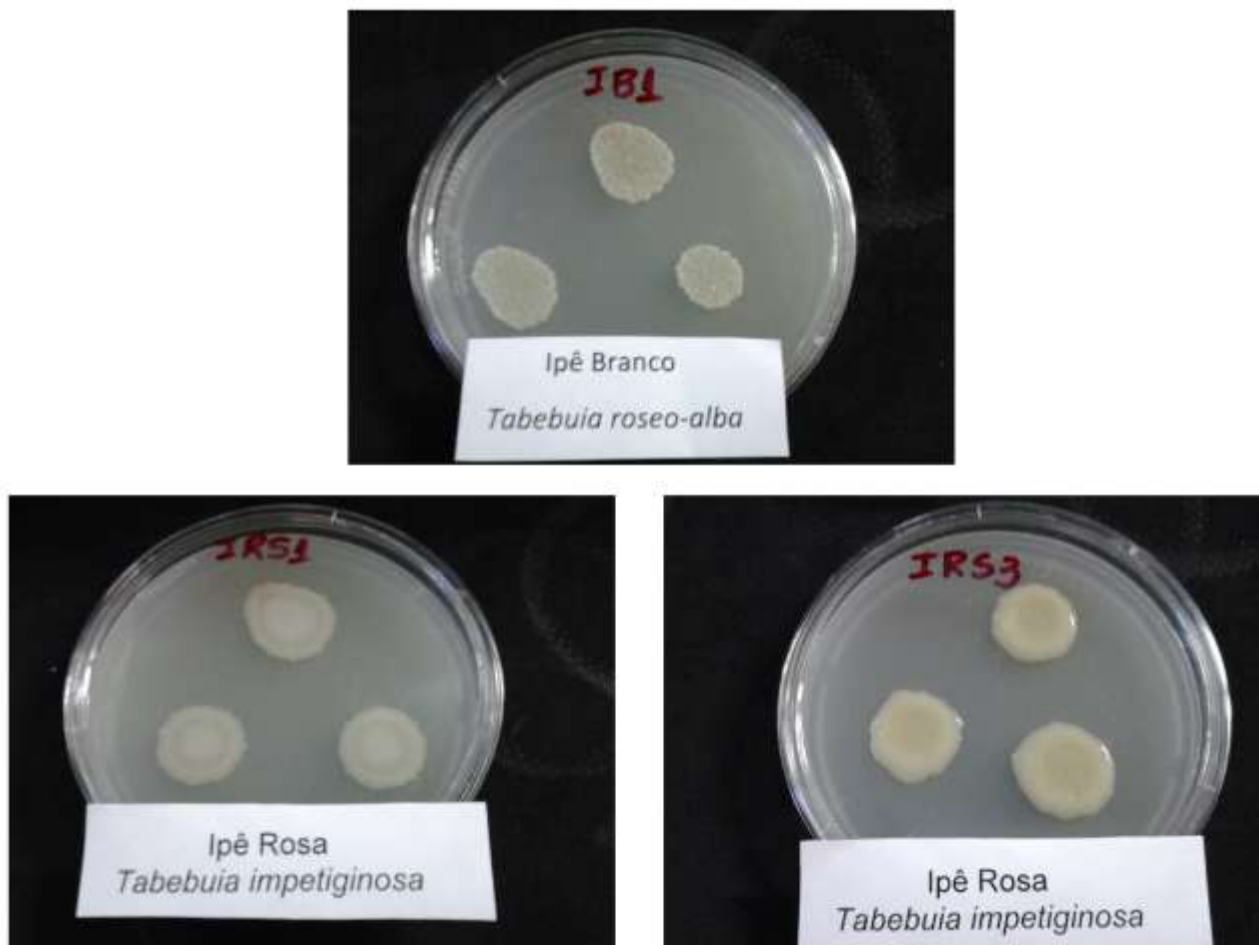
Todas as linhagens apresentaram crescimento em meio amido e demonstrando pequenos halos de clareamento ao redor das colônias. Entre as bactérias que melhor se desenvolveram nesse meio, com o amido como única fonte de carbono disponível, encontram-se IRx1, IA5, IA6 (Figura 44) e IB1/IB2, IRs1 e IRs3 (Figura 45).

Figura 44: Crescimento em meio Amido de IRx1, IA5 e IA6



Fonte: Autor

Figura 45: Crescimento em meio Amido de IB1/IB2, IRs1 e IRs3



Fonte: Autor

As linhagens isoladas inoculadas em Meio Amido tiveram um crescimento relativamente rápido, sendo que o registro fotográfico foi realizado com 72 horas de incubação. Tornando visível também um pequeno halo de clareamento ao redor das colônias, halo este indicativo da produção de amilase.

6.6 Produção de Xilanase

Nos experimentos realizados com finalidade de detecção da capacidade de produção das enzimas degradantes de xilano, nenhuma das linhagens apresentou atividade detectável pelo método utilizado. Ressalta-se que a literatura relata diversos integrantes do grupo dos *Bacillus*

como potenciais produtores dessas enzimas, como descrito na revisão bibliográfica do presente trabalho. A linhagem *Paenibacillus terrae* também é descrita como potencial produtora dessas enzimas, porém também foi obtido com essa linhagem resultado de produção negativo.

6.7 Produção de Celulase

Os resultados dos estudos sobre a produção de CMCase (endoglucanases) não detectaram a capacidade de degradação do substrato CMC por nenhuma das linhagens testadas. Assim como ocorreu nos testes para produção de xilanase, apesar dos relatos em literatura da potencialidade dos isolados, os resultados foram negativos para a produção dessas enzimas.

Observa-se que as análises de produção enzimática, apesar dos relatos da literatura de alguns dos isolados, como o *Paenibacillus terrae*, serem considerados produtores, nenhum dos microrganismos de trabalho demonstraram capacidade de produção desse grupo de moléculas degradantes de xilano e CMC. Porém nos testes que tiveram como objetivo observar a capacidade de degradação de amido, todas as linhagens de endofíticos demonstraram capacidade de crescimento em meio Amido, alguns microrganismos como os IRX1, IA5, IA6, IB1, IRS1 e IRS3 também produziram pequenos halos de clareamento, indicativos da degradação do amido, demonstrando a viabilidade de maiores estudos sobre a produção enzimática pelas linhagens isoladas.

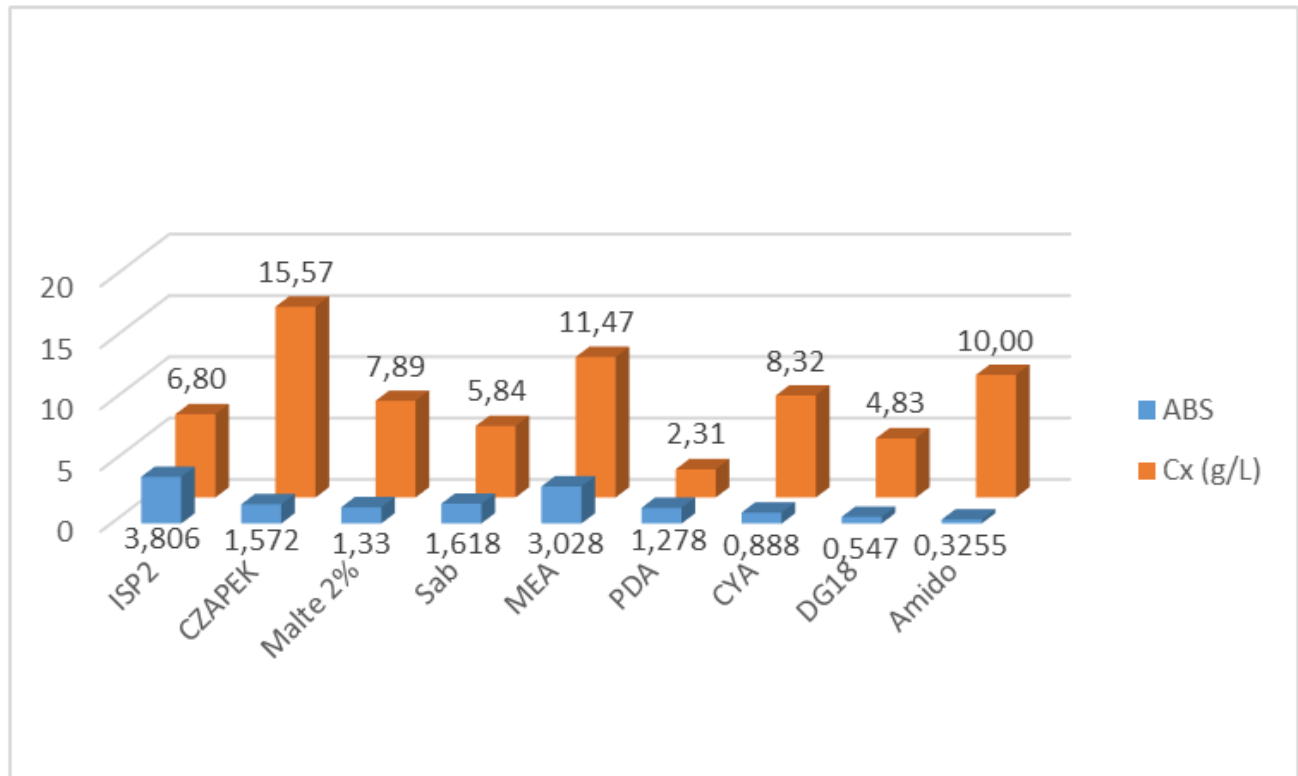
6.8 Cultivo em Mesa Incubadora Rotativa

Foram selecionados dentre os isolados dois microrganismos para estudos em meio de cultura líquido. Essa seleção decorreu levando em consideração a quantidade do produto, no caso a produção de pigmentos por *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1), produção essa que era visível mesmo em meio sólido na fase de isolamento. Outro critério adotado foi o resultado dos testes de inibição microbiana, o microrganismo *Paenibacillus terrae* (IB1/2) conseguiu gerar os halos de inibição mais visíveis contra os microrganismos Gram positivo e negativo e contra o fungo leveduriforme testado.

Os cultivos em mesa incubadora rotativa com *P. minioluteum* tiveram inicialmente a finalidade de verificar a produção do pigmento em diversos meios de cultura diferentes. Foram testados nove diferentes meios nas mesmas condições de cultivo (28 °C, 200rpm, 72h), foram

observadas as produções mensuradas pela absorvância ao final dos cultivos, levando-se em consideração também a biomassa final (Cx). Os resultados desse grupo de experimentos seguem descrito na Figura 46.

Figura 46: Concentração de Cx e Absorbância em 510 nm em 72h de cultivo em 9 diferentes meios de cultivo de *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1).



Autor

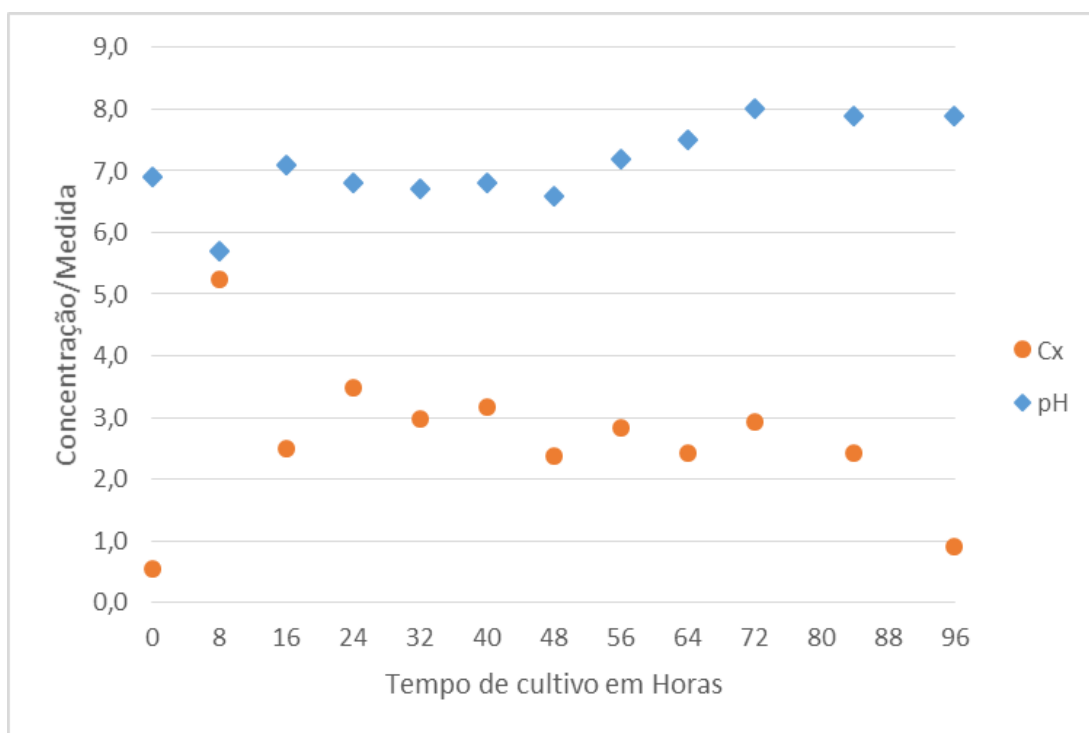
Observa-se que o meio com menor índice de absorvância foi o meio Amido (0,325), porém a concentração celular foi a terceira mais elevada (10 g/L). O meio que apresentou maiores índices de absorvância foi o ISP2 atingindo Abs de 3,806 (medida em 510nm) com Cx de 6,80 g/L. Ressalta-se também a capacidade de produção observada no meio Malte 2%, atingindo 1,33 de Abs com Cx de 7,89 em um meio que tem em sua composição apenas 20g/L de Extrato de Malte.

