

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

“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE  
*Casearia sylvestris* SOBRE MICRORGANISMO ENDOSSIMBIONTE  
DE *Diabrotica speciosa*”

**Fabiana Aparecida Marques\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

\*Bolsista CAPES

São Carlos – SP

2013

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

M357ip

Marques, Fabiana Aparecida.

Investigação do potencial antimicrobiano de *Casearia sylvestris* sobre microrganismo endossimbionte de *Diabrotica speciosa* / Fabiana Aparecida Marques. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
173 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

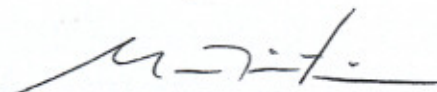
1. Química orgânica. 2. Microorganismos endossimbiontes. 3. *Diabrotica speciosa*. 4. Antimicrobiana. 5. *Casearia sylvestris*. 6. Fitoquímica. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado Acadêmico

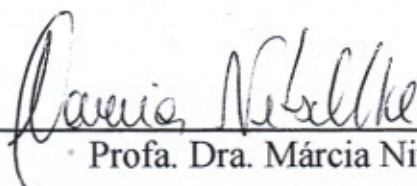
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Fabiana Aparecida Marques, realizada em 27 de março de 2013:*



---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



---

Profa. Dra. Márcia Nitschke



---

Prof. Dr. João Batista Fernandes

*À minha querida  
mãe Maria de Fátima, que se doou inteiramente à  
confiança que tem em mim, renunciando às vezes de  
seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu  
e aos meus irmãos pelo apoio irrestrito.*

***Dedico*** esse trabalho, muito obrigada!

*“É preciso que eu suporte duas ou três  
larvas se eu quiser conhecer as borboletas.”*

Antonie de Saint Exupéri

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente à Deus, pois sem seu consentimento e sua bênção não teria chegado ao final de uma etapa tão importante em minha vida profissional.*

*À minha mãe querida e irmãos, pela preocupação, amor, carinho e educação que sempre me deram e por me ensinarem que é sempre fazendo o meu melhor que se atinge os objetivos, mesmo que surjam obstáculos, nunca desistir. Ao meu namorado Jozemir Miranda, pelo apoio irrestrito e paciência.*

*Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, por ter me aceito como aluna de mestrado, pela paciência em me orientar e pela confiança e autonomia para a realização do trabalho, obrigada.*

*Ao Prof. Dr. Arlindo Boiça, por ter gentilmente cedido os insetos para a realização deste estudo.*

*Ao Dr. Leonardo Toffano, com quem sem dúvida aprendi toda base em trabalhar com microbiologia, seus ensinamentos serão certamente guardados sempre.*

*Ao mestrando Evandro Pietro, pela disponibilidade em ajudar e a discutir na parte de biologia molecular.*

*Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelas análises no MALDI, em especial à sua aluna de doutorado Marília Almeida Trapp, pela ajuda nos experimentos e a disponibilidade de discussão.*

*Ao Prof. Dr. Paulo César Vieira, pela realização dos experimentos no fluorímetro, em especial às suas alunas de doutorado Suelem, Vivian e Roberta por estarem sempre dispostas à ajudar.*

*Aos professores, Dr. Moacir Rossi Forim, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dr.<sup>a</sup> Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dr. João Batista Fernandes,*

*Dr. Edson Rodrigues Filho e o Dr. Antônio Gilberto Ferreira, pela capacidade de cederem o excelente espaço físico e estrutura instrumental utilizada no trabalho.*

*À secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Programa de Excelência Acadêmica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.*

*Aos alunos do grupo que diretamente contribuíram neste trabalho, Gustavo, Naiara, Anderson, Karen e Bruno. E aos demais do grupo pela convivência e discussões: Inajá, Patrícia, Eveline, meus agradecimentos.*

*À todos amigos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais pelas discussões e amizade. Em especial alguns que de alguma forma sempre mais próximos: Rodrigo, Leila, Karla, Vanessa, Sâmya, Cristovam, Roberta, Liliane, Israel, André e Marsele.*

*Às minhas companheiras de república: Maura, Livia, Lorena e Rita, por sempre estarem dispostas a ouvir, sempre apoiando e aconselhando nos mais variados momentos do mestrado, o que facilitou superar os momentos mais difíceis aqui em São Carlos.*

*Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente cooperaram para finalização dessa etapa em minha vida, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!*

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1-Plantas do cerrado e aplicações biológicas .....	5
TABELA 1.2-Casearinas de A-X, grupos substituintes (Adaptada de BANDEIRA et al., 2004).....	9
TABELA 1.3-Exemplos de metabólitos secundários isolados de <i>C. sylvestris</i> . ....	10
TABELA 3.1-Componentes nutricionais dos meios de cultura comerciais utilizados no isolamento. ....	33
TABELA 3.2-Codificação dos microrganismos isolados.....	71
TABELA 3.3-Procedimentos para preparo dos reagentes usados na coloração de Gram. ....	39
TABELA 3.4- <i>Primers</i> selecionados. ....	44
TABELA 3.5-Condições para o programa no termociclador. ....	44
TABELA 3.6-Composição e quantidade recomendada para o preparo dos caldos de meio de cultura.....	48
TABELA 4.1-Resultados das colorações de Gram das cepas bacterianas. ....	74
TABELA 4.2-Isolados bacterianos- identificações e características. ....	94
TABELA 4.3-Valores de absorvância obtidos para construção da curva de crescimento. ....	99
TABELA 4.4-Concentrações de resazurina utilizadas e os valores de fluorescência obtidas. ....	111
TABELA 4.5-Valores obtidos de precisão, exatidão e teste do duplo cego para do método validado.....	114
TABELA 4.6- ANOVA do modelo de regressão linear para curva de calibração do corante resazurina .....	116



TABELA 4.7-Resultados de atividade antibacteriana dos extratos de plantas do cerrado.....	118
TABELA 4.8-Resultados de atividade antibacteriana das frações de <i>C. sylvestris</i> . .....	120
TABELA 4.9-Resultados de atividade antibacteriana das frações de <i>Psidium laruotteanum</i> . .....	122
TABELA 4.10-Dados de deslocamentos de RMN de <sup>1</sup> H do marcador de referência diterpênico e comparação com a literatura com o composto - <i>Argutin D</i> - (WHISTSON et al., 2010).....	126
TABELA 4.11- Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da catequina - Ref 20 (SF6) em comparação com dados da literatura (LÔBO et al, 2008).....	135
TABELA 4.12 – Correlações observadas através dos mapas de contorno em 2D. .....	146
TABELA 4.13- Quantidade do padrão de referência (Ref 7-11 (SF6)) determinada nos extratos provenientes de <i>C. sylvestris</i> .....	152
TABELA 4.14- Relação entre as concentrações molares do marcador nos extratos com a porcentagem de inibição frente à <i>Luteibacter sp.</i> .....	153

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1-Metabólitos secundários de interesse inseticida. Nicotina (1), piretrina (2), epóxido de cariofileno (3), azadirachtina (4) e a rotenona (5).....	3
FIGURA 1.2-Estados brasileiros e seus biomas (Adaptada de RADA, 2013).....	4
FIGURA 1.3- <i>Casearia sylvestris</i> Swartz. A- Hábito; B- Flor; C- Detalhe do disco e estame; D- Gineceu; E- Fruto; F- Detalhe da rede de nervação e aspecto do bordo (MARQUETE, 2001). .....	6
FIGURA 1.4-Esqueleto básico das casearinas. ....	8
FIGURA 1.5- Fases de desenvolvimento da <i>D. speciosa</i> . ....	16
FIGURA 1.6- Relações simbióticas entre insetos e microrganismos (Adaptada de KITANO & ODA, (2006). .....	18
FIGURA 3.1-Imagens de: A) <i>D. speciosa</i> fase adulta (“vaquinha patriota”); B) <i>D. speciosa</i> fase larval (“larva-alfinete”) e C) cativeteiro de criação da larva de <i>D. speciosa</i> . ....	34
FIGURA 3.2- Procedimento de isolamento dos microrganismos endossimbiontes de <i>D. speciosa</i> . A) trato digestivo do inseto adulto; B) larva e C) procedimento de esterilização.....	35
FIGURA 3.3- Representação esquemática da codificação atribuída às cepas microbianas isoladas.....	37
FIGURA 3.4- Processo de coloração de Gram para as células bacterianas.....	40
FIGURA 3.5-Placa de MALDI utilizada nas análises dos microrganismos.....	42
FIGURA 3.6- Procedimento de diluição seriada para seleção da concentração (UFC) microbiana como inóculo para construção da curva de crescimento. ....	47
FIGURA 3.7-Imagens dos frascos incubados para a realização das medidas de densidade óptica do crescimento microbiano da bactéria IBDeL6. a) 1 hora e b) 32 horas de incubação. ....	49
FIGURA 3.8- Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico (ExBCs). ....	60
FIGURA 3.9- Fluxograma de fracionamento da fração acetato de etila (FrAcCs). 61	

FIGURA 3.10- Fluxograma de fracionamento da Ref20(SF6). .....	62
FIGURA 3.11- Fluxograma de fracionamento da Ref 7-11(SF6).....	63
FIGURA 3.12- Fluxograma de fracionamento da Ref47(ColH) e da Ref1-4(SF8).64	
FIGURA 3.13- Fluxogramas de A): Fracionamento da FrHexCs e B): Fracionamento da Ref 98-103(ColE). .....	65
FIGURA 4.1-Placas com crescimento exacerbado de microrganismos. A e B) Frente e fundo- microrganismos desenvolvidos do material fecal, isolamento II, meio de BDA; C) várias colônias bacterianas distintas- desenvolvidas do material fecal, isolamento II, meio de NA.....	69
FIGURA 4.2-Cepas microbianas purificadas. IFDeA4) Fungo do isolamento I, BDA, proveniente do inseto adulto; IFDeL8) Fungo do isolamento I, BDA, larva; IBDeA3) Bactéria do isolamento I, NA, inseto adulto; IIBDeF1) Bactéria do isolamento II, NA, material fecal; IIFDeA15) Fungo do isolamento II, BDA, adulto; IBdeA1) Bactéria do isolamento I, NA, adulto; IBDeA5) Bactéria do isolamento I, NA, adulto e IIBDeA13) Bactéria do isolamento II, NA, adulto. ....	70
FIGURA 4.3-Teste de Gram obtidos para os isolados bacterianos.....	75
FIGURA 4.4-Análises morfológicas das cepas fúngicas.....	77
FIGURA 4.5-Agrupamentos através das análises morfológicas das cepas fúngicas isoladas. ....	78
FIGURA 4.6-Micro imagens morfológicas de conídios, hifas e conidióforos para A) cepa isolada da larva de <i>D. speciosa</i> , IFDeL4 e B) dados da literatura (CROUS et al., 2007).....	79
FIGURA 4.7-Micro imagens morfológicas de conídios e conidióforos para A) cepa isolada da larva de <i>D. speciosa</i> , IIFDeF7 e B) dados da literatura (OVERY & FRISVAD, 2003).....	80
FIGURA 4.8-Esquema geral para agrupamento dos microrganismos por MALDI- TOF MS. ....	82
FIGURA 4.9- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de <i>D. speciosa</i> , bactérias crescidas em NA; perfil protéico adquirido em modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo I.....	84

FIGURA 4.10 - Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de <i>D. speciosa</i> , bactérias crescidas em NA (24horas); perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo II.....	85
FIGURA 4.11- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de <i>D. speciosa</i> , bactérias crescidas em NA; perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)-Grupo III e IV.....	86
FIGURA 4.12- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de <i>D. speciosa</i> , bactérias crescidas em NA (24horas); perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo V.....	87
FIGURA 4.13- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas fúngicas do segundo isolamento de <i>D. speciosa</i> , fungos crescidos em BDA (48 horas); perfil protéico adquirido em modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo de fungos.....	88
FIGURA 4.14- Dendograma de agrupamento por MALDI-TOF dos isolados microbianos de <i>D. speciosa</i> e comparação com os resultados de agrupamento por Gram e isolados fúngicos.....	89
FIGURA 4.15- Representação esquemática dos ciclos da Reação em Cadeia da Polimerase. Este processo envolvendo as três etapas são repetidas em 30 ciclos, sendo que em cada ciclo a concentração de DNA pré-existente é aumentada. ....	92
FIGURA 4.16- Representação esquemática do experimento para obtenção da curva de crescimento. ....	97
FIGURA 4.17- Curva de crescimento da bactéria <i>Luteibacter sp.</i> em A) caldo Luria Bertani; B) caldo Muller Hinton e C) caldo Caldo Nutriente.....	100
FIGURA 4.18- Resultados obtidos nos ensaios de difusão em ágar, placas após 24 horas de incubação. A) Técnica do poço convencional (17ml de meio); B) Técnica do disco em placa. ....	104
FIGURA 4.19- Esquema reacional da redução da resazurina para resorufina na presença de enzimas advindas de células bacterianas vivas. ....	105
FIGURA 4.20- Resultado qualitativo do ensaio de inibição do crescimento bacteriano pelos extratos de <i>C. sylvestris</i> .....	106
FIGURA 4.21- Curva de calibração obtida para o corante resazurina.....	110

FIGURA 4.22- Gráfico de correlação entre fator de resposta e concentrações de resazurina. ....	112
FIGURA 4.23-Gráfico de resíduos demonstrando os resíduos distribuídos homocedasticamente. ....	115
FIGURA 4.24-Histograma de atividade antibacteriana sobre a <i>Luteibacter sp.</i> de extratos de plantas do cerrado.....	119
FIGURA 4.25-Histograma de atividade antibacteriana sobre a <i>Luteibacter sp.</i> de frações e metabólito de <i>C. sylvestris</i> . ....	121
FIGURA 4.26-Histograma de atividade antibacteriana sobre a <i>Luteibacter sp.</i> das frações de <i>Psidium laruotteanum</i> . ....	123
FIGURA 4.27-Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do marcador de referência diterpênico (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	125
FIGURA 4.28-Proposta estrutural da Ref 16-23(ColB) – A, e o composto referência da literatura ( <i>Argutin D</i> )- B.....	127
FIGURA 4.29- Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos e carbinólicos. ....	128
FIGURA 4.30 - Ampliação da região dos hidrogênios das posições 18 e 19.....	129
FIGURA 4.31- Ampliação da região de metilas olefínicas, ligadas a grupos carboxila e a carbonos sp <sup>3</sup> . ....	130
FIGURA 4.32- Espectro de massas <i>full scan</i> da inserção direta da Ref 16-23(ColB) no modo negativo. ....	131
FIGURA 4.33- Esquema de correlações do anel B. ....	132
FIGURA 4.34- Espectro de RMN <sup>1</sup> H da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	136
FIGURA 4.35- Mapa de contorno HSQC da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	137
FIGURA 4.36- Mapa de contorno HMBC da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD). ....	137

FIGURA 4.37- Espectro de COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	138
FIGURA 4.38- Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).33.....	139
FIGURA 4.39- A) Espectro de massas no modo negativo por ESI e B) espectro de ultravioleta visível da catequina. ....	139
FIGURA 4.40- Análise das refrações 14 à 21 da coluna F por CCDA.....	140
FIGURA 4.41- Cromatograma de íons totais contido na Ref 14-21 (ColF).....	141
FIGURA 4.42- Espectro de massas da catequina obtido pelo CG-EM por impacto eletrônico.....	141
FIGURA 4.43- Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ e DEPT 135 da Ref 14-21 (ColF) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	142
FIGURA 4.44- Mapa de contorno HSQC da Ref 14-21 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	143
FIGURA 4.45-Mapa de contorno HMBC da Ref 14 -21 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	144
FIGURA 4.46- Esquema de correlações para atribuição do grupo isopropila na estrutura do composto Ref 14-21 (ColF). ....	144
FIGURA 4.47- Espectro de RMN $^1\text{H}$ da Ref 14-21 (ColF) (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	145
FIGURA 4.48- - Esquema de correlações contribuintes na determinação estrutural da Ref 14-21 (Col F). ....	147
FIGURA 4.49- Proposta estrutural para a Ref 14-21 (ColF).....	148
FIGURA 4.50- Cromatograma do padrão Ref 7-11 (SF6), isolado da fração acetato de etila proveniente da folhas de <i>C. sylvestris</i> . Condições: Coluna C18 Gemini Phenomenex® (150x4,6mm) acoplada com uma pré-coluna C18 (Phenomenex), eluição gradiente utilizando uma fase ternária de água:acetonitrila:metanol 34:44:22 até 0:53:47 (%v/v) respectivamente, vazão de $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e comprimento de onda de 220 nm.....	149
FIGURA 4.51-Cromatogramas dos extratos submetidos à ensaio de atividade antibacteriano. A) Extrato bruto das folhas de <i>C. sylvestris</i> . B) Fração acetato de	

etila de *C. sylvestris* e C) Extrato diterpênico das folhas de *C. sylvestris*. Condições de análise idênticas às especificações da Figura 4.50. .... 151

## RESUMO

“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Casearia sylvestris* SOBRE MICROORGANISMO ENDOSSIMBIONTE DE *Diabrotica speciosa*” A *Diabrotica speciosa* é uma espécie que ocorre na maioria dos estados brasileiros, destacando-se como uma das principais pragas polípagas nas culturas de grãos. O entendimento da função da microbiota presente no trato digestivo deste inseto e a identificação de meios de interferir ou até mesmo destruir essa flora microbiana são conhecimentos que podem levar a um novo modo de ação para o controle de insetos praga. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana presente no trato digestivo de larvas e insetos adultos de *D. speciosa* e avaliar o potencial de *Casearia sylvestris* e extratos de plantas do cerrado como agente antimicrobiano. Como resultados, foram obtidos 19 isolados bacterianos e 8 fúngicos. Estes foram avaliados em termos de perfis protéico por MALDI-TOF/MS, e após a obtenção de agrupamentos estatísticos alguns microrganismos foram identificadas através do seqüenciamento de rDNA região 16S. As bactérias identificadas foram: *Pantoea agglomerans*, *Luteibacter sp.*, *Serratia marcescens*, *Acidovorax temperans* e *Pseudomonas sp.* Dos isolados fúngicos, dois foram identificados através de comparação morfológica como dados da literatura, pertencendo aos gêneros; *Cladosporium sp.* e *Penicillium sp.* Um estudo mais aprofundado foi realizado com a bactéria *Luteibacter sp.* isolada da larva, que teve seu perfil de crescimento avaliado, possibilitando o ajuste de parâmetros para realização de ensaios antimicrobiano. Para estes ensaios foram testadas metodologias de difusão em ágar e por microdiluição em placa de ELISA®, sendo na segunda metodologia obtido os melhores resultados. Assim, uma metodologia por microdiluição foi validada através da utilização do fluorímetro, analisando figuras de mérito como faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, etc. O método por microdiluição foi aplicado ensaiando extratos, frações e metabólitos de plantas do cerrado. O estudo fitoquímico das folhas de *C. sylvestris* propiciou o isolamento de um sesquiterpeno tricíclico inédito na literatura, um flavonóide (catequina) e um diterpeno clerodânico que foi utilizado como marcador de referência para controle cromatográfico de qualidade de extratos e frações *C. sylvestris* que foram submetidos a ensaios antimicrobianos.

Palavras – chave: Microrganismos endossimbiontes, *Diabrotica speciosa*, plantas do cerrado, ensaios antimicrobianos, *Casearia sylvestris*, fitoquímica.



## ABSTRACT

“INVESTIGATION OF THE POTENTIAL ANTIMICROBIAL OF *Casearia sylvestris* ON THE ENDOSYMBIONT MICROORGANISMS OF *Diabrotica speciosa*”

*Diabrotica speciosa* is a pest insect which occurs in most Brazilian states, standing out as one of the most important polyphagous pest of in grain crops. The understand of the role of the microbiota present in the digestive tract and of this insect the identification of ways to interfere or even to eliminate this microbial flora they are knowlegdes that, may lead mode of action to control of the pest insect. In this context, this study aimed to evaluate the microbial diversity present in the digestive tract of larvae and adults of *D. speciosa* and in the sometime, to investigate the potential of *C. sylvestris* as an antimicrobial agent. As results, they were obtained 21 bacterial isolates and 8 fungal isolates. The proteic profile of these microorganisms were analyzed by using MALDI-TOF/MS. Afterwards, these data were grouped identifying clusters of isolates. A bacteria each groups was identified by rDNA sequencing, 16S region. Identified bacteria were: *Pantoea agglomerans*, *Luteibacter sp.*, *Serratia marcescens*, and *Pseudomonas temperans Acidovorax sp.* Two isolated fungi were identified through morphological comparison with literature data, and identified as *Cladosporium sp.* and *Penicillium sp.* A further study was carried out with *Luteibacter sp* bacteria, which were isolated from *D. speciosa* larva. In this study was evaluated growth profile and the parameters to carry out the antimicrobial assay. Several kind of microbial assays were investigated such as agar diffusion and microdilution plate ELISA®. The second method showed the best results. Thus, a microdilution methodology using fluorometric assay, was developed and validated, highlighting parameter such as linearity, specificity, accuracy, precision, robustness, recovery, limites of detection, quantification and detection, etc. This method was applied evaluating extracts, fraction and secondary molecules of cerrado plants. Phytochemical study of *C. sylvestris* leaves resulted in the isolation of an unpublished tricyclic sesquiterpene, the flavonoid catechin and a clerodane diterpene, which was used as a reference marker in chromatographic method to quality control of the extracts and fractions of *C. sylvestris* that were used in assays.

Keywords: Endosymbiont microorganisms, *Diabrotica speciosa*, cerrado plants, antimicrobial activity, *Casearia sylvestris*, phytochemistry.

# SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - BIODIVERSIDADE BRASILEIRA .....	3
1.2.1- <i>Casearia sylvestris</i> Swartz: aspectos taxonômicos, ecológicos e químicos. ..	5
1.2- INSETOS PRAGAS DO SOLO.....	13
1.2.1- <i>Diabrotica speciosa</i> .....	15
1.3- INTERAÇÃO SIMBIÔNTICA ENTRE INSETO E MICRORGANISMOS .....	17
<b>2-OJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.2- OBJETIVOS GERAIS .....	25
2.3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3-MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	27
3.1.2- Materiais utilizados para o isolamento, cultivo, conservação, caracterização dos microrganismos isolados e bioensaios.....	27
3.1.2.1- Solventes e materiais diversos .....	27
3.1.2.2- Meios de cultura.....	28
3.1.3- Equipamentos utilizados para o isolamento, cultivo, conservação, caracterização dos microrganismos endossimbiontes e bioensaios. ....	29
3.1.4- Equipamentos e materiais utilizados no estudo fitoquímico – preparo de extratos e fracionamentos.....	30
3.1.4.1- Solventes e materiais em geral.....	30
3.1.4.2- Equipamentos.....	31
3.2- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	32
3.2.1- Isolamento dos microrganismos endossimbiontes de <i>Diabrotica speciosa</i> ..	32
3.2.1.1- Preparo dos meios de cultura .....	32

3.2.1.2- Obtenção de insetos na fase larval e adultos de <i>D. speciosa</i> .....	33
3.2.1.3- Isolamento dos microrganismos .....	34
3.2.1.4- Purificação e repicagem dos microrganismos isolados .....	36
3.2.1.5- Codificação das cepas isoladas .....	37
3.2.1.6- Preservação dos microrganismos.....	37
3.2.2- Caracterização microbiana .....	38
3.2.2.1- Coloração de Gram para bactérias .....	38
3.2.2.2- Análises do perfil proteico dos microrganismos isolados através da Espectrometria de Massas com Ionização por Laser.....	40
3.2.2.2.1- Análise e Agrupamento dos espectros.....	42
3.2.2.3- Identificação de cepas microbianas através do seqüenciamento da região 16S rDNA.....	42
3.2.2.3.1- Extração de DNA bacteriano .....	42
3.2.2.3.2- Sequenciamento do DNA – Método de Terminação de Cadeia .....	44
3.2.3- Caracterização dos fungos por microscopia óptica.....	45
3.2.4- Obtenção do perfil de crescimento do isolado IBDeL6 .....	45
3.2.5- Ensaio de inibição do crescimento microbiano por produtos naturais .....	49
3.2.5.1- Técnica do poço em camada dupla.....	50
3.2.5.2- Técnica do poço convencional.....	51
3.2.5.3- Técnica do disco em placa .....	51
3.2.5.4- Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação qualitativa utilizando resazurina como revelador.....	52
3.2.5.4.1- Preparo do inóculo.....	52
3.2.5.4.2- Preparo dos extratos para o ensaio antibacteriano.....	53
3.2.5.4.3- Preparo das soluções dos controles .....	53

3.2.6- Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação quantitativa através da técnica de espectrofluorimetria –desenvolvimento de uma metodologia analítica .....	55
3.2.6.1- Linearidade e faixa dinâmica de trabalho .....	55
3.2.6.5- Aplicação do método para avaliação do potencial de inibição de extratos vegetais.....	58
3.2.7- Material botânico .....	58
3.2.7.1- Obtenção dos extratos de <i>Casearia sylvestris</i> .....	59
3.2.7.1.1- Preparo do extrato bruto etanólico de <i>C. sylvestris</i> .....	59
3.2.7.1.2- Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> ...	59
3.2.7.1.3- Fracionamento do extrato acetato de etila das folhas de <i>C. sylvestris</i> . ...	60
3.2.7.1.4 Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>C. sylvestris</i> .....	64
3.2.7.2- Análise quantitativa dos extratos de <i>C. sylvestris</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CLAE-UV).....	66
3.2.7.2.1- Preparo dos extratos e do marcador de referência para análise por CLAE-UV .....	67
<b>4-RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>69</b>
4.1- ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS ENDOSSIMBIONTES DE <i>DIABROTICA SPECIOSA</i> .....	69
4.2- CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA.....	73
4.2.1- Coloração de GRAM .....	73
4.2.2- Caracterização dos fungos por microscopia óptica.....	76
4.2.3- Análises do perfil proteico dos microrganismos através da técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Laser com analisador por Tempo de Voo (MALDI-TOF/MS) .....	80

4.2.4- Identificação de cepas microbianas através do seqüenciamento da região 16S rDNA .....	91
4.2.5- Obtenção do perfil de crescimento do isolado IBDeL6 .....	96
4.2.6- Ensaio de inibição do crescimento microbiano por produtos naturais .....	101
4.2.6.1- Técnicas de difusão em ágar .....	101
4.2.6.2- Bioensaios – interpretação qualitativa utilizando resazurina como revelador .....	104
4.2.6.2.1- Bioensaio – interpretação quantitativa utilizando resazurina como revelador – Desenvolvimento de uma metodologia analítica .....	107
4.2.6.2.2- Linearidade e intervalo de concentrações do corante revelador da atividade antibacteriana.....	109
4.2.6.2.3- Aplicação da metodologia analítica desenvolvida no bioensaio de atividade antibacteriana dos extratos de <i>C. sylvestris</i> e outras plantas do cerrado	117
4.2.6.2.4- Avaliação do potencial antibacteriano de extratos de plantas de cerrado .....	117
4.2.6.2.5- Avaliação do potencial antibacteriano de frações e metabólito secundário de <i>C. sylvestris</i> .....	120
4.2.6.2.6- Avaliação do potencial antibacteriano de frações de <i>Psidium laruotteanum</i> .....	121
4.2.7- Material botânico – Fitoquímica .....	123
4.2.7.1- Determinação da Ref 7-11(SF6) .....	124
4.2.7.2- Determinação da Ref 20 (SF6) .....	131
4.2.7.3- Determinação da Ref 14-21 (CoIF).....	140
4.2.7.4- Análise dos extratos de <i>C. sylvestris</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CLAE-UV).....	148
4.2.7.4.1- Quantificação da Ref 7-11(SF6) nos extratos de <i>Casearia sylvestris</i> testados frente à bactéria <i>Luteibacter sp.</i> .....	148

<b>5-CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>155</b>
<b>6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>159</b>

## 1-INTRODUÇÃO

A incessante busca pela sustentabilidade representa um dos maiores desafios para humanidade. Ao longo dos tempos, o modelo de desenvolvimento brasileiro tem evoluído em função de práticas de extrativismo em geral, em especial a agricultura. Todavia, o uso de tecnologias modernas e, em muitos casos, a utilização exacerbada de recursos ambientais em função dessas práticas extrativistas, vem colocando em risco a imensa riqueza natural existente (VALVERDE et al., 2012).

A agricultura vem sendo desenvolvida e explorada pela humanidade há mais de dez mil anos (LONDRES, 2011). As práticas agrícolas podem ser interpretadas em três sistemas: econômico, social e ecológico, aspectos os quais são interligados e suas interações com o meio ambiente levam a um complexo modelo de produtividade (AGRICULTURA, 2011).

O agronegócio e a agricultura desempenham papéis importantes na economia crescente do Brasil respondendo por 25% do seu PIB. A industrialização da agricultura brasileira, desde a década de 1960 através de técnicas de "Revolução Verde", melhorou bastante a produção agrícola e as exportações através da aplicação de tecnologias químicas modernas (HALL, 2011).

Esta revolução verde levou o Brasil a ocupar uma posição de destaque em termos agrícolas, podendo se destacar o abastecimento de alguns principais produtos: cereais, frutos e outros produtos de origem vegetal. Logo, o controle de pragas nativas ou exóticas, tem sido um desafio que se agrava de tempos em tempos (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Nas últimas cinco décadas, fazendeiros e agricultores têm confiado substancialmente no uso de fertilizantes e compostos químicos de proteção. Como

resultado, o cenário agrícola e os índices de produtividade teve um melhoramento em função do desenvolvimento genético, industrial e técnicas de manejo. (KNOWLES, 2008).

Apesar de todos os esforços, os insetos-pragas ainda são os principais responsáveis por significativas perdas agrícolas de modo direto, consumindo ou danificando a cultura, ou indireto pela transmissão de várias doenças entre culturas. No que concerne à eficácia da utilização de inseticidas sintéticos, não resta dúvidas de que tenham sido eficientes no controle de algumas espécies de pragas. Contudo, o uso contínuo e descontrolado de tais produtos, tem sido intensivamente relacionado a variados problemas de contaminação do meio ambiente e inclusive a intoxicação de animais e do próprio homem (OLIVEIRA-FILHO, 2008).

Neste cenário, pesquisas por novas moléculas inseticidas se baseiam na busca de compostos com características que possibilitem uma maior especificidade biológica, com mecanismos de ação únicos, baixo impacto e baixa persistência ao meio ambiente e nos alimentos e, além disso, que possuam características biodegradáveis.

Assim sendo, atualmente inúmeras são as pesquisas pela busca de novos compostos com tais características, (PAVELA, 2013; DEVAPPA et al., 2012; PERCIVA et al., 2012; AHMAD et al., 2012; TOMÉ et al., 2013; KONGKIATPAIBOON e GRITSANAPAN, 2013; HERTLEIN et al., 2011), se destacando compostos descobertos em estudos originários de ou moléculas sintetizadas seguindo a estrutura de um composto de origem natural como modelo. (BALUNAS e KINGHORN, 2005; CARVALHO, 2006).

Como exemplos de metabólitos secundários com atividades comprovadamente inseticidas pode-se citar: o alcalóide nicotina (**1**) (CROOKS, 1999), o piretróide piretrina (**2**) (VIEGAS JÚNIOR, 2003), o terpeno epóxido de



cariofileno **(3)** (HUBBEL et al., 1983), o limonóide azadirachtina **(4)** (BOURSIER et al., 2011), a rotenona **(5)** (LIU et al., 2012), etc (Figura 1.1).

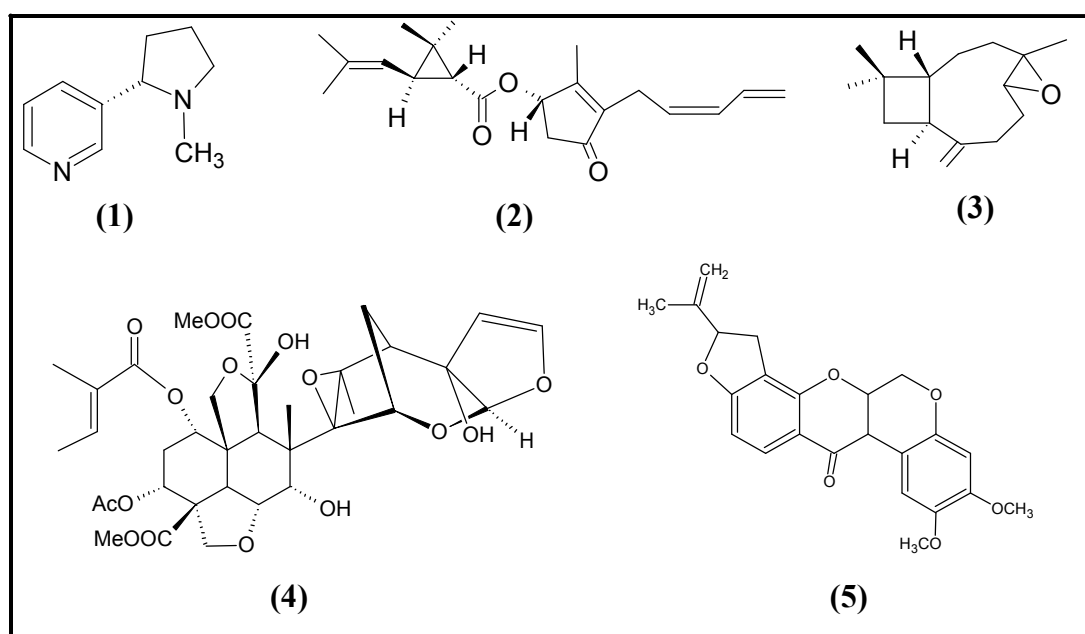


FIGURA 1.1-Metabólitos secundários de interesse inseticida. Nicotina **(1)**, piretrina **(2)**, epóxido de cariofileno **(3)**, azadirachtina **(4)** e a rotenona **(5)**.

## 1.1 - Biodiversidade Brasileira

O Brasil possui uma admirável riqueza natural, incluindo sua flora é o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não podendo abdicar de sua vocação para estudos com os produtos naturais (PINTO et al., 2002).

O país é dividido em seis biomas: Amazônia, Cerrado, Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica e Pampa (IBGE, 2006). O cerrado é a segunda maior província fitogeográfica brasileira, correspondendo à 23,9% da área do país (PORTAL BRASIL DE 2011), atravessando 11 estados brasileiros (RADA, 2013) (Figura 1.2) e não bastante, apresenta também um alto grau de endemismo.

Aproximadamente 44% de suas espécies vegetais são endêmicas (MYERS et al. 2000). Todavia, cerca de 57% de sua área foi completamente destruída e metade da área restante já foi impactada, comprometendo estudos e avaliação de seu potencial biológico e biotecnológico dessa vegetação. (RADA, 2013).

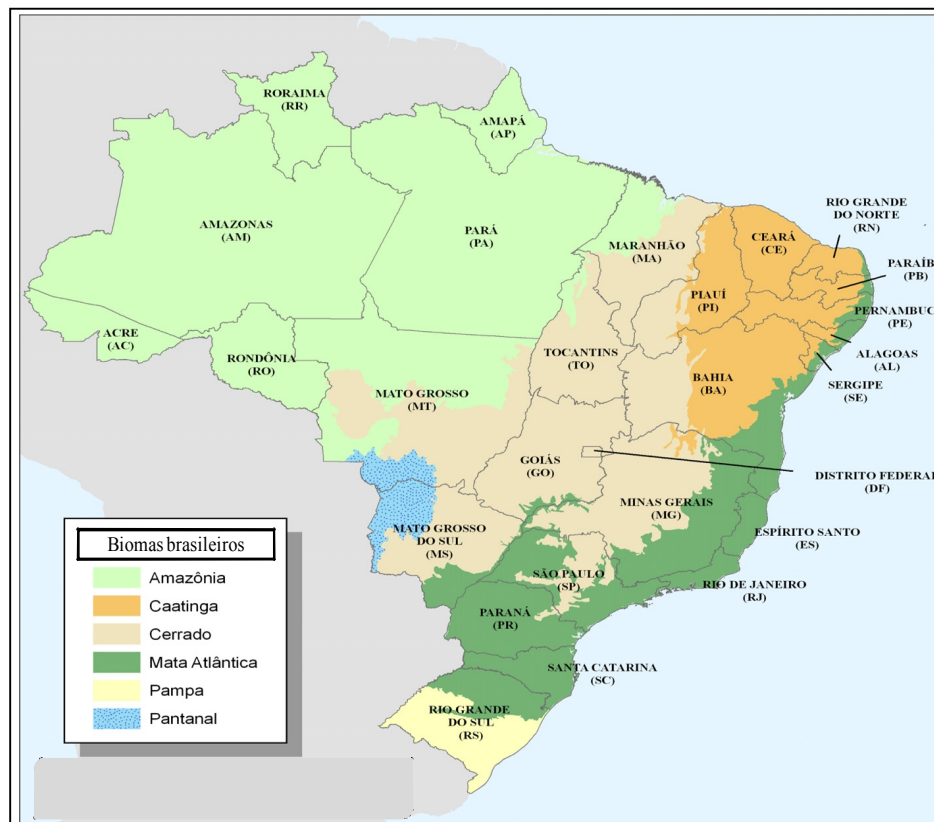


FIGURA 1.2-Estados brasileiros e seus biomas (Adaptada de RADA, 2013).

Tendo como base o princípio de “conhecer e preservar”, vários estudos tem sido realizados investigando o potencial biológico de plantas do cerrado. A Tabela 1.1 evidencia algumas plantas do cerrado e suas respectivas aplicações biológicas.

TABELA 1.1-Plantas do cerrado e aplicações biológicas.

Planta	Atividades descritas	Referências
<i>Davilla elliptica</i> ,	imunoestimulatória, adstringente, tônico, laxativo, sedativo, antiinflamatória	SOARES et al., 2005 CARLOS et al., 2005 AZEVEDO et al., 2007
<i>Eugenia aurata</i>	antimicrobiana, citotóxica	DUARTE, 2006
<i>Psidium laruotteanum</i>	antimicrobiana,	PRABU et al., 2006 ARIMA e DANNO, 2006
<i>Ocotea pulchella</i>	antinociceptivo	MONTRUCCHIO et al., 2012
<i>Miconia ligustroides</i>	antimicrobiana	RODRIGUES et al., 2007

Nota-se que são várias as utilidades de plantas do cerrado na área biológica, no entanto, pouco se depara na literatura da aplicação das mesmas com propósito inseticida, instigando melhores estudos a cerca dessa possibilidade.

### 1.2.1- *Casearia sylvestris* Swartz: aspectos taxonômicos, ecológicos e químicos.

A *Casearia sylvestris* Swartz, popularmente conhecida como “erva-de-bugre”, “guaçatonga” é uma planta amplamente distribuída pelos vários ecossistemas da América do Sul. No Brasil ela pode ser encontrada no cerrado e florestas tropicais (SANTOS et al. 2007). Esta planta pertence à família Flacourtiaceae, recentemente reclassificada de Salicaceae (MOSADDIK et al., 2007), compreendendo em torno de 86 gêneros e cerca de 1300 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais da América do Sul. Fisicamente é

caracterizada por plantas lenhosas com folhas alongadas e flores pequenas (Figura 1.3) (MARQUETE, 2001).

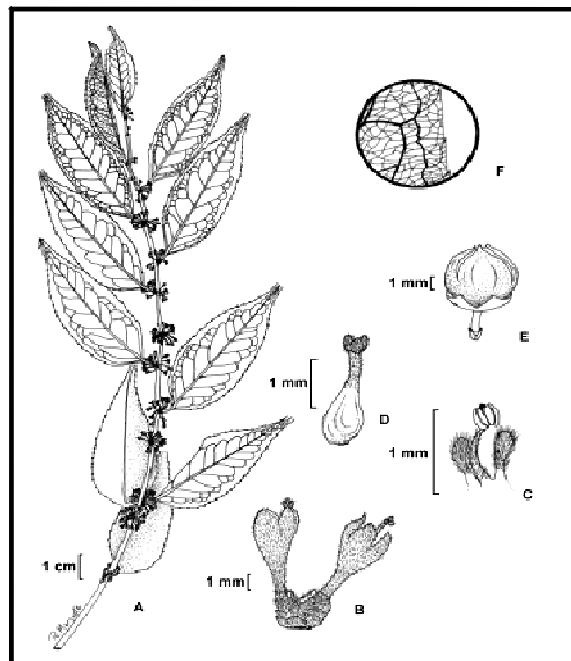


FIGURA 1.3-*Casearia sylvestris* Swartz. A- Hábito; B- Flor; C- Detalhe do disco e estame; D- Gineceu; E- Fruto; F- Detalhe da rede de nervação e aspecto do bordo (MARQUETE, 2001).

Esta planta é tradicionalmente utilizada na medicina popular, abrangendo um leque de atividades, dentre as principais pode-se citar: antimicrobiana, anti-hemorrágica, antiofídica, antidiarréica, anti-reumática, anti-séptica, antiulcerogênica, antiespasmódica, calmante, depurativa do sangue, diurética, estimulante da circulação, fungicida, etc. (TININIS, 2006).

O grande interesse nas propriedades farmacológicas de *Casearia sylvestris* pode ser comprovado pela elevada quantidade de trabalhos científicos utilizando essa espécie. Estudos que compreendem desde a otimização de métodos de extração, isolamento e identificação de metabólitos secundários, quanto pela busca de novos compostos bioativos, são facilmente encontrados na literatura

(BASILE et al., 1990; ALMEIDA, 1999; SANTOS, 2001; SANTOS et al., 2008; JAMAL, 2002; BANDEIRA, 2004; ESTEVES et al., 2005; TININIS, 2006; FERREIRA, 2006; SANTOS 2008).

Embora existam inúmeras publicações investigando o potencial medicinal da *C. sylvestris*, poucos são os relatos avaliando seu potencial no meio agrícola. Além disso, o grande sucesso da *C. sylvestris* nas pesquisas medicinais se deve à descoberta de uma classe de compostos diterpênicos clerodânicos, nomeados como casearinas.

Essa classe de compostos foi primeiramente investigada por ITOKAWA et al., (1988), que avaliaram a atividade antitumoral desses clerodânicos em ratos. Resultados surpreendentes foram obtidos por este grupo de estudo e, desde então, as principais pesquisas são voltadas para esse ramo de atividade antitumoral (ITOKAWA et al., 1990; ITOKAWA et al., 1989; MORITA et al., 1991).

Atualmente, mais de 30 diterpenos clerodânicos (Tabela 1.2) já foram isolados da *Casearia sylvestris*, dos quais 28 são típicos de *Casearia*, destacando as casearinas A-X (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; CARVALHO et al., 1998; SANTOS et al., 2007; WANG et al., 2009; SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010).

A estrutura **(6)** representa o esqueleto diterpênico do qual a maioria das casearinas derivam. As estruturas destes diterpenos *cis*-clerodânicos **(6)** são formadas por um sistema decalínico (anéis A e B) com metilas nas posições C8 (Carbono-17) e C9 (Carbono-20), uma ligação dupla em C3, uma cadeia lateral em C9 (Carbonos 11 e 16) com um dieno conjugado terminal. Além disso, alguns diterpenos podem apresentar um terceiro anel (C) di-hidrofurânico/diacetálico formado a partir de C18 e C19 e substituintes oxigenados (funções éster, éter,

álcool ou cetona) presentes nos carbonos 2, 6, 7, 18 e 19 (substituintes R1 a R5 na estrutura **24**). A maioria dos diterpenos apresentam o grupo diênico C12Z/C14.

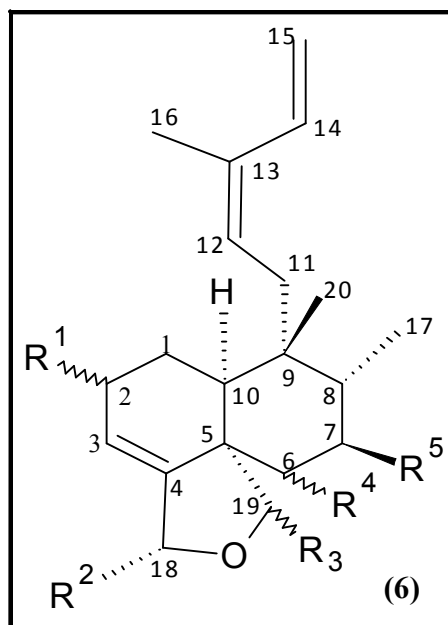


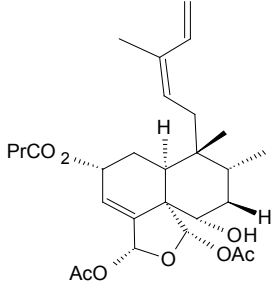
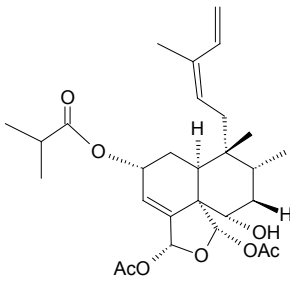
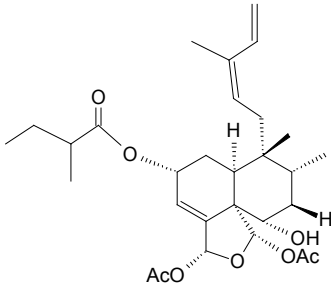
FIGURA 1.4-Esqueleto básico das casearinas.

TABELA 1.2-Casearinas de A-X, grupos substituintes (Adaptada de BANDEIRA et al., 2004).

