

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

RAFAEL CAVICCHIOLI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO *Paenibacillus*
polymyxa RNC-D, ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Prunus* sp.
(CERRADO), PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
INFLAMAÇÃO AGUDA

São Carlos
2017

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

RAFAEL CAVICCHIOLI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO *Paenibacillus*
polymyxa RNC-D, ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Prunus* sp.
(CERRADO), PARA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
INFLAMAÇÃO AGUDA

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

Orientadora: Dra. Fernanda de Freitas Aníbal
Orientadora: Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos
2017

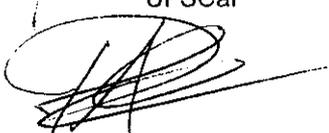


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Cavicchioli, realizada em 22/02/2017:



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Prof. Dr. Henrique Cezar Alves
USP

Dedico este trabalho:

*A minha família e meus amigos,
que independente de momentos,
sempre me estruturam para seguir a diante.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e toda energia do universo;

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

À profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal pela orientação, confiança, aprendizado, paciência, oportunidade e privilégio de tê-la como orientadora;

À Universidade Federal de São Carlos - UFSCar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec;

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior - CAPES;

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

À Genoveva Flores Luna, por estar sempre pronta a ajudar, 7 dias por semana, 24 horas por dia, quando necessário, sempre me socorreu e se tornou uma amiga insubstituível em minha vida;

Ao técnico e amigo Paulo Andrade que sempre esteve à disposição e sem sombra de dúvidas ensinou muito sobre valor próprio e autoestima, brincadeiras a parte, mas o mundo precisa de gente assim;

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

À Claudia Pastega, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar, por ser além de secretária, parceira, psicóloga e transmitir as melhores notícias possíveis sempre.

Aos meus avós, que estão presentes aqui ou não. Sempre foram mais que pais, sempre foram avós. Mimando, tendo o melhor abraço, fazendo aquela comida tão especial de vó, não medindo esforços para agradar. Sei que estão me vendo realizar um sonho que eles tinham pra mim.

Aos meus pais Carlos e Adriana, meu irmão Vinicius e o mascote e mais solidário membro da família: Snow, que me oferecem apoio e amor

incondicional sempre. São o que tenho de mais importante e especial nessa vida;

À todos meus tios e tias que me ajudam das mais diferentes maneiras, muito do que sou e conquistei foi graças a colaboração que tiveram em minha educação e em minha vida.

À minha irmã de alma Bianca Soriano, que não sei nem explicar em palavras tanto companheirismo, intimidade e sincronia, às vezes tenho certeza que ela sabe ler minha mente.

Aos amigos que fiz e certamente irão permanecer em minha vida e em meu coração: Thalita, Driano, Rebecca, Ana Claudia, Felipe, Paula, Flávia, Pam, Ailton, Elisandra e Débora, que sempre estavam me salvando, seja me ouvindo, ensinando, ou mesmo não deixando a autoclave explodir todas as vezes que esqueci. Em especial ainda a Carla Linda que em tão pouco tempo hoje é uma irmã que me ajuda a sonhar mais e mais com toda a luz que me transmite.

Aos meus amigos de vida que sempre me fazem esquecer tudo por um tempinho e apenas sorrir como se a vida fosse uma bela tarde de sol: Maria Érika (a terceira vértice de um triângulo), Marina (o mal humor mais humorado que conheço), Bola (o que discuti papos de “nerd”, eu realmente preciso disso), Rebecca (além de um nariz lindo é a folgada que sabe que sou folgado) e Ana (a despojada que deixou saudade constante).

À todos que harmonizam a minha vida direta ou indiretamente e que contribuíram de alguma maneira para a conclusão desse trabalho;

RESUMO

A variedade de fatores ambientais aos quais a vegetação do cerrado ou savana está submetida favorece o potencial de síntese de novos compostos pelas plantas e também pelos endofíticos isolados das mesmas, estes por sua vez são caracterizados como fungos ou bactérias que hospedam o tecido vegetal sem estabelecer danos. O cerrado caracteriza-se como excelente mosaico de biomas para pesquisa de endofíticos. Endófitos encontrados no cerrado apresentaram grande potencial biotecnológico, produzindo novos compostos com atividades antimicrobianas, enzimáticas, leishmanicidas, antitumorais, anti-inflamatórias, analgésicas, diuréticas e cicatrizantes. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico da cepa de *Paenibacillus polymyxa* RNC-D isolada a partir da espécie vegetal *Prunus* sp. quanto à atividade antagônica, *in vitro*, de fungos fitopatogênicos. Os resultados obtidos foram: *Ceratocystis paradoxa* (negativo) *Colletotrichum* sp.(40%), *Fusarium oxysporum* (51,7%) , *Phytophthora sojae* (61,3%) e *Rhizopus microsporus* (negativo). Também quanto a atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato bruto fresco produzido em meio Yeast extract peptone manitol, filtrado, os resultados obtidos foram: *Candida albicans* (negativo), *Citrobacter freundii* (15mm), *Enterococcus faecalis* (14mm), *Escherichia coli* (17mm), *Micrococcus luteus* (15mm), *Proteus* sp. (negativo), *Salmonella* sp. (16mm), *Staphylococcus aureus* (15mm), *Staphylococcus epidermidis* (12mm), *Staphylococcus saprophyticus* (18mm). A busca por substâncias e compostos anti-inflamatórios é de grande importância para o controle da inflamação, uma vez que os anti-inflamatórios não esteroidais apresentam severos efeitos colaterais, como reações gastrointestinais, dispepsia severa, úlceras duodenais e gástricas. Para a avaliação dos extratos quanto ao seu potencial anti-inflamatório foi usado o modelo de edema de pata estimulado com carragenina (inflamação aguda). Posteriormente foram avaliados os efeitos que contribuem para a redução e controle desse processo, observando um efeito positivo para a queda de temperatura nos grupos tratados com extrato, esse efeito apresentado foi similar com o apresentado pelo tratamento comercial visando um possível e promissor anti-inflamatório para ser avaliado em outros modelos experimentais. **Palavras-chave:** anti-inflamatórios; antimicrobianos; bioatividade; metabólitos secundários, fitopatógenos.

ABSTRACT

*The variety of environmental factors to which Cerrado or Savanna vegetation is subjected has favored the potential for the synthesis of new compounds by the plants and also by the endophytes isolated from them, which are characterized as fungi or bacteria that host the plant tissue without establishing harm. The Cerrado is characterized as an excellent mosaic of biomes for endophytic research. Endophytes found on its environment displayed great biotechnological potential, producing new compounds with antimicrobial, enzymatic, leishmanicidal, antitumor, anti-inflammatory, analgesic, diuretic and cicatrizant activities. In this context, the present work aimed to evaluate the biotechnological potential of the *Paenibacillus polymyxa* strain RNC-D isolated from the plant species *Prunus* sp. Concerning the antagonistic activity of phytopathogenic fungi in vitro. The results obtained were: *Ceratocystis paradoxa* (negative) *Colletotrichum* sp. (40%), *Fusarium oxysporum* (51.7%), *Phytophthora sojae* (61.3%) and *Rhizopus microsporus* (negative). Also as antimicrobial activity, in vitro, the Fresh crude extract produced in medium Yeast extract peptone mannitol, filtered, the obtained results were: *Candida albicans* (negative), *Citrobacter freundii* (15mm), *Enterococcus faecalis* (14mm), *Escherichia coli* (17mm), *Micrococcus luteus* (15mm), *Proteus* sp. (Negative) *Salmonella* sp. (16mm), *Staphylococcus aureus* (15mm), *Staphylococcus epidermidis* (12mm), *Staphylococcus saprophyticus* (18mm). The search for substances and anti-inflammatory compounds is of great importance for the control of inflammation, since the nonsteroidal anti-inflammatory have severe side effects such as gastrointestinal reactions, severe dyspepsia, gastric and duodenal ulcers. Carrageenan-stimulated paw edema model (acute inflammation) was used to evaluate the extracts for their anti-inflammatory potential. Later on, the effects that contributed to the reduction and control of this process were observed, showing a positive effect in the temperature drop in the groups treated with extract, this presented effect was similar to that exhibited by the commercial treatment sighting at a possible and promising anti-inflammatory to be evaluated in other experimental models.*

Keywords: *anti-inflammatory; antimicrobials; bioactivity; secondary metabolites, phytopathogens.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Cerrado.....	19
2.2 Microrganismos endofíticos.....	20
2.3 <i>Paenibacillus polymyxa</i>	23
2.4 Atividade antimicrobiana.....	26
2.4.1 Microrganismos potencialmente patogênicos.....	26
2.4.2 Microrganismos fitopatogênicos.....	28
2.6 Atividade anti-inflamatória	31
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Geral	35
4.2 Específicos.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1 Preparo do extrato bruto a partir do <i>Paenibacillus polymyxa</i>	36
5.2 Atividade antimicrobiana.....	39
5.2 Atividade antimicrobiana.....	Erro! Indicador não definido.
5.2.1 Microrganismos potencialmente patogênicos.....	39
5.3 Microrganismos fitopatogênicos.....	40
5.4 Atividade anti-inflamatória aguda.....	41
5.4.1 Obtenção das células da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue para perfil celular	44
5.4.2 Contagem total e diferencial das células do LCP e do sangue.....	44
5.5 Análise estatística.....	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Determinação da atividade antimicrobiana.....	46
6.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana com extratos brutos frescos	46
6.1.2 Determinação da atividade antimicrobiana com extratos liofilizados.....	48

6.1.3 Análise dos extratos liofilizados frente a esterilização a partir da autoclavagem e filtragem	51
6.1.4 Análise dos extratos liofilizados frente aos diferentes meios utilizados	54
6.2 Determinação da atividade de antagonismo contra fitopatógenos	55
6.3 Determinação da atividade anti-inflamatória	60
6.3.1 Edema de pata.....	60
6.3.2 Análise de temperatura.....	62
6.3.3 Contagem global de leucócitos	67
7. DISCUSSÃO.....	70
8. CONCLUSÕES	76
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** (A) Imagem das células de *P. polymyxa* marcadas com GFP. (B-D) Padrões de colonização da *P. polymyxa* WLY78 marcada com GFP em raízes de trigo após 15 horas de inoculação. (E-G) Padrões de colonização após 1 dia de inoculação. (H) Padrões de colonização após 3 dias de inoculação. (I-J) Padrões de colonização após 5 dias de inoculação. (K) Padrões de colonização após 7 dias de inoculação. (L) Padrões de colonização após 10 dias de inoculação (TIANYI e SANFENG, 2017). 22
- Figura 2.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura da cepa de *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF (HE, et al., 2007)..... 25
- Figura 3.** Imagens obtidas durante o processo de produção do extrato bruto fresco, onde são apresentados: A – meios de cultura esterilizados para posterior preparo do inoculo e extrato; B – inoculo pronto para ser transferido para o meio de produção C – Meio de produção. 38
- Figura 4.** Inibição de crescimento fúngico pelo *Paenibacillus polymyxa*, onde: X1= raio do crescimento fúngico em direção ao *P. polymyxa*; X2 = raio do crescimento fúngico nas laterais da placa e na direção oposta do isolado bacteriano..... 41
- Figura 5.** Fotografia obtida com o uso da câmera FLIR. Posicionamento ideal do camundongo para a realização da fotografia da pata posterior direita do animal..... 43
- Figura 6.** Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato bruto fresco produzido com o meio M2 autoclavados em vermelho e filtrados em azul. A) EBF contra cepas de *Salmonella* sp. B) EBF contra cepas de *E. coli* ATCC 11775; C) EBF contra cepas de *S. aureus* ATCC 6538. 47
- Figura 7.** Gráfico representativo da tabela 1. Esboça a diferença entre os halos obtidos com o uso do extrato bruto fresco produzido nos dois diferentes meios e esterilizados em diferentes condições, autoclavagem ou filtragem, de modo geral nota-se uma melhor performance para o extrato produzido com o meio YPM e filtrado..... 48
- Figura 8.** Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato liofilizado produzido em M2 autoclavados em vermelho e filtrados

em verde, nas concentrações de 5 a 30mg.mL⁻¹ A-D) *E. coli*; B-E) *Salmonella* sp.; C-E) *S.aureus*..... 51

Figura 9. Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato liofilizado produzido em M1 autoclavados, nas concentrações de 8 a 30mg.mL⁻¹ A) *E. coli*; B) *S. aureus*; C-E) *S.epidermidis* 52

Figura 11. Gráficos comparativos entre os extratos autoclavados e filtrados produzidos a partir de M2, os gráficos estão divididos de acordo com a concentração do extrato testado, apenas as concentrações com valores significativos foram expressas, nesse caso 8, 10, 15 e 30 mg.mL⁻¹ 54

Figura 12. Gráficos representando o uso dos dois diferentes meios de cultura, YPM e ISP2, para a produção do extrato liofilizado, em A- extrato liofilizado na concentração de 30 mg.mL⁻¹; B extrato liofilizado na concentração de 15 mg.mL⁻¹; C- extrato liofilizado na concentração de 10 mg.mL⁻¹. A performance do meio YPM se mostrou melhor em todos os casos. 55

Figura 13. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polomyxa* versus *C. paradoxa*. A- teste com *P.polomyxa*; B- controle..... 57

Figura 14. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polomyxa* versus *Colletotrichum*. A- teste com *P.polomyxa*; B- controle..... 57

Figura 15. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polomyxa* versus *F. oxysporum* do algodão. A- teste com *P. polomyxa*; B- controle. 58

Figura 16. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polomyxa* versus *F. oxysporum* do feijão. A- teste com *P.polomyxa*; B- controle. 59

Figura 17. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polomyxa* versus *P. sojae* A- teste com *P.polomyxa*; B- controle. 59

Figura 18. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a temperatura do membro inferior em camundongos injetados com carragenina (200µg/animal). Os símbolos e barras verticais indicam as médias ± desvio padrão das médias das temperaturas (*) (**) indicam diferenças significativas em relação ao grupo carragenina (p<0,05). 64

Figura 19. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a temperatura do membro inferior em camundongos injetados com carragenina (200µg/animal).

Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das temperaturas. 65

Figura 20. Fotografias térmicas obtidas com a câmera FLIR. A figura mostra a temperatura indicada no ponto sp1 (extremidade esquerda superior). Na extremidade direita da figura está esboçada a escala de temperatura da fotografia. Nas figuras A, B e C apresentam-se os animais pertencentes ao grupo 2 (controle Carragenina) em 5, 11, 24 horas respectivamente; D, E e F representam os animais pertencentes ao grupo 4 (tratamento com extrato) em 5, 11 e 24 horas respectivamente; G, H e I representam os animais do grupo 6, em 5, 11 e 24 horas respectivamente. 66

Figura 21. Fotografias térmicas obtidas com a câmera FLIR. A figura mostra a temperatura indicada no ponto sp1 (extremidade esquerda superior). Na extremidade direita da figura está esboçada a escala de temperatura da fotografia. Nas figuras A, B e C apresentam-se os animais pertencentes ao grupo 3 (controle Carragenina) em 5, 11 e 48 horas respectivamente; D, E e F representam os animais pertencentes ao grupo 5 (tratamento com extrato) em 5, 11 e 48 horas respectivamente; G, H e I representam os animais do grupo 7, em 5, 11 e 48 horas respectivamente. 67

Figura 22. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a contagem global de leucócitos. Onde grupo 1 representa o grupo controle PBS, os grupos 2 e 3 representam os controles inflamados; 4 e 5 tratados com extrato; 6 e 7 tratados com Celecoxibe. Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das contagens..... 68

Figura 23. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a contagem global de leucócitos. Onde grupo 1 representa o grupo controle PBS, os grupos 2 e 3 representam os controles inflamados; 4 e 5 tratados com extrato; 6 e 7 tratados com Celecoxibe. Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das contagens. (*)indicam diferenças 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação em (mm) da média da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco preparado com os meios M1 e M2, autoclavados (A) e filtrados (F); Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos. 46
- Tabela 2.** Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M1, nas diluições de 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e autoclavado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos. 49
- Tabela 3.** Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M1, nas diluições de 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e filtrado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos. 49
- Tabela 4.** Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M2, nas diluições de 8, 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e autoclavado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos. 50
- Tabela 5.** Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M2, nas diluições de 5, 8, 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e filtrado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos. 50
- Tabela 6.** Determinação do índice de antagonismo de fitopatógenos, onde: P.s- é representativo do *Phytophthora sojae*; F.o(a)- *Fusarium oxysporum* (algodão); F.o(f)- *Fusarium oxysporum* (feijão); C- *Colletotrichum* sp; M1- ISP2; M2- YPM; IA- Índice de antagonismo. 56
- Tabela 7.** Determinação da média da espessura das patas em (mm) antes da indução da inflamação, logo após a indução, 1, 2, 3, 5, 11 e 24 horas após a indução, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G2 representa controle Carragenina 24 horas, G4 tratamento com o extrato 24 horas e G6 tratamento comercial (Celecoxibe) 24 horas. Ao lado de cada coluna a coluna DP representa o desvio padrão de cada média esboçada. 61
- Tabela 8.** Determinação da média da espessura das patas em (mm) antes da indução da inflamação, logo após a indução, 1, 2, 3, 5, 11 e 24 horas após a indução, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G2 representa controle Carragenina 24 horas, G4 tratamento com o extrato 24 horas e G6 tratamento comercial (Celecoxibe) 24 horas. Ao lado de cada coluna a coluna DP representa o desvio padrão de cada média esboçada. 62

Tabela 9. Determinação da média da temperatura das patas em (°C) 1, 2, 3, 5, 11 e 24 horas após a indução da inflamação, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G2 corresponde ao controle Carragenina 24 horas, G4 tratamento com o extrato 24 horas e G6 tratamento (Celecoxibe) 24 horas.... 63

Tabela 10. Determinação da média da temperatura das patas em (°C) 1, 2, 3, 5, 11, 24 e 48 horas após a indução da inflamação, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G1 corresponde ao controle PBS, G3 Carragenina 48 horas, G6 tratamento com o extrato 48 horas e G6 tratamento comercial (Celecoxibe) 48 horas. 64

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais

CO₂ - Dióxido de Carbono

Da - Dalton

DMP - Departamento de Morfologia e Patologia

DO - Densidade ótica

DP - Desvio Padrão

EB - Extrato Bruto

EBF - Extrato Bruto Fresco

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELP - Extrato Lipopeptídeo

ET - Extrato Total

FA - Fase Aquosa

g - Gramas

GFP - Proteína Verde Fluorescente

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística

ISP2 - Internacional Streptomyces Project Medium

KDa - kilodalton

LaMiB - Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas

LCP - Lavado da cavidade Peritoneal

MH- Muller Hilton

mm - milímetro

PAMs - Peptídeos Antimicrobianos

PBS - Tampão fosfato-salino

TSA - Agar Triptico de Soja

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

USP - Universidade de São Paulo

YMP - Yeast extract, Peptone, Manitol

1. INTRODUÇÃO

Segundo GUIMARÃES et al. (2010), é muito importante considerar fontes que hoje são pouco exploradas, pois muitas vezes estão associadas a uma substância química inovadora. Muitos pesquisadores hoje buscam essas fontes pouco exploradas com base no conhecimento cultural, pois o uso de substâncias bioativas obtidas de plantas é uma das práticas mais antigas e universais praticadas pelo homem. Muitos medicamentos usados hoje em dia têm suas origens de plantas medicinais, cujos princípios ativos são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, podemos citar, por exemplo, aspirina, efedrina, atropina, dentre outros (BOTSARIS, 1998; AMIN, et al., 2017).

Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos, implicando em uma busca contínua por novos produtos pelas indústrias farmacêuticas. Se comparadas às principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos - síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e bibliotecas virtuais, a mais ampla diversidade química encontrada está associada às substâncias de origem natural (BORGES, 2008).

Trabalhos anteriores do nosso grupo relatam (PIZA, et al., 2008; SERRANO, 2014; PIZA, et al., 2015; PIZA, et al., 2016) que muitas substâncias obtidas por meio de plantas têm sua origem no metabolismo de microrganismos que habitam o seu interior, definidos como microrganismos endofíticos.

Endofíticos podem ser definidos como 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). Estes microrganismos podem ser isolados à partir da superfície desinfetada da planta, ou ainda de suas partes internas. Há alguns estudos que mostram que os microrganismos endofíticos podem ter a capacidade para controlar patógenos, pragas e nematoides (ARAUJO, et al., 2002; MOHAMED, et al., 2017; BERNAL, et al., 2017).

Hoje há uma necessidade muito grande de desenvolvimento de novos antibióticos visando tratar infecções causadas por agentes patogênicos que de alguma maneira evoluíram para a resistência aos antibióticos mais comuns, (SANCHEZ e DEMAÏN, 2014).

Atualmente alguns estudos (LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA e SOUSA, 2016; BERNAL, et al., 2017; HONG, et al., 2016) têm indicado que o controle de doenças em plantas pode ser combatido com o uso de bactérias endofíticas. Diferentes espécies bacterianas, que foram relatadas como endófitos, tiveram ação inibitória comprovada contra fitopatógenos (LACAVA e AZEVEDO, 2014). *P. polymyxa* foi desenvolvida como um agente de controle biológico comercial e tem controlado com sucesso muitos fitopatógenos tais como, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora palmivora*. Além disso, um estudo anterior relatou que *P. polymyxa* tem atividade de biocontrole contra fitopatógeno bacteriano e nematoide (KHAN et al., 2008; HONG et al., 2016). Com base nessas informações, os extratos produzidos nesse estudo foram avaliados frente à fitopatógenos para análise do índice de antagonismo.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem tido um efeito positivo para pacientes que tratam questões inflamatórias, pois, diminuem a resposta inflamatória, reduzem a dor e baixam a febre. Por outro lado os mesmos podem causar problemas gastrintestinais, como úlceras, insuficiência renal e hepática (SÜLEYMAN et al., 2007). Devido a esta ampla gama de efeitos colaterais causados pelo uso dos AINEs, torna-se necessária a busca por novas moléculas com novos mecanismos na ação anti-inflamatória, visando diminuir ou ainda eliminar os efeitos colaterais. Utilizando-se o modelo de edema de pata causado por meio da administração da Carragenina foi avaliada a bioatividade do extrato produzido por *P. polymyxa* no controle da inflamação aguda.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cerrado

Segundo o ministério do meio ambiente e o Instituto Brasileiro de Geografia e Bioestatística (IBGE) 2004, o Cerrado é um mosaico de biomas, sendo o segundo maior encontrado na América do Sul, ocupando atualmente uma área de 2.036.448 km², aproximadamente 22% do território nacional. A sua área contínua está incidida sobre os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos encraves no Amapá, Roraima e Amazonas. O cerrado brasileiro é hoje, considerado como a savana mais rica do mundo, abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas. É constituído por árvores relativamente baixas (até 20 metros), distribuídas entre arbustos e gramíneas. A vegetação típica do cerrado é constituída de ramos e troncos retorcidos, folhas grossas e cascas espessas.

Este mosaico de biomas único contém alta densidade de diferentes plantas endêmicas e foi incluído entre os 25 locais prioritários para conservação de biodiversidade (MYERS et al., 2000).

Nos estados de Minas Gerais e São Paulo o Cerrado nativo está reduzido em fragmentos que raramente excedem o trecho máximo de 100 hectares. O bioma caracterizado como cerrado brasileiro tem uma estação seca com duração de cinco a seis meses, que se dá entre abril e setembro e uma estação chuvosa com precipitação variando de 800 a 2000 mm (GOMES et al., 2000).

A variedade de fatores ambientais aos quais a vegetação desta região está submetida favorece o potencial de síntese de novos compostos pelas plantas e também pelos microrganismos endofíticos isolados das mesmas, devido a estes aspectos, o cerrado caracteriza-se como excelente bioma para pesquisa de bactérias e fungos associados a plantas. (CHALLIS e HOPWOOD, 2003; RANGEL et al., 2007; SERRANO, 2014). Porém pouco se sabe sobre a diversidade de bactérias encontradas no cerrado, embora esse grupo seja responsável por uma variedade de atividades que afetam todo um

ecossistema, particularmente o solo, que é considerado um sistema complexo e dinâmico (ZHANG & XU, 2008).

COELHO et al. (2007) durante um estudo, investigou a diversidade de espécies de *Paenibacillus* em rizosferas de quatro cultivos de *Sorghum bicolor* em solo de Cerrado, encontrando 14 espécies de *Paenibacillus* spp..

Um estudo bioprospectivo realizado no cerrado da região de São Carlos/ SP obteve, dentre outras, uma espécie isolada de *Prunus* sp. que foi capaz de inibir o crescimento da cepa indicadora *Staphylococcus*. Em estudo complementar, a espécie isolada de *Prunus* sp. foi posteriormente identificada como *Paenibacillus polymyxa* e recebeu a designação RNC-D (SERRANO, et al. 2012).

2.2 Microrganismos endofíticos

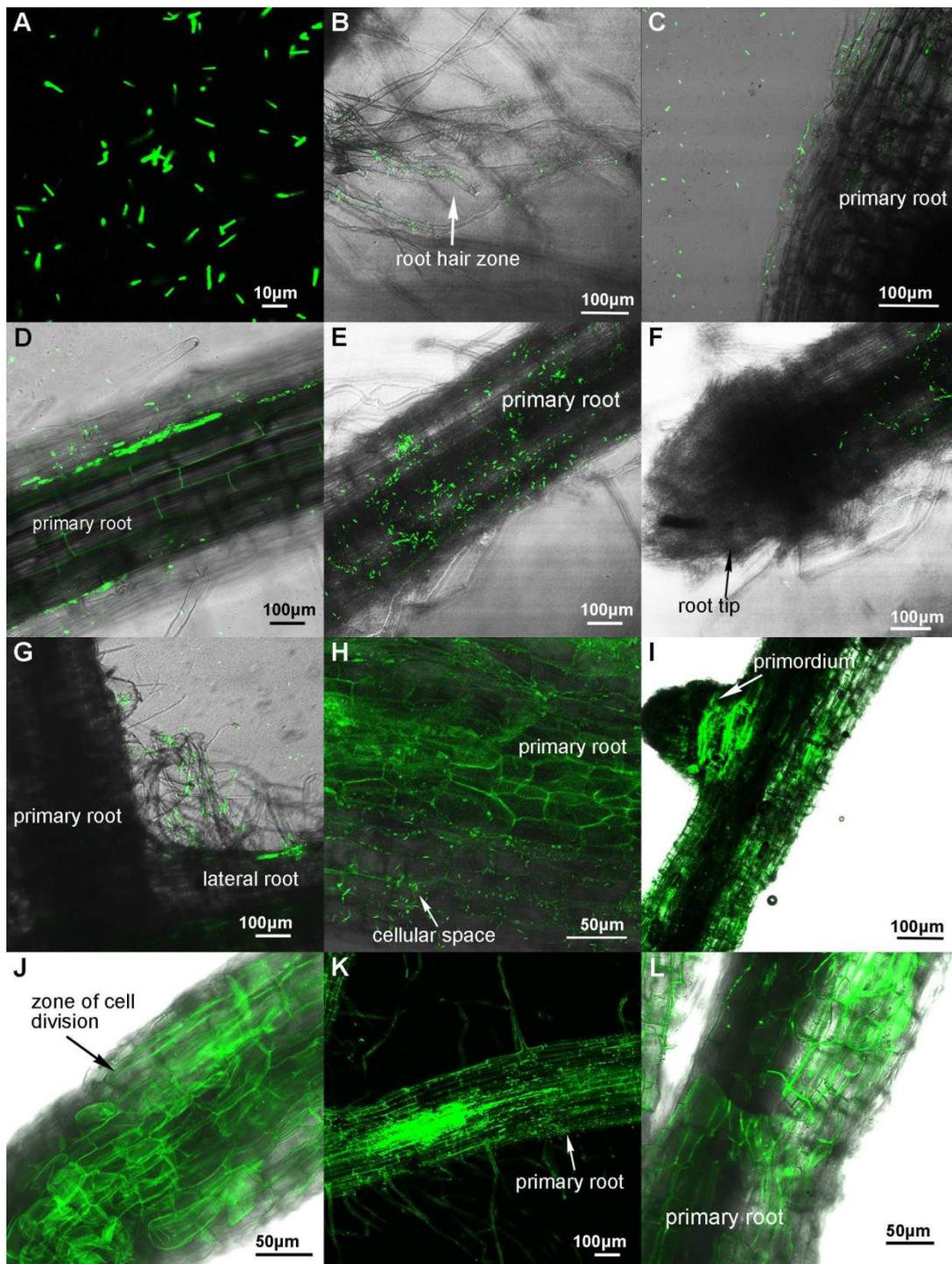
Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX; e apenas no final da década de 70 foi verificado que estes organismos possuem propriedades metabólicas de interesse em diversas áreas (STROBEL & DAISY, 2003). Em 1926, Perotti foi o primeiro a usar o termo endofíticos para descrever bactérias que não são patogênicas e tiveram sua origem do interior de tecidos vegetais ou ainda da rizosfera (AKSHIT PURI, et al., 2015). Sabe-se que como consequência de sua evolução bioquímica e biológica, microrganismos tem a habilidade de utilizar vários substratos sólidos, dentre os quais se podem incluir o interior de plantas vivas (SANO, et al., 2010).