Os cultivos de *Paenibacillus terrae* (IB1/2) foram realizados em meio ISP2. Esse meio de cultivo foi o meio de isolamento e também o meio de cultivo que propiciou os resultados de inibição bacteriana e fúngica.

Foram observados dados como concentração celular variando com o tempo para verificar as etapas de crescimento bacteriano, juntamente as medidas das concentrações de Cx e das fontes de carbono (Cs) e também o pH variando com o tempo ao longo do cultivo, como pode ser observado na

Figura 47 e Figura 48. As condições utilizadas foram agitação de 200 rpm, temperatura constante de 28 °C.

Figura 47: Perfil de variação de Cx e do pH no decorrer de 96h de cultivo em meio ISP2 de *Paenibacillus terrae* (IB1/IB2)

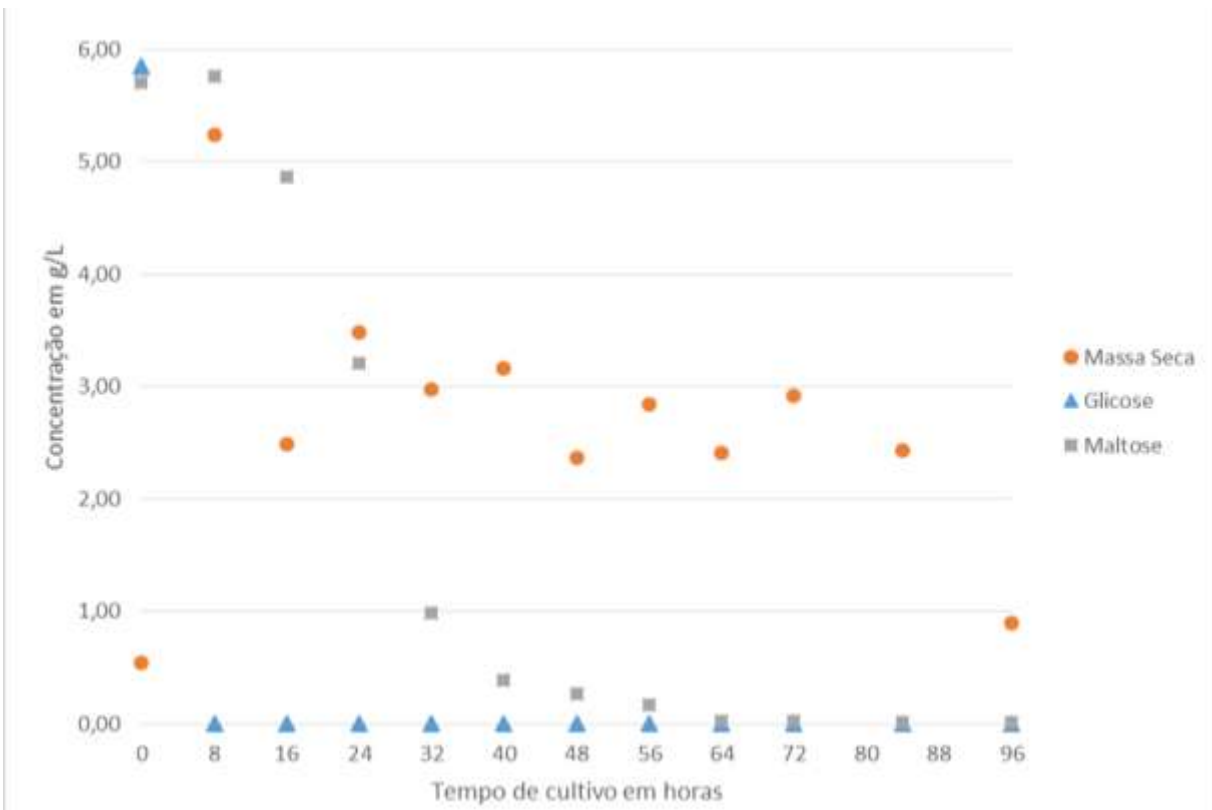


Fonte: Autor

Salienta-se que o pH sofreu variação no decorrer do cultivo, sendo que o pH inicial foi 6,9 (0h), caiu para 5,7 com 8h de cultivo e chegou a 8,0 em 72h de experimento, coincidindo com os

momentos de maiores variações de Cx. Outro ponto interessante é que Cx se mantém praticamente constante à partir de 24 horas de cultivo.

Figura 48: Perfil de variação de Cx e da concentração das fontes de carbono no decorrer de 96h de cultivo em meio ISP2 de *Paenibacillus terrae* (IB1/IB2)



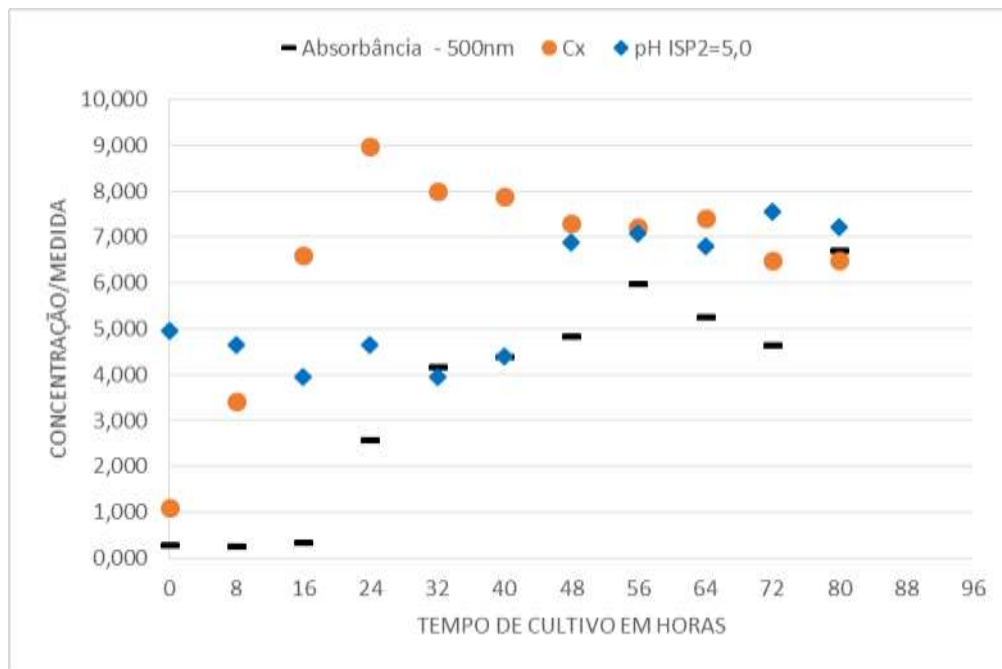
Fonte: Autor

Nas análises das concentrações de fontes de carbono, observa-se que a glicose chega ao zero em apenas 8 horas de cultivo, só então iniciando o consumo de maltose, a segunda fonte de carbono a ser consumida. Este tem a primeira queda registrada de sua concentração em 16 horas de cultivo e se esgota em 64 horas, indicando que o microrganismo apresenta comportamento diaúxico nas condições testadas.

Quanto ao cultivo de *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1) em meio líquido, as mesmas condições do cultivo de *P. terrae* (IB1/IB2) foram mantidas, meio ISP2, 200 rpm e 28 °C. Este experimento teve como objetivo observar a concentração celular, pH e

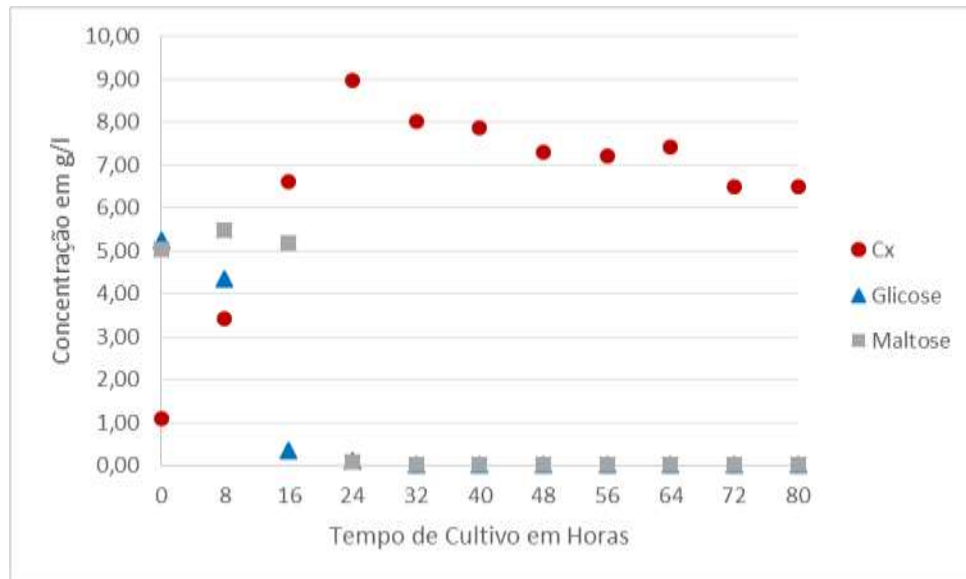
absorbância variando com o tempo (Figura 49), além de possibilitar o estudo do consumo das fontes de carbono disponíveis (Figura 50).

Figura 49: Perfil de crescimento, e variação de pH e absorbância obtidos no cultivo em meio ISP2 de *Penicillium minioluteum*/*Talaromyces minioluteus* (IJ1)



Fonte: Autor

Figura 50: Perfil de Cx e Cs no cultivo de *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1)



Fonte: Autor

Esse experimento possibilitou a observação do tempo de duração da fase exponencial de crescimento do fungo (de aproximadamente 24 horas). Foi possível notar que a produção de pigmento inicia-se quando cessa a fase log. Observou-se também que as duas fontes de carbono disponíveis são consumidas em 24 horas de cultivo, sendo a glicose aparentemente consumida primeiro, para então a maltose ser consumida, demonstrando possível diauxia também desta linhagem.

6.9 Separação dos Principais Compostos

Foi observada na tentativa de separação em fase aquosa do pigmento vermelho produzido por *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1), que a coloração vermelha do caldo de cultivo migrava em totalidade para a fase aquosa tanto quando em contato com acetato de etila, quanto quando separada com butanol.

Foi realizada também a separação do caldo de cultivo gerado pelo *Paenibacillus terrae* (IB1/IB2), neste processo de separação, será realizada a observação do extrato com atividade através da inibição de *Candida albicans* e células tumorais pelos extratos.

Também foram realizados testes com o caldo de cultivo bruto, contra parasitos do gênero *Leishmania*, descritos no Anexo VII.

6.10 Produção de Substâncias com Atividade Citotóxica

Mediante os resultados de inibição microbiana e interesse em confirmação da não toxicidade do produtor de pigmentos, foram submetidos a análises de capacidade de inibição de células tumorais, as linhagens *Paenibacillus terrae* (IB1/IB2) e *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1). O *Paenibacillus terrae* mostrou-se eficaz contra as três linhagens celulares contra as quais foi testado. O método MTT indica viabilidade de maiores estudos quando a inibição superior à 75% ocorre em para duas das linhagens celulares. Ressalta-se que o caldo bruto de cultivo de *P. terrae* inibiu as células com inibições de 97,36% para HCT, 86,64% para células SF295 e 94,37% para OVCAR8, demonstrando assim a importância e a viabilidade de maiores estudos com este intuito (Anexo III).