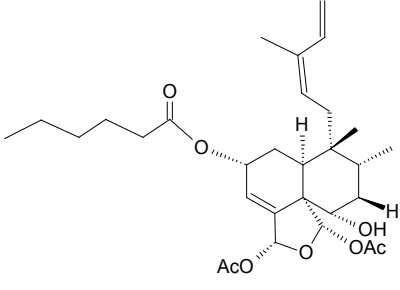
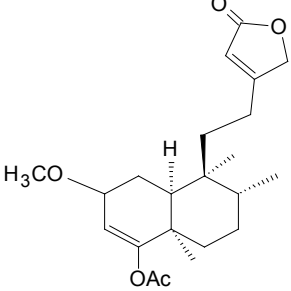
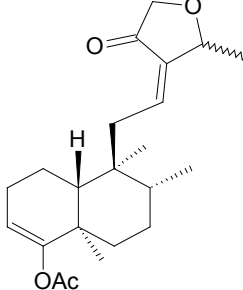
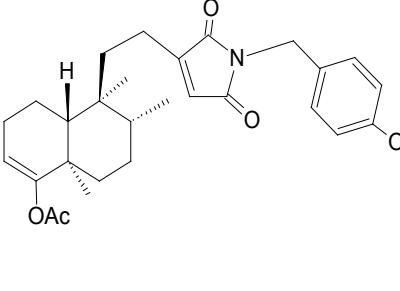
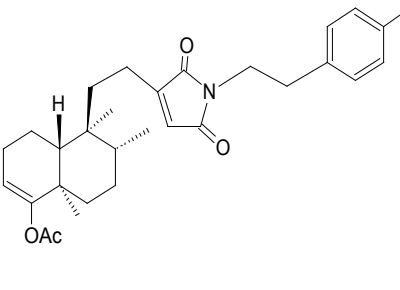
Diterpenos	R1	R2	R3	R4	R5
Casearina A	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina B	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina C	OH α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina D	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina E	OH α	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina F	OH α	OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina G	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina H	OH α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina I	OH α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina J	OCH <sub>3</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina K	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina L	OCH <sub>3</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	OH α
Casearina M	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	OH α
Casearina N	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina O	OCH <sub>3</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina P	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina Q	OH α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina R	=O	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina S	OCH <sub>3</sub> α	=O	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina T	OCH <sub>3</sub> α	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> β	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina U	OCH <sub>3</sub> α	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina V	OH α	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>
Casearina X	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub>	OH α	H

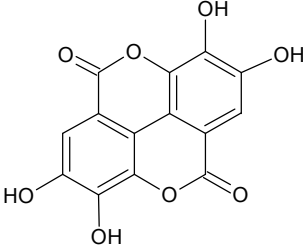
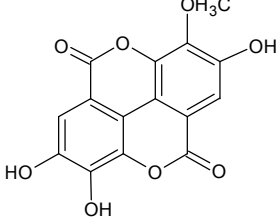
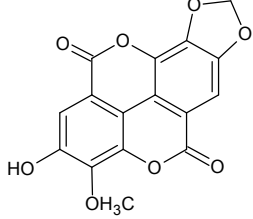
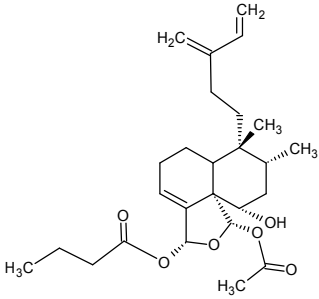
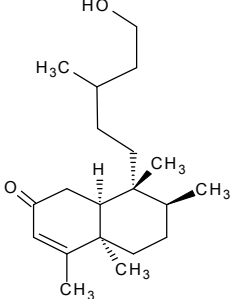
Além dessa classe de metabólitos secundários da classe das casearinas, há ainda outros exemplos de compostos já isolados da *C. sylvestris*. A Tabela 1.3 demonstra alguns terpenóides, derivados de ácido gálico e cumarinas já identificados da *C. sylvestris*.

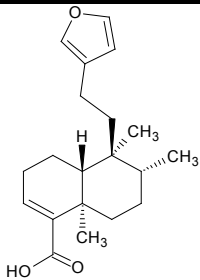
TABELA 1.3-Exemplos de metabólitos secundários isolados de *C. sylvestris*.

Classe do composto/ Nome	Estrutura	Referência
Terpenóide caseargrewiina F		SANTOS et al., 2010
Terpenóide casearvestrinas A		OBERLIES et al., 2002
Terpenóide casearvestrina B		OBERLIES et al., 2002



Terpenóide <i>casearvestrina C</i>		OBERLIES et al., 2002
Terpenóide <i>2β-metoxi-cleroda-3,13-dien-18-carboxi-15,16-olida</i>		WANG et al., 2009
Terpenóide <i>15ξ-metoxi-cleroda-3,12-dien-18-carboxi-15,16-olida</i>		WANG et al., 2009
Terpenóide <i>15-oxo-echinophyllin A</i>		WANG et al., 2009
Terpenóide <i>echinophyllin A</i>		WANG e al., 2009

<p>Cumarina Ácido elágico</p>		<p>DA SILVA et al., 2008</p>
<p>Cumarina ácido 3,3'-di-<i>O</i>-metil elágico</p>		<p>DA SILVA et al., 2008</p>
<p>Cumarina ácido 3-<i>O</i>-metil-3',4'- etilenodioxo elágico</p>		<p>DA SILVA et al., 2008</p>
<p>Terpenóide <i>rel</i>-19<i>S</i>-acetóxi-18<i>R</i>- butanoiloxi-18,19-epóxi-6<i>S</i>- hidróxi-2<i>R</i>-(2- metilbutanoilóxi)- 5<i>S</i>,8<i>R</i>,9<i>R</i>,10<i>S</i>-cleroda- 3,13,14-trieno</p>		<p>CARVALHO et al., 1998</p>
<p>Terpenóide 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona</p>		<p>CARVALHO et al., 1998</p>

<p>Terpenóide (-)-Ácido <i>hardwickico</i></p>		<p>CARVALHO et al., 1998</p>
--	---	------------------------------

Além dos metabólitos secundários já descritos, WERLE et al., (2009) realizando uma abordagem fitoquímica da *C. sylvestris* evidenciaram a presença de taninos, flavonóides e saponinas.

Embora a *Casearia sylvestris* tenha sido vastamente explorada na área farmacêutica, poucos estudos foram realizados com a aplicação dos extratos de *Casearia sylvestris* com propósito inseticida ou microbiano focando sua posterior utilização na área agrícola.

Diante do cenário apresentado e das informações químicas da espécie em questão é de suma importância evidenciar o potencial de de compostos terpênicos como protótipos inseticidas. Exemplos de trabalhos reportando houveram os devidos isolamentos e identificações de classes terpênicas e obtenção de bons resultados de suas atividades frente a insetos LUO et al., 2013; SABANDAR et al., 2013; PAVELA et al., 2010; PAVELA, 2004; ZAHAN & ABDELGALEIL, 2011; BANDEIRA et al., 2013. Deste modo no presente estudo os extratos da espécie em questão foram aplicados como agentes antimicrobiano.

## 1.2- Insetos pragas do solo

As pragas de solo são assim classificadas por se tratarem de insetos que ao longo da vida, passam a maior parte dela no solo interagindo direta ou

indiretamente com raízes, tubérculos e caules subterrâneos de plantas (MÓRON, 2004). Ainda hoje as pragas do solo são um o principal limitador na produção agrícola, devido as inúmeras perdas causadas por esses insetos (CHELLEMI, 2000).

Tais problemas se agravam em casos de propriedades com pequena produção agrícola (agricultura familiar) em que a exploração de insumos é dependente de fatores ecológicos, econômicos ou sociais. Além disso, o uso generalizado de inseticidas de solo pode levar à contaminações lençóis freáticos, devido a lixiviação, ou inclusive os alimentos, através de ações sistêmicas, resultando em danos ambientais e de saúde pública (EIZAGUIRRE et al. 2005).

Quando este tipo de praga ataca as raízes dos vegetais causam um crescimento irregular das plantas tornando-as recurvadas (doença conhecida como pescoço de ganso) diminuindo seu peso e altura, tendo como consequência, perdas de produtividade (MARQUES et al.,1999).

Não somente na fase larval (fase de permanência no solo), mas também quando adulto (fase fora do solo), estas pragas podem causar diversos danos. Por exemplo, a *Diabrotica speciosa*, uma praga polífaga, quando adulta alimenta-se da folhagem de várias espécies de plantas de grande importância econômica (batatas, milho, feijão, ervilha, soja, girassol, lentilha, bananeiras, curcubitácea - melancia, melão, pepino, abóbora, etc -, tomate, pimentão e cana-de-açúcar) (MIGLIORINI et al., 2010).

Com algum sucesso, as pragas de solo têm sido controlada com a rotatividade entre as lavouras. No entanto, em áreas de monocultura, por exemplo a cana-de-açúcar no Estado de São Paulo-Br, cultivos com extensas áreas. Este quadro ainda é agravado com a atual mudança no sistema de colheita da cana-de-açúcar, com a eliminação gradual das queimadas no Estado de São Paulo-Br, ou a

expansão de culturas como o milho safrinha, propiciando ideais condições de desenvolvimento.

Prejuízos diretos e indiretos podem ser creditados à essa praga. O principal prejuízo indireto está na possibilidade maior de entrada de fitopatôgenos através dos orifícios que esses insetos fazem ao se alimentarem dos tecidos das raízes, o que também resulta na redução da produtividade da planta (MARQUES et al., 1999) devido à perda de capacidade do vegetal absorver água e nutrientes.

Relatórios anuais de gerenciamento de pragas (principalmente insetos de solo) estimam perdas econômicas de aproximadamente US\$ 1 bilhão/ano somente nos Estados Unidos (SAPPINGTON et al., 2006).

### **1.2.1- *Diabrotica speciosa***

A espécie de inseto *Diabrotica speciosa* (Coleoptera, Chrysomelidae), popularmente conhecida na fase adulta como “vaquinha ou patriota” e na fase larval como “larva alfinete”, é um besourinho de coloração verde com três manchinhas amarelas em cada élitro, atingindo cerca 5 a 6mm de comprimento (Figura 1.5). É uma praga que ocorre na maioria dos estados brasileiros, destacando-se como uma das mais importantes pragas polípagas. (MIGLIORINI et al., 2010; ZARBIN e RODRIGUES, 2009)

A larva deste inseto é caracterizada pelo corpo vermiforme (fino e alongado) e cabeça escura; consegue atingir até 12 milímetros de comprimento quando completamente desenvolvida (Figura 1.5). Tem se destacado como uma das principais pragas de milho dos Estados Unidos nos últimos 50 anos (GARABAGI et al., 2008). Esta larva possui hábitos subterrâneos consumindo o sistema radicular das plantas. Tendo como consequência perdas em peso da parte aérea, redução de

altura das plantas, o que facilita a entrada de fitopatógenos levando à redução de produtividade (MARQUES *et al.*, 1999).

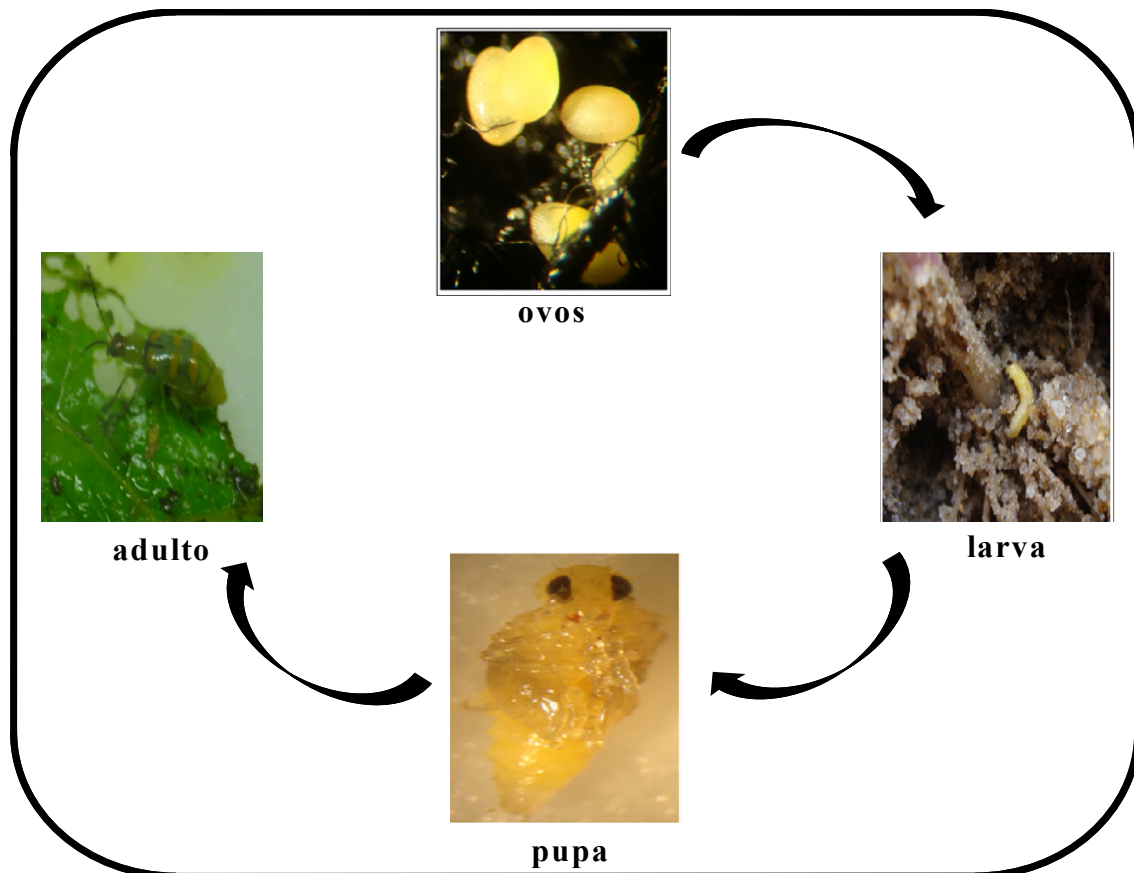


FIGURA 1.5- Fases de desenvolvimento da *D. speciosa*.

A *D. speciosa* na fase adulta alimenta-se da folhagem de várias espécies de hortaliças de importância econômica, as hortaliças (solanáceas, cucurbitáceas, crucíferas), feijoeiro, soja, girassol e milho (MILANEZ, 2000; GALLO *et al.*, 2002).

Para o controle das larvas, aplica-se inseticidas líquidos ou granulados no sulco de plantio ou na amontoa (batata). Esta modalidade demanda quantidades relativamente grandes de ingrediente ativo por área, o que eleva os custos e pode

causar contaminação dos lençóis freáticos principalmente em solos arenosos (PEREIRA et al., 2005).

O principal produto utilizado no controle dessa praga é o inseticida sintético comercial Carbaril® (GALLO et al, 2002). No entanto, a conscientização da necessidade de desenvolver métodos de controle de insetos pragas, não agressivos ao meio ambiente, se destaca nos últimos tempos. Assim, aliada à percepção de que o trato digestivo dos insetos trata-se de uma interface grande e relativamente pouco protegida, instiga estudos que visem entender melhor a composição microbiana desse sistema, podendo corroborar no desenvolvimento de novos métodos de controle.

### **1.3- Interação simbiótica entre inseto e microrganismos**

Os insetos são organismos que conseguem viver dentro de limites de tolerância, sendo estes, uma série de fatores bióticos e abióticos, como por exemplo: relações ecológicas, alimentícias, climáticas, etc. São seres que mantêm diferentes associações biológicas com outros seres vivos, incluindo: competição, parasitismo, mutualismo, predação, detritívora e etc (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2005).

Cada uma dessas relações possui suas particularidades. O mutualismo ou simbiose um termo utilizado pela primeira vez por De Bary em 1887, tornou-se desde então um termo utilizado para descrever duas ou mais espécies distintas vivendo em uma associação íntima entre si. Há casos em que uma espécie consegue sobreviver no interior de outra espécie, relação classificada como endossimbiose (KLEPZIG et al., 2009).

As interações simbióticas entre insetos e microrganismos já é bem estabelecida; contudo poucos estudos são realizados de forma a aprofundar o conhecimento acerca do assunto. Nos artrópodes há uma enorme e diversificada quantidade de bactérias que vivem em simbiose no seu interior, e que na maioria das vezes são transmitidos verticalmente através do citoplasma do ovo, na Figura 1.6 é demonstrado um esquema de possíveis relações simbióticas entre insetos e microrganismos que podem vir a existir, exemplificando alguns microrganismos envolvidos em diferentes situações.

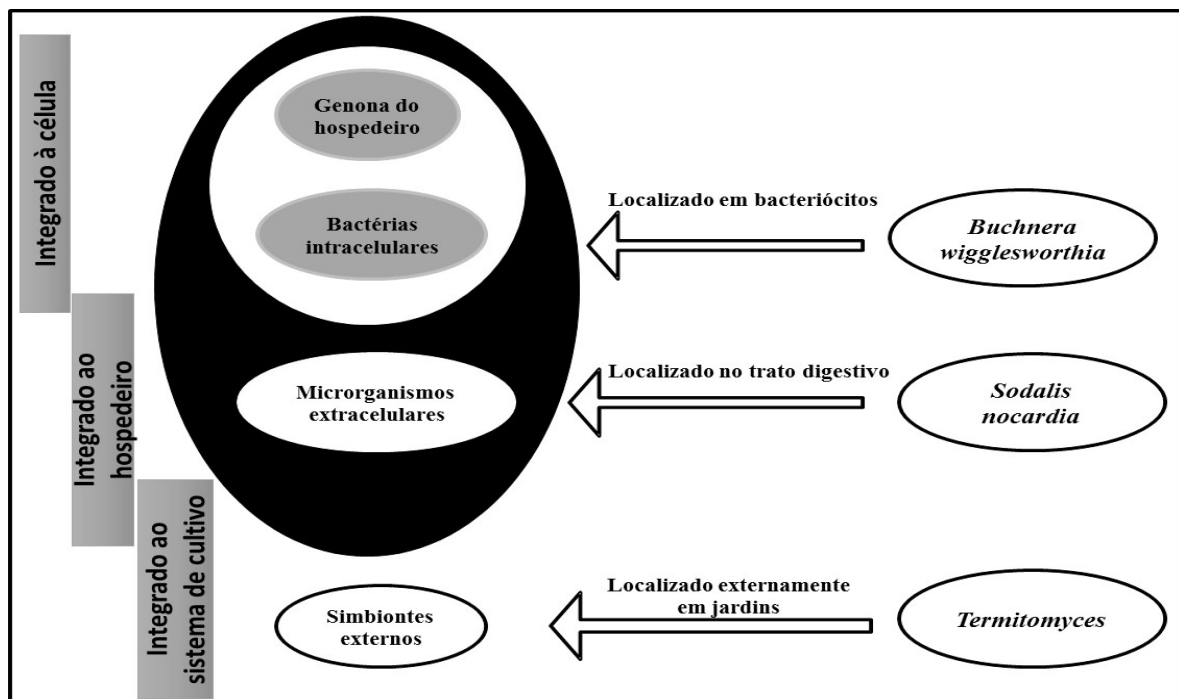


FIGURA 1.6- Relações simbióticas entre insetos e microrganismos (Adaptada de KITANO & ODA, (2006).

As interações simbióticas são consideradas complexas e um melhor entendimento dessas relações bem como se dá a interação desses microrganismos com os vegetais que são ingeridos pelas pragas, é de suma importância para uma compreensão em termos ecológicos da associação – inseto-microrganismo-planta.



O grande sucesso dos insetos tem sido relacionado à capacidade destes de ocuparem uma gama de habitats terrestres, alguns até mesmo limitados em termos nutricionais ou então dispostos a contribuir somente com alimentos de fontes não balanceadas (FELDHAAR & GROSS, 2009).

Nesse contexto, sabe-se que insetos herbívoros possuem uma dieta não balanceada com excesso de carboidratos em relação à compostos nitrogenados. Assim, uma alternativa para superar esta limitação seria modificar suas dietas e até mesmo o modo de vida (DENNO & FAGAN, 2003). Entretanto, o consumo alimentar envolvendo várias fontes como vegetais, requer especializações fisiológicas e morfológicas (COLL & GUERSHON, 2002).

Nessa perspectiva, uma maneira de alcançar tais especializações, tem sido a utilização da capacidade metabólica de microrganismos associados ao seu trato gastrointestinal, uma rota que tem permitido aos insetos melhores adaptações e sobrevivência ao meio ambiente, explorando as mais diversas possibilidades alimentares (BAUMANN, 1995).

Esses microrganismos podem vir a ser encontrados tanto no intestino quanto em outras regiões do corpo do inseto. No entanto, a microbiota gastrointestinal é responsável pelos hábitos alimentares, representando todo o aspecto de interação microbiana, tanto em casos de patógenos como de mutualismo obrigatório.

Existem duas principais classificações de simbiose, a primária e a secundária. A simbiose primária é assim denominada quando se trata de casos em que esta interação é essencial para o hospedeiro. Um exemplo é o caso do pulgão com bactéria *Buchnera aphidicola*, essa interação já é bem descrita na literatura. A simbiose secundária é descrita por interações não essenciais aos seres envolvidos, no entanto, desempenha significativas funções na ecologia e evolução dos

hospedeiros (WERREN et al., 2008), por exemplo, tem capacidade de contribuir na manutenção e fornecimento dos aminoácidos essenciais ao inseto (TAMAS et al., 2002).

Um exemplo de simbiose secundária bastante estudada é o caso de artrópodes com a bactéria *Wolbachia sp.*, onde cerca de 60% das espécies de insetos podem estar infectados por este endossimbionte intracelular (HILGENBOECKER et al., 2008, MARTINS et al., 2012).

Inúmeros são os exemplos descritos na literatura da interação entre insetos e microrganismos endossimbiontes: HUNTER et al., 2003; GOTOH et al., 2007; ROS et al., 2009; PERLMAN et al., 2010; OLIVER, et al. 2003; DALE & MORAN, 2006; PARECER E AHMADJIAN, 2000; VISÔTTO et al., 2009.

Estudos demonstraram que formigas e insetos de plantas, sugadores de seiva, possuem células especializadas contendo bactérias transmitidas verticalmente por células reprodutivas (BAUMANN et al., 1995), denominados de endossimbiontes primários. Estas células, conhecidas como bacteriocitas, são providas de um hospedeiro como parte de seu programa de desenvolvimento normal durante embriogenesis num respectivo inseto (FELDHAAR & GROSS, 2009). As bacteriocitas podem estar inseridas entre células do intestino médio, como ocorre em formigas cortadeiras, ou até mesmo formarem estruturas orgânicas ligadas consistindo de agrupamentos celulares adjacentes no intestino ou em células gordurosas de reserva de energia, como no caso de pulgões ou baratas (BAUMANN, 2005).

SCARBOROUGH et al. (2005) demonstraram a interação simbiote entre o pulgão *Acyrtosiphon pisum* e a bactéria *Regiella insecticola*. Esta bactéria confere ao pulgão *A. pisum* resistência contra fungos patogênicos, sendo esta verticalmente transmitida durante reprodução do pulgão.

Um outro exemplo é o caso do pulgão *Myzus persicae*, o qual possui um vírus fitopatogênico do gênero *Luteovirus*, esse vírus por sua vez depende de uma bactéria endossimbionte do gênero *Buchnera sp.*, a qual é responsável em estabilizar o vírus infectante no sistema circulatório do inseto (hemolinfa), na ausência dessa bactéria, o vírus não seria capaz de se estabilizar no fluido circulatório do inseto, o que levaria a uma perda infectante da planta por parte do inseto (VAN DER HEUVEL et al., 1998).

Trabalhos realizados por WERREN (2012) e KIKUCHI et al. (2012), demonstraram que a relação de simbiose existente entre inseto e a sua flora microbiana, pode inclusive ser responsável pela resistência adquirida por alguns insetos contra inseticidas.

Geralmente a obtenção de resistência contra pesticidas por insetos pragas é adquirida devido à mudanças mutacional no genoma do inseto. Entretanto, estudos na área vem demonstrando que essa resistência pode ser também atribuída aos microrganismos endossimbióticos que colonizam determinado inseto praga.

Uma explicação para a teoria de resistência contra pesticidas adquirida por inseto através de sua relação simbiote com seu microbiana foi o assunto de um estudo realizado por KIKUCHI et al., (2012). Demonstraram a capacidade de adaptação do inseto praga *Riptortus pedestris* contra o inseticida inibidor da acetilcolinesterase, o fenitrothion (*O,O*-dimetil *O*-(4-nitro-*m*-toluol) fosforotioato), quando associado à bactérias do gênero *Burkholderia*. Esta bactéria foi capaz de hidrolisar o Fenitrothion<sup>®</sup>, levando a subprodutos de menor toxicidade, eliminando o efeito desejado sobre o inseto.

Em constrate com a transmissão vertical, a infecção do inseto *R. pedestris* com a bactéria do gênero *Bulkholderia*, ocorre no solo durante o estágio

de segundo instar, concluindo que essa resistência é adquirida pelo inseto de forma mais rápida que possíveis mutações genéticas (KIKUCHI et al., 2012).

Estas relações simbióticas vem demonstrando a importância da interferência endomicrobiótica para o desenvolvimento fisiológico e social de insetos pragas. O desequilíbrio dessa simbiose resulta em mudanças comportamentais nos insetos, como por exemplo: sociais, alimentares, ciclo de desenvolvimento, reprodução, *etc.*, culminando num controle populacional e/ou morte do inseto praga.

Estudos conduzidos em ratos, HEIJTZ et al., (2011) demonstraram que a flora microbiana intestinal, promove impactos no desenvolvimento cerebral destes animais e, por subsequente, em seu comportamento, com evidentes efeitos observados na atividade motora e em níveis de ansiedade.

Assim, não resta dúvidas de que os microrganismos presentes no trato gastrointestinal de animais/insetos contribuem para condições de saúde ou doença, física e mental, ou seja, desempenha papel direto no metabolismo, incluindo as mais variadas funções e no comportamento social. Devido à sua grande área de superfície, exposição a diversos microrganismos e a alimentação, o trato gastrointestinal é uma interface única entre o ambiente interno e externo de diversas espécies. Isto coloca o trato gastrointestinal, em especial de insetos pragas, num patamar de vanguarda para pesquisas multidisciplinares que buscam novos conhecimentos fisiológicos e até mesmo biotecnológicos.

Diante do exposto até então, onde quadros de desequilíbrio entre as comunidades microbianas está diretamente relacionado a fatores causadores de disfunções no organismo do animal; um intencional quadro de desequilíbrio no microbioma gastrointestinal de insetos pragas não poderia levar a alterações comportamentais ou doenças nestes insetos, podendo este ser um novo modo de

ação para controle de pragas? Outra importante questão é se os produtos naturais (extratos, frações ou moléculas isoladas) podem contribuir no controle do microbioma intestinal de insetos pragas? Respostas a estas perguntas fizeram parte dos objetivos deste estudo.



## 2-OJETIVOS

### 2.2- Objetivos gerais

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a diversidade microbiana presente no trato digestivo de larvas e insetos adultos de *D. speciosa* e avaliar o potencial de *C. sylvestris* e outros extratos de planta do cerrado como agente antimicrobiano.

### 2.3- Objetivos específicos

-Sabendo-se da existência de interações simbióticas entre microrganismos-insetos, o presente estudo objetivou o isolamento, purificação e identificação no maior número possível de microrganismos candidatos a endossimbiontes de *Diabrotica speciosa*;

-Conhecendo-se das propriedades biológicas de plantas do cerrado, o trabalho objetivou testar o potencial antimicrobiano de extratos de plantas do cerrado, incluindo extratos e frações dessas plantas, metabólitos secundários em especial de *C. sylvestris*;

-Desenvolver uma metodologia analítica para obtenção de resultados quantitativos de ensaios de atividade antimicrobiana.





### 3-MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1- Materiais e equipamentos

##### 3.1.2- Materiais utilizados para o isolamento, cultivo, conservação, caracterização dos microrganismos isolados e bioensaios.

###### 3.1.2.1- Solventes e materiais diversos

- Água deionizada ultra pura proveniente de sistemas de filtragem e osmose reversa (0,08  $\mu$ S) foi obtida através de um equipamento (modelo Master System) da Gehaka<sup>®</sup>;
- Micropipetas calibradas de 10, 100 e 1000  $\mu$ l / GILSON<sup>®</sup>;
- Reagentes para preparo das soluções do teste de Gram: Safranina Merck Certistain<sup>®</sup>, Cristal violeta Merck Certistain<sup>®</sup>, Iodeto de potássio grau P.A. SYNTH<sup>®</sup> e Iodo metálico SYNTH<sup>®</sup>;
- Tubo criogênico 2,0 mL; fabricante: TPP<sup>®</sup>; estéril;
- Tubos de ensaio de vidro (150 x 20mm);
- Alça de Drigalski;
- Alça de platina (5cm x 0,5 cm);
- Álcool grau P.A. SYNTH<sup>®</sup>;
- Bico de Bunsen;

- Cloreto de Sódio grau P.A. SYNTH<sup>®</sup>;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grau P.A., SYNTH<sup>®</sup>;
- Glicose – D Anidra (Dextrose) P.A. SYNTH<sup>®</sup>;
- Hipoclorito de Sódio,
- Lâminas de bisturi;
- Papel de filtro qualitativo;
- Peptona SYNTH<sup>®</sup>;
- Pinça metálica;
- Placa de ELISA<sup>®</sup> de 96 poços (opaca e transparente);
- Placas de Petri PETRIC<sup>®</sup>;
- Tetraciclina, SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>.

### **3.1.2.2- Meios de cultura**

- Ágar bacteriológico HIMEDIA<sup>®</sup>;
- Ágar Luria Bertani HIMEDIA<sup>®</sup>;
- Ágar Muller Hinton HIMEDIA<sup>®</sup>;
- Batata Dextrose Ágar HIMEDIA<sup>®</sup>;
- Caldo Luria Bertani HIMEDIA<sup>®</sup>;

- Caldo Muller Hinton HIMEDIA®;
- Extrato de carne HIMEDIA®;
- Extrato de levedura SYNTH®;
- Nutriente Ágar HIMEDIA®.

### **3.1.3- Equipamentos utilizados para o isolamento, cultivo, conservação, caracterização dos microrganismos endossimbiontes e bioensaios.**

- Autoclave vertical;
- Capela de fluxo laminar (motor/germicida);
- Espectrofotômetro 700 plus FEMTO®;
- Espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF- Modelo: AutoFlex Speed Bruker®;
- Estufa incubadora de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O) NOVA ÉTICA®;
- Incubadora com Plataforma de Agitação Orbital (Shaker), NOVA ÉTICA®;
- Microscópio óptico MICRONAL®;
- Sequenciador GeneticAnalyzer 3130 da Applied Biosystems®;
- Ultrafreezer. Fabricante: Sanyo; Modelo: MDF – U56VC;

-Espectrofluorímetro Spectramax Multi-Mode Microplate reader /Leitor de microplacas.

### **3.1.4- Equipamentos e materiais utilizados no estudo fitoquímico – preparo de extratos e fracionamentos.**

#### **3.1.4.1- Solventes e materiais em geral**

- Pré – coluna Phenomenex<sup>®</sup>C18, (5µm; 4x3mm);
- Placas para cromatografia em camada delgada analítica: Sílica gel em folhas sobre alumínio (ALUGRAMTM SIL G/UV254 – MACHEREY-NAGEL<sup>®</sup>);
- Sephadex<sup>®</sup> LH-20, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB.
- Sílica gel 230-400 mesh, sílica gel 70-230 mesh SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>;
- Solução de Vanilina em ácido clorídrico, utilizada como revelador das placas de CCDA;
- Solventes deuterados (metanol e clorofórmio) da MERCK e SIGMA ALDRICH para obtenção de espectros de RMN;
- Solventes–MERCK, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos (metanol, acetato de etila, acetona, diclorometano e hexano);
- Metanol e Acetonitrila grau HPLC das marcas J.T.Baker<sup>®</sup> e Panreac<sup>®</sup> foram utilizados como fases móveis para cromatografias líquidas;

- Coluna Phenomenex<sup>®</sup>, Gemini C18 ( 5µm; 150 X 4,6 mm).

### **3.1.4.2- Equipamentos**

- Agitador Turrax, fabricante: IKA<sup>®</sup>; modelo: RW20;

- Cromatógrafo gasoso acoplado à um Espectrômetro de massas Shimadzu– QP 5000, equipado com coluna da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Optima-5 de 30m de comprimento e  $\phi$  0,25 mm com 0,25 µm, operando com ionização no modo positivo por impacto eletrônico (IE) a 70eV. O software utilizado para tratamento dos dados foi o GCMS *Real Time Analysis*;

- Espectrômetro de massas Applied Biosystems Life Technologies (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, USA), sob a plataforma API<sup>™</sup> 2000, analisador triplo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (fonte TurboIonSpray<sup>®</sup>) (ESI-MS);

- Balança analítica Satorius<sup>®</sup> BP210S;

- Cabine de revelação por luz ultravioleta tipo SPECTROLINE modelo CM-10 com luz tipo SPECTROLINE modelo ENF-260C ( $\lambda = 254$  e 365nm);

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A, detector de Ultravioleta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA);

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear - BRUKER modelo DRX 400

- Evaporador rotativo- BÜCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BÜCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Evaporador rotativo- BÜCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BÜCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Moinhos de tritura e homogeneização (TECNAL® TE-631).

### **3.2- Procedimentos experimentais**

#### **3.2.1- Isolamento dos microrganismos endossimbiontes de *Diabrotica speciosa***

##### **3.2.1.1- Preparo dos meios de cultura**

Para promover o crescimento dos microrganismos endossimbióticos dos insetos e larvas de *D. speciosa* foram preparados três meios de cultivo, contendo cada um, diferentes nutrientes. Os meios preparados foram: cultura ágar batata dextrose (BDA) (HIMEDIA), nutriente ágar (NA) (HIMEDIA) e meio contendo apenas ágar (A) (HIMEDIA).

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando a proporção de 28g, 39g e 14g de meio Nutriente Ágar, Batata dextrose Ágar e meio Ágar- Ágar, respectivamente, para 1,0L de água destilada cada um. Após a distribuição dos meios em erlenmeyrs contendo a quantidade desejada de água destilada, os mesmos foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 120°C. Após a esterilização dos meios, estes foram vertidos (aproximadamente 15ml) em placas de Petri® de vidro (90mm) previamente esterilizadas. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo

laminar. As placas foram deixadas em repouso por aproximadamente 90 minutos podendo ser utilizadas em seguida, sendo ainda, expostas à radiação ultra-violeta por cerca de 30 minutos. A composição dos meios utilizados no isolamento estão demonstrados na Tabela 3.1.

TABELA 3.1-Componentes nutricionais dos meios de cultura comerciais utilizados no isolamento.

Meio de cultura sólido	Composição (gramas/litro) (g.l <sup>-1</sup> )
Nutriente Ágar	Dextrose (5g) Extrato de carne (1g) Extrato de levedura (2g) Cloreto de sódio (5g) Peptona (5g) Ágar (14g)
Batata Dextrose Ágar	Batata (200g) Dextrose (20g) Ágar (16g)
Ágar Ágar	Ágar bacteriológico (14g)

### 3.2.1.2- Obtenção de insetos na fase larval e adultos de *D. speciosa*

Os insetos e larvas de *D. speciosa*, foram capturados na área rural do município de Jaboticabal e fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça-Jr, professor/pesquisador do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal. Uma criação dos mesmos insetos tem sido mantida em cativeiro, cultivados em vermiculita de granulometria média, sendo fornecido para *D. speciosa* plântulas de milho ou feijão e mantidas a temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com umidade relativa do ar de  $70 \pm 10\%$ . A Figura 3.1 ilustra a

*D. speciosa* na fase adulta, larval e o cativeiro de criação da larva de *D. speciosa* (cultivo de milho).

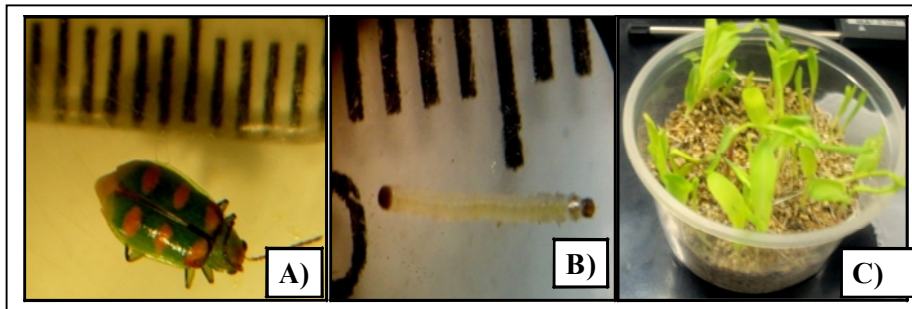


FIGURA 3.1-Imagens de: A) *D. speciosa* fase adulta (“vaquinha patriota”); B) *D. speciosa* fase larval (“larva-alfinete”) e C) cativeiro de criação da larva de *D. speciosa*.

### 3.2.1.3- Isolamento dos microrganismos

O isolamento dos microrganismos ensossimbióticos foi realizado de maneira adaptada à metodologia proposta por GUSMÃO et al., (2007).

Os insetos adultos e as larvas foram obtidos vivos sendo criogenicamente mortos utilizando um ultrafreezer vertical a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, em capela de fluxo laminar, os insetos e larvas foram submetidos à esterilização superficial (externa) eliminando possíveis microrganismos contaminantes externos. Assim, os insetos adultos e as larvas foram separadamente mergulhados em soluções de esterilização na seguinte ordem: etanol 70% (v/v); solução aquosa de hipoclorito de sódio 3% (m/v); água destilada; água destilada. Por último, o excesso do solvente foi eliminado colocando rapidamente o material biológico em papel de filtro estéril. O tempo de cada imersão foi de 90 segundos.



Após a esterilização, com auxílio de pinças e bisturi cirúrgico, ambos previamente esterilizados em autoclave e em radiação ultravioleta, os élitros, cabeças e pernas dos insetos adultos foram removidos. Na sequência, um corte ao longo da parte ventral do abdômen do inseto permitiu a retirada do trato digestivo, que foi dividido e distribuído nos diferentes meios de cultura sólido, em placas de Petri®, a fim de permitir o desenvolvimento de diferentes microrganismos. A Figura 3.2 ilustra o processo descrito. No caso da larva, um corte ventral também foi realizado e a mesma colocada em contato com os diferentes meios de cultura.

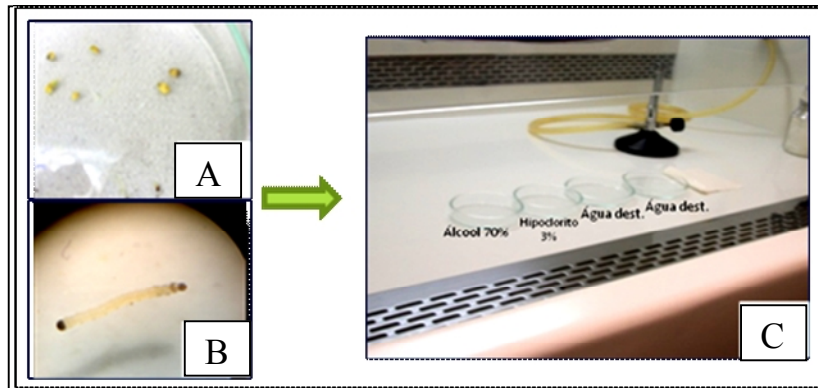


FIGURA 3.2- Procedimento de isolamento dos microrganismos endossimbiontes de *D. speciosa*. A) trato digestivo do inseto adulto; B) larva e C) procedimento de esterilização.

A etapa de isolamento dos microrganismos foi realizada duas vezes, sendo a primeira em Dezembro de 2011 e a segunda em Junho de 2012. No primeiro isolamento utilizaram-se larvas e adultos de *D. speciosa*. No segundo procedimento, larvas, adultos e material fecal foram utilizados como material de isolamento. O procedimento utilizado foi o mesmo em ambos as datas, se diferenciando apenas nas dietas em que se encontravam, no primeiro caso plântulas de milho e no segundo de feijão.

As placas contendo os tratos digestivos dos insetos e fragmentos das larvas e o material fecal do inseto, foram colocadas em estufa incubadora (B.O.D.) a 28°C, sendo diariamente observadas.

### **3.2.1.4- Purificação e repicagem dos microrganismos isolados**

#### ➤ Bactérias

À medida que as colônias bacterianas apareciam (24-48horas), as mesmas foram purificadas através de sucessivas repicagens em meio de cultura sólido (NA). As colônias foram retiradas com o auxílio de uma alça de platina, previamente flambada e esfriada, seguida por um estriamento em outra placa de Petri® contendo NA. As placas de Petri® foram sempre manipuladas em câmara de fluxo laminar próximas ao bico de Bunsen para evitar contaminação. Uma vez semeadas as placas, estas foram novamente incubadas em estufas B.O.D. a 28°C. Este procedimento foi repetido até obtenção de isolados bacterianos visualmente puros.

#### ➤ Fungos

Um bloco do meio de cultura sólido (5mm) contendo colônias de fungos foi retirado da placa de Petri® inicialmente inoculada o trato digestivo do inseto e adicionado a uma nova placa com meio de cultura sólido de BDA. A placa foi mantida em uma incubadora B.O.D. a 28°C para o desenvolvimento dos fungos. Na sequência, os fungos foram novamente repicados em novas placas contendo meio de cultura de BDA, seguindo o mesmo procedimento. Este procedimento foi repetido até obter isolados fúngicos purificadas.

### 3.2.1.5- Codificação das cepas isoladas

Os microrganismos isolados foram codificados de acordo com sua origem (adulto, larva, material fecal) e de meio de cultura em que foi purificado, conforme o esquema a seguir:

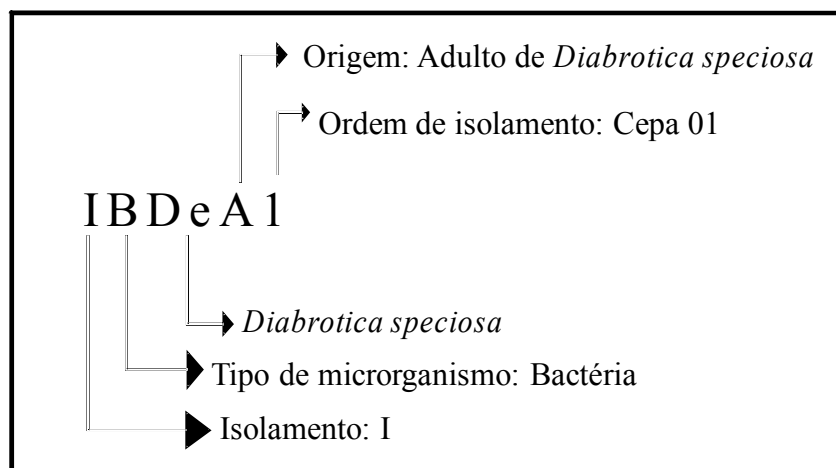


FIGURA 3.3- Representação esquemática da codificação atribuída às cepas microbianas isoladas.

### 3.2.1.6- Preservação dos microrganismos

#### ➤ Isolados fúngicos

A preservação dos fungos isolados foi realizada utilizando-se de dois métodos: CASTELLANI (1939) e em óleo mineral. Aplicando o método de Castellani, um bloco de meio de cultura sólido (BDA), de aproximadamente 5mm de diâmetro, contendo o fungo purificado foi colocado em um tubo de vidro estéril com tampa de rosca, contendo 4mL de água destilada esterilizada. O tubo foi conservado a temperatura ambiente.

Pelo uso do método de óleo mineral, o fungo foi repicado para um tubo de ensaio de 150x20mm contendo o meio de cultivo de BDA de forma inclinada (45°). Após quatro dias de desenvolvimento do fungo no meio sólido, uma quantidade de óleo mineral esterilizado foi acrescentada de forma a submergir todo o meio de cultura existente no tubo. As amostras preservadas foram armazenadas em uma estufa B.O.D. a 25°C.

➤ Isolados bacterianos

As células bacterianas foram preservadas através do congelamento em ultra freezer a temperaturas entre  $-70\pm 10$  °C. Dessa forma, as cepas bacterianas purificadas foram cultivadas em meio de cultura líquido (Caldo Nutriente), sendo 900 µl do inóculo adicionados em tubos criogênicos já contendo 100 µl de glicerol (50% v/v) esterilizado. Os tubos criogênicos contendo as cepas bacterianas foram então devidamente rotulados e armazenados em um ultra freezer na temperatura de -80°C presente no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar.

### **3.2.2- Caracterização microbiana**

#### **3.2.2.1- Coloração de Gram para bactérias**

Essa coloração, desenvolvida por Gram (1884) é utilizada para separar as bactérias em dois grandes grupos: bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas. Neste processo, o esfregaço bacteriano foi tratado com reagentes na seguinte ordem: adição de corante púrpura cristal violeta, solução de iodo (um mordente que fixa o corante no interior da célula), álcool (agente descolorante que

remove o primeiro corante utilizado, permitindo diferenciar as duas classes bacterianas) e por fim o corante safranina, que define a coloração final das células.

O procedimento de preparo destes reagentes se encontra descrito na Tabela 3.2. As bactérias Gram positivas retêm o cristal violeta e aparecem coradas em púrpura, enquanto bactérias Gram negativas perdem o cristal violeta quando tratadas com álcool e são coradas com o corante safranina e aparecem coradas de vermelho. As etapas do teste de Gram estão resumidas na Figura 3.4.

TABELA 3.2-Procedimentos para preparo dos reagentes usados na coloração de Gram.

<b>Solução</b>	<b>Reagentes*</b>	
Corante Cristal Violeta	<i>Solução A</i> Cristal violeta: 2g Álcool etílico: 20ml	<i>Solução B</i> Oxalato de amônio: 0,8g Água: 80ml
Lugol	Cristal de Iodo: 1g Iodeto de potássio: 2g Água ultra pura: 300ml	
Corante Safranina	Safranina 0,25g Álcool etílico: 10ml Água ultra pura: 90ml	

*\* Os reagentes correspondentes à cada solução foram misturados com auxílio de um bastão de vidro, e após 24hs de repouso, cada solução foi separadamente filtrada e devidamente armazenada em frascos âmbar.*

Para que fosse realizado a coloração de Gram, as cepas bacterianas foram reativadas do freezer -80°C em placas de Petri® contendo NA. Após 48 horas de reativação e incubação em estufa B.O.D a 28°C, as colônias bacterianas foram então repicadas para meio de cultura líquido (Caldo Nutriente), sendo o teste iniciado após 24hs de repicagem no meio líquido. Assim, as células foram

previamente fixadas em uma lâmina de vidro, sendo a fixação das células realizada seguindo o seguinte protocolo:

a) Com auxílio de uma alça de platina, foi inserido sobre uma lâmina de vidro limpa e seca, uma porção da suspensão bacteriana;

b) O inóculo foi lentamente espalhado pela lâmina, formando uma película fina sobre a mesma, a qual foi seca à temperatura ambiente;

c) O material foi fixado passando rapidamente a lâmina três vezes sobre uma chama do bico de Bunsen;

d) Após seco, o material foi submetido ao tratamento com os diferentes reagentes, conforme a sequência descrita na Figura 3.4.

