

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

**Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos
isolados do Cerrado de São Carlos-SP**

Naira Beatriz Favoretto

São Carlos

2010

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

**Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos
isolados do Cerrado de São Carlos-SP**

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

Orientada: Naira Beatriz Favoretto

Orientadores: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

São Carlos

2010

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

F275ps

Favoretto, Naira Beatriz.

Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos-SP / Naira Beatriz Favoretto. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
39 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Microbiologia. 3. Microorganismos endofíticos. 4. Antimicrobiana. 5. Cerrado. 6. Streptomyces.
I. Título.

CDD: 660.6 (20ª)

Naira Beatriz Favoreto

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

Aprovado em: 22/03/2010

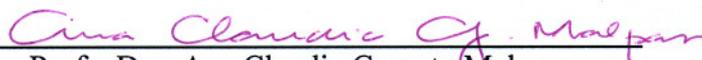
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos - DMP



Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo
Instituto de Química - UNESP



Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Universidade Federal de São Carlos - DEQ



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Universidade Federal de São Carlos - DEQ

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar esta oportunidade de capacitação.

Aos meus pais, Joaquim e Maria Emília, pelo amor, apoio e incentivo.

Às minhas irmãs, Danieli e Natalia, pelo companheirismo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pela confiança e ensinamentos. Ao Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, pela compreensão nos momentos críticos.

Às amigas, Ana Cândida, Nadja e Regiane. Obrigada pela recepção no laboratório, pelo incentivo, apoio e momentos alegres compartilhados.

Aos colegas do programa com os quais foram compartilhados momentos difíceis e alegres durante a obtenção dos créditos.

Ao Mauro, pela ajuda indispensável durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, aos meus orientadores e amigos.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão da literatura.....	2
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Sítio de coleta.....	11
3.2. Material vegetal.....	11
3.3. Isolamento dos microrganismos endofíticos.....	12
3.4. Caracterização fenotípica.....	13
3.4.1. Características macroscópicas.....	13
3.4.2. Características fisiológicas.....	13
3.4.3. Características bioquímicas.....	14
3.4.4. Características morfo-tintoriais.....	14
3.5. Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada).....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
5. CONCLUSÕES.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Características macroscópicas do isolado (1) de *Butia capitata*
Pág. 16
- Figura 2:** Características macroscópicas do isolado (2) de *B. capitata*
Pág. 16
- Figura 3:** Características macroscópicas do isolado (3) de *Butia capitata*
Pág. 17
- Figura 4:** Características macroscópicas do isolado (4) de *Butia capitata*
Pág. 17
- Figura 5:** Características macroscópicas do isolado (5) de *Butia capitata*
Pág. 17
- Figura 6:** Características macroscópicas do isolado (6) de *Butia capitata*
Pág. 17
- Figura 7:** Crescimento colonial do isolado (7) a partir de *Solanum lycocarpum*
Pág. 18
- Figura 8:** Crescimento colonial do isolado (8) a partir de *Solanum lycocarpum*
Pág. 18
- Figura 9:** Crescimento colonial do isolado (9) a partir de *Solanum lycocarpum*
Pág. 18
- Figura 10:** Crescimento colonial do isolado (10) a partir de *Solanum lycocarpum*
Pág. 18
- Figura 11:** Crescimento colonial do isolado (11) a partir de *Solanum lycocarpum*
Pág. 19
- Figura 12:** Características do isolado (12) de *Stryphnodendron polyphyllum*
Pág. 19
- Figura 13:** Características do isolado (13) de *Stryphnodendron polyphyllum*
Pág. 19

- Figura 14:** Características do isolado (14) a partir de *Stryphnodendron polyphyllum*
Pág. 20
- Figura 15:** Características do isolado (15) a partir de *Stryphnodendron polyphyllum*
Pág. 20
- Figura 16:** Características de crescimento do isolado (16) de *Miconia albicans*
Pág. 20
- Figura 17:** Características de crescimento do isolado (17) de *Miconia albicans*
Pág. 20
- Figura 18:** Características de crescimento do isolado (18) de *Miconia albicans*
Pág. 21
- Figura 19:** Características de crescimento do isolado (19) de *Miconia albicans*
Pág. 21
- Figura 20:** Características de crescimento do isolado (20) de *Miconia albicans*
Pág. 21
- Figura 21:** Características de crescimento do isolado (21) de *Miconia albicans*
Pág. 21
- Figura 22:** Crescimento colonial do isolado (22) de *Aegiphila lhotzkiana*
Pág. 22
- Figura 23:** Crescimento colonial do isolado (23) de *Aegiphila lhotzkiana*
Pág. 22
- Figura 24:** Crescimento colonial do isolado (24) de *Aegiphila lhotzkiana*
Pág. 22
- Figura 25:** Crescimento colonial do isolado (25) de *Aegiphila lhotzkiana*
Pág. 22

Figura 26: Crescimento colonial do isolado (26) de *Aegiphila lhotzkiana*

Pág. 24

Figura 27: Características morfológicas do microrganismo endofítico isolado (amostra 2) de *Butia capitata* var *capitata*: (A) frente e (B) verso.

Pág. 24

Figura 28: Características morfológicas do microrganismo endofítico isolado (amostra 21) de *Miconia albicans*: (A) frente e (B) verso.

Pág. 24

Figura 29: Perfil de degradação de amido pelo Microrganismo 2

Pág. 25

Figura 30: Perfil de degradação de amido pelo Microrganismo 21

Pág. 25

Figura 31: Bioatividade do microrganismo endofítico 2 isolado de *Butia capitata* var *capitata* contra *S. aureus* e mensurada por halos de inibição

Pág. 27

Figura 32: Bioatividade do microrganismo endofítico 2 isolado de *Butia capitata* var *capitata* contra *E. faecalis* mensurada por halos de inibição

Pág. 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação fenotípica e características macroscópica, morfo-tintorial, fisiológica e bioquímica de microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos, SP.

Pág 26

Tabela 2. Antibiose apresentada por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos, SP e mensurada por halos de inibição (mm).

Pág 28

RESUMO

O Cerrado ocupa uma extensa área geográfica no Brasil comportando uma variedade de espécies de plantas. Essa diversidade é uma potencial fonte de microrganismos endofíticos constituídos principalmente por bactérias e fungos que habitam o interior das plantas. Os endofíticos podem produzir metabólitos secundários bioativos de interesse biotecnológico, como ação antibacteriana e antifúngica. Esse trabalho objetivou isolar das folhas das plantas *Butia capitata* var. *capitata* (Coquinho-do-cerrado), *Solanum lycocarpum* (Lobeira), *Stryphnodendron polyphyllu* (Barbatimão), *Miconia albicans* (Quaresmeira-branca) e *Aegiphila lhotziana* (Tamanqueira), coletadas no cerrado de São Carlos, SP, microrganismos endofíticos produtores de substâncias bioativas com características sugestivas do gênero *Streptomyces*. As amostras foram identificadas através de características macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfo-tintoriais. O potencial antagônico foi testado contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 10231. Vinte e seis amostras de endofíticos foram isoladas e duas selecionadas, provenientes de *Butia capitata* var *capitata* e de *Miconia albicans*. Ambas apresentaram características de *Streptomyces*. O endofítico isolado de *Butia* inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (13 mm) e de *Enterococcus faecalis* (11 mm), e o isolado de *Miconia* não apresentou bioatividade contra os microrganismos testados.

