

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas
por endofítico isolado de *Prunus* spp.

Nadja Fernanda Gonzaga Serrano

São Carlos

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas
por endofítico isolado de *Prunus* spp.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia

Orientada: Nadja Fernanda Gonzaga Serrano
Orientadores: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

São Carlos

2009

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

S487pc

Serrano, Nadja Fernanda Gonzaga.
Purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas por endofítico isolado de *Prunus* spp. / Nadja Fernanda Gonzaga Serrano. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
49 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biotecnologia. 2. Microorganismos endofíticos. 3. Micromoléculas bioativas. 4. Cerrado. 5. Produtos biotecnológicos - purificação. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

NADJA FERNANDA GONZAGA SERRANO

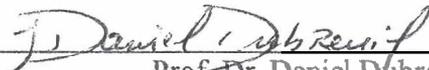
Dissertação de **Mestrado** submetida
h **Coordenação** do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial **para**
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 13/03/2009

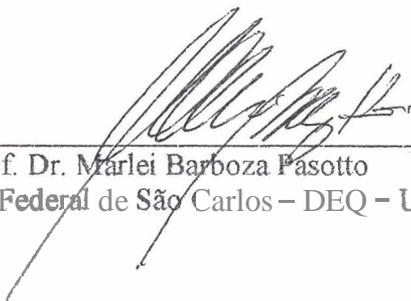
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. **Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)**
Universidade Federal de São Carlos – DEQ/UFSCar



Prof. Dr. **Daniel Dubreuil**
Universidade de Montreal - Canadá



Prof. Dr. **Marlei Barboza Pasotto**
Universidade **Federal** de São Carlos – DEQ – UFSCar

Prof. Dr. **Alberto Colli Badino Junior**
Universidade Federal de São **Carlos** – DEQ – UFSCar

Prof. Dr. **Carlos Osamu Hokka**
Universidade Federal de São **Carlos** – DEQ – UFSCar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha existência.

Aos meus pais, Rosa e José, devido ao carinho e confiança durante toda minha vida e formação acadêmica.

Ao meu filho Eric, lindo e maravilhoso, que acompanha meu trabalho desde muito pequeno e demonstra admiração pelos microrganismos.

Ao meu irmão Igor, que, além de ser uma pessoa que amo muito, sempre me ajuda nos recursos computacionais.

Ao meu namorado Dinho, pela pessoa especial que representa para mim e pela constante demonstração de interesse em nossas conversas microbiológicas.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa pelos seis anos de trabalho conjuntos, nos quais foi possível estabelecer grande vínculo de afeto e admiração por esta docente exemplar. Obrigada por ser minha orientadora!

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, pelos ensinamentos transmitidos e entusiasmo ao discutir isolamento de microrganismos endofíticos.

Ao *Paenibacillus polymyxa* RNC-D, pelo árduo trabalho desenvolvido na produção de moléculas bioativas.

As minhas colegas de laboratório Regiane e Nina, pelas coletas de plantas, momentos de convivência e constante colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Prof. Dr. Daniel Dubreuil, pela parceria para o desenvolvimento de importantes etapas deste projeto, bem como pelas conversas agradáveis e muita paciência na sala de HPLC! Obrigada Santo Expedito....

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

DEDICATÓRIA

Ao universo microbiano no qual estamos inseridos; sem esta espetacular existência, este trabalho, assim como muitos outros, não seria possível.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Necessidade de novos compostos bioativos.....	1
1.2. Microrganismos endofíticos.....	2
1.3. Vegetação de Cerrado.....	4
2. OBJETIVOS	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Isolamento de microrganismos endofíticos.....	7
3.2. Caracterização fenotípica e bioquímica dos endofíticos isolados.....	7
3.3. Identificação genotípica.....	8
3.4. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana.....	9
3.5. Microrganismos, meios e condições de cultivo.....	9
3.6. Produção do extrato bruto.....	10
3.7. Cinética de crescimento do endofítico.....	10
3.8. Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana	11
3.9. Tratamentos térmico, enzimático e de variação no pH.....	11

3.10. Estimativa da massa molar das substâncias antimicrobianas.....	12
3.11. Separação e purificação por HPLC.....	12
3.12. Espectrometria de massa.....	15
3.12.1. Sistema de HPLC	15
3.12.2. Condições cromatográficas.....	15
3.12.3. Condições de espectrometria de massa	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Isolamento e identificação de endofítico produtor de substâncias bioativas.....	17
4.2. Caracterização do potencial antagônico de <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	20
4.3. Cinética de crescimento e quantificação da atividade antimicrobiana do extrato produzido por <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	21
4.4. Estabilidade térmica, enzimática, de variação no pH do extrato e estimativa da massa molar das substâncias bioativas.....	23
4.5. Separação e purificação das moléculas bioativas contidas no extrato produzido por <i>P. polymyxa</i> RNC-D.....	27
4.6. Espectrometria de massa	29
5. CONCLUSÕES.....	39
6. AGRADECIMENTOS.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AP: ágar peptona

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion* (Caldo Infusão Cérebro Coração)

E. coli: *Escherichia coli*

ESI+: *Electrospray ionization in ion-positive mode* (ionização por *spray* de elétrons em modo íon-positivo)

HCl: Ácido clorídrico

HPLC: *High Liquid Performance Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

ISP: *International Streptomyces Project*

LC: *Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida)

MS: *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa)

NaOH: Hidróxido de sódio

P. polymyxa: *Paenibacillus polymyxa*

rpm: rotações por minuto

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

TRIS: Tampão tris-hidroximetil-aminometano, cuja fórmula é $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

TSB: *Tryptic Soya Broth*

UA.mL⁻¹: Unidades Arbitrárias por mL

YE: ágar extrato de levedura

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicação de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto produzido por *P. polymyxa* RNC-D e efeitos na atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Pág. 24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da seqüência utilizada para purificação das substâncias antimicrobianas contidas no extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D. Pág. 14
- Figura 2.** Microrganismo isolado de *Cassia leptophylla* apresentando atividade inibitória negativa contra *S. aureus* em ágar peptona e ágar extrato de levedura. Pág. 17
- Figura 3.** Microrganismo isolado de folhas de *Prunus* spp. apresentando bioatividade contra *S. aureus* quando cultivado em ágar peptona. Pág. 18
- Figura 4.** Microrganismo isolado de folhas de *Prunus* spp. apresentando bioatividade contra *S. aureus* quando cultivado em ágar extrato de levedura. Pág. 18
- Figura 5.** Diferentes aspectos morfológicos do endofítico isolado de *Prunus* spp. quando cultivado nos ágares AP e YE. Pág. 19
- Figura 6.** Cinética de crescimento de *P. polymyxa* RNC-D e bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus*. Pág. 22
- Figura 7.** Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *E. coli*. Pág. 26
- Figura 8.** Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *S. aureus*. Pág. 26
- Figura 9.** Perfil de separação por HPLC do extrato concentrado produzido por *P. polymyxa* RNC-D. Pág. 28
- Figura 10.** Fração eluída em HPLC a 22% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl. Pág. 29

Figura 11. Fração eluída em HPLC a 24% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 30

Figura 12. Fração eluída em HPLC a 28% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 32

Figura 13. Fração eluída em HPLC a 29% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 33

Figura 14. Fração eluída em HPLC a 33% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 34

Figura 15. Bioensaio utilizando solução de Sulfato de Polimixina E (1 µg/mL) contra *S.*

aureus.

Pág. 35

Figura 16: Fração eluída em HPLC a 36% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 36

Figura 17: Fração eluída em HPLC a 40% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 37

Figura 18: Fração eluída em HPLC a 46% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl.

Pág. 38

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Estudos bioprospectivos de microrganismos endofíticos para aplicações biotecnológicas são fundamentais na descoberta de novas substâncias, as quais podem ser utilizadas em diferentes áreas. Por habitarem nichos biológicos únicos, endófitos representam excelente fonte de produtos naturais bioativos com estrutura química e atividade biológica diversas. Um microrganismo endofítico, isolado de folhas de *Prunus* spp. (Cerrado de São Carlos – SP, Brasil), apresentou potencial antagonico contra importante patógeno em saúde pública. O endofítico foi identificado fenotípica e genotipicamente como *Paenibacillus polymyxa* e denominado RNC-D. O extrato bruto fresco apresentou potencial antagonico máximo de 800 UA.mL⁻¹ contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 horas da cultura) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (120 horas da cultura). As substâncias bioativas contidas no extrato mantiveram a bioatividade após tratamento enzimático utilizando proteases e lipase. O extrato concentrado manteve-se biologicamente ativo quando exposto a temperaturas elevadas (100 e 121°C) e baixas temperaturas (-20 e -80 °C); da mesma maneira, a bioatividade do extrato não foi alterada em valores de pH entre 2,0 e 9,0, contra ambos os microrganismos testados. A massa molar das substâncias bioativas contra *E. coli* foi estimada por ultrafiltração como menor que 1 kDa, enquanto que, para *S. aureus*, a estimativa da massa dos compostos foi maior que 1 e menor que 2 kDa. Através de técnica cromatográfica (HPLC) foi possível a separação das substâncias bioativas contidas no extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D. Três novas moléculas, com massas molares de 403, 420 e 425 Da foram identificadas por LC-MS em pico bioativo (eluído em HPLC a 22% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl) contra *E. coli*. O estudo prosseguirá na determinação do espectro antimicrobiano das novas substâncias bioativas purificadas, bem como na avaliação de possíveis áreas de aplicação.

Palavras-chave: microrganismos endofíticos, Cerrado, *Prunus* spp., potencial antagonico, substâncias bioativas, purificação em HPLC.

ABSTRACT

Bioprospective studies of endophytic microorganisms for biotechnological applications are essential to discover new substances, which can be used in different areas. Endophytes represent an excellent source of bioactive natural products with chemical structure and biological activities diverse. An endophytic microorganism, isolated from leaves of *Prunus* spp. (Cerrado of Sao Carlos, SP, Brazil), showed antagonistic potential against an important pathogen in Public Health. The endophytic microorganism was phenotypic and genetic identified like a *Paenibacillus polymyxa* and it was given the strain designation RNC-D. The fresh brut extract showed maximum antimicrobial potency of 800 AU.mL⁻¹ against *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 hours of culture) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (120 hours of culture). The bioactive substances contained on extract kept bioactivity after enzymatic assay with proteases and lipase, pH variation from 2.0 to 9.0, thermic treatment using low (-80, -20 °C) and high temperatures (100, 121 °C) against both microorganisms tested. The molecular weight of bioactive substances against *E. coli* was estimated by ultrafiltration as smaller than 1 kDa, while the bioactive compounds against *S. aureus* have the molecular weight between 1 and 2 kDa. It was possible to separate the bioactive substances contained in the extract produced by *P. polymyxa* RNC-D using chromatographic technique (HPLC). Three new molecules, with molecular weight 403, 420 and 425 Da were identified in bioactive peak (eluted in 22% of solution 20 mM TRIS + 1 M NaCl) against *E. coli* using LC-MS. This research will be continued to determine the antimicrobial spectrum of the purified molecules, as well as to evaluate the potential application areas.

Key – words: endophytic microorganisms, Cerrado, *Prunus* spp., antagonistic potential, bioactive substances, purification with HPLC.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Necessidade de novos compostos bioativos

A necessidade da descoberta e utilização de compostos que proporcionem qualidade de vida em vários aspectos da condição humana é preponderante. A resistência bacteriana à drogas e o aumento da incidência de doenças de origem microbiana enfatizam a necessidade da investigação e detecção de novos compostos bioativos.

O uso de novas drogas antimicrobianas efetivas tem sido incitado pelo aumento na prevalência de bactérias resistentes a antibióticos. Um importante exemplo é a elevada incidência de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), as quais representam até 45% das espécies de *S. aureus* isoladas de infecções nosocomiais distribuídas mundialmente (Emori e Gaynes, 1993).

Estudos envolvendo microrganismos produtores de moléculas biologicamente ativas são essenciais para o isolamento de novos compostos. De acordo com Homma e Suzui (1989), antibióticos elaborados por microrganismos desempenham um importante papel na supressão de patógenos.

O mundo microbiano possui uma ampla diversidade. Há uma estimativa de que menos de 1% das espécies bacterianas e menos de 5% das espécies fúngicas sejam conhecidas, sugerindo que milhões de espécies microbianas ainda não foram descobertas (Gunatilaka, 2006).

Diferentes habitats microbianos precisam ser examinados no *screening* de cepas potencialmente produtoras de moléculas que apresentem bioatividade. Microrganismos endofíticos exploram um habitat não usual – tecidos internos de plantas – o que pode

torná-los aptos a possuírem potencial para a produção de compostos bioativos similares aos produzidos por seus hospedeiros. Endofíticos têm atraído a atenção na busca por novos compostos naturais bioativos que podem ser usados no design de novas drogas substituindo as atualmente utilizadas, as quais cepas patogênicas têm adquirido resistência rapidamente (Blackwell, 2000).