Microrganismos endofíticos são definidos como fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico ao hospedeiro (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007). Embora não provoquem sinais ou sintomas evidentes de sua aparência na planta, os endófitos podem existir como simbioses, fornecendo ao hospedeiro alguma forma de proteção contra várias injúrias ambientais, como o ataque de pragas, patógenos ou ainda potenciais estresses ambientais (BACON, 2000; STROBEL, et al., 2017).

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 e, assim, disseminam-se por todas as partes da planta. O

endófito *Paenibacillus polymyxa*, bactéria usualmente encontrada na rizosfera, provavelmente utiliza deste mecanismo para habitar plantas, isso devido ao fato do mesmo possuir capacidade em produzir enzimas hidrolíticas (NIELSEN & SORENSEN, 1997). Em um estudo realizado por TIANYI & SANFENG (2017) *P. polymyxa* WLY78 foi marcado com Proteína Verde Fluorescente (GFP) e posteriormente inoculado em raízes de trigo, milho e pepino (Figura 1). Os padrões de colonização de *P. polymyxa* WLY78 nestas plantas foram observados no microscópio de varredura a laser verificando os padrões de colonização.

Figura 1 – Imagem confocal da *P. polymyxa* colonizando raízes de trigo.



(A) Imagem das células de *P. polymyxa* marcadas com GFP. (B-D) Padrões de colonização da *P. polymyxa* WLY78 marcada com GFP em raízes de trigo após 15 horas de inoculação. (E-G) Padrões de colonização após 1 dia de inoculação. (H) Padrões de colonização após 3 dias de inoculação. (I-J) Padrões de colonização após 5 dias de inoculação. (K) Padrões de colonização após 7 dias de inoculação. (L) Padrões de colonização após 10 dias de inoculação (TIANYI e SANFENG, 2017).

Endófitos podem ser isolados de plantas cuja superfície foi desinfetada adequadamente ou ainda 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). Vários relatos em literatura comprovam que endofíticos possuem a capacidade de produzir compostos naturais bioativos para inibir o crescimento de outros organismos e assim gerar uma vantagem seletiva para a planta hospedeira (ARNOLD et al., 2003; STROBEL et al., 2004; SERRANO, 2014; GUBIANI, 2015). Esses microrganismos, quando associados às plantas, também desenvolvem a habilidade bioquímica de produzir metabólitos similares ou idênticos àqueles produzidos por suas plantas hospedeiras como um resultado de recombinação genética durante seu processo evolucionário (GUNATILAKA, 2006).

Hoje em dia há uma visão amplamente aceita de que os microrganismos, endofíticos ou não, constituem se não o mais, uma das mais importantes formas de vida que fornecem ferramentas biotecnológicas que auxiliam na transformação da matéria orgânica, assim como na fabricação de produtos químicos, bioquímicos, entre outros. (GUBIANI, 2015). Assim, pode-se considerar de grande valia a bioprospecção de microrganismos endofíticos, frente a diversas áreas abrangendo produtos farmacêuticos, agrícolas e ainda para biorremediação.

2.3 *Paenibacillus polymyxa*

Em 1986, CLAUS & BERKELEY atribuíram a bactérias em forma de bastonete que se diferenciam em endosporos sob condições aeróbicas, o gênero *Bacillus* e que mais de 60 espécies eram reconhecidas, exibindo uma enorme variedade de fenótipos incluindo, por exemplo: aeróbios estritos, facultativos anaeróbios e até mesmo, acidófilos, alcalófilos, quimiolitotróficos, halófilos, psicrófilos e termófilos. Em 1991 ASH et al. demonstram a presença de 5 linhas altamente divergentes dentro do gênero *Bacillus* e sugere uma nova divisão taxonômica. Em 1993 ASH et al., a partir de informações genotípicas, classificaram espécies anaeróbicas facultativas como o *Bacillus polymyxa* e semelhantes próximos (Grupo rRNA: 3) em um novo gênero denominado *Paenibacillus polymyxa*.

Esse gênero compreende mais de 30 espécies de bacilos Gram-positivos que contém baixo conteúdo de C+G no material genético, são anaeróbios facultativos, formadores de esporos elípticos, neutrofilicos, periflagelados e heterotróficos (LORENTZ, 2006).

A cepa *P. polymyxa* P13, isolada a partir de linguiça fermentada, secreta um composto, denominado polixina, que inibe o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Este composto antimicrobiano é efetivo contra diversos Gram-positivos e Gram-negativos incluindo deteriorantes de alimentos. A Polixina, cuja massa molecular foi definida em 10 kDa apresenta propriedades de bacteriocinas, como por exemplo, natureza proteínica, insensibilidade a solventes orgânicos, estabilidade a elevação de temperatura (90 °C, 10 min) e pH baixo, mas instabilidade em condições alcalinas (PIURI *et al.*, 1998).

Paenibacillus anteriormente *Bacillus polymyxa*, tem atraído considerável interesse devido ao seu grande potencial biotecnológico em diversos processos industriais assim como na agricultura sustentável (KIRAN, AKSHIT e CHRIS, 2016).

Segundo GUO *et al.*, (2012), a cepa de *Paenibacillus thiaminolyticus* OSY-SE produz o lipopeptídeo paenibacterin (m/z 1.605,14) o qual é resistente ao tratamento com lipase, tripsina, lisozima e α -glicosidase. O que contradiz com o estudo dirigido por SERRANO (2014), onde foi possível verificar a sensibilidade do Extrato Total (ET) frente ao tratamento com lipase, indicando assim a presença de diferentes substâncias bioativas produzidas por *P. thiaminolyticus* OSY-SE e *P. polymyxa* RNC-D. Ainda, HE *et al.*, (2007) isolaram um composto de massa molecular 2983,44 Da, metabolizado por cepas de *P. polymyxa* OSY-DF (Figura 2) e denominado paenibacillin que demonstra bioatividade contra microrganismos Gram-positivos. Foi verificado que este composto apresenta perda parcial da bioatividade sob a ação de tripsina. Esta perda de bioatividade após o tratamento enzimático não foi observada na cepa *P. polymyxa* RNC-D. Estes resultados deixam claro que a substância bioativa isolada por GUO *et al.*, (2012) e HE *et al.*, (2007) é diferente daquela produzida por *P. polymyxa* RNC-D.

Figura 2 – *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF

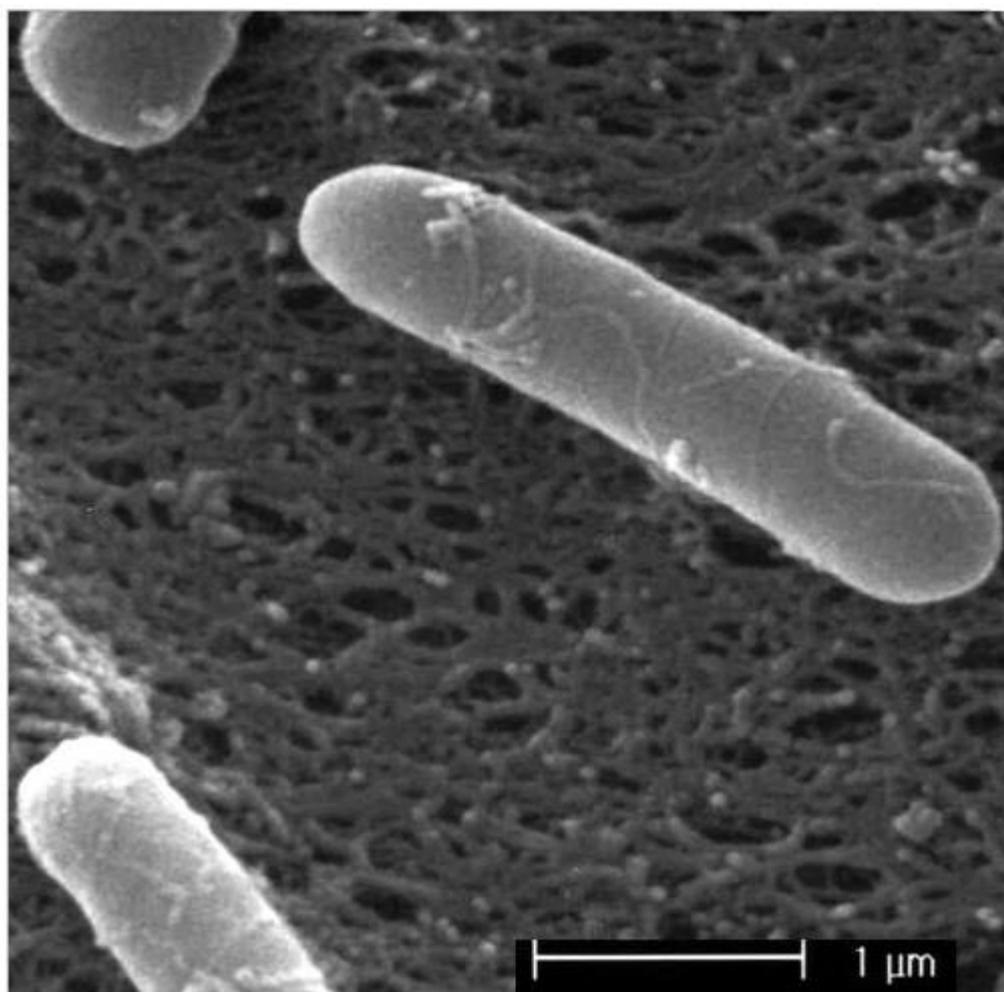


Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da cepa de *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF (HE, et al., 2007).

Na avaliação da atividade antimicrobiana do ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D isolado por SERRANO, (2014) a partir de folhas de *Prunus* sp, conhecido popularmente como pessegueiro do cerrado, demonstrou bioatividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Após a aplicação de tratamentos enzimáticos e filtração, constata-se que: o tratamento com protease, proteinase K, pronase E, pepsina e tripsina, o ET manteve sua bioatividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; Já após o tratamento com lipase houve presença de redução da bioatividade contra as duas cepas citadas, sendo que, a redução na atividade antimicrobiana foi mais acentuada contra o microrganismo Gram-positivo. Após a filtração em membranas de 10KDa, 3KDa e 1KDa, houve redução da bioatividade apenas

contra *S. aureus* após a filtração de 1KDa. Assim afirma-se que há pelo menos um composto de natureza lipídica (ou mista) bioativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; também que no ET existe pelo menos um composto, de massa molecular estimada em menor que 1 KDa, com atividade seletiva para bactérias GRAM-negativas; e ainda, que há pelo menos uma molécula antibacteriana de natureza peptídica presente no ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D (SERRANO, 2014).

Considerando os resultados obtidos por SERRANO, (2014) juntamente com dados da literatura tem-se que a molécula com m/z 3376,453 Da, com espectro de atividade que abrange bactérias GRAM-negativas, GRAM-positivas e fungo, e cuja bioatividade é reduzida sob tratamento com lipase, representa um novo lipopeptídeo e foi denominado polycerradin. O ET do *P. polymyxa* RND-C depois de fracionado em fase aquosa (FA) e extrato lipopeptídico (ELP), foi analisado através de cromatografia para identificação de seus compostos bioativos. Um dos peptídeos da FA teve sua sequência determinada como: glicina - ácido glutâmico – hidroxiprolina – glicina – alanina.

A hidroxiprolina é um aminoácido não proteinogênico e não essencial com duas formas isoméricas, isto é, trans-4-hidroxi-L-prolina e trans-3-hidroxi-L-prolina. A trans-4-hidroxi-L-prolina difere da prolina pela presença de um grupo hidroxilo ligado ao átomo de carbono γ e enquanto que na trans-3- hidroxi-L-prolina o grupo hidroxilo está ligado ao átomo de carbono β . A hidroxiprolina é um constituinte importante da principal proteína estrutural do colágeno e desempenham um papel fundamental na síntese e estabilidade do colágeno (ANANTHANARAYANAN, 1983; AMIT, 2016).

2.4 Atividade antimicrobiana

2.4.1 Microrganismos potencialmente patogênicos

Segundo STROBEL e DAISY, (2003) antibiótico pode ser definido como uma substância de baixo peso molecular produzido por microrganismos que apresentam atividade em baixas concentrações contra outros microrganismos.