PALAVRAS-CHAVE: Cerrado; substâncias bioativas; endofíticos; *Streptomyces*

ABSTRACT

The Brazilian tropical savannah occupies a large area in Brazil and includes a high variety of plant species. This diversity is an important source of endophytic microorganisms consisting mainly of bacteria and fungi that inhabit the interior of plants. Endophytes can produce bioactive metabolites that exhibit activities of biotechnological interest, such as antibacterial and antifungal action. The aim of this study was to isolate from *Butia capitata var capitata* (Coquinho-do-cerrado), *Solanum lycocarpum* (Lobeira), *Stryphnodendron polyphyllu* (Barbatimão), *Miconia albicans* (Quaresmeira-white) and *Aegiphila lhotziana* (Tamanqueira), collected on Brazilian tropical savannah at São Carlos, SP, endophytic microorganisms with suggestive features of the genus *Streptomyces*. The samples were characterized through macroscopic, physiological, biochemical and morph-dying characteristics. The antagonistic potential was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* ITB 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 and *Candida albicans* ATCC 10231. 26 samples of endophytic microorganisms were isolated and selected two, one from *Butia capitata var capitata* and another one from *Miconia albicans*. Both presented microbiological characteristics of *Streptomyces*. The microorganism isolated from *Butia* inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* (13 mm) and *Enterococcus faecalis* (11 mm), and the one isolated from *Miconia* did not show bioactivity against the pathogens tested.

Key-words: Brazilian tropical savannah; Bioactive substances; endophytes; *Streptomyces*

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma do país, estendendo-se desde a floresta Amazônica até os estados de São Paulo e Paraná, ocupando, aproximadamente, 23% do território brasileiro. Segundo RATTER et al. (1997), o Cerrado, é uma das mais ricas savanas do mundo, comportando imensa diversidade de fauna e flora, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica (RATTER et al., 1997; RIBEIRO; WALTER, 1998). De acordo com CASTRO et al. (1999) a flora do cerrado é composta por cerca de 2.000 espécies arbóreas e 5.250 espécies herbáceas e subarbustivas, sendo muito mais rica do que os pesquisadores pensavam.

A biodiversidade do cerrado brasileiro está comprometida, visto que sua cobertura original já foi reduzida em mais de 37% (FELFILI et al., 2002). A destruição da flora tem relação direta com a frequência das queimadas e dos fatores antrópicos (RIBEIRO; WALTER, 1998). Tal destruição relaciona-se com comprometimentos inerentes à degradação dos recursos naturais e afeta o potencial para a realização de pesquisas. Segundo ASSUNÇÃO e FELFILI (2004), para a preservação de tal patrimônio natural brasileiro, são imprescindíveis o incentivo para a proteção e a valorização científica da área.

A extensão do bioma sobre as regiões do país com diferentes circunstâncias ambientais favorece a multiplicidade de compostos químicos que as plantas e/ou seus microrganismos endofíticos são capazes de sintetizar (CHALLIS e HOPWOOD, 2003). Isso gera um enorme potencial para a biossíntese de diversos compostos naturais com importância científica e tecnológica (RANGEL et al., 2007).

A diversidade das plantas associada a dos microrganismos é uma vasta área de exploração científica. Microrganismos endofíticos habitam o interior de plantas sem

causar prejuízos aparentes aos hospedeiros e podem produzir metabólitos secundários bioativos (CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

Entre os endofíticos, destacam-se os actinomicetos (STROBEL, 2003) e o gênero *Streptomyces* spp. é um dos maiores produtores de metabólitos bioativos com aplicações na medicina e na indústria (INBAR et al., 2005) produzindo mais de 80% dos antibióticos conhecidos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

A utilização de microrganismos endofíticos está associada a sua capacidade metabólica de produção de moléculas bioativas, potencialmente úteis na inibição de patógenos importantes em saúde pública. O isolamento destes microrganismos a partir de plantas do cerrado é importante, gerando a aplicabilidade em biotecnologia.

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

O extenso Cerrado brasileiro comporta o crescimento de diversas espécies vegetais. Dentre as árvores do Cerrado, destacam-se algumas que apresentam propriedades medicinais (RATTER et al., 1997; RIBEIRO; WALTER, 1998).

Solanum lycocarpum, popularmente conhecida como Lobeira, é comumente encontrada no cerrado brasileiro e muito freqüente em áreas alteradas pelo homem, como beira de estradas (SANTOS et al., 2002). É um arbusto ou arvoreta de até 5 m de altura, com copa arredondada e aberta. Seus frutos atingem até 13 cm de diâmetro e representam até 50% da dieta alimentar do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), acreditando-se que tenham ação terapêutica contra o verme-gigante-dos-rins, que é muito freqüente e geralmente fatal nessa espécie animal. Também são utilizados na alimentação de populações tradicionais para o preparo de doces e geléias. A medicina popular relata que as folhas são consideradas anti-reumáticas e as flores e os frutos são usados como tônicos contra asma, gripes e resfriados. Há relatos da atividade

hipoglicemiante do polvilho produzido a partir de seu fruto (VIDAL et al., 1999; VASCONCELOS et al., 2003).

As espécies do gênero *Stryphnodendron*, são vulgarmente conhecidas como “barbatimão” e são nativas do cerrado brasileiro, destacando-se pelas suas propriedades medicinais. Produzem uma elevada concentração de taninos em sua casca, são amplamente utilizadas na medicina popular, na indústria do couro e na fabricação de tintas para escrita (CORREA, 1978 apud CARVALHO et al., 2009). A espécie é descrita como arbusto com caule e ramos tortuosos, revestida de pouca folhagem, copa rala e irregular, casca rugosa, flores creme ou quase branca. O fruto é uma vagem grossa, um pouco carnosa, quase cilíndrica, com aproximadamente 10 cm de comprimento (FELFILI; CRUVINEL, 2003). Estudos demonstram que essa planta possui atividade antiinflamatória, protetora da mucosa gástrica, cicatrizante, antioxidante, antiviral, antiprotozoária e antimicrobiana (MELO et al., 2007). SOUZA et al. (2007) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato seco das cascas de *Stryphnodendron adstringens* frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, com bons resultados.