Ainda sobre as capacidades de inibição de células carcinogênicas, maiores estudos são incentivados devido ao fator produção. A produtividade dos microrganismos é outro fator que merece atenção, para drogas antitumorais como halicondrinas (droga candidata) extraídas de esponjas do mar (*Lissodendoryx*), o rendimento é de aproximadamente 1,5mg do composto por kg de esponja, sendo que para o tratamento de um único paciente são necessários quase 5kg da droga, a produção via microbiana é muito mais viável, mas não só pelo fator produção, mas também pela qualidade dos compostos produzidos e menor custo (GRANATO e colaboradores, 2013).

O fungo *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1) não demonstrou nenhum potencial de inibição contra as linhagens celulares testadas (Anexo III).

6.11 Produção de Substâncias com Atividade Anti-*Leishmania*

No estudo que observou a capacidade de inibição do caldo de cultivo do microrganismo *P. terrae* (IB1/IB2), foi detectada a inibição da forma promastigota do parasito do gênero *Leishmania*, atingindo índices mais altos que o controle realizado com Glucantime® (com

aproximadamente 500 parasitos vivos) utilizando 500µg e 250 µg (com aproximadamente 300 e 250 parasitos vivos respectivamente) do caldo de cultivo bruto e seco (Anexo VII).

6.12 Identificação do Pigmento

Nos experimentos para identificação da estrutura responsável pela coloração de *Penicillium minioluteus*, o extrato aquoso do caldo de cultivo foi inicialmente analisado no equipamento Combiflash, capaz de promover a separação de amostras baseado no comprimento de onda (Abs por UV). Foram obtidas diversas amostras através da separação baseada no espectro de UV do caldo de cultivo injetado na coluna C18, os resultados encontram-se ilustrados na Figura 51.

Figura 51: Análise por Combiflash do pigmento vermelho em extrato aquoso de *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (IJ1)

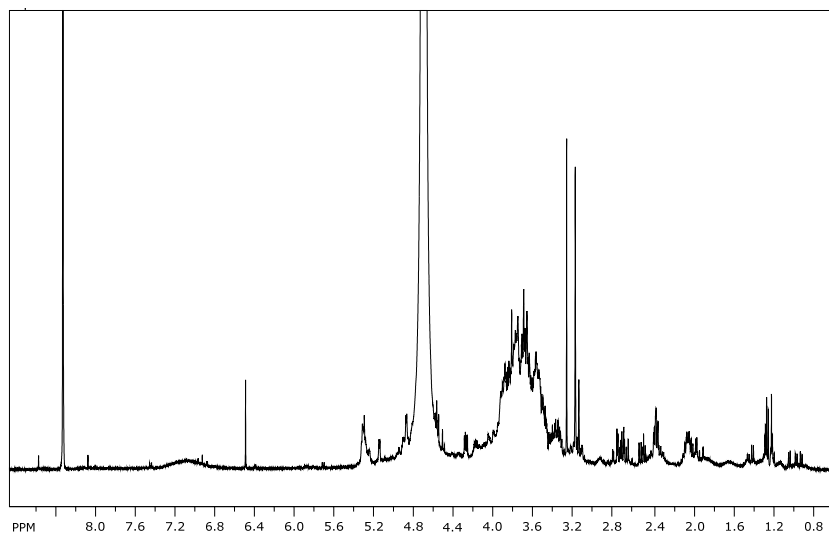
Fonte: Autor

Posteriormente foram realizadas análises de RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) com as amostras que apresentaram picos diferenciais detectados por UV durante as análises separativas em Combiflash.

Foram escolhidas as amostras que pertenciam a uma mesma região de pico cromatográfico. Foram analisadas as amostras 1 e 2 (Figura 52), 16 à 20 (analisadas 3 vezes e demonstrados nas Figura 53) e 35 à 37 (Figura 54).

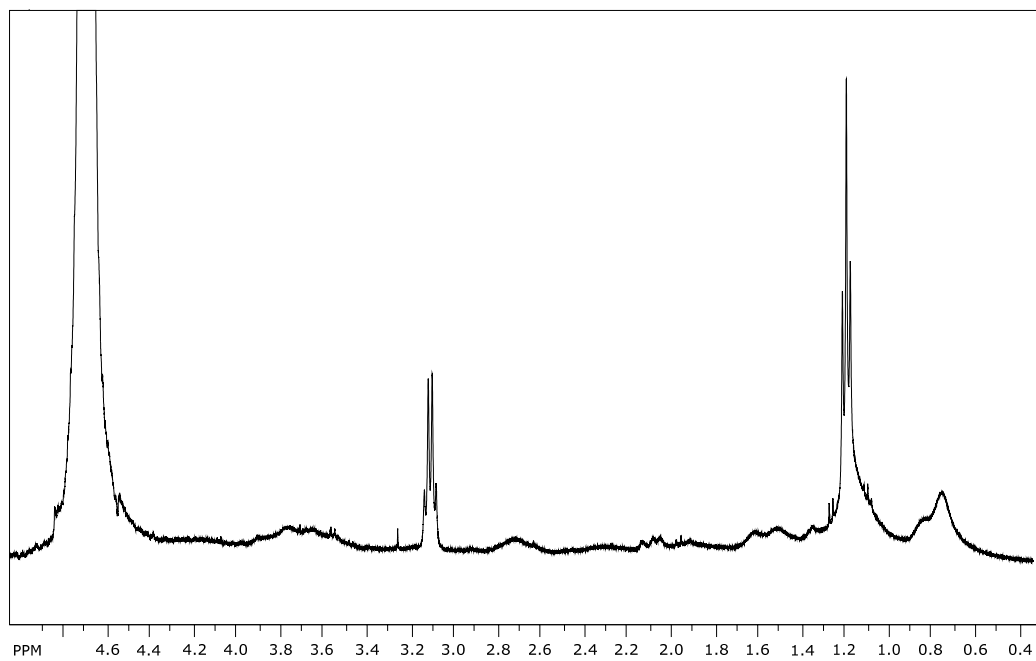
92

Figura 52: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) das amostras 1 e 2



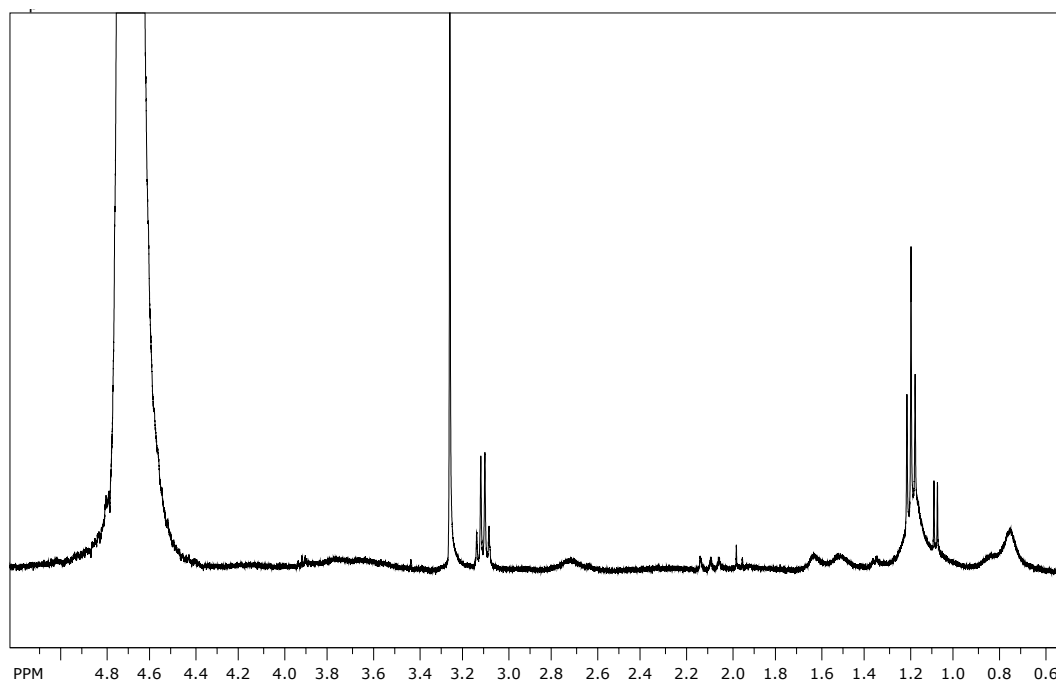
Fonte: Autor

Figura 53: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) da amostra 16 à 20



Fonte: Autor

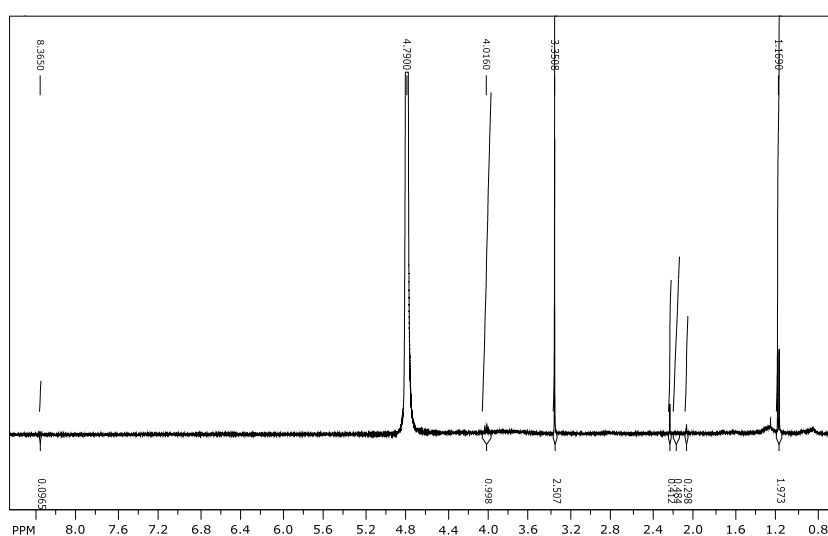
Figura 54: Análise da RMN 1H (D2O, 400 MHz) da amostra 35 à 37



Fonte: Autor

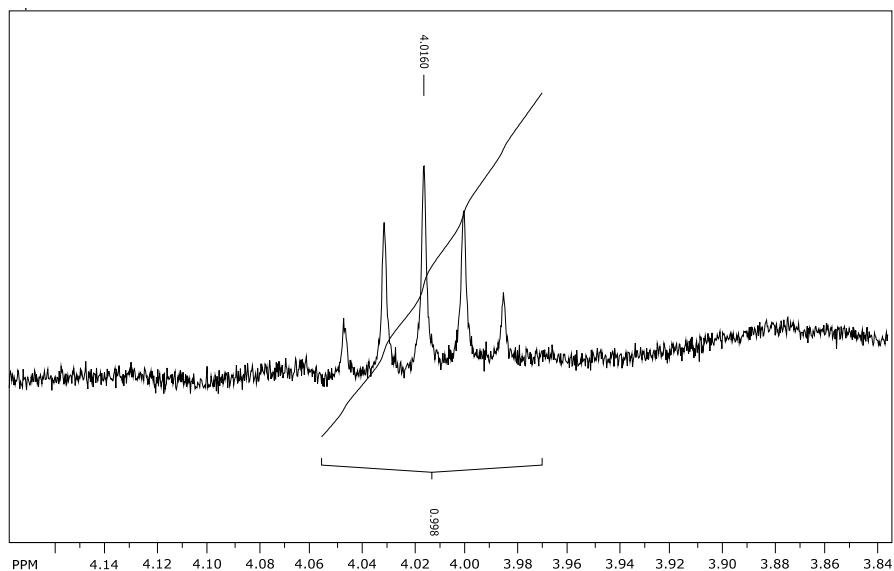
Na Figura 55 observa-se sinais na região de δ 0.8 - δ 8.0, enquanto no espectro apresentado na figura 55 observa-se sinais mais intensos na região de deslocamento químico δ 4.1- δ 3.84.