Estudos bioprospectivos de microrganismos endofíticos são fundamentais para a descoberta de novas substâncias usadas na terapêutica humana, incluindo antibióticos, antimaláricos, anticarcinogênicos (Strobel e Long, 1998; Strobel, 2002; Strobel e Daisy, 2003), antifúngicos, dentre outros.

1.2. Microrganismos endofíticos

A evidência de microrganismos associados a plantas, descobertos em tecidos fossilizados de caules e folhas, revelou que associações hospedeiro-endófitos podem ter evoluído desde o período em que plantas superiores apareceram na Terra (Strobel, 2003).

Endofíticos podem ser definidos como quaisquer microrganismos que, pelo menos em uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes à planta hospedeira (Hallmann *et al.*, 1999).

Segundo Hallmann *et al.* (1997), microrganismos associados a plantas podem permanecer localizados em certo ponto ou se espalharem no interior de seu hospedeiro. Estes microrganismos podem residir no interior das células vegetais (Jacobs *et al.*, 1985), no espaço intercelular (Patriquin *et al.*, 1978) ou no sistema vascular (Bell *et al.*, 1995).

De acordo com Clay (1992), microrganismos endofíticos são importantes componentes da diversidade microbiana, devido ao fato de que numerosas novas espécies podem existir no interior das plantas.

Endofíticos constituem-se em importante reserva de diversidade genética sendo, portanto, fonte para a descoberta de novas moléculas bioativas com amplo espectro de bioatividade (Tan e Zou, 2001; Strobel *et al.*, 2004).

Microrganismos associados a plantas desenvolveram a habilidade bioquímica para produzir compostos similares ou idênticos aqueles produzidos por suas plantas hospedeiras como um resultado de recombinação genética durante o processo evolucionário (Gunatilaka, 2006).

Pesquisas recentes (Cao *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2002; Coombs e Franco, 2003) têm demonstrado como endofíticos podem habitar em hospedeiros vegetais sem causar danos, e por sua vez produzirem metabólitos secundários bioativos, os quais conduzem a um aumento na resistência do hospedeiro contra *stress* e infecções patogênicas.

Por habitarem nichos biológicos únicos, endófitos representam excelente fonte de produtos naturais bioativos. Segundo Strobel (2003), estes microrganismos aumentam a resistência da planta hospedeira contra adversidades através da secreção de metabólitos secundários, numa perspectiva co-evolucionária.

De acordo com Hallmann *et al.* (1997), endófitos podem ser isolados de plantas cuja superfície foi esterilizada ou podem ser extraídos de tecidos internos. Uma grande variedade de espécies bacterianas pode ser isolada a partir de uma única planta (Kobayashi e Palumbo, 2000).

Enquanto processos de síntese combinatória, endofíticos produzem metabólitos secundários bioativos definidos como compostos de baixo peso molecular, que não são

requeridos para crescimento em cultura pura, mas produzidos como um mecanismo de adaptação, exercendo funções específicas na natureza (Demain, 1981).

Neste sentido, Schutz (2001) sugere que organismos e seus biótipos que estão em constantes interações metabólicas e ambientais devem, provavelmente, expressar maior produção de metabólitos secundários bioativos.

Alguns metabólitos microbianos parecem ser característicos de certos biótopos, tanto em nível do organismo quanto do ambiente (Shutz, 2001). Sendo assim, a pesquisa por novos metabólitos secundários deve-se focalizar em organismos que habitam biótopos ímpares.

1.3. Vegetação de Cerrado

Savanas brasileiras, conhecidas como Cerrado, são caracterizadas por ampla variedade vegetal. O Bioma do Cerrado ocupava, originalmente, 23% da área territorial brasileira (Ratter *et al.*, 1997), cobrindo a Planície Central e abrangendo diversas espécies fisionômicas, desde pastagens com árvores de pequeno porte, até florestas onde a maioria das fitoespécies representam a definição de Savana Tropical (Sarmiento, 1983), caracterizada por vegetação densa em biomassa (Oliveira-Filho e Ratter, 2002).

Atualmente, a vegetação de Savana ocupa cerca de 350.000 km², a qual representa apenas 20% de uma área original de 1.783.169 km². Este é o segundo maior ecossistema do Brasil, sendo apenas menor que a Amazônia (Eiten, 1972). O Cerrado brasileiro é caracterizado por um clima sazonal, cuja precipitação anual varia de 1200 a 1800 mm, e uma estação seca que ocorre durante 5 a 6 meses por ano (Adámoli *et al.* 1985).

Segundo Ratter *et al.* (1997), o bioma do Cerrado é uma das mais ricas savanas do mundo, comportando imensa diversidade de fauna e flora. O endemismo de plantas é bastante elevado, estimado em mais de 4.400 espécies de plantas superiores, o que posiciona o Cerrado Brasileiro entre os 25 *hotspots* globais de conservação da biodiversidade (Mayers *et al.*, 2000).

Embora nas últimas décadas (Ratter, 1996), tenha havido um crescente interesse no estudo do Cerrado Brasileiro, baseado no fato de que ele é um centro único e extremamente rico em biodiversidade, o conhecimento biológico do Cerrado é, ainda, incompleto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar endofítico(s) de plantas do Cerrado (*Prunus* spp. e *Cassia leptophylla*) da região de São Carlos, SP, e realizar a purificação e caracterização bioquímica de substâncias bioativas produzidas pelas cepas isoladas.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar microrganismos endofíticos a partir das plantas *Prunus* spp. e *Cassia leptophylla*, vegetação de Cerrado da região de São Carlos – SP;
- Avaliar o antagonismo do(s) isolado(s) contra bactérias patogênicas;
- Realizar a identificação fenotípica e genotípica das cepas isoladas que apresentarem potencial antagônico;
- Cultivar o endofítico e avaliar a bioatividade do extrato contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- Caracterizar bioquimicamente o extrato produzido pelo endofítico;
- Purificar os compostos bioativos contidos no extrato através de HPLC;
- Determinar a massa molar das substâncias purificadas em HPLC por análise de LC-MS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento de microrganismos endofíticos

Foram coletadas folhas e caules de *Prunus* spp. e *Cassia leptophylla* em área com vegetação de Cerrado na cidade de São Carlos – SP, Brasil. As amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas ao Laboratório de Ensino, Pesquisa e Diagnóstico em Microbiologia (Universidade Federal de São Carlos) para processamento, em um intervalo máximo de duas horas. Para eliminação de microrganismos epifíticos foi realizada desinfecção de superfície, com imersão sequencial das folhas e caules em etanol 70% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio 2% por 6 minutos, etanol 70% por 30 segundos e, finalmente, enxágüe em água destilada esterilizada (Pereira *et al.*, 1996). As folhas e caules foram cortados assepticamente em pequenos pedaços (0,5 - 0,7cm), e inoculados na superfície do ágar peptona (AP) e ágar extrato de levedura (YE); as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 4 dias. Paralelamente outros pedaços foram homogeneizados em água peptonada 0,1% e diluições decimais seriadas (10^{-1} – 10^{-5}) foram plaqueadas em AP e YE e incubados sob as mesmas condições (Shirling e Gottlieb, 1966).

3.2. Caracterização fenotípica e bioquímica dos endofíticos isolados

Colônias isoladas nos ágares AP e YE foram avaliadas quanto às características morfológicas e culturais, sendo posteriormente submetidas às seguintes caracterizações

bioquímicas: coloração de Gram e Ziehl-Neelsen, produção de melanina e atividade de catalase.

3.3. Identificação genotípica

O endofítico selecionado foi identificado pelo método de amplificação e seqüenciamento do RNA ribossomal 16S. A extração de DNA genômico total do isolado bacteriano foi realizada utilizando o mini kit QIAamp DNA (Qiagen). 5µL da amostra contendo DNA modelo foi adicionada a 15µL da mistura reacional (Qiagen Fast Cycling PCR Kit). Os *primers* usados na reação foram 27F 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3' e 519R 5' - GWA TTA CCG CGG CKG CTG – 3'.

Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando o kit comercial QIAquick PCR *purification* (Qiagen). Ambos os produtos de PCR purificados foram seqüenciados usando os mesmos *primers* com métodos de seqüenciamento padronizados (FMV Sequencing Laboratory, Bigdye terminator version 3.1, sequencer: AB1 310; Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

As seqüências foram comparadas no NCBI GenBank usando-se como ferramenta o BLAST (National Center for Biotechnology Information - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Esta avaliação foi realizada pelo INRS – Institut Armand Frappier (Laval, Quebec, Canadá).

3.4. Avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana

O teste da sobrecamada (*Overlay Assay*) foi utilizado como bioensaio qualitativo para detectar a produção de compostos bioativos (Rosado e Seldin, 1993). Duas a três colônias do microrganismo endofítico foram diluídas em água peptonada 0,1% e cinco alíquotas de 20 µL foram transferidas para a superfície de placas contendo AP e YE. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 4 dias. Após crescimento, 1 mL de clorofórmio foi adicionado na superfície interna da tampa de cada placa para inativação microbiana (20 minutos). As placas permaneceram semi-abertas, por 30 minutos, para eliminação dos resíduos de clorofórmio.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 foi cultivado em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 horas e 200 µL foram transferidos para tubos contendo 10 mL de BHI semi-sólido. As soluções resultantes foram vertidas na superfície de placas contendo o endofítico inativado. As placas foram incubadas (37 °C / 24 - 48 h) para verificar a ocorrência de halos de inibição.

3.5. Microrganismos, meios e condições de cultivo

O meio de cultura utilizado para crescimento do microrganismo endofítico foi ISP2 (extrato de levedura 2,5 g; extrato de malte 10,0 g; dextrose 4,0 g; ágar 20 g; água destilada 1000 mL; pH 7,0) suplementado com 0,25% de peptona. O endofítico foi submetido a crescimento em *slants* (48-72 horas / 28 °C) e armazenado a 4 °C. Para estocagem em longo prazo foram preparados criotubos com cultura *overnight* em caldo ISP2, adicionada de glicerol (concentração final de 15%) e armazenados a - 80 °C.

Foram utilizados como microrganismos indicadores Gram-positivo e Gram-negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, respectivamente. Para a realização dos bioensaios, estas bactérias foram incubadas em caldo BHI *overnight* a 37 °C. As cepas foram cultivadas e estocadas em *slants* a 4 °C. Os microrganismos indicadores foram fornecidos pela Bacterioteca do Departamento de Microbiologia, Universidade de Montreal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá).

3.6. Produção do extrato bruto

O meio de inóculo foi preparado transferindo-se duas alçadas do microrganismo endofítico, acondicionado em *slant*, a um *Erlenmeyer* com capacidade de 200 mL contendo 10 mL de ISP2. Este meio foi mantido *overnight* a 28° C e 180 rpm em *shaker* orbital. Então, 1% (v/v) do inóculo (densidade óptica 0,8; λ 600 nm) foi adicionado a *Erlenmeyer* de 1 litro com 200 mL de ISP2. O meio de produção foi incubado a 28° C e 180 rpm (Gerhardt *et al.*, 1994).

Após atingir a fase estacionária, a cultura foi centrifugada (10.000 g, 20 minutos) e o sobrenadante *cell-free* foi filtrado em membrana de 0,22 μ m para obtenção do extrato bruto.

3.7. Cinética de crescimento do endofítico

O microrganismo endofítico foi cultivado em meio líquido ISP2 conforme condições citadas anteriormente. O crescimento microbiano foi mensurado através de diluições decimais seriadas da cultura, com um intervalo de 24 horas. As diluições

foram plaqueadas em ágar ISP2 e incubadas a 28 °C / 48 - 72 h. As quantificações foram conduzidas em triplicata e os resultados expressos em log UFC. mL⁻¹.

3.8. Determinação quantitativa da atividade antimicrobiana

A quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar (*well diffusion assay*). Alíquotas de 100 µL do extrato bruto fresco, diluído duplo-serialmente, foram depositadas em orifício de placas com ágar Müller-Hinton, previamente semeadas com *E. coli* e *S. aureus* (10⁶ células / mL). As placas foram incubadas a 37 °C *overnight* para verificar os halos de inibição. Os bioensaios foram avaliados em triplicata.

A atividade antimicrobiana foi expressa em Unidades Arbitrárias por mL (UA.mL⁻¹), sendo esta definida como a recíproca entre a diluição mais alta que apresente zona de inibição e que corresponda a 1 mL de sobrenadante não-diluído.

3.9. Tratamentos térmico, enzimático e de variação no pH

A estabilidade térmica do extrato bruto, concentrado numa proporção de 10 vezes em *speed-vac*, foi avaliada expondo-o a diferentes tempos e temperaturas: -80, -20, 28 e 37 °C por 6 horas; 60, 80 e 100 °C por 1 hora e 121 °C por 15 minutos.

O extrato bruto concentrado foi submetido a tratamento com diferentes enzimas degradativas. Em 100 µL de extrato foi adicionado 1 mg das enzimas: protease (tipo

XVIII), proteinase K, pronase E (tipo XXV), pepsina, tripsina e lipase. As preparações foram incubadas a 37 °C por 1 hora.