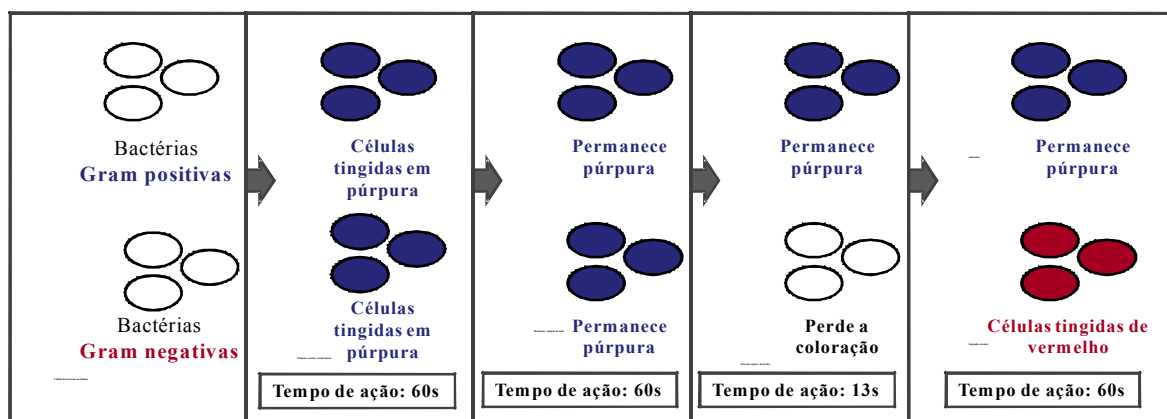


FIGURA 3.4- Processo de coloração de Gram para as células bacterianas.

### **3.2.2.2- Análises do perfil proteico dos microrganismos isolados através da Espectrometria de Massas com Ionização por Laser**

Essa parte do trabalho foi realizado em colaboração com a doutoranda Marília Almeida Trapp do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos do Departamento de Química da UFSCar.

As amostras microbianas foram analisadas em um Espectrômetro de Massas com Ionização por Laser hifenado a um detector de tempo de voo (Ionização por Dessorção a Laser Assistido por Matriz, MALDI-TOF/MS, sigla em inglês) (Autoflex Speed; Bruker Daltonics) equipado com um laser de estado sólido no comprimento de onda de 355nm. Os íons positivos foram obtidos utilizando uma aceleração de 500Hz, e a matriz polimérica utilizada foi o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico.

Para a análise dos mesmos, os microrganismos foram devidamente reativados, fungos em meio de BDA e bactérias em meio de NA. Os fungos foram analisados com 96 horas de reativação e as bactérias com 24 horas.

O material a ser inserido na placa de MALDI foi retirado da própria placa de meio de cultura em que o microrganismo cresceu, sem nenhum pré-tratamento. Resumidamente, as amostras foram colocadas na placa de metal (Figura 3.4), sendo adicionado em cada *spot* 1 $\mu$ l de uma solução de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico na concentração de 5mg.ml<sup>-1</sup>, em acetonitrila:água:trifluoroacético (50:46:2, % v/v/v). Em seguida as amostras foram secas ao ar e após a co-cristalização da matriz com a amostra, a placa foi inserida no interior do equipamento e bombardeadas com laser. Tendo a matriz a função de absorver os fótons e os transferir ao analito, levando à vaporização e ionização da amostra.

Os espectros de massas foram obtidos como resultado da soma dos íons obtidos de 25 tiros do laser, em 10 diferentes posições da amostra (250 tiros no total) aplicada num mesmo *spot*. Para o modo linear positivo de extração de íons,

se utilizou uma aceleração de 20kV. Como padrão de calibração aferindo o equipamento, foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli*. Cada amostra, células de diferentes isolados microbianos, foram analisadas em quintuplicata ( $n=5$ ), sendo a faixa de relação massa/carga analisada entre 2000 e 20.000Da.

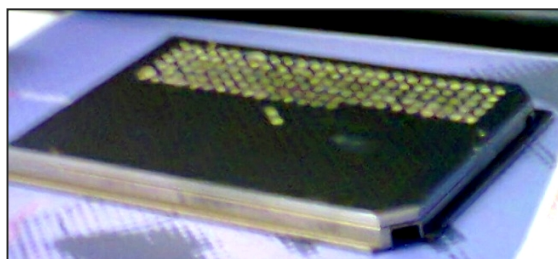


FIGURA 3.5-Placa de MALDI utilizada nas análises dos microrganismos.

### **3.2.2.2.1- Análise e Agrupamento dos espectros**

Os espectros gerados foram submetidos à análise de similaridades entre eles utilizando o *software* Biotyper<sup>®</sup>. O número de picos, a intensidade e as relações massa/carga ( $m/z$ ) foram avaliados gerando um espectro de massas resultante para quintuplicata de cada amostra. Após essa etapa, os espectros médios finais de todas as estirpes foram analisados pelo mesmo *software*, que compara as informações obtidas entre as amostras e realiza uma análise estatística gerando um gráfico de agrupamento dos mesmos (dendograma).

### **3.2.2.3- Identificação de cepas microbianas através do seqüenciamento da região 16S rDNA**

#### **3.2.2.3.1- Extração de DNA bacteriano**



A realização dessa etapa do estudo, foi realizada em colaboração com o aluno de mestrado Evandro Pietro, sendo os experimentos realizados no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dulce Helena Ferreira de Souza pertencente ao Departamento de Química da UFSCar.

A extração de DNA genômico das bactérias isoladas foi realizada de acordo com o protocolo e uso do kit AxyPrep<sup>®</sup> Bacterial Genomic DNA MiniPrep da Axygen Biosciences.

Inicialmente as cepas bacterianas devidamente armazenadas em solução com glicerol 50% (v/v) à -80°C, foram reativadas em placas contendo meio de NA. Após a reativação das colônias nas placas, para cada cepa uma colônia foi retirada com auxílio de uma alça de platina estéril e repicada em 5 ml de meio líquido de caldo nutriente. Deixando-as crescerem por 24 horas. Após este período, os 5ml do meio de cultivo foram divididos em cinco tubos eppendorf de 2ml os quais foram centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspendido em 150µl do tampão de lise contido no kit. Na sequência uma série de soluções foram sendo adicionadas e homogeneizadas de acordo com o manual, sendo: a) adição de 20µl de lisozima (50mg.ml<sup>-1</sup>) e incubação por 5min a temperatura ambiente; b) adição de 30µl de EDTA (pH 8,0) e incubação por 5min em banho de gelo; c) adição de 450µl do tampão G-A<sup>®</sup> e incubação por 5min em banho-maria a 65°C; d) adição de 400µl e 1000µl dos tampões G-B<sup>®</sup> e DV<sup>®</sup> (pré-resfriado a 4°C), respectivamente, seguido por forte agitação e centrifugação a 12.000rpm durante 2 minutos. No final o sobrenadante foi novamente descartado sem a perturbação da interface do precipitado.

Após a extração do DNA das cepas, foi realizada uma reação de PCR (Reação de Polimerização em Cadeia – sigla em inglês) com *primers* universais

para bactérias da região 16S (Tabela 3.3). Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese (gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio), para confirmar o tamanho do fragmento de interesse (Tabela 3.4). Uma vez confirmado o tamanho do fragmento, essas bandas foram recortadas do gel e purificadas com o kit de purificação Wisard®SV Gel e PCR Clean UP® System Promega de acordo com o manual do kit. O produto de PCR purificado foi armazenado em um freezer-20°C.

TABELA 3.3- *Primers* selecionados.

Tipo do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Tamanho esperado do produto
<b>Bactérias</b>		
FP: 27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500pb
RP: 1525r	AAGGAGGTGWTCARCC	

TABELA 3.4-Condições para o programa no termociclador.

Reagentes	Volumes	Termociclador (programação)	
H <sub>2</sub> O	10.5 µl		
Tampão 10X	5µl	94°C	4 min.
MgCl <sub>2</sub>	4µl	94°C	1 min.
dNTP	1µl	49°C	1 min.
PF 10nM	1µl	72°C	1 min.
PR 10nM	1µl	72°C	15 min.
Enzima Taq	0.5 µl	4°C	∞
DNA molde	2µl		

### 3.2.2.3.2- Sequenciamento do DNA – Método de Terminação de Cadeia

Obtido o produto de PCR purificado, o sequenciamento foi realizado num equipamento GeneticAnalyzer 3130 da Applied Biosystems contendo 4 capilares de 50cm possibilitando uma resolução de até 1500pb. As amostras para sequenciamento foram preparadas pela adição de 1µl dos *primers* (na concentração de 3,2 pmol.µl<sup>-1</sup>) em tubo de PCR com posterior adição do DNA extraído, o produto de PCR e água em quantidade suficiente para 7µl.

Os resultados obtidos foram analisados em Bancos de Dados para Ácidos Nucléicos através da ferramenta BLAST, disponível no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### **3.2.3- Caracterização dos fungos por microscopia óptica**

Para uma análise morfológica dos fungos foi utilizada a microscopia óptica avaliando os tipos de hifas, conídios e conidióforos. Para tal, os fungos foram reativados em placas de Petri® contendo BDA como meio de cultura, e após 96 horas de crescimento os mesmos foram inseridos em lâminas para posterior visualização no microscópio óptico. As imagens foram obtidas por câmera manual, utilizando aumento 400 vezes e 1000 vezes.

As imagens obtidas possibilitaram agrupar os fungos em termos de similaridade morfológica.

### **3.2.4- Obtenção do perfil de crescimento do isolado IBDeL6**

Com o propósito de desenvolver metodologias para estudo da inibição do crescimento dos microrganismos endossimbióticos, primeiramente foi desenvolvido um protocolo para o acompanhamento do perfil de crescimento microbiano de uma das cepas bacterianas devidamente identificadas.

O conhecimento do perfil de crescimento microbiano permitiu estabelecer as fases *lag*, *log* e estacionária da bactéria permitindo assim definir as características e a quantidade do microrganismo que foram utilizados nos ensaios de inibição de crescimento, e o mais importante, o tempo ótimo para realização da leitura, assegurando que o microrganismo se encontrasse na fase *log*.

O crescimento microbiano foi realizado em um sistema fechado, isto é, nenhum novo nutriente foi adicionado ao sistema e nenhum produto de excreção metabólico foi removido. A metodologia foi adaptada do trabalho desenvolvido por MYTILINAIOS et al. (2012), utilizando como técnica de monitoramento da quantidade de microrganismo a turbidimetria. O uso desta técnica considera as medidas de densidade ótica (DO), através de relações diretas com valores de absorbância.

Para tal, a cepa bacteriana IBDeL6 foi devidamente reativada em placa de petri contendo meio NA. Após 48h de repicagem, e a bactéria ocupar toda extensão da estria, uma etapa de diluição seriada em solução salina (NaCl 0,90%, m/v) foi realizada conforme ilustrado na Figura 3.6. Todas as suspensões obtidas na diluição seriada foram plaqueadas com auxílio de uma alça de Drigalski, e então determinada a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) existentes. A suspensão bacteriana contendo a concentração de  $10^8$  UFC (5ª diluição, Figura 3.6) foi escolhida como a concentração do inóculo de trabalho para construção da curva de crescimento da referida bactéria.

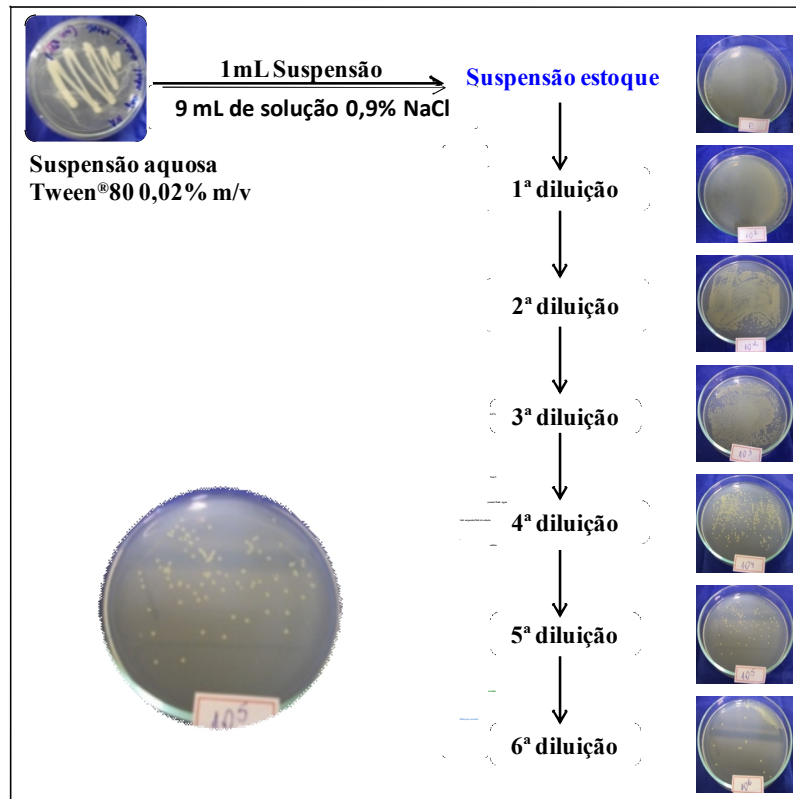


FIGURA 3.6-Procedimento de diluição seriada para seleção da concentração (UFC) microbiana como inoculo para construção da curva de crescimento.

A curva de crescimento foi realizada em três caldos de meios de cultura distintos, determinando qual o melhor meio para desenvolvimento da bactéria em estudo. Os caldos foram preparados conforme procedimentos convencionais de assepsia e as quantidades indicadas pelo fabricante (Tabela 3.5).

TABELA 3.5-Composição e quantidade recomendada para o preparo dos caldos de meio de cultura.

Meio de cultura	Composição	Quantidade (g.l <sup>-1</sup> )
Caldo Nutriente	Extrato de carne	1,0
	Extrato de levedura	2,0
	Peptona	5,0
	Dextrose	5,0
	Cloreto de Sódio	5,0
Caldo Luria Bertani	Caseína enzimática hidrolisada	10,0
	Extrato de levedura	5,0
	Cloreto de Sódio	10,0
Caldo Mueller Hinton	Infusão de bife	300,0
	Caseína ácida hidrolisada	17,5

A curva de crescimento para a bactéria IBDeL6 foi realizada utilizando-se de 6 erlenmeyers de 500ml, sendo estes previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos. Em cada erlenmeyer foram adicionados 250ml de meios de cultura líquido, e adição de 1,5ml da suspensão de inóculo na concentração padronizada de 10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup> em cada um dos meios. Sendo no total 3 erlenmeyers contendo inóculo ( $n=3$ ) e 3 erlenmeyers que foram os brancos ( $n=3$ ) (Figura 3.7). Posteriormente, os frascos foram incubados em mesa agitadora (*Shaker*) com agitação de 150rpm, a 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Alíquotas de cada repetição foram retiradas em intervalos programados de 3 em 3 horas e com duração final de 102 horas. Sempre que retiradas as amostras nos determinados tempos, as mesmas eram avaliadas quando à sua absorbância, as medidas foram realizadas em triplicatas e analisadas em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm.

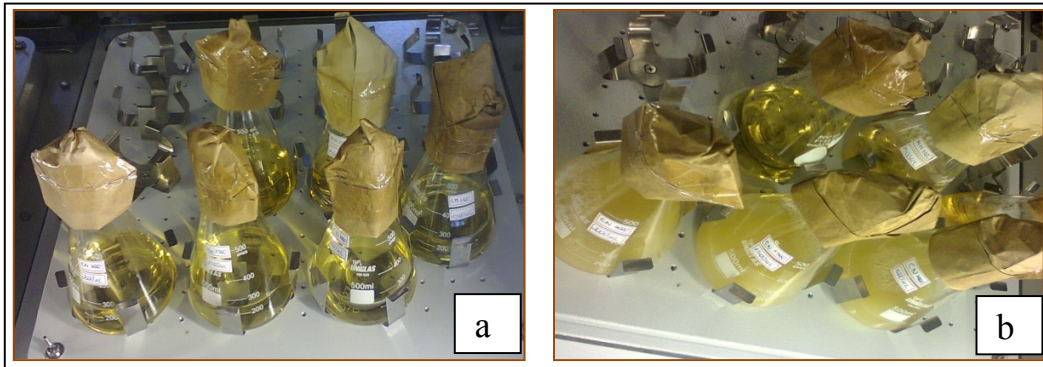


FIGURA 3.7-Imagens dos frascos incubados para a realização das medidas de densidade óptica do crescimento microbiano da bactéria IBDeL6. a) 1hora e b) 32horas de incubação.

### **3.2.5- Ensaio de inibição do crescimento microbiano por produtos naturais**

Para a realização destes ensaios foram avaliados quatro protocolos distintos. Os três primeiros foram metodologias de ensaio de inibição por métodos de difusão em ágar, segundo metodologias avaliadas por ALVES et al.(2008).

E por conseguinte, foi testada uma metodologia de avaliação de inibição microbiana, utilizando a técnica de microdiluição em placa de ELISA<sup>®</sup>, que associa à técnica de espectrofluorescência para monitorar o crescimento microbiano tornando possível quantificar as devidas inibições por diferentes extratos vegetais.

Todos os ensaios antibacterianos foram realizados sobre a cepa codificada como IBDeL6.

### **3.2.5.1- Técnica do poço em camada dupla**

A determinação da atividade antibacteriana pela técnica do poço foi realizada utilizando-se de placas com camada dupla sendo uma camada base e outra de semeadura de meios adequados à bactéria (NA). A camada base foi estabelecido como meio de cultura NA. Após o meio base ser esterilizado e resfriado a cerca de 50°C, um volume de 12 ml foram adicionadas em placas de Petri® de 15x90mm esterilizadas. Após solidificação à temperatura ambiente a uma camada de semeadura foi preparada e adicionada sobre a camada base. A camada de semeadura foi preparada em um tubo contendo 7,0ml também do meio de cultura NA esterilizado, previamente resfriado e incorporado com 1,0ml de Caldo Nutriente com inóculo na concentração de  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup> (correspondente à 3ª diluição em série, Figura 3.6). Após a camada base solidificada, cerca de 50min, a camada de semeadura foi vertida sobre a mesma. Após a solidificação da camada de semeadura, poços foram confeccionados com um furador metálico de 5,0mm de diâmetro. Em cada poço foram adicionados 30µl de uma solução preparada com extratos a serem testados. Tratamentos com metabólitos secundários puros e controles negativo e positivo também foram inclusos em cada ensaio. Como controle positivo foi utilizado a tetraciclina na concentração de 500µg.ml<sup>-1</sup> (conforme normas da NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) em solução de 2,5 (% v/v) de DMSO. Os extratos foram preparados na concentração de 1000µg.ml<sup>-1</sup> em solução aquosa com 2,5 (% v/v) de DMSO. O controle negativo correspondeu à água estéril com 2,5 (% v/v) de DMSO. As soluções foram filtradas em filtros estéreis de 0,22µm de diâmetro, previamente à aplicação nos poços. Após um período de pré-incubação de 90 minutos à temperatura ambiente, que permite a difusão dos extratos antes do início do desenvolvimento dos microrganismos, as placas foram incubadas a 28°C



por 24 horas. Após esse período foi realizada a leitura métrica dos halos de inibição.

### **3.2.5.2- Técnica do poço convencional**

O teste para determinação da atividade antibacteriana pela técnica do poço convencional foi realizado de forma bem similar a metodologia acima descrita, utilizando mesmo meio de cultura NA. No entanto, neste protocolo apenas uma camada foi introduzida na placa de Petri<sup>®</sup>, sendo investigados os volumes de 17ml e 20ml de meio. O inóculo foi utilizado na concentração de  $10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>. O inóculo foi distribuído uniformemente sobre o ágar já solidificado com auxílio de um *swab* esterilizado. Após um período de repouso por 3 minutos, os poços foram confeccionados com auxílio de um furador metálico com 5mm de diâmetro. Em cada poço foram adicionados 25µl da solução dos agentes antibacterianos e controles em investigação.

### **3.2.5.3- Técnica do disco em placa**

O teste para determinação da atividade antibacteriana pela técnica do disco foi executado segundo recomendações das normas da NCCLS. Inicialmente foi preparado o meio de cultura de NA. Após resfriamento a cerca de 50°C, um volume de 20ml do meio ainda liquefeito foi transferido para cada placa de Petri<sup>®</sup> de vidro esterilizadas de dimensões de 15x90mm. Após o meio solidificado e com auxílio de um *swab* esterilizado, o inóculo foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar, realizando movimentos em ângulos de 180° e deixado em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. Os discos foram preparados de papel de filtro com auxílio de um furador de 5mm e, após esterilizados, foram

embebidos nas soluções a serem testadas frente à atividade antimicrobiana, 20 minutos antes da aplicação. Posteriormente, os discos foram incorporados ao meio de cultivo, deixados em repouso por 30 minutos e então incubados a 28°C por 24 horas. Todos os tratamentos descritos foram realizados em triplicata ( $n=3$ ).

### **3.2.5.4- Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação qualitativa utilizando resazurina como revelador**

Com o propósito de obter uma metodologia mais robusta, com maior sensibilidade, incluindo resultados qualitativos e quantitativos, uma nova metodologia foi desenvolvida. Este método utilizou placas de ELISA® com 96 poços e fundo chato, microrganismo, os compostos de investigação e um corante que na presença de células viáveis é reduzido, é detectado por fluorescência.

#### **3.2.5.4.1- Preparo do inóculo**

A cepa bacteriana foi reativada do freezer a -80°C, e repicada para uma placa de Petri contendo meio de cultura NA, após 48 horas de repicagem, foram inoculadas 3 colônias em um tubo contendo Caldo Nutriente, onde após 24 horas de crescimento foi realizado o procedimento de diluição seriada em solução salina, obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , onde o inóculo utilizado no ensaio correspondeu à quinta diluição, equivalente à  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup>, quantidade de células recomendável para ensaios de microdiluição em caldo, o qual equivale ao padrão de inóculo predito por MacFarland (NCCLS) como padrão para realização de ensaios antibacterianos. O monitoramento do crescimento microbiano foi realizado por um espectrofotômetro em 600nm, onde a absorbância correspondeu à 0,1-0,5 (SARKER et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011).

### **3.2.5.4.2- Preparo dos extratos para o ensaio antibacteriano**

As amostras de extratos e frações a serem testados foram preparados pesando-se 5mg de cada amostra e adicionando-se 125µl de DMSO P.A. (Padrão Analítico), a esta solução adicionaram-se 4,9ml de meio de cultura líquido Caldo Nutriente esterilizado. Todas as suspensões das amostras foram devidamente filtradas em membrana 0,22µm.

### **3.2.5.4.3- Preparo das soluções dos controles**

✓ Controle positivo (antibiótico Tetraciclina)

Em geral, cepas bacterianas conhecidas já possuem uma faixa de concentração em que apresentam sensibilidade à antibióticos, informações que pode-se obter pelas normas da NCCLS, no entanto, como a bactéria em questão possui pouquíssimos relatos na literatura, sendo nenhum desses em relação à sensibilidade à antibióticos, optou-se em preparar uma solução de antibiótico na maior concentração predita pelas normas da NCCLS. Para tal, o caldo do meio de cultura a ser utilizado (Caldo Nutriente) e o DMSO foram devidamente esterilizados em autoclave por 20min a 120°C. Assim, a solução de tetraciclina preparada foi de 500µg.ml<sup>-1</sup>, onde 1mg de tetraciclina foi dissolvido em 50µl de DMSO em um tubo de eppendorf de 2ml, a mistura foi homogeneizada em um agitador magnético por 3min e então completado o volume com 1950µl de caldo nutriente. É interessante destacar, que o antibiótico utilizado correspondeu a um padrão com 99,8% de pureza (SIGMA-ALDRICH) e não a medicamentos

comerciais, pra que não houvesse interferências que poderiam comprometer a reprodutibilidade dos ensaios.

✓ Controle de DMSO

Este controle consistiu apenas 4,9 ml de meio de cultura (Caldo Nutriente) com adição de 125µl de DMSO P.A.; este controle é importante para avaliar a toxicidade do DMSO frente à cepa bacteriana, averiguando se há ou não interferência do mesmo no resultado de inibição.

✓ Montagem da placa de ELISA

Foram transferidos 100µl das soluções contendo as amostras de extrato e frações e 60 µl de meio para os poços da placa de ELISA. Cada composto foi ensaiado em triplicata. Além do extrato bruto de *C. sylvestris*, foram testadas também suas partições (acetato, metanólica), um extrato enriquecido de Casearinas (diterpenos clerodânicos- cedido por uma aluna de mestrado) e alguns controles, o controle positivo (solução de tetraciclina), controle de DMSO (meio de cultura com 2,5% (v/v) de DMSO), controle de esterilidade do ambiente (apenas meio de cultura sem adição de inóculo) e controle negativo (meio de cultura).

Após a montagem na placa de todas as triplicatas das soluções, foram adicionados 10µl de suspensão bacteriana na concentração padronizada de 10<sup>5</sup> UFC, totalizando um volume final de 170µl.

Na sequência, a placa foi tampada com outra placa igual e protegida com um plástico *insulfim* nas laterais sendo incubadas por 48 horas a uma temperatura de 28°C. Após esse período adicionaram-se 30µL de resazurina na concentração de 100µg.ml<sup>-1</sup> em cada poço. Por fim, a atividade foi qualitativamente avaliada, através da leitura visual da mesma.

### **3.2.6- Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação quantitativa através da técnica de espectrofluorimetria – desenvolvimento de uma metodologia analítica**

O bioensaio para avaliação da atividade antibacteriana foi também testado de forma a obter resultados quantitativos. Para tal foi desenvolvido um método analítico utilizando-se da técnica de espectro fluorescência, onde primeiramente foi obtida uma curva de calibração a fim de avaliar a melhor faixa linear de concentrações que o corante poderia ser testado.

A validação do método analítico foi realizada avaliando parâmetros de fluorescência, tais como linearidade, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão, exatidão e teste do duplo cego.

#### **3.2.6.1- Linearidade e faixa dinâmica de trabalho**

A linearidade e faixa dinâmica de trabalho foram estabelecidos a partir da construção de uma curva de calibração visando utilizando diferentes concentrações do corante resazurina. A faixa de concentração foi determinada empiricamente.

A melhor linearidade foi obtida em um intervalo de 0,28-5,2% (v/v) de corante, ou seja, em concentração final nos poços entre 0,010 e 0,195  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

✓ Preparo da placa de ELISA<sup>®</sup>

Anterior ao preparo das soluções padrão foi preparada a placa de ELISA<sup>®</sup> conforme a necessidade das concentrações que foram testadas. A placa foi preparada conforme descrito no item 3.2.5.4.3. Sendo que para cada concentração de corante a ser testada, foram confeccionados três poços, ou seja, análise realizada em triplicata ( $n=3$ ).

Este experimento para determinar a linearidade foi realizado adicionando em cada poço meio de cultura líquido (160 $\mu$ l) e o inóculo (10 $\mu$ l) na concentra  $10^5$  UFC Contudo, neste caso foram adicionados somente o meio de cultura (160 $\mu$ l) e 10 $\mu$ l de inóculo, a placa foi incubada em B.O.D à 28°C por 48 horas. Após o período de 48 horas, 30 $\mu$ l de cada solução de trabalho ( $n=3$ ) foram incorporados nos poços. Um período de 40 minutos foi mantido para ocorrência da reação. Na sequência a placa foi submetida à leitura de fluorescência em um espectrofluorímetro Spectramax com um  $\lambda_{\text{abs}}=530$  e  $\lambda_{\text{emi}}=590\text{nm}$ . Esta leitura foi realizada em 5 minutos por placa, onde cada poço foi lido três vezes.

✓ Preparo da solução estoque

Para o preparo das soluções padrão a serem utilizadas na realização da curva; primeiramente, foi preparada uma solução estoque na concentração de 2,51  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Esta solução foi preparada adicionando 2,51mg de resazurina em um balão volumétrico de 100ml já contendo uma certa quantidade de água destilada estéril. Posteriormente à adição do corante, o volume do balão foi então completado até o menisco com água destilada estéril.

✓ Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas à partir da diluição da solução estoque anteriormente descrita. À partir da estoque ( $2,51\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) volumes conhecidos das soluções de trabalho foram adicionados em balões volumétricos de 10mL, sendo os volumes completados até o menisco com água estéril e então obtidas soluções nas concentrações de 0,070; 0,17; 0,30; 0,40; 0,50; 0,70; 0,90; 1,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Considerando que foram utilizados um volume de 30 $\mu\text{l}$  das soluções de trabalho em cada poço da placa de ELISA<sup>®</sup> para um volume final de 200 $\mu\text{l}$ , as concentrações nominais em cada poço foram de: 0,010; 0,026; 0,045; 0,060; 0,075; 0,135; 0,195  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

✓ Obtenção da curva de calibração

A curva de calibração foi construída relacionando-se os valores da concentração de resazurina nos poços ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), no eixo das abscissas, com os valores de fluorescência, no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da verificação da proporcionalidade entre a concentração e a resposta analítica (fluorescência) a partir do cálculo dos coeficientes linear ( $b$ ), angular ( $a$ ) e de correlação ( $r$ ).

Para validação do método foram avaliados as figuras de mérito seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão, seguindo as especificações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

### **3.2.6.5- Aplicação do método para avaliação do potencial de inibição de extratos vegetais**

#### ✓ Montagem da placa

O ensaio foi realizado utilizando a metodologia similar ao item 3.2.5.4.3. No entanto neste caso, após as 48 horas de incubação, a concentração fixa de resazurina a ser adicionada nos poços para realização de leitura no fluorímetro foi determinada através dos resultados obtidos pela curva de calibração realizada, sendo de  $0,135 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ou seja, a concentração adicionada na placa contendo as amostras de extratos ( os mesmos citados no item 3.2.5.4.3., bem como a forma de preparo) foi de  $0,9\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Neste experimento foram utilizados nos poços:  $100\mu\text{l}$  de solução dos extratos em estudo,  $60\mu\text{l}$  de meio líquido e  $10\mu\text{l}$  de inóculo, conseqüentemente após a adição dos  $30\mu\text{l}$  de resazurina o volume total no poço foi de  $200\mu\text{l}$ .

As condições de análise no fluorímetro foram as mesmas utilizadas para a construção da curva de calibração.

### **3.2.7- Material botânico**

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas no cerrado da UFSCar, campus São Carlos-SP em novembro de 2011. A amostra foi obtida coletando somente as folhas da planta, visando uma coleta sustentável. O ponto de coleta foi devidamente registrado através de dados de localização geográfica por satélite, sendo a localização correspondente: Sul- $21^{\circ}58'$  e  $22^{\circ}00'$  e Oeste- $47^{\circ}51'$  e  $47^{\circ}54'$ . Uma exsicata da amostra foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar sob os cuidados da Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Inês Salgado Lima. Estes



procedimentos contribuirão para a rastreabilidade dos dados bem como assegurar a reprodutividade de futuros ensaios.

### **3.2.7.1- Obtenção dos extratos de *Casearia sylvestris***

#### **3.2.7.1.1- Preparo do extrato bruto etanólico de *C. sylvestris***

Após a coleta das folhas da planta, a mesma foi encaminhada para o Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSCar, sendo as folhas imediatamente secas em estufa de ar circulante a 40° C por sete dias. Posterior à secagem, o material foi então triturado com auxílio de um moinho tipo Willey®.

O material seco e triturado, foi submetido a uma extração do tipo turbólise utilizando um ultra-turrax e reservado em solvente orgânico (álcool etílico P.A.) correspondendo à uma proporção de 5:1 entre solvente e massa seca. Este procedimento de maceração foi realizado cinco vezes, sendo no término das extrações, todo o extrato etanólico agrupado e concentrado em um evaporador rotativo. O extrato final obtido exibiu aspecto pastoso e coloração verde escura. A cada lavagem e extração, o solvente foi retirado por filtração à vácuo com auxílio de um funil de Buchner. O filtrado então foi retirado e uma nova quantidade de álcool etílico adicionada à torta. O rendimento da extração pôde ser calculado com base na diferença entre as massas de material seco e do extrato final obtido.

#### **3.2.7.1.2- Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Casearia sylvestris***

Posterior à obtenção do extrato etanólico, 30g do material foi fracionado em uma coluna de sílica gel (230 – 400 mesh) à vácuo, a qual foi eluída com três solventes distintos em ordem crescente de polaridade (Figura 3.8). Foram

obtidas três novas frações do extrato etanólico bruto, o volume utilizado de cada solvente foi de aproximadamente 2L, no entanto a extração foi acompanhada pela coloração que o respectivo solvente ia sendo eluído. As frações foram então concentradas em evaporador rotatório até a completa eliminação dos solventes.

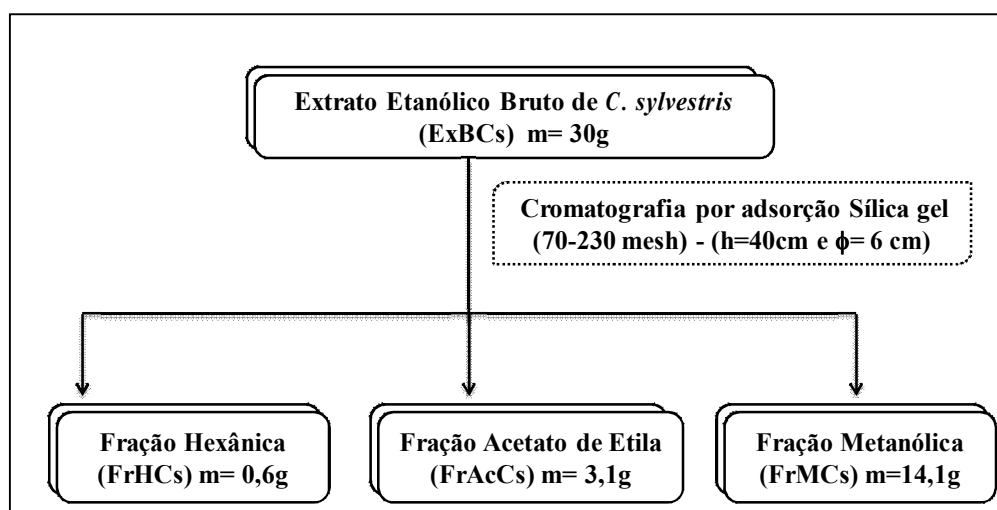


FIGURA 3.8- Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico (ExBCs).

### 3.2.7.1.3- Fracionamento da partição acetato de etila das folhas de *C. sylvestris*.

Após análise de RMN  $^1\text{H}$  da fração acetato de etila (FrAcCs), que apresentou sinais característicos de casearinas, esta foi fracionada em uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho utilizando Sephadex<sup>®</sup>-LH 20 como fase estacionária. No primeiro fracionamento (Figura 3.9), obtiveram-se 24 novas frações. Após analisar as mesmas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), estas foram agrupadas em 8 novas subfrações, as quais foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ).

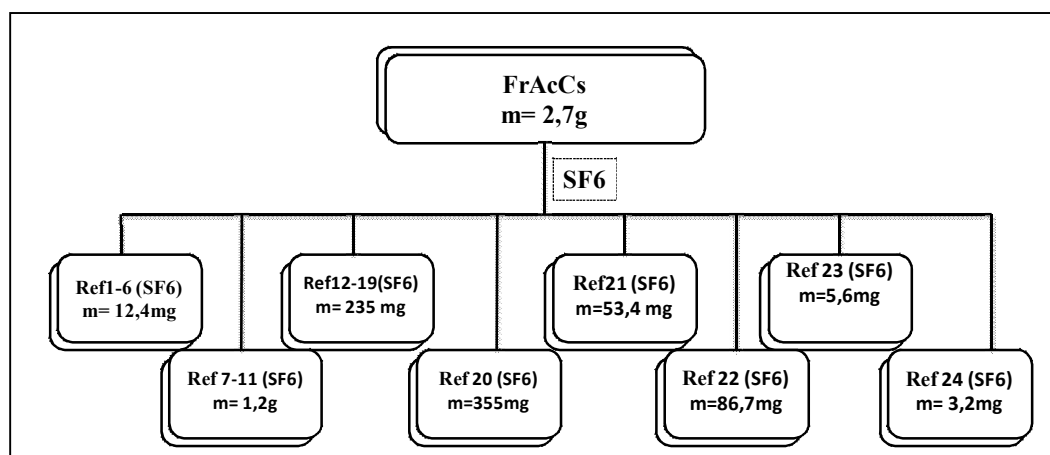


FIGURA 3.9- Fluxograma de fracionamento da fração acetato de etila (FrAcCs).

SF6) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 4,5$  cm,  $h = 90$  cm), fase estacionária: Sephadex<sup>®</sup> LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

Após análises das placas de CCDA e RMN <sup>1</sup>H. As subfrações Ref 7-11(SF6) e a Ref 20 (SF6) foram selecionadas para novas etapas de purificação, afim de isolar e identificar marcadores do ExAcCs. As subfrações citadas foram escolhidas por apresentaram sinais típicos de diterpenos clerodânicos e flavonóides, respectivamente.

A Ref 20 (SF6) foi submetida a um novo fracionamento utilizando à cromatografia líquida por adsorção à pressão atmosférica (Figura 3.10). Foram obtidas 37 novas subfrações que após analisadas por CCDA foram agrupadas em 4 grupos. Assim, o terceiro grupo correspondeu ao flavonóide puro, sendo então possível a correta determinação da substância através de técnicas espectroscópicas.

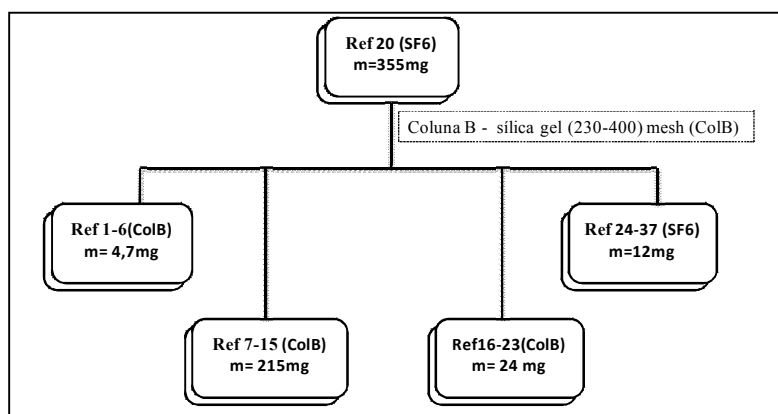


FIGURA 3.10- Fluxograma de fracionamento da Ref20(SF6).

Col B) Cromatografia por adsorção – coluna de sílica gel (230-400) mesh, ( $\phi = 2,5$  cm, h = 14cm), gradiente de acetato de etila:metanol.

A Ref 7-11(SF6) foi novamente fracionada através da cromatografia por adsorção a baixa pressão, conforme Figura 3.11. A coluna resultou em 51 subfrações, as quais após analisadas por CCDA foram devidamente agrupadas por questão de similariedade no fator de retenção e número de manchas. O Agrupamento resultou em 11 novos grupos os quais foram submetidos a experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ .

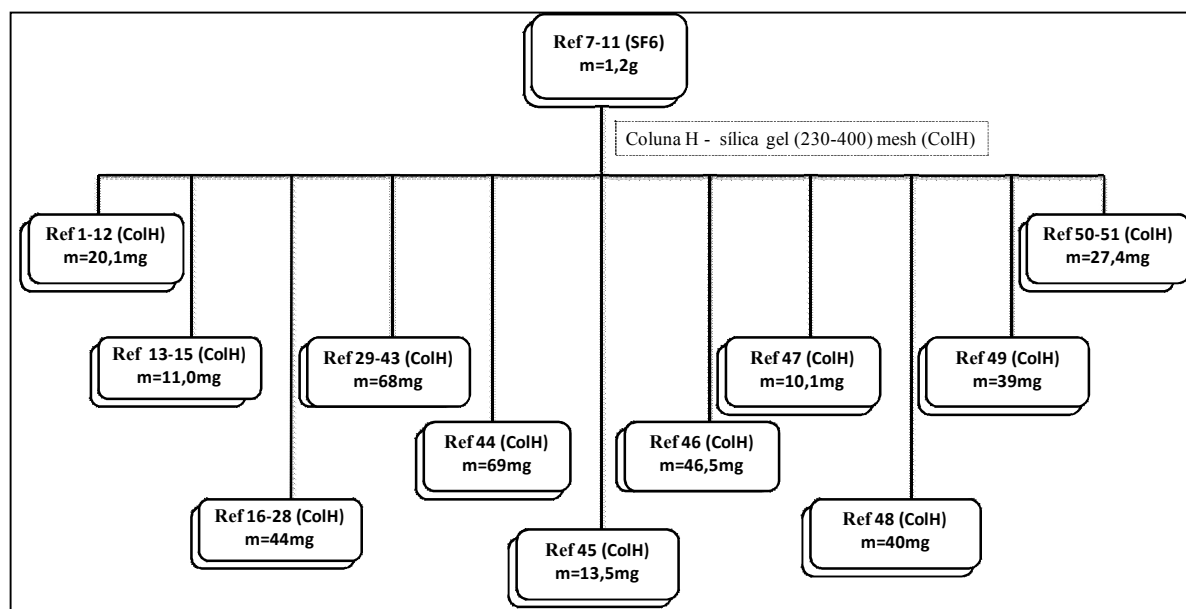


FIGURA 3.11- Fluxograma de fracionamento da Ref 7-11(SF6).

Col H) Cromatografia por adsorção – coluna de sílica gel (230-400) mesh, ( $\phi$  =3,5cm, h = 30cm), isocrático de de Hexano:Acetona (8:2 %v/v).

Após análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das subfrações da coluna H, a Ref47(colH) apresentou sinais interessantes, assim foi submetida a uma cromatografia por exclusão utilizando Sephadex<sup>®</sup> LH-20, objetivando uma melhor purificação do mesmo (Figura 3.12). Realizada a separação, 12 subfrações foram geradas e agrupadas após análises por CCDA, gerando 3 novos grupos. Estes foram então analisados por RMN  $^1\text{H}$  e a Ref (1-4) SF8 novamente submetido à uma cromatografia por exclusão de tamanho. O fracionamento forneceu 9 novas frações, sendo reagrupadas em 2 subfrações, sendo uma delas o marcador de interesse (diterpeno clerodânico). A determinação estrutural deste marcador foi realizada através de comparações dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com a literatura e confirmada por dados de espectrometria de massas.

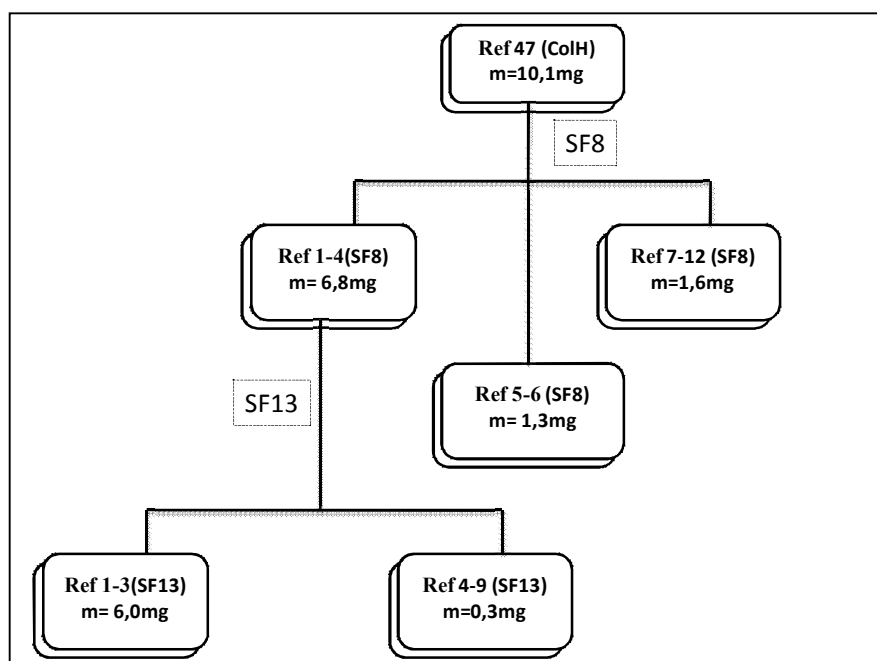


FIGURA 3.12- Fluxograma de fracionamento da Ref47(CoIH) e da Ref1-4(SF8).

SF8) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi=1,5\text{cm}$ ,  $h=45\text{cm}$ ), fase estacionária: Sephadex<sup>®</sup> LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

SF13) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi=1,5\text{cm}$ ,  $h=45\text{cm}$ ), fase estacionária: Sephadex<sup>®</sup> LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH:Diclorometano (1:1, %v/v).

### 3.2.7.1.4 Fracionamento da partição hexânica das folhas de *C. sylvestris*.

O fracionamento do extrato hexânico (ExHeCs) resultou em 135 frações (Figura 3.13 A), as quais foram analisadas por CCDA e agrupadas em 11 novas frações. Após análise por RMN de  $^1\text{H}$  das subfrações, a Ref 98-103 (Cole) foi novamente submetida à purificação por cromatografia de adsorção utilizando sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária (Figura 3.13 B). Após a eluição cromatográfica foram obtidas 41 novas subfrações que também após analisadas por

CCDA foram reagrupadas em 3 frações. Estas frações foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e verificou-se o isolamento de um novo sesquiterpeno- Ref 14-21(CoIF), que teve sua elucidação estrutural realizada através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

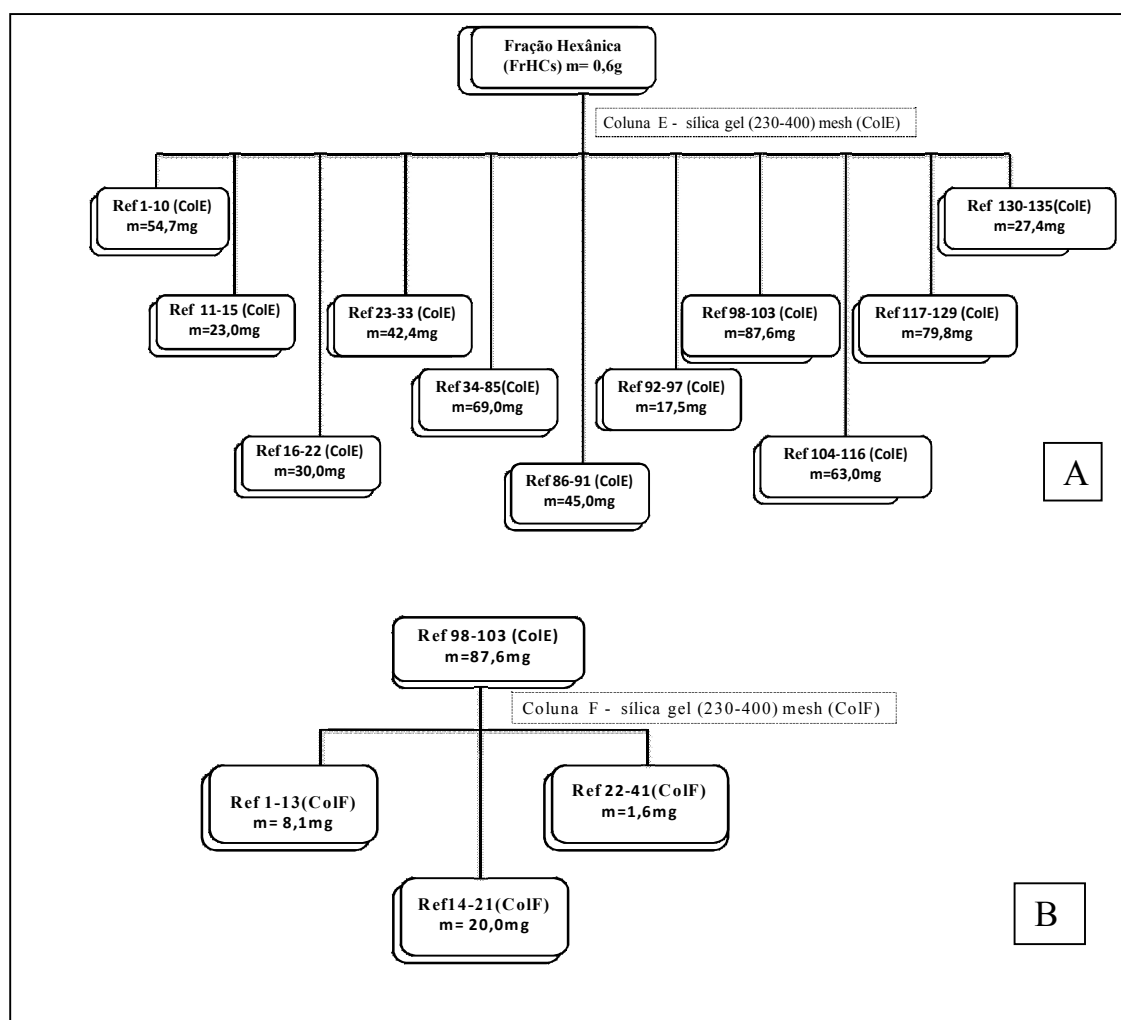


FIGURA 3.13- Fluxogramas de A): Fracionamento da FrHexCs e B): Fracionamento da Ref 98-103(CoE).