Figura 55: Análise de RMN 1H (D2O, 400 MHz) detalhe das amostras de 35 à 37



Fonte: Autor

Figura 56: RMN 1H (D2O, 400 MHz) detalhe das amostras de 35 à 37

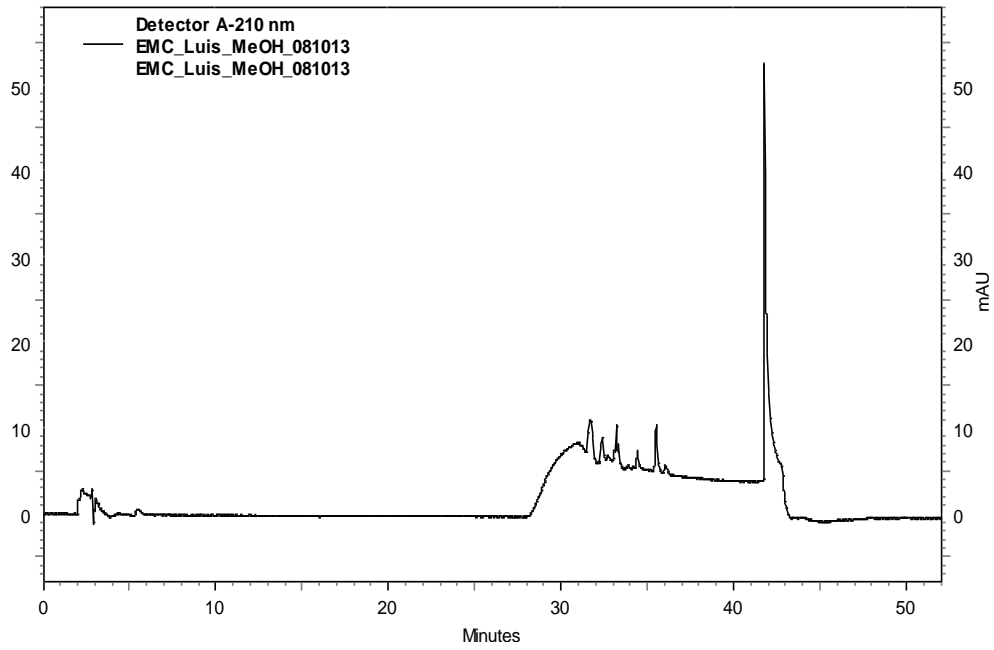


Fonte: Autor

Como pode ser observado, a análise dos espectros de RMN não levou a identificação do pigmento, porém é possível observar que o composto apresenta poucos átomos de H, uma possibilidade para determinação do mesmo seria a realização de experimento de carbono e bidimensionais, como HSQC e HMBC nos quais se observam correlações de C-H diretamente ligados ou distantes a duas ou três ligações respectivamente. Porém para tais análises são necessários uma quantidade maior de amostra.

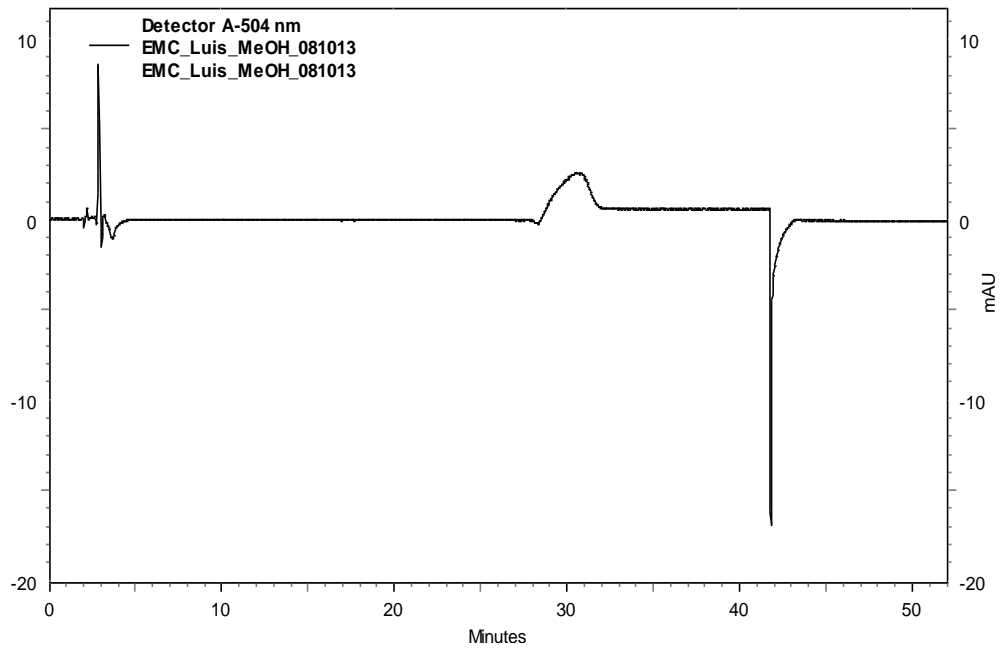
Outra análise realizada com os extratos foi CLAE-UV com processamento através do software SHIMADZU CLASS-VP. Os cromatogramas obtidos com MeOH (metanol) como fase móvel das amostras 1 e 2 estão representados na Figura 57, Figura 58 e com H₂O na fase móvel na Figura 59.

Figura 57: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com MeOH na fase móvel



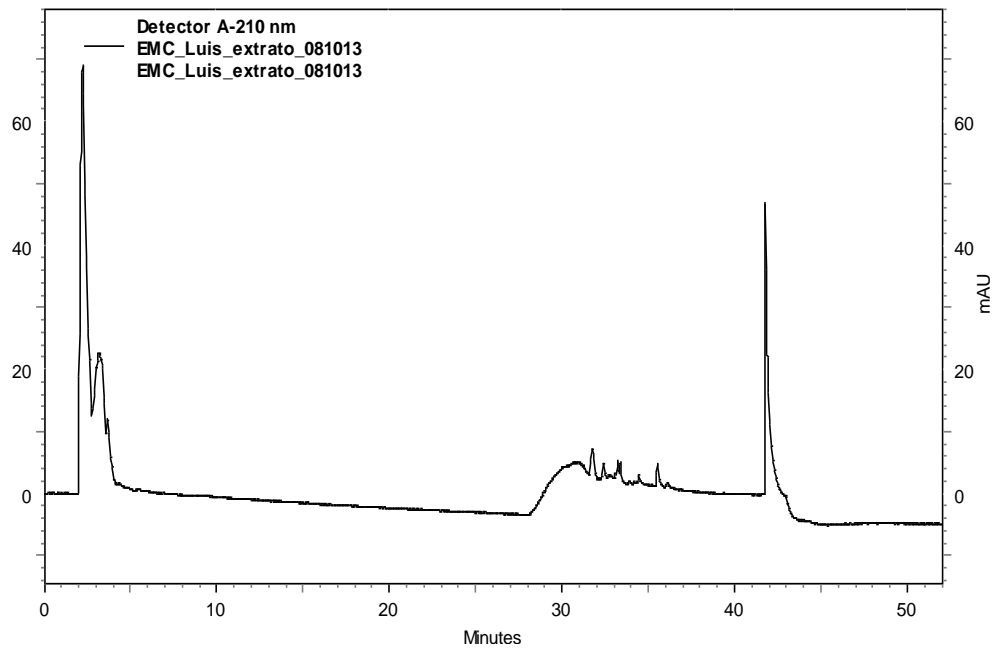
Fonte: Autor

Figura 58: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com MeOH na fase móvel



Fonte: Autor

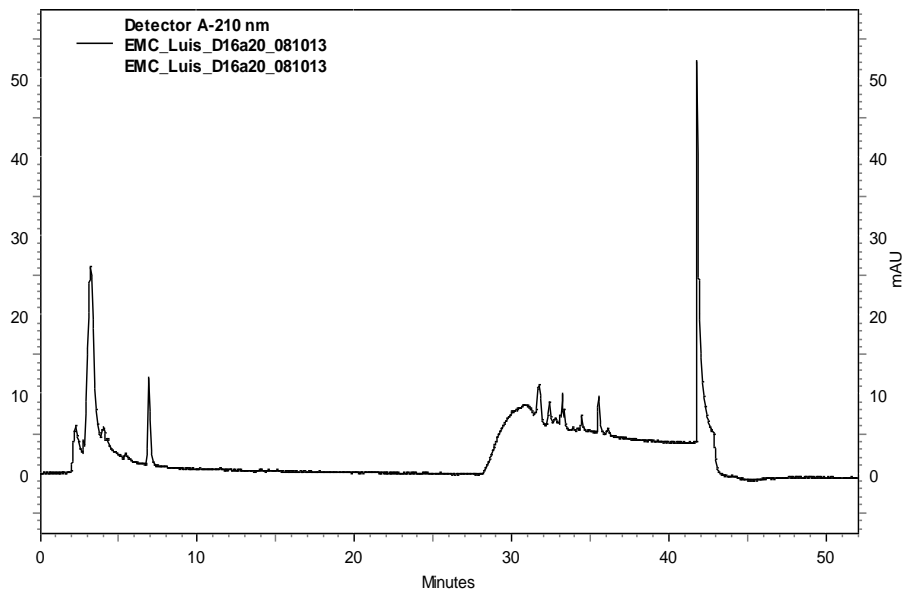
Figura 59: Análise de RMN das amostras 1 e 2 com H₂O na fase móvel



Fonte: Autor

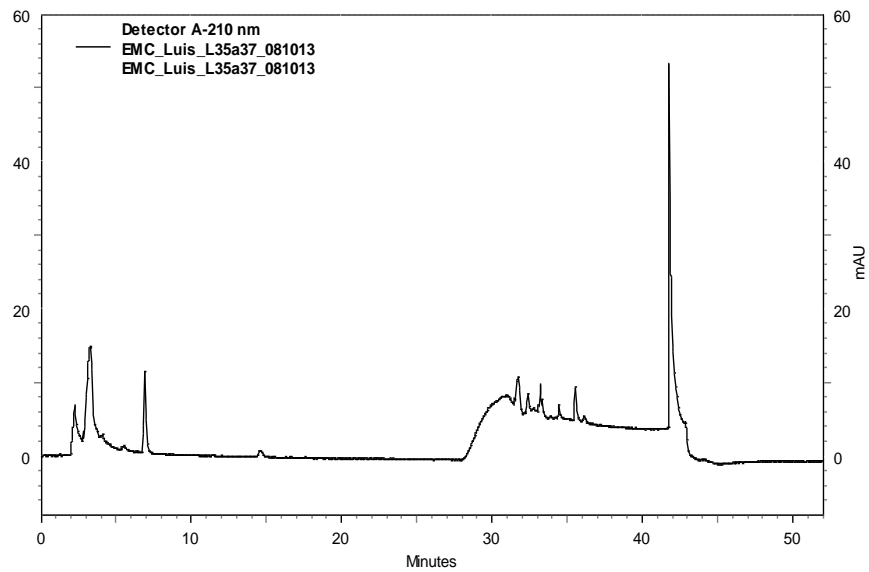
Da mesma maneira que os testes que utilizaram as amostras 1 e 2, foram realizados cromatogramas com as amostras 16 à 20 e 35 à 37. Os cromatogramas podem ser vistos nas Figura 60 (amostras de 16 à 20) e Figura 61 (amostras de 35 à 37).

Figura 60: Análise de RMN das amostras 16 à 20 utilizando H₂O na fase móvel



Fonte: Autor

Figura 61: Análise de RMN das amostras de 35 à 37 utilizando H₂O na fase móvel



Fonte: Autor

As análises por CLAE-UV foram repetidas com metanol na fase móvel, Coluna: PHENOMENEX Phenyl-Hexyl 5 μ 100A 250x4,6 mm PART NUMBER 00G-4257-E0 S/No 376691-3, Equipamento: SHIMADZU LC-10AD equipado com um detector por

espectrofotometria de ultravioleta SCL-10A (SHIMADZU) UV: 190-800 nm/monitorado: 210 e 504 nm (corante máximo); Solvente A: H₂O; Solvente B: MeOH. Os dados foram processados através do software SHIMADZU CLASS-VP, porém foram obtidos os mesmos perfis cromatográficos.

Uma vez que as análises realizadas a partir do caldo de cultivo não possibilitaram a identificação da substâncias, optou-se então pela utilização de amostras obtidas através de micro extração diretamente das colônias de *Penicillium minioluteum*/*Talaromyces minioluteus* cultivadas em meio ágar ISP2, utilizando o pigmento sem estar em contato com o meio de cultivo para realização de novo RMN.