Atualmente há uma necessidade muito grande de desenvolvimento de novos antibióticos visando tratar infecções causadas por agentes patogênicos

que de alguma maneira evoluíram para a resistência aos antibióticos mais comuns (SANCHEZ e DEMAIN, 2014; ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014). A bioprospecção de produtos naturais é uma fonte para a descoberta de novos fármacos por meio de do isolamento de metabolitos de organismos vivos (BUATONG et al., 2011; ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

A bioprospecção de bactérias produtoras de metabólitos antimicrobianos em plantas do cerrado da região de São Carlos foi realizada por Ratti et al., (2008). Os microrganismos isolados de *Cassia leptophylla* não demonstraram potencial antagonico contra *Staphylococcus coagulase* positivo. Por outro lado, uma espécie isolada a partir de *Prunus* sp. denominada *Paenibacillus polymyxa* RND-C foi capaz de inibir o crescimento da cepa indicadora (SERRANO, et al. 2012).

Os Peptídeos Antimicrobianos (PAMs) podem ser considerados como um grupo único e variado de moléculas que são produzidas por organismos vivos de todos os tipos, além disso, também fazem parte do sistema imune inato (ZASLOFF, 2002; GIULIANI et al., 2007). Embora haja grande diversidade de moléculas, a maioria dos PAMs, tem como mecanismo de ação a capacidade de danificar a membrana celular através da formação de poros, esses permitem o efluxo de substâncias, desestabilizando e conduzindo à morte celular (PETERS et al.,2010). Uma importante característica dos PAMs, é de apresentar interação preferencial por células microbianas fazendo deles não tóxicos para células de mamíferos (HARRIS et al. 2009). Esses peptídeos exibem uma vasta gama de atividades contra microrganismos incluindo bactérias GRAM-positivas e GRAM-negativas, protozoários, leveduras, fungos e até mesmo certos vírus e protozoários. Em contraste com muitos dos antibióticos convencionais, os PAMs parecem ser bactericidas em vez de bacteriostáticos e requerem um curto tempo de contato para induzir a morte de microrganismos. Também tem demonstrado ter um grande número de funções imunomodulatórias, como, atuar como quimiocinas ou induzir sua produção, induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias promovendo cicatrização de feridas e modulando as respostas de células dendríticas e células da resposta imune adaptativa (PENGMIAN; ZHENYI; XIAOYU, 2017).

Um grande número de PAMs é sintetizado nos ribossomos e sequencialmente recebem modificações para adquirirem formas biologicamente ativas. Tais peptídeos, produzidos por certo tipos de bactérias, são genericamente denominados bacteriocinas (SERRANO 2014). L-antibióticos pertencem à classe I das bacteriocinas, e são caracterizados por conter aminoácidos não usuais em sua estrutura, tais como aminoácidos com ligações cruzadas de tio-éter, lantionina, 3-metil-lantionina e aminoácidos desidratados (CHATTERJEE et al., 2005; McAULIFFE et al., 2005). Estes resíduos modificados dão estabilidade a conformação molecular sendo assim essenciais para a atividade antimicrobiana e também para resistência a ação de proteases secretadas (OSAPAY et al., 1997; VAN KRAAIJ et al., 2000). L-antibióticos são peptídeos antimicrobianos contendo lantionina produzidos por bactérias GRAM-positivas. Estes são peptídeos modificados pós-traducionalmente e sintetizados ribossomicamente (EN e AHMED, 2015).

Lipopeptídeos são moléculas constituídas por uma sequência de aminoácidos, dispostos de forma linear ou cíclica, na qual uma porção lipídica está associada. Esses compostos apresentam-se ativos contra um grande número de espécies de bactérias e fungos (ONGENA e JACQUES, 2008).

P. polymyxa é conhecido por produzir dois grupos de PAMs. Um grupo compreende moléculas ativas contra bactérias GRAM-negativas, incluindo polimixinas (SHOJI et al., 1977). O outro grupo é constituído por PAMs ativos contra fungos e bactérias Gram-positivas, incluindo fusaricidinas A, B C e D (BEATTY e JENSEN, 2002) e compostos análogos a fusaricidinas (RAZA et al., 2010). O aumento da resistência bacteriana a antibióticos convencionais vêm estimulando o isolamento e caracterização de diferentes PAMs para uso potencial como novos agentes antibacterianos e antifúngicos. Mais significativamente, a habilidade destas moléculas naturais em suprimir microrganismos multidroga resistente direciona a elas considerável atenção e interesse clínico (GIULIANI et al., 2007).

2.4.2 Microrganismos fitopatogênicos

Atualmente alguns estudos têm indicado que o controle de doenças em plantas pode ser combatido com o uso de bactérias antagônicas. Diferentes

espécies bacterianas que foram relatadas como endófitos tiveram ação inibitória comprovada contra fitopatógenos (LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA e SOUSA, 2016; LU, 2017; MOHAMED, 2017; HU, 2017).

Há uma demanda crescente por estratégias consideradas ecologicamente corretas na agricultura. Ao longo dos últimos 150 anos, a pesquisa repetidamente demonstrou que as bactérias e os fungos têm uma íntima ligação com suas plantas hospedeiras e são capazes de promover o crescimento das plantas, resistência contra patógenos e parasitas, maior resistência, entre outros (WHIPPS, 2001).

São considerados fitopatógenos, fungos, bactérias e vírus responsáveis por ocasionarem doenças em plantas (PERNEZNY et al., 2014). Esses microrganismos causam um processo infeccioso, ao invadir os tecidos e colonizar a planta. Normalmente, retiram do hospedeiro todos os nutrientes responsáveis para o seu desenvolvimento e são identificados pelos sinais e sintomas que causam no hospedeiro, como podridões, ramos secos, manchas nas folhas e murcha das plantas (BATISTA et al., 2007).

Os agroquímicos, muito utilizados atualmente com sucesso na agricultura, podem causar diversos efeitos indesejados, como resíduos em alimentos, resistência de patógenos e pragas aumentadas e contaminação de águas subterrâneas e superficiais (AMORIM; REZENDE; BERGAMIN, 2011). Um método alternativo ao uso destes agroquímicos é o controle biológico atribuído à ação de outros seres vivos. Esse é considerado um método eficiente e que possui menor custo de manutenção, além de não agredir o ecossistema (AZEVEDO et al., 2000).

As doenças causadas por fitopatógenos levam à queda de produção e, conseqüentemente, grandes prejuízos financeiros. Podem também induzir o apodrecimento de verduras e frutas após a colheita, alterando o conteúdo nutricional e o aproveitamento esperado desses alimentos (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 2014).

Em um estudo realizado por MOHAMED, et al. (2017), foram estudadas bactérias antagonistas pertencentes aos seguintes gêneros: *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Rummeliibacillus*, que foram capazes de antagonizar o crescimento de *Fusarium sambucinum*, *Verticillium dahliae* e *Pythium sulcatum*. Todos os isolados mostraram uma

redução significativa do crescimento micelial de pelo menos um dos três patógenos testados. A presença de uma zona de inibição em meios de cultura sólidos sugeriu que a redução do crescimento era provavelmente devido à produção de metabólitos extracelulares difusíveis.

O fungo fitopatígeno *Ceratocystis paradoxa* é o causador da podridão negra no abacaxi. É um fitopatígeno agressivo e de difícil controle. Os sintomas são escurecimento e apodrecimento da casca e da polpa do abacaxi, tornando inviável a comercialização dos frutos (FERRARI, 2009). O mesmo pode também ocorrer em cana de açúcar (CHAPOLA, 2010).

O fitopatígeno *Phytophthora sojae* é um dos patógenos de soja considerados predominante nas regiões de produção onde se apresentam solos mal drenados. Ele pode infectar soja em qualquer etapa de seu desenvolvimento e provoca podridão de raiz e sementes (DORRANCE et al., 2008).

O fungo *Colletotrichum*, trata-se de um gênero que também pode ser considerado como simbiote de plantas, porém é mais comumente encontrado como fitopatígeno. Esse fungo causa antracnose em diferentes espécies vegetais (DAMM et al., 2010). A antracnose é caracterizada por lesões necróticas, irregulares, inicialmente de cor parda em folhas jovens e posteriormente de coloração avermelhada em folhas mais velhas. As folhas jovens tornam-se retorcidas, enegrecidas e posteriormente caem, quando o ataque é muito severo. Também causa queda de frutos e flores jovens, com enormes prejuízos no pomar (CHAPOLA, 2010).

Diversas espécies de *Fusarium*, normalmente, são consideradas como sendo fitopatógenos e saprófitos do solo. Grande parte das espécies desse gênero parasitam sementes de cereais e outros frutos do campo, causando assim, danos antes e após a colheita aos mesmos (ZACARONI et al., 2009).

Microrganismos comumente encontrados no solo, incluindo *P. polymyxa* (TIMMUSK et al., 2005), podem promover o crescimento de plantas por meio de produção de hormônios tais como citocinas, auxinas, etileno, giberelinas e habilidade de fixar nitrogênio, ou ainda, pela supressão de doenças em plantas causadas por microrganismos deletérios como os já citados acima (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; LOON, 2007)

2.6 Atividade anti-inflamatória

A descoberta do taxol como um produto natural derivado do endófito *Taxomyces andreanae* em 1993, foi o precursor do reconhecimento dos endofíticos como uma importante fonte de produção de substâncias bioativas (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Desde que o primeiro endofítico foi identificado, uma grande atenção foi dada à exploração de novas substâncias que podem ser sintetizadas por eles. Esta habilidade é relevante por fornecer uma alternativa à exploração de vegetais de crescimento lento, assim ajudando a preservar a biodiversidade (CARVALHO et al., 2012), além de reduzir o valor de mercado e facilitar a produção de tais substâncias (SEBASTIANES et al., 2012; ZHENG et al., 2015).

SERRANO, (2009) isolou da espécie vegetal *Prunus* sp. oriunda do cerrado, uma cepa denominada *P. Polymyxa* RNC-D. O ET produzido com tal cepa, foi submetido a um sistema de duas fases, separando-se então em ELP e FA. Resultados obtidos em bioensaios revelaram que o ELP apresenta um amplo espectro de atividade contra bactérias GRAM-positivas, GRAM-negativas e fungo. A análise por espectrometria de massas de ELP revelou a presença de um composto peptídico inédito o qual foi denominado polycerradin. A partir da fração aquosa foi possível a purificação de um novo PAM. A bioatividade do composto foi avaliada e confirmada frente às bactérias GRAM-negativas. A determinação da sequência de aminoácidos foi realizada relatando pela primeira vez a produção do PAM PpRNCD que possui um aminoácido não usual em sua constituição. Em termos de tamanho de molécula, pode-se considerar que o PAM PpRNCD é um dos menores peptídeos naturais ativos relatados até o momento. Uma característica intrigante da sequência de aminoácidos do PpRNCD é a presença da hidroxiprolina como parte da cadeia.

A hidroxiprolina é um constituinte importante da principal proteína estrutural do colágeno e desempenha um papel fundamental na sua síntese e estabilidade (AMIT, et al., 2016). A concentração de hidroxiprolina é uma medida da concentração de colágeno. Assim, uma maior concentração de hidroxiprolina indica uma taxa mais rápida da cicatrização de ferida, além de

apresentar um reflexo da proliferação celular aumentada devido ao aumento da síntese de colágeno (DWIVED, et al. 2016).

A inflamação é considerada um dos mais importantes processos que estão envolvidos na defesa do nosso organismo, entretanto, na grande maioria das vezes a mesma progride para situações dolorosas ou doenças crônicas, necessitando então de intervenção e tratamento farmacológico. O processo inflamatório não é um evento único, ao contrário disso esse processo envolve uma série de eventos que podem ser induzidos por diferentes tipos de estímulos como, por exemplo, agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno anticorpo e ainda danos de origem física ou térmica. A resposta inflamatória é na maioria das vezes acompanhada pelos sinais clínicos clássicos, que são: calor, rubor, dor, edema e a perda da função do local afetado que é decorrente de um influxo marcante de células inflamatórias, além de extravasamento plasmático para o local lesado (CELOTTI & LAUFER, 2001).

Em 1983 com o interesse de auxiliar seu pai, portador de artrite reumatoide severa, o químico alemão Félix Hoffman iniciou junto à companhia Bayer, a qual era vinculado, a produção de uma molécula com atividade analgésica chamada de ácido acetilsalicílico ou aspirina. Após este evento, surge então uma classe de novas drogas, os AINEs, que se tornam os mais utilizados nos últimos 100 anos (DUBOIS, et al. 1998).

O grande interesse pelo processo inflamatório na ciência se dá ao motivo de ser o primeiro sinal biológico em qualquer estado de anormalidade que nosso corpo apresente. Os AINEs possuem um impacto positivo sobre a qualidade de vida do paciente, pois incorporam benefícios como, por exemplo, melhoria de dores musculoesqueléticas, e também em algumas doenças como, por exemplo, a artrite reumatóide, uma doença inflamatória crônica. (GABRIEL e MATTESON, 1995).

Uma revisão sobre o consenso do uso de AINEs em casos de artrite reumatóide foi elaborada em 1995, apresentando as vantagens e as desvantagens de seu uso. Entre os riscos oferecidos devido ao seu uso, podem-se listar as reações gastrointestinais (GI) como dispepsia severa, úlceras duodenais e gástricas. (GABRIEL e MATTESON, 1995). No fim do século XX e início do século XXI foram testemunhados diversos ensaios

clínicos aleatórios de grande porte, organizados para quantificar o risco gastrointestinal dos AINEs. A partir desses estudos descobriu-se inesperadamente um aumento da incidência de infarto do miocárdio em pacientes tratados com o Rofecoxib seletivo de ciclooxigenase-2. Os AINEs ainda podem levar a uma elevação da pressão arterial, logo, pacientes com insuficiência cardíaca congestiva apresentam um risco de descompensação da doença, quando fazem uso desse tipo de medicamento. (BOMBARDIER et al., 2000; VARGA, SABZWARI e VARGOVA, 2017).