CoE) Cromatografia por adsorção – coluna de sílica gel (230-400)mesh ( $\phi=4,0\text{cm}$ ,  $h = 20\text{cm}$ ), gradiente de Hexano:Acetona.

CoIF) Cromatografia por adsorção – coluna de sílica gel (230-400)mesh ( $\phi=2,0\text{cm}$ ,  $h = 15\text{cm}$ ), gradiente de Hexano:Acetato de etila:acetona.

### **3.2.7.2- Análise quantitativa dos extratos de *C. sylvestris* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CLAE-UV)**

O extrato e frações obtidos das folhas de *C. sylvestris* submetidos à ensaios de inibição microbiana foram analisados por CLAE-UV (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Detector de Ultravioleta). O método utilizado foi desenvolvido em colaboração com a aluna de mestrado Karen Cristina dos Santos do grupo de Produtos Naturais.

O método foi devidamente desenvolvido e validado. Tendo como objetivo padronizar em termos quantitativos os extratos de *C. sylvestris* que foram submetidos à ensaio frente à *Luteibacter sp.*

Para a obtenção de dados quantitativos, o composto codificado por Ref 7-11(SF6) foi utilizada como marcador de referência e devidamente quantificado nos extratos. O metodologia analítica foi desenvolvida no modo reverso de eluição, utilizando um gradiente ternário de fase móvel composto por água, acetonitrila e metanol nas proporções iniciais de 34:44:22 (% v/v/v) respectivamente, essa proporção evoluiu até 0:53:47 (% v/v/v) em 42 minutos, onde permaneceu nessas condições por 10 minutos antes de retornar às condições iniciais. Utilizou-se de uma fase estacionária uma coluna da Phenomenex® Gemini C18 (5 µm de tamanho de partícula, e comprimento da coluna de 150x4,6mm), sendo acoplada à uma pré-coluna Phenomenex® C18 (5µm, 4x3mm).

O volume injetado foi de 20µl, a vazão de 1ml.min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda selecionado foi 220nm. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (25,0 ± 1,0 °C).



### **3.2.7.2.1- Preparo dos extratos, frações e do marcador de referência para análise por CLAE-UV**

Para o preparo das amostras de extratos e frações que foram submetidas à análise por CLAE-UV, 1mg de cada extrato e fração (ExBrCs, FrAcCs, FrMCs, Ref 7-11(SF6) e extrato diterpênico) foi pesado e dissolvido em 1mL de metanol grau HPLC. Posteriormente as amostras foram filtradas com membrana 0,22 $\mu$ m e assim submetidas à análise.



## 4-RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1- Isolamento dos microrganismos endossimbiontes de *Diabrotica speciosa*

Os procedimentos para o isolamento de microrganismos foram repetidos em diferentes épocas e dietas distintas. Durante os procedimentos de isolamento os fragmentos do trato digestivo do inseto, parte ventral da larva e o material fecal, foram cuidadosamente inoculados em diferentes meios de cultura e variadas placas de Petri®, visando o desenvolvimento de possíveis microrganismos endossimbiontes do inseto *Diabrotica speciosa*.

Como resultado, observou-se o desenvolvimento de diferentes espécies de microrganismos para o mesmo tipo de fragmento inoculado. Além disso algumas placas propiciaram o isolamento de cepas puras e outras em que não apresentaram nenhum crescimento microbiano. No entanto houveram outras que tiveram o crescimento exacerbado de microrganismos (Figura 4.1), impossibilitando a devida purificação das cepas.

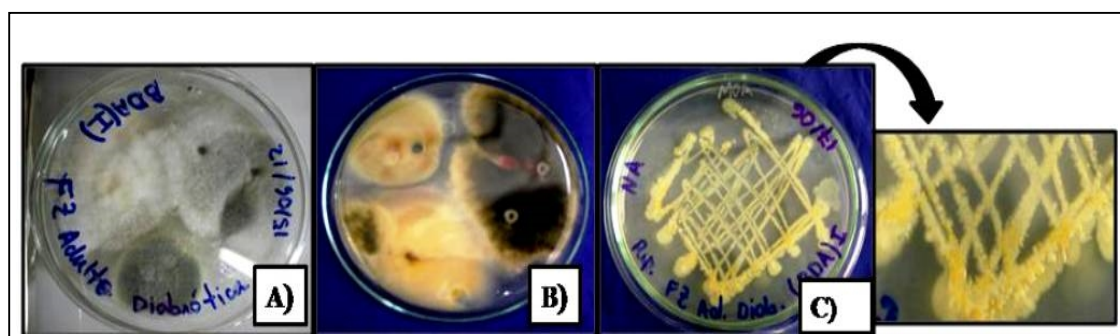


FIGURA 4.1-Placas com crescimento exacerbado de microrganismos. A e B) Frente e fundo- microrganismos desenvolvidos do material fecal, isolamento II, meio de BDA; C) várias colônias bacterianas distintas- desenvolvidas do material fecal, isolamento II, meio de NA.

O procedimento de inoculação dos fragmentos nas placas de Petri® contendo meios cultura sólido, possibilitou o crescimento tanto de cepas fúngicas quanto bacterianas em um intervalo entre 24 horas e 96 horas após a inoculação. Este fato aconteceu tanto para o primeiro isolamento quanto para o segundo isolamento. Em ambos isolamentos, após sucessivas repicagens, cepas purificadas de microrganismos que foram possíveis de se obter.

Foi observado o desenvolvimento de cepas fúngicas e bacterianas em meios de cultura sólidos de BDA e NA, respectivamente. A purificação dos mesmos foi realizada através de sucessivas repicagens para placas de Petri® contendo o mesmo meio de cultura de origem. Na Figura 4.2 estão representados algumas cepas microbianas após purificação

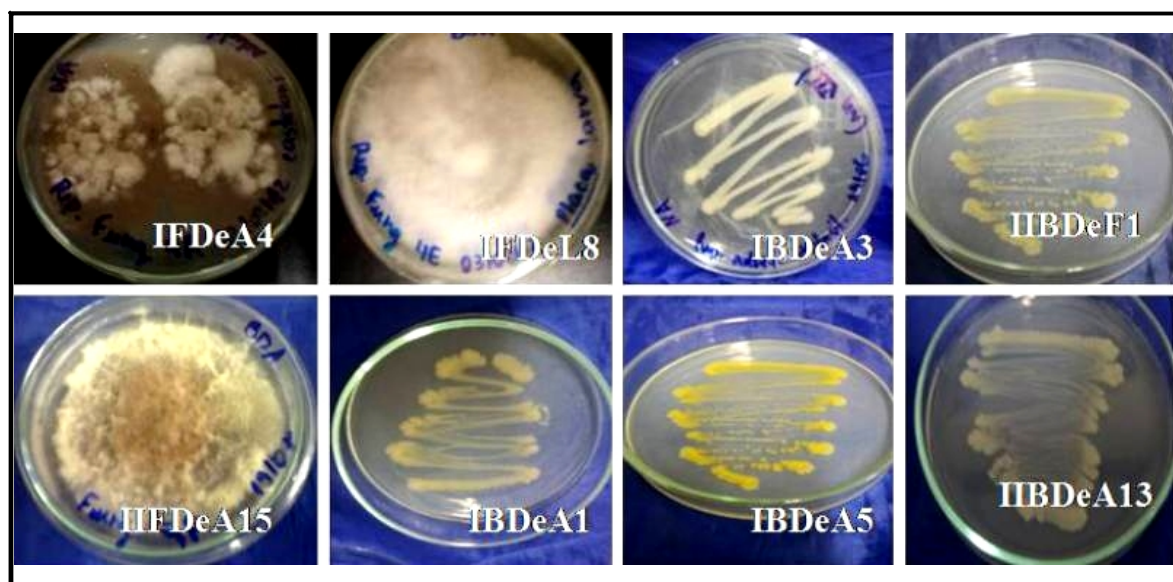


FIGURA 4.2-Cepas microbianas purificadas. IFDeA4) Fungo do isolamento I, BDA, proveniente do inseto adulto; IFDeL8) Fungo do isolamento I, BDA, larva; IBDeA3) Bactéria do isolamento I, NA, inseto adulto; IIBDeF1) Bactéria do isolamento II, NA, material fecal; IIFDeA15) Fungo do isolamento II, BDA, adulto; IBDeA1) Bactéria do isolamento I, NA, adulto; IBDeA5) Bactéria do isolamento I, NA, adulto e IIBDeA13) Bactéria do isolamento II, NA, adulto.

Na Tabela 4.1 estão demonstrados todos os microrganismos que foram possíveis de serem isolados e purificados.

TABELA 4.1-Codificação dos microrganismos isolados.

<b>Tipo de microrganismo</b>	<b>Código</b>	<b>Código Trabalho</b>	<b>Origem</b>	<b>Meio de cultura</b>
Bactéria	IBDeA1	1A	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA2	2A	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA3	3A	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA5	1B	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA6	2B	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA7	1C	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeA8	2C	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL1	1D	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL2	2D	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL3	3D	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL5	1E	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL6	2E	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IBDeL7	3E	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeA9	1F	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeA10	2F	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeA11	3F	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeA12	4F	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeA13	5F	Adulto	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeL9	1G	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeL10	2G	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeL11	3G	Larva	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeFe1	1H	Fezes	Nutriente Ágar
Bactéria	IIBDeFe2	2H	Fezes	Nutriente Ágar
Fungo	IFDeA4	4A	Adulto	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IFDeL4	4D	Larva	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IFDeL8	4E	Larva	Nutriente Ágar
Fungo	IIFDeA14	6F	Adulto	Batata Dextrose Ágar

## Resultados e Discussões

Fungo	IIFDeA15	7F	Adulto	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeA16	8F	Adulto	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeL12	4G	Larva	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeL13	5G	Larva	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeFe3	3H	Fezes	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeFe4	4H	Fezes	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeFe5	5H	Fezes	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeFe6	6H	Fezes	Batata Dextrose Ágar
Fungo	IIFDeFe7	7H	Fezes	Batata Dextrose Ágar

No primeiro isolamento, a criação de inseto e larvas de *D. speciosa*, foi mantida com plântulas e raízes de milho e no segundo isolamento por sua vez a criação encontrava-se em plântulas e raízes de feijão.

Após a devida purificação das cepas possíveis de serem isoladas, foi possível obter microrganismos diferentes em cada processo de isolamento. Desde modo, se pode atribuir a dieta um fator contribuinte na diversidade associada ao inseto. Conforme pode ser visualizado na Tabela 3.2. No total foram isolados e purificados 3 isolados fúngicos e 13 bacterianos do primeiro isolamento e 10 isolados fúngicos e 10 bacterianos do segundo isolamento. Deste total, 19 cepas bacterianas e 8 cepas fúngicas estão devidamente preservados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar. Sendo que 4 cepas fúngicas e 4 cepas bacterianas não foram possíveis de reativação, provavelmente o método de preservação não foi eficiente para estes microrganismos

Importante ressaltar, que não foram testados muitos tipo de meios com diferentes fontes nutricionais para o isolamento, foram utilizados apenas três tipos

de meios dos quais dois deles são já bem definidos para fungos (BDA) e bactérias(NA) e um outro terceiro meio (AA) com menor quantidade de nutrientes. O que provavelmente pode ter limitado a quantidade de microrganismos isolados.

## **4.2- Caracterização microbiana**

### **4.2.1- Coloração de GRAM**

A coloração de Gram é uma técnica que possibilita a classificação dos microrganismos com base em suas características morfológicas em relação à composição da parede celular, a partir das colorações que estas adquirem após tratadas com reagentes químicos específicos.

Através da técnica foi possível distinguir as cepas bacterianas em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas. A parede celular das bactérias Gram positivas consegue reter o complexo formado entre o cristal violeta –iodo, mesmo após o tratamento com álcool etílico, permanecendo a coloração azul-violeta. As cepas bacterianas Gram negativas por sua vez, ao serem tratadas com o solvente orgânico descoram e permanece a coloração do último corante utilizado, vermelho.

Esta técnica de agrupamento de cepas bacterianas, já existe há cerca de cem anos, a qual se baseia na complexidade ou não da parede celular do microrganismo. A parede celular de bactérias Gram positivas é formada por uma espessa camada de peptidoglicano, enquanto as bactérias Gram negativas possuem uma parede celular um tanto quanto mais complexa, sendo formada também por uma camada de peptidoglicano, e ainda rodeada por uma camada externa de lipopolissacarídeos e proteína (SAIDA et al., 2000). Essa diferença nas camadas da parede celular das bactérias é que possibilita a distinção das mesmas por esta técnica de coloração.

Além da possibilidade de dividir os isolados bacterianos em dois grupos, foi possível através da observação em microscópio óptico atribuir a morfologia celular desses microrganismos, conforme pode-se observar na Tabela 4.2.

TABELA 4.2-Resultados das colorações de Gram das cepas bacterianas.

<b>Bactéria</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Formato celular</b>
<b>IBDeA1</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IBDeA2</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IBDeA3</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IBDeA5</b>	Azul (Gram-positiva)	Bastonete
<b>IBDeA6</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Vibrião
<b>IBDeA7</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IBDeA8</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IBDeL1</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IBDeL2</b>	Azul (Gram-positiva)	Bastonete
<b>IBDeL3</b>	Azul (Gram-positiva)	Bastonete
<b>IBDeL5</b>	Não reativada	--
<b>IBDeL6</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IBDeL7</b>	Não reativada	--
<b>IIBDeA9</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IIBDeA10</b>	Azul (Gram-positiva)	Cocos
<b>IIBDeA11</b>	Azul (Gram-positiva)	Bastonete
<b>IIBDeA12</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IIBDeA13</b>	Azul (Gram-positiva)	Cocos
<b>IIBDeL9</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IIBDeL10</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IIBDeL11</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Cocos
<b>IIBDeFe1</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete
<b>IIBDeFe2</b>	Vermelho (Gram-negativa)	Bastonete

Esta técnica de coloração apresentou ser de fácil aplicação e análise, contudo pode ser prejudicada pelo uso de microscópio de baixa resolução de



imagens. A Figura 4.3 ilustra os resultados obtidos para a coloração de Gram dos isolados bacterianas, conforme descrito na Tabela 4.1.

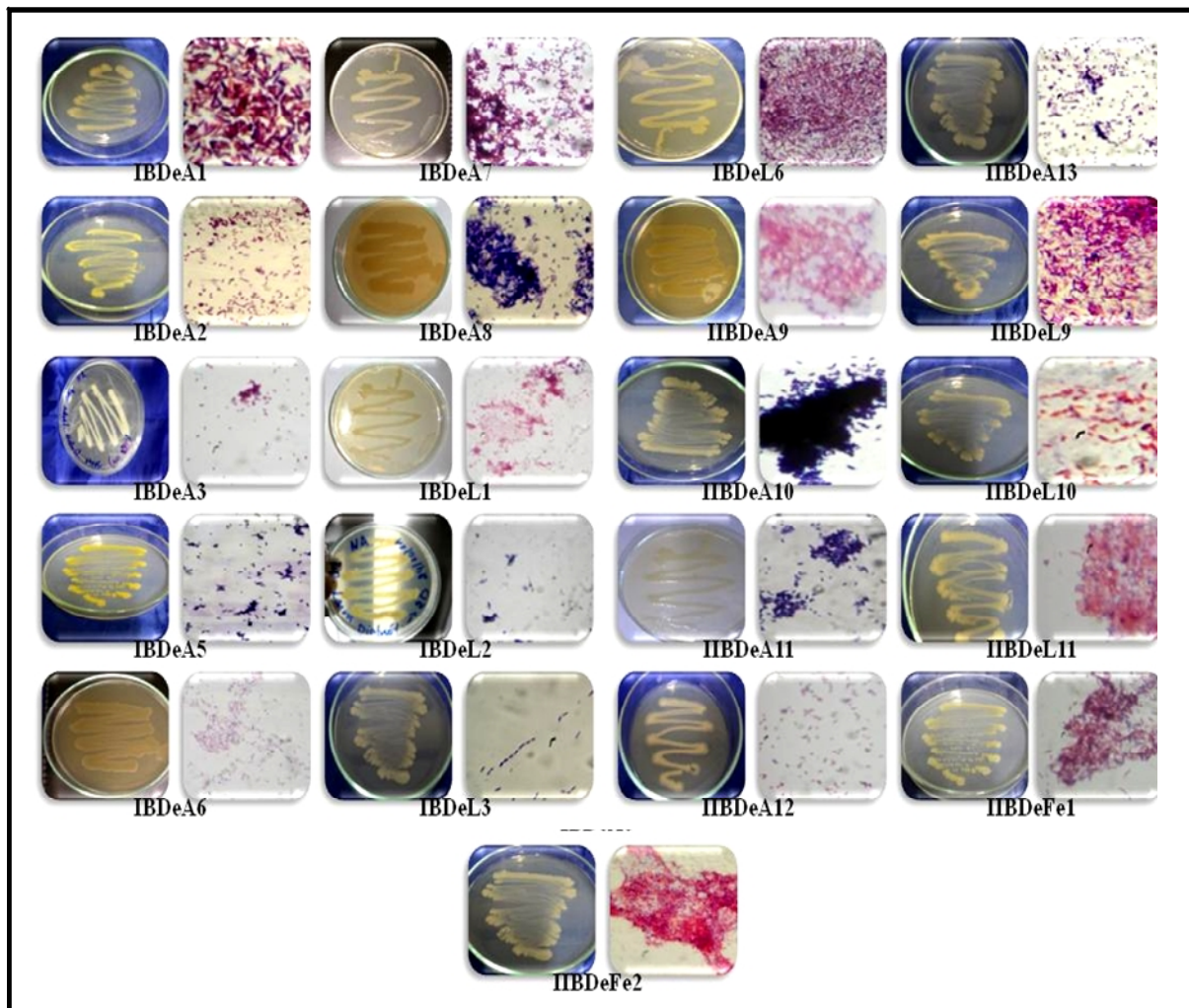


FIGURA 4.3-Teste de Gram obtidos para os isolados bacterianos.

De acordo com a literatura, o trato digestivo dos insetos abriga, em sua maioria, bactérias Gram-negativas (HIROSE et al., 2006). Como foram obtidos 15 isolados bacterianos Gram negativos e 6 isolados bacterianos Gram positivos, este resultado coincide com informações da literatura, reforçando a possibilidade de se tratarem de endossimbiontes de *D. speciosa*.

#### **4.2.2- Caracterização dos fungos por microscopia óptica**

Os isolados fúngicos foram analisadas morfologicamente a fim de realizar um agrupamento das mesmas. Geralmente, é conveniente distingui-los pelas diferenças características dos esporos sexuais e corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais dos seus ciclos de vida. Do ponto de vista morfológico, eles diferenciam pelas características do seu micélio, conídios, conidióforos.

As cepas foram analisadas por um microscópio óptico, com ampliações de até 1000 vezes. Através das imagens obtidas foi possível agrupar as cepas em quatro grupos. Duas cepas foram comparadas com dados da literatura de fungos já conhecidos e elas atribuídas, por comparação morfológica com a literatura, uma classificação a nível de gênero. Na Figura 4.4 pode-se observar as imagens obtidas dos fungos analisados no microscópio óptico.

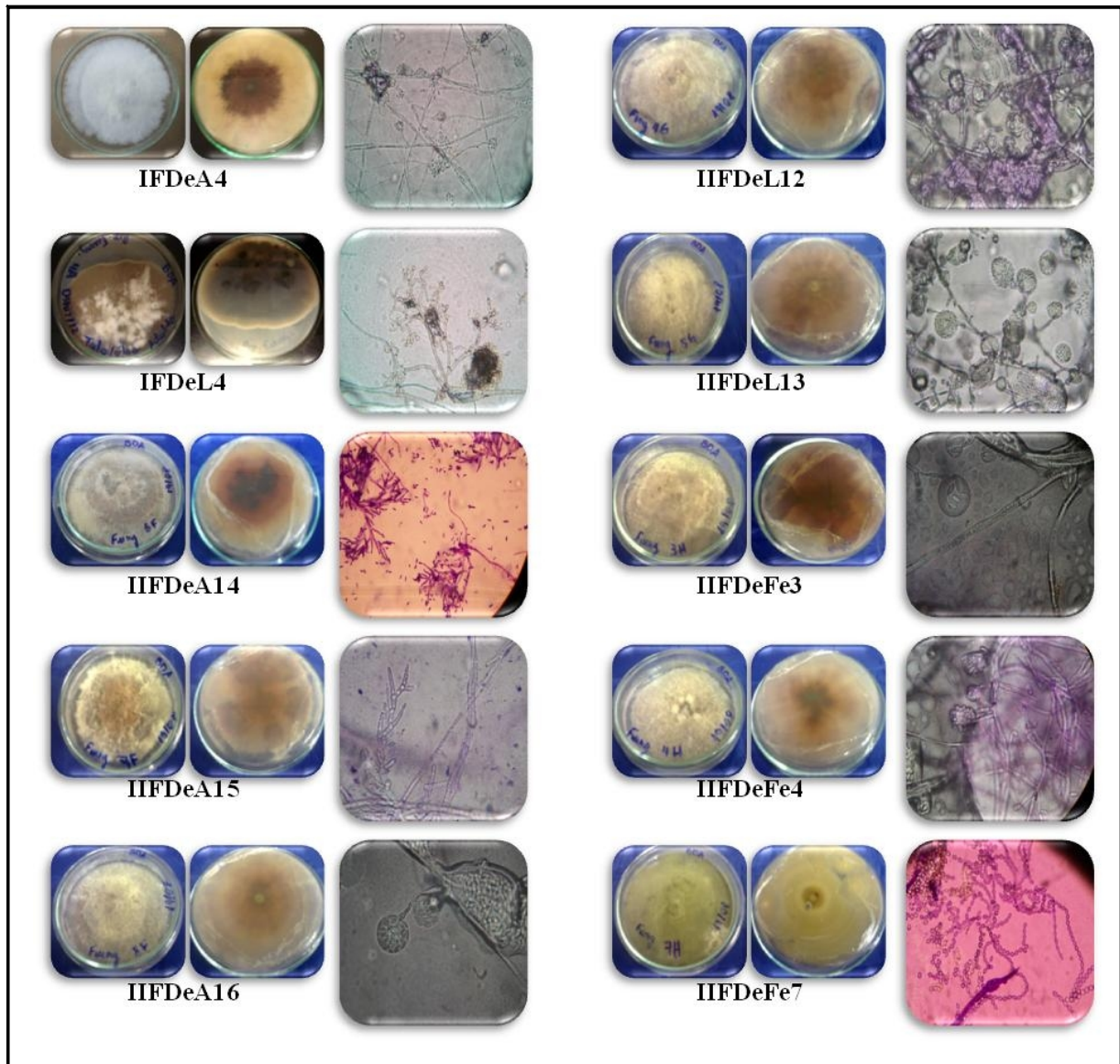


FIGURA 4.4-Análises morfológicas das cepas fúngicas.

Embora já tenha sido descrito o isolamento de 13 cepas fúngicas, apenas 10 cepas foram analisadas em termos morfológicos, uma vez que algumas eram nitidamente idênticas, sendo portanto não avaliadas. Através dessas micrografias, a Figura 4.5 demonstra o agrupamento sugerido para os isolados.

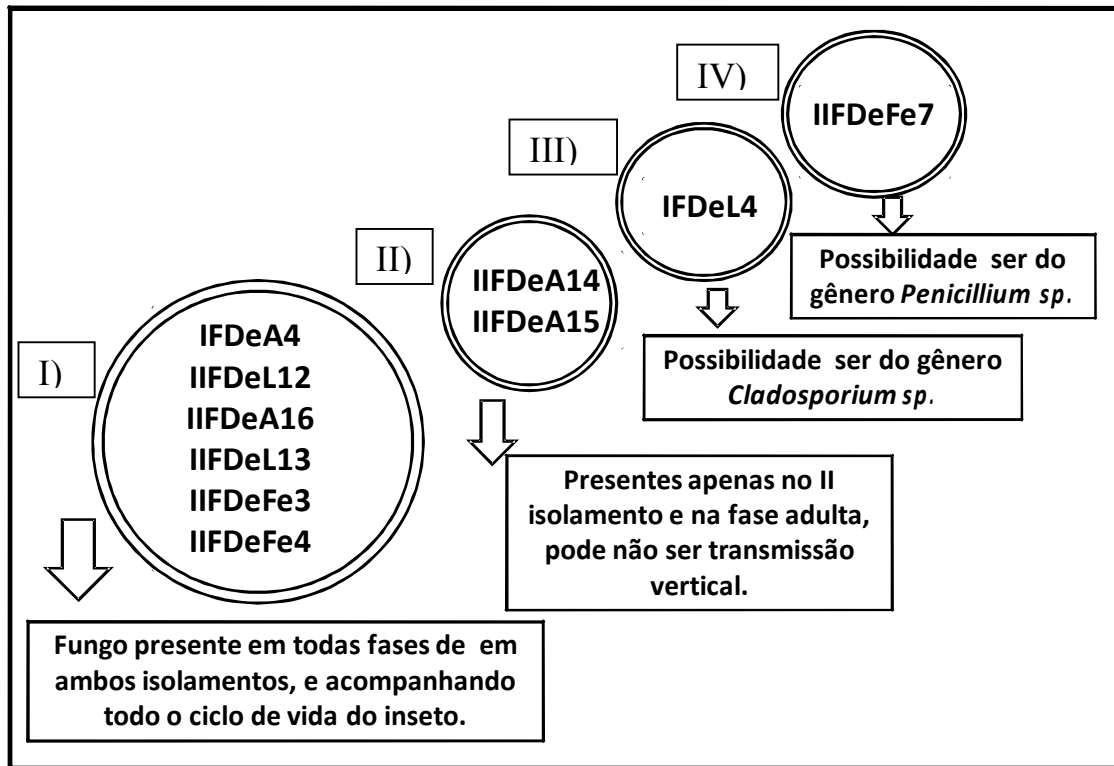


FIGURA 4.5-Agrupamentos através das análises morfológicas das cepas fúngicas isoladas.

Os isolados fúngicos posicionados no agrupamento I) foram isolados em ambos os processos de isolamento, para ambas as diferentes dietas e em todas as fases de desenvolvimento (inseto adulto, larva e material fecal). Este resultado possibilita infligir a estes isolados elevada possibilidade de se tratarem de espécies que de fato podem ter sido transmitidos verticalmente à *D speciosa*, serem de fato endossimbiontes do inseto.

O agrupamento II) se refere a isolados originados apenas do segundo isolamento, podendo portanto, sem microrganismos adquiridos do ambiente (transmissão horizontal).

Os microrganismos dos agrupamentos III) e IV), por sua vez, tiveram através de comparações morfológicas com a literatura, suas propostas de gênero atribuídas.

Na Figura 4.6 estão ilustradas as imagens morfológicas para o isolado IFDeL4 juntamente com os dados morfológicos da literatura.

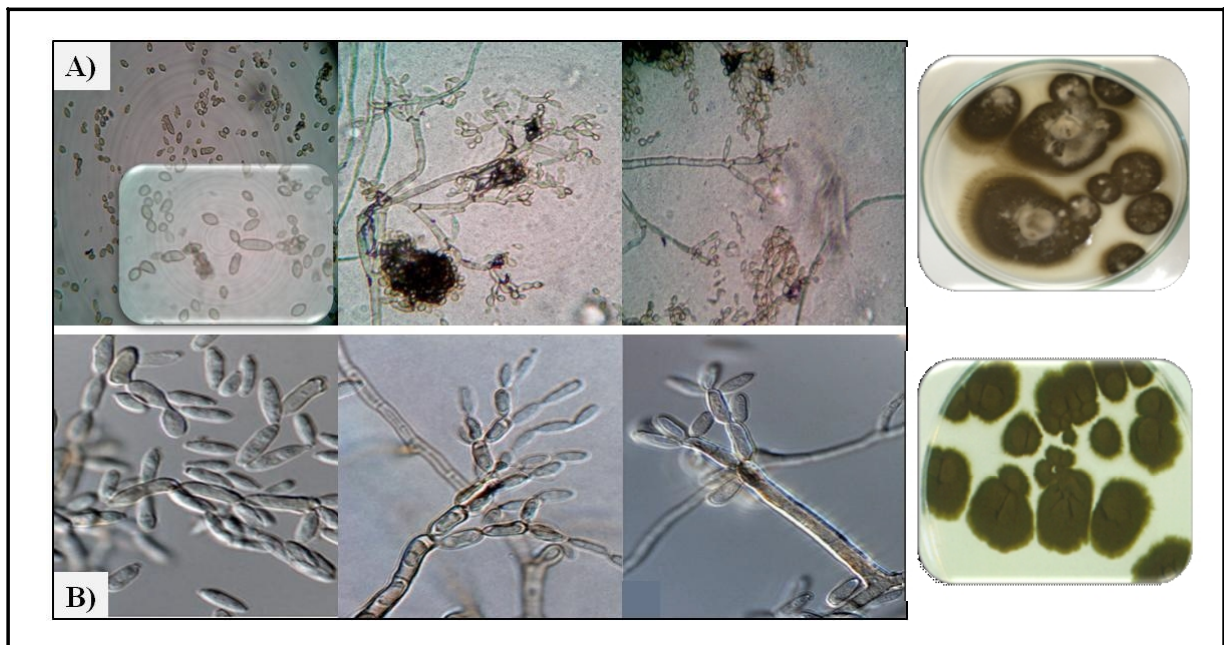


FIGURA 4.6-Micro imagens morfológicas de conídios, hifas e conidióforos para A) cepa isolada da larva de *D. speciosa*, IFDeL4 e B) dados da literatura (CROUS et al., 2007).

Assim, comparando a morfologia do isolado fúngico em questão, pode-se atribuir ao mesmo pertencer ao gênero *Cladosporium* sp.

Para o agrupamento IV) também foi atribuída uma proposta a nível de gênero, realizando as mesmas comparações no caso anterior. A Figura 4.7 vem demonstrando essa proposta.

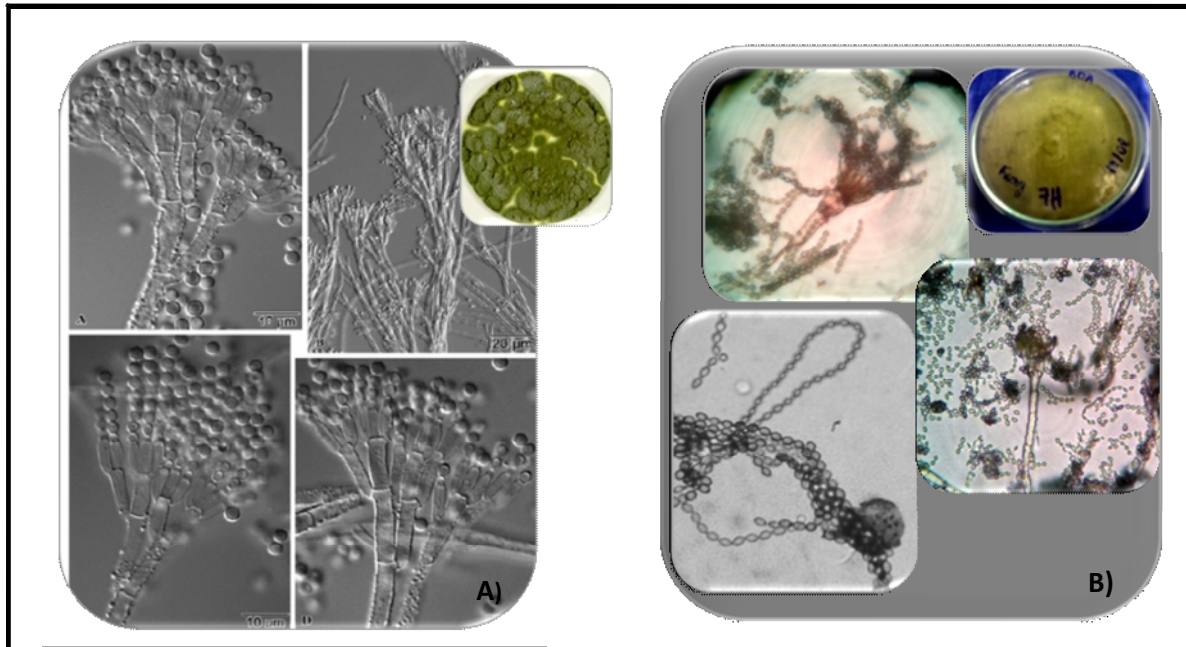


FIGURA 4.7-Micro imagens morfológicas de conídios e conidióforos para A) cepa isolada da larva de *D. speciosa*, IIFDeF7 e B) dados da literatura (OVERY & FRISVAD, 2003).

À cepa fúngica IIFDeF7 isolada a partir do material fecal do inseto de *D. speciosa* foi atribuída pertencer ao gênero *Penicillium sp.*

#### **4.2.3- Análises do perfil proteico dos microrganismos através da técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Laser com analisador por Tempo de Vôo (MALDI-TOF/MS)**

As caracterizações morfológicas realizadas utilizando métodos clássicos de microbiologia, possibilitou agrupar os isolados em diferentes grupos. Para as cepas bacterianas foi possível realizar o agrupamento das mesmas em termos de Gram negativa e Gram positiva. As cepas fúngicas foram agrupadas de

acordo com as similaridades de suas estruturas de reprodução (conídios e conidióforos).

Todavia, uma abordagem alternativa às técnicas clássicas de microbiologia para identificação e caracterização microbiana, os isolados microbianas foram analisadas por Espectrometria de Massas com Ionização por Dessorção a Laser assistida por matriz e analisador por tempo de voo (MALDI-TOF/MS- sigla do inglês). Esta técnica possibilitou a discriminação entre os isolados. As análises foram realizadas com células inteiras dos microrganismos, obtendo informações celulares totais em termos de perfil protéico, tanto de fungos quanto das bactérias.

Esta técnica de MALDI-TOF/MS utiliza o princípio de ionização branda, possibilitando detectar grandes moléculas não fragmentadas e moléculas com alta grau de complexidade, como proteínas. Resumidamente, a técnica consiste de uma matriz absorver a energia do laser incidido efetuando uma ionização suave de biomoléculas e, ao mesmo tempo mantendo-as intactas. Este princípio aliado a rapidez da técnica são as principais vantagens do MALDI-TOF/MS, na caracterização proteica e conseqüentemente no agrupamento de microrganismos.

Inúmeros são os trabalhos na literatura que vem substituindo as técnicas de microbiologia clássica pelo MALDI para avaliar a análise de microrganismos, este tipo de análise provou ser útil para caracterização de níveis de gêneros e inclusive espécies, no entanto esse nível de informação está intrinsicamente relacionado à quantidade de informações que as bibliotecas dos equipamentos possuem.

Uma limitação de uso da técnica ocorre na identificação dos microrganismos, que depende da qualidade e quantidade de informações que compõem os bancos de dados.

O perfil protéico dos microrganismos analisados não foi compatível com nenhum dado da literatura. Deste modo, pode-se inferir a possibilidade de estar trabalhando com microrganismos inéditos. Importante ressaltar, que os microrganismos foram analisados em quintuplicata ( $n=5$ ), gerando espectros de massa bem reproduzíveis.

Embora as análises por MALDI-TOF MS não tenham possibilitado a identificação de nenhum microrganismo isolado, os dados de perfis protéicos dos microrganismos foram agrupados pela comparação entre os espectros de massas obtidos, viabilizando obter um agrupamento de similaridade entre os isolados. A Figura 4.8 ilustra o procedimento geral utilizado na análise.

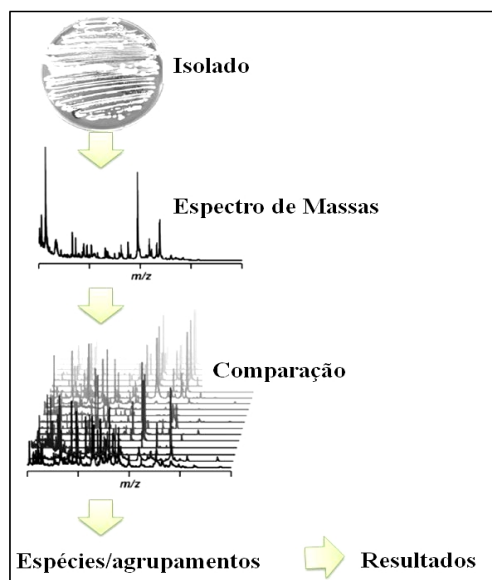


FIGURA 4.8-Esquema geral para agrupamento dos microrganismos por MALDI-TOF MS.

Os dados de massas obtidos pela sequência de pulsos do laser e aquisição dos sinais brutos dos espectros de massas, foram processados. A correção da linha de base e o modo de reconhecimento de picos foram parâmetros de comparação entre os espectros obtidos. Como resultado, para comparação dos



espectros de massas, diferentes critérios como presença ou ausência de picos bem como suas intensidades puderam ser adotados. As informações essenciais utilizadas para o agrupamento das cepas microbianas foi o número de pico, os valores de relação massa/carga ( $m/z$ ) dos picos e suas intensidades – os denominados de *fingerprint*, os quais foram os responsáveis pelos agrupamentos dos isolados.

A faixa de relação  $m/z$  analisada entre 2.000 e 20.000Da e um critério mínimo de 25 picos foram utilizados. O número de informações obtidas dos espectros foi suficiente para gerar um modelo que através de tratamentos no *software* Byotiper<sup>®</sup> foi possível a construir um gráfico de agrupamento entre os microrganismos.

A Figura 4.9 a 4.13 ilustra os espectros de massas referentes aos microrganismos investigados, sendo possível observar a alta similariedade entre os grupos obtidos. A análise dos *fingerprints* e, conseqüentemente, do dendograma (Figura 4.14) de agrupamento dos resultados do MALDI-TOF MS indiretamente se refere a um agrupamento em termos de informações genóticas dos microrganismos procariotos e fungos aqui investigados.

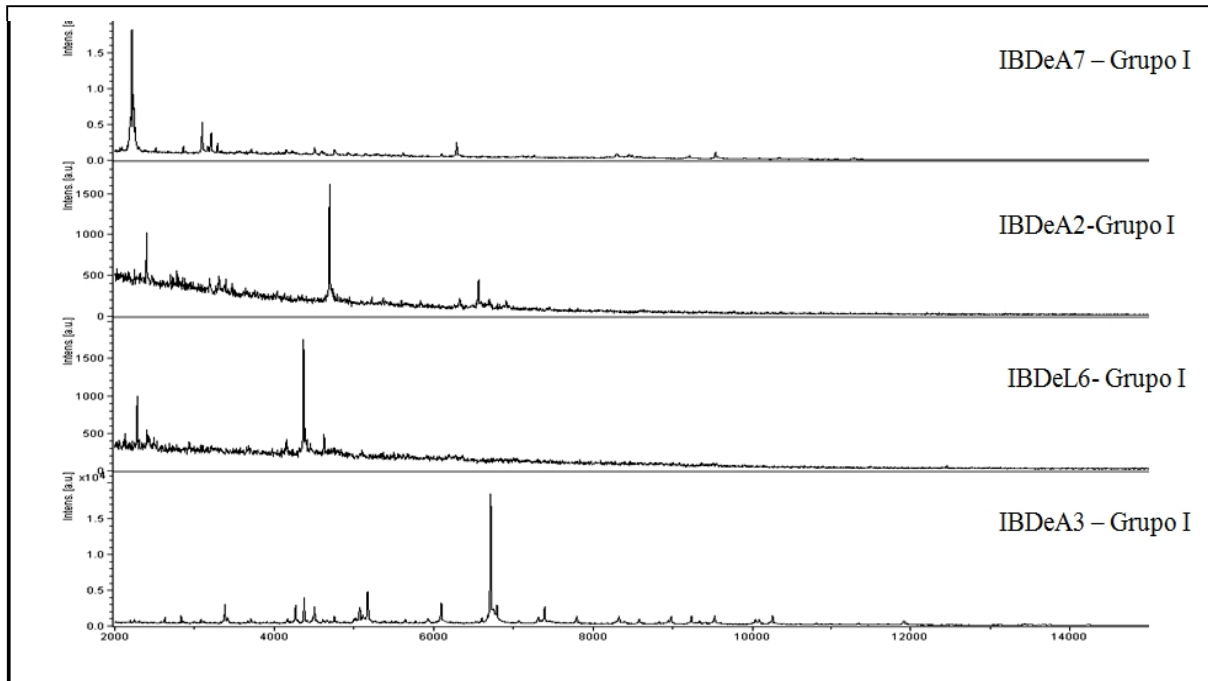


FIGURA 4.9- Espectros de massa MALDI I-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de *D. speciosa*, bactérias crescidas em NA; perfil protéico adquirido em modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo I.

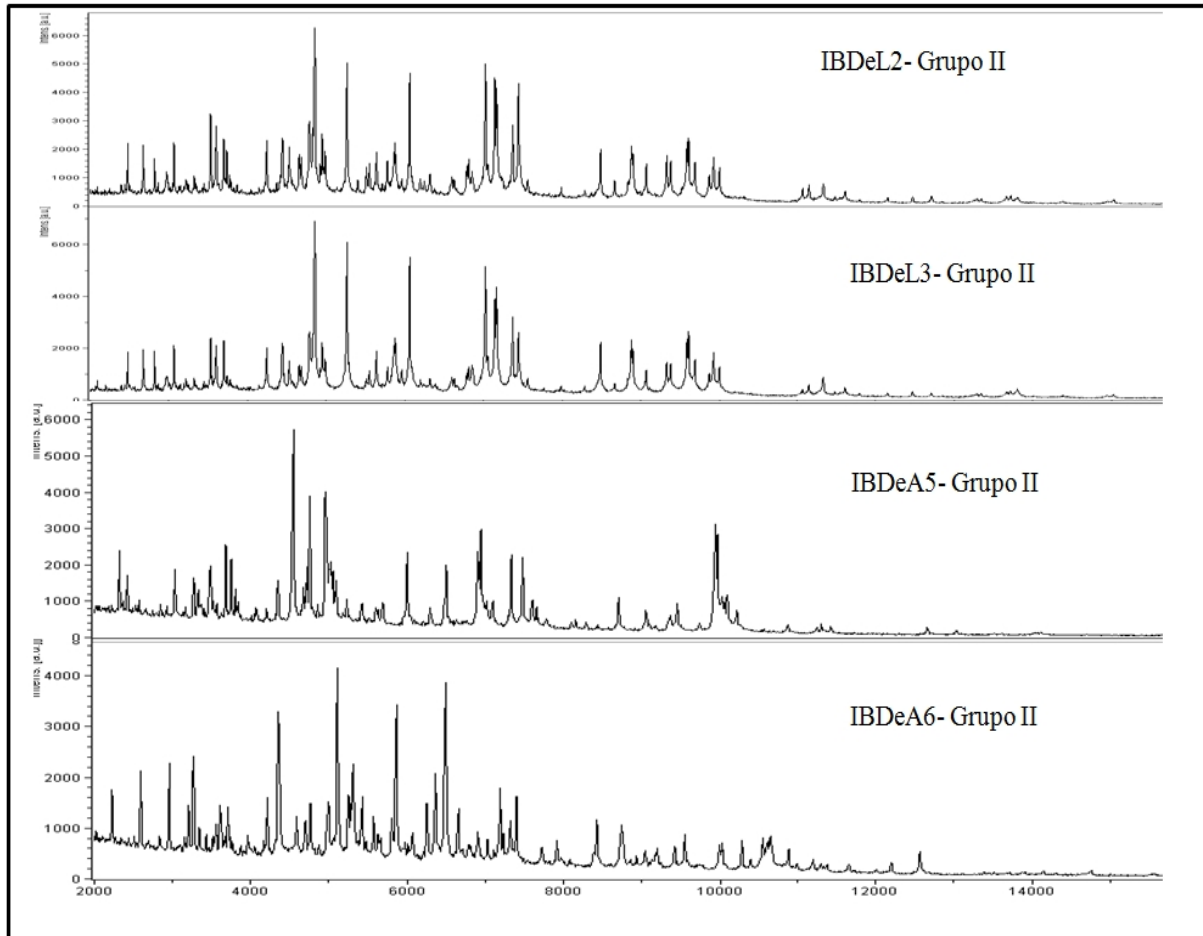


FIGURA 4.10 - Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de *D. speciosa*, bactérias crescidas em NA (24horas); perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo II.