Miconia albicans é uma espécie arbórea pertencente à família *Melastomataceae*, distribuída principalmente nas regiões tropicais, abundante em nossa flora e muito comum no cerrado. Sua reprodução é feita por sementes (GORLA; PEREZ, 1997). De acordo com DAMASCOS, PRADO e RONQUIM (2005), esta espécie cresce em áreas ensolaradas como arbustos ou pequenas árvores alcançando aproximadamente 3,0 metros. A inserção de suas folhas ocorre de forma oposta e através de inserções em cruz e apresenta textura frontal coriácea. Suas folhagens são permanentes durante o ano inteiro. Estudos sugerem as propriedades analgésica e antiinflamatória em extrato cru da planta em seus testes (VASCONCELOS et al., 2003). A ausência de herbívoros nessa

espécie vegetal pode indicar um mecanismo químico de defesa anti-herbívoro eficiente (DAMASCOS et al., 2005). Trabalhos descrevendo a atividade do extrato da planta podem ser encontrados, como o de RODRIGUES et al. (2008) que demonstraram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos e clorofórmicos das folhas de *Miconia* spp.

Aegiphila é um gênero constituído de aproximadamente 180 espécies. As árvores pertencentes ao gênero são pequenas e encontradas em todo Brasil, conhecidas como "Papagaio" ou "Tamanqueira". Seu porte arbóreo é de 4 a 7 m, suas folhas possuem margem serrada e pêlos macios e os frutos são consumidos pela avi-fauna. Possuem propriedades medicinais, algumas são tidas como antiofídicas e existem relatos da ação dos extratos dessas plantas com atividade antiinflamatória (FONSECA et al., 2004).

Butia capitata (coquinho-azedo) é uma palmeira nativa do cerrado, podendo ser encontrada também em terrenos arenosos e atingem até 5 m. Desempenha importante papel socioeconômico junto a comunidades do Norte de Minas, em função do extrativismo de seus frutos, embora possuindo poucas informações científicas (NUNES et al., 2008; FARIA et al., 2008) sobre seu potencial terapêutico.

A diversidade das plantas associada a dos microrganismos é uma incomensurável área de exploração científica. 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).

Microrganismos endofíticos, por definição, são geralmente fungos e bactérias que habitam o interior de plantas, podendo ser encontrados em folhas, ramos e raízes de vegetais e que não causam prejuízos aparentes aos hospedeiros (CHALLIS;

HOPWOOD, 2003). Eles recebem nutrientes e proteção da planta e produzem compostos químicos, como antibióticos e enzimas, que em determinadas condições protegem e auxiliam a planta (NETO et al., 2003). Tais microrganismos podem residir no interior das células vegetais (JACOBS et al., 1985), no espaço intercelular (PATRIQUIN; DORING-BEREINER et al., 1978), no sistema vascular (BELL et al., 1995) e em sementes (POSADA; VEGA, 2005).

Os endofíticos que habitam as raízes das plantas são bastante estudados devido a sua importância na agricultura, especialmente pela sua participação na fixação de nitrogênio pelo vegetal. Por outro lado, o endófito albergado em partes aéreas das plantas apenas recentemente vem despertando o interesse dos cientistas, particularmente pelo seu potencial de produção de metabólitos secundários de interesse econômico (SOUZA et al., 2004).

Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos potencialmente produtores de compostos de interesse biotecnológico, como por exemplo hormônios, antibióticos e antitumorais, ainda não classificados e pouco conhecidos (NETO et al., 2003; SOUZA et al., 2004).

Há estudos que afirmam que determinados microrganismos endofíticos também podem atuar na produção de compostos com atividades biológicas que resultam em certa toxicidade (NETO et al., 2003).

Os metabólitos produzidos por endofíticos podem também apresentar capacidade de estimular o crescimento de plantas, seja através do auxílio durante a fixação do nitrogênio, da produção de fitohormônios, do antagonismo contra patógenos ou da resistência a drogas (NETO et al., 2003).

O biocontrole pode também estar relacionado com microrganismos endofíticos, uma vez que estes competem com fitopatogênicos por nutrientes, produção de

substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou induzindo a planta a desencadear resistência (NETO et al., 2003). Estudo realizado por SOUSA et al. (2006) têm demonstrado o potencial de bactérias endofíticas como agentes de controle biológico do nematóide *Meloidoyne incognita* em mudas de tomateiro.

O controle de pragas e/ou doenças também vem sendo estudado através da tecnologia do DNA recombinante, pois esta permite a expressão de genes marcadores nos microrganismos endofíticos de interesse permitindo o estudo da colonização destes na planta, ao facilitar a sua detecção no hospedeiro e permitir o seu monitoramento na planta e no meio ambiente (MURRAY et al., 1992).

A nível molecular, além das descobertas de genes ligados ao controle biológico, pode-se citar a produção de enzimas, a biorremediação de compostos tóxicos e a produção de metabólitos secundários com atividades terapêuticas por microrganismos endofíticos (NETO et al., 2003).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial dos microrganismos endofíticos como produtores de substâncias antimicrobianas, como as fitoalexinas (NETO; DIETRICH, 1992), de substâncias antitumorais, como o taxol (STIERLE et al., 1993) e a rentamicina (INOUE et al., 2007), de substâncias antimicóticas, como a cryptocandina (STROBEL et al., 1999), entre outros.

Podemos destacar, entre os microrganismos endofíticos, os actinomicetos que são classificados como bactérias Gram-positivas, as quais podem desenvolver micélio superficial e submerso, com formação de hifas de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro. Para os actinomicetos maiores, as hifas assemelham-se às de fungo em relação as suas características e tamanho. Muitos ainda apresentam a formação de esporos aéreos, conídios, dispostos em cadeia ou em esporângio (STROBEL, 2003).

Estes constituem um grupo de bactérias conhecido principalmente por sua ampla produção de metabólitos secundários (antibióticos; enzimas extra-celulares, entre outros) (INBAR et al., 2005). A produção destas substâncias, em especial os antibióticos, delinea a interação das populações dos actinomicetos com outras populações microbianas (PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1999).

Os actinomicetos, além de serem isolados como endofíticos, também podem ocorrer em populações no solo principalmente na forma de esporos, exceto em períodos em que existam nutrientes disponíveis e há predominância da fração hifa, colonizando resíduos animais e vegetais (HERRON; WELLINGTON, 1990). São também utilizados como agente de controle biológico, devido a sua ampla produção de antibióticos e compostos bioativos que atuam controlando fitopatógenos (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). De acordo com SOARES et al. (2006), os actinomicetos podem ser considerados como potenciais agentes de biocontrole de doenças foliares do inhame devido a bioatividade de seus metabólitos secundários.