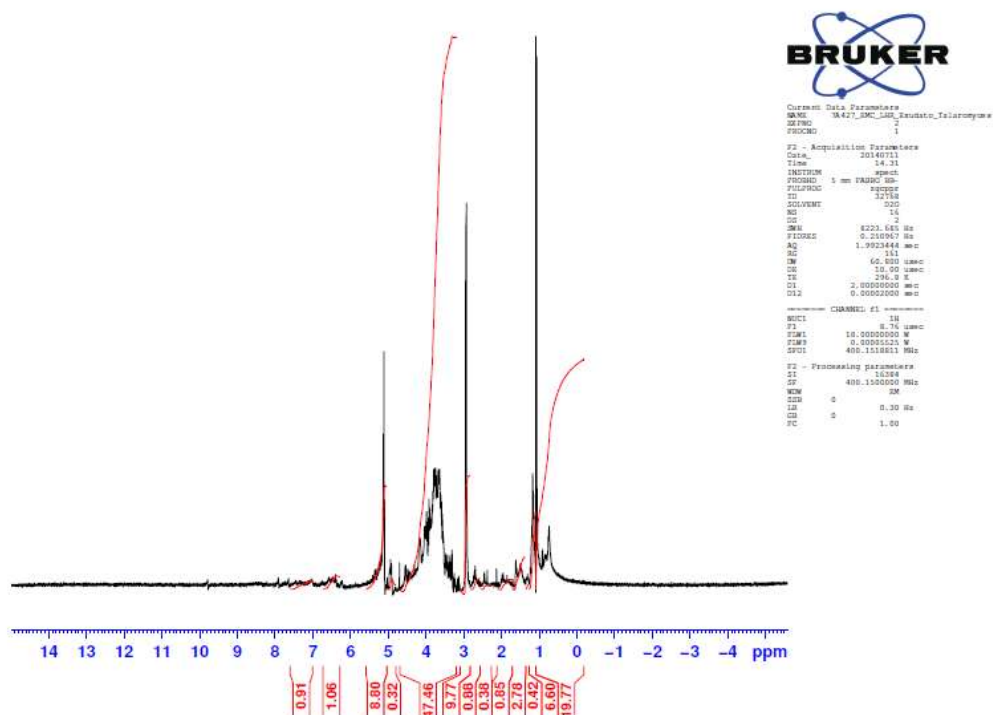
O fungo *Penicillium minioluteum*/*Talaromyces minioluteus*/*Talaromyces minioluteus* foi cultivado no meio ISP2 (Tabela 1) por 7 dias à 28 °C. A morfologia de crescimento do microrganismo com 168 horas de crescimento, a coloração do ágar e o exsudato podem ser vistos na Figura 62. Os perfis de RMN obtidos encontram-se na Figura 63 e mais detalhadamente na Figura 64.

Figura 62: Morfologia de *Penicillium/Talaromyces minioluteum* (IJ1) cultivado em meio ISP2



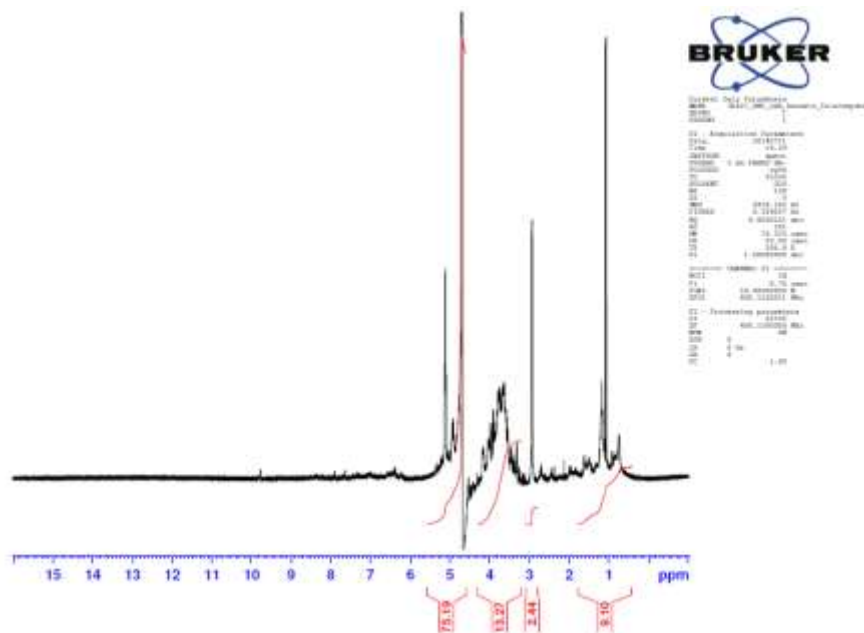
Fonte: Autor

Figura 63: Perfil de RMN gerado da análise do exsudato extraído diretamente das colônias



Fonte: Autor

Figura 64: Perfil detalhado de RMN gerado da análise do exsudato extraído diretamente das colônias de IJ1



Fonte: Autor

Apesar das tentativas de concentrar as amostras e da extração do pigmento diretamente das colônias, não foi possível obter uma leitura clara para favorecer a identificação do mesmo. Dessa maneira demonstrou-se a baixa concentração do mesmo, apesar da coloração forte e avermelhada.

O estudo da produção de pigmentos obteve apenas uma linhagem produtora no meio de cultivo de isolamento. O fungo isolado das folhas de *Hymenaea courbaril*, identificado como *Penicillium minioluteum*/*Talaromyces minioluteus* apresentou a produção visível de pigmento de cor vermelha na fase de isolamento. Pigmentos em uso na atualidade são em grande maioria sintéticos, porém o valor agregado a produtos naturais é maior, além da maior aceitação do consumidor.

Ressalta-se que os pigmentos naturais são comumente de origem vegetal e, uma vez que as variações climáticas como o aumento de temperatura e a mudança quantidade e das regiões de precipitação hídrica podem provocar mudanças e dificuldades nos cultivos de espécies vegetais essenciais para a obtenção de pigmentos. Dessa maneira, os corantes de origem microbiológica podem ocupar um papel de extrema importância para diversas indústrias.

O fungo endofítico *P. minioluteum* isolado neste trabalho não apresentou indícios de atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram positivas quanto para bactérias Gram negativas, também não sendo capaz de inibir o crescimento do fungo *Candida albicans*, demonstrando potencial para ser testado contra células tumorais, de replicação mais rápida comparadas com células normais, dessa maneira mais sensíveis a determinados agentes citotóxicos, sendo também negativo o resultado da ação antitumoral.

O conjunto de resultados negativos indica a viabilidade da continuidade das pesquisas visando a identificação do pigmento, estudo da micotoxicidade e com resultados positivos o desenvolvimento do processo de produção, visando maiores quantidades de pigmento e utilização de substratos de menor baixo custo. Porém ainda sobre a linhagem fúngica deste trabalho e concentração de molécula corante, a dificuldade de identificação do pigmento pode ser explicada pela baixa concentração de pigmento no caldo. Ressalta-se ainda que apesar da concentração insuficiente para identificação, a coloração vermelha era intensa em todos os cultivos realizado, revelando o grande poder corante.

7 Discussão

Após análise dos resultados pode-se ressaltar que o Brasil é detentor de biomas que se encontram entre as maiores diversidades biológicas e consequentemente microbiológicas do planeta. Pensando-se apenas nos integrantes da flora, encontram-se motivos suficientes para justificar as pesquisas com esse vasto material. Á exemplo de trabalhos com extratos vegetais, combinações desses extratos provenientes de *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea courbaril* demonstraram potencial inibitório contra a bactéria meticiclina-resistente *S. aureus* (MRSA) 31,25mg/ml de concentração mínima inibitória (ALEIXO e colaboradores, 2013).

A microdiversidade encontrada nas folhas das quatro espécies de ipês em suma, foi de microrganismos não relatados como endofíticos e mais especificamente não foram encontrados na literatura referencias das linhagens isoladas com as espécies de *Tabebuia sp.* O mesmo ocorreu sobre o microrganismo isolado das folhas de jatobá, o fungo *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus* (único endofítico que pode ser isolado desta árvore utilizando meio ISP2), que não foi encontrado na revisão bibliográfica, relatado como endofítico.

O gênero *Bacillus* foi o predominantemente obtido no isolamento proveniente das folhas dos Ipês. O isolamento de um gênero predominante não é descrito apenas com microrganismo endofíticos. JIN e colaboradores (2014) relata o isolamento desse gênero de amostras de esponjas do mar, relatando atividade de 5 isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* contra organismos eucariontes, as diatomáceas *Amphora spp.*, *Nitzschia closterium*, *Sellaphora spp.* e *Stauroneis spp.*

Interessantemente, 15 das bactérias isoladas neste trabalho pertenciam ao gênero *Bacillus spp.* Porém, nos experimentos aqui relatados, apesar de serem do mesmo gênero, a maioria das espécies isoladas apresentaram suas regiões do DNA 16 S, porção do material genético utilizada para identificação, compatível com mais de um microrganismo catalogado no GenBank. Outros trabalhos também obtiveram resultados de identificação similares.

Bactérias como *Bacillus cereus* e *B. pumilus*, isolados nesse trabalho, e outras do gênero, são de relevância para a indústria alimentar, em especial a indústria de derivados lácteos. DE JONGHE, e colaboradores (2010), citam essas bactérias como alguns dos principais contaminantes da indústria produtoras de leite, uma vez que são formadoras de esporos e resistente a processos como a pasteurização.

A linhagem de *Paenibacillus beijingensis*, isolada por WANG e colaboradores (2013), foi encontrada na rizosfera (solo) e identificada utilizando o DNA 16S, porém 6 espécies foram encontradas com compatibilidade acima de 96% (*Paenibacillus peoriae* DSM 8320T (99.05 %), *Paenibacillus jamilae* DSM 13815T (98.86 %), *Paenibacillus brasiliensis* DSM13188T (98.55 %), *Paenibacillus polymyxa* DSM 36T (98.74 %), *Paenibacillus terrae* DSM 15891, (97.99 %) e *Paenibacillus kribbensis* JCM 11465T (97.92 %). Neste caso foi constatado que o isolado era uma espécie nova, esse fato demonstra a importância da continuidade dos trabalhos com as linhagens endofíticas de provenientes das folhas de *Tabebuia* sp.

LORENTZ e colaboradores (2006) realizaram um trabalho para observar a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas com 55 isolados da água e do solo, pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, 25 desses isolados apresentaram alguma atividade antibacteriana, enquanto 14 conseguiram inibir o crescimento de fungos. Esses números demonstram a importância de estudos mais aprofundados com esse gênero bacteriano, inclusive a prospecção de novas linhagens e novas capacidades de produção.

O isolado identificado como *Paenibacillus terrae* demonstrou capacidade de produção de compostos com bioatividades descritas na literatura, por exemplo a capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, como também descreve o trabalho de LOHANS e colaboradores (2014). O fato de o *P. terrae* ter gerado os maiores halos de inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e do fungo leveduriforme *Candida albicans* foram gerados pelo microrganismo identificado como *Paenibacillus terrae*. Esse fato foi o que justificou o envio de amostras para serem testadas no laboratório da Universidade Federal do Ceará para verificar a presença de atividade antitumoral.

Entretanto, em contraste com a literatura, não foi observada a produção de xilanases. A produção desse grupo de enzimas é descrita no trabalho de SHIM e colaboradores (2012). Esse estudo sequenciou o genoma de uma linhagem de *P. terrae*, citado por ele como o melhor produtor de xilanase, de um grupo de isolados de resíduos no solo da floresta de Gara Mountain (ao nordeste da cidade de Dohuk, Iraque).

Outros autores também relatam a produção de outras enzimas celulolíticas por *Paenibacillus terrae* em condições anaeróbicas e aeróbicas. LIANG e colaboradores (2014) descreve o *P. terrae* como o maior produtor de CMCase entre 22 isolados atingindo 2.08 U/mL de enzima. Nos testes realizados neste trabalho foram utilizados os mesmos substratos e o mesmo

método analítico, porém não foi detectada a produção de CMCase por *Paenibacillus terrae* ou por qualquer outro isolado.

Quanto a produção de outras enzimas, as linhagens IB1, IB2, IB3, IB6, IB7 apresentaram halos indicativos da produção de amilase mais visíveis e em menor tempo (24h de crescimento, enquanto as outras linhagens apenas com 72h), sugerindo maiores estudos para quantificar a produção de amilase por essas linhagens.