A bioatividade do extrato concentrado foi verificada em diferentes valores de pH. Alíquotas de 100 µL foram ajustadas em pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0 com adição de HCl ou NaOH. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas; após este período o pH das alíquotas foi neutralizado (pH 6,0) antes do bioensaio. O extrato concentrado sem tratamento - controle positivo - apresentou pH 6,0.

O bioensaio de difusão em ágar foi utilizado para determinar a atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus* antes e após os tratamentos descritos anteriormente, em triplicata.

3.10. Estimativa da massa molar das substâncias antimicrobianas

O extrato bruto concentrado foi submetido a ultrafiltração em membranas Millipore® de 10, 3, 2 e 1 kDa (6.000 g, 15 min) para estimar o peso molecular das substâncias bioativas. As frações com pesos moleculares maiores e menores que 10, 3, 2 e 1 kDa foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*.

3.11. Separação e purificação por HPLC

Os passos seqüenciais para a obtenção das moléculas bioativas, que incluem desde a produção até a separação e purificação das substâncias contidas no extrato

produzido por *P. polymyxa* RNC-D, estão demonstrados na Figura 1. Ultrafiltração em membrana Millipore® de 2 kDa (6000 g, 20 minutos) foi utilizada como etapa preparatória para separação e purificação das substâncias antimicrobianas a partir do extrato concentrado. O equipamento de HPLC foi composto pelo sistema Äkta Purifier10 (GE Healthcare) e coluna Mono Q (HR 5/5) de 1 mL de volume (Pharmacia).

A fase móvel consistiu em: 20 mM TRIS HCl, pH 7.5 (solução A) e 20 mM TRIS HCl + 1M NaCl, pH 7,5 (solução B), com um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. O volume injetado foi de 500 µL, sendo constituído por 250 µL 20 mM TRIS + 250 µL extrato concentrado < 2 kDa. As amostras foram eluídas na coluna sob o gradiente linear de 0 a 100%, durante 30 minutos. A eluição foi monitorada em comprimento de onda de 214 e 280 nm e os picos, coletados manualmente, foram liofilizados em *speed-vac* e ressuspensos em 100 µL de água destilada, para os ensaios de atividade antimicrobiana.

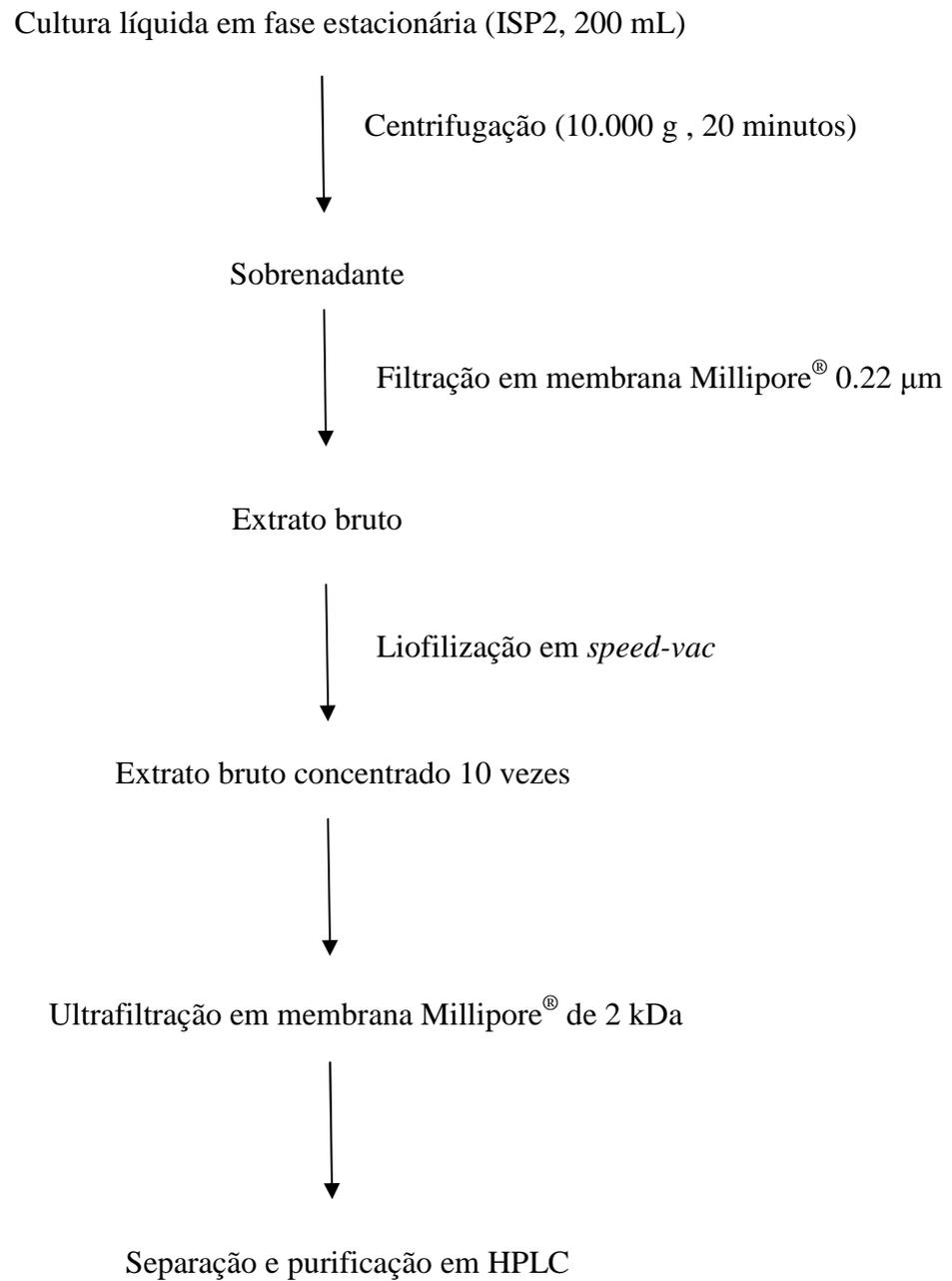


Figura 1. Representação esquemática da seqüência utilizada para purificação das substâncias antimicrobianas contidas no extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

3.12. Espectrometria de massa

Com o objetivo de determinar a massa molar das moléculas bioativas, os picos eluídos em HPLC foram analisados em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). As amostras foram analisadas no Laboratório de Espectrometria de Massa e Química Médica da Universidade de Montreal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canadá).

3.12.1. Sistema de HPLC

O sistema de HPLC consistiu nas bombas Thermo Surveyor e Thermo Surveyor MS (San Jose, CA, USA). O espectrômetro de massa usado foi Thermo LCQ Advantage (San Jose, CA, USA). Os dados foram adquiridos em computador Dell Optiplex (Round Rock, TX, USA) equipado com sistema de operação Windows XP Professional. A aquisição e análises foram realizadas usando X Calibur 1.4 (San Jose, CA, USA).

3.12.2. Condições cromatográficas

O gradiente da fase móvel foi usado com uma coluna Thermo Biobasic C8 10 x 1 mm com tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel inicial consistiu de acetonitrila e 0.2% de ácido fórmico em água numa proporção de 5:95, respectivamente, a qual foi mantida de 0 a 2 minutos. No período de 2 a 10 minutos o gradiente foi

crescente até a proporção de 70:30 e mantido por 4 minutos. A composição da fase móvel foi revertida – considerando-se a proporção inicial – e a coluna reequilibrada durante 5 minutos, totalizando 19 minutos de corrida. O fluxo foi de 55 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.12.3. Condições de espectrometria de massa

O espectrômetro de massa foi acoplado ao sistema de HPLC usando ionização de *spray* de elétrons em modo íon-positivo (ESI+). O revestimento de gás foi regulado para 5 unidades e o eletrodo de ESI fixo em 4000 Volts. A temperatura do capilar foi ajustada para 300 °C e a voltagem capilar para 6 V. O espectrômetro de massa foi operado em modo *full scan* abrangendo a escala m/z de 300 – 2000 Da; o tempo de injeção máximo foi de 300 ms.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação de endofítico produtor de substâncias bioativas

Dentre os microrganismos endofíticos isolados a partir de *Cassia leptophylla* e *Prunus* spp., dez colônias, apresentando diferentes características morfológicas, foram selecionadas. O teste da sobrecamada foi realizado para avaliar o potencial antagônico dos microrganismos isolados. Os resultados mostraram que os microrganismos isolados de *Cassia leptophylla* não apresentaram bioatividade contra *S. aureus*. A Figura 2 mostra a atividade inibitória negativa de um microrganismo isolado a partir de *Cassia leptophylla*.

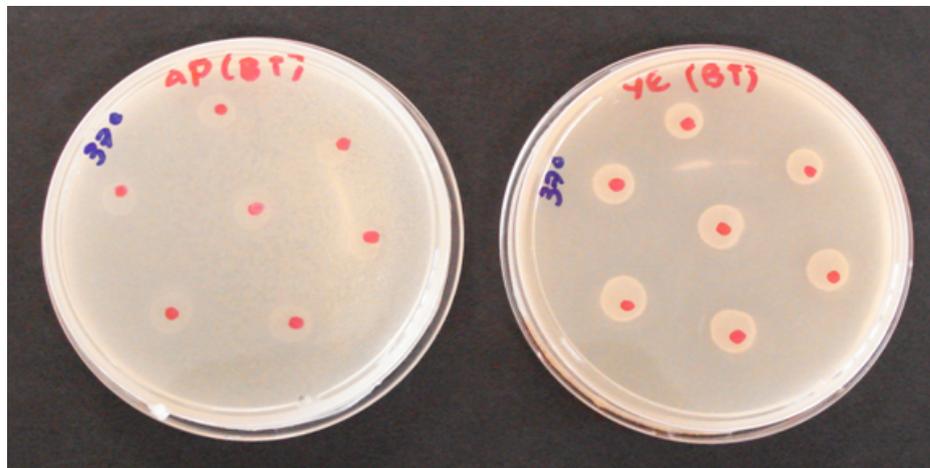


Figura 2. Microrganismo isolado de *Cassia leptophylla* apresentando atividade inibitória negativa contra *S. aureus* em ágar peptona (esquerda) e ágar extrato de levedura (direita).

Na bioprospecção de endofíticos produtores de substâncias bioativas a partir de folhas de *Prunus* spp., foi isolada uma bactéria apresentando bioatividade contra *S. aureus*. Este resultado pode ser observado nas Figuras 3 e 4.

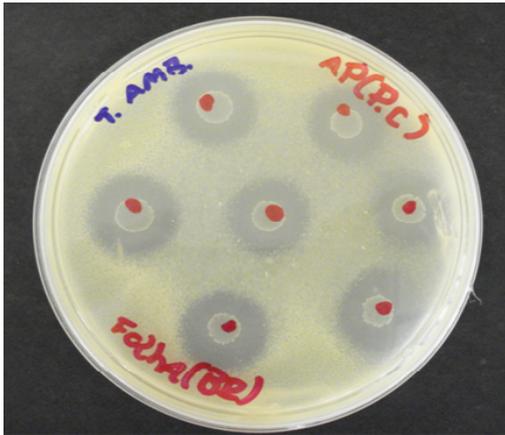


Figura 3. Microrganismo isolado de folhas de *Prunus* spp. apresentando bioatividade contra *S. aureus* quando cultivado em ágar peptona

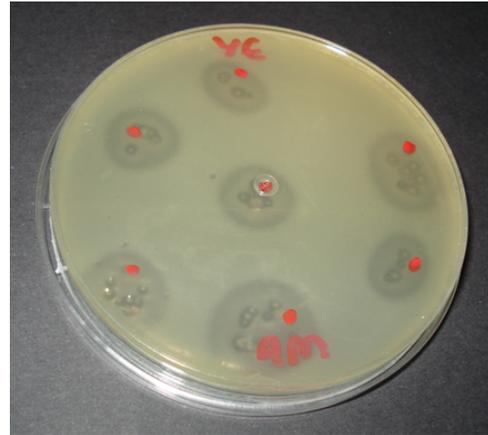


Figura 4. Microrganismo isolado de folhas de *Prunus* spp. apresentando bioatividade contra *S. aureus* quando cultivado em ágar extrato de levedura

Quanto às características culturais, o endofítico isolado, com potencial antagonico, apresentou diferentes aspectos de crescimento quando cultivado nos ágaros YE e AP (Figura 5). No primeiro meio de cultivo, as colônias desenvolveram-se amarelas, brilhantes e mucosas; em AP observaram-se colônias pequenas, brancas e com bordas irregulares. Em avaliação morfológica e reação tintorial foram observados bacilos Gram-positivos e esporos. As células apresentaram-se não álcool-ácido-resistentes após coloração de Ziehl-Neelsen. O endofítico apresentou positividade para a catalase e não produziu pigmento melanóide.