Streptomyces fazem parte do grupo dos actinomicetos. As espécies de *Streptomyces* têm um micélio aéreo bem desenvolvido, não fragmentado, produzem cadeias de esporos por segmentação de hifas e são aeróbios estritos. Seu habitat é o interior de plantas e o solo, produzindo odor de terra característico. São Gram-positivos e filamentosos. Suas colônias são macias, mas se tornam pulverulentas ou algodonosas à medida que o micélio aéreo e os esporos se desenvolvem. As colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de sete a dez dias para desenvolver suas hifas aéreas (HOPWOOD, 2007).

Uma grande parte de microrganismos oriundos do solo pertence a esse grupo de bactérias, mas também podem ser encontrados naturalmente em outros nichos, inclusive em interações com plantas (SARDI et al., 1992), como endofíticos.

O gênero *Streptomyces* spp. tem sido um dos mais estudado devido a diversidade de metabólitos secundários por ele produzidos com aplicações na medicina e na agropecuária (INBAR et al., 2005). Tal fato justifica o grande interesse comercial nesse grupo de bactérias, pois mais de 80% dos antibióticos produzidos industrialmente são processados por espécies desse gênero (CHALLIS; HOPWOOD, 2003).

CASTILLO et al. (2002), isolaram *Streptomyces* spp. a partir de *Kennedia nigricans*, planta medicinal nativa do norte da Austrália, produtora de mununbicina E4 e E5, um antibiótico de amplo espectro contra patógenos humanos e de plantas.

Streptomyces spp. também foi isolado de *Aegiceras comiculatum* e a produção de ciclopentanos foi detectada através do estudo desenvolvido por LIN et al. (2005). Outro exemplo foi o trabalho realizado por STROBEL (2007) através do qual ficou constatada a atividade antifúngica de três *Streptomyces* endofíticos isoladas das plantas medicinais *Thottea grandiflora*, *Polyalthia* spp. e *Mapania* spp.

O uso incorreto e/ou inadequado de antibióticos e fungicidas tem gerado o sério problema da resistência por parte de alguns microrganismos. Devido a este fato, pesquisas na tentativa de descoberta de novos antimicrobianos, vêm sendo realizadas por todo o mundo. Pretendeu este trabalho verificar a produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados de plantas do Cerrado de São Carlos – SP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados de plantas do Cerrado de São Carlos – SP.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos endofíticos a partir das plantas: *Butia capitata* var *capitata*, *Solanum lycocarpum*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Miconia albicans* e *Aegiphila lhotzliana*, nativas do cerrado da região de São Carlos, SP;

- Caracterizar fenotipicamente os isolados enfatizando características de morfologia colonial e determinando características macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfo-tintoriais;

- Realizar a triagem dos *Streptomyces* isolados considerando suas características fenotípicas;

- Avaliar o potencial antagônico dos isolados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 10231.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sítio de coleta

As coletas foram realizadas em uma reserva de vegetação do Cerrado na Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), Brasil, situada a 21°58' S, 47°52' W e localizada a 850 m acima do nível do mar. O clima regional é tropical com um período seco durante o inverno e parte da primavera (Junho-Setembro) seguida de um período úmido durante o verão e a parte do outono (Outubro-Março).

3.2 Material vegetal

As plantas estudadas foram *Butia capitata* var *capitata*, *Solanum lycocarpum*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Miconia albicans* e *Aegiphila lhotziana*, popularmente conhecidas como “Coquinho-azedo”, “Lobeira”, “Barbatimão”, “Quaresmeira-branca” e “Tamanqueira”, respectivamente.

O material vegetal foi selecionado em seu habitat natural, Cerrado de São Carlos-SP. Foram coletadas amostras constituídas por 25 g de folhas com aparência saudável, de cada planta supracitada, acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas até o laboratório para a realização dos procedimentos analíticos de isolamento e identificação de microrganismos endofíticos.

3.3 Isolamento dos microrganismos endofíticos

As coletadas foram submetidas à lavagem superficial em água corrente para remoção de substâncias aderidas à superfície.

Para a desinfecção e eliminação da população epifítica, foram utilizadas imersões sucessivas em álcool 70% (3 min), solução de hipoclorito de sódio 3% (10 min), álcool 70% (1 min) e enxágües em água destilada esterilizada (3 vezes) (ARAÚJO, et al., 2002).

Posteriormente, 25 g das amostras foram trituradas em 225 mL de solução salina (0,85%) e filtradas em filtro de papel (100% celulose). Foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) e alíquotas de 200 µl foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo os meios ISP2A (ágar extrato de malte e levedura adicionado de amido 10%), YE (ágar extrato de levedura) e GYM (ágar extrato de levedura, de malte adicionado de carbonato de cálcio) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). As purificações das colônias bacterianas isoladas dos tecidos vegetais foram realizadas por esgotamento utilizando-se alças de níquel cromo em ISP2A, YE e GYM.

3.4 Caracterização fenotípica

Na identificação fenotípica de *Streptomyces* spp. foram analisadas e utilizadas características: (a) macroscópicas, (b) fisiológicas, (c) bioquímicas e (d) morfológicas-tintoriais (HASEGAWA, 1983; FISHER et al., 2003).

3.4.1 Características macroscópicas

Foram observados por até 15 dias de incubação a 28° C em placas contendo os meios ISP2A, YE e GYM o tamanho, aspecto das bordas, aspecto e coloração frontal e do verso das colônias, consistência, além de sua capacidade de adesão ao substrato.

Foram consideradas colônias típicas de *Streptomyces* spp. as que apresentaram coloração branco-acinzentada, sem brilho, com aparência pulverulenta ou cotonosa com adesão colonial penetrando fortemente no ágar (STROBEL, 2003).

3.4.2 Características fisiológicas

De acordo com GOODEFELLOW e WILLIAMS (1983), muitas linhagens de actinomicetos, incluindo *Streptomyces* são capazes de degradar polissacarídeos complexos como amido, pectina e quitina, por produzirem a enzima amilase. Na assimilação de fontes de carbono foi utilizado o meio ISP2A. A utilização do amido como fonte de carbono pôde ser observada quando houve degradação deste carboidrato, resultando em formação de halo. Como controle negativo foi utilizado o meio ISP2 (sem o amido). A não formação do halo demonstra que não houve degradação de amido.

3.4.3 Características bioquímicas

Na análise das características bioquímicas, o odor de “terra molhada” foi avaliado. Esse odor sugere a produção de geosmina, composto produzido por alguns grupos de microrganismos incluindo a maioria dos *Streptomyces*, algumas espécies de cianobactérias e alguns fungos (JIANG; CANE, 2008).

Outra análise bioquímica realizada foi a verificação da produção de catalase. A partir de culturas do microrganismo em meio líquido TSB (caldo triptona-soja) com 15 dias de incubação (28 °C) foi transferida uma alíquota do crescimento microbiano, utilizando-se uma espátula de madeira, para uma lâmina de vidro. Duas gotas de solução de peróxido de hidrogênio (10% v/v) foram adicionadas à alíquota microbiana e observada a reação. O desprendimento de bolhas de gás demonstra a presença da enzima catalase produzida pelo microrganismo. A cepa de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle positivo.