O processo inflamatório pode se manifestar de maneira aguda ou crônica. A forma aguda tem curta duração, podendo ser minutos, horas, ou ainda alguns dias, essa forma tem como principais características a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, ocasionando o edema, migração celular, sensibilização e ativação de nociceptores. Já a fase crônica da inflamação possui longa duração (COSTA, 2004; VIZOLI, 2008; BAPTISTINI, 2015). A Carragenina é um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas de ordem Gigartinales. Um dos modelos para indução de inflamação aguda utiliza agentes inflamatórios como a Carragenina, esse modelo foi originalmente proposto por WINTER, et al., (1962) para indução do edema de pata. A carragenina induz uma resposta inflamatória e é altamente sensível aos AINEs, é caracterizada predominantemente por infiltração de neutrófilos. As aminas biogênicas (histamina e serotonina), bradicinina e substância P são liberadas na primeira fase, de 1 a 2 horas após aplicação e são responsáveis pelo desenvolvimento de eventos vasculares. Na segunda fase de 2 a 6 horas, esses eventos são mantidos por outros mediadores, como citocinas (IL-1 e TNF-), prostaglandinas e óxido nítrico (FRANZOTTI, et al. 2000; CAMPOS, et al. 2017). O edema pode ser avaliado de forma direta, por meio da determinação do volume ou da espessura da pata, ou de forma indireta, por meio da determinação do extravasamento de corantes ou substâncias marcadas com elementos radioativos no local onde foi injetado o estímulo inflamatório (VIZIOLI, 2008; COSTA, 2004). Os experimentos de inflamação aguda foram realizados em camundongos fêmeas da linhagem Balb/C seguindo o modelo de edema de pata, baseado no modelo de JAIN, et al., (2008).

Devido a esta ampla gama de efeitos colaterais causados pelo uso prolongado dos AINEs, torna-se necessária a busca por novas moléculas com novos mecanismos na ação anti-inflamatória, visando diminuir ou ainda eliminar os efeitos colaterais citados.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Esse trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade antimicrobiana de microrganismos potencialmente patogênicos para humanos e fitopatogênicos além da atividade anti-inflamatória do extrato total produzido por *Paenibacillus polymyxa*, bactéria endofítica isolada do Cerrado da UFSCar, a partir de *Prunus* sp., conhecido popularmente com pessegueiro do Cerrado.

4.2 Específicos

- 1) Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* do ET de *Paenibacillus polymyxa* contra os seguintes microrganismos potencialmente patogênicos, clinicamente importantes: *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*.
- 2) Comparar a atividade antimicrobiana do extrato total preparado a partir da cepa de *Paenibacillus polymyxa* em dois diferentes meios, ISP2 e YPM, e a efetividade do extrato após filtração e autoclavagem.
- 3) Verificar a atividade antagonista *in vitro* do *Paenibacillus polymyxa* contra os fungos fitopatogênicos: *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sojae* e *Rhizopus microsporus*;
- 4) Traçar um perfil anti-inflamatório a partir da verificação de temperatura, diâmetro da pata e quantificação de leucócitos de camundongos da linhagem Balb/c.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparo do extrato bruto a partir do *Paenibacillus polymyxa*

Neste ensaio foram utilizadas cepas de *P. polymyxa* (SERRANO, et al., 2009) que estão depositados na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) cultivadas em placas de Petri contendo dois meios diferentes, ISP2 (M1) e YPM (M2). O meio ISP2 – International Streptomyces Project Medium (number 2) tem como composição básica (g/L): 10g de extrato de malte; 2,5g de extrato de levedura; 16g de glicose; 15g de ágar. O meio ainda foi suplementado com 0,25% de peptona bacteriológica. O meio YPM – Yeast extract, Peptone, Manitol, tem como composição básica: 20g de extrato de malte; 11,25g de extrato de levedura; 16g de glicose; 11,25g de peptona bacteriológica e 15g de ágar.

A escolha da utilização de dois meios foi baseada em estudos que afirmam que a produção de metabólitos secundários por microrganismos varia qualitativa e quantitativamente de acordo com a cepa e condições de cultivo usadas (LAM, et al., 1989; WANG, et al., 2010). Conforme KAWAI (1992), muitos polissacarídeos bacterianos são produzidos seguindo um processo de fermentação descontínua utilizando diferentes açúcares como fontes de carbono e a produtividade destes pode ser afetada pelas condições culturais, pela composição do meio de cultura, temperatura, pH e aeração. Muitos estudos vêm sendo conduzidos para a otimização dos componentes do meio de crescimento, composição e condições culturais visando aumentar a produção de PAMs (SEN e SWAMINATHAN, 1997; OGUNBANWO, et al., 2003; KORENBLUM, et al., 2005; ERNANDES, 2006; VIJAYALAKSHMI, PREMALATHA e RAJAKUMAR, 2011; SERRANO, 2014; LUSA, et al., 2016).

O meio de inóculo foi preparado transferindo-se 4 alçadas da cultura de *P. polymyxa* contida em placas de Petri, tendo no final a absorbância de 1,0 nm, para um Erlenmeyer com capacidade de 200 mL, contendo 20 mL de caldo de ISP2 (M1) suplementado com 0,25% de peptona e em um segundo momento com o caldo YPM (M2). O pH do meio foi ajustado para 7,0 adicionando-se

solução de NaOH 1M. O cultivo foi mantido *overnight* a 30°C e 180 rpm em *shaker* orbital (Tecnal, TE-424).

Para a produção de substâncias bioativas, 10 mL (5% do volume final) do meio de inoculo foram transferidos para o meio de produção (Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de caldo ISP2 ou YPM). O meio de produção foi incubado a 30°C e 180 rpm, conforme pode ser observado na (Figura 3).

Após ter sido atingida a fase estacionária de crescimento, aproximadamente 48 horas, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos em tubo cônico de 50mL e o sobrenadante cell-free foi filtrado em membrana de 0,22 µm para a obtenção do extrato bruto. Além de filtrado o extrato bruto foi autoclavado para posterior comparação dos resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos, assim pôde ser decidida a melhor forma de esterilização para o extrato bruto (EB) e também avaliado se o mesmo perde sua atividade biológica quando submetido a alta temperatura e pressão. O EBF foi obtido e posteriormente liofilizado no Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação.

Figura 3- Produção do extrato bruto

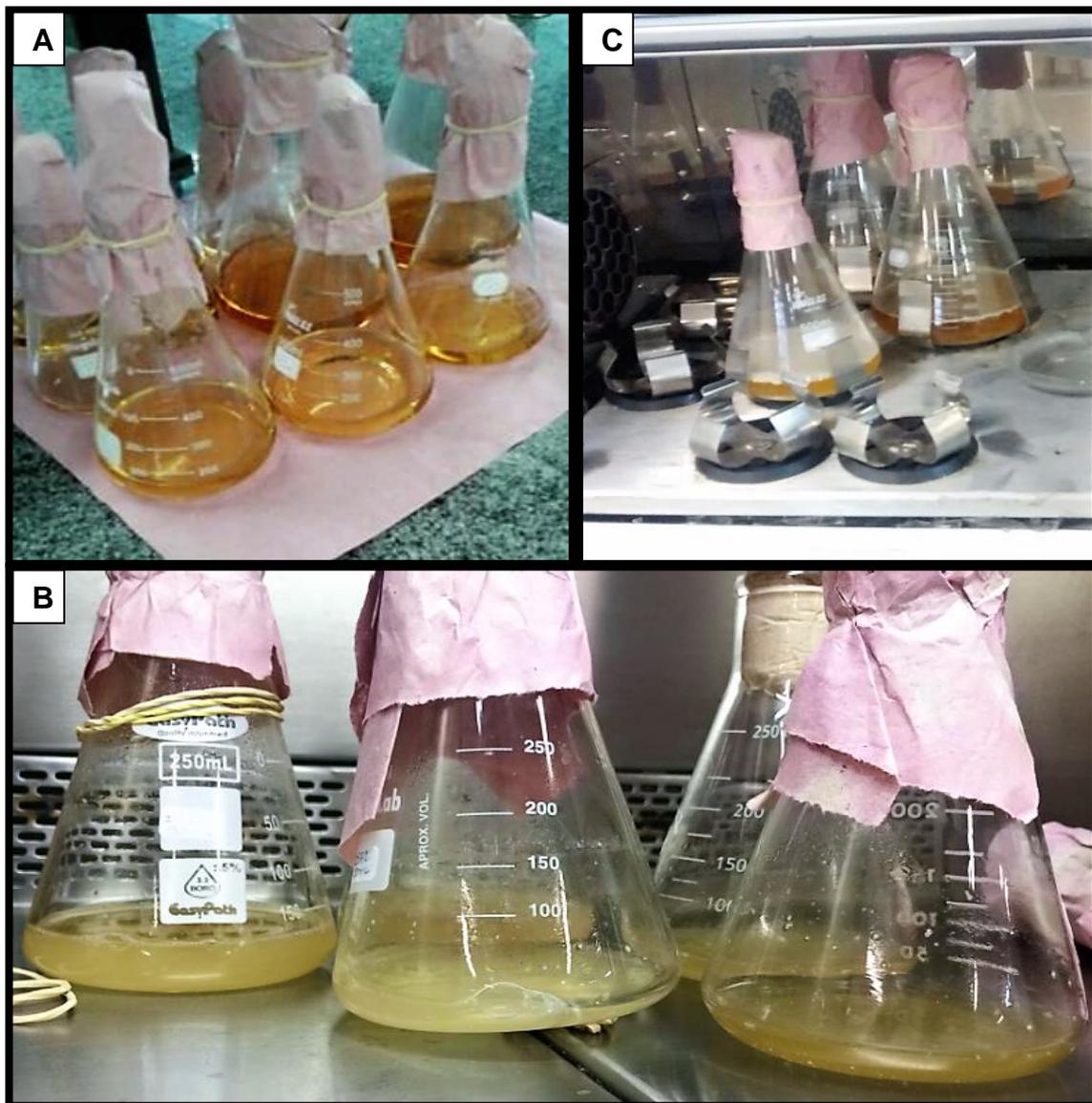


Figura 2. Imagens obtidas durante o processo de produção do extrato bruto fresco, onde são apresentados: A – meios de cultura esterilizados para posterior preparo do inoculo e extrato; B – inoculo pronto para ser transferido para o meio de produção C – Meio de produção.

5.2 Atividade antimicrobiana

5.2.1 Microrganismos potencialmente patogênicos

Para realização dos testes antimicrobianos, os extratos, tanto fresco como liofilizado, foram autoclavados à 121°C por 15 minutos ou filtrados em filtro para seringa, membranas de celulose 0,22 µm em tubos estéreis. O EBF foi autoclavado/filtrado após centrifugação para a subtração de células bacterianas. Depois de centrifugados uma segunda parte dos extratos foram submetidos a liofilização. Após liofilizados os extratos foram diluídos com água ultrapura nas concentrações de 05, 08, 10, 15 e 30 mg.mL⁻¹ e então foram autoclavados/filtrados. Todos os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados em triplicata e as medidas dos halos de inibição foram obtidas através de uma média dos resultados obtidos em milímetros.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, as bactérias foram semeadas em meio Agar Triptico de Soja (TSA, KASVI) e cultivadas por no mínimo 24 horas, posteriormente foram retiradas alíquotas das colônias dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *C. freundii*, *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 11775 e ATCC 25922, *M. luteus*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* (todos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas).

Essas alíquotas foram diluídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,9% e ajustadas na escala 0,5 de Mc Farland em espectrofotômetro. Para o método de difusão em Ágar - Técnica do Disco e do Poço (GROVE e RANDALL, 1955), as placas contendo Ágar Mueller Hinton (MH, KASVI) preparadas antecipadamente, foram deixadas em repouso para atingir a temperatura ambiente, posteriormente, com *swab* estéril, cada microrganismo foi semeado em placa de Petri com ágar MH. Foram feitos poços de 9 mm de diâmetro com o uso da base de uma ponteira de 1000µL esterilizada. Em seguida, foi adicionado à cada poço 100uL do extrato bruto fresco. Foram testados 4 EBFs: 1- EBF em meio ISP2 filtrado; 2- EBF em meio ISP2 autoclavado; 3- EBF em meio YPM filtrado e 4- EBF em meio YPM

autoclavado. Então as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C para posterior leitura quantitativa de formação de halo.

Os mesmos procedimentos citados à cima foram repetidos para os testes realizados com o extrato liofilizado. Todos os extratos, após liofilizados foram diluídos em água deionizada nas seguintes diluições: 30mg.mL⁻¹, 15 mg.mL⁻¹, 10 mg.mL⁻¹, 8 mg.mL⁻¹ e 5mg.mL⁻¹, onde todas foram testadas, as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C para posterior leitura quantitativa de formação de halo.

5.2.2 Microrganismos fitopatogênicos

Foram realizados testes de antagonismo semiquantitativos para a avaliação do potencial do *P. polymyxa* em relação a fungos seguintes fungos fitopatogênicos: *Ceratocystis paradoxa*, *Phytophthora sojae*, *Colletotrichum* e *Fusarium*. Para este ensaio foram utilizadas cepas de *P. polymyxa* cultivadas em ágar ISP2 e em ágar YPM, para comparar se as duas possuem as mesmas características quanto ao antagonismo.