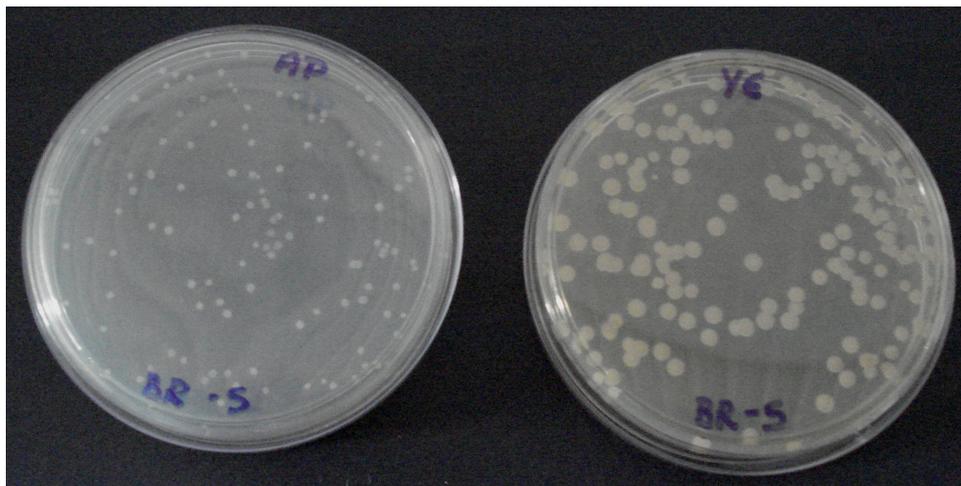


Figura 5. Diferentes aspectos morfológicos do endofítico isolado de *Prunus* spp. quando cultivado nos ágar AP (esquerda) e YE (direita).

O microrganismo endofítico foi identificado genotipicamente, com 99,2% de homologia (505 nucleotídeos do microrganismo isolado / 509 nucleotídeos Genbank), como *Paenibacillus polymyxa* (*Bacillus polymyxa*; reclassificado por Ash *et al.* 1993 e reconhecido pela Comissão Judicial do Comitê Internacional para Sistemática de Procariotos, 2005) e foi denominado *Paenibacillus polymyxa* RNC-D.

Paenibacillus polymyxa foi descrito em poucos estudos como microrganismo endofítico isolado de *Stemona japonica* (Lu *et al.*, 2007) e de raízes de ginseng (Cho *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007). Nestes três trabalhos, as cepas foram associadas à produção de enzimas fibrinolíticas, hidrolases e bioatividade contra fungos fitopatógenos, respectivamente. Este estudo relata pela primeira vez o endofitismo da bactéria *P. polymyxa*, isolada a partir de folhas de *Prunus* spp., vegetação de Cerrado.

Em pesquisa realizada por von der Weid *et al.* (2000), um total de 67 cepas de *P. polymyxa* foram isoladas da rizosfera de milho plantado em solo de Cerrado. Outro estudo envolvendo o mesmo gênero bacteriano, Coelho *et al.* (2007) investigaram a

diversidade de espécies de *Paenibacillus* em rizosferas de quatro cultivos de *Sorghum bicolor* em solo de Cerrado, encontrando 14 espécies de *Paenibacillus* spp.

Em certos ambientes, alguns microrganismos parecem invadir ativamente tecidos vegetais que apresentam soluções descontinuas (aberturas ou feridas) e utilizam, proativamente, enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases (Zhang, 2006). Desta forma, acredita-se que algumas bactérias endofíticas têm sua origem na rizosfera, penetram e colonizam tecidos da raiz para obterem um ponto de acesso ao xilema.

4.2. Caracterização do potencial antagônico de *P. polymyxa* RNC-D

O potencial de produção de compostos bioativos foi avaliado qualitativamente através do teste da sobrecamada. O microrganismo endofítico apresentou distintas zonas de inibição contra *Staphylococcus* quando cultivado em YE (20 mm) e AP (14 mm). Em pesquisa conduzida por Seldin *et al.* (1999), utilizando a cepa de *P. polymyxa* SCE2, o halo de inibição induzido contra *S. aureus* foi maior (26 mm) do que os obtidos neste estudo. Por outro lado, não foi detectada bioatividade contra *S. aureus* em estudo conduzido por Piuri *et al.* (1998), cuja cepa de *P. polymyxa* P13 foi isolada a partir de lingüiça fermentada.

4.3. Cinética de crescimento e quantificação da atividade antimicrobiana do extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

A cinética de crescimento de *P. polymyxa* RNC-D e bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus* estão demonstrados na Figura 6. O extrato bruto fresco apresentou potencial antimicrobiano máximo de 800 UA.mL⁻¹ contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 horas da cultura) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (120 horas da cultura). Durante a cultura, o valor de pH foi monitorado e manteve-se na faixa da neutralidade, variando de 6,0 – 7,0.

He *et al.* (2007) detectaram atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* em sobrenadante produzido por *P. polymyxa* OSY-DF cultivado em meio TSB suplementado com 0,6% de extrato de levedura. A bioatividade foi quantificada e expressa no valor de 1600 UA.mL⁻¹, sendo este superior ao detectado nesta pesquisa. Entretanto, o sobrenadante produzido por *P. polymyxa* P13 (Piuri *et al.*, 1998) apresentou 400 UA.mL⁻¹ de bioatividade, quando cultivado em BHI tamponado em pH 6,0, contra as cepas *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*.

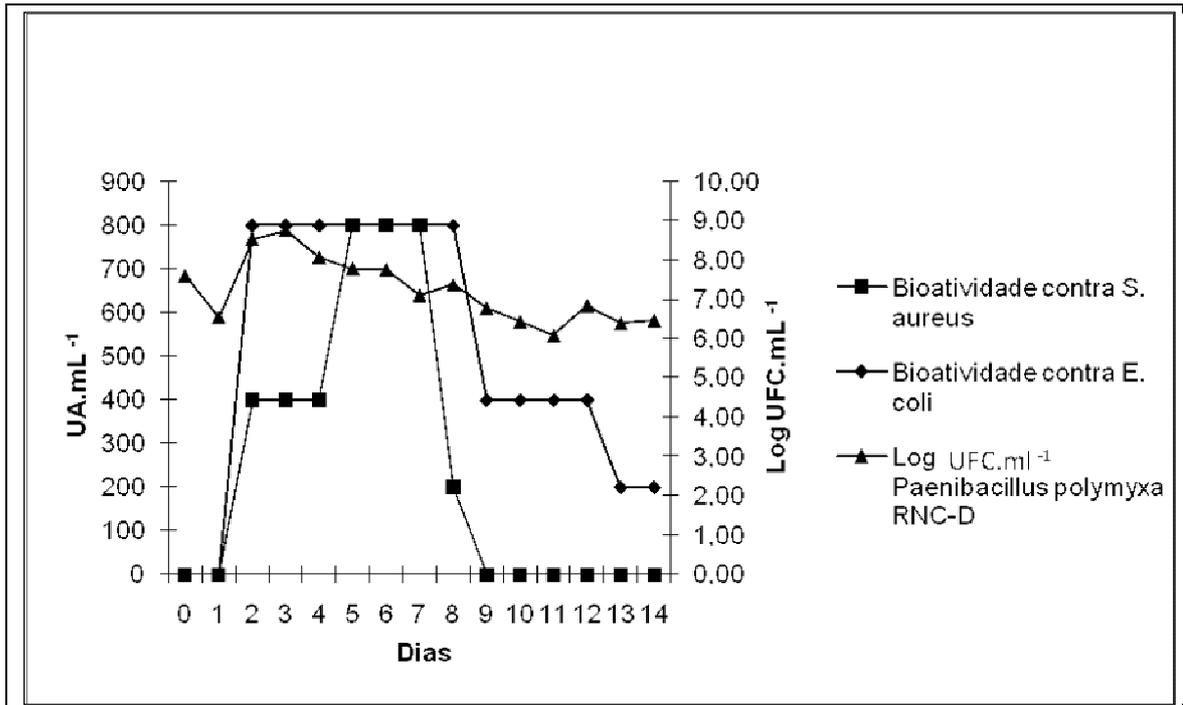


Figura 6. Cinética de crescimento de *P. polymyxa* RNC-D e bioatividade do extrato contra *E. coli* e *S. aureus*.

Na Figura 6 é possível observar a relação entre a cinética de crescimento de *P. polymyxa* RNC-D e a bioatividade do extrato bruto fresco contra *E. coli* e *S. aureus*. A biocarga do inóculo foi quantificada na ordem de 10^7 UFC.mL⁻¹, e a maior contagem microbiana ($8,74 \log \text{UFC.mL}^{-1}$) foi verificada no terceiro dia da cultura. O início da produção de substâncias bioativas correspondeu ao final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento do endofítico (segundo dia).

Considerando-se os dois microrganismos avaliados, o potencial antagonístico do extrato apresentou início, duração e término diferentes. A bioatividade contra *E. coli* atingiu o potencial máximo de 800 UA.mL^{-1} em dois dias da cultura; este potencial foi mantido até o oitavo dia. No 9º dia de cultivo, a bioatividade decaiu à metade, e este valor permaneceu até o 12º dia. A partir do 13º dia, a ação antagonística do extrato fresco contra *E. coli* atingiu seu menor valor (200 UA.mL^{-1}).

A fração do extrato responsável pela inibição de *S. aureus* foi detectada no segundo dia da cultura. O potencial antimicrobiano de 400 UA.mL⁻¹ manteve-se estável até o quarto dia, sendo que, no quinto dia, o máximo de bioatividade foi alcançado (800 UA.mL⁻¹). No oitavo dia de cultivo do endofítico, a bioatividade do extrato foi de 200 UA.mL⁻¹ e, a partir do 9º dia, o extrato tornou-se inativo contra *S. aureus*.

4.4. Estabilidade térmica, enzimática e variação no pH do extrato e estimativa da massa molar das substâncias bioativas

A estabilidade térmica, enzimática e de variação no pH do extrato bruto concentrado, e a estimativa da massa molar das substâncias bioativas foram avaliadas; os resultados estão plotados na Tabela 1 e Figuras 7 e 8.

Tabela 1. Aplicação de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto produzido por *P. polymyxa* RNC-D e efeitos na atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*.

Tratamento	Bioatividade contra	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Nenhum (controle positivo)	+	+
Enzimático		
Protease (tipo XVIII)	+	+
Proteinase K	+	+
Pronase E (tipo XXV)	+	+
Pepsina	+	+
Tripsina	+	+
Lipase	+	+
Aplicação de temperaturas		
-80 e -20 °C (6 horas)	+	+
28 e 37 °C (6 horas)	+	+
60 e 80 °C (1 hora)	+	+
100 °C (1 hora)	+	+
121 °C (15 minutos)	+	+
Variação no pH		
pH 2,0 – 5,0 (2 horas)	+	+
pH 6,0 (2 horas)	+	+
pH 7,0 – 9,0 (2 horas)	+	+
Ultrafiltração		
Membrana de 10 kDa	+	+
Membrana de 3 kDa	+	+
Membrana de 2 kDa	+	+
Membrana de 1 kDa	+	-

De acordo com dados mostrados na Tabela 1, as substâncias bioativas contra *E. coli* e *S. aureus* mantiveram o mesmo potencial de atividade após tratamento com

diversas enzimas degradativas. Estes resultados indicam que as substâncias bioativas produzidas por *P. polymyxa* RNC-D possuem natureza não-proteínica e não-lipídica.

Após ser submetido a ampla variação térmica, o extrato bruto manteve sua estabilidade a elevadas (100 e 115 °C) e baixas (-20 e -80 °C) temperaturas.

Em estudo realizado por He *et al.* (2007), o composto de massa molar 2983,44 Da, denominado *paenibacillin* e responsável pela bioatividade contra microrganismos Gram-positivos (incluindo *S. aureus*), mostrou perda parcial da bioatividade sob a ação de tripsina. Esta perda de bioatividade após tratamento enzimático não foi observada neste estudo. Estes resultados podem explicar, provavelmente, que os estudos relatam substâncias bioativas diferentes. Também foi observado que *paenibacillin* manteve maior parte de sua bioatividade quando submetido a tratamento térmico de 121 °C por 5 minutos. O extrato bioativo contra *S. aureus*, descrito neste estudo, apresentou resultado semelhante quando exposto a mesma temperatura, por um período de 15 minutos.

A cepa de *P. polymyxa* P13 foi caracterizada pela produção de polixina (Piuri *et al.*, 1998). Este composto, com massa molar de 10 kDa, apresentou alta sensibilidade a tratamento com proteases (proteínase K, pronase E e tripsina), indicando a natureza protéica da substância. Estas observações são diferentes das evidenciadas nesta pesquisa.

Resultados semelhantes aos apresentados neste estudo foram encontrados por Rosado e Seldin (1993); estes autores caracterizaram a substância produzida por *P. polymyxa* SCE2, cuja massa molar foi estimado como menor de 3,5 kDa, resistente a tratamento térmico (65 °C, 2 horas) e diversas enzimas, incluindo proteases.