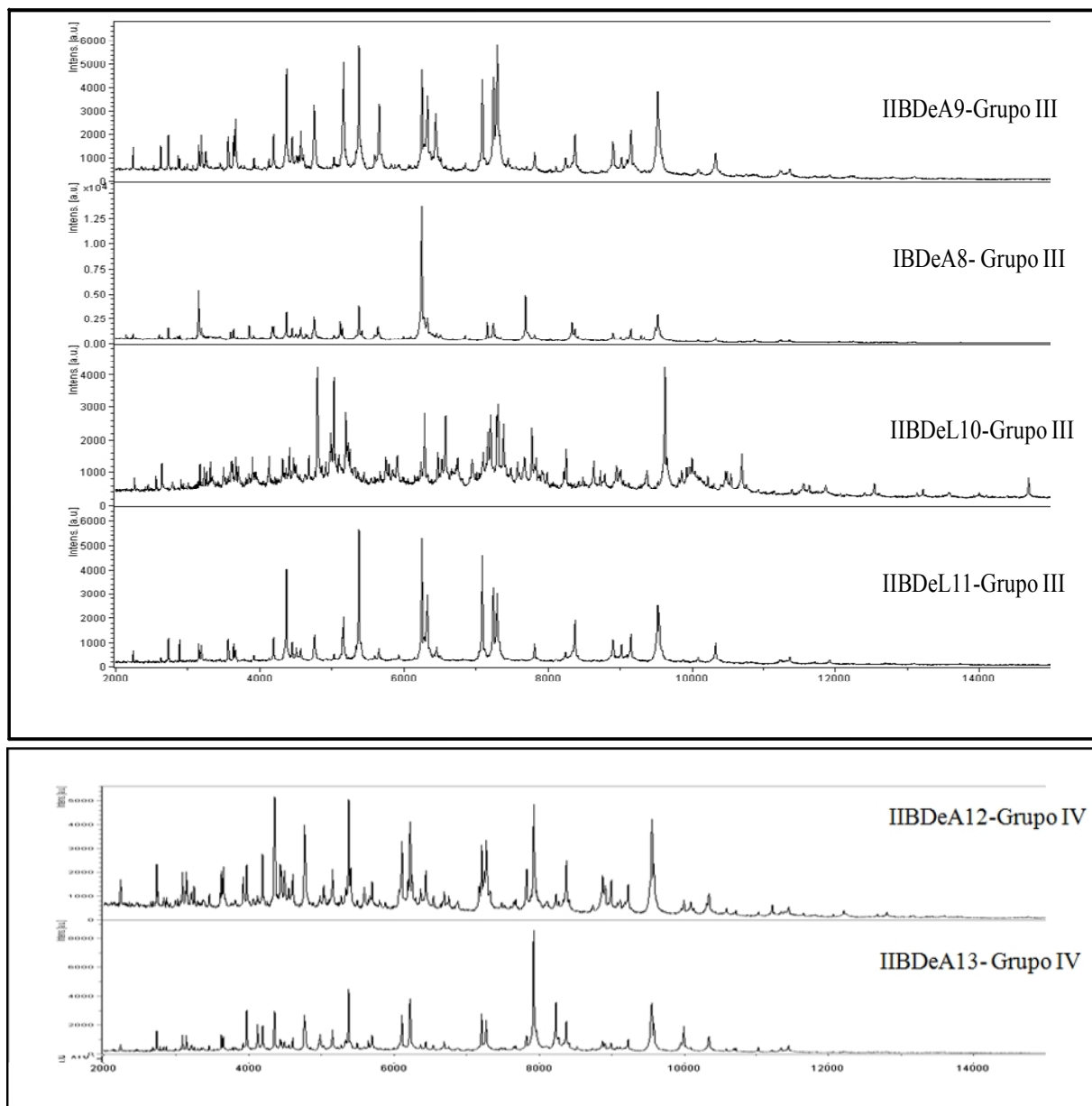


FIGURA 4.11- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de *D. speciosa*, bactérias crescidas em NA; perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)-Grupo III e IV.

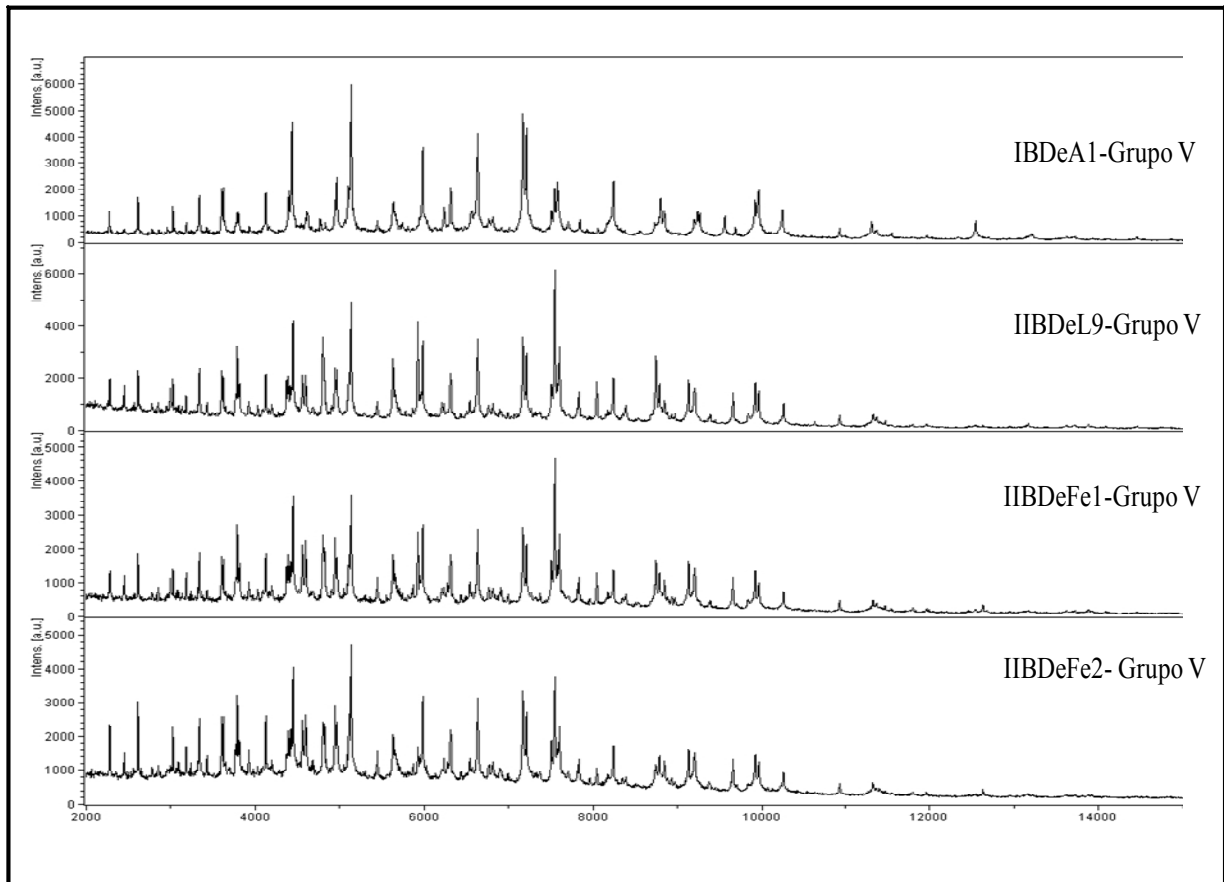


FIGURA 4.12- Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas bacterianas isolados de *D. speciosa*, bactérias crescidas em NA (24horas); perfil protéico adquirido no modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo V.

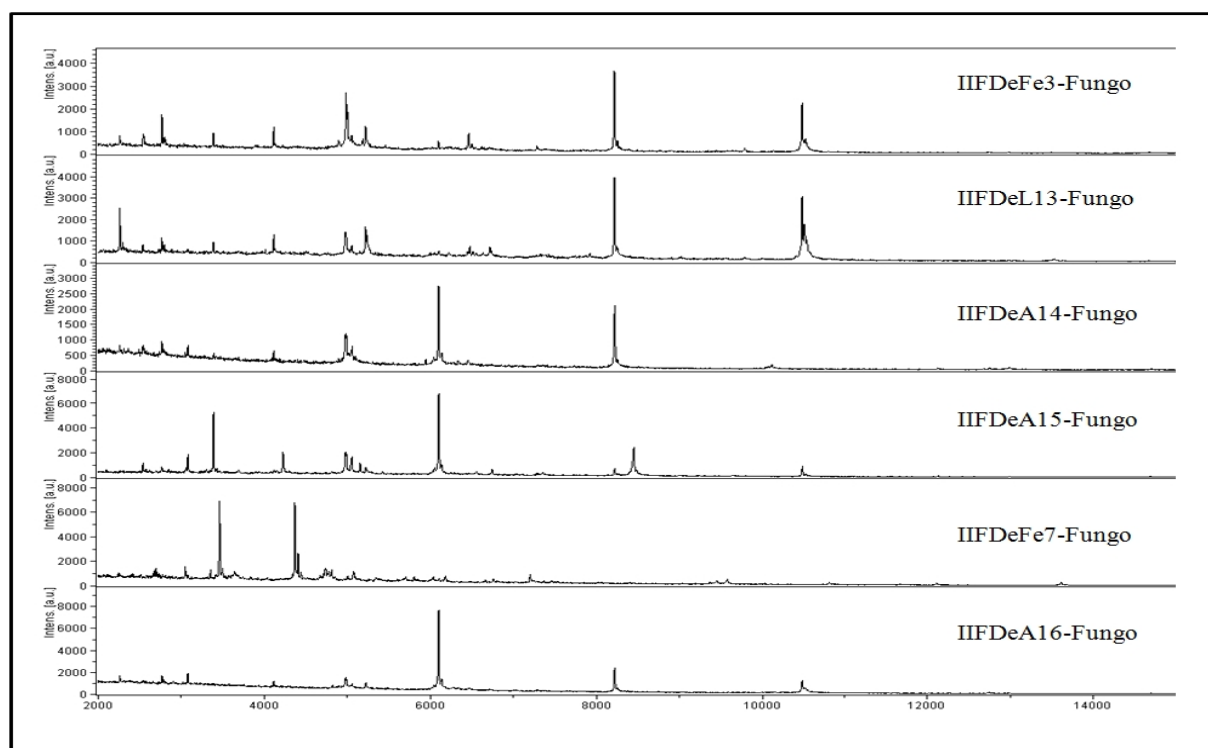


FIGURA 4.13-Espectros de massa MALDI-TOF-MS de cepas fúngicas do segundo isolamento de *D. speciosa*, fungos crescidos em BDA (48 horas); perfil protéico adquirido em modo linear positivo (janela apresentada de 2000 – 1400 Da)- Grupo de fungos.

Através dos espectros de massas obtidos pela técnica de MALDI-TOF/MS, ficou evidente que alguns isolados apresentam perfis protéicos semelhantes, conforme ilustrado nas Figura 4.9 a 4.13.

O eixo x corresponde à razão  $m/z$  dos íons detectados e o eixo y corresponde à intensidade do sinal em unidades arbitrárias não normalizadas neste experimento. Quando comparados os espectros de massas obtidos entre os fungos e bactérias, pôde-se observar semelhança entre alguns *fingerprints*, provavelmente de microrganismos geneticamente próximos. Os resultados de agrupamento obtido foram condizentes com a classificação de coloração de Gram e com o agrupamento entre as espécies para os diferentes isolamentos e entre bactérias e fungos (Figura

4.14).

Observa-se que bactérias Gram negativas e fungos foram isolados em maior quantidade no segundo procedimento (Junho/2012). Isto pode ser explicado pelo fato de que apenas no segundo isolamento foi incluso o isolamento de microrganismos a partir do material fecal do inseto.

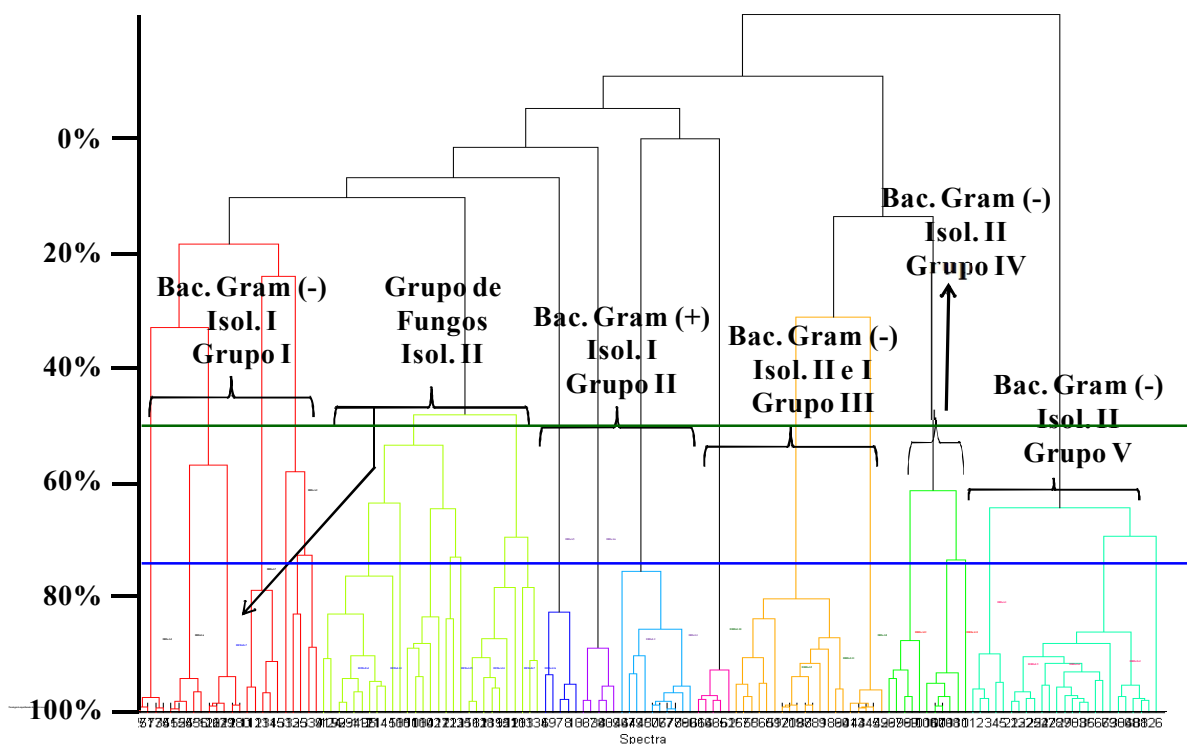


FIGURA 4.14-Dendrograma de agrupamento por MALDI-TOF dos isolados microbianos de *D. speciosa* e comparação com os resultados de agrupamento por Gram e isolados fúngicos.

O MALDI-TOF-MS, por se tratar de uma técnica relativamente simples, está sendo apontado como um potencial substituto para as metodologias atualmente utilizadas na rotina laboratorial, vários trabalhos já vem substituindo as técnicas de microbiologia clássicas por MALDI. Como já dito, na presença de

banco de dados com bastante informações é possível a identificação microbiana em poucos minutos (DECRISTOPHORIS et al., 2011; HINSE et al., 2011). Também apresenta vantagens em relação aos métodos moleculares, como a simplicidade do preparo da amostra, menor custo para análise e a rapidez na obtenção do resultado. Além disso o MALDI-TOF é extremamente sensível, podendo detectar um sinal gerado de uma amostra que contém cerca de  $10^4$  a  $10^7$  células bacterianas (DEMIREV e FENSELAU, 2008; SAUER et.al., 2008).

A análise do dendrograma (Figura 4.14), mostra claramente a separação de grupos, observa-se 14 agrupamentos com similaridade dos espectros de massas, considerando uma porcentagem de emparelhamento menor que 50% (linha verde Figura 4.15) sinalizando para a existência de pelo menos 14 gêneros microbianos distintos. Por outro lado, analisando o conjunto de dados similares que compartilham entre si 75% de emparelhamento (linha azul Figura 4.14) de sinais de massas, eleva o número de espécies para pelo menos 26 tipos de microrganismos.

A informação de 26 tipos microbianos é exatamente o número de amostras que foram analisadas neste experimento demonstrando que todos os microrganismos isolados, em nível genômico, são diferentes entre si. Nenhum microrganismo apresentou similaridade  $\geq 98\%$  com as bases de dados disponível, não podendo serem identificados.

Baseando-se nos agrupamentos obtidos dos microrganismos, algumas cepas microbianas representativas de alguns grupos foram escolhidas para a identificação através do sequenciamento de DNA na região 16S, uma região do DNA microbiano específicos para bactérias.

A identificação de alguns microrganismos por sequenciamento de DNA e seu perfil peptídico por massas, serão futuramente utilizados para alimentar o banco de dados para análises por MALDI.



#### **4.2.4- Identificação de cepas microbianas através do sequenciamento da região 16S rDNA**

Após as análises dos perfis protéicos dos isolados através do MALDI-TOF MS, seguida pela análise de agrupamento realizada pelo software Biotyper, foi possível selecionar isolados bacterianos representante de cada agrupamento para identificação através do seqüenciamento da subunidade 16S do rDNA. Foram selecionados um representante de cada grupo, considerando a possibilidade de terem, intra-grupo, suas identidades genotípicas e fenotípicas bem similares, dando indícios dos gêneros de bactérias que podem vir a predominar no trato gastrointestinal da *D. speciosa*.

Essas informações obtidas no presente estudo poderão ser utilizadas para dar início à construção de um banco de dados referentes à microrganismos associados à insetos pragas.

Para a identificação das bactérias através do seqüenciamento de rDNA, o material genômico das bactérias foram devidamente extraídos e purificado através da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR-sigla em inglês). Esta reação envolve basicamente três principais etapas: a desnaturação, a anelação e por fim a extensão. A Figura 4.15 representa o processo de um ciclo básico da PCR.

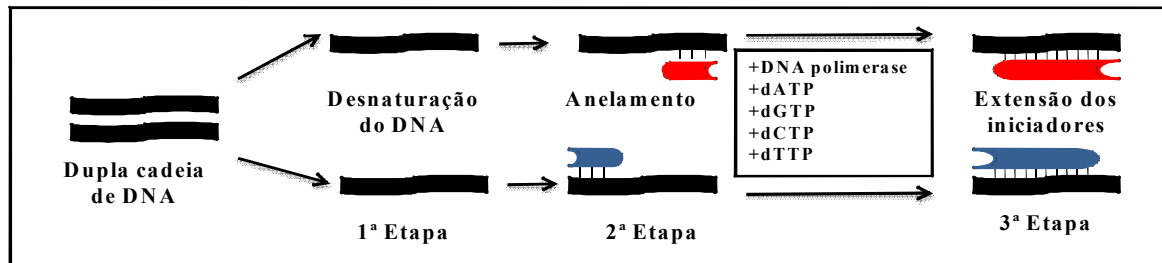


FIGURA 4.15-Representação esquemática dos ciclos da Reação em Cadeia da Polimerase. Este processo envolvendo as três etapas são repetidas em 30 ciclos, sendo que em cada ciclo a concentração de DNA pré-existente é aumentada.

Para a realização desta reação, foi utilizado um *primer* universal para região 16S rDNA, permitindo a perfeita amplificação da região do DNA característica para bactérias.

Na primeira etapa, ocorre a desnaturação da fita dupla de DNA, para tal foi utilizado uma temperatura de 94°C durante 4 min. Nesta temperatura, as duas fitas do DNA alvo se separam. Já para a etapa de anelamento, a temperatura foi rapidamente reduzida para 49° por 1 min, nesta etapa ocorre a hibridização dos oligonucleotídeos na região específica do DNA molde em que há complementariedade das bases. Posteriormente a temperatura foi elevada para 72°C, permitindo que a DNA polimerase realize a extensão a partir das extremidades 3' e 5' dos *primers*. Assim, em função de se utilizar uma DNA polimerase termo estável, a *Taq* DNA polimerase, foi possível executar uma programação de 30 ciclos da reação.

Portanto a amplificação via PCR é uma etapa primordial para a obtenção da quantidade de DNA necessário para ser utilizado na etapa de seqüenciamento dos nucleotídeos, o que garante que a região do DNA de interesse

será passível de detecção por fluorescência. A reação ocorreu com êxito, comprovado pelos resultados obtidos no seqüenciamento.

O seqüenciamento de DNA por sua vez foi realizado utilizando-se o método do didesoxinucleotídeo marcado (*dideoxy chain termination method*) com auxílio de um seqüenciador automático MegaBace<sup>®</sup> 1000 GE. Após o seqüenciamento, para identificar a seqüência obtida para cada amostra, estas foram submetidas a comparações com banco de dado público, o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Os resultados mostraram similaridade de seqüência com proposta de microrganismos obtida no BLAST variando de 84 a 95% de identidade frente à cadeia nucleotídica comparada. Este grau de similaridade ( $80 \leq 98\%$ ) permite propor a identificação com certeza a nível de gênero, no entanto alguns embora tenham tido uma porcentagem inferior a 90%, tiveram também uma proposta quanto à espécie.

Importante ressaltar que todas bactérias identificadas, após busca na literatura foi confirmada as características fenotípicas anteriormente obtidas, como por exemplo formato celular e características de coloração de Gram. A Tabela 4.3 demonstra uma relação dos microrganismos identificados bem como as informações referentes a cada um.

TABELA 4.3-Isolados bacterianos- identificações e características.

Características do Isolado					
<b>Código</b>	IBDeA8	IBDeL6	IIBDeA12	IBDeA6	IIBDeL9
<b>Filo</b>	Proteobactéria	Proteobactéria	Proteobactéria	Proteobactéria	Proteobactéria
<b>Classe</b>	Gamma Proteobactéria	Gamma Proteobactéria	Gamma Proteobactéria	Beta Proteobactéria	Gamma Proteobactéria
<b>Ordem</b>	Enterobacteriales	Xanthomonadales	Enterobacteriales	Burkholderiales	Pseudomonadales
<b>Família</b>	Enterobacteriaceae	Xanthomonadaceae	Enterobacteriaceae	Comamonadaceae	Pseudomonadaceae
<b>Gênero</b>	<i>Pantoea</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espécie</b>	<i>agglomerans</i>	-	<i>marcescens</i>	<i>temperans</i>	-
<b>% de identidade pelo BLAST</b>	96%	95%	95%	93%	84%
<b>Coloração de Gram</b>	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -
<b>Grupo pelo MALDI</b>	Grupo III	Grupo I	Grupo IV	Grupo II	Grupo V
<b>Origem do isolamento</b>	Adulto	Larva	Adulto	Adulto	Larva

Realizando um levantamento bibliográfico sobre as bactérias identificadas, o isolado da larva IBDeA6 identificado como *Luteibacter sp.*, foi pela primeira vez descrito por JOHANSEN et al. (2005). Atualmente, possui três espécies: *Luteibacter rhizovicinus*, *Luteibacter yeojuensis* e *Luteibacter anthropi*. (JOHANSEN et al. 2005 & KÄMPFER et al. 2009). A espécie *L. rhizovicinus* foi isolada da rizosfera de cevada e as espécies *L. yeojuensis* e *L. anthropi* foram identificadas no sangue humano. Ambos os locais de isolamento são condizentes com o meio que a bactéria *Luteibacter sp.* (IBDeL6) de *D. speciosa* foi isolada. Rizosfera – solo – local de convívio e alimentação da *D. speciosa* durante a fase larval e hemolinfa, local de convívio da bactéria no inseto. Todavia, estas informações podem gerar dúvidas sobre a origem das bactérias no inseto se por transmissão vertical ou horizontal. Estudos futuros mais aprofundados a cerca dessa hipótese devem ser realizados.

As bactérias identificadas do gênero *Pantoea sp.*, *Serratia sp.* e *Pseudomonas sp.*, já são bem descritas na literatura e alguns estudos revelam se tratem de gêneros denominadas de rizobactérias (ABALLAY et al., 2013).

Esse termo rizobactéria caracteriza microrganismos que colonizam as raízes dos vegetais, as quais podem promover efeitos positivos sobre as culturas (HARTHMANN et al, 2009). Tendo em vista que o material de isolamento desses microrganismos se tratou de um inseto praga de solo, esse fato de corresponderem a bactérias que circundam as raízes de vegetais, as mesmas podem não se tratem de microrganismos endossimbiontes primários de *D. speciosa* e sim microrganismos que foram adquiridos através do meio de vivência desse inseto, caracterizando uma simbiose originária de forma horizontal.

Ainda discutindo sobre esses três gêneros de bactérias identificados, cabe ressaltar um trabalho realizado por AKHOUNDI et al., (2012). Realizaram um estudo de investigação da diversidade microbiana do intestino de moscas transmissoras de leishmanioses, e chegaram ao isolamento de 34 microrganismos, sendo três destes bactérias do gênero *Pantoea sp.*, *Serratia sp.* e *Pseudomonas sp.* Assim, fazendo-se uma analogia com o estudo citado, surge uma incógnita que se de fato não podem ser bactérias associadas à *D. speciosa* contemplando uma relação de simbiose primária.

Partindo para a bactéria do gênero *Acidovorax sp.*, de acordo com a literatura trata-se de um microrganismo fitopatogênico. Em um estudo realizado por GRONDEAU et al, (2007); descreveram uma bactéria desse gênero como sendo a responsável da doença denominada de mancha preta do milho. E considerando que esse isolado foi proveniente do adulto e advindo do primeiro isolamento, o qual os insetos estavam se alimentando de plântulas de milho, pode

ser que esse material estivesse infectado com o referido microrganismo, sendo portanto uma bactéria advinda do meio externo, transmissão horizontal.

#### 4.2.5- Obtenção do perfil de crescimento do isolado IBDeL6

Acredita-se que a maioria dos organismos da classe *Insecta* está envolvido em algum tipo de simbiose, e maior parte dessas relações é compartilhada com bactérias (RIO et al., 2003).

Assim, com o intuito de realizar ensaios antimicrobianos sobre microrganismos isolados, um dos isolados bacteriano IBDeL6 proveniente da larva, foi então escolhido para execução dos ensaios. Esta foi selecionada por ser advinda da fase larval. Isto se deve ao fato de a fase larval ser a mais próxima da fase em que os endossimbiontes primários são transmitidos ao inseto, neste caso considerando uma transmissão vertical através do citoplasma do ovo, justificando assim a escolha da mesma baseando-se nesta hipótese.

O perfil de crescimento da bactéria IBDeL6, identificada posteriormente através do seqüenciamento de rDNA pertencente ao gênero *Luteibacter sp.* foi determinado em três diferentes meios de cultivo líquidos – caldo nutriente, caldo Luria Bertani e caldo Mueller Hinton. Estes meios foram selecionados devido à divergência de suas composições, o que proporcionaria distintos perfis de desenvolvimento para o microrganismo.

Geralmente uma curva de crescimento bacteriana segue um padrão geral de desenvolvimento sigmoidal. Essa curva é acompanhado por quatro principais fases: primeiramente uma fase lenta, na qual as células do microrganismo está se adaptando ao meio e à quantidade de nutrientes (fase *lag*), posteriormente inicia-se uma fase onde o crescimento celular ocorre de forma muito rápida, de modo exponencial (fase *log*), após essa etapa é alcançado o

período de densidade máxima, o qual fica estagnado por um determinado tempo, nessa fase considera-se que o número de células vivas e células está em equilíbrio (fase estacionária), por fim chega-se ao período em que a quantidade de células vivas é superado pela quantidade de células mortas e assim entra-se de fase final de declínio.

A fase exponencial de desenvolvimento pode ser considerada o período mais importante de crescimento bacteriano. É neste período que a reprodução celular se encontra significativamente ativa e sua atividade metabólica acentuada. Nesta fase o microrganismo está sensível à mudanças ambientais, sendo o período portando mais oportuno para testar a atividade de novos agentes antibacterianos.

Assim a curva de crescimento para a *Luteibacter sp.* foi obtida nos diferentes meios de cultura, utilizando a técnica da turbidez através de medidas de densidade óptica que correspondeu à absorbância da suspensão bacteriana. A Figura 4.16 ilustra o procedimento adotado para realização do experimento.

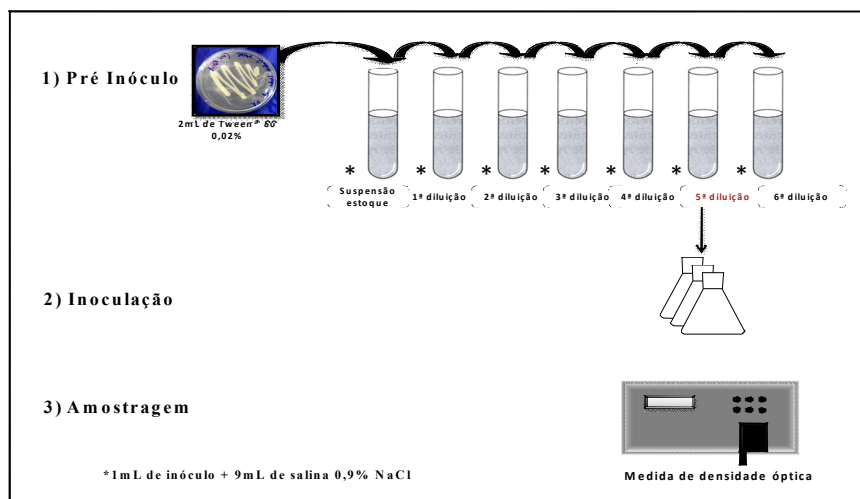


FIGURA 4.16-Representação esquemática do experimento para obtenção da curva de crescimento.

As medidas de densidade óptica do inóculo e seus respectivos brancos, foram realizadas a cada três horas. O experimento foi interrompido assim que observado as três primeiras medidas indicando um declínio da curva. A Tabela 4.4 vem demonstrando os valores de densidade óptica obtidos nos três meios e seus respectivos brancos, os quais foram utilizados para construção da curva de crescimento.



TABELA 4.4-Valores de absorvância obtidos para construção da curva de crescimento.

Tempo(h)	Média das triplicatas dos valores de absorvância/densidade óptica (600nm)		
	Caldo Nutriente	Caldo Luria Bertani	Caldo Muller Hinton
0	0,001	0,001	0,002
3	0,015	0,013	0,016
6	0,016	0,014	0,018
9	0,051	0,049	0,019
12	0,109	0,099	0,089
15	0,209	0,156	0,145
18	0,222	0,168	0,154
21	0,229	0,189	0,185
24	0,241	0,194	0,190
27	0,263	0,201	0,198
30	0,275	0,235	0,204
33	0,281	0,254	0,257
36	0,289	0,302	0,308
39	0,815	0,757	0,440
42	1,220	0,902	0,425
45	1,556	1,086	0,697
48	1,797	1,220	0,922
51	1,931	1,323	1,176
54	2,041	1,399	1,498
57	2,125	1,472	1,534
60	2,179	1,555	1,705
63	2,249	1,605	1,879
66	2,289	1,659	1,994
69	2,310	1,694	2,077
72	2,327	1,727	2,128
75	2,357	1,758	2,158
78	2,397	1,810	2,182
81	2,420	1,846	2,208
84	2,432	1,849	2,120
87	2,433	1,851	2,127
90	2,434	1,852	2,129
93	2,456	1,715	1,998
96	2,294	1,617	1,892
99	2,090	1,617	1,889
102	1,958	1,609	1,885

A média dos valores das triplicatas foram utilizados para construção da curva de crescimento. As curvas obtidas podem ser visualizadas Figura 4.17. A velocidade de crescimento para o microrganismo foi ligeiramente maior no meio de caldo nutriente. Contudo, independente do meio, o desenvolvimento da bactéria foi similar para ambos, e dentro do padrão de curva já esperado, podendo observar as quatro fases de desenvolvimento celular: *lag*, *log*, estacionária e de declínio.

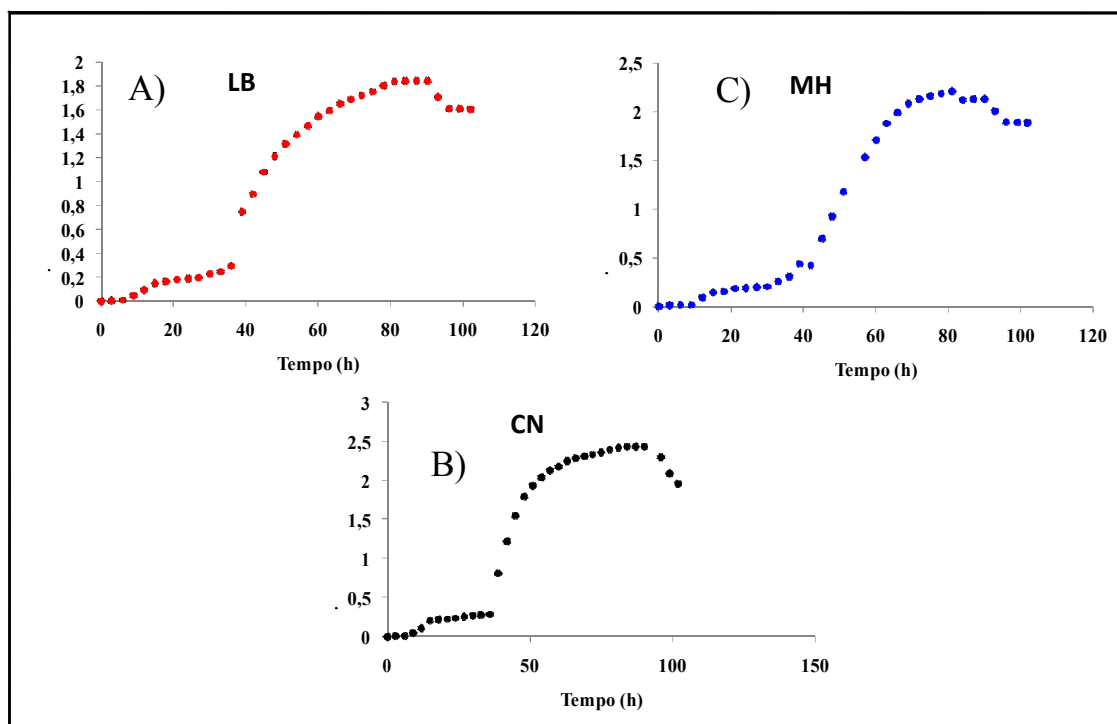


FIGURA 4.17-Curva de crescimento da bactéria *Luteibacter sp.* em A) caldo Luria Bertani, B) caldo Muller Hinton e C) caldo Caldo Nutriente.

O princípio para construção da curva de crescimento baseou-se na avaliação da turbidez da cultura microbiana nos diferentes meios de cultivo líquidos. A medida em questão estima de modo indireto a concentração celular com o decorrer do tempo, através da medida de absorbância. Neste caso utiliza-se o

conceito de turbidez para avaliar a quantidade de massa bacteriana produzida. Um feixe de luz focado na suspensão bacteriana é parcialmente desviada pelas células e a porcentagem de luz não desviada é medida pelo espectrofotômetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão microbiana depende principalmente da concentração celular, sendo portanto possível de ser avaliada através da relação direta com a densidade óptica obtida.

Através dos resultados obtidos na avaliação do crescimento microbiano, foi possível escolher o meio de cultura e tempo de avaliação para a realização dos ensaios de inibição do crescimento bacteriano por microdiluição em placa de ELISA.

## **4.2.6- Ensaios de inibição do crescimento microbiano por produtos naturais**

### **4.2.6.1- Técnicas de difusão em ágar**

As técnicas de difusão em ágar correspondem a uma das metodologias de ensaio antimicrobiano mais citados na literatura utilizando produtos naturais. O teste é um método físico no qual o microrganismo é desafiado contra uma substância a ser testada em relação à sua capacidade de inibição do crescimento do determinado microrganismo.

Três metodologias de difusão em ágar foram testadas no presente trabalho: técnica do poço em camada dupla, técnica do poço convencional e técnica do disco em placa. Ambas as técnicas se baseiam no mesmo princípio, onde o resultado de inibição é avaliado de acordo com o tamanho do halo de inibição formado em torno do disco ou poço em que está presente a substância em

investigação. Se trata de técnicas bastante utilizadas, no entanto se limita a microrganismos de crescimento rápido, como é o caso da bactéria em estudo.

A avaliação do ensaio ocorre pela comparação da substância a ser testada frente a uma testemunha e um controle positivo. O controle positivo é definido como sendo um padrão com atividade antibacteriana conhecida, como por exemplo a tetraciclina utilizada neste trabalho. A testemunha, ou controle negativo, é apenas o meio de cultura líquido com o aditivo de 2,5 % (v/v) de DMSO.

Pelas normas do NCCLS, o meio padrão para realização destes ensaios, é o meio Ágar Muller Hinton. No entanto, o ensaio foi realizado no meio Nutriente Ágar, já que a bactéria em estudo demonstrou um melhor desenvolvimento neste meio de cultura.

O teste realizado pelo procedimento utilizando camada dupla, não demonstrou resultados satisfatórios, nem mesmo o controle positivo (tetraciclina) apresentou inibição sobre a bactéria *Luteibacter sp.*, dificultando até mesmo avaliar a confiabilidade da técnica. Já nos ensaios do poço convencional, apenas as placas contendo 17ml de meio de cultura demonstraram resultados para tetraciclina, podendo inferir credibilidade à técnica. No entanto os extratos e compostos utilizados não demonstraram atividade (Figura 4.18 A). Alguns são os fatores que poder ter influenciados nos resultados, dentre eles uma baixa difusão dos compostos, que pode não ter sido suficiente para agir sobre o microrganismo na superfície, ou até mesmo a concentração, uma vez que foram utilizadas concentrações para os extratos brutos de  $1.000\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  e metabólito isolado  $500\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Todavia, concentrações maiores que estas inviabilizaria a substância do ponto de vista comercial.

Outra metodologia utilizada foi o ensaio utilizando um disco empregnado com o composto ser testado adicionado à superfície do ágar. Trata-se

de um teste de difusão aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

Os ensaios utilizando a técnica de disco em placa (Figura 4.18 B) para avaliar a ação dos extratos sobre a *Luteibacter sp.* Após período de incubação de 48 horas, verificou-se a presença de zonas claras ao redor dos discos. Uma zona clara indica que o antibiótico difundiu no ágar e apresentou ação inibitória sobre o crescimento da bactéria. A ausência de uma zona clara significa que o organismo é resistente ao antibiótico, como é o caso da testemunha.

Através dos resultados deste ensaio, seria possível concluir que os extratos de *Casearia sylvestris* não apresentaram um potencial inibitório. Contudo, devido à dificuldade de visualização do resultado, optou-se por testar uma metodologia que apresentasse uma maior sensibilidade, praticidade no preparo, um método de leitura independente da capacidade de leitura do observador. Assim, iniciou-se uma nova etapa, desenvolvendo um método mais preciso e exato que possibilitasse o monitoramento quantitativo por técnicas espectroscópicas.

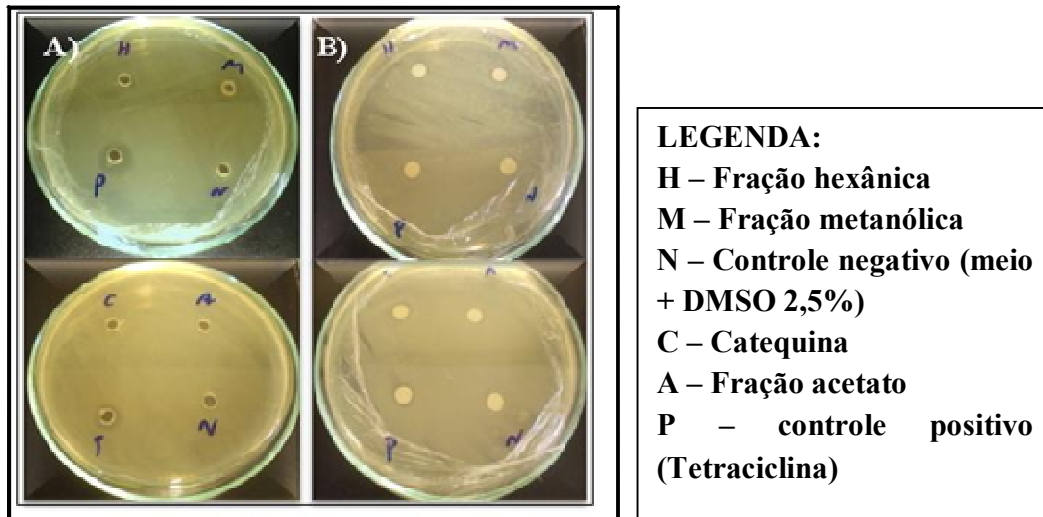


FIGURA 4.18-Resultados obtidos nos ensaios de difusão em ágar, placas após 24 horas de incubação. A) Técnica do poço convencional (17ml de meio); B) Técnica do disco em placa.

Os bioensaios executados por difusão em ágar foram todos realizados em triplicatas, no entanto foi demonstrado apenas uma das réplicas, uma vez que a pelos resultados obtidos neste caso, as técnicas não se mostraram reprodutíveis, levando à necessidade de se desenvolver outras metodologias de ensaio, que pudessem oferecer maior reprodutibilidade.

#### **4.2.6.2- Bioensaios – interpretação qualitativa utilizando resazurina como revelador**

Em função dos resultados insatisfatórios obtidos nos bioensaios por difusão em ágar, optou-se por desenvolver uma nova metodologia por microdiluição em placa de ELISA®.

Os métodos de diluição em geral, são aqueles nos quais os compostos a serem testados são incorporados junto ao meio líquido de crescimento do microrganismo.

Primeiramente foi desenvolvido uma metodologia para o ensaio de inibição em placa de ELISA de modo que possibilitasse uma interpretação qualitativa do resultado. No procedimento desenvolvido utilizaram-se controles positivos (tetraciclina), negativos (testemunha), de DMSO 2,5 (% v/v) e de esterilidade do ambiente, os quais são de suma importância para contemplar confiabilidade da técnica. O controle positivo de tetraciclina garante que a cepa utilizada estava em uma concentração sensível a agentes antibacterianos. O controle negativo, por sua vez, comprova a viabilidade da cepa, bem como a não interferência do DMSO 2,5 (% v/v) no crescimento microbiano.

Neste ensaio utilizou-se como revelador o corante resazurina. Este composto age como indicador da existência ou não de células viáveis dos poços. A resazurina na presença de células viáveis é submetido à uma reação redox (Figura 4.19), a qual modifica tua coloração de azul (forma oxidada) para rosa (forma reduzida).

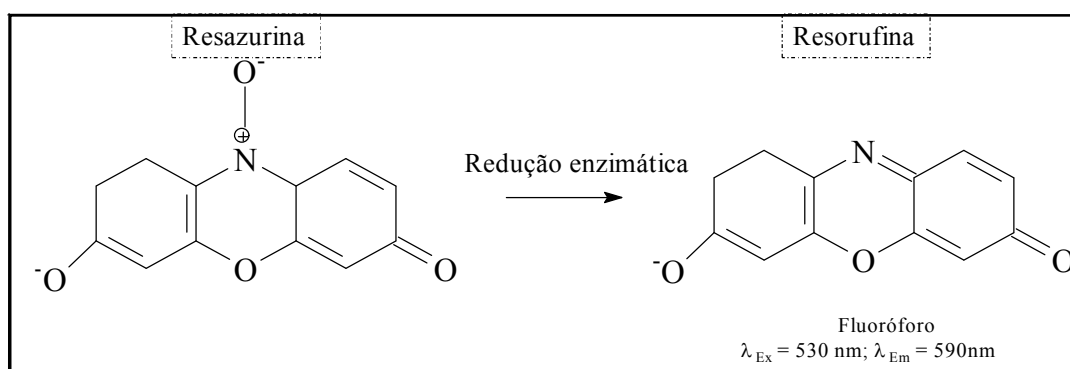


FIGURA 4.19-Esquema reacional da redução da resazurina para resorufina na presença de enzimas advindas de células bacterianas vivas.

Essa reação é mediada por enzimas oxirredutases presentes nas células metabolicamente viáveis, onde, a resazurina (azul) passa para a sua forma reduzida resorufina (rosa).

Assim sendo, os resultados do ensaio foram baseados nas colorações que os poços da placa de ELISA apresentaram. Nos locais onde permanecesse a coloração azul indicou que não houve crescimento bacteriano significativo. Por outro lado, os poços em que apresentaram coloração rosa, indicaram o crescimento bacteriano. A Figura 4.20 ilustra o resultado obtido no ensaio avaliando o potencial antibacteriano dos extratos de *C. sylvestris*.

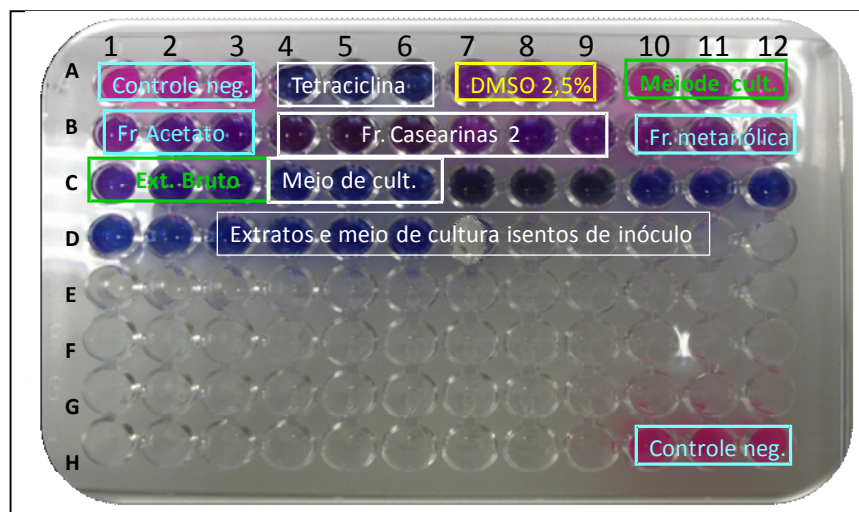


FIGURA 4.20-Resultado qualitativo do ensaio de inibição do crescimento bacteriano pelos extratos de *C. sylvestris*.

Aplicando este ensaio para extratos brutos e frações de *Casearia sylvestris*, observou-se que as mesmas tiveram uma capacidade parcial e considerável de inibição do crescimento bacteriano. Conforme ilustrado na Figura 4.20, verifica-se que a fração acetato, extrato bruto e a fração enriquecida de diterpenos, demonstrou uma resposta bem próxima ao controle positivo do



antibiótico tetraciclina. Por outro lado, a fração metanólica teve uma parcial inibição, quando comparado com o controle negativo (meio + inóculo).

Um destaque pode-se ter com os resultados observados para os controles e os extratos isentos de inóculo. Nota-se que o controle positivo na concentração empregada mostrou-se ativo sobre a *Luteibacter sp.*, observado pela coloração azul nos poços, indicando a sensibilidade a esse antibiótico pela bactéria. Já no controle negativo, a coloração rosa intensa, demonstrou a viabilidade da cepa utilizada, além dos controles de esterilidade do ambiente de incubação, os quais não demonstraram crescimento microbiano (C4 a D12), comprovado pela coloração azul.

Tendo obtidos os resultados qualitativos do respectivo bioensaio, o interesse de conhecer a diferença de potencialidade inibitória dos extratos de *C. sylvestris*, optou-se por desenvolver uma metodologia que fosse possível de quantificar precisamente os resultados de inibição.