A cultura bacteriana foi transferida para 5 mL de água ultrapura autoclavada e a absorbância (DO 550nm) da cultura foi medida para que o ensaio fosse realizado com aproximadamente 10⁸ células bacterianas mL⁻¹. Em uma placa de Petri de vidro de 90x150 mm, contendo meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA, KASVI) foram inoculados, de um lado a dois centímetros da borda 10µL de solução bacteriana. No mesmo dia foi inoculado no centro da placa de Petri um disco de ágar com crescimento micelial do fungo fitopatogênico com 0,5cm de diâmetro contendo o patógeno (ASSUMPÇÃO, et al., 2009). As placas foram incubadas a 28° C num período de 5 a 7 dias em triplicata. Os Resultados foram interpretados a partir das medições realizadas como mostrado na figura 4.

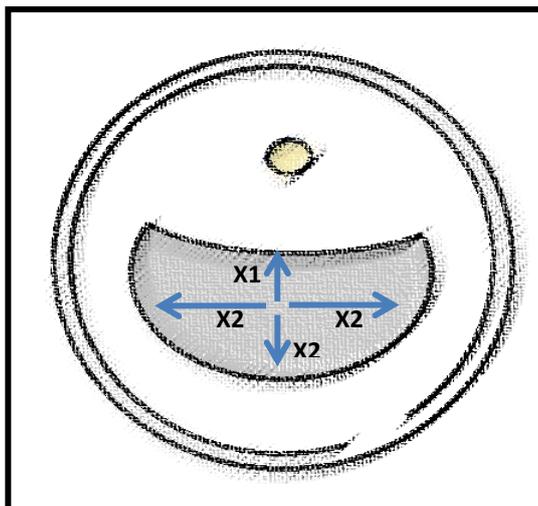


Figura 3. Inibição de crescimento fúngico pelo *P. polymyxa*, onde: X1= raio do crescimento fúngico em direção ao *P. polymyxa*; X2 = raio do crescimento fúngico nas laterais da placa e na direção oposta do isolado bacteriano.

O cálculo da porcentagem de inibição do *P. polymyxa* foi realizado a partir da seguinte fórmula:

$$IA = 100 - \left[\frac{X1}{\left(\frac{X2+X2'+X2''}{3} \right)} \right] \times 100$$

5.4 Atividade anti-inflamatória aguda

Para essa etapa foram utilizados camundongos Balb/C fêmeas, com idade entre 5 e 6 semanas, pesando entre 18 e 20 g. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto, e ficaram alojados no biotério do DMP-UFSCar, com livre acesso a água e ração para roedores. Os experimentos de inflamação aguda foram realizados seguindo o modelo de edema de pata, em que se induz a formação de exsudato inflamatório com a

Carragenina 200µg / pata (Jain, et al., 2008). Este estudo foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética da UFSCar.

Foram utilizados para este experimento 7 grupos com 5 camundongos em cada, sendo divididos em:

Grupo1: controle PBS;

Grupo 2: controle carragenina 24 horas;

Grupo 3: controle carragenina 48 horas;

Grupo 4: carragenina mais tratamento (extrato) 24 horas;

Grupo 5: carragenina mais tratamento (extrato) 48horas;

Grupo 6: carragenina mais tratamento (comercial - Celecoxib) 24 horas;

Grupo 7: carragenina mais tratamento (comercial - Celecoxib) 48 horas.

Todos os animais foram pesados e uma média foi estabelecida a cada grupo para então ser calculada a dose de 5mg para cada quilograma de animal do extrato a ser testado e 3,81 mg para cada quilograma de animal do tratamento comercial Celecoxibe, uma vez que para o mesmo, 100nM = 3,81mg/kg. As doses dos tratamentos, comercial e a ser testado foram diluídas em 200µL de Tampão Fosfato Salino (PBS) 1x e administradas 1 hora antes da indução do edema, via intraperitoneal (JAIN, et al., 2008).

O grupo controle (1) recebeu por via subplantar 0,3mL de PBS 1x na pata posterior direita. Nos grupos 2 e 3 a indução do exsudato inflamatório foi realizada com a Carragenina (Sigma-Aldrich®) 200 µg / pata, o composto foi diluído em 0,3 mL de PBS 1x e a aplicação foi realizada na pata posterior direita. O extrato a ser testado foi administrado nos grupos de animais 4 e 5, 60 minutos antes da carragenina (subplantar). Alíquotas do extrato liofilizado de *P. polymyxa* foram mantidas sob refrigeração a -20°C, o extrato foi diluído em PBS 1x e filtrado em membrana 0,22µm minutos antes da administração nos animais. A dose foi baseada na EC50 que foi de aproximadamente 1mg.mL⁻¹ em 48 e 72 horas. Os testes de citotoxicidade foram realizados com macrófagos e fibroblastos de camundongos, dados em fase de publicação. Após 1 hora do tratamento, ainda nos grupos 4 e 5 foi administrado 0,3mL de carragenina na pata posterior direita. Os grupos 6 e 7 receberam o tratamento comercial,

Celecoxibe diluído em PBS 1x por via intraperitoneal e após 1 hora, também receberam 0,3mL da carragenina na pata posterior direita (Jain, et al., 2008).

As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital antes e após os tratamentos, de hora em hora, por 3 horas, e após 5, 11, 24 e 48 horas após a administração da carragenina. Os resultados foram expressos pela diferença entre as leituras das patas antes e após os tratamentos. A temperatura dos animais foi controlada nos mesmos tempos em que ocorreram as medições da espessura das patas após administração da carragenina com o auxílio de uma câmera térmica. Para fazer as fotografias térmicas é importante o uso de uma luva preta, preferencialmente que não transmita calor, assim os camundongos foram segurados pela ponta da cauda com as patas inferiores apoiadas em uma base de isopor encapado de preto como demonstrado na figura 5 e as fotos foram feitas utilizando a câmera térmica FLIR.



Figura 4. Fotografia obtida com o uso da câmera FLIR. Posicionamento ideal do camundongo para a realização da fotografia da pata posterior direita do animal.

Após 24 horas o primeiro grupo de animais sofreu eutanásia e após 48 horas do início do experimento, o segundo grupo de animais também sofreu eutanásia em câmara de CO₂. Foi retirado dos animais o sangue para confecção do esfregaço, realização de contagem global em câmara de Neubauer e posterior centrifugação para obtenção do plasma; O lavado da

cavidade peritoneal (LCP) foi obtido para contagem global em câmara de Neubauer e posterior confecção de lâminas com o LCP concentrado.

5.4.1 Obtenção das células da cavidade peritoneal (LCP) e do sangue para perfil celular

A técnica de lavagem peritoneal foi utilizada para recuperação de células da cavidade peritoneal (LCP). Para o LCP foi utilizado 3 mL de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato). Empregando uma agulha intraperitonealmente foi injetado o PBS, puxando o peritônio cuidadosamente homogeneizou-se aproximadamente 15 vezes antes de ser recuperado. O LCP foi então recuperado e mantido em tubos de fundo cônico de 15 mL.

O sangue foi obtido após sangria total dos animais por punção braquial. Após punção o sangue foi coletado em tubos de ensaio de vidro pequenos contendo aproximadamente 2 gotas de EDTA. Foram realizadas as contagens total e diferencial de células do sangue e lavado. Para a contagem global foram preparados para cada animal uma diluição de 1:20 sangue ou lavado/Turk. Foram montados tubos com 380 µL de Turk, onde posteriormente foram adicionados 20 µL de sangue, o mesmo foi realizado com as amostras de LCP. Após o preparo da diluição a mesma foi colocada em câmara de Neubauer, aproximadamente 10µL de cada lado da lâmina. A contagem diferencial foi feita nos esfregaços sanguíneos e nas lâminas de LCP preparadas na centrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem). Essas foram coradas pelo corante Panótico-Laborclin, para coloração as lâminas foram submersas no corante 1 por 10 segundos, no corante 2 por 10 segundos e no corante 3 por 8 segundos. Em cada lâmina foram contadas 100 células, utilizando microscopia de luz com aumento final de 1000x. O número total de células/mm³ nos diferentes compartimentos foi determinado empregando solução de Turk (Violeta de Genciana 0.002 g, Ácido Acético 3%) para a lise das hemácias.

5.4.2 Contagem total e diferencial das células do LCP e do sangue

A contagem total de células dos compartimentos foi realizada adicionando-se às amostras solução Turk na diluição de 1:20 individualmente

na câmara de Neubauer, onde foram contados os quatro quadrantes e multiplicado por 50 (fator de diluição) para determinação do número de células totais por mm³ (STIBBE; WEISE; SEIDEL, 1985). Para a contagem diferencial foram confeccionados esfregaços sanguíneos e lâminas do LCP preparadas na citocentrífuga a 1500 rpm por 3 minutos, sendo que ambas foram coradas pelo corante Panótico. Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-as em mononucleados (linfócitos e monócitos), neutrófilos e eosinófilos para determinar a porcentagens destas células nos compartimentos, com auxílio da microscopia de luz com aumento final de 1000 X.

5.5 Análise estatística

Os resultados das análises das amostras foram tratados estatisticamente utilizando o programa statistica versão 13.2, utilizando testes de homogeneidade, kolmogorov para teste de normalidade e para verificar se existe diferença significativas entre as amostras, foram utilizados os métodos de Fisher e Kruskal-Wallis. Para construção dos gráficos foi utilizado o software OriginPro versão 9.0.

6. RESULTADOS

6.1 Determinação da atividade antimicrobiana

6.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana com extratos brutos frescos

A mesma cepa de *P. polymyxa* foi utilizada em dois diferentes meios de cultura, onde, ISP2 (M1) e YPM (M2), para avaliação e comparação da atividade antimicrobiana frente aos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *C. freundii*, *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 11775 e ATCC 25922, *Micrococcus luteus*, *Proteus sp*, *Salmonella sp*, *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 6538, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Os extratos produzidos foram testados após filtração em membranas de 22 µm e também após autoclavagem, 121°C por 15 minutos. Os resultados obtidos estão inseridos na tabela 2.

Tabela 1. Determinação em (mm) da média da atividade antimicrobiana do extrato bruto fresco preparado com os meios M1 e M2, autoclavados (A) e filtrados (F); Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos.

	M1 A	DP	M1 F	DP	M2 A	DP	M2 F	DP
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	11,33	0,58	15,00	0,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	14,33	0,58
<i>Escherichia coli 11775</i>	16,33	0,58	14,66	2,08	13,66	0,58	17,00	1,73
<i>Escherichia coli 25922</i>	15,33	0,58	12,33	1,15	14,00	0,00	17,00	1,00
<i>Micrococcus luteus</i>	14,00	1,00	11,66	1,15	11,00	1,00	15,00	1,00
<i>Salmonella 19196</i>	11,33	1,53	10,66	0,58	12,66	0,58	16,33	0,58
<i>S. aureus 29213</i>	14,66	1,53	11,33	1,15	11,00	1,00	12,33	0,58
<i>S. aureus 6538</i>	13,33	1,53	12,66	0,58	11,66	0,58	15,00	0,00
<i>S. epidermidis 12228</i>	15,03	0,57	14,00	1,73	11,33	0,57	11,33	1,53
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	13,66	1,15	18,00	0,00

Na figura 6 podem-se observar antimicrobianos com três diferentes microrganismos potencialmente patogênicos. Os resultados apresentados acima mostram a efetividade do extrato bruto nos dois meios que foram utilizados para a produção do mesmo, sendo notório o melhor desempenho do extrato produzido com o M2 (YPM) figura 7.

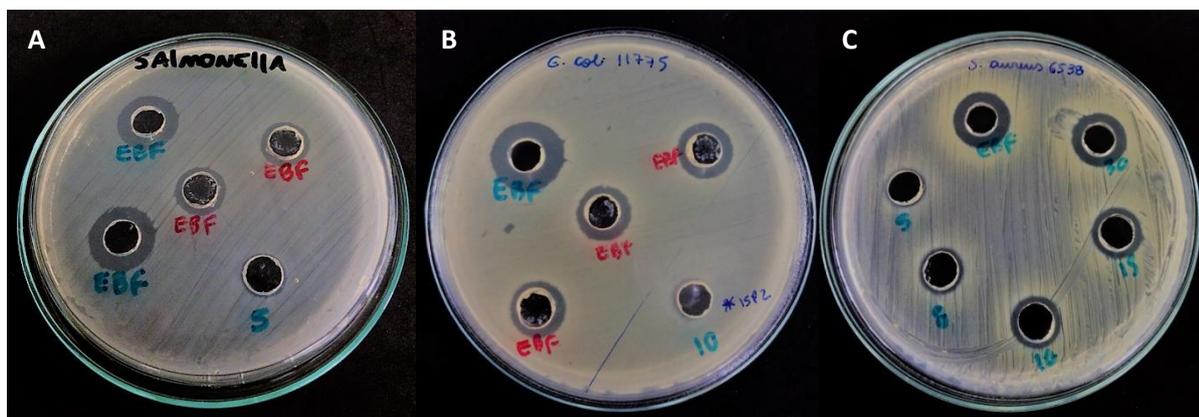


Figura 5. Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato bruto fresco produzido com o meio M2 autoclavados em vermelho e filtrados em azul. A) EBF contra cepas de *Salmonella* sp. B) EBF contra cepas de *E. coli* ATCC 11775; C) EBF contra cepas de *S. aureus* ATCC 6538.