Em estudo realizado por Svetoch *et al.* (2005) utilizando cepas de *P. polymyxa*, a substância bioativa contra *Campylobacter jejuni* apresentou-se sensível à ação de proteases e com massa molar de aproximadamente 3,5 kDa. Em nosso trabalho, a cepa

de *P. polymyxa* RNC-D isolada produziu substâncias diferentes das descritas na literatura, com massa molar inferior a 3,5 kDa e estabilidade à ação de proteases.

A bioatividade do extrato contra *E. coli* foi detectada nas frações retidas e eluídas em membranas de 10, 3, 2 e 1 kDa. Portanto, as moléculas bioativas contra o microrganismo Gram-negativo avaliado foram estimadas com massa molar inferior a 1 kDa. Por outro lado, a bioatividade contra *S. aureus* foi perdida quando o extrato foi ultrafiltrado em membrana de 1 kDa. Desta maneira, os compostos bioativos contra este microrganismo apresentam massa molar estimada em maior que 1 kDa e menor que 2 kDa.

O extrato bruto concentrado foi submetido a diferentes valores de pH e a bioatividade, após este tratamento, contra *E. coli* e *S. aureus*, pode ser observada nas Figuras 7 e 8, respectivamente.



Figura 7. Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *E. coli*

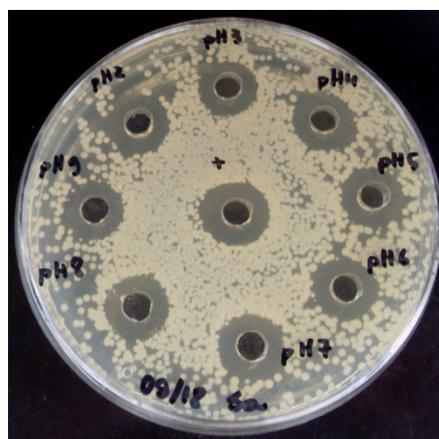


Figura 8. Variação do pH (2,0 – 9,0) do extrato concentrado e bioatividade contra *S. aureus*

De acordo com estes resultados, pode-se concluir que a bioatividade dos compostos presentes no extrato, contra ambos os microrganismos avaliados, não é influenciada em condições de acidez nem de alcalinidade. Resultados semelhantes

foram encontrados por He *et al.* (2006); a substância purificada *paenibacillin* reteve a maior parte da atividade antimicrobiana quando submetida a valores de pH entre 2,0 e 9,0. Em trabalho conduzido por Piuri *et al.* (1998), a substância polixina permaneceu ativa em valores de pH entre 2,0 e 8,0. Porém, a molécula foi inativada em condições de alta alcalinidade (pH 9,0 – 10,0)

4.5. Separação e purificação das moléculas bioativas contidas no extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D

As moléculas bioativas contidas no extrato concentrado produzidas por *P. polymyxa* RNC-D foram separadas e purificadas por HPLC. O perfil de separação está demonstrado na Figura 9. Os picos eluídos foram expressos em função do gradiente linear de concentração.

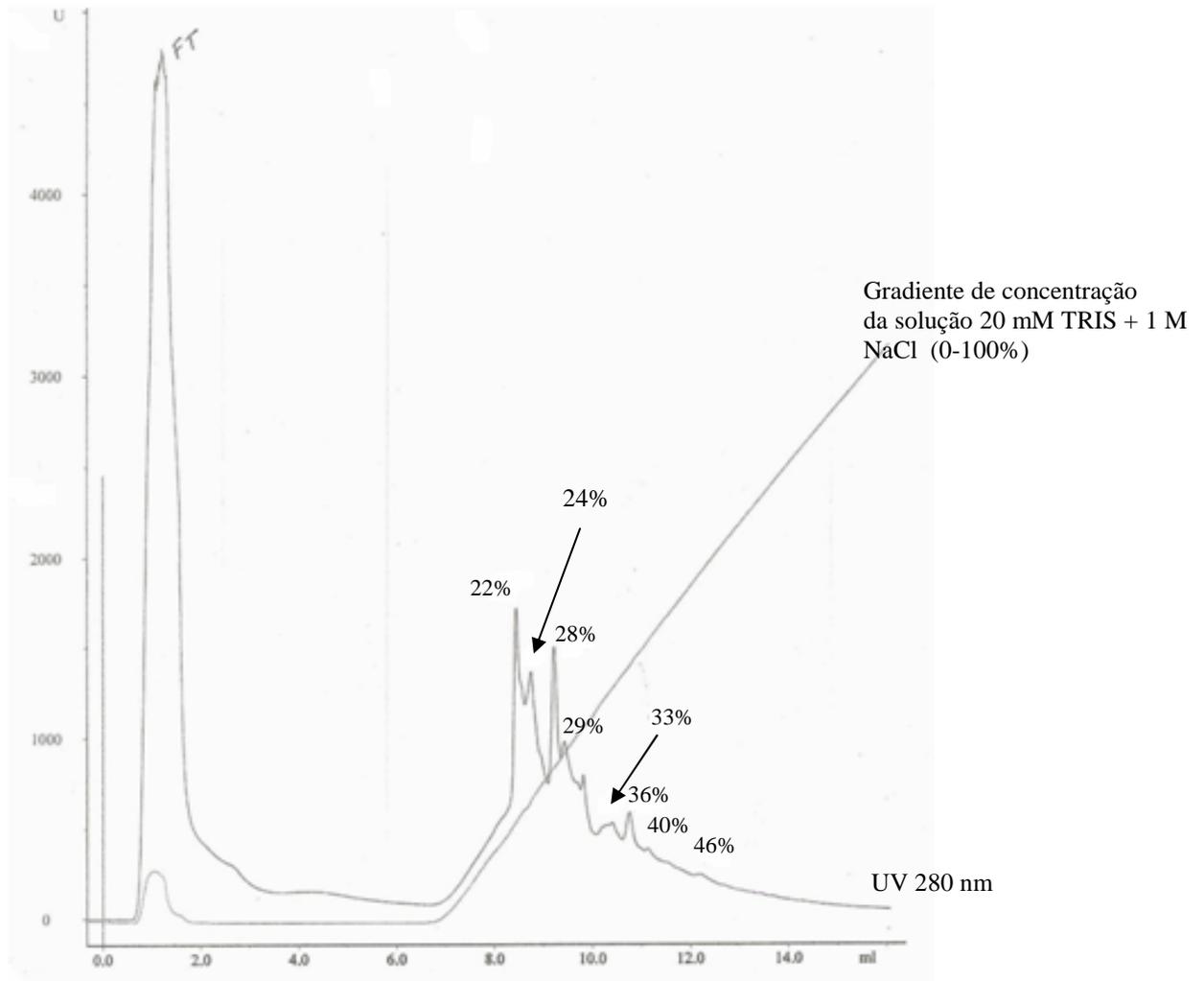


Figura 9. Perfil de separação por HPLC do extrato concentrado produzido por *P. polymyxa* RNC-D.

Os picos coletados foram bioensaiados contra *E. coli*. O diâmetro dos halos de inibição para as frações eluídas foram: 22% - 12 mm, 24% - 8 mm, 28% - 12 mm, 29% - 8 mm, 33% - 10 mm, 36% - 11 mm, 40% - 13 mm e 44% - 11 mm.

4.6. Espectrometria de Massa (MS)

As frações purificadas em HPLC foram analisadas em LC-MS para elucidação da massa molar dos compostos bioativos contidos em cada pico. Os resultados das análises podem ser visualizados nas Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

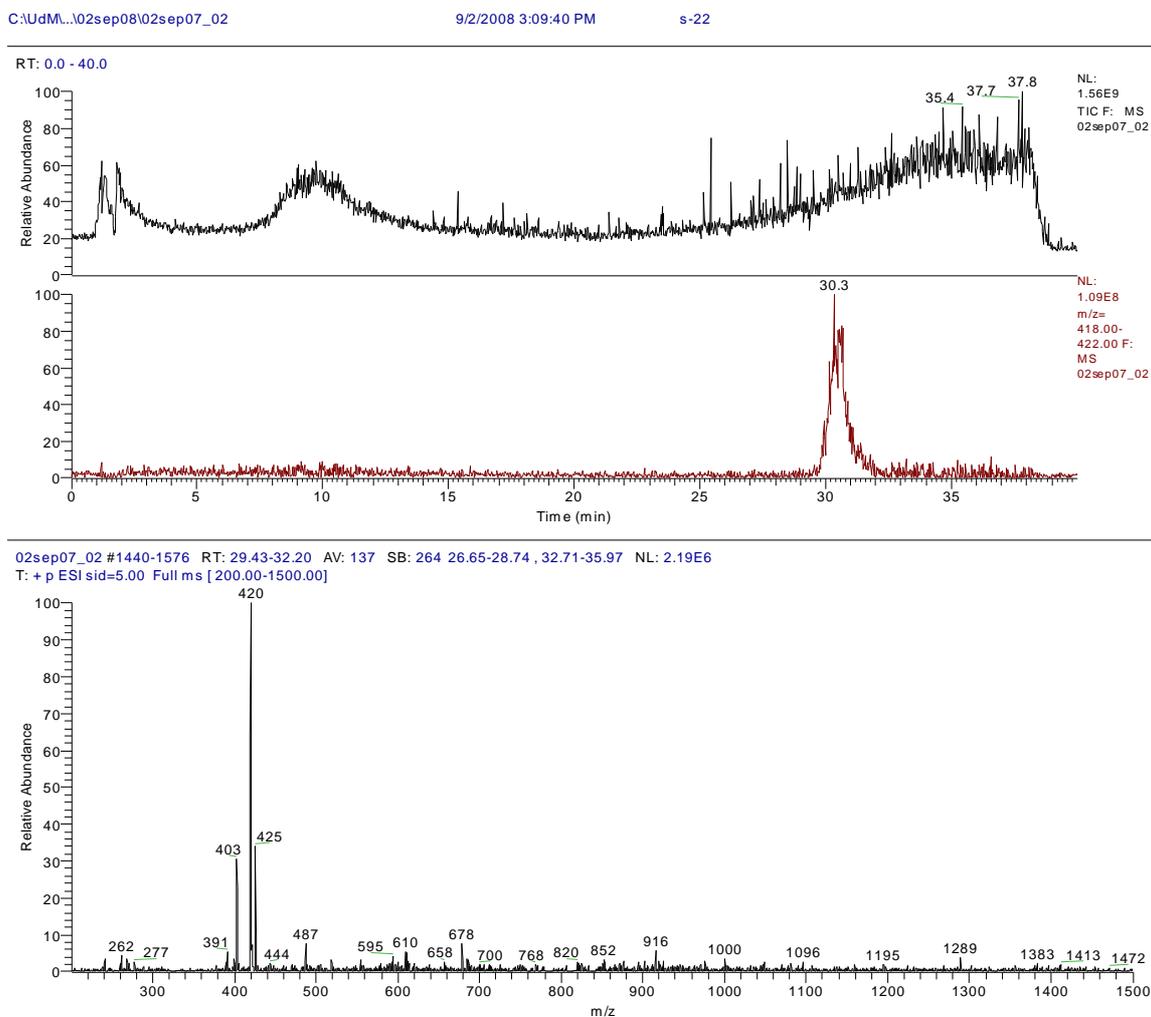


Figura 10. Fração eluída em HPLC a 22% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

A análise de MS detectou três íons cuja relação m/z foi 403, 420 e 425 Da (Figura 10). Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos descrevendo a bioatividade destas moléculas. Portanto, este trabalho apresenta, pela primeira vez, um conjunto de moléculas produzidas por *P. polymyxa* RNC-D que apresentam significativa bioatividade contra *E. coli*.