3.4.4 Características morfo-tintoriais

Para a análise morfológica-tintorial foi realizado o exame microscópico dos esporos, coloração de Gram e coloração de Ziehl Neelsen (álcool-ácido resistente). Actinomicetos e *Streptomyces* são Gram +, não álcool-ácido resistentes e a maioria apresenta esporos.

3.5 Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada)

Para a detecção de metabólitos secundários apresentando bioatividade contra importantes patógenos, o teste da sobrecamada foi realizado.

Colônias de microrganismos endofíticos selecionadas foram diluídas em solução salina (0,85%) e alíquotas de 20µL foram depositadas em placas de Petri contendo os meios ISP2A, YE e GYM e incubadas a 28°C por 10 dias em média. As colônias foram tratadas para inativação microbiana através do depósito de 1 ml de clorofórmio na superfície interna da placa de Petri durante 20 minutos. Posteriormente as placas foram mantidas semi-abertas durante 30 minutos para a evaporação dos vapores da substância. Microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475 e *Shigella sonnei* ATCC 1578) e o fungo leveduriforme (*Candida albicans* ATCC 10231), foram usados como indicadores e utilizados no teste de antibiose (MOURA; ROMEIRO, 1999). Estes microrganismos foram selecionados pela importância em Saúde Pública, uma vez que são relacionados a surtos de infecções hospitalares e alimentares, além de serem implicados em outras doenças. Para tal, as cepas que eram mantidas em bacterioteca a - 20°C foram reativadas em um tubo contendo caldo BHI (caldo-infusão-cérebro-coração). Após incubação (24 h / 37°C), 200 µL das culturas previamente reativadas foram transferidas a um tubo contendo 10 mL de BHI semi-sólido. Este foi agitado e a solução vertida na superfície de placas contendo cada um dos microrganismos previamente inativados. As placas foram incubadas (37 °C por 24–48 h) para verificação e mensuração de halos de inibição (MOURA; ROMEIRO, 1999).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As plantas *Butia capitata* var *capitata* (Coquinho-azedo), *Solanum lycocarpum* (Lobeira), *Stryphnodendron polyphyllum* (Barbatimão), *Miconia albicans* (Quaresmeira-branca) e *Aegiphila lhotzkiana* (Tamanqueira) foram processadas visando o isolamento de microrganismos endofíticos conforme metodologia descrita anteriormente.

Foram isolados 26 (vinte e seis) microrganismos, sendo 6 (seis) a partir de folhas da planta *Butia capitata* var *capitata*, 5 (cinco) da *Solanum lycocarpum*, 4 (quatro) da *Stryphnodendron polyphyllum*, 6 (seis) da *Miconia albicans* e 5 (cinco) da *Aegiphila lhotzkiana* (Figuras 1 a 26).

Microrganismos isolados a partir do processamento da planta *Butia capitata* var *capitata* (microrganismo 1 ao microrganismo 6):



Figura 1

Características macroscópicas
do isolado (1) de *Butia capitata*



Figura 2

Características macroscópicas
do isolado (2) de *Butia capitata*

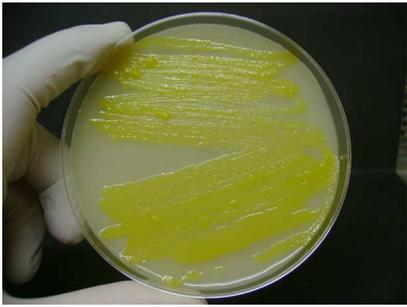


Figura 3

Características macroscópicas
do isolado (3) de *Butia capitata*



Figura 4

Características macroscópicas
do isolado (4) de *Butia capitata*



Figura 5

Características macroscópicas
do isolado (5) de *Butia capitata*



Figura 6

Características macroscópicas
do isolado (6) de *Butia capitata*

Microrganismos isolados a partir do processamento da planta *Solanum lycocarpum* (microrganismo 7 ao microrganismo 11):



Figura 7

Crescimento colonial do isolado (7)
a partir de *Solanum lycocarpum*

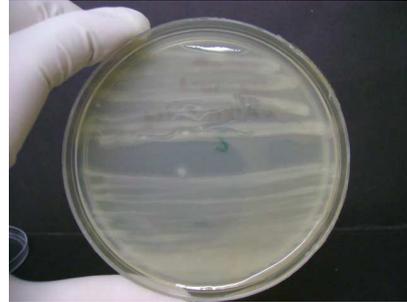


Figura 8

Crescimento colonial do isolado (8)
a partir de *Solanum lycocarpum*



Figura 9

Crescimento colonial do isolado (9)
a partir de *Solanum lycocarpum*



Figura 10

Crescimento colonial do isolado (10)
a partir de *Solanum lycocarpum*

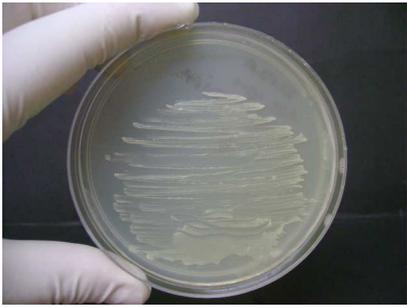


Figura 11

Crescimento colonial do isolado (11)

a partir de *Solanum lycocarpum*

Microrganismos isolados a partir do processamento da planta *Stryphnodendron polyphyllum* (microrganismo 12 ao microrganismo 15):



Figura 12

Características do isolado (12)

de *Stryphnodendron polyphyllum*



Figura 13

Características do isolado (13)

de *Stryphnodendron polyphyllum*



Figura 14

Características do isolado (14)
de *Stryphnodendron polyphyllum*



Figura 15

Características do isolado (15)
de *Stryphnodendron polyphyllum*

Microrganismos isolados a partir do processamento da planta *Miconia albicans*
(microrganismo 16 ao microrganismo 21):



Figura 16

Características de crescimento
do isolado (16) de *Miconia albicans*



Figura 17

Características de crescimento
do isolado (17) de *Miconia albicans*



Figura 18

Características de crescimento
do isolado (18) de *Miconia albicans*



Figura 19

Características de crescimento
do isolado (19) de *Miconia albicans*



Figura 20

Características de crescimento
do isolado (20) de *Miconia albicans*



Figura 21

Características de crescimento
do isolado (21) de *Miconia albicans*

Microrganismos isolados a partir do processamento da planta *Aegiphila lhotzkiana* (microrganismo 22 ao microrganismo 26):



Figura 22

Crescimento colonial do isolado (22)
de *Aegiphila lhotzkiana*



Figura 23

Crescimento colonial do isolado (23)
de *Aegiphila lhotzkiana*



Figura 24

Crescimento colonial do isolado (24)
de *Aegiphila lhotzkiana*



Figura 25

Crescimento colonial do isolado (25)
de *Aegiphila lhotzkiana*



Figura 26

Crescimento colonial do isolado (26)

de *Aeigiphila lhotzkiana*

Após a análise das características fenotípicas dos microrganismos endofíticos isolados, duas linhagens que apresentaram características típicas de *Streptomyces* foram selecionadas (Figuras 27 e 28), sendo representadas pelos microrganismos 2 e 21, isolados de *Butia* e *Miconia*, respectivamente. De acordo com HOPWOOD (2007) as colônias de *Streptomyces* são macias, mas se tornam pulverulentas ou algodonosas à medida que o micélio aéreo e os esporos se desenvolvem. As colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de sete a dez dias para desenvolver suas hifas aéreas.