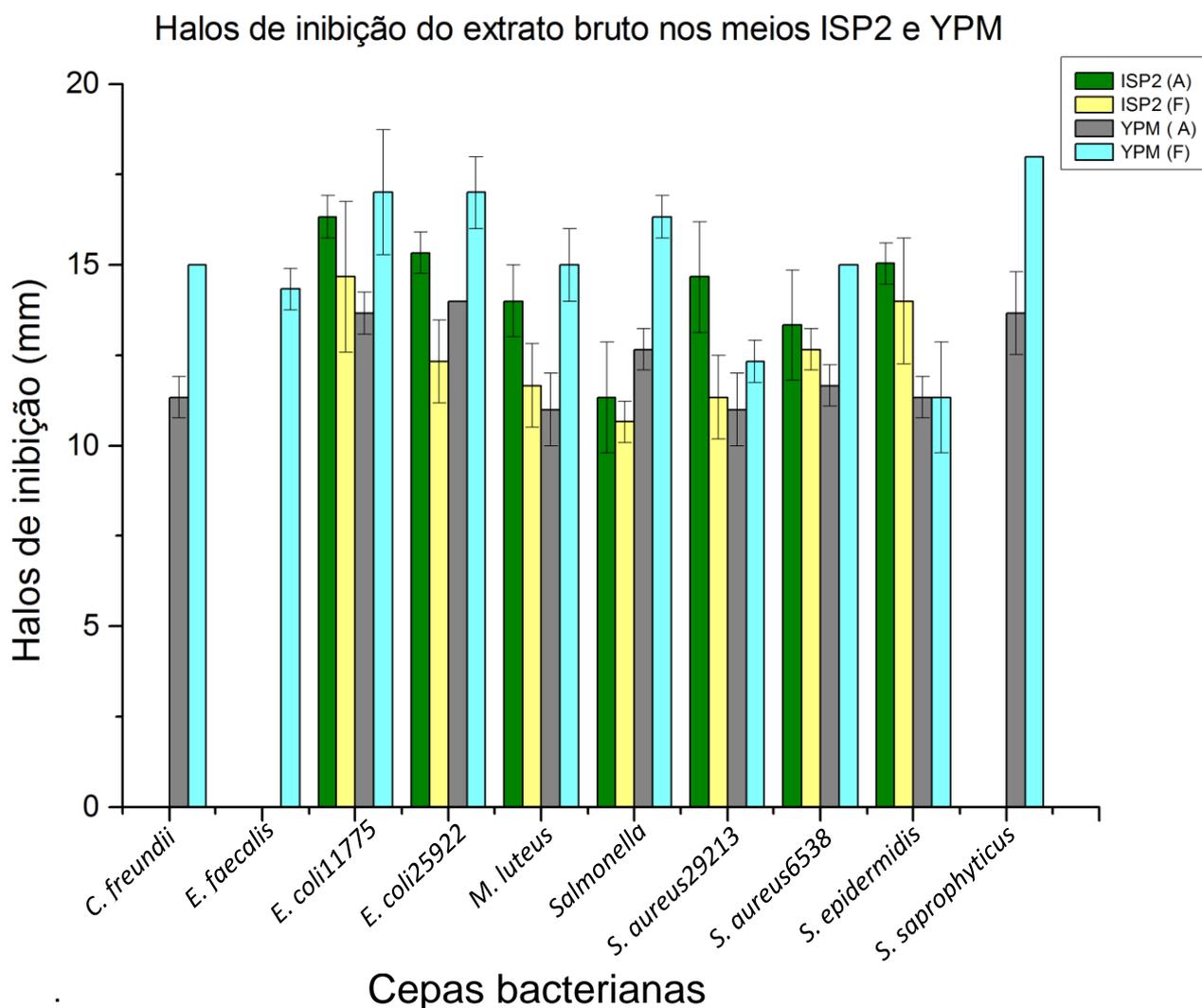


Figura 6. Gráfico representativo da tabela 1. Esboça a diferença entre os halos obtidos com o uso do extrato bruto fresco produzido nos dois diferentes meios e esterilizados em diferentes condições, autoclavagem ou filtragem, de modo geral nota-se uma melhor performance para o extrato produzido com o meio YPM e filtrado

6.1.2 Determinação da atividade antimicrobiana com extratos liofilizados

Após os EBF serem liofilizados, foram diluídos nas seguintes concentrações: 5, 8, 10, 15, 30 mg.mL⁻¹. Foram realizadas diluições igual e menor que 1mg/mL⁻¹. A menor diluição apresentando halos foi a de 5mg.mL⁻¹. Para os microrganismos *Candida albicans*, *Proteus* spp e *Pseudomonas aeruginosa* nenhum extrato em nenhuma concentração apresentou atividade

antimicrobiana. Para os demais microrganismos os resultados estão expressos nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 2. Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M1, nas diluições de 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e autoclavado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos.

	30 mg		15 mg		10 mg	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Escherichia coli</i> 11775	14,00	1,00	12,33	1,53	11,33	1,53
<i>Escherichia coli</i> 25922	14,00	1,00	11,00	1,00	0,00	0,00
<i>Micrococcus luteus</i>	14,33	1,15	13,00	1,00	11,00	1,00
<i>S. aureus</i> 29213	11,66	1,15	12,66	1,52	11,33	1,53
<i>S. aureus</i> 6538	14,33	1,15	11,33	1,15	12,00	1,00
<i>S. epidermidis</i> 12228	14,66	0,58	13,66	0,58	-	-

Na tabela 3 está apresentada a determinação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e esterilizado por processo de filtragem em filtros para seringa com membrana de celulose e poros de 0,22 µm.

Tabela 3. Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M1, nas diluições de 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e filtrado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos.

	30 mg		15 mg		10 mg	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Escherichia coli</i> 11775	14,00	1,00	12,33	1,53	11,00	1,00
<i>Escherichia coli</i> 25922	14,00	1,00	12,66	0,58	11,33	1,15
<i>Micrococcus luteus</i>	16,33	1,53	12,66	0,58	11,33	1,15
<i>S. aureus</i> 29213	11,66	1,53	11,00	0,00	10,66	0,58
<i>S. aureus</i> 6538	12,33	0,58	11,00	1,00	11,33	1,15
<i>S. epidermidis</i> 12228	13,00	1,00	12,00	0,00	-	-

Na tabela 4 está apresentada a determinação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e esterilizado por processo de autoclavagem (121 °C por 15 minutos).

Tabela 4. Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M2, nas diluições de 8, 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e autoclavado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos.

	30	DP	15	DP	10	DP	8	DP
<i>Citrobacter freundii</i>	15,00	1,00	14,66	1,15	12,66	0,57	-	-
<i>Escherichia coli 11775</i>	15,33	0,58	13,66	0,58	12,00	1,00	11,00	1,00
<i>Escherichia coli 25922</i>	15,00	0,00	13,00	1,00	11,33	0,58	11,00	0,00
<i>Salmonella sp.</i>	13,33	1,53	11,66	0,58	-	-	-	-
<i>S. aureus 29213</i>	12,33	1,15	12,00	1,00	12,00	1,00	11,33	0,58
<i>S. aureus 6538</i>	12,66	1,15	12,00	1,00	11,66	0,57	10,66	1,15
<i>S. saprophyticus</i>	14,66	1,15	12,66	1,15	-	-	-	-

Na tabela 5 está apresentada a determinação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado e esterilizado por processo de filtragem em filtros para seringa com membrana de celulose e poros de 0,22 µm.

Tabela 5. Determinação em (mm) da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado produzido com M2, nas diluições de 5, 8, 10, 15, 30 mg.mL⁻¹ e filtrado; Desvio Padrão (DP); (-) para resultados negativos.

	30	DP	15	DP	10	DP	8	DP	5	DP
<i>Citrobacter freundii</i>	17,00	1,73	16,66	0,58	13,33	1,15	13,00	1,00	-	-
<i>Escherichia coli 11775</i>	18,33	0,58	16,33	0,58	15,66	0,58	13,66	0,58	11,33	1,15
<i>Escherichia coli 25922</i>	18,33	0,58	16,33	0,58	15,00	1,00	13,33	0,58	12,00	0,00
<i>Salmonella sp.</i>	16,66	0,58	15,33	0,58	13,33	0,58	13,00	0,00	-	-
<i>S. aureus 29213</i>	15,00	1,00	15,00	1,00	13,00	1,00	12,66	0,57	12,33	1,15
<i>S. aureus 6538</i>	16,00	1,73	14,33	1,15	13,33	1,15	11,66	1,15	11,66	1,53
<i>S. saprophyticus</i>	19,00	1,00	15,33	0,57	15,00	1,73	12,00	1,00	-	-

6.1.3 Análise dos extratos liofilizados frente a esterilização a partir da autoclavagem e filtragem

As figuras 8 e 9 apresentam as imagens fotográficas demonstrando os ensaios antimicrobianos realizados com extrato liofilizado autoclavado e filtrado. Nota-se que para a figura 8, o extrato filtrado (em verde) apresentou halos de inibição contra os microrganismos potencialmente patogênicos maiores, sugerindo que após condições de autoclavagem o extrato perde sua bioatividade parcial.

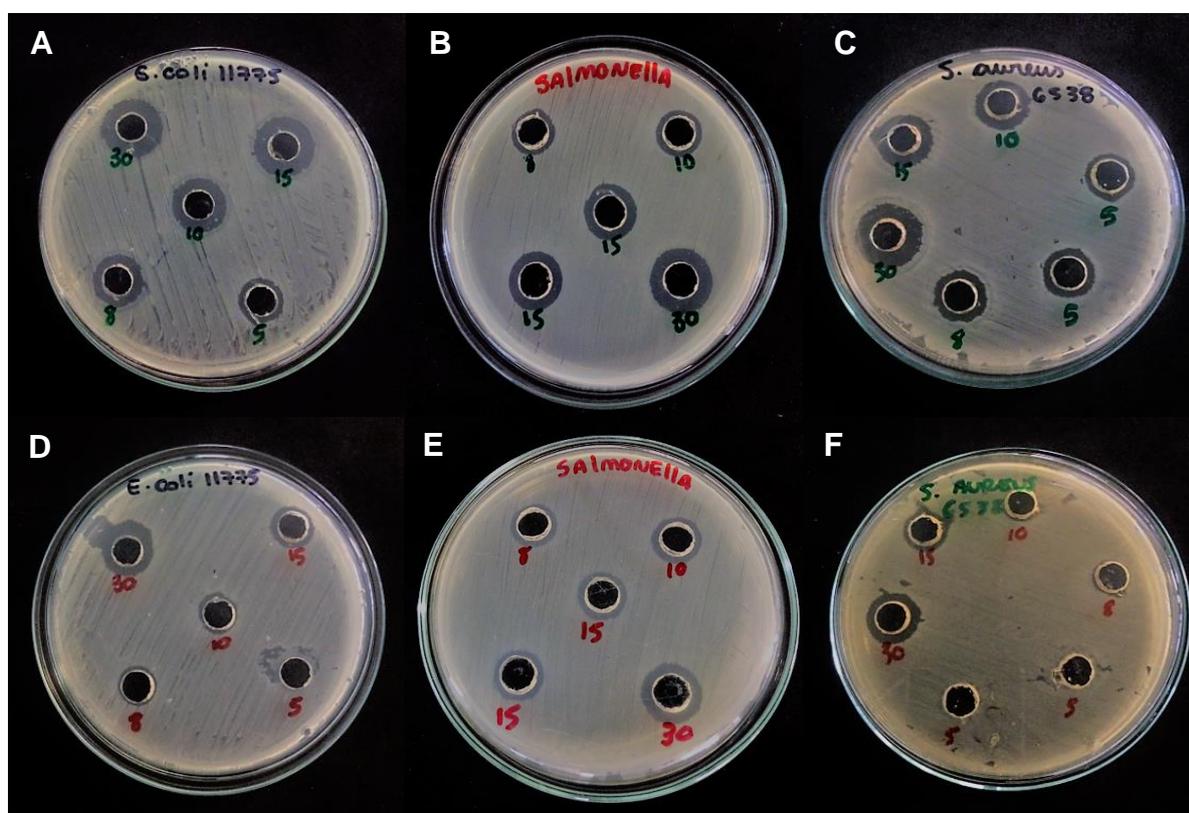


Figura 7. Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato liofilizado produzido em M2 autoclavados em vermelho e filtrados em verde, nas concentrações de 5 a 30 mg.mL⁻¹ A-D) *E. coli*; B-E) *Salmonella* sp.; C-E) *S. aureus*

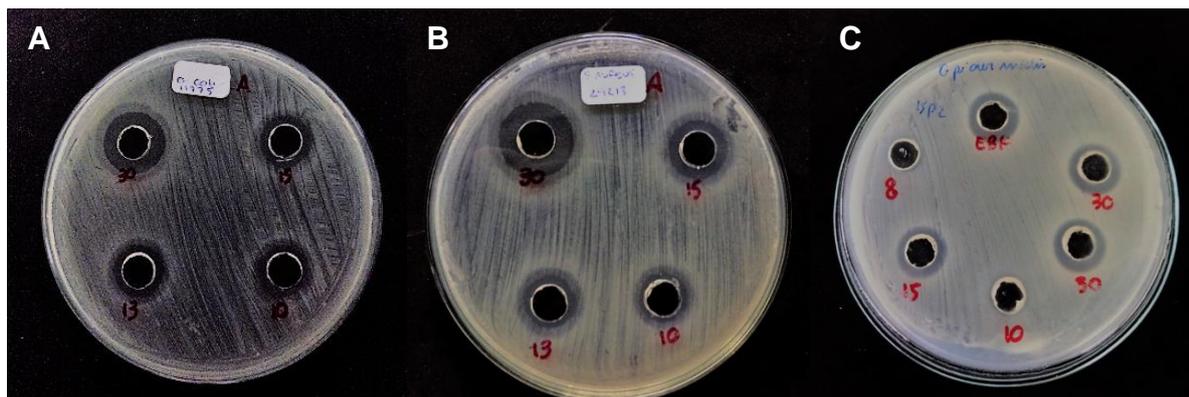


Figura 8. Imagem fotográfica convencional sobre os ensaios antimicrobianos com extrato liofilizado produzido em M1 autoclavados, nas concentrações de 8 a 30 mg.mL⁻¹ A) *E. coli*; B) *S. aureus*; C-E) *S. epidermidis*

O extrato liofilizado quando produzido em meio M1 apresenta bioatividade similar nas condições de autoclavagem e filtração, nota-se que pequenas diferenças entre os resultados de inibição obtidos estão presentes, porém o extrato não perde sua bioatividade após a autoclavagem até a concentração de 15 mg.mL⁻¹. Porém em 10 mg.mL⁻¹ o extrato autoclavado perdeu sua atividade contra cepas de *E. coli* ATCC 25922. Isso provavelmente ocorre pela razão da atividade obtida com o extrato filtrado ser mínima, ainda quando na próxima diluição 5 mg.mL⁻¹ tanto o extrato autoclavado como o filtrado perderam sua bioatividade (Figura 10).