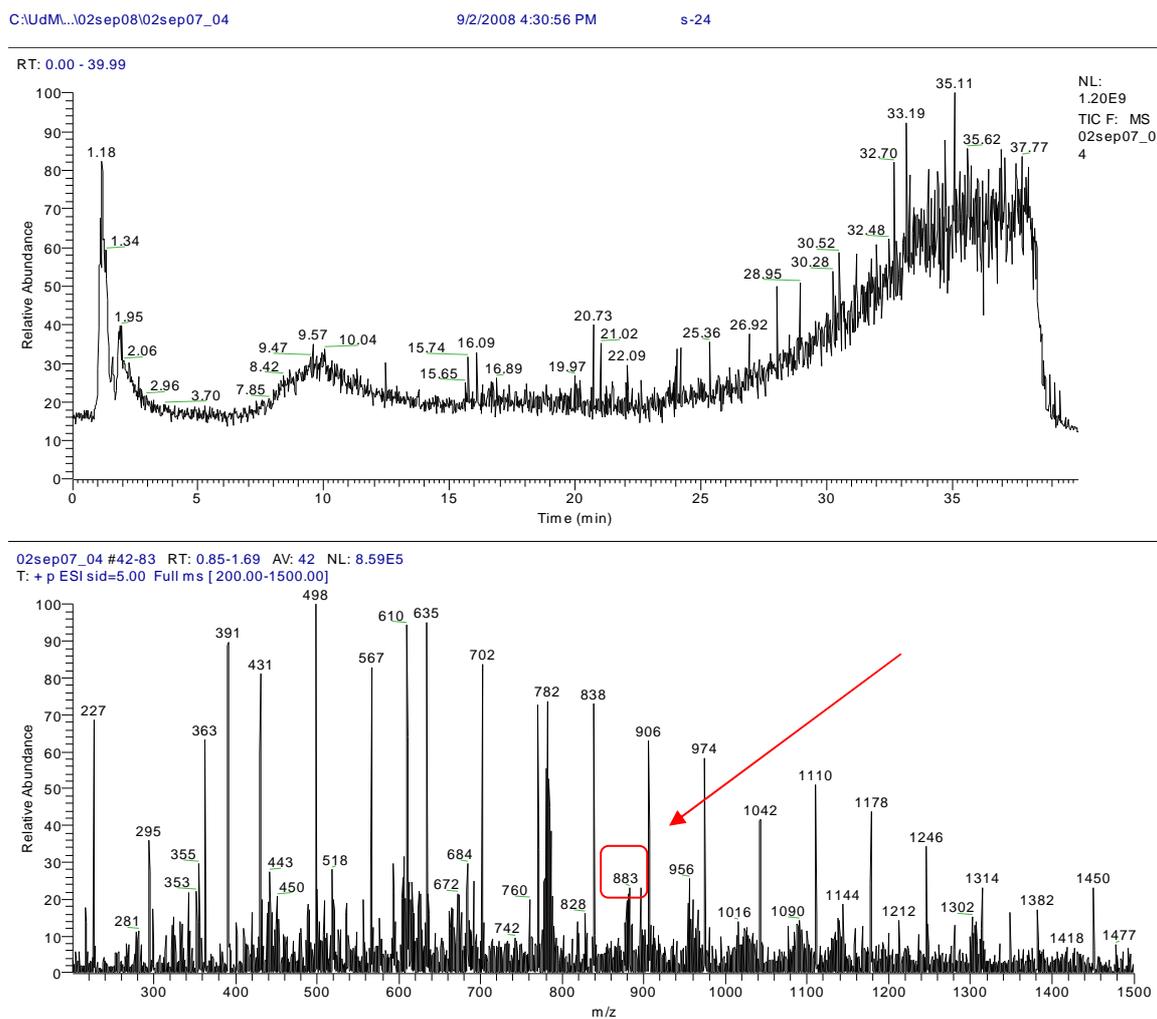


Figura 11. Fração eluída em HPLC a 24% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

Pode-se observar, na Figura 11, um padrão polimérico a 1,18 minutos, com perdas subseqüentes de 68 Da, sugerindo a presença de unidades de n-isopreno. Com uma abundância relativa de aproximadamente 25%, foi detectada uma molécula de 883

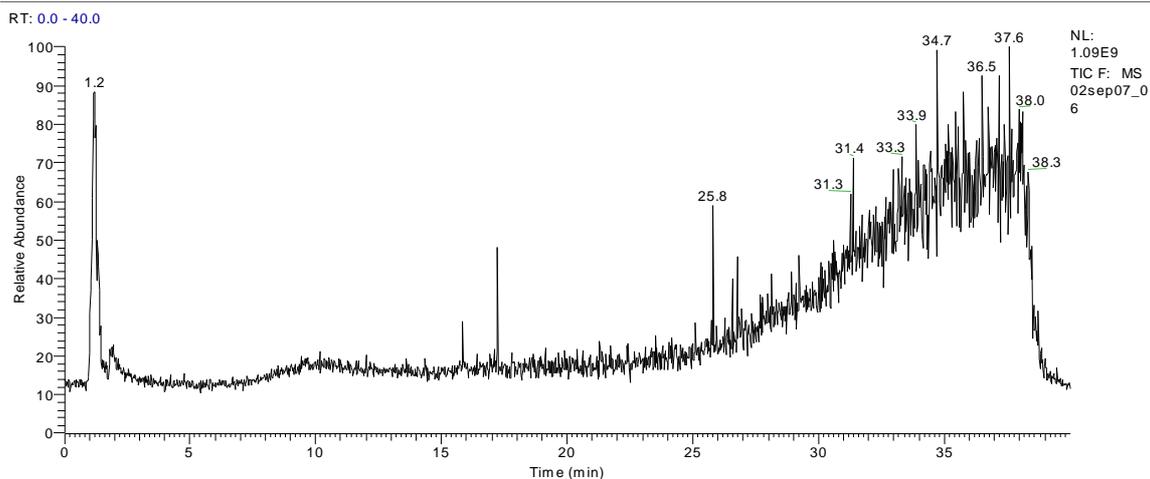
Da (indicada pela seta). Em estudo realizado por Kurusu e Fukushima (1987), os autores descreveram um complexo de antibióticos peptídicos novos, produzidos por *Bacillus polymyxa*. Entre eles foi descrito o composto F04, de massa molar 883 Da, que também foi detectada por análise de MS neste estudo. No entanto, a bioatividade das substâncias descritas na pesquisa de Kurusu e Fukushima (1987) abrange bactérias Gram-positivas, micobactérias, fungos e leveduras; os antibióticos peptídicos mostraram-se ineficazes contra Gram-negativos.

A substância de massa molar 883 Da, encontrada no extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D, pode ter sido uma das moléculas responsáveis pela bioatividade contra *S. aureus*.

C:\UdM...02sep08\02sep07_06

9/2/2008 5:52:18 PM

s-28



02sep07_06 #46-87 RT: 0.95-1.79 AV: 42 NL: 1.09E6
T: + p ESI sid=5.00 Full ms [200.00-1500.00]

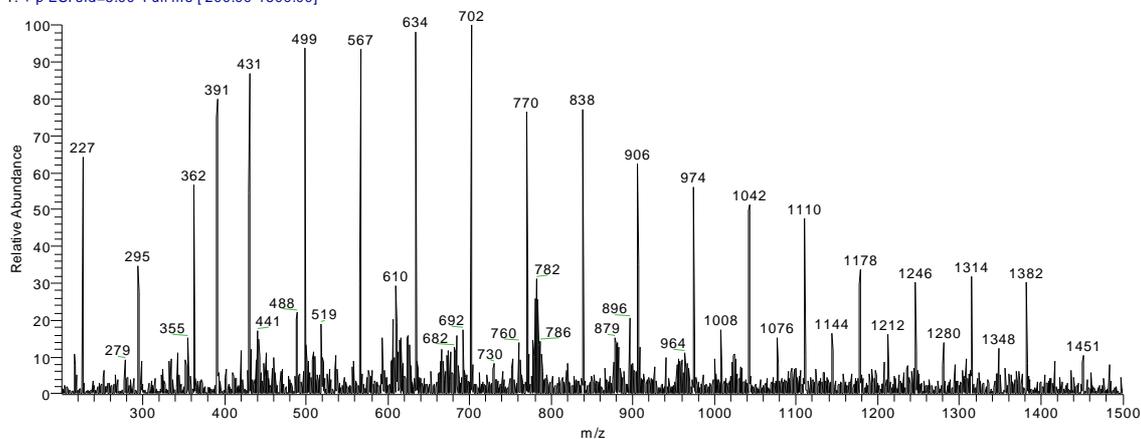


Figura 12. Fração eluída em HPLC a 28% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

Na fração eluída a 28% em HPLC (Figura 12) foi observado um padrão polimérico a 1,2 minutos. Os valores de massa molar encontrados diferem entre si, principalmente, em 68 Da, o que sugere a presença de unidades de n-isopreno.

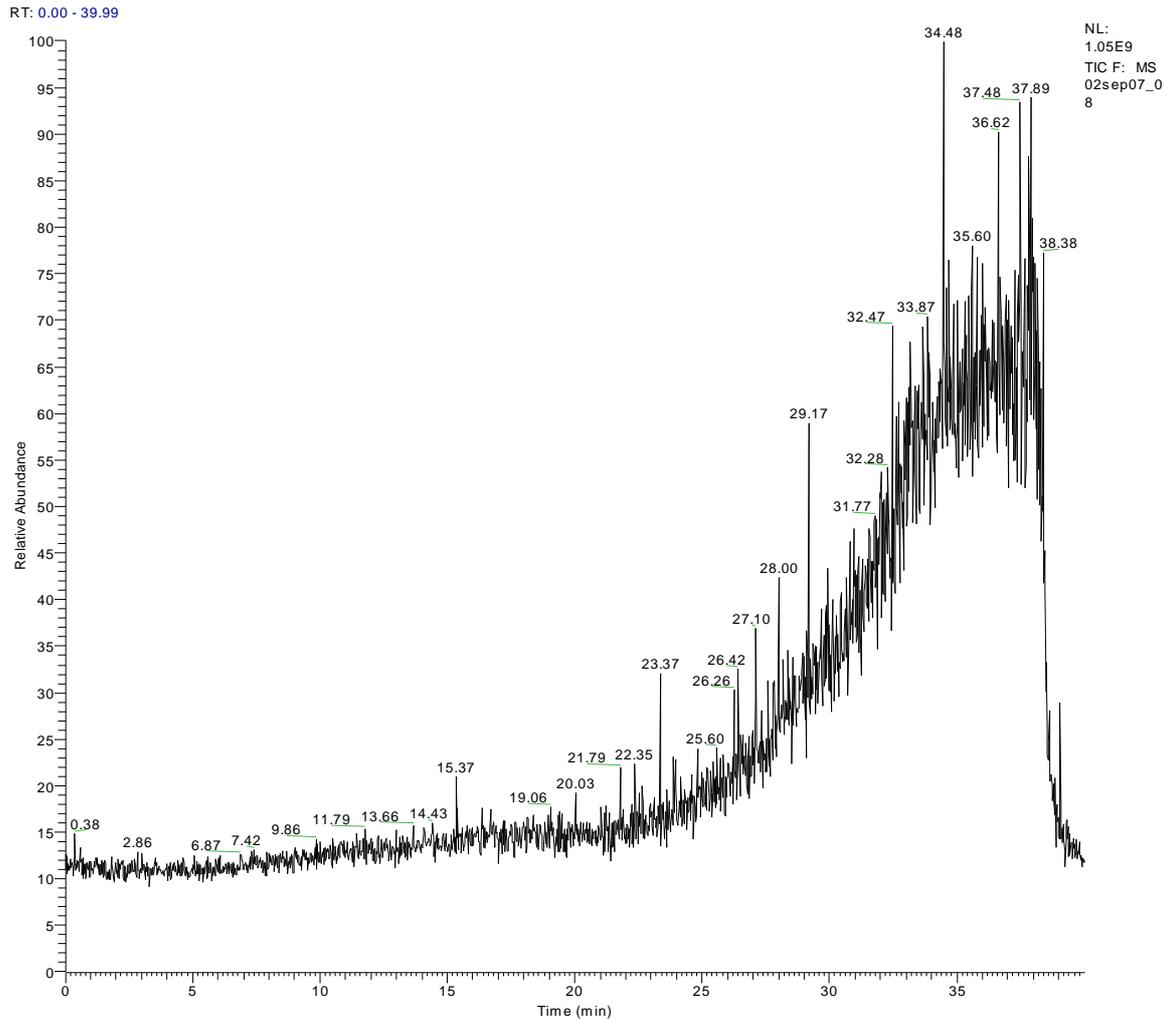


Figura 13. Fração eluída em HPLC a 29% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

Na fração eluída a 29% não foi encontrado pico significativo; apenas um fraco padrão polimérico, como pode ser observado na Figura 13.