Pode-se observar através das figuras 27 e 28 as características macroscópicas das amostras sugestivas de *Streptomyces*. O microrganismo 2 (figura 27) apresentou bordas regulares, frente branco-acinzentada com aparência pulverulenta, reverso amarelado e forte aderência ao Ágar. As mesmas características foram observadas na figura 28, que representa o microrganismo 21.

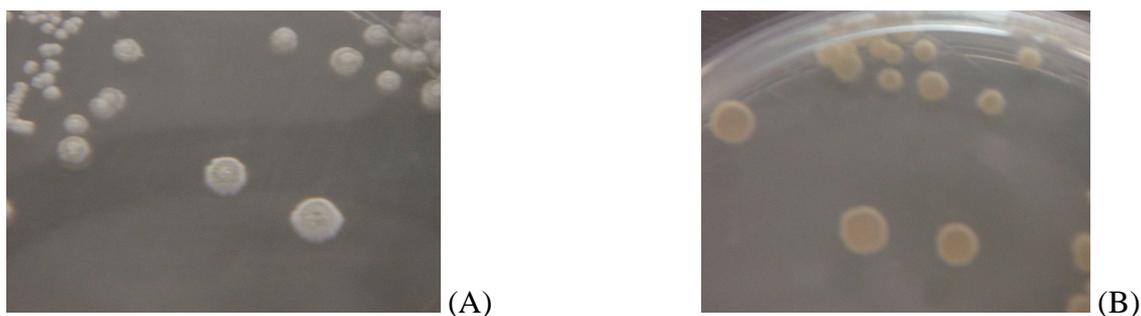


Figura 27 — Características morfológicas do microrganismo endofítico isolado (amostra 2) de *Butia capitata* var *capitata*: (A) frente e (B) verso.

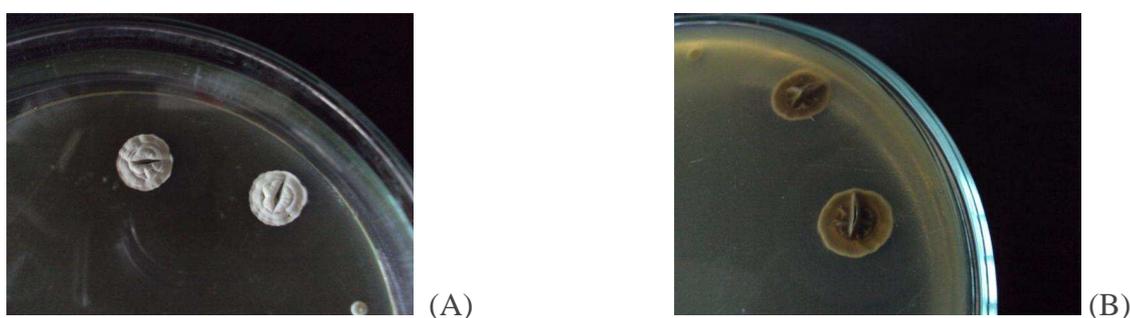


Figura 28 – Características morfológicas do microrganismo endofítico isolado (amostra 21) de *Miconia albicans*: (A) frente e (B) verso.

O microrganismo 2 apresentou melhor crescimento no meio GYM enquanto que o 21 cresceu melhor no meio YE. Estas diferenças no crescimento de cada isolado em meios seletivos podem ser explicadas, em parte, através de características metabólicas de cada um dos endofíticos. Em um estudo realizado por KORBOKANDI et al. (2007) foi verificado o crescimento de *Streptomyces clavurigerus* relacionado à produção do ácido clavulânico quando semeado em meio GYM. SEJINY (1991), por sua vez, constatou a produção de antimicrobiano por *Streptomyces*, cultivado em meio YE, efetivo contra *S. aureus*.

Foram submetidos ao teste de assimilação de fontes de carbono os dois microrganismos supracitados. As figuras 29 e 30 demonstram o resultado do teste dos microrganismos 2 e 21, respectivamente. A formação de um halo no meio de cultura,

quando cultivados em ISP2A, ocorreu devido à degradação da fonte de carbono (amido), sugerindo sua utilização pelo microrganismo. As duas amostras apresentaram crescimento e demonstraram habilidade em degradar o amido. CLARKSON et al. (1987) verificaram a utilização de amido por *Actinomyces viscosus*. Os resultados de Esse mesmo resultado foi obtido por RODRIGUES (2006) que verificou o consumo de amido por 98% da amostra de actinomicetos isolados em uma leira de compostagem composta de resíduos domésticos.



Figura 29- Perfil de degradação de amido pelo Microrganismo 2

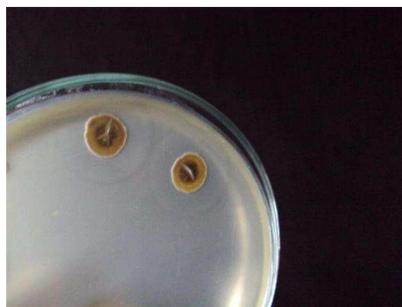


Figura 30- Perfil de degradação de amido pelo Microrganismo 21

A produção de geosmina, verificada através do “cheiro de terra-molhada” foi confirmada nas duas amostras. Vale ressaltar que o odor descrito acima foi mais evidenciado na amostra 1 (microrganismo 2) quando comparada a amostra 2 (microrganismo 21). Tal fato pode sugerir que o primeiro microrganismo produz geosmina em maior concentração que o segundo. Segundo JIANG; CANE (2008) a geosmina é produzida por alguns microrganismos, inclusive a maioria das *Streptomyces*.

O teste da catalase foi realizado e as duas amostras mostraram-se positivas ao ser observado o desprendimento de bolhas de gás. Alguns membros dos actinomicetos como o *Streptomyces coelicolor*, espécie mais estudada, produz três catalases distintas

(HAHN *et al.*, 2000) para proteger-se do stress osmótico e oxidativo, e permitir crescimento e diferenciação apropriados. A catalase mais importante (*cat A*) é induzida pelo peróxido de hidrogênio, e é requerida para eficiente crescimento aeróbico.