#### **4.2.6.2.1- Bioensaio – interpretação quantitativa utilizando resazurina como revelador – Desenvolvimento de uma metodologia analítica**

Tendo em vista que o corante utilizado para monitorar a capacidade de inibição dos extratos vegetais, quando reduzido apresenta a capacidade de fluorescer, o que possibilita o monitoramento da reação de redução através da técnica de fluorimetria. O princípio neste caso seria que na presença do corante na sua forma reduzida teria uma determinada fluorescência proporcional à quantidade de células viáveis nos poços. Possibilitando o monitoramento do ensaio pela intensidade de fluorescência nos poços da placa de ELISA®. Quanto maior a

quantidade de células presente, maior a quantidade de resorufina e maior valor de fluorescência obtida.

Assim, para o desenvolvimento de uma metodologia possível de quantificação dos resultados de inibição dos extratos frente à bactéria *Luteibacter sp.*, o ensaio foi realizado utilizando uma placa de ELISA® opaca de coloração preta.

Esta placa foi escolhida pois a medida de fluorescência seria realizada nos poços. As medidas seriam realizadas em um equipamento no qual a medida de fluorescência é dada pela incidência de um laser nos comprimentos de excitação e emissão desejados, partiu-se do princípio de que um poço poderia influenciar no resultado obtido aos poços vizinhos, e assim sucessivamente. Portanto, para anular tal hipótese de interferência, a placa transparente foi substituída pela opaca.

O resultado deste primeiro ensaio não foi satisfatório, uma vez que a concentração de resazurina utilizada de  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , foi suficiente para originar uma concentração relativamente elevada de resorufina nos poços que houve crescimento celular, o que impossibilitou a aquisição dos valores de fluorescência pelo equipamento utilizado, uma vez pelas respostas obtidas, houve uma saturação nas leituras, o que certamente deve ter sido ocasionado pela elevada sensibilidade do equipamento. Assim devido a valores certamente elevados, as medidas não foram possíveis de serem obtidas.

Frente a esse primeiro resultado, optou-se em realizar um teste com várias concentrações de corante, e após obter uma faixa possível de medida no equipamento, foi desenvolvida uma metodologia analítica avaliando a melhor faixa linear de trabalho que poderia ser utilizada em relação à concentração do corante.

#### **4.2.6.2.2- Linearidade e intervalo de concentrações do corante revelador da atividade antibacteriana**

##### ✓ Curva de calibração

Para a validação do método de bioensaio quantitativo, foi necessária a construção de uma curva de calibração a resazurina. Esta curva corresponde à uma representação gráfica da relação entre uma resposta analítica medida (neste caso a fluorescência – eixo y) e a concentração do analito (eixo x). Neste experimento utilizou-se da maneira mais comum que se tem de descrever a relação dependente entre os eixos, que foi a regressão linear. Esta regressão é representada por uma equação matemática (equação da reta), onde o y está em função de x, conforme a Equação 4.1.

$$y = ax \pm b \quad (4.1)$$

A curva foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados, o que possibilitou a obtenção dos coeficientes de regressão, o coeficiente linear (*b*) e o coeficiente angular (*a*) (Figura 4.21). A relação matemática entre *x* e *y* foi possível de ser determinado empiricamente a partir das soluções de concentrações nominais conhecidas do analito resazurina.

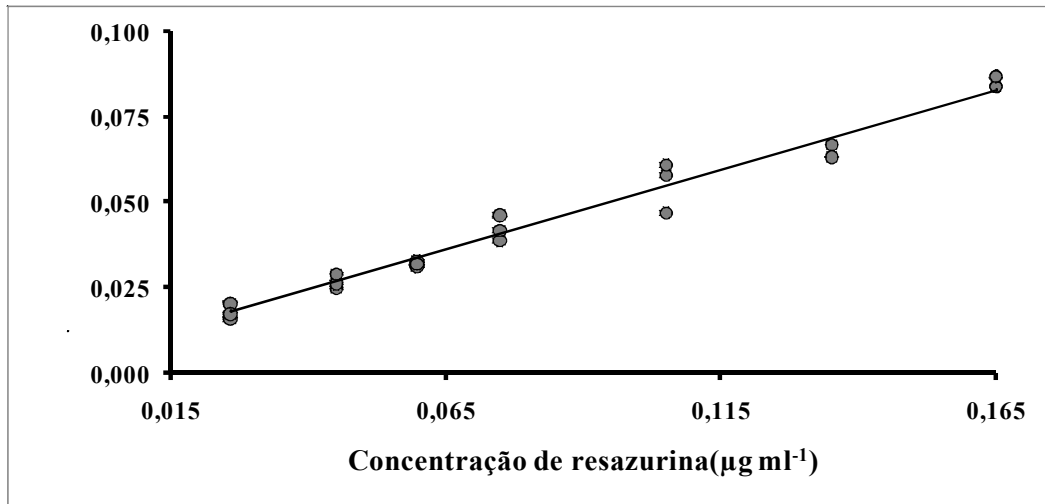


FIGURA 4.21-Curva de calibração obtida para o corante resazurina.

O coeficiente de correlação  $r^2$  foi determinado e obtido em valor de 0,998; indicando uma excelente correlação entre os valores de fluorescência e as concentrações nominais. Com a respectiva curva, foi possível definir a linearidade do método e, conseqüentemente, a faixa de trabalho possível de realizar as medidas. Além disso, foi possível selecionar uma das concentrações contida de resazurina para a realização do bioensaio.

A Tabela 4.5 demonstra os valores de fluorescência obtidos para cada replicata das concentrações.

TABELA 4.5-Concentrações de resazurina utilizadas e os valores de fluorescência obtidas.

[resazurina] / $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Valores de Fluorescência				CV* <sup>1</sup> (%)	[resazurina]/ calculada $\mu\text{g.ml}^{-1}$	Exatidão (%)	FR* <sup>2</sup>
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média				
<b>0,026</b>	0,016	0,020	0,017	0,018	11,78	0,03	104,2	0,679
<b>0,045</b>	0,025	0,026	0,029	0,027	7,81	0,05	100,9	0,593
<b>0,060</b>	0,031	0,033	0,032	0,032	3,13	0,06	93,8	0,533
<b>0,075</b>	0,046	0,039	0,042	0,042	8,30	0,08	103,1	0,564
<b>0,105</b>	0,047	0,058	0,061	0,055	13,32	0,10	98,8	0,527
<b>0,135</b>	0,085	0,067	0,063	0,072	16,35	0,14	101,5	0,481
<b>0,165</b>	0,084	0,084	0,087	0,085	2,04	0,16	99,5	0,515

$$y = 0,491x + 0,004, r^2 = 0,998$$

\*<sup>1</sup>Coeficiente de variação, \*<sup>2</sup> Fator de resposta.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir a partir de parâmetros da curva analítica, desvio padrão da resposta e o coeficiente angular. Os valores encontrados foram de 0,006 e 0,019  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente.

Considerando que a matriz em estudo se trata de uma amostra biológica, o percentual aceitável para o coeficiente de variação se encontra de até 20% referencia (ICH - *International Conference on Harmonisation*), assim como pode-se visualizar na Tabela 4.5, os valores obtidos para tal parâmetro está dentro do aceitável para uma validação analítica. Esse termo coeficiente de variação ou também conhecido como precisão, fornece informações em relação à dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio (CASSIANO et al., 2009).

Foram calculados os valores de concentrações utilizando os valores de fluorescência e a equação da reta obtidos. Através desses valores foi possível estabelecer o percentual de exatidão nas medidas. A exatidão reflete o quão próximo está o valor medido do valor de referência considerado verdadeiro, o que relaciona também o erro absoluto da medida. Neste caso a exatidão dos valores de fluorescência obtidos foram estabelecidos comparando o valor obtido empiricamente com o valor nominal já conhecido, e observando os resultados obtidos, pode-se considerar uma boa exatidão nas medidas.

Outro parâmetro avaliado foi o fator de resposta das medidas. A Figura 4.22 demonstra a relação obtida entre as médias das replicatas obtidas e o fator de resposta calculado (valor da concentração nominal dividido pela média das replicatas).

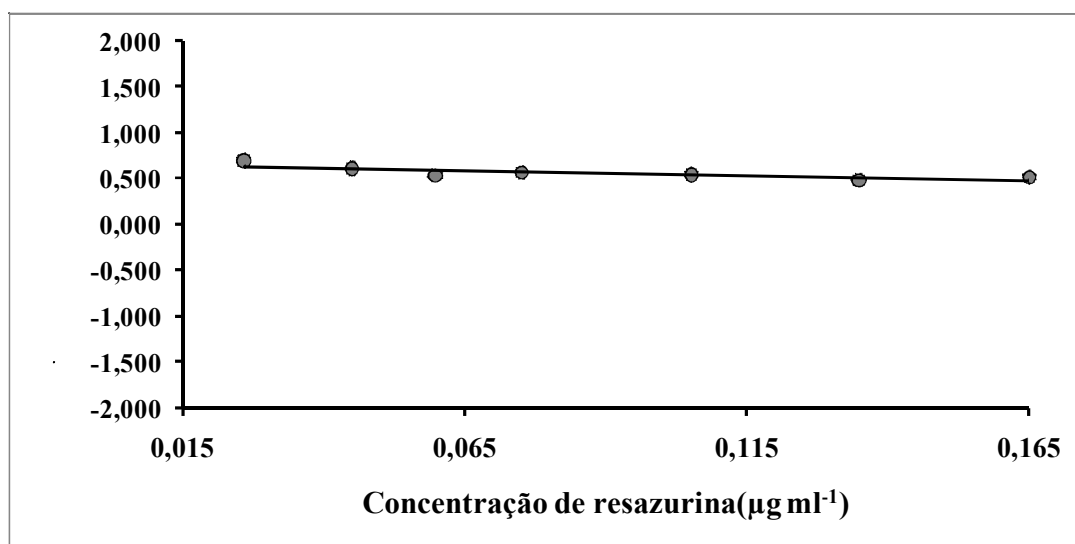


FIGURA 4.22- Gráfico de correlação entre fator de resposta e concentrações de resazurina.

Através da curva obtida, pode-se observar que a curva analítica construída teve uma resposta linear por toda faixa de trabalho, o que contribui para

linearidade do método e consequentemente avaliar a precisão e exatidão do método.

Foram realizados também análises de precisão, exatidão e ainda um teste de duplo cego, para os ensaios de precisão e exatidão. Foram utilizadas três concentrações distintas de resazurina, sendo um controle de baixa, média e alta concentração em relação às concentrações utilizadas na construção da curva de calibração. As concentrações foram 0,032; 0,082 e 0,150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , podendo portanto, avaliar toda a faixa linear de trabalho, identificando possíveis desvios relacionados à inclinação da reta.

O teste do duplo cego foi realizado para averiguar a confiabilidade do método. Duas amostras de concentrações desconhecidas pelo operador foram preparadas por um membro do grupo de pesquisa e as amostras foram submetidas às condições experimentais utilizadas para a construção da curva. Após as análises, os resultados de fluorescência obtidos foram lançados na equação de reta referente à curva de calibração construída e as obtidas então as concentrações empiricamente. Observa-se que os valores obtidos foram bem próximos aos valores nominais, diagnosticando a confiável aplicabilidade do método. Na Tabela 4.6 são apresentados os valores obtidos.

TABELA 4.6-Valores obtidos de precisão, exatidão e teste do duplo cego para do método validado.

[resazurina] µg.ml <sup>-1</sup> Valor nominal	Valores de Fluorescência				CV* (%)	[resazurina] calculada µg.ml <sup>-1</sup>	Exatidão (%)
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média			
<b>0,032</b>	0,028	-	0,026	0,027	5,24	0,029	91,0
<b>0,082</b>	0,035	-	0,041	0,038	11,16	0,085	103,4
<b>0,150</b>	0,088	0,086	0,091	0,088	2,85	0,171	114,0
<b>Teste do duplo cego</b>							
<b>0,120</b>	0,076	0,071	0,061	0,069	11,02	0,132	110,2
<b>0,054</b>	0,030	0,035	0,025	0,030	16,67	0,052	96,6

\*Coeficiente de variação.

A validação do método foi realizada a partir da análise dos seguintes critérios de desempenho já demonstrados: linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. Foi aplicado ainda um teste estatístico a fim de detectar possíveis problemas no ajuste da curva, a aleatoriedade dos desvios envolvidos nas medidas, denominado análise de resíduo (Figura 4.18).

A média dos valores obtidos para cada concentração é o valor considerado e isso não inclui as incertezas existentes, erros aleatórios, que englobe a curva de calibração como um todo, já que se tratam de incertezas pontuais. Assim uma análise dos resíduos pode estabelecer o comportamento como um todo de possíveis desvios da linearidade que pode estar envolvidos na curva de calibração.

Com o resultado obtido (Figura 4.23) pode-se considerar claramente que independente da concentração padrão de calibração, os resíduos seguem uma tendência randonizada, ou seja, encontram-se em uma regressão linear de forma



homogênea e com baixa dispersão, propriedade conhecida como homoscedasticidade e ao mesmo tempo, sem apresentar comportamento tendencioso (CASSIANO et al., 2009).

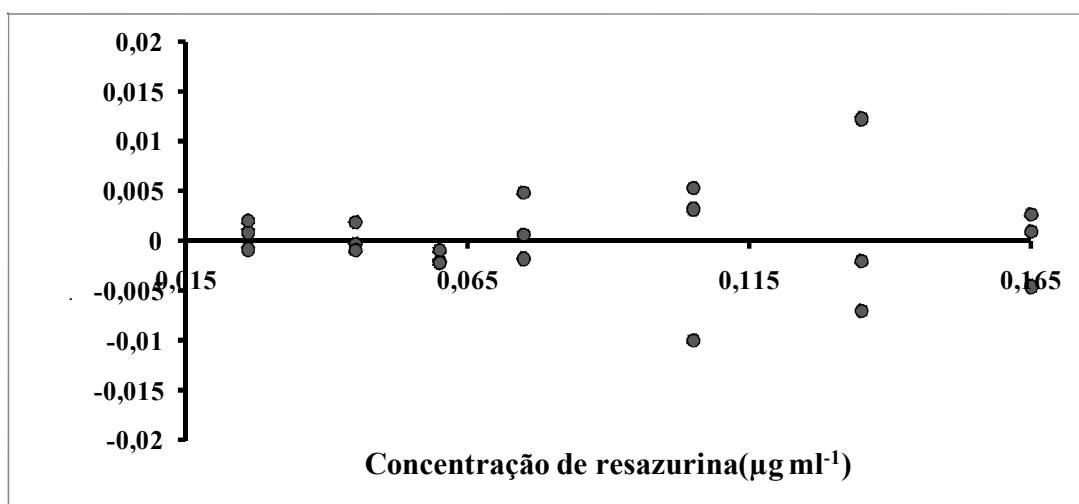


FIGURA 4.23-Gráfico de resíduos demonstrando os resíduos distribuídos homoscedasticamente.

A linearidade do modelo obtido através da regressão linear foi confirmada através de parâmetros avaliados pela análise de variância (ANOVA). Na Tabela 4.7 pode-se observar os parâmetros estatísticos avaliados.

TABELA 4.7- ANOVA do modelo de regressão linear para curva de calibração do corante resazurina .

ANOVA	Graus de liberdade (gl)	Soma dos quocientes (SQ)	Soma das médias (SM)	F	F de significação
Regressão	1	0,010907014	0,010907	457,6751012	9,32986 x 10 <sup>-15</sup>
Resíduos	19	0,000452796	2,38 x 10 <sup>-5</sup>		
Total	20	0,01135981			

	Coefficientes	Stat t	P- Valor	95% inferior	95%superior
Intersecção	0,004364778	1,923157	0,06957795	-0,000385529	0,009115085
Coefficiente angular	0,491183664	21,39334	9,32986 x 10 <sup>-15</sup>	0,443128564	0,539238765

Na Tabela 4.7 estão descritos os valores obtidos pelo cálculo da ANOVA para análise do modelo de regressão linear utilizado na construção da curva de calibração. Através destes dados pode-se confirmar a linearidade do modelo pelo desvio significativo do coeficiente angular (P-Valor < 0,05) e que o valor da intersecção não difere estatisticamente de zero (P- Valor > 0,05).

Sendo assim, a curva de calibração construída pode ser considerada adequada para o método de ensaio dentro da faixa de trabalho proposta.

#### **4.2.6.2.3- Aplicação da metodologia analítica desenvolvida no bioensaio de atividade antibacteriana dos extratos de *C. sylvestris* e outras plantas do cerrado**

Desenvolvida a metodologia analítica para determinar a melhor faixa linear de trabalho para o corante revelador da atividade antibacteriana (resazurina), a metodologia foi aplicada em ensaios da atividade antimicrobiana de extratos, frações e composto puro de plantas do cerrado.

O ensaio foi conduzido conforme metodologia descrita no item 3.2.6. Após a obtenção dos dados analíticos da metodologia validada, foi possível selecionar a concentração de  $0,135\mu\text{g.ml}^{-1}$  de resazurina para ser acrescentada nos poços da placa de ELISA®.

Esta concentração foi selecionada por se localizar próxima ao último ponto da curva de calibração, representando um valor limite para reagir com as células viáveis. Além resultar em uma quantidade de resorufina formada dentro da faixa linear de trabalho.

Os testes foram realizados em triplicata para cada amostra, o que possibilitou a análise do desvio padrão para cada resultado de inibição obtidos.

#### **4.2.6.2.4- Avaliação do potencial antibacteriano de extratos de plantas de cerrado**

Para realização dos ensaios, a placa de ELISA contendo os componentes da metodologia foi preparada conforme já descrito no item 3.2.6. Após as 48 horas de incubação a  $28^{\circ}\text{C}$ , tempo necessário para garantir que o

microrganismo se encontre na fase *log* de desenvolvimento, o corante revelador foi então adicionado e, após 40 minutos de reação, a placa foi então submetida à leitura no fluorímetro nos comprimentos de onda 530nm e 590nm, excitação e emissão, respectivamente.

Os resultados de inibição dos extratos foram avaliados de acordo com as fluorescências apresentados, e normalizados como os parâmetros dos controles positivos e a testemunha negativa. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.8.

TABELA 4.8-Resultados de atividade antibacteriana dos extratos de plantas do cerrado.

Agentes antibacteriano	Fluorescência				CV *	% de inibição
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média		
Testemunha Controle Negativo	0,080	0,080	0,084	0,081	3,13	0,0
Controle Positivo	0,011	0,011	0,007	0,010	23,89	93,0
Extrato <i>Casearia sylvestris</i>	0,024	0,029	0,031	0,028	12,88	69,0
Extrato <i>Davilla elliptica</i>	0,051	0,046	0,040	0,046	11,12	44,0
Extrato <i>Eugenia aurata</i>	0,026	0,025	0,023	0,025	6,19	73,3
Extrato <i>Ocotea pulchella</i>	0,024	0,036	0,030	0,030	20,00	66,3
Extrato <i>Psidium laruotteanum</i>	0,018	0,014	0,017	0,016	12,74	84,3
Extrato <i>Miconia ligustroides</i>	0,026	0,023	0,024	0,024	6,28	73,8

\*Coeficiente de variação.

Os extratos das plantas de cerrado testadas, exceto a *C. sylvestris*, foram cedidos em colaboração por um aluno de mestrado Anderson Luigi, do grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar.

Os resultados de inibição obtidos podem ser melhores visualizados na Figura 4.24. Observa-se que o extrato que apresentou uma melhor inibição frente à bactéria *Luteibacter sp.* foi o extrato de *Psidium laruotteanum* 84,3% quando comparado ao controle. Em seguida a *Miconia ligustroides* com uma porcentagem de inibição de 73,8 %, sucessivamente a *Eugenia aurata*, não muito diferente com 73,3% de inibição e com 69,0% de inibição a *Casearia sylvestris*.

Na Figura 4.24 estão demonstrados em forma de histograma as atividades inibitórias pelos extratos de vegetais do cerrado conforme visualizado na Tabela 4.8.

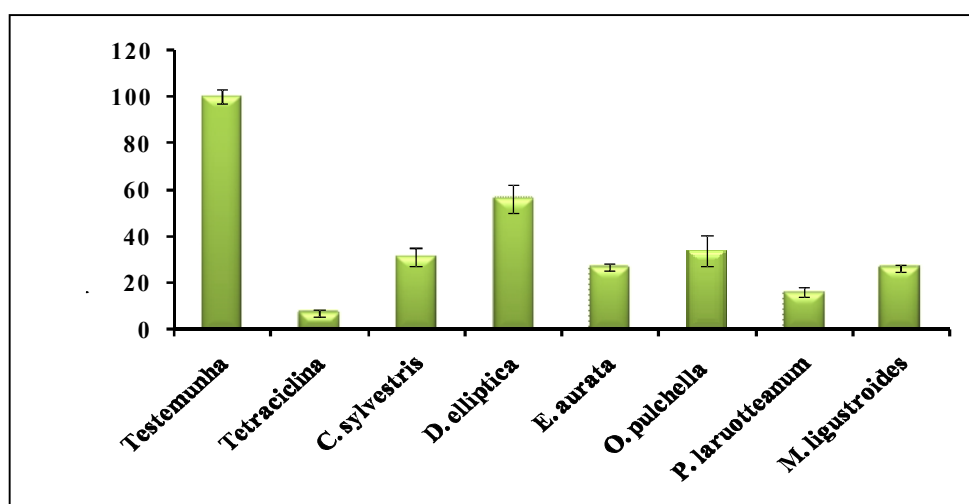


FIGURA 4.24-Histograma de atividade antibacteriana sobre a *Luteibacter sp.* de extratos de plantas do cerrado.

#### 4.2.6.2.5- Avaliação do potencial antibacteriano de frações e metabólito secundário de *C. sylvestris*

As frações acetato, metanólica, extrato diterpênico e o metabólito catequina foram também avaliados. Os resultados de inibição frente à *Luteibacter sp.* estão descritos na Tabela 4.9 e Figura 4.25.

TABELA 4.9-Resultados de atividade antibacteriana das frações de *C. sylvestris*.

Agentes antibacteriano	Fluorescência				CV*	% de inibição
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média		
Testemunha Controle Negat.	0,080	0,080	0,084	0,081	3,13	0,0
Controle Positivo	0,011	0,011	0,007	0,010	23,89	93,0
FrAcCs	0,043	0,036	0,050	0,043	13,99	50,2
Extrato Diterpênico <i>C. sylvestris</i>	0,033	0,028	0,043	0,035	22,03	60,2
FrMeCs	0,025	0,024	0,021	0,023	8,92	75,1
Catequina	0,013	0,016	0,010	0,013	23,08	88,7

\*Coeficiente de variação.

O extrato denominado de “extrato diterpênico” foi cedido por uma aluna de mestrado do grupo, Karen Cristina dos Santos. Este extrato bruto foi preparado de uma forma não convencional, onde o objetivo foi extrair seletivamente os compostos da classe dos diterpenos clerodânicos (casearinas), o mesmo apresentou uma inibição de 60,2% frente à *Luteibacter sp.*

Observa-se que o melhor resultado foi obtido pelo flavonóide catequina isolado da fração acetato das folhas de *C. sylvestris*, seguido pelo extrato metanólico. Na Figura 4.25, o resultado demonstrado na Tabela 4.9 é melhor ilustrado em forma de histograma.

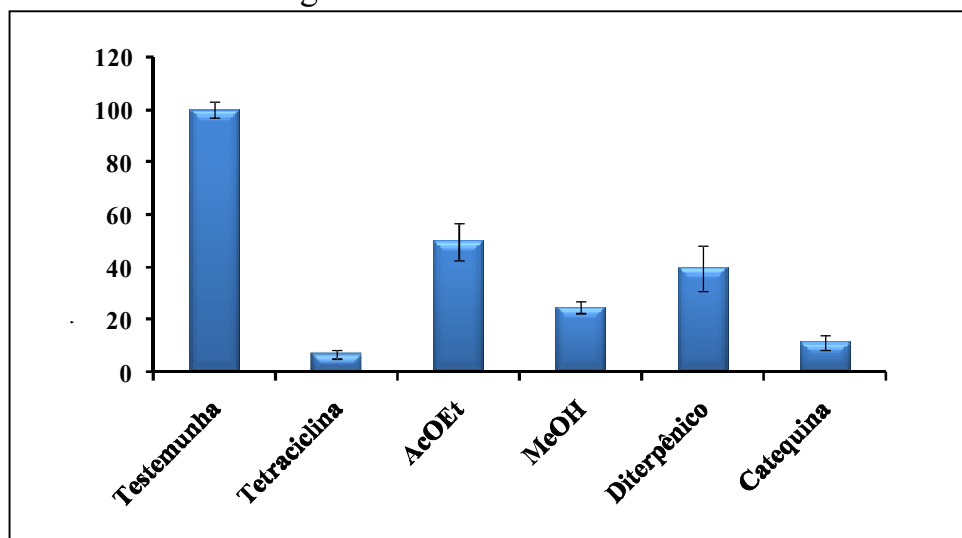


FIGURA 4.25-Histograma de atividade antibacteriana sobre a *Luteibacter sp.* de frações e metabólito de *C. sylvestris*.

#### 4.2.6.2.6- Avaliação do potencial antibacteriano de frações de *Psidium laruotteanum*

Após o satisfatório resultado de inibição do extrato etanólico bruto das folhas de *Psidium laruotteanum*, o mesmo foi então particionado com diferentes solventes, e suas frações foram então submetidas à ensaio de inibição do crescimento da *Luteibacter sp.* Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.10 e Figura 4.26.

TABELA 4.10-Resultados de atividade antibacteriana das frações de *Psidium laruotteanum*.

Agentes antibacteriano	Fluorescência				CV*	% de inibição
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média		
Testemunha Controle Negat.	0,080	0,080	0,084	0,081	3,13	0,0
Controle Positivo	0,011	0,011	0,007	0,010	23,89	93,0
FrHex - <i>P. laruotteanum</i>	0,052	0,061	0,068	0,060	12,56	22,6
FrDCM - <i>P. laruotteanum</i>	0,064	0,059	0,067	0,063	5,22	22,3
FrAcOEt - <i>P. laruotteanum</i>	0,008	0,006	0,006	0,007	23,08	97,0
FrMeOH - <i>P. laruotteanum</i>	0,041	0,056	0,042	0,046	15,87	42,7

Pode-se observar que houve uma perda de eficiência de inibição das frações quando comparada com o extrato bruto. Isto pode ser explicado pelo sinergismo existente entre os metabólitos secundários constituintes do extrato inicial, os quais foram separados quando submetidos à fracionamentos. Contudo, ainda assim a fração acetato e metanólica ainda apresentaram resultados satisfatórios de 97,0 e 42,7 % de inibição, respectivamente.

Na Figura 4.26 está demonstrado em forma de histograma o resultado obtido das frações de *Psidium laruotteanum*.



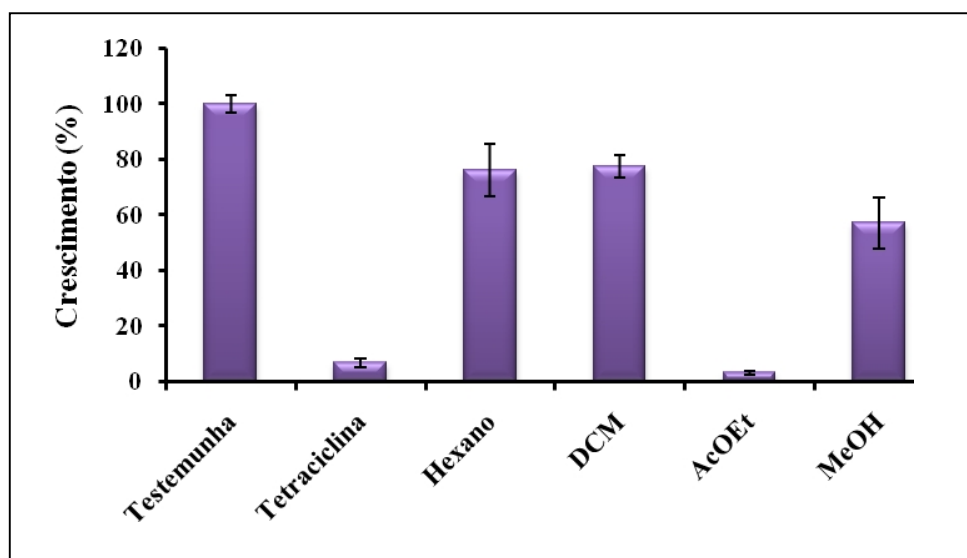


FIGURA 4.26-Histograma de atividade antibacteriana sobre a *Luteibacter sp.* das frações de *Psidium laruotteanum*.

O objetivo de se avaliar o potencial de inibição de extratos vegetais sobre a bactéria isolada de *D. speciosa*, se concentra na idéia de realização de futuros ensaios sobre os insetos e larvas *in vivo*. O que poderia dar indícios se de fato o microrganismo em estudo se trata de um endossimbionte primário ou não do inseto praga.

#### 4.2.7- Material botânico – Fitoquímica

A seleção da planta utilizada para a realização deste trabalho, fundamentou-se em uma revisão na literatura, a qual indicou se tratar de uma planta com inúmeros trabalhos de atividades biológicas, no entanto pouquíssimos relatos de sua aplicação na área agrícola.

O estudo fitoquímico objetivou o isolamento de metabólitos secundários que fossem utilizados como marcador de referência dos extratos ensaiados. Para tal um prévio estudo fitoquímico dos extratos hexânico e acetato

das folhas de *C. sylvestris* foi realizado. Neste estudo ambos os extratos foram refractionados utilizando técnicas cromatográficas por exclusão de tamanho e por adsorção.

Da fração acetato foi possível o isolamento de dois metabólitos secundários, um flavonóide já bem descrito na literatura e um diterpeno clerodânico.

Embora o diterpeno que tenho sido o marcador para os extratos bioensaiados, os outros dois metabólitos, o flavonóide advindo da fração acetato e um sesquiterpeno advindo da fração hexânica, tiveram suas estruturas elucidadas, a fim de corroborar com a quimiosistemática da planta.

#### **4.2.7.1- Determinação da Ref 16-23(ColB)**

O composto terpênico isolado, foi utilizado como marcador de referência dos extratos submetidos a ensaios, a fim de padronizá-los. Este foi proveniente do fração acetato de etila das folhas de *C. sylvestris*, correspondeu a um sólido oleoso amarelado. O mesmo teve sua estrutura elucidada através da comparação com dados da literatura e confirmação da massa do íon molecular através de espectrometria de massas (WHISTSON et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2008). Na Figura 4.26 está representado o espectro de RMN de <sup>1</sup>H total do referido composto.

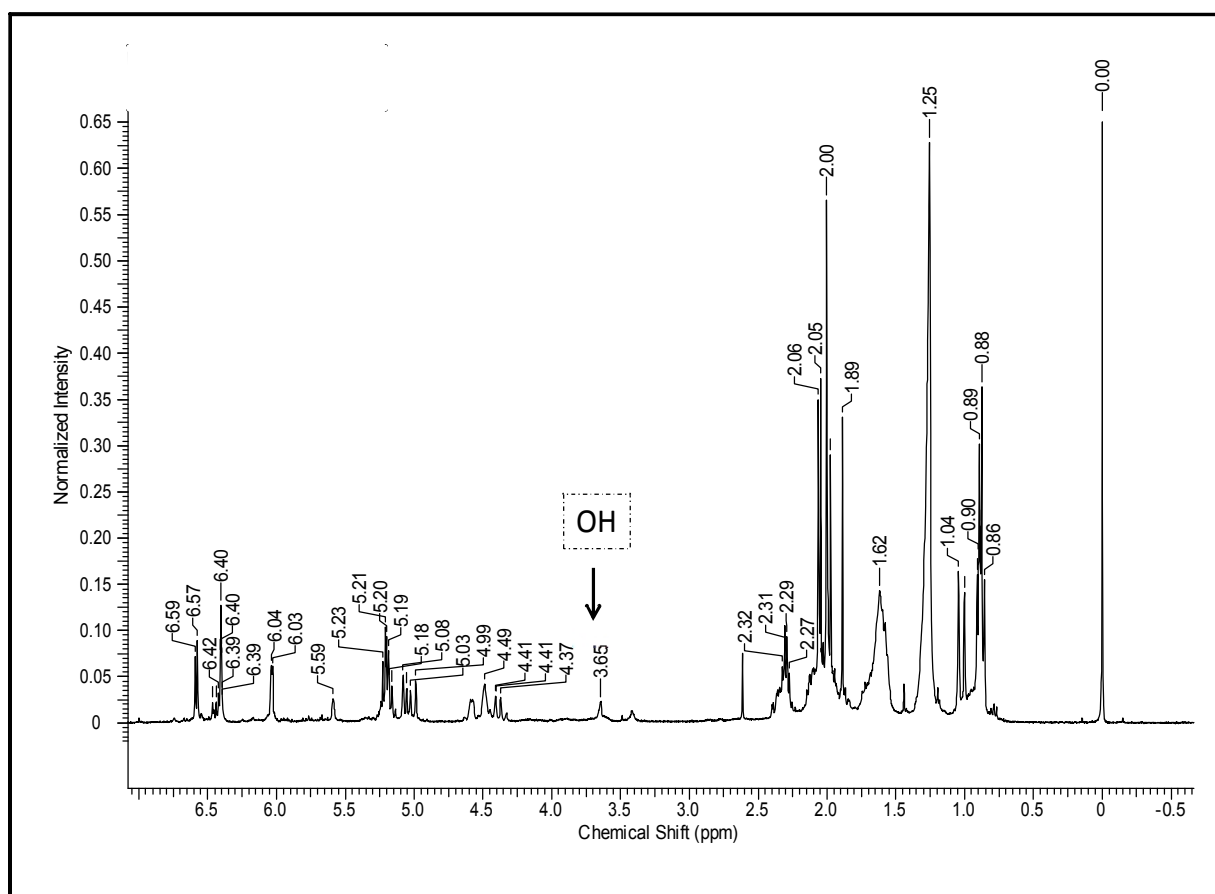


FIGURA 4.27-Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do marcador de referência diterpênico ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Na Tabela 4.11 estão demonstrados os sinais obtidos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Ref 16-23(ColB), e a comparação do mesmo com dados da literatura. O metabólito de referência da literatura foi isolado do gênero *Casearia* *sp.*, no da espécie *arguta* (WHISTSON et al., 2010).

TABELA 4.11-Dados de deslocamentos de RMN de  $^1\text{H}$  do marcador de referência diterpênico e comparação com a literatura com o composto - *Argutin D* - (WHISTSON et al., 2010).

Posição	Isolado $\delta_{\text{H}}$ <i>mult</i>	Literatura $\delta_{\text{H}}$ <i>mult</i> (WHISTSON et al., 2010)
1	2.06 <i>m</i>	2.07 <i>m</i>
	2.00 <i>m</i>	1.98 <i>m</i>
2	4.58 <i>dl</i>	4.47 <i>t</i>
3	6.03 <i>dl</i>	6.01 <i>d</i>
4	—	—
5	—	—
6	4.37 <i>dl</i>	5.08 <i>d</i>
7	5.04 <i>dl</i>	3.66 <i>t</i>
8	1.62 <i>m</i>	1.77 <i>dd</i>
9	—	—
10	2.35 <i>dd</i>	2.37 <i>m</i>
11	1.61 <i>m</i>	2.37 <i>m</i>
	1.25 <i>m</i> (se $\beta$ )	1.61 <i>m</i>
	2,30 <i>dd</i> (se $\alpha$ )	
12	5.04 <i>d</i>	5,38 <i>d</i>
13	—	—
14	6.44 <i>dd</i>	6.26 <i>dd</i>
15	5.20 <i>d</i>	5.07 <i>d</i>
	5.17 <i>d</i>	4.91 <i>d</i>
16	1.89 <i>sl</i>	1.64 <i>s</i>
17	0.89 <i>d</i>	1.04 <i>d</i>
18	6.58 <i>sl</i>	6.40 <i>t</i>
19	6.57 <i>sl</i>	6.55 <i>s</i>
20	0.87 <i>sl</i>	0.88 <i>s</i>
2'	5,01 <i>d</i> (11,2)	5.63 <i>d</i> (11,2)
3'	5,03 <i>d</i> (11,0)	6.63 <i>t</i> (11,2)
4'	6,60 <i>dd</i> (15,5 e 11,0)	7.30 <i>dd</i> (15.2 e 11.2)
5'	6.03 <i>m</i>	6.09 <i>ddd</i> (15.2, 7.7 e 7.2)
6'	2,29 <i>m</i>	2.14 <i>ddd</i> (14.7, 7.7 e 7.3)
7'	1,61 <i>m</i>	1.38 <i>ddd</i> (14.8, 7.6 e 7.3)
8'	1,25 <i>m</i>	1.23 <i>m</i>
9'	1,27 <i>m</i>	1.26 <i>m</i>
10'	0,84 <i>m</i>	0.84 <i>t</i>
2''	—	—
3''	5,60 <i>s</i>	—
4''	2.06 <i>s</i>	—
5''	2.05 <i>s</i>	—
18-OAc	—	2.04 <i>s</i>
19-OAc	2,00 <i>s</i>	1.91 <i>s</i>

Após avaliar e comparar com dados da literatura (WHISTSON et al., 2010), e analisar os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e massas obtidos, foi possível atribuir uma proposta estrutural para a Ref 16-23(ColB) (Figura 4.28 A).

Na Figura 4.28 A está representada a proposta estrutural do composto. A numeração atribuída à estrutura está de acordo com os sistemas padrões para terpenóides da classe dos clerodanos, sendo os grupos substituintes numerados de acordo com a literatura.

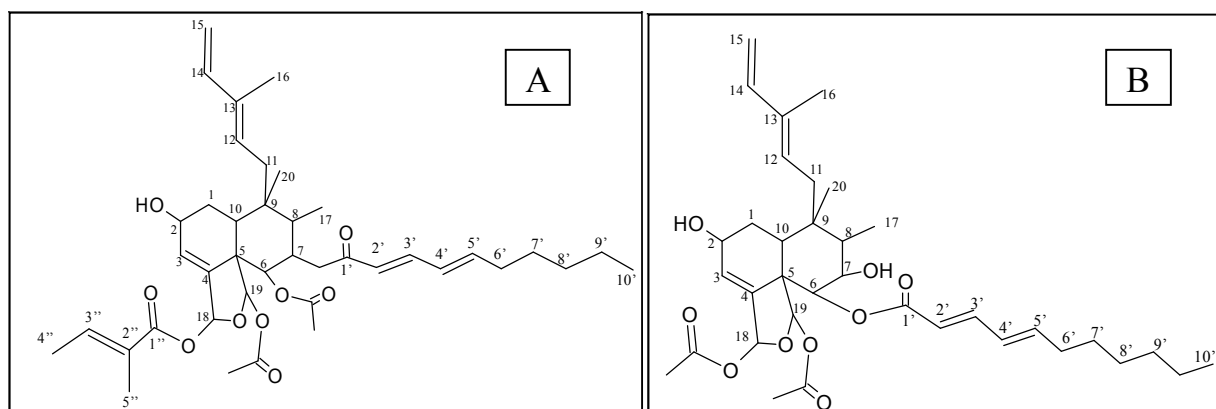


FIGURA 4.28-Proposta estrutural da Ref 16-23(ColB) – A, e o composto referência da literatura (*Argutin D*)- B.

Ampliando uma região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.29), este mostrou a presença de sinais característicos a hidrogênios olefínicos, com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,44(*dd*; 12,5 e 7,0 Hz) (carbono 14),  $\delta_{\text{H}}$  5,19(*d*; 12,5 Hz) e 5,20 (*d*; 7,0Hz) (carbono 15),  $\delta_{\text{H}}$  5,04 (*d*; 10,6 Hz) (carbono 12),  $\delta_{\text{H}}$  6,03 (*dl*; 3,7Hz) (carbono 3) e do grupo tigloil  $\delta_{\text{H}}$  5,59 (*sl*). Além disso, visualiza-se os hidrogênios carbinólicos, apresentando sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,38 (*d*; 11,0 Hz) (carbono 6) e  $\delta_{\text{H}}$  5,04 (*dl*; 11,0 Hz), onde: *dd* (duplo dubleto), *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *sl* (singleto largo).

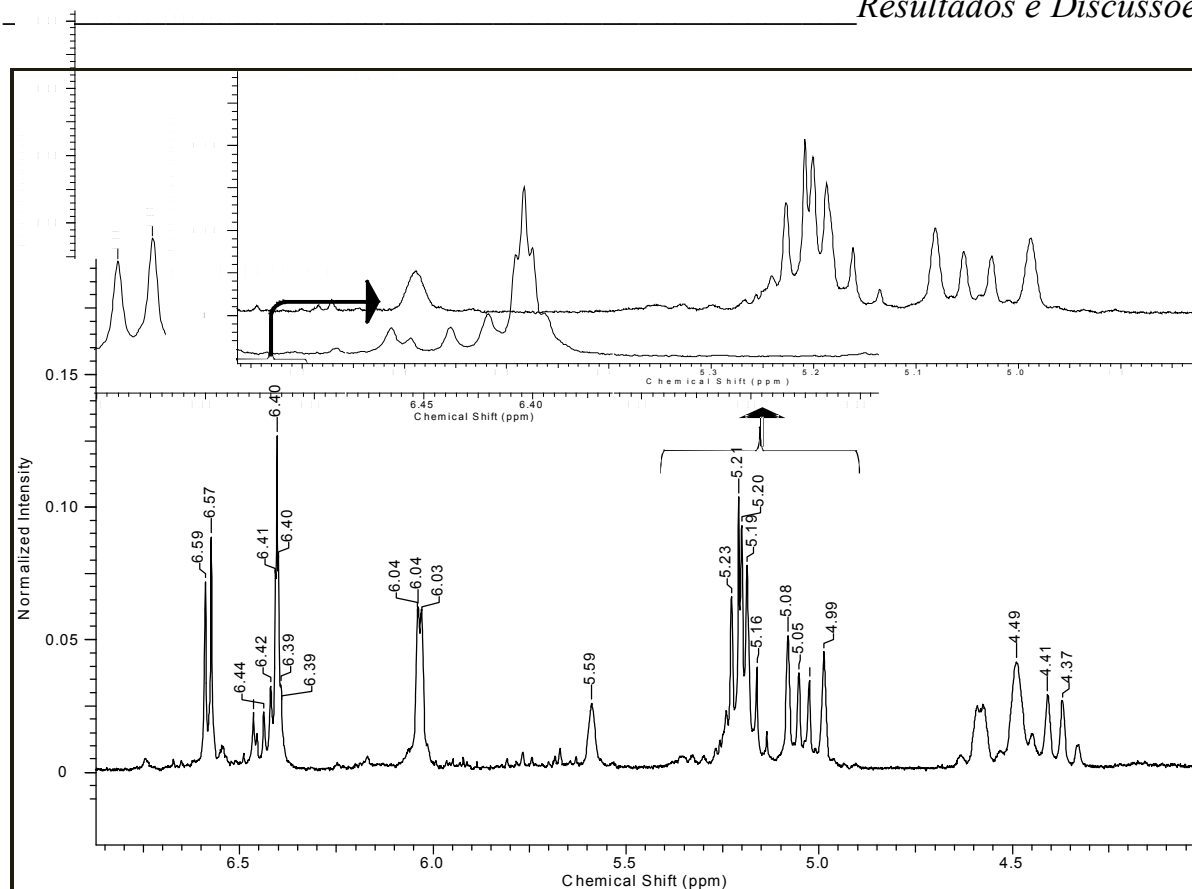


FIGURA 4.29- Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios olefínicos e carbinólicos.

Um sinal referente ao hidrogênio da hidroxila da posição 2 pode ser visualizado. Este se encontra na região de  $\delta_H$  3,64 como um singlete largo, característico deste grupamento (Figura 4.27).

Observando a estrutura proposta, observa-se a presença de grupos cetais. Os hidrogênios vizinhos a estes possuem sinais semelhantes a hidrogênios aromáticos (Figura 4.30), bastante desblindados em função dos grupos vizinhos eletronegativos que atuam atraindo a densidade eletrônica, no caso os grupos carboxilas.

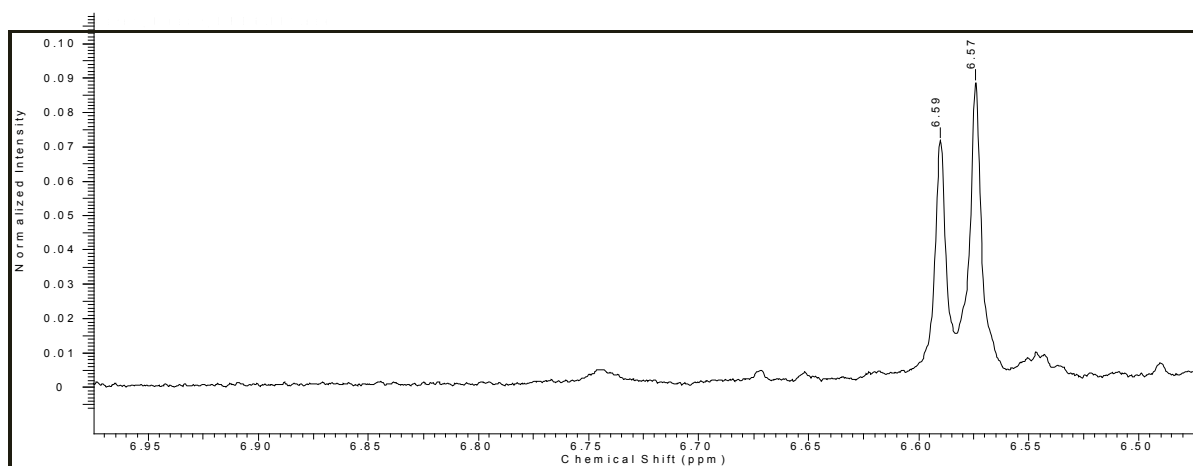


FIGURA 4.30 - Ampliação da região dos hidrogênios das posições 18 e 19.

Considerando as metilas existentes no composto, pode-se deparar com a existência de três tipos: metilas de grupo acetato, metilas olefinicas e metilas ligadas a carbono tetraédrico ( $sp^3$ ). Tais grupos metílicos podem ser claramente observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto. Na ampliação representada na Figura 4.31 – B, pode-se observar sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,98 (s) e  $\delta_{\text{H}}$  2,01 (s) referentes à metilas ligadas a grupo carboxila, tem-se ainda sinas em  $\delta_{\text{H}}$  2,07 (s),  $\delta_{\text{H}}$  2,06 e  $\delta_{\text{H}}$  1,90 (carbono 13), referindo-se às metila olefinicas.

Já os sinais referentes à metilas lidagas à carbonos  $sp^3$ , podem ser observadas na ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,85–1,01 (Figura 4.31 A). As metilas presentes no composto podem ser confirmadas pelo sinal em  $\delta_{\text{H}}$  0,90 (d; 6,8 Hz) referente à posição de carbono 8 do sistema decalínico e outra metila com deslocamento em  $\delta_{\text{H}}$  0,88 (sl) característico de metilas na posição carbono 9 dos clerodanos.