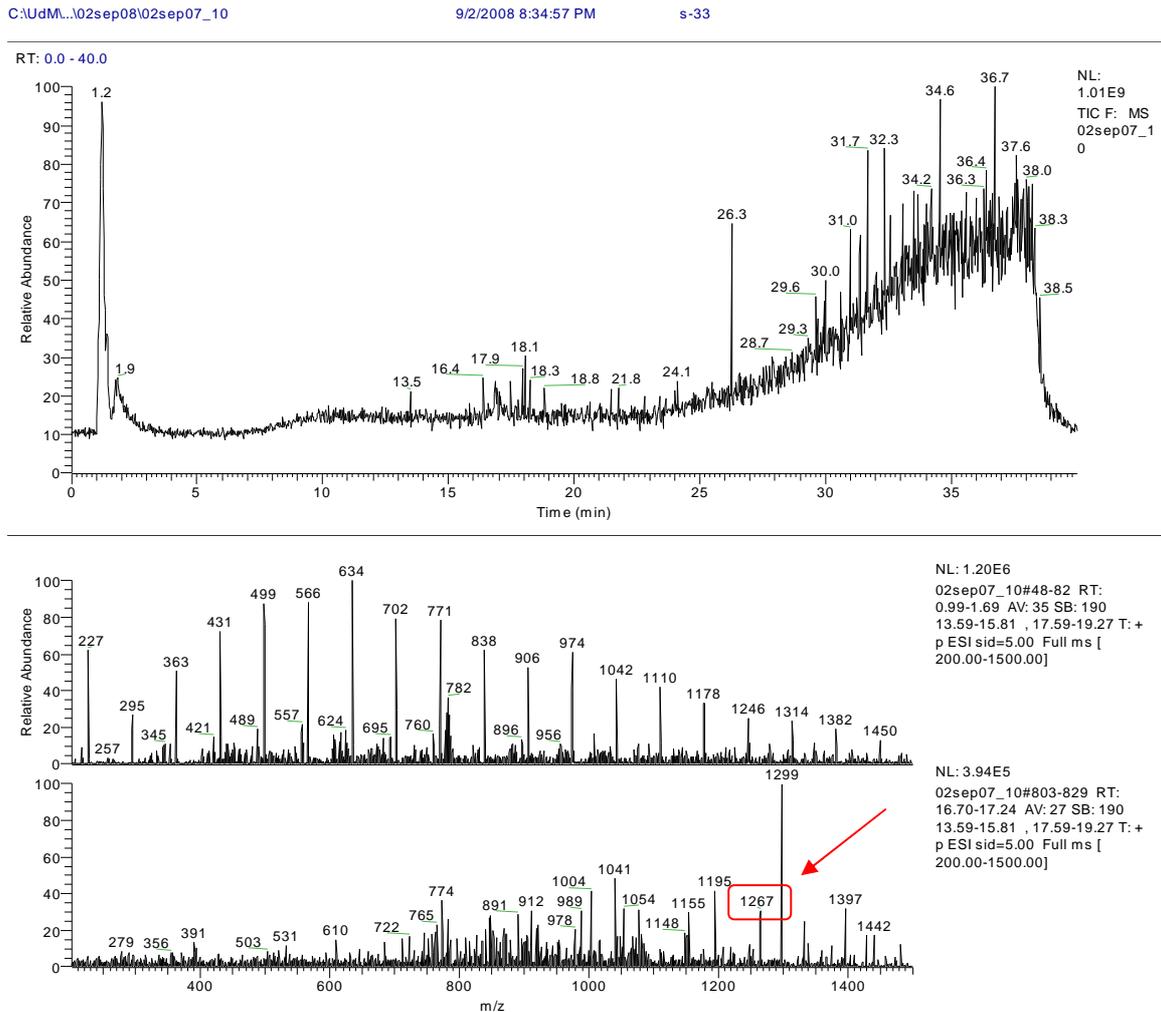


Figura 14. Fração eluída em HPLC a 33% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

O resultado da análise de LC-MS da fração eluída a 33% mostrou a presença de dois picos, encontrados a 1,2 e 17 minutos. Padrão polimérico (unidades de n-isopreno) foi observado a 1,2 minutos, com perda de 68 Da entre as massas molares detectadas. No pico encontrado a 17 minutos houve uma distribuição não uniforme de massas. A substância de 1267 Da corresponde a Polimixina E ou Colistina, cuja bioatividade contra microrganismos Gram-negativos é descrita na literatura (Spinosa, 2002).

No presente trabalho, o peso molecular das substâncias bioativas contra *S. aureus* foi estimado em maior que 1 e menor que 2 kDa. Desta maneira, uma solução de 1 µg/mL de Polimixina E (Sulfato de Polimixina E, 8000 U/mg, Sigma) foi bioensaiada

contra *S. aureus*. Nesta avaliação foram utilizadas soluções do antibiótico esterilizadas em membrana de 0,22 μm (parte inferior à esquerda, Figura 15), em autoclave a 121°C/15 minutos (parte inferior central, Figura 15) e meio de cultura esterilizado como controle negativo (parte inferior à direita, Figura 15).



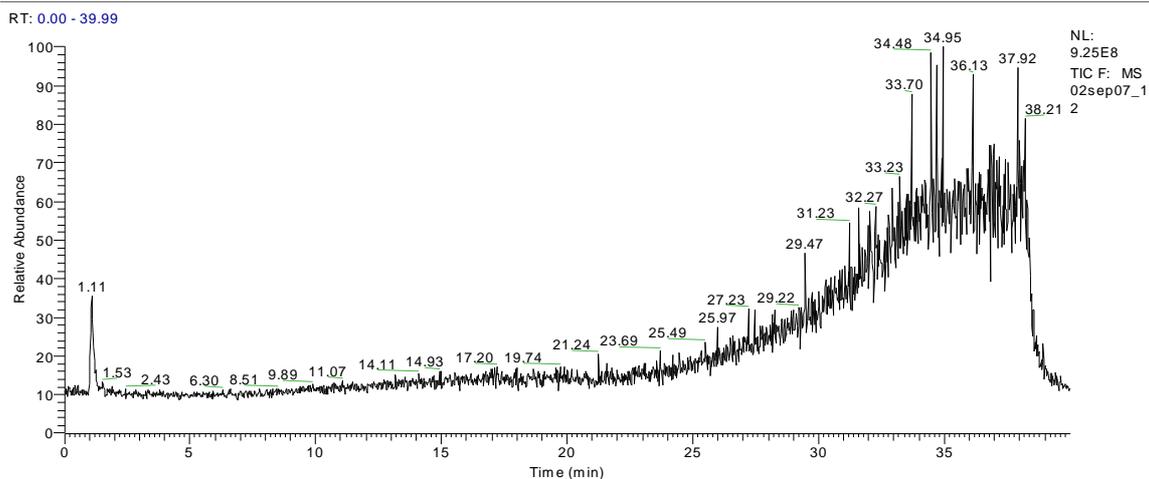
Figura 15. Bioensaio utilizando solução de Sulfato de Polimixina E (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra *S. aureus* (parte inferior da placa de Petri).

Os halos de inibição da solução de Sulfato de Polimixina E filtrada em 0,22 μm e autoclavada foram, respectivamente, 13 e 12 mm. Portanto, segundo estes resultados, a molécula de polimixina contida no extrato também pode ter sido responsável pela bioatividade contra *S. aureus*.

C:\UdM...02sep08\02sep07_12

9/2/2008 9:56:18 PM

s-36



02sep07_12 #48-79 RT: 0.99-1.63 AV: 32 SB: 150 2.22-5.36 NL: 3.23E5
T: + p ESI sid=5.00 Full ms [200.00-1500.00]

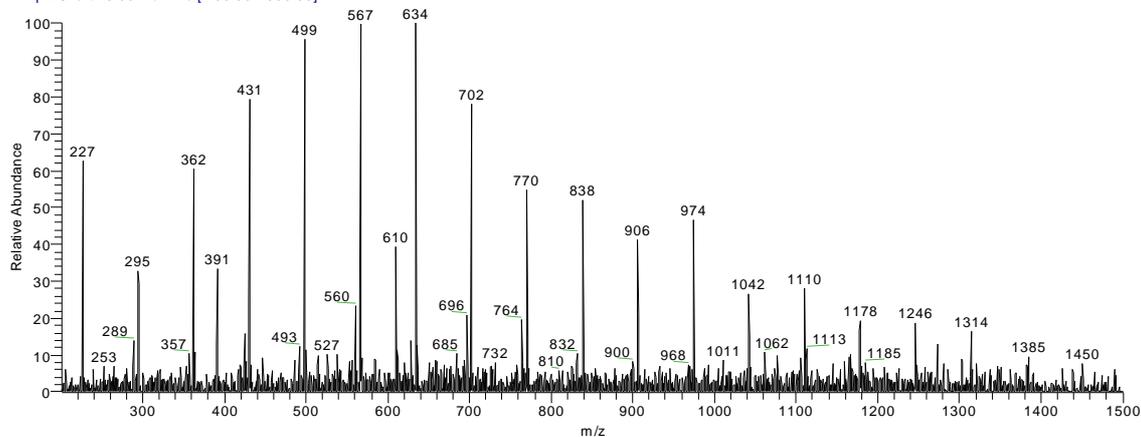


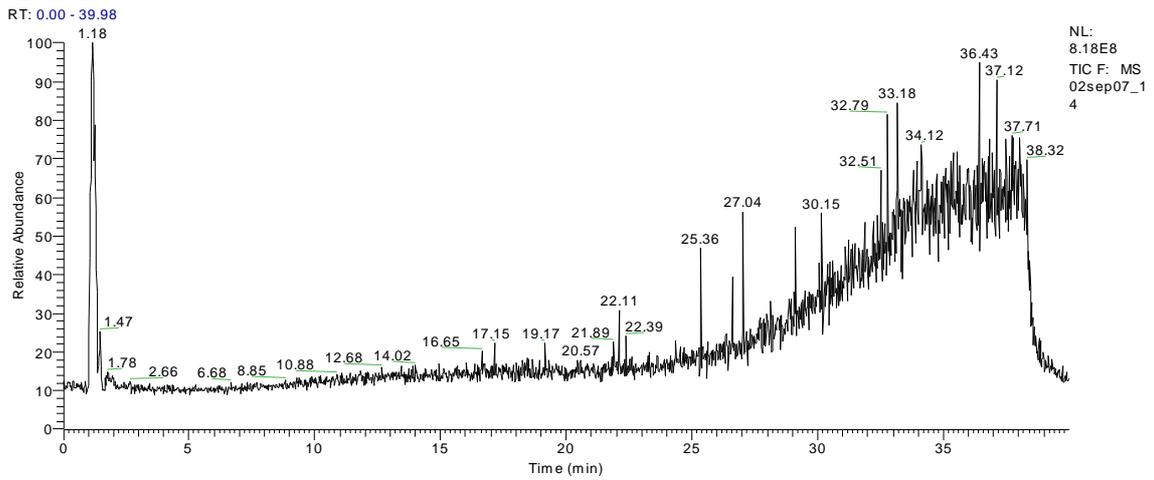
Figura 16: fração eluída em HPLC a 36% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

Na fração eluída a 36%, os resultados de LC-MS revelaram a presença de um padrão polimérico (1,11 minutos) e a presença de unidades de n-isopreno, com diferença de 68 Da entre as moléculas detectadas.

C:\UdM...02sep08\02sep07_14

9/2/2008 11:17:34 PM

s-40



02sep07_14 #46-79 RT: 0.95-1.63 AV: 34 NL: 1.42E6
 T: + p ESI: sid=5.00 Full ms [200.00-1500.00]

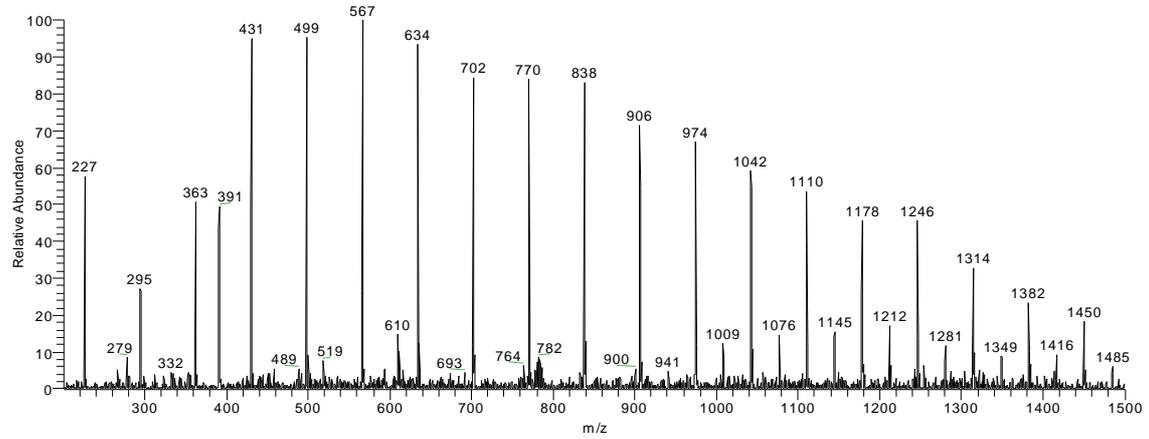


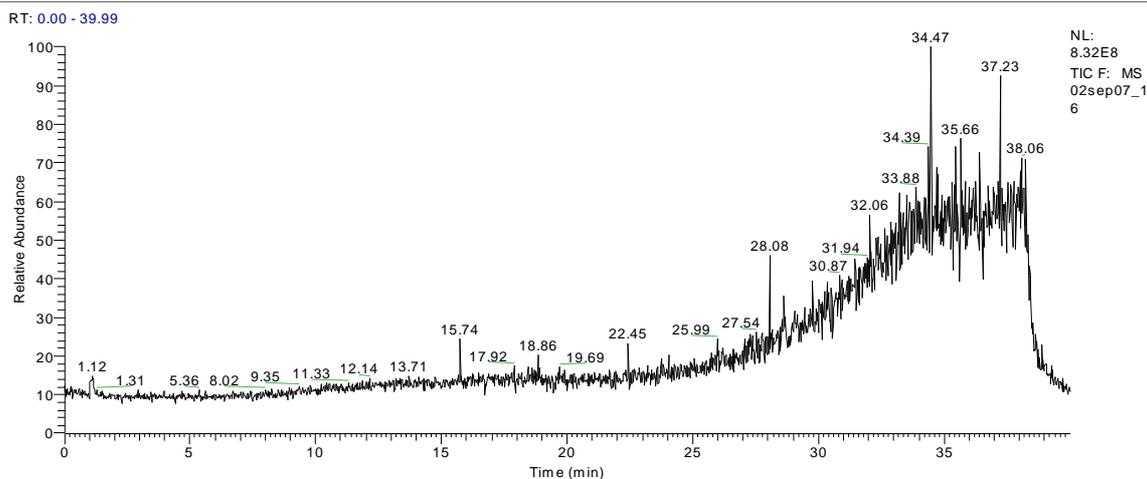
Figura 17: fração eluída em HPLC a 40% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

Padrão polimérico (1,18 minutos) na fração eluída a 40% e presença de unidades de n-isopreno, com diferença intermolecular de 68 Da.