As duas amostras foram submetidas a coloração de GRAM e de Ziehl Neelsen (álcool-ácido resistente). Observou-se a presença de microrganismo GRAM (+) e não álcool-resistentes. Os resultados detectados no presente estudo corroboram com dados obtidos por OLIVEIRA (2003) e RODRIGUES (2006).

Tabela 1: Determinação fenotípica e características macroscópica, morfo-tintorial, fisiológica e bioquímica de microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos, SP.

Microrganismo	Meio de cultura	Características macroscópicas coloniais	Características morfo-tintoriais	Características fisiológicas e bioquímicas
2	GYM	bordas regulares, frente branco-acinzentada com aparência pulverulenta, reverso alaranjado e forte aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Forte odor de geosmina, cat + e degradação de amido
21	YE	bordas regulares, frente branco-acinzentada com aparência pulverulenta, reverso alaranjado e forte aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Leve odor de geosmina, cat + e degradação de amido

O potencial antimicrobiano foi verificado através da realização do teste da sobrecamada.

Dentre os microrganismos endofíticos isolados, apresentou bioatividade o microrganismo 2, isolado de *Butia capitata* var *capitata*. Tal microrganismo atuou contra *Staphylococcus aureus* - ATCC 29213 (figura 31) com formação de halo de inibição de 13 mm e contra *Enterococcus faecalis* - ATCC 29212 (figura 32) com halo de 11 mm de diâmetro. Não foi observada atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475 e *Shigella sonnei* ATCC 1578 e *Candida albicans* ATCC 10231.



Figura 31- Bioatividade do microrganismo endofítico 2 isolado de *Butia capitata* var *capitata* contra *S. aureus* e mensurada por halos de inibição



Figura 32- Bioatividade do microrganismo endofítico 2 isolado de *Butia capitata* var *capitata* contra *E. faecalis* mensurada por halos de inibição

Na tabela 2 é apresentada a inibição de microrganismos indicadores por endófitos. Observa-se que apenas os isolados de *Butia*, apresentaram potencial inibitório. A antibiose foi observada contra *E. faecalis* (11 mm) e *S. aureus* (13 mm). O isolado de *Miconia*, não inibiu os microrganismos patogênicos testados.

Tabela 2: Antibiose apresentada por microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos, SP e mensurada por halos de inibição (mm).

Microrganismos endofíticos	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>
02 (isolado de <i>Butia</i>)	11	13	-	-	-
21 (isolado de <i>Miconia</i>)	-	-	-	-	-

CASTILLO et al. (2003) constataram a produção de substâncias bioativas por *Streptomyces* isolado de uma árvore australiana (*Grevillea pteridifolia*). Observaram que a "kakadumicina A" apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram (+). RATTI et al. (2008) isolaram da planta *Prunus* spp. microrganismo endofítico que apresentou bioatividade contra *S. aureus*, da mesma forma que o isolado de *Butia carpitata* isolado no presente estudo.

EFTKHAR et al. (2009) em seu estudo com o óleo oriundo de *Satureja spicigera*, verificaram que este apresentou bioatividade contra *E. faecalis*. Dados similares podem ser encontrados no estudo realizado por RODRIGUES (2006) no qual se verificou que o gênero *Streptomyces* representou 70% dos microrganismos isolados

produtores de compostos bioativos, seguidos de *Nocardia* com 20% e *Terrabacter* com 8%, com destaque para a eficácia biocida contra bactérias Gram (+).

O microrganismo 21 não apresentou bioatividade contra os microrganismos-testados. Tal resultado pode sugerir que o microrganismo isolado e a Quaresmeira-branca estabelecem uma relação planta-endófito neutra (NETO, 2003) ou atuam de maneira simbiótica em que não há formação de substâncias antimicrobianas. Há possibilidade do microrganismo supracitado possuir outros tipos de bioatividades, como por exemplo, atividade anti-tumoral, não testados neste estudo. Portanto outros bioensaios poderiam ser realizados para melhor se avaliar a produção de metabólitos bioativos produzidos pelo endófito isolado da Quaresmeira-branca.

5. CONCLUSÕES

Foram selecionadas cinco plantas do Cerrado de São Carlos-SP e isolados 26 microrganismos endofíticos.

As plantas estudadas foram *Butia capitata* var *capitata*, *Solanum lycocarpum*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Miconia albicans* e *Aegiphila lhotziana*, sendo isolados 6, 5, 4, 6 e 5 microrganismos endofíticos, respectivamente.

Os microrganismos isolados foram analisados e selecionados de acordo com características macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfo-tintoriais sugestivas de actinomicetos. Dentre as 26 amostras, foram selecionadas duas, o microrganismo 2, endofítico de *Butia capitata* var *capitata* e o 21 de *Miconia albicans*. Ambos apresentaram características de *Streptomyces*.

Foi avaliado o potencial antagonista microbiano através do teste da sobrecamada pelos dois microrganismos supracitados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 10231.

O microrganismo 2 inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (13 mm de halo inibitório) e de *Enterococcus faecalis* (11 mm). O microrganismo 21 não apresentou bioatividade contra os microrganismos indicadores testados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR.,; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, Jw.L.; AZEVESO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 4906-4914, 2002.

ASSUNÇÃO, S.L.; FELFILI, J. M. Fitossociologia de um fragmento de cerrado *sensu stricto* na APA do Paranoá, DF, Brasil. *Acta bot. bras.* 18(4): 903-909. 2004.

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

CARVALHO, F. A.; JACOBSON, T. K. B.; COSTA, A. F.; SANTOS, A. A. B. S.; HAY, J. D. V. Estrutura e distribuição espacial do Barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) em uma área de cerrado no sudeste de Goiás. *Revista Tropica – Ciências Agrarias e Biológicas.* 3 (1), p. 14, 2009.

CASTILLO, U.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. In *Microbiology.* 148: 2675-2685, 2002.

CASTILLO, U. *et al.* Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 224(2): 183-90, 2003.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; TAMASHIRO, J. Y.; SHEPHERD, G. J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 86 (2): 192-224. 1999.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 14555-14561, 2003.

CLARKSON, B.H.; KRELL, D.; WEFEL, J.S.; CRALL, J.; FEAGIN, F.F. In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. In *J. Dent. Res.*, 66(3): 795-798, 1987.

DAMASCOS, M. A.; PRADO, C. H. B. A.; RONQUIM C. C. Bud Composition, Branching Patterns and Leaf Phenology in Cerrado Woody Species. In *Ann. Bot.* 96(6):1075-1084, 2005.

EFTEKLAR, F.; RAEI, F.; YOUSEFZADI, M.; EBRAHIMI, S. N.; HADIAN, J. Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. In *Z Naturforsch [C]. J. Biosci.*, 64(1-2): 20-24, 2009.

FARIA, J. P.; ARELLANO, D. B.; GRIMALDI, R.; SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização química da amêndoa de coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). *Rev. Bras. Frutic.* 30(2): 549-552, 2008.