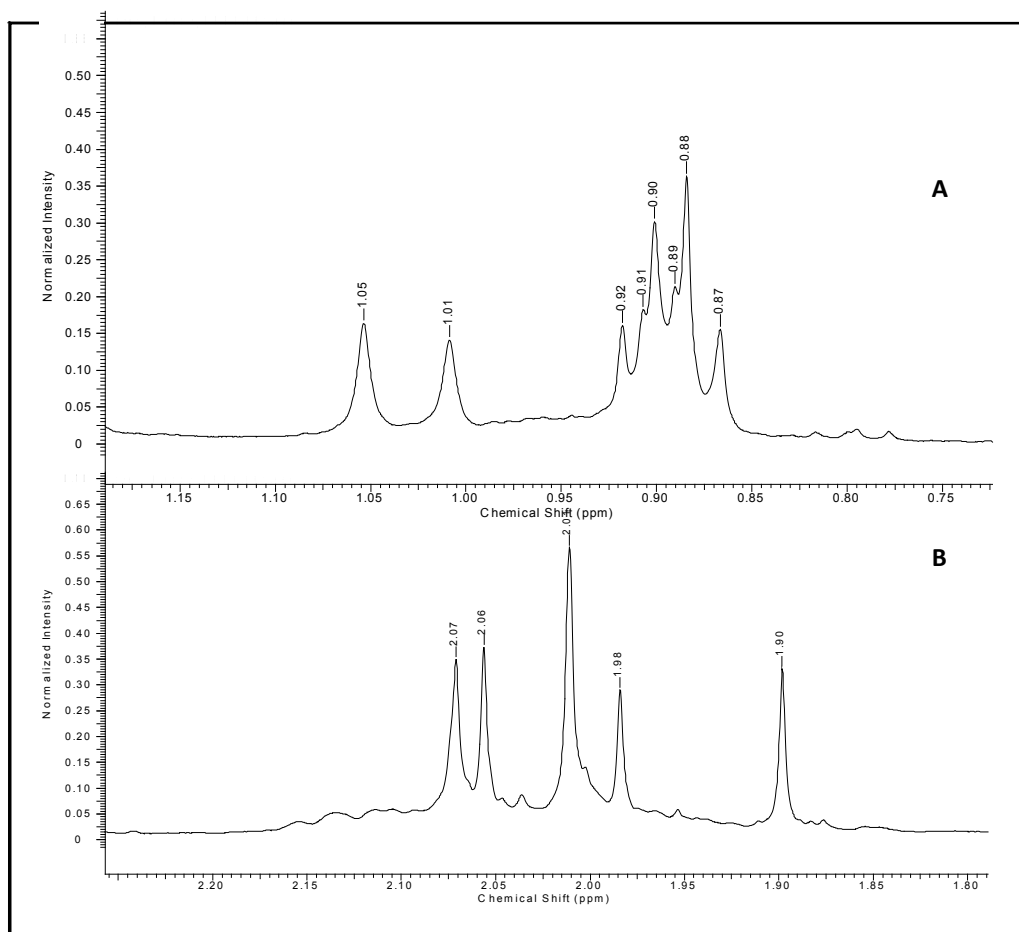


FIGURA 4.31- Ampliação da região de metilas olefínicas, ligadas a grupos carboxila e a carbonos  $sp^3$ .

Para a confirmação da massa molecular do composto, foi realizada uma análise no espectrômetro de massas com ionização por *electrospray*, no modo negativo. Observado os espectros obtido Figura 4.32 A e B, pode-se confirmar a massa do íon  $[M-H]^-$  681,5 Da, sendo a fórmula molecular proposta para o composto  $C_{39}H_{54}O_{10} = 682 \text{ g. mol}^{-1}$  e o índice de deficiência de hidrogênio (IDH) (Equação 4.2) igual a 13, condizente com a fórmula molecular.

$$\text{IDH} = n^{\circ} \text{ C} - n^{\circ} \text{ H}/2 + n^{\circ} \text{ N}/2 - n^{\circ} \text{ X}/2 + 1 \quad (4.2)$$



Onde: n° C = número de carbonos

n° H = número de hidrogênios

n° N = número de nitrogênios

n° X = número de halogênios

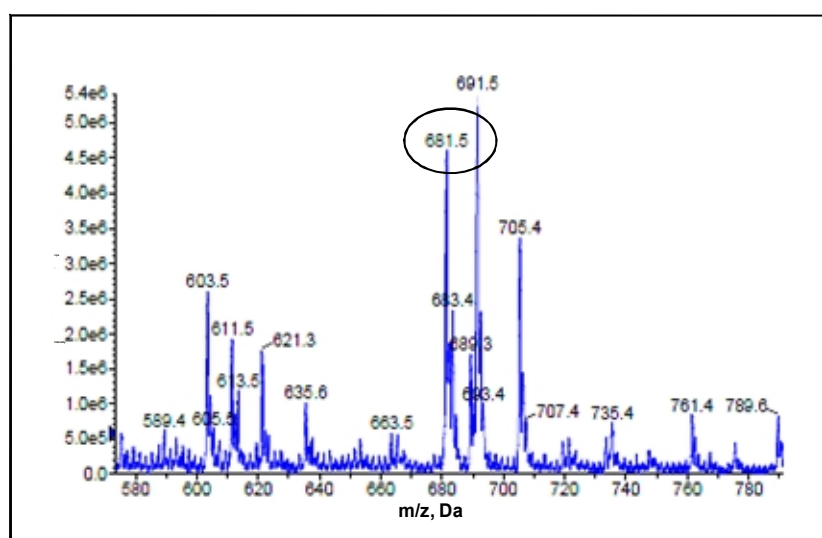


FIGURA 4.32- Espectro de massas *full scan* da inserção direta da Ref 16-23(ColB) no modo negativo.

#### 4.2.7.2- Identificação estrutural da Ref 1-3 (SF3)

A Ref 1-3 (SF3) foi isolada da fração acetato de etila das folhas de *C. sylvestris*. A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.34) revelou a presença de dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 ( $J = 1,9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,76 ( $J = 8,1$  Hz) e ainda a presença de um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,71 ( $J = 8,1$  e 1,9 Hz), o que evidencia um acoplamento *meta* entre os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,84 e  $\delta_{\text{H}}$  6,71, além deste último apresentar um acoplamento *orto* com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,76.

Prosseguindo nas informações obtidas pelas correlações nos espectros bidimensionais (2D), no mapa de correlações HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) (FIGURA 4.35) foram observadas correlações dos sinais de hidrogênios em  $\delta_H$  6,84,  $\delta_H$  6,76 e  $\delta_H$  6,71 com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  115,2,  $\delta_C$  116,0 e  $\delta_C$  120,0, respectivamente. Analisando o mapa de correlações HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) (FIGURA 4.36) destaca-se as correlações dos sinais de dupletos em  $\delta_H$  6,82 com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  82,8,  $\delta_C$  120,0 e  $\delta_C$  146,1 e em  $\delta_H$  6,76 com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  132,1 e  $\delta_C$  146,2. Observou-se ainda as correlações apresentadas para o sinal duplo dubleto em  $\delta_H$  6,71 com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  82,8,  $\delta_C$  115,2,  $\delta_C$  132,1 e  $\delta_C$  146,2. Os sinais em  $\delta_H$  6,84,  $\delta_H$  6,76 e  $\delta_H$  6,71 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B de um esqueleto 2,3-diidroflavonoídico (correlações representadas na Figura 4.33).

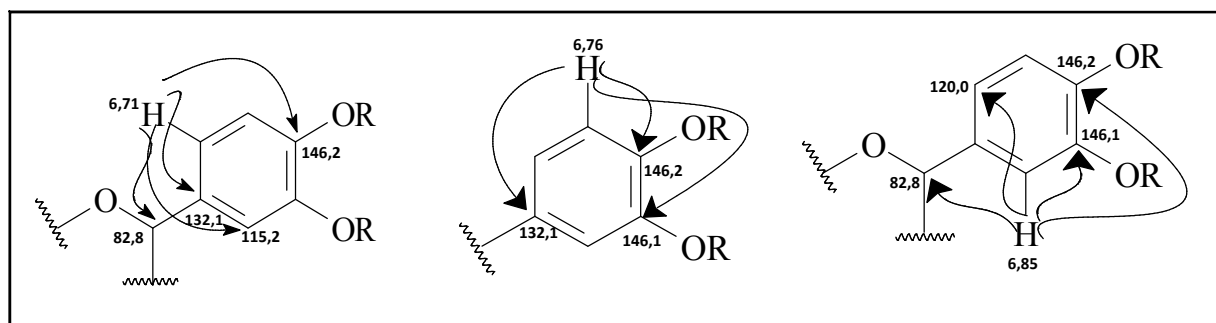


FIGURA 4.33- Esquema de correlações do anel B.

O anel C presente na estrutura foi verificado pela presença de dubleto em  $\delta_H$  4,57 ( $J = 7,5$  Hz), atribuído a H-2. Pelo espectro de COSY (*Correlated Spectroscopy*) (Figura 4.37) pode se verificar que este sinal acopla com H-3 em  $\delta_H$  3,97. A configuração 2,3-*trans* foi determinada pela constante de acoplamento ( $J = 7,5$  Hz) observada no espectro de RMN  $^1H$  e pelo valor de C-2 em  $\delta_C$  82,8

observado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Ainda no mapa de correlações HSQC pode-se observar correlações  $\delta_{\text{H}}$  4,56 e  $\delta_{\text{H}}$  3,97 com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  82,8 e  $\delta_{\text{C}}$  68,7, respectivamente. Observando o mapa de correlações HMBC correlações para o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,57 com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  28,4,  $\delta_{\text{C}}$  68,7,  $\delta_{\text{C}}$  115,2 (C-2'),  $\delta_{\text{C}}$  120,1 (C-6') e  $\delta_{\text{C}}$  132,3 (C-1').

Observando ainda o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 3.34) observa-se a presença de dois sinais de duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,84 ( $J = 16,1$  e  $5,4$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,50 ( $J = 16,1$  e  $8,0$  Hz). Os sinais de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,84 e  $\delta_{\text{H}}$  2,50m os quais através do HSQC se correlacionaram com o mesmo sinal de carbono  $\delta_{\text{C}}$  28,4.

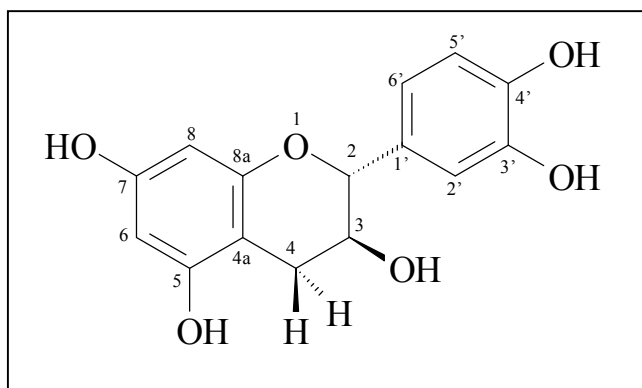
No mapa de correlações HMBC observa-se as correlações observadas para esses duplos dubletos com os sinais de carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  68,7;  $\delta_{\text{C}}$  82,8 (C-2),  $\delta_{\text{C}}$  100,8 e  $\delta_{\text{C}}$  157,5.

Analisando as constantes de acoplamento destes hidrogênios pôde-se atribuir que o duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,84 ( $J = 16,1$  e  $5,4$  Hz) é correspondente ao H-4 $\alpha$  devido ao seu acoplamento geminal com H-4 $\beta$  ( $J = 16,1$  Hz) e acoplamento pseudo-equatorial-axial com H-3 ( $J = 5,4$  Hz). O duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,50 ( $J = 16,1$  e  $8,0$  Hz) foi atribuído ao H-4 $\beta$ , devido ao seu acoplamento pseudo-diaxial com H-3 ( $J = 8,0$  Hz).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.38) foram observados 14 sinais de carbonos, onde os deslocamentos químicos observados concordaram com dados da literatura se tratando do composto catequina (LÔBO,2008). Além disso teve sua massa confirmada através da espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI) no modo negativo (Figura 4.39 A), o qual apresentou um pico de íon molecular em  $m/z$  289  $[\text{M-H}]^-$ , condizente com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$  do composto determinado.

No espectro de ultravioleta (Figura 4.39 B), foram observadas as bandas de máxima absorvância em 220 e 278nm. Para atribuição dos grupos referentes a estas bandas, informações teóricas de sistemas aromáticos foram utilizadas (PAVIA et al., 2010).

Assim, analisando a banda em 220 nm, esta se aproxima ao valor base correspondente ao cromóforo fenol (210,5 nm). Já a banda em 278nm, é referente ao fragmento da molécula que corresponde ao derivado benzênico substituído adotando como valor base 246nm. Assim considerando os incrementos de duas hidroxilas nas posições *para* (+25nm) e *orto* (+7nm), resulta no valor visualizado no espectro de 278nm.



Na Tabela 4.12 estão descritos os deslocamentos obtidos de nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e a comparação com dados da literatura.

TABELA 4.12- Dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da catequina - Ref 1-3 (SF3) em comparação com dados da literatura (LÔBO et al, 2008).

<b>Isolado <math>\delta_{\text{H}} \text{mult}^{\text{a}}</math></b>	<b>Literatura <math>\delta_{\text{H}} \text{mult}^{\text{b}}</math></b>	<b>Isolado <math>\delta_{\text{C}}^{\text{a}}</math></b>	<b>Literatura <math>\delta_{\text{C}}^{\text{b}}</math></b>
6,82 ( <i>d</i> , J= 1,9Hz – H-2')	6,83 ( <i>d</i> , J= 1,9Hz – H-2')	157,7 (C-7)	157,5 (C-7)
6,76 ( <i>d</i> , J= 8,1Hz – H-5')	6,76 ( <i>d</i> , J= 8,1Hz – H-5')	157,5 (C-5)	157,0 (C-5)
6,71 ( <i>dd</i> , J=1,9 e 8,1 Hz – H-6')	6,71 ( <i>dd</i> , J=1,9 e 8,1 Hz – H-6')	156,6 (C-8a)	156,6 (C-8a)
5,92 ( <i>d</i> , J= 2,2 – H-6)	5,93 ( <i>d</i> , J= 2,2 – H-6)	146,2 (C-3')	145,6 (C-3')
5,85 ( <i>d</i> , J= 2,3 – H-8)	5,85 ( <i>d</i> , J= 2,3 – H-8)	146, 1 (C-4')	145, 5 (C-4')
4, 57 ( <i>d</i> , J= 7,5 – H-2)	4, 57 ( <i>d</i> , J= 7,5 – H-2)	132,1 (C- 1')	131,7 (C- 1')
3,97 <i>m</i> (H-3)	3,97 <i>m</i> (H-3)	120,0 (C-6')	119,8 (C-6')
2,84 ( <i>dd</i> , J= 5,4 e 16,1Hz – H4 $\alpha$ )	2,85 ( <i>dd</i> , J= 5,4 e 16,1Hz – H4 $\alpha$ )	116,0 (C-5')	115,6 (C-5')
2,50 ( <i>dd</i> , J=8,2 e 16,1Hz – H4 $\beta$ )	2,51 ( <i>dd</i> , J=8,2 e 16,1Hz – H4 $\beta$ )	115,2 (C-2')	115,2 (C-2')
		100,8 (C4a)	100,3 (C4a)
		96,2 (C-6)	96,0 (C-6)
		95,5 (C-8)	95,1 (C-8)
		82,8 (C-2)	82,4 (C-2)
		68,7 (C-3)	68,0 (C-3)
		28,4 (C-4)	28,6 (C-4)

<sup>a</sup> CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, <sup>b</sup> CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz.

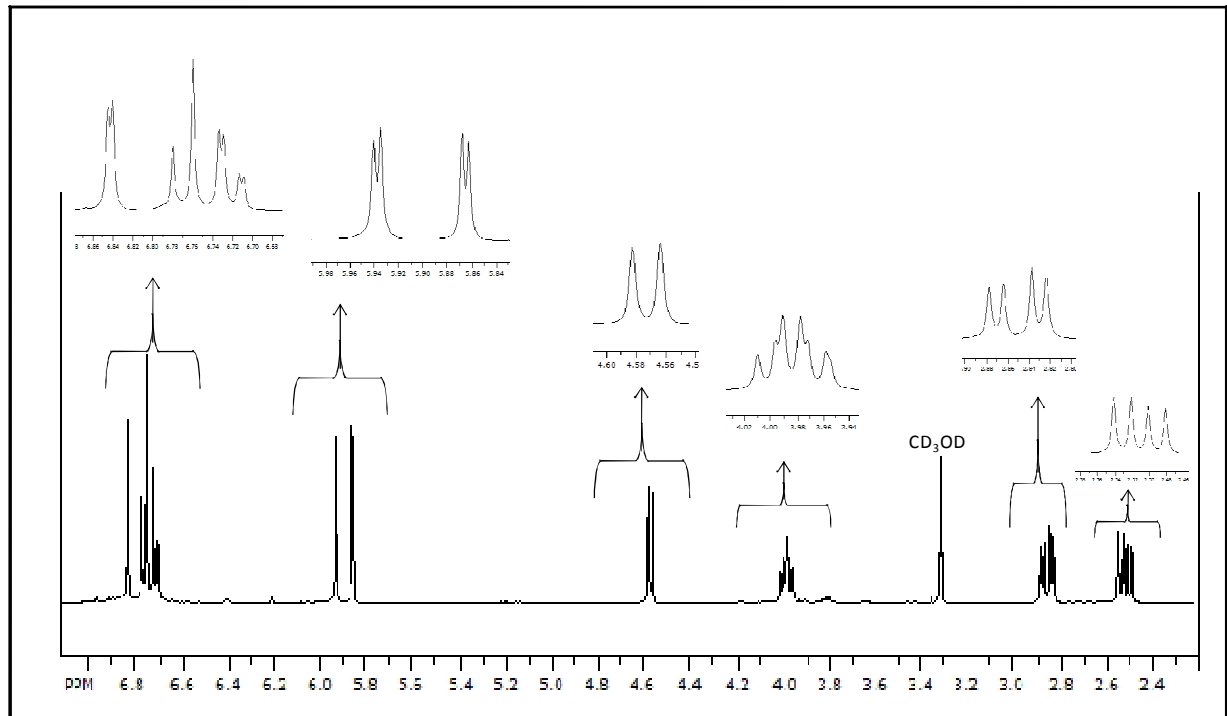


FIGURA 4.34- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

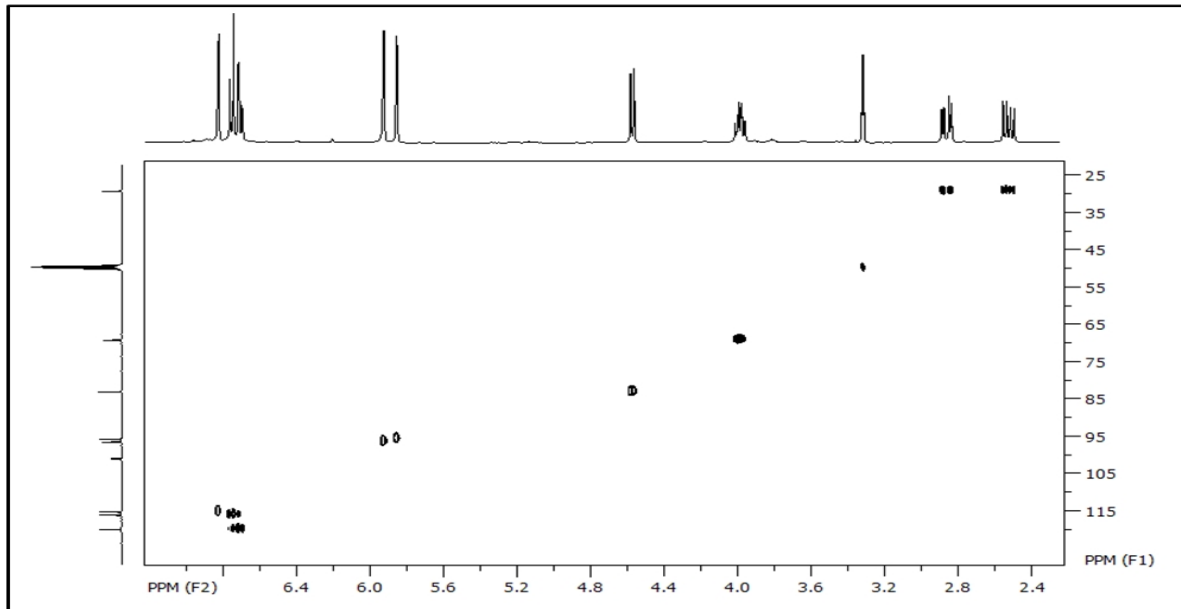


FIGURA 4.35- Mapa de contorno HSQC da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

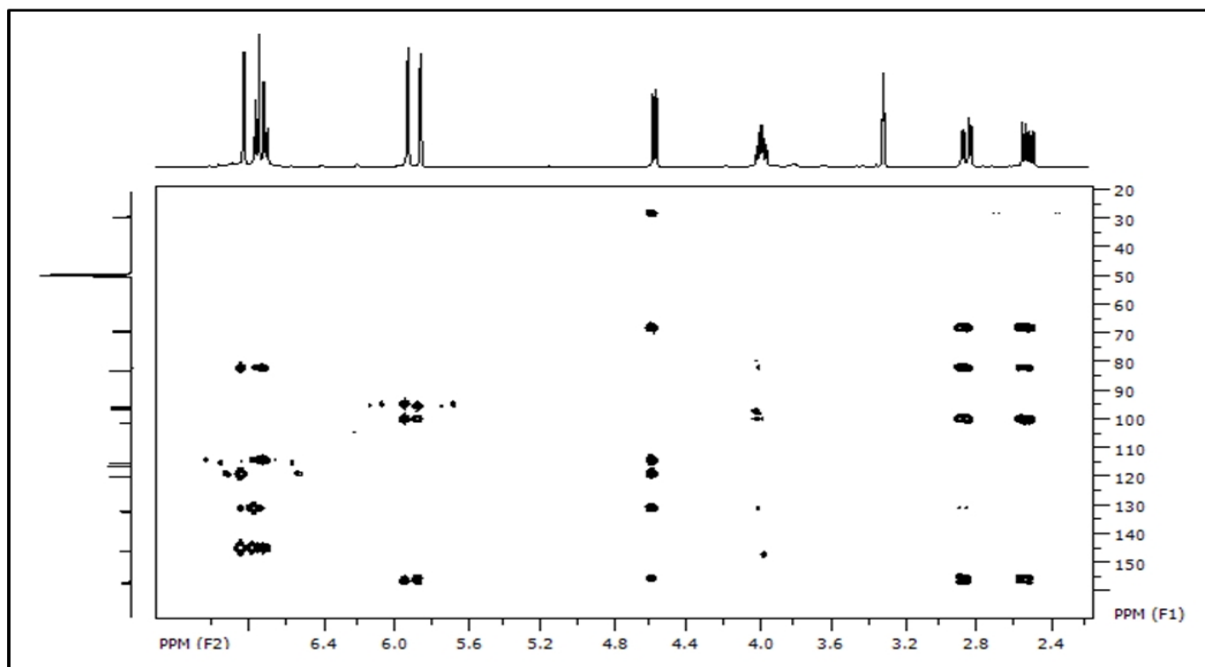


FIGURA 4.36- Mapa de contorno HMBC da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

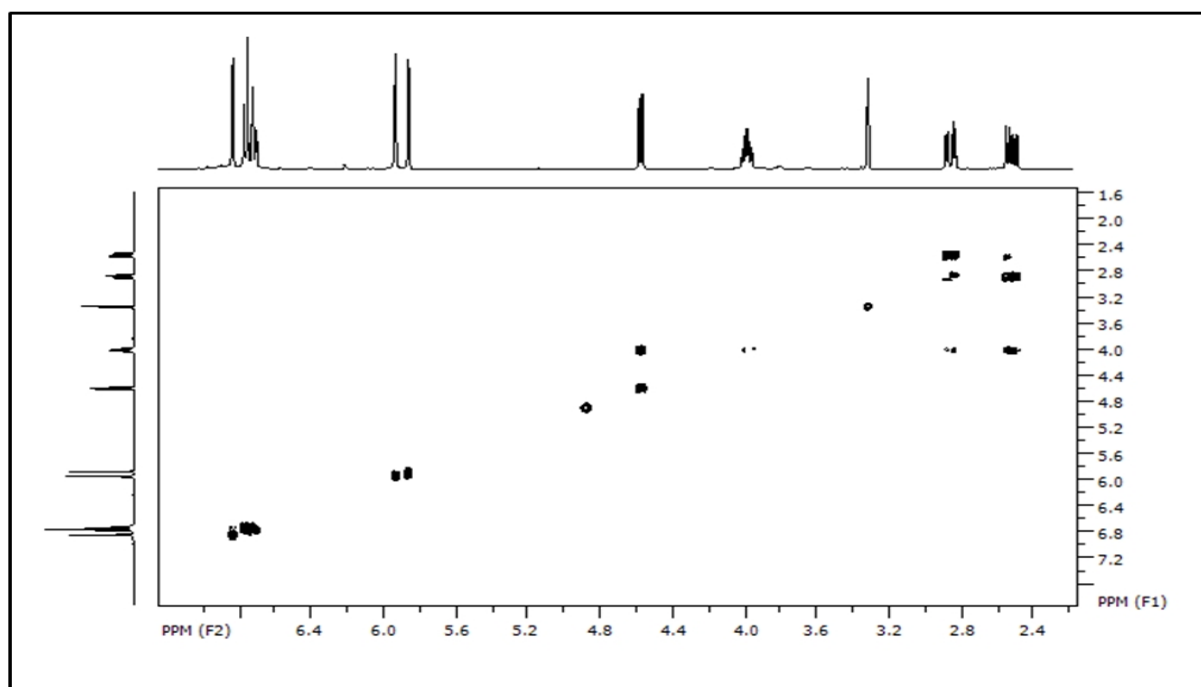


FIGURA 4.37- Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da catequina - Ref 1-3 (SF3) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



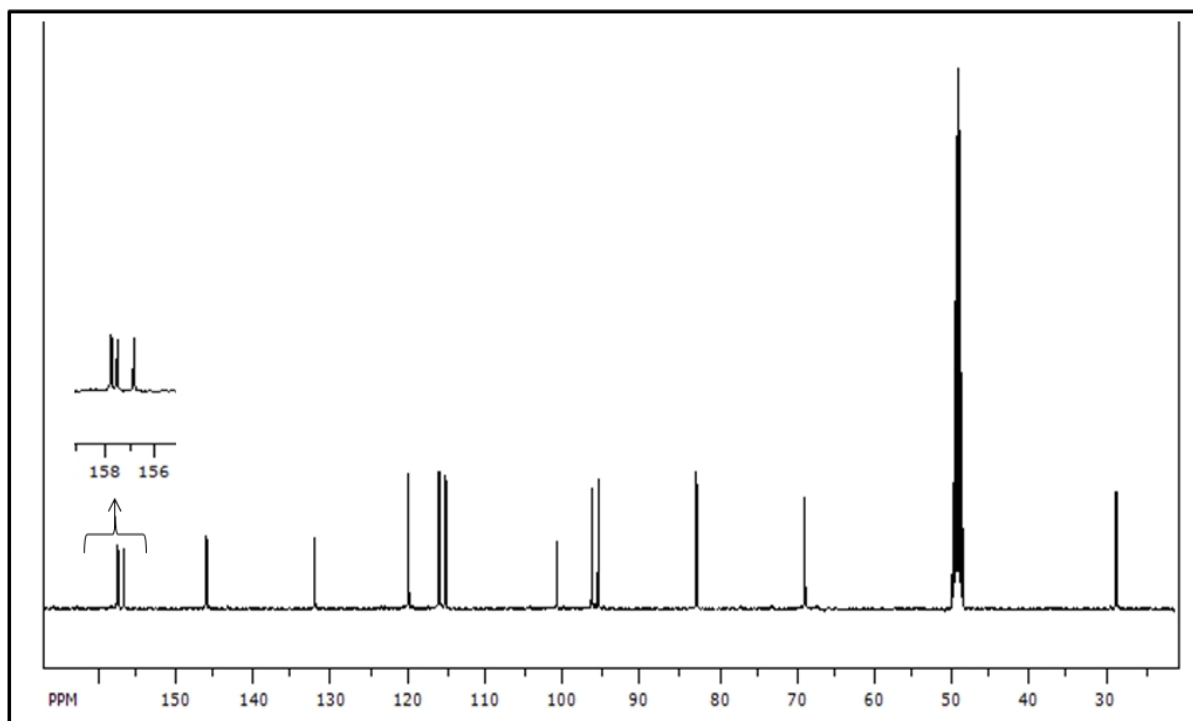


FIGURA 4.38- Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da catequina - Ref 1-3 ( $\text{SF}_3$ ) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).33

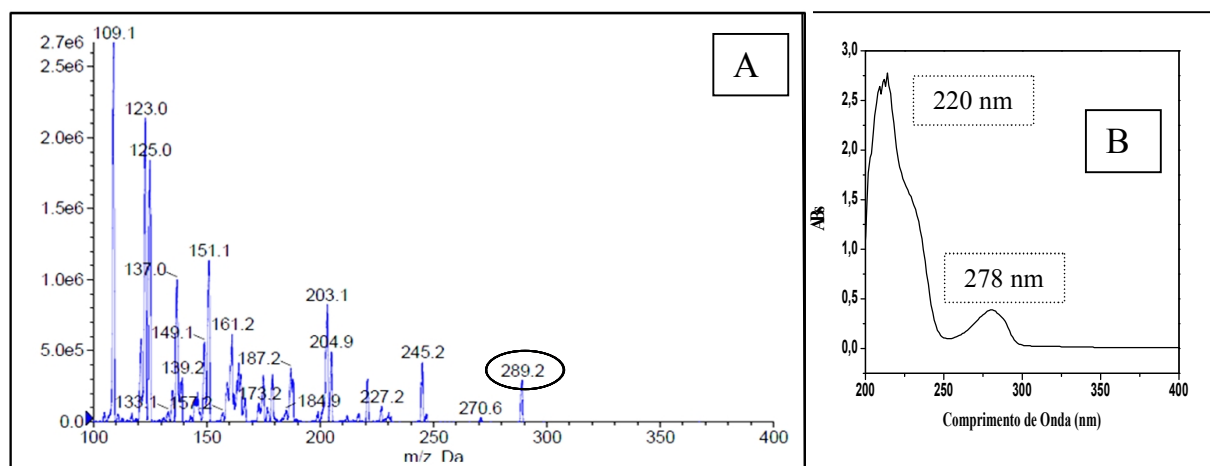


FIGURA 4.39- A) Espectro de massas no modo negativo por ESI e B) espectro de ultravioleta visível da catequina.

#### 4.2.7.3- Determinação da Ref 14-21 (ColF).

A Ref 14-21 (ColF) foi isolada da fração hexânica das folhas de *C. sylvestris*. Embora tenha sido uma fração não trabalhada em termos de atividade biológica, o isolamento deste composto instigou a determinação do mesmo a fim de contribuir para a quimiosistemática da planta.

Após analisar as placas de CCDA das frações da coluna F, as refrações 14 a 21 foram agrupadas após verificar a similariedade entre os fatores de retenção das mesmas (Figura 4.40). Verificou-se qualitativamente que se tratava de um composto com elevado grau de pureza.

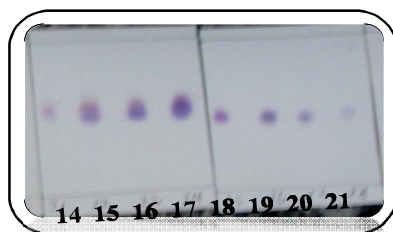


FIGURA 4.40- Análise das refrações 14 à 21 da coluna F por CCDA.

A amostra então nomeada de Ref 14-21 (ColF) foi submetida à análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

Analisando o espectro de massa obtido para a banda majoritária no cromatograma (Figura 4.41 e 4.42), a massa do íon molecular correspondeu à  $[M.^+] = 238\text{Da}$ .

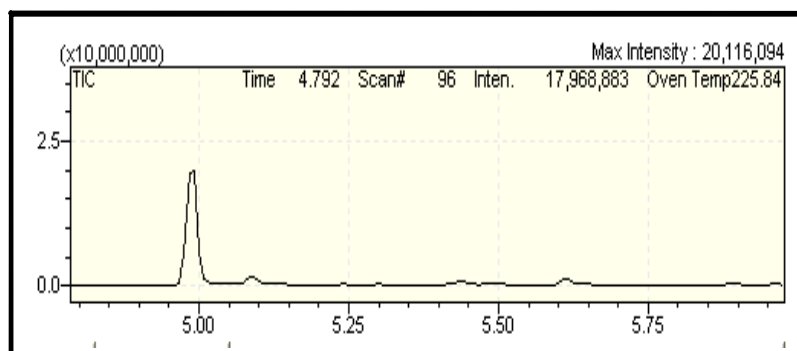


FIGURA 4.41- Cromatograma de íons totais contido na Ref 14-21 (ColF).

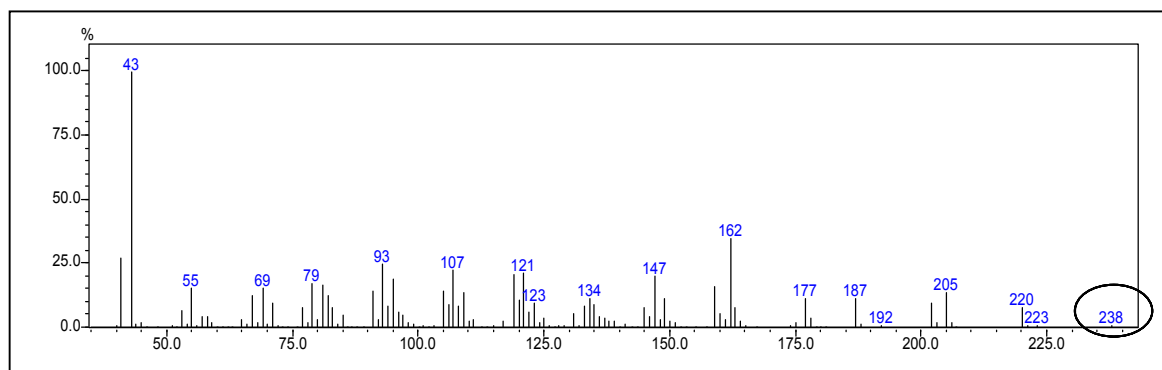


FIGURA 4.42- Espectro de massas da catequina obtido pelo CG-EM por impacto eletrônico.

Prosseguindo as informações acerca da Ref 14-21 (ColF), este foi devidamente analisado por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de uma de duas dimensões (1D e 2D).

Através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) (Figura 4.43) foi possível determinar a presença de 15 carbonos na estrutura.

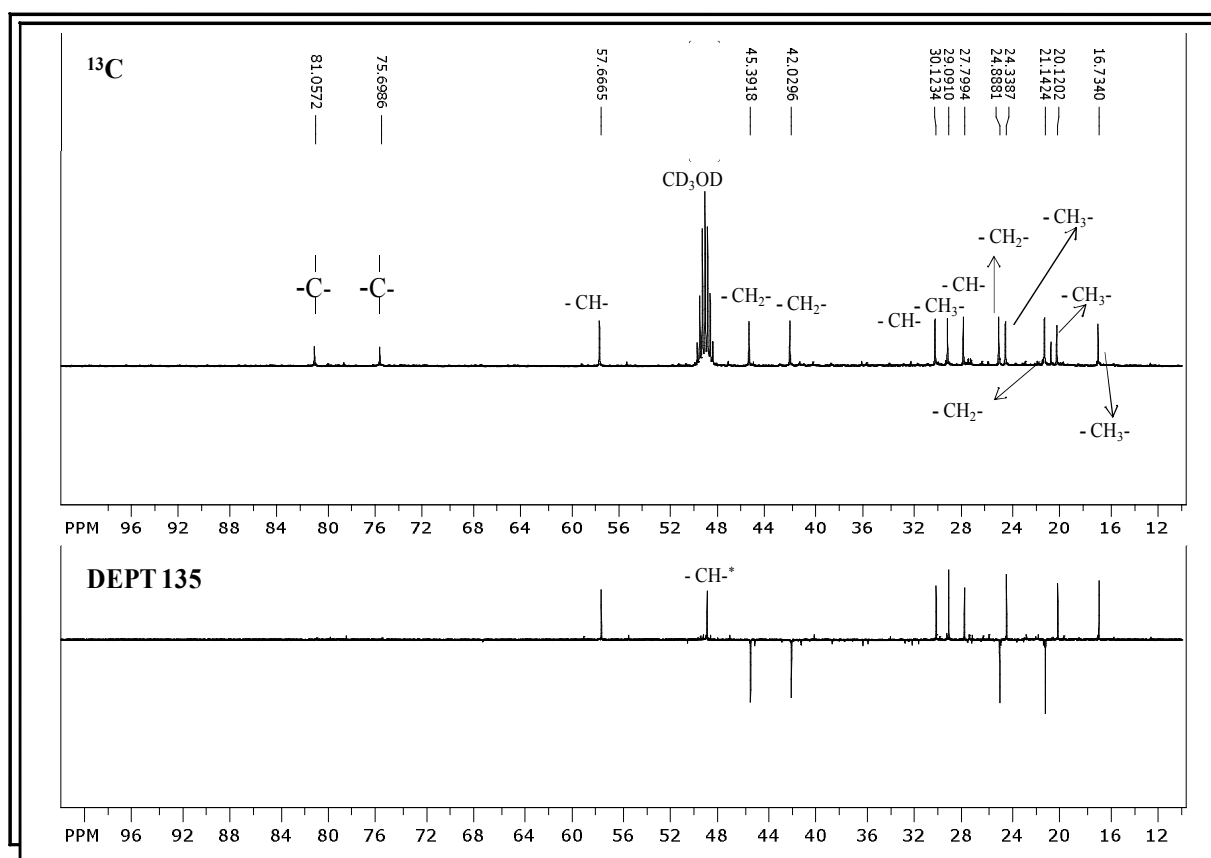


FIGURA 4.43- Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 da Ref 14-21 (CoIF) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posteriormente foram analisados os acoplamentos e correlações existentes na estrutura através dos mapas de contorno de HSQC, HMBC e COSY. Através dos acoplamentos observados no HSQC (Figura 4.44) e as correlações obtidos pela análise do HMBC (Figura 4.45), foi possível atribuir a presença de um grupo isopropila na estrutura do composto.

No mapa de contorno do HSQC pode-se observar o acoplamento de um singlete  $\delta_{\text{H}}$  1,04 com um sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  29,1, além de outro acoplamento de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,06 com um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  16,7, sendo que estes dois singletos, através do HMBC, correlacionam com um sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  30,2; que por sua vez acopla com o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  0,447.

Nota-se ainda a correlação do carbono em  $\delta_C$  30,2 com o multipletto em  $\delta_H$  0,619; o qual possui acoplamento com o carbono em  $\delta_C$  27,8. Analisando ainda o HMBC, o carbono em  $\delta_C$  27,8 correlaciona com os multipletos em  $\delta_H$  1,76 e  $\delta_H$  0,965; os quais acoplam com um carbono em  $\delta_C$  21,2. Na Figura 4.46 pode-se isualizar as correlações e acoplamentos mencionados. O espectro de RMN de H total está demonstrado na Figura 4.47.

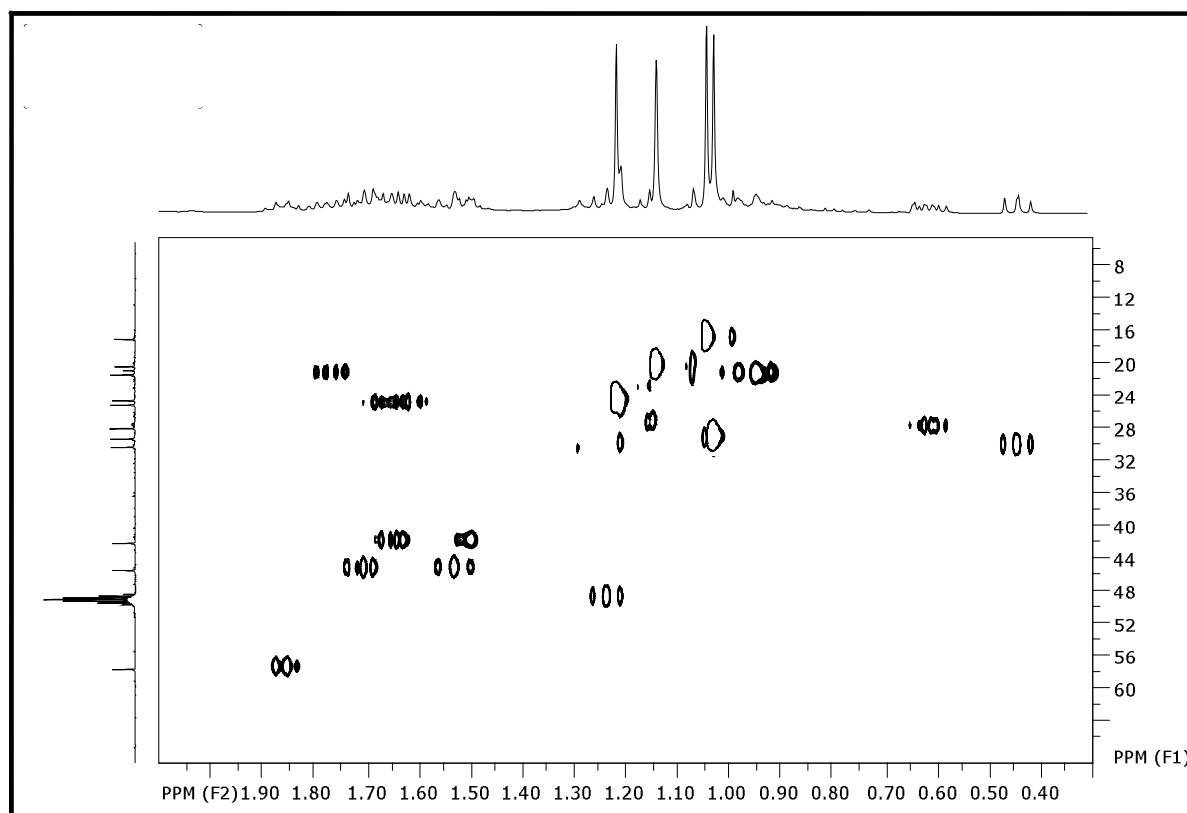


FIGURA 4.44- Mapa de contorno HSQC da Ref 14-21 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

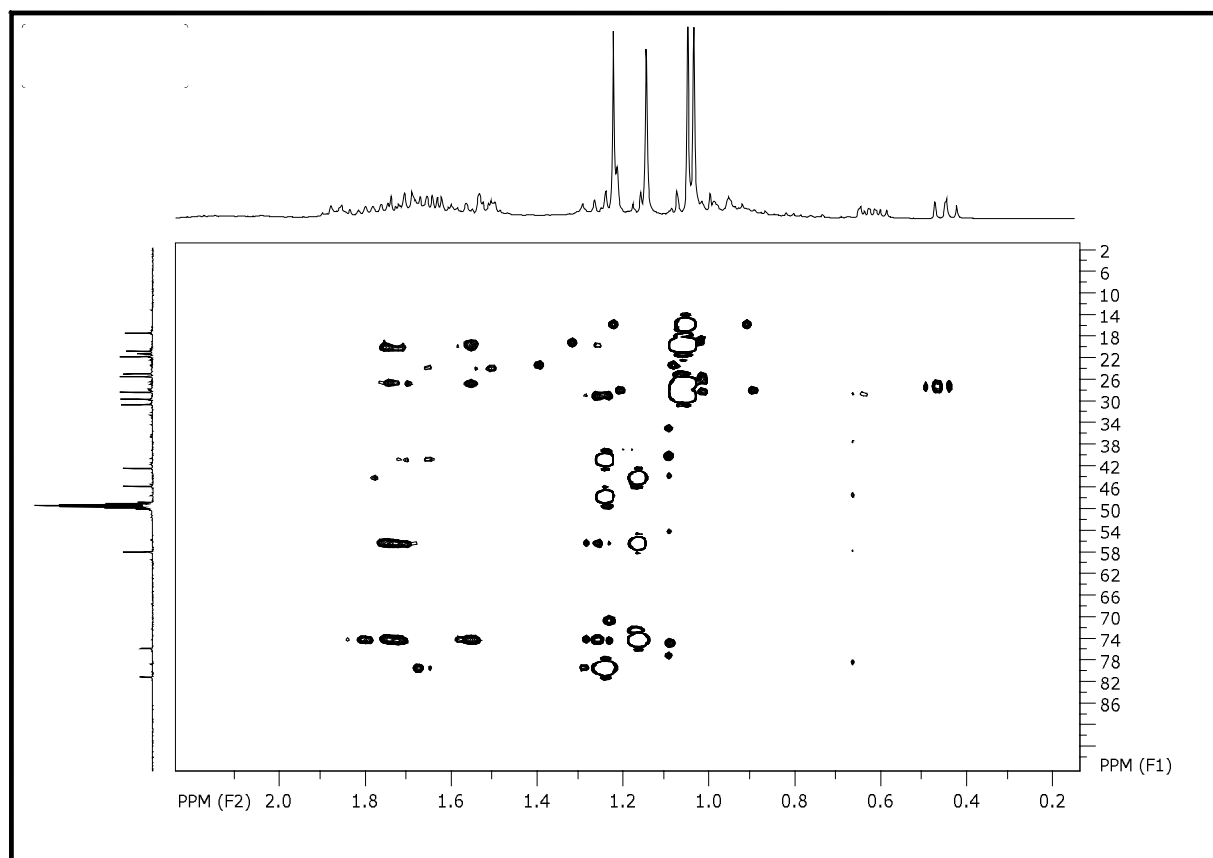


FIGURA 4.45-Mapa de contorno HMBC da Ref 14 -21 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

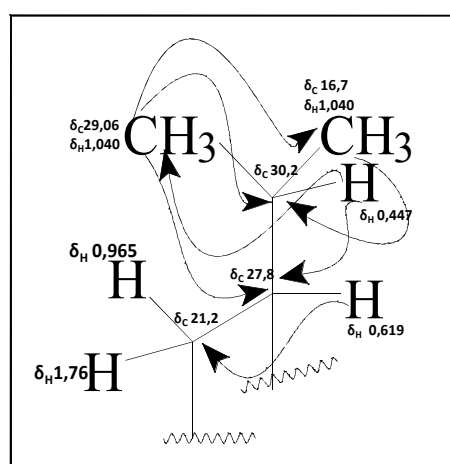
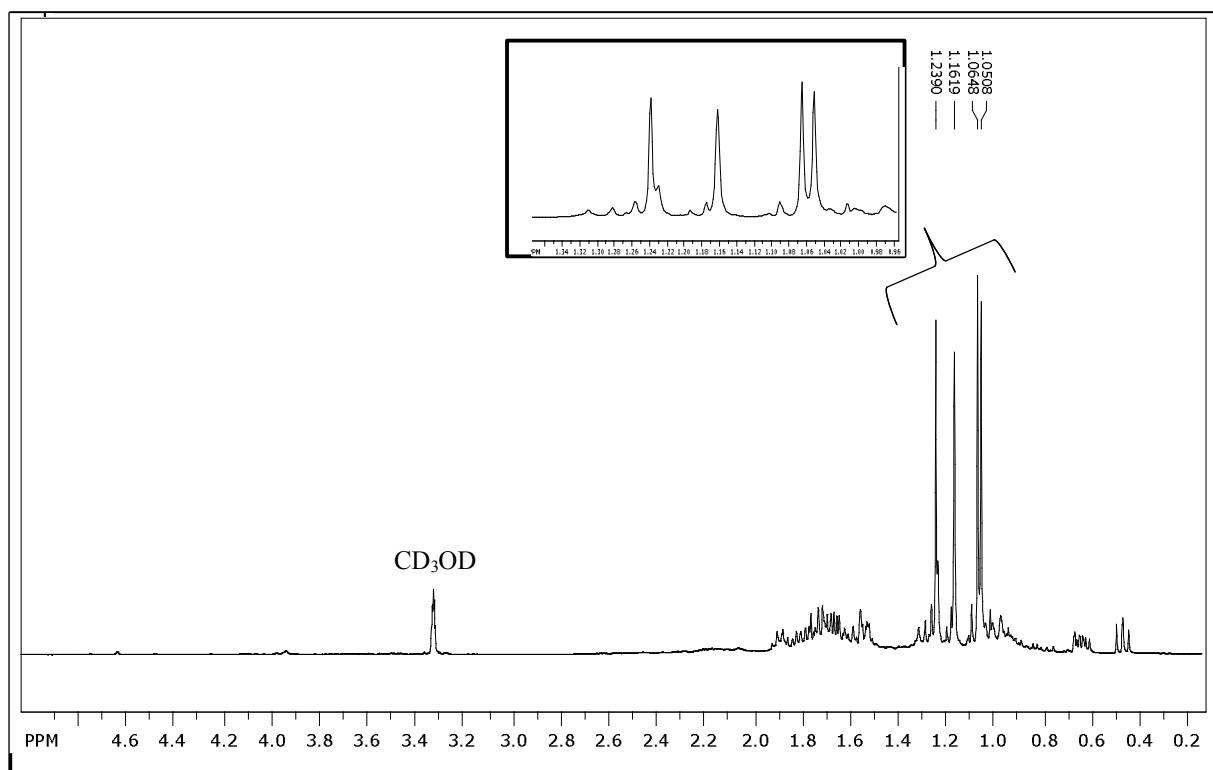


FIGURA 4.46- Esquema de correlações para atribuição do grupo isopropila na estrutura do composto Ref 14-21 (ColF).