C:\UdM...02sep08\02sep07_16

9/3/2008 12:38:55 AM

s-46



02sep07_16 #38-71 RT: 0.79-1.48 AV: 34 SB: 177 2.07-5.80 NL: 9.45E4
T: + p ESI sid=5.00 Full ms [200.00-1500.00]

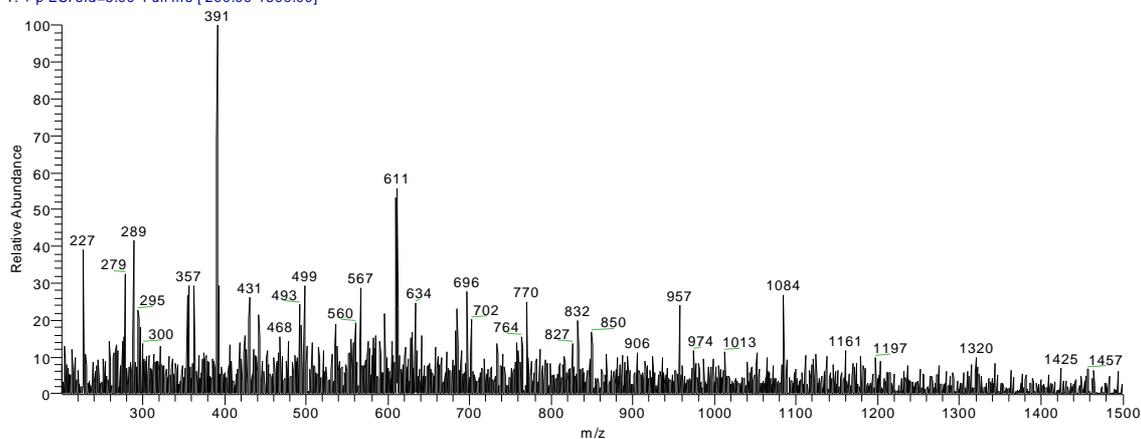


Figura 18: fração eluída em HPLC a 46% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl

A Figura 18 mostra o resultado da análise de LC-MS da fração eluída a 46% de solução B. Diferença de 68 Da entre as unidades de n-isopreno foram detectadas neste padrão polimérico.

Dentre os oito picos bioativos obtidos a partir de HPLC, em três foram detectadas a presença de moléculas bioativas. Em duas frações, as moléculas presentes já foram descritas na literatura (Kurusu e Fukushima, 1987; Spinosa, 2002), e na eluição a 22% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl, bioativa contra *E. coli*, os compostos estão sendo relatados pela primeira vez neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Na realização do estudo bioprospectivo de microrganismos endofíticos produtores de substâncias bioativas, utilizando plantas do Cerrado, foi isolada uma bactéria, a partir de folhas de *Prunus* spp., apresentando bioatividade contra microrganismos de importância em saúde pública;

Os resultados do teste de bioatividade mostraram que os microrganismos isolados de *Cassia leptophylla* apresentaram atividade inibitória negativa contra *S. aureus*;

O endofítico isolado, apresentando potencial antagônico, foi identificado através de análises fenotípicas e genotípicas como *Paenibacillus polymyxa* e denominado RNC-D;

Este estudo relata, pela primeira vez, a associação endofítica da bactéria *P. polymyxa* RNC-D, com folhas de *Prunus* spp., vegetação de Cerrado (São Carlos, SP);

O extrato bruto fresco produzido por *P. polymyxa* RNC-D apresentou potencial antimicrobiano máximo de 800 UA.mL⁻¹ contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (48 horas da cultura) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (120 horas da cultura);

Após ter sido submetido a tratamento enzimático com proteases e lipase, o extrato concentrado manteve-se bioativo, sugerindo a natureza não-proteinácea e não-lipídica das substâncias bioativas;

O extrato concentrado manteve-se biologicamente ativo quando exposto a baixas (-20 e -80 °C) e elevadas (100 e 121 °C) temperaturas, e variação no pH (2,0 – 9,0) contra ambos os microrganismos testados;

A massa molar dos compostos bioativos contra *E. coli* foi estimada em menor que 1 kDa, enquanto que, para *S. aureus*, a estimativa foi de maior que 1 kDa e menor que 2 kDa.

Através de técnica cromatográfica (HPLC) foi possível a separação das substâncias bioativas contidas em extrato produzido por *P. polymyxa* RNC-D;

Três novas moléculas, com massas molares de 403, 420 e 425 Da foram identificadas por LC-MS em pico bioativo (eluído em HPLC a 22% de solução 20 mM TRIS + 1 M NaCl) contra *E. coli*;

O estudo prosseguirá na determinação do espectro antimicrobiano das novas substâncias bioativas purificadas, bem como na avaliação de possíveis áreas de aplicação.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. J. Daniel Dubreuil, pela parceria no desenvolvimento deste estudo que fez parte do projeto de pesquisa intitulado “Purification and Biochemical Characterization of Some Bioactive Substances produced by *Actinomyces* isolated from Brazilian Tropical Savannah Trees”. Os autores gostariam de agradecer ao governo do Canadá por concessão de bolsa de estudos - Graduate Students Exchange Program (2007-2008). Os autores são gratos a PhD Francis Beaudry (Laboratório de Espectrometria de Massa e Química Médica), pelas análises de LC-MS. Ainda, os autores agradecem a CAPES por concessão de bolsa de Mestrado (Serrano, N.F.G.) e, finalmente, a FAPESP (Projeto Temático 05/55079-4).

7. REFERÊNCIAS

Adámoli, J., Macedo, J., Azevedo, L.G., Madeira Neto, J. (1985). Caracterização da região dos Cerrados. In: *Solos dos Cerrados: Tecnologias e Estratégias de Manejo* (ed. Goedert WJ), pp. 33–74. EMBRAPA and Nobel Press, São Paulo.

Ash, C., Priest, F.G. and Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64: 253-260.

Bell, C.R., Drickie, G.A., Harvey, W.L.G., Chan, J.W.Y.F. (1995). Endophytic bacteria in grapevine. In *Can. J. Microbiol.*, 41: 46-53.

Blackwell, M. (2000). Evolution. Terrestrial life--fungal from the start? In *Science*, 15 (289): 1884-5.

Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R., Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. In *Chembiochem.*, 3(7): 619-27.

Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H., Zou, S. (2003). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. In *Lett. Appl. Microbiol.*, 39: 425–430.

- Cao, L.X., Qiu, Z.Q., You, J.L., Tan, H.M., Zou, S. (2004). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface sterilized banana roots. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 247: 147–152.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robison, R. (2002). Munumbicins wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. In *Microbiology*, 148: 2675–2685.
- Cho, K.M. *et al.* (2006). A cel44C-man26A gene of endophytic *Paenibacillus polymyxa* GS01 has multi-glycosyl hydrolases in two catalytic domains. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73(3):618-30.
- Cho, K.M. *et al.* (2007). Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. In *Microb Ecol.*, 54(2): 341-51.
- Clay, K. (1992). Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. In *Nat. Toxins*, 1(3): 147-149.
- Coelho, M. R. *et al.* (2007). Diversity of *Paenibacillus* spp. in the rhizosphere of four sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars sown with two contrasting levels of nitrogen fertilizer assessed by rpoB-based PCR-DGGE and sequencing analysis. In *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(5): 753-60.
- Coombs, J.T., Franco, C.M.M. (2003). Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. In *Appl. Env. Microbiol.*, 69: 5603–5608.

- Demain, A.L. (1981). Industrial Microbiology. In *Science*, 214: 987-994.
- Eiten, G. (1972). The cerrado vegetation of Brazil. In *The Botanical Review*, **38**, 201–341.
- Emori, T.G., Gaynes, R.P. (1993). An overview of nosocomial infections including the role of microbiology laboratory. In *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 428-442.
- Gerhardt, P.; Murray, G.G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. (1994). Methods for general and molecular microbiology. In ASM publication, Washington, D.C., 791 p.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006). Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. In *J. Nat. Prod.*, 69: 509-526.
- Hallmann, J., Rodriguez-Kabana, R., Kloepper, J.W. (1999). Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. In *Soil Biol. Biochem.*, 31: 551-560.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. In *Can. J. Microbiol.*, 43: 895-914.

He, Z. *et al.* (2007). Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and Polymyxin. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (1): 168-178.

Homma, Y., Suzui, T. (1989). Role of antibiotic production in suppression of radish damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia*. In *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 55: 643-652.

Jacobs, M.J., Bugbee, W.M., Gabrielson, D.A. (1985). Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. In *Can. J. Bot.*, 63: 1262-1265.

Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes (2005). The type species of the genus *Paenibacillus* Ash *et al.* 1994 is *Paenibacillus polymyxa*. Opinion 77. In *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55(Pt 1):513.

Kobayashi, D.Y., Palumbo, J.D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura, *Microbiol endophytes*, In C.W. Bacon and J.F. White (ed), Marcel Dekker Inc., New York, N.Y., p.199-233.

Lorenzi, H. e Matos, J.F.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

Lu, F., Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Fang, Y. and Liu S. (2007). Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. In *Curr. Microbiol.*, 54(6):435-439.

Martins, D.T.O.; Lima, J.C.S.; Rao, V.S.N. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. In *Phytotherapy Research.*, 16 (5): 427 – 431, 2002.

Myers, N. *et al.* (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. In *Nature*, 403: 853–858.

Oliveira-Filho, A.T. and Ratter, J.A. (2002). Vegetation physiognomies and woody flora of the Cerrado biome. In: Oliveira, O.S., Marquis, R.J. (eds). In *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, pp 91–120.

Patriquin, D.G., Döring;berner, J. (1978). Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. In *Can. J. Microbiol.*, 24: 734-742.

Pereira, J.C.; Neves, M.C.P.; Drozdowicz, A. (1996). Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos. *Seropédica: Embrapa – CNPAB*, 20p. (Embrapa – CNPAB, documentos, 26).

Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. and Ruzal, S.M. (1998). A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. In *Lett. Appl Microbiol.*, 27: 9-13.

Ratter, J.A., Ribeiro, J.F. and Bridgewater, S. (1997). The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. In *Ann. Bot.*, 80: 223–230.

Ratti, R.P., Serrano, N.F.G., Hokka, C.O. and Sousa, C.P. (2008). Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian Tropical Savannah plants against *Staphylococcus* coagulase positive strain. In *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 14(2): 294-302.

Rosado, A.S. e Seldin, L. (1993). Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. In *World J. Microbiol. Biotech.*, 90: 521-528.

Sarmiento, G., e Monasterio, M. (1983). Life forms and phenology, In Bourlière, F. (ed.). In *Ecosystems of the world: tropical savannas*, Elsevier, Amsterdam. p. 79-108.

Schutz, B. (2001). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. In: British Mycological Society, international symposium proceedings: bioactive fungal metabolites – impact and exploitation. University of Wales, Swansea, Wales.

Seldin, L., Silva de Azevedo, F., Alviano, D.S., Alviano, C.S. and Freire Bastos, M.C. (1999). Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic microorganisms. In *Lett. Appl. Microbiol.*, 28: 423 – 427.

Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966). Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. In *Int. J. System. Bacteriol.*, 16: 313-340.

Spinosa, H.S. (2002). Antibióticos: Aminoglicosídeos, Polimixinas, Bacitracina e Vancomicina. In Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 3 ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p 418-419.

Strobel, G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. In *Crit. Ver. Biotechnol.*, 22: 315-333.

Strobel, G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. In *Microbes Infect.*, 5(6):535-44.

Strobel, G.A., Daisy, B.H. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. In *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 491-502.

Strobel, G.A., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. In *J. Nat. Prod.*, 64(2): 257-68.

Strobel, G.A., Long, D.M. (1998). Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. In *ASM News*, 64: 263-268.

Svetoch, E.A. *et al.* (2005). Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and characterization of associated bacteriocins. In *J. Food Prot.*, 68(1):11-17.

Tan, R.X. and Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. In *Nat. Prod. Rep.*, 18(4): 448-59.

von der Weid, I., Paiva, E., Nóbrega, A., van Elsas, J.D., Seldin, L. (2000). Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. In *Res. Microbiol.*, 151(5): 369-81.

Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. In *Nat. Prod. Rep.*, 23: 753-771.