Os pigmentos utilizados atualmente nas indústrias alimentícias e farmacológicas são quase que exclusivamente de produção sintética. Fungos como os pertencentes aos gêneros *Talaromyces* spp. e *Penicillium* spp. entre outros, são relatados como grandes produtores de pigmentos, porém em contraste com os resultados obtidos com o fungo endofítico isolado nesse trabalho, apresentam relatos de micotoxicidade, não sendo aprovados como ingrediente alimentar na União Europeia ou nos Estados Unidos, grandes mercados consumidores. (ARAI e colaboradores, 2013).

Recentes estudos demonstram ainda bioatividades antifúngicas, antibacterianas e até mesmo antioxidantes provenientes de *Monascus* spp., espécies cujos pigmentos encontravam-se estudados para uso em alimentos, porém também foi constatada citotoxicidade gerada pelo composto citrinina. Entretanto, esses fatos não ofuscam a possibilidade dos pigmentos de origem microbiológica como alternativa viável aos compostos sintéticos atualmente utilizados, demonstrando a importância de maiores estudos.

8 Conclusões

A partir dos resultados obtidos pode se afirmar que os microrganismos endofíticos possuem uma grande diversidade de espécies ainda não relacionadas a esse grupo, além de serem uma fonte de metabólitos de interesse ainda pouco explorada e com grande potencial biotecnológico de aplicação.

O potencial da descoberta de novas espécies e moléculas, vinculado ao estudo dos microrganismos endofíticos é corroborado pelos resultados apresentados nesse trabalho. Resultados importantes como as atividades antitumorais e antiparasitárias os obtidos com *P.*

terrae e a produção de pigmentos produzidos pela linhagem fúngica isolada, são indicativos da validade da pesquisa e da importância da continuidade dos trabalhos.

Desta maneira conclui-se que o trabalho de Bioprospecção de espécies microbianas endofíticas de árvores do Cerrado é de extrema importância tanto para pesquisas de base quanto para as possíveis aplicações nas diversas áreas industriais que podem utilizar de alternativas biotecnológicas em seus processos de produção. Como consideração final, observa-se também a viabilidade da continuação dos trabalhos com as linhagens isoladas, não só com *Paenibacillus terraе* e com *Penicillium minioluteum/Talaromyces minioluteus*, mas também com os demais microrganismos, uma vez que todos os isolados apresentaram algum tipo de bioatividade.

9 Referências Bibliográficas

ALEIXO, A.A.; CAMARGOS, V. N.; ANDRADE, A.C.S.P; SANTOS, M.; CARVALHO, R. S.; MIRANDA, V.C.; HERRERA, K.M.S.; MAGALHÃES, J. T.; LIMA, L.A.R.S.; FERREIRA, J. M.S. Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* E *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclinaresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). BBR - **Biochemistry and Biotechnology Reports**. Edição Especial, v. 2, n. 2, jun., p. 85-88, 2013.

ARAI, T.; KOGANEI, K.; UMEMURA, S.; KOJIMA, R.; KATO, J.; KASUMI, T.; ARAI, J. A.. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. **AMB Express**. p.3:19. 2013.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electron. J. Biotechnol.** v.3 n.1. 2000.

BAILEY, B. A., BAE, H., STREM, M. D., ROBERTS, D. P., THOMAS, S. E., CROZIER, J., SAMUELS, G. J., CHOI, I. Y. & HOLMES, K. A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta** 224, 1449–1464. 2006.

BAUER, A.W.; KIRB, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURK, M. – Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Armer. J. clin. Path.**, 45: 493-496, 1966.

BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. **Analyst**, v.107, p.1241-1245, 1982.

BEZERRA, G.P.; SILVA GÓIS, R.W.; BRITO, T. S.; LIMA, F.J.B.; BANDEIRA, M.A.M.; ROMERO, N.R.; MAGALHÃES, P.J.C.; SANTIAGO, G.M.P.. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v 149. v 62–69. 2013.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 42, n. 3. 2006.

COSTA, C.L.L; BADINO, A.C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemical Engineering Journal**. 2012.

DALLAGO, R.M.; SMANIOTTO, A. e OLIVEIRA, L.C.A. “Resíduos sólidos de curtumes como adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso.” **Quim. Nova**. Vol. 28, No. 3, 433-437, em 2005.

DE JONGHE, V.; COOREVITS, A.; DE BLOCK, J.; COILLIE, E. V.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; HEYNDRICKX, M.. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**. V. 136. p. 318–325. 2010.

DIAS, L.S.; LUZIA, D.M.M.; Jorge, N. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops and Products**. V.49. p. 610– 618. 2013.

DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SOARES, R.P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. Leaf anatomy of *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagated *in vitro*, *in vivo* and during the acclimatization. **Ciênc. Agrotec**. v. 32, n. 6, p. 1694-1700. 2008.

EL-SERSY, N. A.; ABD-ELNABY, H.; ABOU-ELELA, G. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-TOUKHY, N. M. K. Optimization, Economization and Characterization of Cellulase Produced by Marine *Streptomyces rubber*. **African Journal of Biotechnology**. 9(38): 6355-6364. 2010.

FENNER, R; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 42, n. 3, jul./set., 2006.

FISHER, I.H.; KIMATI, H.; MARTINS, M.C. Isolamento, caracterização cultural-morfológica, patogenicidade e serologia de *Streptomyces* spp. da batata. **Fisiopatologia Brasileira**. V.28 (6): p.650-655. 2003.

FRISVAD, J.C.; YILMAZ, N.; THRANEL, U.; RASMUSSEN, K.B.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. *Talaromyces atroroseus*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. **Plos One**; v. 8, 2013.

GIOVANNONI, S.; J. **The Polymerase Chain Reaction** p. 177-303. In: E. Stackebrandt, and M. Goodfellow (ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York. 1991.

GRANATO, A. C.; BARBOZA, M.; ROMANO, L. H.; HERNANDEZ, I. L. C.; HOKKA, C. O.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; MONTENEGRO, R. C.; SOUSA, C. P. Comparison Of Growth Methods And Biological Activities Of Brazilian Marine *Streptomyces*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. Vol. 30, No. 01, pp. 125 – 131. 2013.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycol.**, v.67, p.597-607, 1975.

HIGAL, R. A.; AYDOS, R. D.; SILVA, I. S.; RAMALHO, R. T.; SOUZA, A. S.V. Study of the antineoplastic action of *Tabebuia avellanadae* in carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol. 26. Pg.125. 2011.

JIN, C.; XIN, X.; YU, S.; QIU, J.; MIAO, L.; FENG, K.; ZHOU, X.. Antidiatom activity of marine bacteria associated with sponges from San Juan Island, Washington. **World J Microbiol Biotechnol**. V. 30, p.1325–1334. 2014.

KUBOYAMA, R. H. Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco. 2009, Tese (doutorado), Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, UNICAMP. Campinas, SP. 2009.

LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York. 1991.

LEE, S.D. “*Kineococcus rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil”. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 559, p. 2204-2207. 2009.

LI, L.; TIAN, H.; CHENG, Y.; JIANG, Z.; YANG, S. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 780-787. 2006.

LIANG, Y.L.; ZHANG, Z.; WU, M.; WU, Y.; FENG, J.X.. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**. P.13. 2014.

LOHANS, C.T.; VAN BELKUM, M.J.; COCHRANE, S.A.; HUANG, Z.; SIT, C.S.; MCMULLEN, L.M.; VEDERAS, J.C. Biochemical, Structural, and Genetic Characterization of Tridecaptin A1, an Antagonist of *Campylobacter jejuni*. **ChemBioChem**, v.15, pg243 – 249. 2014.

LORENTZ, R.H.; ÁRTICO, S.; DA SILVEIRA, A.B.; EINSFELD, A.; CORÇÃO, G.. Evaluation of antimicrobial activity in *Paenibacillus* spp. strains isolated from natural environment. Letters in **Applied Microbiology**. V 43, p.541–547. 2006.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; Ó PESSOA, C.; LOTFUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v21(3). p456-464. 2011.

MEINICKE, R.M. **Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCt 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso**. Dissertação de Mestrado apresentado na Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chem.** v. 31, p. 426- 428, 1959.

MOURA, K.C.G.; EMERY, F.S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M.C.F.R.; DANTAS, A.P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S.L.; PINTO, A. V. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives: A Review from an Interdisciplinary Study. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 12, No. 3, 325-338, 2001.

NASCIMENTO, R.P.; JUNIOR, N.A.; PEREIRA JR. N.; BOM, E.P.S.; COELHO, R.R.R.. Brewer's spent grain and corm steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**. 48. 529-535. 2009.

NERI, A.V.; MEIRA NETO, J. A. A.; SILVA, A.F.; MARTINS, S. V.; BATISTA, M. L. Análise Da Estrutura De Uma Comunidade Lenhosa Em Área De Cerrado *Sensu Stricto* No Município De Senador Modestino Gonçalves, Norte De Minas Gerais, Brasil. **Sociedade de Investigações Florestais R. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.1, p.123-134, 2007.

OSPINA, F. G; ARAGÓN, D. M. N.; VERGEL, N. E.; ISAZA, G. M.; PÉREZ, J. E. C. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *phenax rugosus* (poir.) Wedd and *tabebuia chrysanta* g. Nicholson. **Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica**. Págs. 49-55. Vol. 18, número 1, ano 2011.

PIZA, ANA ; HOKKA, CARLOS ; SOUSA, CRISTINA . Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (Melastomataceae) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 4, p. 281-291, 2015.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**. V.80 (3): pg. 223-230, 1997.

RIBEIRO, J.F.; RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S. Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests Plant Diversity, Biogeography, and Conservation. **Biodiversity Patterns of the Woody Vegetation of the Brazilian Cerrado**. Chap.2. P. 31–66. 2006.

RODRIGUES, R.L. **Fungos Endofíticos Associados À *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) Presente em Afloramentos Rochosos nos Estados de Minas Gerais e Tocantins**. **Dissertação mestrado- universidade federal de ouro preto**. Pós graduação em ecologia de biomas tropicais- 2010.

ROSADO, A.S.; SELDIN, L. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9. p. 521–528. 1993.

SADANANDA, T. S.; NIRUPAMA, R.; CHAITHRA, K.; GOVINDAPPA, M.; CHANDRAPP, C. P.; SARZI, I.; VILLAS BOAS, R.L.; SILVA, M.R.; CARVALHO, J. L. Características biométricas de mudas de *Tabebuia chrysotricha* (standl.) Formadas em diferentes substratos e soluções de fertirrigação, quando plantadas em campo. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.34. p.241-249. 2010.

SILVA, A.C.O.; ALBUQUERQUE, U.P. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta bot. bras**. V.19(1). p17-26. 2005.

SUBRAMANI, R.; KUMAR, R.; PRASAD, P.; AALBERSBERG, W. Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. V.3, Issue 4, pg 291–296. 2013.

VEGGI, P.C.; PRADO, J.M.; BAGLION, G.A.; EBERLIN, M.N.; MEIRELES, M.A. A. Obtaining phenolic compounds from jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark by supercritical fluid extraction. **J. of Supercritical Fluids**, v.89 p. 68–77. 2014.

VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; RODRIGUES, C.; SILVA PEREIRA, C.; DIJSTERHUIS, J.; SEIFERT, K.A.; JACOBS, K.; SAMSON, R.A. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. **Persoonia**.; v.31 p.42–62. 2013.

WU, X.C.; QIAN, C.D.; FANG, H.H.; WEN, Y.P.; ZHOU, J.Y.; ZHAN, Z.J.; DING, R.; LI, O.; GAO, H.. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbial Biotechnology**. V.4, p. 491–502. 2011.

YASINOK, A. E.; ŞAHIN, F. I.; HABERAL, M.. *Isolation of Endopyhtic and Xilanolytic Bacillus pumilus Sstrains from Zea mays*. **Tarim Bilimleri Dergisi**. V.14 (4) p.374-380. 2008.

ZHANG, C. E.; KIM, SE-K. *Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects*. **Mar. Drugs**. v. 8, pg.1920-1934. 2010.

Moura, R.M.; Queiroz, A.F.S.; Fook, J.M.S.L.L.; Dias, A.S.F.; Monteiro, N.K.V.; Ribeiro, J.K.C.; Moura, G. E.D.D.; Macedo, L.L.P.; Santos, E.A.; Sales, M.P.. *CvL, a lectin from the marine sponge Cliona varians: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*145. Pg.517–523. 2006.