FELFILI, J. M.; NOGUEIRA, P.E.; SILCA JR, M. C.; MARIMON, B.S.; DELITTI, W. B. C. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa, MT. *Acta Botânica Brasílica*. 16 (1): 102-112, 2002.

FELFILI, J.M.; CRUVINEL, H. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) no Distrito Federal, Brasil. *Revista Árvore*, Viçosa-MG, v.27, n.5, p.735-745, 2003.

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

FONSECA, E. N. ; FIGER, Alex ; LEITAO, S. G. . 3,5-Di-Caffeoylquinic Acid From The Fruits Of *Vitex Cymosa* Bertero (Verbenaceae). *XIII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina Paolo Ceccherelli*, v. 0, 2004.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. *Caderno de Saúde Pública*. 11 (3): 495-500, 1995.

GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T., Ecology of actinomycetes. *Rev. of Microbiol.*, 37, 24-32, 1983.

GORLA, C. M; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia albicans* Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit E

Drimys winteri Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. *Revista Brasileira de Sementes*, 19 (2), p.260-265, 1997.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. In *J. Nat. Prod.*, 69: 509-526, 2006.

HAHN, J.S.; OH, S.Y.; CHATER, K.F.; CHO, Y.H.; ROE, J.H. (2000). H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. In *J. Biol. Chem.*, 275(49):38254-38260.

HASEGAWA, T.; TAKIZAWA, M.; TANIDA, S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic *Actinomycetes*. In *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29: 319-322, 1983.

HERRON, P. R.; WELLINGTON, E. M. H. New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amend and monsterile soil. *Applied and Enviromental Microbiology*. 56 (5): 1406-1412, 1990.

HOPWOOD, D. A. Therapeutic treasures from the deep. In *Nat. Chem. Biol.*, 3(8): 457-458, 2007.

INBAR, E. et al. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of streptomycetes. *Microbial Ecology*. v.50: 71-81, 2005.

INOUE, O. O. et al., Carbon Catabolite repression of Retamycin production by *Streptomyces olidensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:58-61, 2007.

JIANG, J.; CANE, D. E. Geosmin Biosynthesis. Mechanism of the Fragmentation–Rearrangement in the Conversion of Germacradienol to Geosmin. In *J. Am. Chem. Soc.*, 130(2): 428–429, 2008.

KORBOKANDI, H.; HOJJATI, Z.; ABEDI, D.; POURHSEIN, M.; DARKHAL. Superprodução de ácido clavulânico por UV mutagenesis do *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Biotechnology*, V. 131, suplemento 1, 2007.

MELO, J. O., M.; ENDO, T. H.; BERSANI-AMADO, L. E.; SVIDZINSKI, A. E.; BARONI, S.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Efeito da casca de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) em modelos de nocicepção animais. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* vol.43 no.3 São Paulo July/Sept. 2007.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R.S. Avaliação in vitro de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanaceum*. *Ciência e Agrotec.*, 23: 281-288, 1999.

MURRAY, F. R. et al., Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium*. *Molecular and General Genetics*, 223: 1-9, 1992.

NETO, E. C.; DIETRICH, S. M. C. Phytoalexin induction by Leaf-Surface Fungi of Tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura.*, 44 (45): 342-344, 1992.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. nº 29, 2003.

NUNES, A. M.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; CARVALHO, A. Z.; CARDOSO, G. Caracterização molecular de butiazeiro por marcadores RAPD. *Rev. Bras. Frutic.* 30(3): 702-707, 2008.

OGAWARA, H. Production and Property of Beta-lactamases in *Streptomyces*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 8 (4): 402-408, 1975.

OLIVEIRA, M.F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Porto Alegre, 125p. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente* - Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

PATRIQUIM, D.G., DORING-BERINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. In *Can. J. Microbiol.*, 24: 734-742, 1978.

PEREIRA, J. C., NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* – Brasília, 34 (5): 801-811, 1999.

POSADA, F.; VEGA, F. E. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). In *Mycologia*. 97(6): 1195- 1200, 2005.

RANGEL, T. F. L. V. B.; BINIB, L. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; PINTO, M. P.; CARVALHO P.; BASTOS, R. P. Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. *Appl. Geography*, V. 27, p- 14-27, 2007.

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

RATTI, R.P., SERRANO, N.F.G., HOKKA, C.O.; SOUSA, C.P. 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, 2008.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. Pp. 89-166. n: S. M. Sano & P. Almeida (eds). *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA- CPAC, Planaltina, 1998.

RODRIGUES, K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. Porto Alegre, 129p. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente* - Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D.C.; RINALDO, D.; ZOCOLO, G.J.; dos SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). In *J. Med. Food.*, 11(1): 120-126, 2008.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINE, B.;BORGONNOVI, G.E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterelized roots. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8): 2691-2693, 1992.

SANTOS, M. O.; COELHO, A. D. F., MONTANARIL, R. M., PINTO, E. S., VICCINI, L. F. Variabilidade genética entre populações de lobeira. (*Solanum lycocarpum* St. HIL.). Floresta e Ambiente. V. 9, n.1, p.158 - 164, jan./dez, 2002.

SEJINY, M. J. Growth Phases of Some Antibiotics Producing *Streptomyces* and their Identification. *J. K. A. U: Sci*, V. 3, pp. 21-29, 1991.

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

SOARES, A. C. F. et al., Soil Streptomycetes whit in vitro activity against the yam pathogens *curvularia eragrostides* and *colletotrichum gloeosporioides*. *cBrazilian Journal Microbiology*, 37: 456-461, 2006.

SOUSA, C. S. et al., Estreptomicetos no controle da leloidoginose em mudas de tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* - Brasília, 41 (12): 1759-1766, 2006.

SOUZA, et al., Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.. *ACTA Amazônica*. 34 (2): 185-195, 2004.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. D.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. *Revista Brasileira de farmacognsia*. 17(1): 71-75, jan.-mar., 2007.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxani Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, 260: 214-216, 1993.

SROBEL, G. A. et al., Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology*, 17:417-423, 1999.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. In *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4): 491- 502, 2003.

STROBEL, G.A.; ZIN, N.M.; SARMIN, N.I.M.; GGANDHI N.; BARSÍ, D.F.; SIDIK, N.M.; HESS. M. Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 274: 83-88, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8.ed. São Paulo: Artmed, 2006. 894p.

VASCONCELOS, M. A.; FERREIRA da. S.; ANDRADE e SILVA, M. L.; VENEZIANI, R. C.; CUNHA W. R. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). In *Boll. Chim. Farm.*, 142(8): 333-335, 2003.

VIDAL, MC.; STACCIARINI-SERAPHIN, E.; CAMARA, H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Lobeira) em casa de vegetação. *Acta Botânica Brasílica*, Brasília, v.13. n.3. p. 271-275, 1999.