FIGURA 4.47- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Ref 14-21 (ColF) (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Analisando ainda os mapas de correlação HMBC e HSQC, observou-se correlação entre o carbono  $\delta_{\text{C}} 27,8$  com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 81,2$ . O carbono em  $\delta_{\text{C}} 21,2$  se correlaciona com um carbono em  $\delta_{\text{C}} 45,4$ , sendo este responsável por acoplar com os multipletos em  $\delta_{\text{H}} 1,31$  e  $\delta_{\text{H}} 1,53$ . Este mesmo carbono apresentou correlação com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 75,8$ ; que por sua vez correlaciona com o multipletto em  $\delta_{\text{H}} 1,24$ , o qual está acoplado com o sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 49,1$ .

Observando este sinal de carbono em  $\delta_{\text{C}} 49,1$  no HMBC, este se correlaciona com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 81,2$  e em função desta e de outras demais correlações demonstradas na Tabela 4.13, sugere-se a existência de um anel de seis membros na estrutura do composto. Na Figura 4,48 estão demonstradas as correlações anteriormente descritas, bem como outras correlações observadas com

os grupos em destaque, o que contribuiu para a determinação estrutural do composto.

TABELA 4.13 – Correlações observadas através dos mapas de contorno em 2D.

HSQC ( $\delta_H$ )	DEPT ( $\delta_C$ )	HMBC( $\delta_C$ )
0,447	(CH; 30,2)	27,8; 29,1; 81,2
0,619	(CH; 27,8)	21,2; 30,2; 49,1
1,040	(CH <sub>3</sub> ; 29,1)	16,8; 27,8; 30,2; 49,1
1,060	(CH <sub>3</sub> , 16,8)	21,2; 30,2
1,150	(CH <sub>3</sub> ; 20,2)	27,8; 45,4; 57,7; 75,8
1,223	(CH <sub>3</sub> ; 24,3)	16,8; 21,2; 30,2; 75,8
1,241	(CH, 49,1)	21,2; 30,2; 42,1; 49,1; 57,7; 75,8; 81,2
1,637 e 1,510	(CH <sub>2</sub> , 42,1)	- 49,1; 57,7; 81,2 - 21,2; 27,8; 49,1; 57,7; 75,8; 81,2
1,650 e 1,225	(CH <sub>2</sub> , 24,8)	- 24,8; 42,1; 49,1; 57,7; 81,2 - 16,8; 21,2; 30,2; 42,1; 49,1; 57,7
1,765 e 0,965	(CH <sub>2</sub> , 21,2)	- 27,8; 30,2; 45,4; 57,7, 75,8 - 16,8, 75,8
1,710 e 1,534	(CH <sub>2</sub> , 45,4)	- 21,2; 27,8; 57,7; 75,8 - 27,8; 42,1; 57,7; 75,8
1,864	(CH, 57,7)	24,8; 30,2; 45,4; 49,1; 75,8



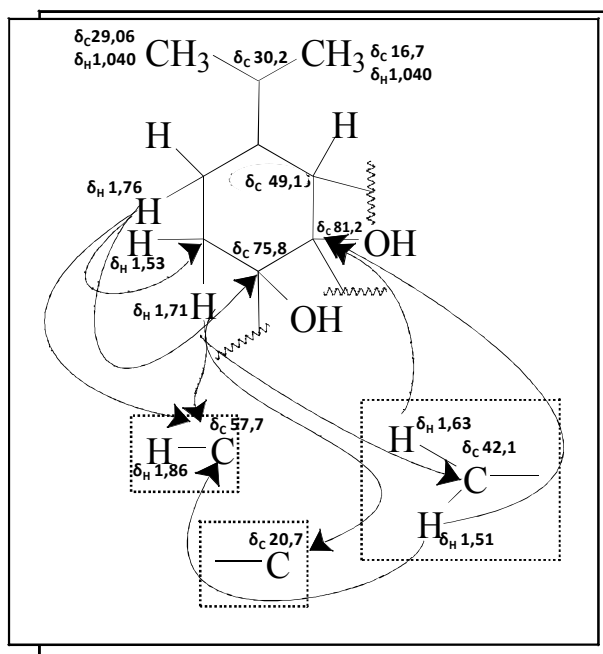


FIGURA 4.48- - Esquema de correlações contribuintes na determinação estrutural da Ref 14-21 (Col F).

Pode-se observar a inserção de dois grupos hidroxilas na estrutura do composto. Estes foram localmente distribuídos em função das informações obtidas pela comparação do RMN de  $^{13}\text{C}$  com o DEPT 135 e pela análise no CG-EM. Através da comparação foi possível detectar a presença de três carbonos quaternários; onde um apresentou um deslocamento mais blindado em  $\delta_C 20,7$  e os outros dois com deslocamento mais desblindados em  $\delta_C 75,8$  e  $\delta_C 81,2$ . Pela massa do íon molecular obtido pelo CG-EM, foi possível propor uma fórmula molecular ao composto ( $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ ), ao qual através do espectro de massas obtido observou-se a perda de duas unidades de  $m/z 18 \text{ Da.}$ , sugerindo a perda de duas moléculas de água, o que possibilita atribuir à estrutura duas hidroxilas ligadas justamente nesses carbonos quaternários, justificando os deslocamentos nas regiões menos blindadas dos respectivos carbonos.

Por fim, utilizando das regras para determinação do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) na molécula, foi determinada um IDH=3. Após a análise de todas correlações obtidas pelo HSQC e HMBC juntamente com as informações obtidas pelo CG-EM, foi possível propor uma estrutura sesquiterpênica tricíclica à Ref 14-21 (ColF)- Figura 4.49.

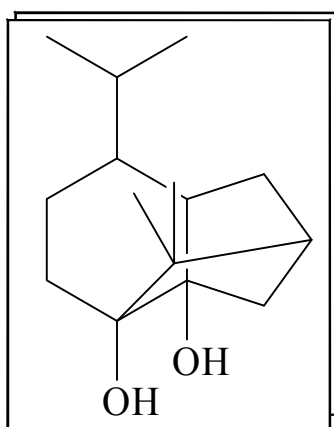


FIGURA 4.49- Proposta estrutural para a Ref 14-21 (ColF).

Realizando-se uma busca na literatura, detectou-se que o composto é inédito.

#### **4.2.7.4- Análise dos extratos de *C. sylvestris* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CLAE-UV)**

##### **4.2.7.4.1- Quantificação da Ref 7-11(SF6) nos extratos de *Casearia sylvestris* testados frente à bactéria *Luteibacter sp.***

Uma maneira de garantir a reprodutibilidade em ensaios biológicos é o controle da qualidade dos extratos a serem ensaiados.

Assim o composto padrão de referência (Ref 7-11 (SF6)) foi devidamente quantificado nos extratos vegetais provenientes da *Casearia sylvestris* que foram submetidos de inibição bacteriana, a fim de verificar a quantidade do marcador de referência existente em 1mg dos extratos (extrato bruto, fração acetato, fração metanólica e extrato diterpênico).

Sabe-se que o sucesso de uma análise quantitativa está principalmente ligado à qualidade e especificações do padrão de referência utilizado na metodologia. Como não estava disponível um padrão de qualidade comercial da planta em estudo, optou-se pelo trabalho de fitoquímica clássica incluindo extração, isolamento e purificação seguida de sua caracterização. Na Figura 4.50 pode ser observado o cromatograma do padrão isolado Ref 7-11 (SF6). A análise foi realizada por CLAE-UV em 220 nm.

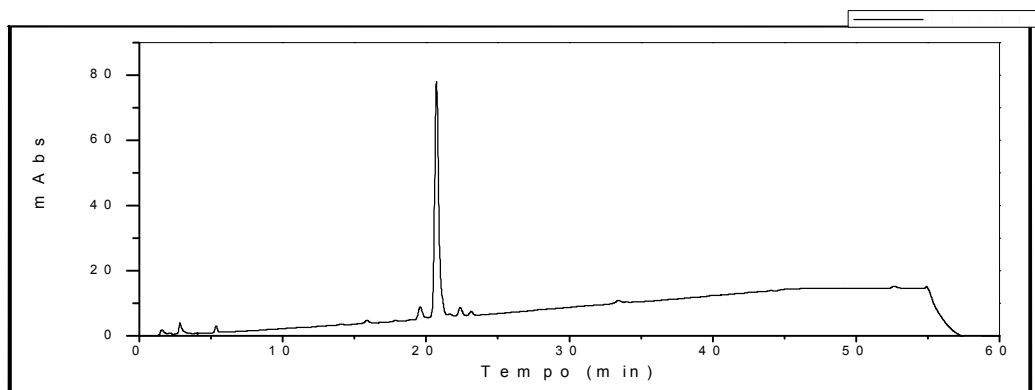


FIGURA 4.50- Cromatograma do padrão Ref 7-11 (SF6), isolado da fração acetato de etila proveniente da folhas de *C. sylvestris*. Condições: Coluna C18 Gemini Phenomenex® (150x4,6mm) acoplada com uma pré-coluna C18 (Phenomenex), eluição gradiente utilizando uma fase ternária de água:acetonitrila:metanol 34:44:22 até 0:53:47 (%v/v) respectivamente, vazão de 1ml.min<sup>-1</sup> e comprimento de onda de 220 nm.

A Ref 7-11 (SF6) teve sua identificação estrutural através de comparação com a literatura, conforme já demonstrado no item 4.2.7.1. A banda cromatográfica ilustrada na Figura 4.50 foi confirmada como referente à Ref 7-11 (SF6) através de análise por Cromatografia Líquida acoplada à um Espectrômetro de massas (CLAE-EM) utilizando-se de uma fonte *electrospray* no modo negativo, obtendo uma razão de massa igual a  $m/z$  681,5 [M-H]<sup>-</sup>, o que possibilitou a confirmação do íon molecular do referido composto, com fórmula molecular: C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>O<sub>10</sub>.

Utilizando-se o padrão de referência um método foi então validado a fim de determinar a quantidade desse marcador nos extratos ensaiados frente à *Luteibacter sp.* Após obtida a curva de padrão analítica, os extratos na concentração de 1mg.ml<sup>-1</sup> foram então injetados no equipamento utilizando-se do método desenvolvido. Na Figura 4.51 estão ilustrados os cromatogramas típicos de cada extrato com um destaque para o marcador de referência.

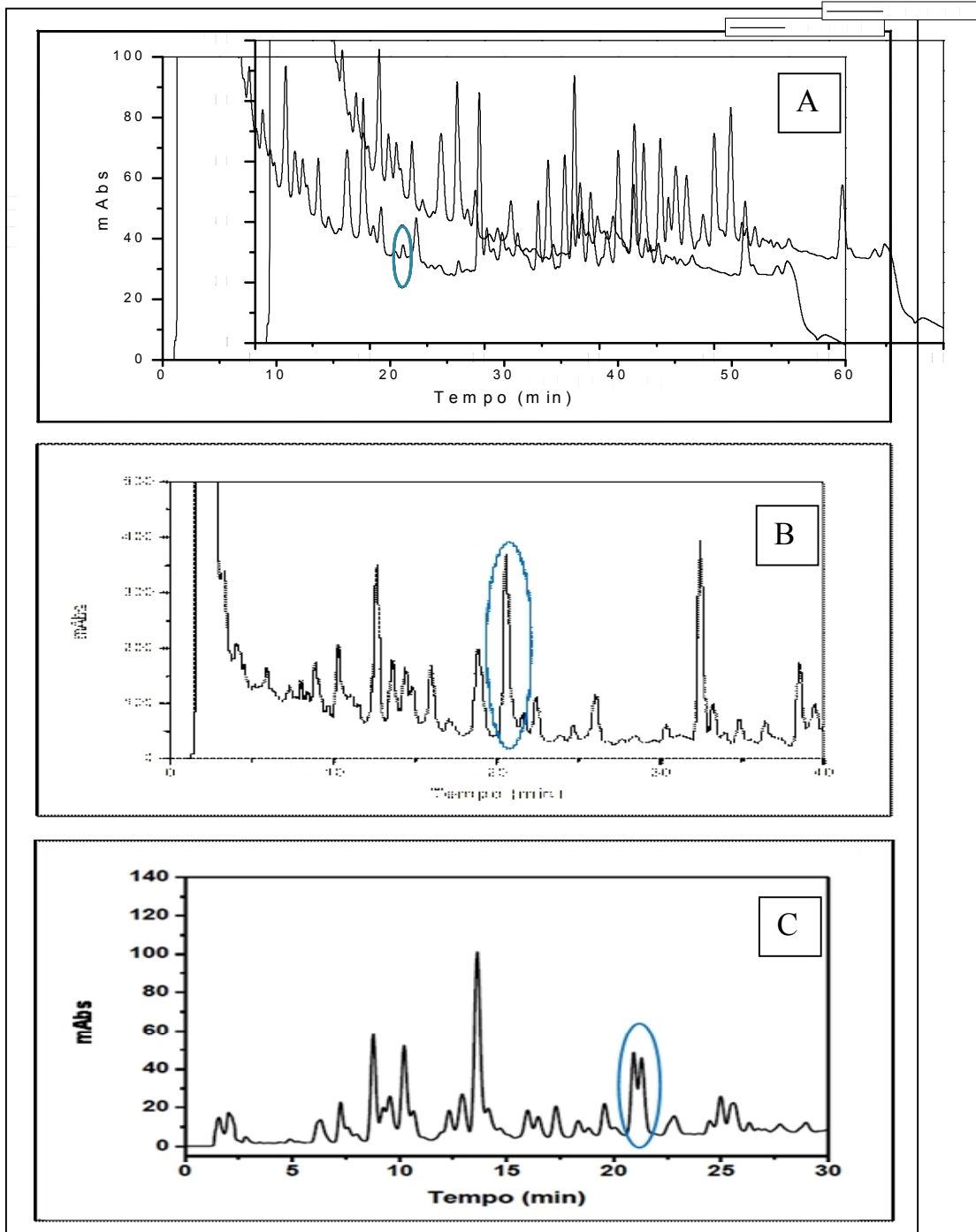


FIGURA 4.51-Cromatogramas dos extratos submetidos à ensaio de atividade antibacteriano. A) Extrato bruto das folhas de *C. sylvestris*. B) Fração acetato de etila de *C. sylvestris* e C) Extrato diterpênico das folhas de *C. sylvestris*. Condições de análise idênticas às especificações da Figura 4.50.

Pode-se observar que embora ensaiada, a fração metanólica não está representada na Figura 4.51. A mesma também foi submetida à análise cromatográfica nas mesmas condições dos demais, no entanto não foi detectado nenhuma banda cromatográfica referente ao marcador. Este resultado já era esperado, em função da diferença de polaridade do composto com a referida fração, portanto a sua elevada atividade certamente não advém de compostos diterpênicos e sim da elevada quantidade de taninos presentes na mesma.

Para os outros extratos foi possível a quantificação do composto padrão. O procedimento de quantificação se deu de forma a utilizar a área da banda cromatográfica referente ao padrão de referência e aplicar na equação de curva analítica obtida no método. Como observa-se na Figura 4.51, o pico referente ao marcador se encontra na faixa de 20,07 minutos. Na Tabela 4.14 estão demonstrados as quantidade detectadas do marcador em cada extrato.

TABELA 4.14- Quantidade do padrão de referência (Ref 7-11 (SF6)) determinada nos extratos provenientes de *C. sylvestris*.

Extrato vegetal (1mg.ml <sup>-1</sup> )	Massa do marcador de referência (µg. ml <sup>-1</sup> )
Extrato bruto	42,0
Fração acetato de etila	65,3
Extrato diterpênico	55,5
Equação da curva: $y=14095x+7813,3$ ; $r^2= 0,9996$	

Observa-se que o extrato no qual apresenta um maior teor desse marcador é o extrato acetato de etila. Embora o ExAcCs apresenta um maior teor desse diterpeno; este apresentou um percentual de inibição inferior tanto do extrato

diterpênico quanto do extrato bruto. Esse percentual pode estar ligado diretamente à perda de sinergismo do extrato quando submetido ao fracionamento, uma vez que tanto o extrato bruto quanto o diterpênico não passaram por fracionamentos.

Após determinar a quantidade do marcador de referência em cada extrato submetido à ensaio microbiano, foi possível calcular a quantidade do diterpeno nominalmente presente no ensaio. Sabendo-se que é inserido 100µl de extrato na concentração de 1000µg.ml<sup>-1</sup> nos poços da placa de ELISA® para um volume final de 200µl, a concentração então verdadeiramente submetida à ensaio é de 500µg.ml<sup>-1</sup>. Sendo assim, conhecendo-se a quantidade do diterpeno nos extratos e sua estrutura, foi possível então calcular a quantidade molar do mesmo em que foi inserido no ensaio. Na Tabela 4.15 estão demonstrados os valores obtidos do marcador nos ensaios antibacteriano relacionando com a porcentagem de inibição de cada extrato.

TABELA 4.15- Relação entre as concentrações molares do marcador nos extratos com a porcentagem de inibição frente à *Luteibacter sp.*

Extrato/Fração	Concentração molar do marcador (mM)	% de inibição
Diterpênico de <i>C. sylvestris</i>	0,203	60,2
Acetato de etila de <i>C. sylvestris</i>	0,240	50,2
Etanólico bruto de <i>C. sylvestris</i>	0,154	69,0

Relacionando a quantidade do marcador com porcentagem de inibição, nota-se que a embora o extrato etanólico possua a menor quantidade de marcador, este extrato possui a melhor atividade frente a *Luteibacter sp.*, resultado este indicando que o efeito de sinergismo prevalece.





## 5-CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento adotado e os meios de cultura utilizados possibilitaram o isolamento, purificação e cultivo em laboratório de 21 isolados bacterianos e 8 fúngicos, possíveis microrganismos endossimbiontes do inseto *D. speciosa*. Estes resultados podem contribuir para informações acerca do sistema microbiótico desse inseto e seu compostamento social.

Alguns destes microrganismos tiveram o perfil protéico analisado através da técnica de MALDI-TOF/MS (*fingerprint*). A análise estatística das réplicas dos espectros obtidos para cada microrganismos através do *software* Biotyper<sup>®</sup>, possibilitou o agrupamento dos microrganismos em seis grupos de isolados. A técnica se mostrou eficiente para este tipo de análise, uma vez que realizou uma correta separação entre fungos e bactérias.

Os resultados do MALDI foram condizentes com os dados obtidos por microbiologia clássica, tanto de formato celular quanto pelo teste de Gram dos isolados bacterianos (15 bactérias Gram negativas e 6 bactérias Gram positivas).

Através dos agrupamentos obtidos para bactérias, foi possível selecionar isolados de cada grupo para identificação por seqüenciamento de rDNA na região 16S. A técnica de sequenciamento mostrou-se eficiente na identificação das cepas, onde através do BLAST foi possível identificação das bactérias; *Pantoea agglomerans* (96% de identidade), *Luteibacter sp.* (95% de identidade), *Serratia marcescens* (95% de identidade), *Acidovorax temperans* (93% de identidade) e *Pseudomonas sp.* (84% de identidade). Nota-se que algumas a identificação foi possível apenas a nível de gênero, podendo portanto se tratarem de novas espécies do gênero.

Utilizando uma microbiologia clássica, através de comparações com a literatura de estruturas morfológicas de dois dos isolados fúngicos, foi possível atribuir a estes propostas quanto ao gênero. Sendo um pertencente ao gênero *Cladosporium sp.* e outro ao gênero *Penicillium sp.*

Após informações do perfil de desenvolvimento de um dos isolados bacterianos da larva, foi possível selecionar o melhor meio e o tempo ideal para a realização de bioensaios por microdiluição, uma vez que os resultados obtidos pelos ensaios por difusão em ágar não foram satisfatórios.

Assim, foi desenvolvida um método para ensaio quantitativo de inibição microbiana por microdiluição utilizando o corante resazurina como revelador. Para a obtenção de resposta quantitativa de inibição, foi então desenvolvida e validada uma metodologia através de medidas de fluorescência. A metodologia desenvolvida e validada mostrou-se linear na faixa de trabalho de concentração entre 0,010 e 0,195  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de resazurina ( $r^2 = 0,998$ ) e com limites de detecção e quantificação de 0,006 e 0,019  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente.

Validada e metodologia, esta foi então aplicada para a realização de bioensaio sobre a *Luteibacter sp.*, avaliando o potencial de inibição de extratos de plantas do cerrado. Os melhores resultados obtidos foram para os extratos de *C. sylvestris*, *Eugenia aurata*, *Psidium laruotteanum*, *Miconia ligustroides* e catequina com 69,0; 73,3; 84,3; 73,8; 88,7 % de inibição respectivamente. Diante desse resultado, propostas para a realização de futuros ensaios *in vivo* sobre as larvas e adulto de *D. speciosa*, comprovando possíveis indícios de relação simbiótica com a referida bactéria isolada da larva.

O estudo fitoquímico das folhas de *C. sylvestris* propiciou o isolamento e determinação de três metabólitos secundários de *C. sylvestris*, o flavonóide catequina, um sesquiterpeno tricíclico inédito na literatura e um

diterpeno clerodânico o qual foi utilizado como marcador de referência nos extratos de *C. sylvestris* submetidos à ensaio frente à *Luteibacter sp.*



## 6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALLAY, E., ORDENES, P., MARTENSSON, A., PERSSON, P. “Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines.” *Eur. J. Plant. Pathol.*, 135:137, 2013.
- AHMAD, N., ANSARI, M. S., HASAN, F. “Effects of neem based insecticides on *Plutella xylostella* (Linn.)” *Crop Protec.*, 34:18, 2012.
- AKHOUNDI, M., BAKHTIARI, R., GUILLARD, T., BAGHAEI, A., TOLOUEI, R., SERENO, D., TOUBAS, D., DEPAQUIT, J., ABYANEH, M. R. “Diversity of the Bacterial and Fungal Microflora from the Midgut and Cuticle of Phlebotomine Sand Flies Collected in North-Western Iran.” *PLoS ONE*, 7:1, 2012.
- ALMEIDA, A. “Antitumor and Anti-inflammatory Effects of Extract from *Casearia sylvestris*: Comparative Study with Piroxicam and Meloxicam.” Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999. Dissertação de Mestrado.
- ALVES, E.G., VINHOLIS, A.H.C., CASEMIRO, L.A., JACOMETTI, N.A., FURTADO, C., SILVA, M. L.A., CUNHA, W.R., MARTINS, C.H.G. “Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.” *Quim. Nova*, 31:1224, 2008.
- ARIMA, H.; DANNON, G. “Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.)” *Biosc., Biotechnol. Biochem.*, 66:7270, 2002.
- AZEVEDO, A. O.; CAMPOS, J. J.; GALDINO, G. S.; BRAGA, F. C.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C. “Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract.” *J. Ethnopharmacol.*, 113:354, 2007.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. “Drug discovery from medicinal plants.” *Life Sci.*, 78:431, 2005.

- BANDEIRA, G. N., CAMARA, C. A. G., MORAES, M. M., BARROS, R., MUHAMMAD, S., AKHTAR, Y. “Insecticidal activity of *Muntingia calabura* extracts against larvae and pupae of diamondback, *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae).” J. King Saud Univers. – Science, 25:83, 2013.
- BANDEIRA, K. F. Otimização e Comparação de Metodologias de Extração de Casearinas em *Casearia sylvestris*. Araraquara. Programa de Pós Graduação em Química, UNESP, 2004, Dissertação de Mestrado, 113p.
- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; AZZOLINI, C. “A pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract.” J. ethnopharm., 30:185, 1990.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; LAI, C.Y.; ROUHBAKHSH, D.; MORAN, N.A.; CLARK, M.A. “Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids.” Annu. Rev. Microbiol., 49:55, 1995.
- BERNAYS E.; LUPI A.; BETTOLO R. M.; MASTROFRANCESCO C.; TAGLIATESTA P. “Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol miconidin from *Miconia* spp.” Experientia, 40:1010, 1984.
- BOURSIER, C.M., BOSCO, D., COULIBALY ,A., NEGRE , M. “Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A?” Crop Protect., 30:318, 2011.
- CARLOS, I. Z.; LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO JR., C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. “Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune.” Rev. Bras. de Farmacog., 15:44, 2005.
- CARVALHO, J. E. “Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese.” Multi Ciência: Construindo a história dos produtos naturais, 7, 2006.

- CARVALHO, P.R.F., FURLAN, M., YOUNG, M.C.M., KINGSTON, D.G.I., BOLZANI, V.S. “Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*.” *Phytochem.*; 49:1659, 1998.
- CASSIANO, N. M., BARREIRO, J. C., MARTINS, L. R. R., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. “Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas.” *Quim. Nova*, 32:1021, 2009.
- CHELLEMI, D. “Adaptation of approaches to pest control in low-input agriculture.” *Crop Protect.*, 19: 855, 2000.
- COLL, M., GUERSHON, M. “Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets.” *Annu. Rev. Entomol.*, 47:269, 2002.
- CROOKS, P.A. “Chemical properties of nicotine and other tobacco-related compounds. In.: Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and their Metabolites.” Gorrod, J.W., Jacob III, P. Oxford: Elsevier, 69-147, 1999.
- CROUS, P.W., BRAUN, U., SCHUBERT, K., GROENEWALD, J.Z. “Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera.” *Studies in Mycol.*, 58: 33, 2007.
- DA SILVA, S. L., CHAAR, J. S., DAMICO, D. C. S., FIGUEIREDO, P. M. S., YANO, T. “Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from Leaves of *Casearia sylvestris*” *Pharm. Biol.*, 46:347, 2008.
- DALE, C., MORAN, N. A. “Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and their Hosts.” *Cell.*, 126:453, 2006.
- DECRISTOPHORIS, P., FASOLA, A., BENAGLI, C., TONOLLA, M., PETRINI, O. “Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS.” *System. Applied Microbiol.*, 34:45, 2011.

- DEMIREV, P.A.; FENSELAU, C. “Mass spectrometry in biodefense.” *J. Mass Spectrom.*, 43:1441, 2008.
- DENNO, R.F., FAGAN, W.F. “Might nitrogen limitation promote omnivory among carnivorous arthropods?” *Ecology*, 84:2522, 2003.
- DEVAPPA, R. K., ANGULO-ESCALANTE, M. A., MAKKAR, H. P.S., BECKER, K. “Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*.” *Ind. Crops Prod.*, 38:50, 2012.
- DOS SANTOS, J.E.; PAESE, A.; PIRES, J.S.R. “A Ecologia como Ferramenta para Integração Efetiva entre os Cursos de Graduação (Ciências Biológicas) e da Pós-Graduação (Ecologia e Recursos Naturais), UFSCar. São Carlos: PPG-ERN, 1996.
- DUARTE, M.C.T., “Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.” *MultiCiência*, 7:1, 2006.
- EIZAGUIRRE, M., XANXO, L., PONS, X. “Importance and control of soil pests in silage maize in the highlands of the Pyrenees, north-east Spain.” *Crop Protect.*, 24:549, 2005.
- ESTEVES, I.; SOUZA, I.R; RODRIGUES, M. “Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw.” *J. Ethnopharm.*, 101:191, 2005.
- FELDHAAR, H.; GROSS, R. “Insects as hosts for mutualistic bacteria.” *Int. J. Med. Microb.*, 299:1, 2009.
- FERREIRA, P.M.P. Determinação do Potencial Antitumoral de Diterpenos Isolados das Folhas de *Casearia sylvestris* Swarts. Pós Graduação Farmacologia, UFC, 2006. Dissertação de Mestrado, 116 p.



- FERREIRA, P.M.P., SANTOS, A.G., TININIS, A.G., COSTA, P.M., CAVALHEIRO, A.J., BOLZANI, V.S., MORAES, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V., MONTENEGRO, R.C., PESSO, A. C. “Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis.” *Chem Biol Interact.*, 188:497, 2010.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BAPTISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B., VENDRAMIN, J.D., MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S., OMOTO, C. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GARABAGI, F.; FRENCH, B.W.; SCHAAFSMA, A.W.; PAULS, K.P. “Increased expression of a cGMP-dependent protein kinase in rotationadapted western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* L.)” *Ins. Biochem. Molec. Biol.*, 38:697, 2008.
- GOTOH, T., NODA, H., ITO, S. “*Cardinium* symbionts cause cytoplasmic incompatibility in spider mites.” *Heredity*, 98:13, 2007.
- GRONDEAU, C., MANCEAU, C., SAMSON, R. “A semiselective medium for the isolation of *Acidovorax valerianellae* from soil and plant debris.” *Plant Pathol.*, 56:302–310, 2007.
- GUSMÃO, D. S., SANTOS, A. V., MARINI, D. C., RUSSO, E. S., PEIXOTO, A. M. D., JÚNIOR, M. B., BERBERT-MOLINA, M. A., LEMOS, F. J. A. “First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association.” *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102:919, 2007.
- HALL, J., MATOS, S., SILVESTRE, B., MARTIN, M. “Managing technological and social uncertainties of innovation: The evolution of Brazilian energy and agriculture.” *Technol. Forecast. Soc. Change.*, 78:1147, 2011.

- HARTHMANN, O. E. L., MÓGOR, A. F., WORDELL FILHO, J. A., LUZ, W. C.; BIASI, L. A. “Tratamento de sementes com rizobactérias na produção de cebola.” *Cienc. Rural*, 39:2533, 2009.
- HEIJTZ, R.D., WANG, S., ANUAR F., QIAN, Y., BJÖRKHOLM, B., SAMUELSSON, A., HIBBERD, M.L., FORSSBERG, H., PETTERSSON, S. “Normal gut microbiota modulates brain development and behavior.” *PNAS*, 108:3047, 2011.
- HENRY-SILVA, G.G., CAMARGO, A. F. M. “Interações ecológicas entre macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* e *Pistis stratiotes*.” *Hoehnea*, 32:445, 2005.
- HERTLEIN, M. B., THOMPSON, G. D., SUBRAMANYAM, B. , ATHANASSIOU, C. G. “Spinosad: A new natural product for stored grain protection.” *J. Stored Prod. Research*, 47:131, 2011.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A., WERREN, J. H. “How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data.” *FEMS Microbiol. Lett.*, 281:215, 2008.
- HINSE, D., VOLLMER, T., ERHARD, M., WELKER, M., MOORE, E.R.B., KLEESIEK, K., DREIER, J. “Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses.” *System. Applied Microbiol.*, 34:52, 2011.
- HIROSE, E., PANIZZI, A. R., DE SOUZA, J. T., CATTELAN, A. J., ALDRICH, J. R. “Bacteria in the gut of southern Green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae).” *Annals of the Entomological Society America*, Lanham, 99:91, 2006.
- HUNTER, M. S., PERLMAN, S. J., KELLY, S. E. “A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*.” *Proc. Roy. Soc. Lon. B.*, 270:2185, 2003.

- HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., NIGAM, P. S., SARKER, S. D., MOORE, J. E., RAO, J. R., MAZUMDAR, A. "Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth." LWT - Food Science Technol, 44:1199, 2011.
- IBGE, 2006. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Rio de Janeiro. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/english/geociencias/default\\_prod.shtm#TOPO](http://www.ibge.gov.br/english/geociencias/default_prod.shtm#TOPO). Acesso em 01/2013.
- International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- ITOKAWA, H. "Isolation of diterpenes as antitumor agents from plants." Patente Japão: Kokai Tokyo Koho-01; 149, 779: 6pp. 1989.
- ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., MORITA, H., TAKEYA, H., LITAKA, Y., SCHENKEL, E. P., MOTIDOME, M. "New antitumor principles, casearins A-F, for *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae)." Chem. Pharmacol. Bulletin, 38:3384, 1990.
- ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. "Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy." Chem. Pharm. Bull, 36:1585, 1988.
- JAMAL, C. M. "Estudo Fitoquímico de *Casearia sylvestris* Sw e *Abatia tomentosa* Mart. (Flacourtiaceae) – Análise de Derivados Fenólicos por CLAE." Programa de Pós Graduação em Química, UFMG, 2002, Tese de Doutorado. 187p.
- JOHANSEN, J.E., BINNERUP, S.J., KROER, N., MOLBAK, L. "*Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.)." Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 55:2285, 2005.

- KÄMPFER, P., LODDERS, N., FALSEN, E. “*Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from human blood, and reclassification of *Dyella yeojuensis* Kim *et al.* 2006 as *Luteibacter yeojuensis* comb. nov.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:2884, 2009.
- KIKUCHI, Y., HAYATSU, M., HOSOKAWA, T., NAGAYAMA, A., TAGO, K., FUKATSU, T. “Symbiont-mediated insecticide resistance.” *PNAS*, 109:8618, 2012.
- KITANO, H., ODA, K. “Self-extending symbiosis: a mechanism for increasing robustness through evolution.” *Biol. Theory*, 1:61, 2006.
- KLEPZIG, K. D., ADAMS, A. S., HANDELSMAN, J., RAFFA, K. F. “Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans.” *Environ. Entomol.*, 38:67, 2009.
- KONGKIATPAIBOON, S., GRITSANAPAN, W. “Optimized extraction for high yield of insecticidal didehydrostemofoline alkaloid in *Stemona collinsiae* root extracts.” *Ind. Crops Prod.*, 41:371, 2013.
- LIU, Y-Q., OHKOSHI, E., LI, L-H., YANG, L., LEE, K-H. “Design, synthesis and cytotoxic activity of novel spin-labeled rotenone derivatives.” *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, 22:920, 2012.
- LONDRES, F., *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. 1ª Ed. Rio de Janeiro, AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, p. 17.
- LUO, S-H., HUA, J., NIU, X-M., LIU, Y., LI, C-H, ZHOU, Y-Y, JING, S-X, ZHAO, X., LI, S-H. “Defense sesterterpenoid lactones from *Leucoscepttrum canum*.” *Phytochem.*, 86:29, 2013.

- MARQUES, G.B.C.; ÁVILA, C.J.; PARRA, R.P.P.; POSTALI, R.; “Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho”. Pesq. Agropec. Bras., 34:1983, 1999.
- MARQUETE, R., Reserva ecológica do IBGE (Brasília-DF): Flacourtiaceae. Rodriguésia, 52:5, 2001.
- MARTINS, C., SOUZA, R. F., BUENO, O. C. “Presence and distribution of the endosymbiont Wolbachia among Solenopsis spp. (Hymenoptera: Formicidae) from Brazil and its evolutionary history.” J. Inverteb. Pathol., 109:287, 2012.
- MIGLIORINI, P; LUTINSKI, J. A.; GARCIA, F. R. M. “Eficiência de extratos vegetais no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório.” Biotemas, 23:83 2010.
- MILANEZ, L.M., PARRA, J.R.P. “Preferência de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) para Oviposição em Diferentes Tipos e Umidade de Solos.” An. Soc. Entomol. Brasil., 29:155, 2000.
- MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W.; DA SILVA, G. A.; CARDOZO, A. M.; SANTOS, A. R. S. “Antinociceptive Effects of a Chloroform Extract and the Alkaloid Dicentrine Isolated from Fruits of *Ocotea puberula*.” Planta Medica, 78:1543, 2012.
- MORAN, N. A., MCCUTCHEON, J. P., NAKABACHI, A. “Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts.” Annu. Rev. Genet., 42:165, 2008.
- MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. “Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw.” Chem. Pharm. Bull., 39:693, 1991.
- MORÓN, M.A. Insetos de solo. In: Pragas de solo no Brasil. Salvadori, J.R., Ávila, C.J., Da Silva, M.T.B. (Eds.). Dourados: Embrapa Trigo, 2004.

- MOSADDIK, M. A., FORSTER, P. I., BOOTH, R., WATERMAN, P. G. "Clerodane diterpenes from the stems of *Casearia grewiifolia* var. *gelonioides* (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*)." *Biochem. Syst. Ecol.*, 35:631, 2007.
- MYERS, O.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. "Biodiversity hotspots for conservation priorities." *Nature*, 403:853, 2000.
- MYTILINAIOS, I., SALIH, M., SCHOFIELD, H.K., LAMBERT, R.J.W. "Growth curve prediction from optical density data." *Int. J. Food Microb.*, 154:169, 2012.
- NCCLS. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. 15º Suplemento Informativo. ANVISA: M100-S15, 25(1), 2005.
- OBERLIES, N.H., BURGESS, J.P., NAVARRO, H.A., PINOS, R.E., FAIRCHILD, C.R., PETERSON, R.W., SOEJARTO, D.D., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D., WANI, M.C., WALL, M.E. "Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*." *J. Nat. Prod.*, 65:95-99, 2002.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. "Avaliação da Periculosidade Ambiental de Bioinseticidas como uma Nova Perspectiva para a Ecotoxicologia no Brasil." *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, 3:1, 2008.
- OLIVER, K. M., RUSSEL, J. A., MORAN, N. A., HUNTER, M. S. "Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:1803, 2003.
- OVERY, D. P., FRISVAD, J. C. "New *Penicillium* Species Associated with Bulbs and Root Vegetables." *System. Appl. Microbiol.*, 26:631, 2003.
- PARECER, S., AHMADJIAN, V. "Symbioses: an introduction to biological associations." Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000.

- PAVELA, R. "Efficacy of naphthoquinones as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L." *Indust. Crops Prod.*, 43:745, 2013.
- PAVELA, R. "Insecticidal activity of certain medicinal plants." *Fitoterapia*, 75:745, 2004.
- PAVELA, R., SAJFRTOVÁ, M., SOVOVÁ, H., BÁRNET, M., KARBAN, J. "The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation." *Ind. Crops Prod.*, 31:449, 2010.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. *Introdução à Espectroscopia*. Editora Cengage Learning, 4ª Edição, 227 p., 2010.
- PEREIRA, T.; VENTURA, M.U.; MARQUES, F.A. "Comportamento de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em resposta ao CO<sub>2</sub> e plântulas de espécies cultivadas." *Ciênc. Rur.*, 35:981, 2005.
- PERLAMN, S. J., MAGNUS, S.A., COPLEY, C. R. "Pervasive associations between *Cybaeus* spiders and the bacterial symbiont *Cardinium*." *J. Inverteb. Pathol.*, 103:150, 2010.
- PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. A. "Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas." *Quim. Nova*, 25: 45, 2002.
- PRABU, G.R.; GNANAMANI, A.; SADULLA, S. "Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*." *J. Applied Microbiol.*, 101: 487, 2006.
- RADA, N. "Assessing Brazil's Cerrado agricultural miracle." *Food Pol.*, 38:146, 2013.

- RIO, R. V., LEFEVRE, C., HEDDI, A., AKSOY, S. “Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition.” *Applied Environm. Microbiol.*, 69:6825, 2003.
- RODRIGUES J.; RINALDO D.; DOS SANTOS L. C.; VILEGAS W. “An unusual C6–C6 linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae).” *Phytochem.*, 68:1781, 2007.
- ROS, V. L.D., BREEUWER, J. A. J. “The effects of, and interactions between, *Cardinium* and *Wolbachia* in the doubly infected spider mite *Bryobia sarothamni*.” *Heredity*, 102:413, 2009.
- SABANDAR, W. C., AHMAT, N, JAAFAR, F. M., SAHIDIN, I. “Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review.” *Phytochem.*, 85:7, 2013.
- SAIDA, H., MAEKAWA, T., SATAKE, T., HIGASHI, Y., SEKI, H. “Gram stain index of a natural bacterial community at a nutrient gradient in the freshwater environment.” *Environm. Pollut.*, 109:293, 2000.
- SANTOS, A. G. Desenvolvimento de Metodologia para a Análise de Variabilidade Intraespecífica e Dinâmica de Casearinas em *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). Araraquara, Programa de Pós Graduação em Química,UNESP, 2001, Dissertação de Mestrado, 120p.
- SANTOS, A. G., PEREZ, C. C., TININIS, A. G., BOLZANI, V. S., CAVALHEIRO, A. J. “Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris swartz*.” *Quim. Nova*, 30:1103, 2007.
- SANTOS, A.G. “Identificação dos Princípios Ativos Antiulcerogênicos das Folhas de *Casearia sylvestris*: Contribuição para o Desenvolvimento de um Fitoterápico.” Araraquara, Programa de Pós Graduação em Química,UNESP, 2008. Tese de doutorado, 174p.



- SANTOS, A.G., FERREIRA, P.M.P., VIEIRA JÚNIOR, G.M., PEREZ, C.C., TININIS, A.G., SILVA, G.H., BOLZANI, V.S., COSTA-LOTUFO, L.V., PESSOA, C DO Ó, CAVALHEIRO, A. J. “Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells.” *Chem Biodiversity*; 7:205, 2010.
- SANTOS, A.G., PEREZ, C.C., TININIS, A.G., BOLZANI, V.S., CAVALHEIRO, A.J. “Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz.” *Quím Nova*; 30:1100, 2007.
- SAPPINGTON, T.W.; SIEGFRIED, B.D.; GUILLEMAUD, T. “Coordinated diabrotica genetics research: accelerating progress on an urgent insect pest problem.” *Am. Entomol.*, 52:90, 2006.
- SARKER, S. D., NAHAR, L., KUMARASAMY, Y. “Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals.” *Methods*, 42:321, 2007.
- SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; KOSTRZEWA, M.; GEIDER, K. “Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis.” *PLoS ONE*, 3:1, 2008.
- SCARBOROUGH, C.L.; FERRARI, J.; GODFRAY, H.C.J. “Aphid protected from pathogen by endosymbiont.” *Science*, 310:1781,2005.
- SOARES, M. L.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D.; FIGUEIREDO, A. D. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. “Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae).” *Rev. Bras. de Farmacog.*, 15:352, 2005.

- TAMAS, I., KLASSON, L., CANBACK, B., NASLUND, A. K., ERIKSSON, A. S., WERNEGREN, J. J., SANDSTROM, J. P., MORAN, N. A., ANDERSSON, S. G. E. "50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria." *Science*, 296:2376, 2002.
- TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. "Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW." *Rev. Bras. de Plant. Medic.*, 8:132, 2006.
- TOMÉ, H.V.V. , MARTINS, J.C. , CORRÊA, A.S. , GALDINO, T.V.S. , PICANÇO, M.C. , GUEDES, R.N.C. " Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*." *Crop Protec.*, 46:63, 2013.
- VALVERDE, S. R., MAFRA, J. W. A., MIRANDA, M. A., SOUZA, C. S., VASCONCELOS, D. C., *Silvicultura brasileira - oportunidades e desafios da economia verde*. Disponível em <http://fbds.org.br/fbds/IMG/pdf/doc-549.pdf>, acesso em Janeiro de 2013.
- VAN DER HEUVEL, J.F.J.M., HOGENHOUT, S.A., VERBEEK, M., VAN DER WILK, F. "*Azadirachta indica* metabolites interfere with the host-endosymbiont relationship and inhibit the transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*". *Entomol Exp Appl.*, 86:253, 1998.
- VIEGAS JÚNIOR, C. "Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos." *Quim. Nova*, 26:390, 2003.
- VISÔTTO, L. V., OLIVEIRA, M. G. A., GUEDES, R. N. C., RIBON, A. O. B., GOOD-GOD, P. I. V. "Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*." *J. Insect Physiol.*, 55:185, 2009.
- WANG, W., ALI, Z., LI, X., SMILLIE, T. A., GUO, D., KHAN I. A. "New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*." *Fitoterapia*, 80:404, 2009.

WERLE, A. L. B., ZANETTI, G. D., CERON, C. S., MANFRON, M. P. “Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicérides em ratos.” Rev. Bras. Farmacogn., 19:400, 2009.

WERREN, J. H., BALDO, L., CLARK, M. E. “*Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology.” Nat. Rev. Microbiol., 6:741, 2008.

WERREN, J.H. “Symbionts provide pesticide detoxification.” PNAS, 109: 8364, 2012.

WHITSON, E. L., THOMAS, C. L., HENRICH, C. J., SAYERS, T. J., MCMAHON, J. B., MCKEE, T. C. “Clerodane Diterpenes from *Casearia arguta* That Act As Synergistic TRAIL Sensitizers.” J. Nat. Prod., 73:2013, 2010.

ZARBIN, P. H. G., RODRIGUES, M. A. C. M. “Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil.” Quim. Nova, 32:722, 2009.