10 Anexos

Anexo I

<p>DAMHA GOLF CLUB PARQUE ECO-ESPORTIVO DAMHA – SÃO CARLOS – SP CNPJ: 08.618.164/0001-99 ROD. SP 318 – KM 234 (Estrada São Carlos – Ribeirão Preto) www.dgc.com.br - e-mail: golf@damha.com.br</p>	
--	---

AUTORIZAÇÃO

Autorizo para fins de pesquisa, a coleta de folhas de exemplares de Ipê Amarelo (*Tabebuia aurea*), Ipê Branco (*Tabebuia roseoalba*), Ipê Rosa (*Tabebuia heptaphylla*), Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa*) e de Jatobá (*Hymenaea courbaril*), localizados nas dependências do DAMHA GOLF CLUB (PARQUE ECO-ESPORTIVO DAMHA – SÃO CARLOS – SP), pelo Prof. Alberto Colli Badino Junior do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

São Carlos, 15 de março de 2012.



Carlos Gonzalez

Presidente do DAMHA GOLF CLUB

Anexo II

Sequenciamentos de DNA bacteriano realizados sem necessidade de extração de DNA:

Sequenciamento IB3:

ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTANGGGAAGAA
CAATGCGAGAGTAACTGCTCGCA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAT
TGGAAGCTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTA
GTGCTGAAGCTAACGCATTAAGC
ACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TACTT

Sequenciamento IB5:

CACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAA
CATATGTGTAAGTAACTGTGCAC
ATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAGCTGGAAAAGTGGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGCAGAGATATGGAGGA

ACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGT
GGGGATCAAACAGGATTAGATAA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG

Sequenciamento IB7:

GAGTGATGAAGGTTCTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGA
AGTAACTGCTCGCACCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAAC
CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG
GAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG

Sequenciamento IA2:

CGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTANGG
GAAGAACAAGTGCGAGAGTAACT
GCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT

AGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCGG
CCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCA
TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTAAT

Sequenciamento IA3:

CTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAGTGCTAGTTGAA
TAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGT
GGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGGC
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTT
CCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAA
CGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCG

Sequenciamento IRS2:

GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGTGGGAAGAACG
CTTGCGAAGTAACTGCTCGCAAG
GTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGGCGGCCTTGTAAGTCTGTCGTTTAAACTCGG
AGCTCAACTTCGAGTCGAGATGG

AAACTGCAAAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC

Sequenciamento IRX1:

TCGGGTCGTAAA ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTATTGAATAAGCTGGCACC
TTGACGGTACCTAACCAGAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG
CAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG

Sequenciamento IRX2:

GCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAA ACTCTGTTGTTAGGGAAGACAAG
TGTATTGAATAAGCTGGCACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTATCAGGAA
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGG
CTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG AATTCCATGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATATGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTTACTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCC

Sequencias que tiveram que ter o DNA extraído

Sequenciamento IA1:

GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAG
TGCGAGAGTAACTGCTCGCACCT
TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA

ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCG
GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA

Sequenciamento IA4:

GATGGACGAAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
AATACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAAAA
GCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
TGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG
TGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGCAA
CTCAGAGGAATTGACGGTGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTG

Sequenciamento IA5:

TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTACGAGAGT
AACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC

AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATAACC

Sequenciamento IA6:

GCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGA
TGCGGTTAATAACCGCGTCGATTG
ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGC
TTAACCTGGGAAGTGCATTTGAA
ACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGAGATCTGGAGGAATAACCG
GTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCG

Sequenciamento IA7:

TCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGA
ATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCCACGGCTCAACCG
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG

ATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGC
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGT
TTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTT
AACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGANACTCAAGGGA
ATTGACGGGGGGCCCGCAACAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTA

Sequenciamento IB1:

TCGATGGGCGAAAGCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG
TAAAGCTCTGTTGCCAGGGNAAGA
ACGTCTTGTAGAGTAACTGCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG
GCTCTTTAAGTCTGGTGTTTAATC
CCGAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGA
GAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTA
GGTGTTAGGGGTTTTCGATACCCTT
GGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGGAAGACTGA
AACTCAAAGG

Sequenciamento IB2:

ACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGG
GAAGAACGTCTTGTAGAGTACTG
CTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAAGTCTGGTGT
AATCCCGAGGCTCAACTTCGGGT

CGCACTGGAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGG
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATAA
CCCTTGGTTGCCG

Sequenciamento IB4:

CGATGGACGAAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCG
TAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAA
AAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAGTGCTA
AGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG

Sequenciamento IB6:

ACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGG
GAAGAACAAGTGCGAGAGTAACT
GCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGA
GGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTG
TAGCGGTG

Sequenciamento IRS1:

CGATGGACGAAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCG
TAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTG
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGAGGCGCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT
TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAAGCTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGT

Sequenciamento IRS3:

TGATGGACGAAAGTCTGACGGAGCACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCG
TAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAA
CAAGTTGAGAGTAACTGCTCGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC
ACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAA
AGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAA
CTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA

Anexo III

 <p>Universidade Federal do Ceará</p>	 <p>Laboratório de Oncologia Experimental</p>
<p>FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA - Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> em linhagens celulares de câncer –</p> <p>Data de recebimento: / / Protocolo N°:</p>	
<p>PROCEDÊNCIA</p>	
Data de envio	09/ 10/13
Convênio	
Solicitante	Luis Henrique Romano
Telefone de contato	16-98812-9169
e-mail	Rickromano_ha@hotmail.com
<p>INFORMAÇÕES GERAIS</p>	
Código adotado pelo solicitante	
Quantidade enviada (mg)	25 mg
Tipo	<input checked="" type="checkbox"/> Extrato Bruto <input type="checkbox"/> Óleo Essencial <input type="checkbox"/> Fração Cromatográfica <input type="checkbox"/> Substância Pura
Solubilidade	solúvel em água
Origem	<input type="checkbox"/> Planta <input checked="" type="checkbox"/> Microrganismo <input type="checkbox"/> Organismo Marinho <input type="checkbox"/> Síntese
Local da coleta	São Carlos São Paulo
Data da coleta	03/06/11
Família, gênero e espécie	<i>Penicillium</i> sp

Nome(s) popular(es)	Fungo Filamentoso
Uso popular	
SUBSTÂNCIA PURA-INFORMAÇÕES QUÍMICAS	
Nomeclatura	
Fórmula química / Peso molecular	
Estrutura química	
INFORMAÇÕES ADICIONAIS	
Bibliografia relacionada	
Data prevista para defesa de tese ou dissertação (quando for o caso)	30/03/2015



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Laboratório de Oncologia Experimental (LOE)

**LAUDO TÉCNICO DO ESTUDO DAS AMOSTRAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

Avaliação do potencial citotóxico em três linhagens de células tumorais

LAUDO Nº:
Nº. de Páginas: 04

Pesquisador responsável pela Amostra:
Prof. Dr. Luis Henrique Romano

Pesquisadores Responsáveis (LOE):

Cláudia do Ó Pessoa, MSc, PhD
cpeessoa@ufc.br

Teiliane Rodrigues Cameiro, MSc, Doutoranda em Biotecnologia
teilipet@yahoo.com.br

Laboratório de Oncologia Experimental (LOE)

Rua Coronel Nunes de Melo, 1127

Fortaleza – Ceará – Brasil

C EP: 60.430-270

Tel: (85) 3366-8255 Fax: (85) 3366-8333

<http://www.unifac.med.br/loe/index.asp>

CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

OBJETIVO

Verificar a citotoxicidade *in vitro* de substâncias puras em três linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral destas amostras.

MATERIAL

Células: As linhagens tumorais utilizadas, OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em água e DMSO. Os extratos foram testados na concentração única de 50µg/mL.

MÉTODO

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *e colaboradores.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *e colaboradores.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens OVCAR-8 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

RESULTADOS

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na **Tabela 1**, com seus respectivos percentuais de inibição. Apenas os extratos que apresentarem valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) são escolhidas para avaliações subseqüentes, valor esse considerado como *cut-off* para o *screening* de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela 1 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Valores são média \pm DPM.

Amostra		HCT	SD	SF 295	SD	OVCAR8	SD
Nº	Identificação	GI% média		GI% média		GI% média	
1	<i>P. minioluteum/T. minioluteus</i> (IJ1)	15,11%	3,41%	35,98%	0,93%	4,43%	0,77%
2	<i>Paenibacillus terrae</i> (IB1/2)	97,36%	0,32%	86,64%	2,49%	94,37%	2,21%

CONCLUSÃO

Dentre as amostras analisadas, a amostra 3 apresentou potencial citotóxico nas três linhagens celulares testadas e se dará continuidade a avaliação.

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
- SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BODESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82(13): 1107-1112, 1990.

Anexo IV

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: GGG	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS RELATÓRIO TÉCNICO	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/4
---	--	--

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 834/13 DRM	PÁGINA: 1 de 2
-----------------------------------	----------------

1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE

RAZÃO SOCIAL: Luiz Henrique Romano		
ENDEREÇO: Rodovia Washington Luís, km 235-SP 310		
CIDADE: São Carlos	UF: SP	CEP: 13565-905
CNPJ/CPF: 32.597.699/862	INSCRIÇÃO ESTADUAL: 0	

2 – DADOS DAS AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: fungo	No.CPS: 159/13
TOTAL DE AMOSTRAS: 1	LOCAL DE PRODUÇÃO: não se aplica
LOTE:	VALIDADE:

3 – ENSAIOS

ENSAIOS REALIZADOS: identificação de linhagem de fungo
NÚMERO DOS PROCEDIMENTOS (E/R)
PTMDRM-05

4 – EXECUÇÃO DOS ENSAIOS

DIVISÃO Recursos Microbianos	
CPQBA – UNICAMP	
AV. Alexandre Cazelatto, 999 - Vila Betel – Paulínia – SP - CEP: 13140-000	
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO: Dertene Atili de Angelis	
DATA DO RECEBIMENTO DA AMOSTRA	08/10/2013
PERÍODO REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS	DE: 08/10/2013 A 13/12/2013
DATA DE EMISSÃO DO RELATÓRIO	

CPQBA - UNICAMP, 13 de dezembro de 2013

 RESPONSÁVEL PELO ENSAIO	 COORDENADOR DA DIVISÃO	 DIRETOR DO CPQBA
--	--	---

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos utilizados, sendo vetado seu utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometer. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: conpesq@cpqba.unicamp.br



FMQ-07
Emissão: GGG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 834/13 DRM

PÁGINA: 2 de 2

Identificação de fungos filamentosos

1. Objetivos

- Identificação de uma linhagem de fungo filamentosos utilizando sequenciamento e análise filogenética de fragmentos de genes do *operon* ribossomal.

2. Metodologia utilizada

- **Extração de DNA genômico.** O DNA genômico das amostras foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985).
- **Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS4.** A metodologia consistiu na amplificação pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 (para a amplificação da região ITS) para a amostra de **CPQBA 834-13 DRM 01**.
- **Sequenciamento.** Os fragmentos amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram ITS-1 e ITS-4.
- **Análise filogenética.** As sequências parciais da região ITS obtidas foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

3. Resultados

- Fragmentos da região ITS da amostra **CPQBA 834-13 DRM 01** foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O material foi purificado em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetido ao sequenciamento automático no sistema ABI3500XL Series (Applied Biosystem).
- A sequência de DNA da região ITS1-5.8S-ITS4 obtida para a amostra **CPQBA 834-13 DRM 01** está apresentada no **Anexo I**. Esta sequência foi analisada usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (*Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre*).
- A árvore filogenética construída a partir da sequência da amostra **CPQBA 834-13 DRM 01** e das sequências recuperadas no GenBank está apresentada na **Figura 1**.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometerem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: conpesq@cpqba.unicamp.br



FMO-07
Emissão: GGO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 834/13 DRM

PÁGINA: 3 de 2

- O resultado de identificação para a amostra está apresentado na tabela abaixo:

Amostra	Identificação do cliente	Resultado da identificação
CPQBA 834-13 DRM 01	LH	<i>Talaromyces complexo minioluteus</i> (<i>Penicillium complexo minioluteum</i>)

4. Comentários

O sequenciamento do fungo filamentosso CPQBA 834-13 DRM 01 apresentou o seguinte resultado:

- A sequência parcial da região ITS da amostra CPQBA 834-13 DRM 01 apresentou 100% de similaridade com sequências da mesma região da espécie *Penicillium minioluteum*, depositadas no banco de dados GenBank e do CBS. Entretanto, não formou um agrupamento bem suportado para definir a espécie mencionada acima (Figura 1). Especialistas ressaltam que atualmente o complexo *minioluteus* passa por uma ampla revisão taxonômica. Assim, com base nos resultados das análises moleculares, a cultura CPQBA 834-13 DRM 01 pode ser identificada como *Talaromyces complexo minioluteus*/*Penicillium complexo minioluteum*, fases sexuada e assexuada, respectivamente.

5. Referências Bibliográficas

- Houbraken J, Samson R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology* 70:1-51, 2011.
- Kimura, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120, 1980
- Raeder, J.; Broda, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v. 1, p. 17-20, 1985.
- Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425, 1987.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J.D. Higgins, D.G. Gibson, T.J. Clustal, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680, 1994.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



UNICAMP
FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 834/13 DRM

PÁGINA: 4 de 2

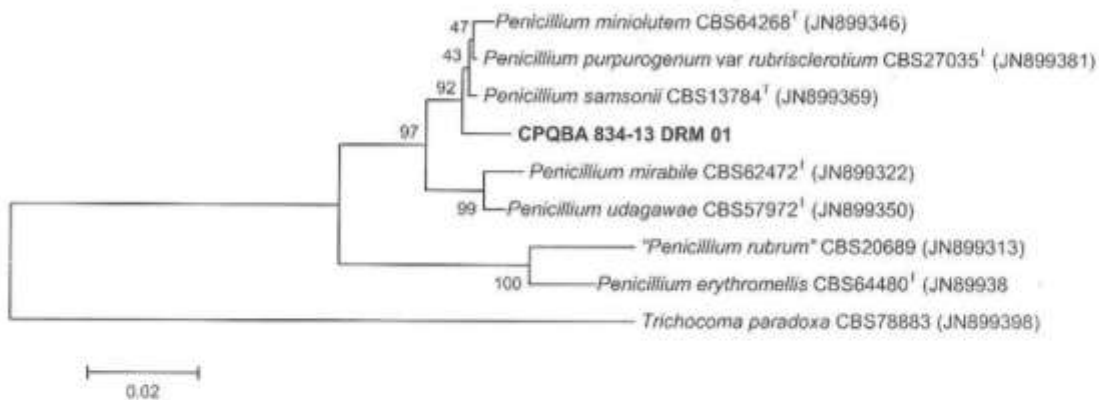


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais dos genes ribossomais da amostra **CPQBA 834-13 DRM 01** e de sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e Genbank.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vedada sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.



FMQ-07
Emissão: GGO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 834/13 DRM

PÁGINA: 5 de 2

Anexo I. Sequência parcial do *operon* ribossomal.

```
>CPQBA 834-13 DRM 01
CTCCCACCCGTGTCTCTTGAATACCCTGTTGCTTTGGCGGGCCACCGGGCCACCCCGG
TGGCCGGGGGCACTGCGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCAGAGCGCCTGTGAACCCTAATG
AAGAAGGACTGTCTGAGTCTAOGATATAATTATCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGG
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATCCG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGT
CCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTGGGCGTGGTCCCCCGGTGTC
GGGGGGACCTGCCCCAAAAGGCAGCGGCGACGTTCCGCCTAGGTCTCGAGCGTATGGGGC
TTTGTCAACCCGCTCGGGAGGGGCTACGGGCGTTGGCCATCCACCAATTTTTTACGGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGAGTTACCCG
```

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

Anexo V

As duas árvores filogenéticas representadas abaixo, foram elaboradas com base nos os marcadores RPB1 e RPB2 para o isolado fúngico disponibilizado para análise filogenética. O isolado passou a ter um código de referência CML 2719, uma vez que foi depositado na Coleção Micológica de Lavras (Fiel Depositária) com o código CML 2719.

Como pode ser observado nas árvores filogenéticas, as análises demonstram que o isolado pertence ao gênero *Talaromyces* e a espécie.

Figura X: Arvore filogenética 1 para o Isolado FJ1

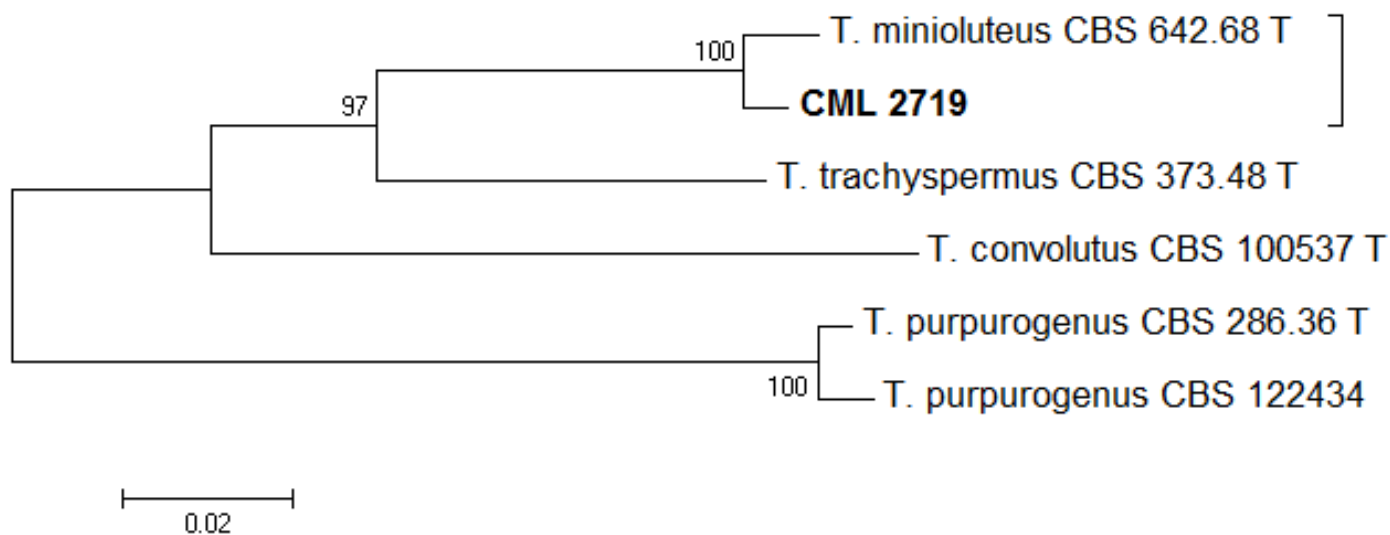
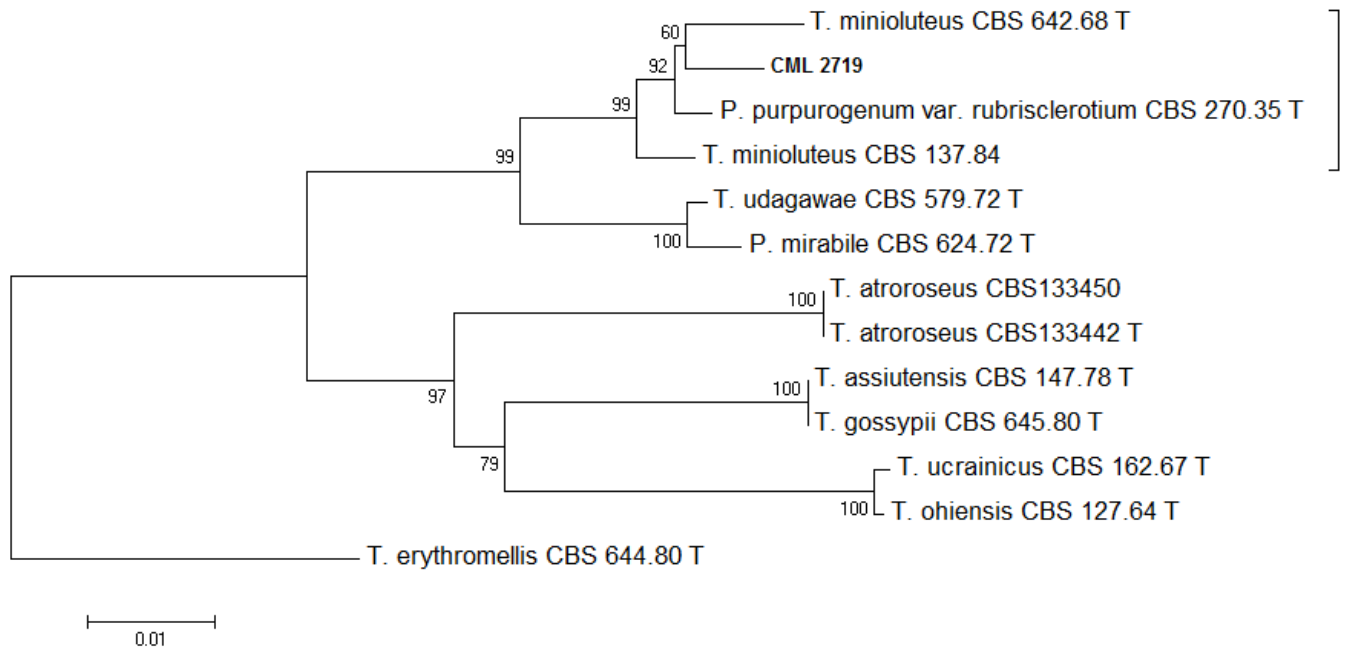


Figura X: Arvore filogenética 2 para o Isolado FJ1



Anexo VI

Teste de atividade leishmanicida do caldo bruto de cultivo de *Paenibacillus terrae*. O cultivo foi realizado em mesa incubadora rotativa em meio ISP2, nas condições de 200 rpm, 28° C, com tempo de cultivo de 72 horas.

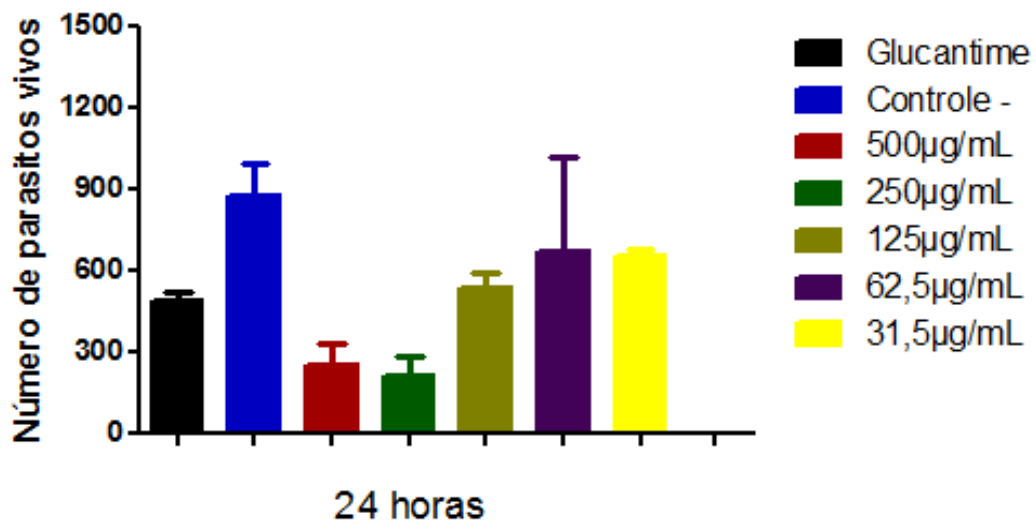
Metodologia

Para os ensaios, o extrato bruto foi diluído em meio 199 completo, em 10% de DMSO. Em placas de 96 poços, foi plaqueado 100 µL do extrato bruto nas concentrações de 500 a 31,25 µg/mL. Em cada poço, foi adicionado 10µL de parasitos na concentração de $6,3 \times 10^4$. As mesmas concentrações foram utilizadas para o Glucantime® como droga de referência. O controle negativo foi obtido a partir de cultura das formas promastigotas em meio 199 completo. A atividade leishmanicida dos extratos foi avaliada pela inibição do crescimento de formas promastigotas, indicada pela contagem do número total de promastigotas vivas, após 24h de incubação a 26 °C, em câmara de Neubauer em aumento de 400X. Cada concentração dos extratos foi analisada em triplicata.

As doses do extrato bruto terão suas concentrações aumentadas até que seja determinado um efeito inibitório do crescimento parasitário de 50% (IC 50).

Os resultados foram expressos com média \pm EPM. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados utilizando o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (2005) (San Diego, Califórnia, USA) pelo teste não - paramétrico One-way ANOVA (*One-Way analysis of variance*), pós-teste pelo método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$ (Figura 1).

Figura 1: Resultados de inibição de parasita do gênero *Leshmania* por caldo de cultivo de *Paenibacillus terrae*(IB1/IB2).



Fonte: Fonseca, D.