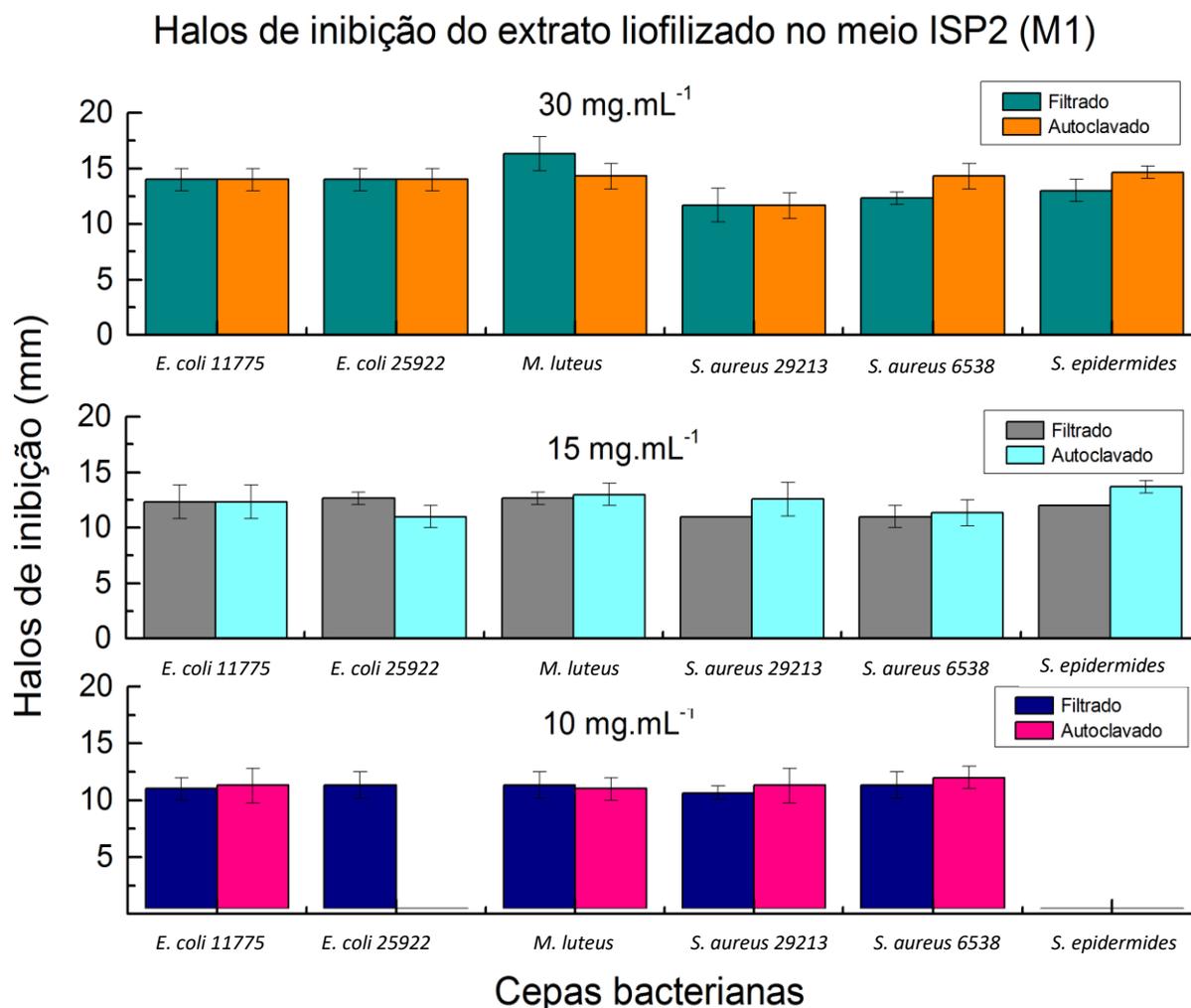


Figura 9. Gráficos comparativos entre os extratos autoclavados e filtrados produzidos a partir d M1, os gráficos estão divididos de acordo com a concentração do extrato testado, apenas as concentrações com valores significativos foram expressas, nesse caso 10, 15 e 30 mg.mL⁻¹.

O extrato liofilizado quando produzido em meio M2 apresenta bioatividade reduzida após o tratamento por autoclavagem, em todos os casos analisados o extrato filtrado obteve melhores resultados para inibição dos microrganismos potencialmente patogênicos, concluindo que para este caso há perda da bioatividade do extrato após autoclavagem (Figura 11).

Halos de inibição do extrato liofilizado no meio YPM (M2)

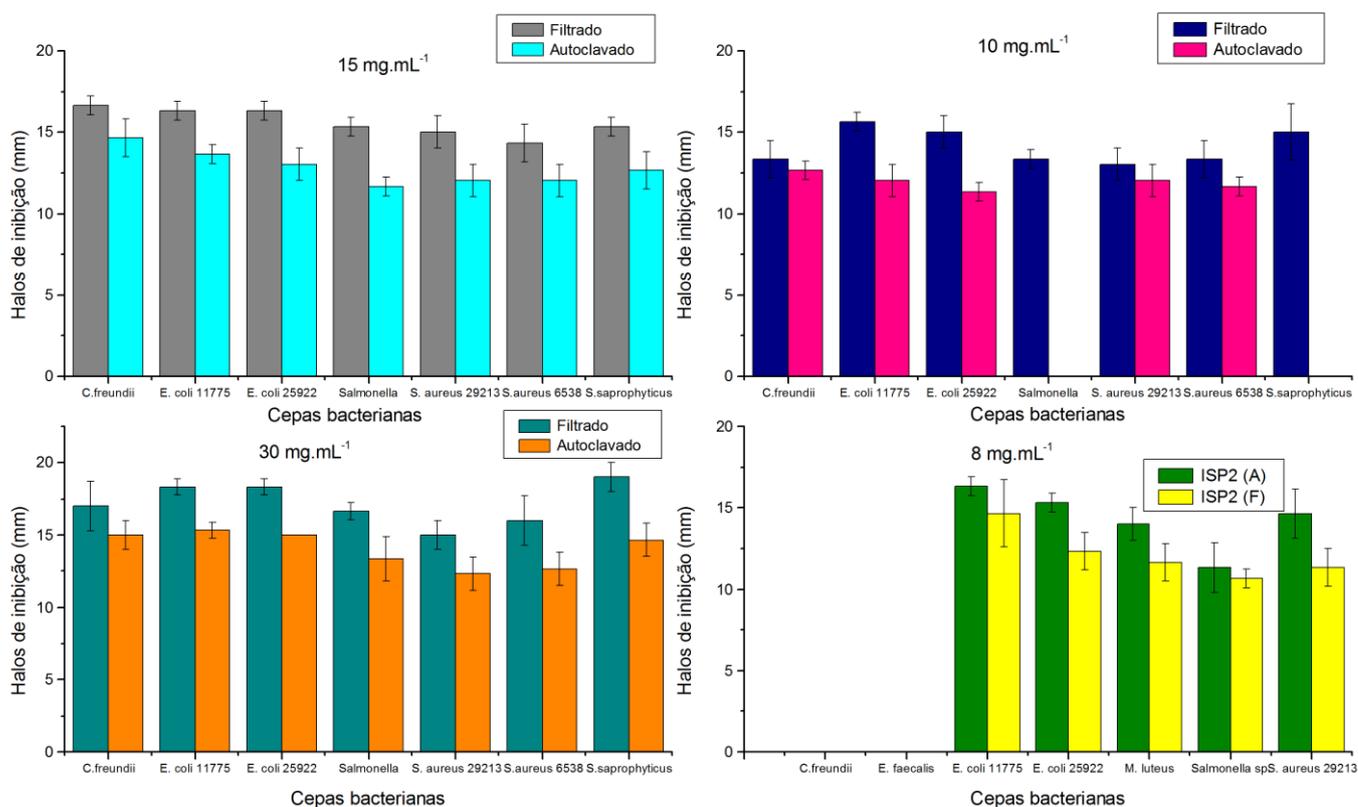


Figura 10. Gráficos comparativos entre os extratos autoclavados e filtrados produzidos a partir de M2, os gráficos estão divididos de acordo com a concentração do extrato testado, apenas as concentrações com valores significativos foram expressas, nesse caso 8, 10, 15 e 30 mg.mL⁻¹.

6.1.4 Análise dos extratos liofilizados frente aos diferentes meios utilizados

Os extratos como já citado foram produzidos em dois meios distintos, ISP2 e YPM, para análise da produção de metabólitos bioativos do extrato. Foi verificada diferença entre os dois extratos quanto a sua bioatividade antimicrobiana, sendo que, o extrato quando produzido com o meio de cultura YPM apresentou melhores resultados em praticamente todos os casos, isso provavelmente devido ao meio apresentar maiores concentrações de extrato de malte, extrato de levedura e peptona bacteriológica, uma vez que esses foram os únicos fatores divergentes. Figura 12.

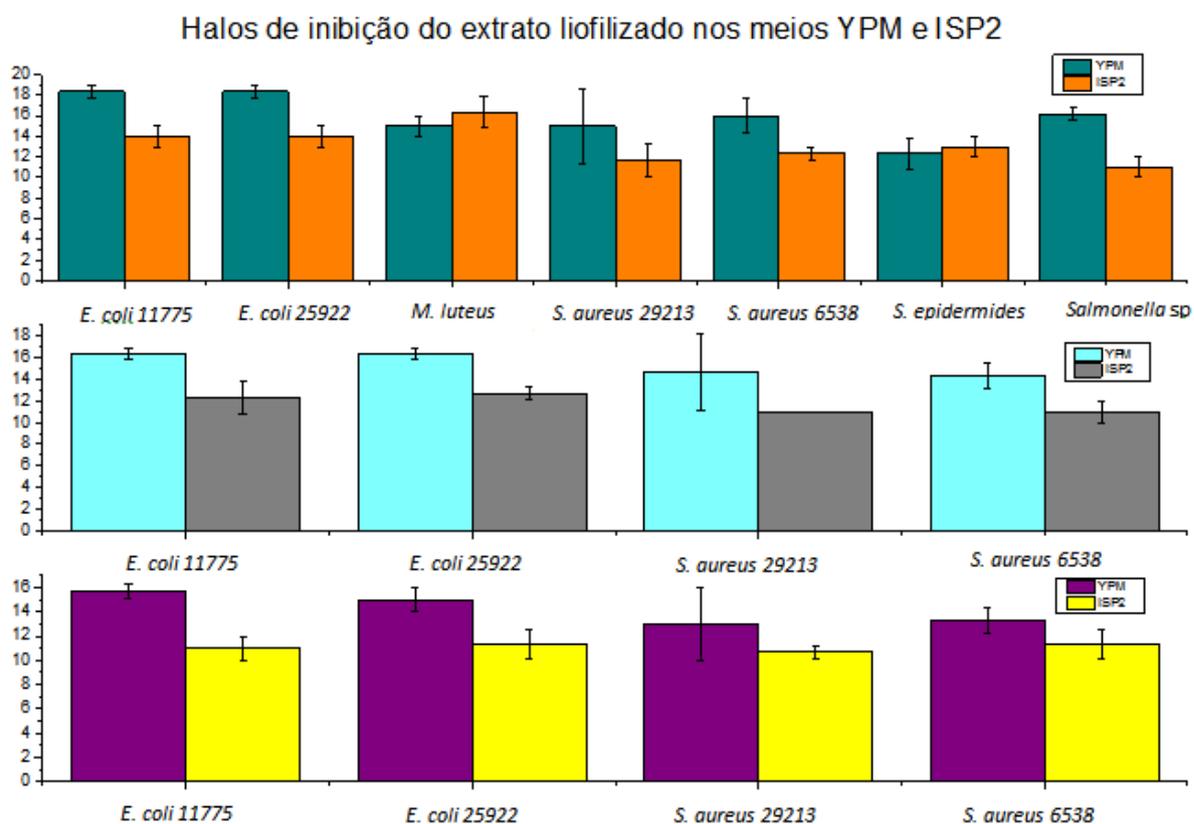


Figura 11. Gráficos representando o uso dos dois diferentes meios de cultura, YPM e ISP2, para a produção do extrato liofilizado, em A- extrato liofilizado na concentração de 30 mg.mL⁻¹; B extrato liofilizado na concentração de 15 mg.mL⁻¹; C- extrato liofilizado na concentração de 10 mg.mL⁻¹. A performance do meio YPM se mostrou melhor em todos os casos.

6.2 Determinação da atividade de antagonismo contra fitopatógenos

Cepas de *P. polymyxa* foram cultivadas e mantidas em dois diferentes meios, M1 e M2 e os testes de antagonismo, foram realizados com as duas cepas, para verificação do maior potencial de bioatividade apresentado. O *P. polymyxa* se mostrou positivo para 3 dos 5 fitopatogênicos testados (Tabela7)

Tabela 6. Determinação do índice de antagonismo de fitopatógenos, onde: P.s- é representativo do *Phytophthora sojae*; F.o(a)- *Fusarium oxysporum* (algodão); F.o(f)- *Fusarium oxysporum* (feijão); C- *Colletotrichum* sp; M1- ISP2; M2- YPM; IA- Índice de antagonismo

Amostra	IA	MÉDIA	DP
P.s m2	58,5	59,66	3,10
P.s m2	64,4		
P.s m2	59,7		
P.s m1	40,7	61,39	12,50
P.s m1	61,4		
P.s m1	63,1		
F.o(a) m2	46,4	51,72	4,97
F.o(a) m2	56,4		
F.o(a) m2	51,7		
F.o(a) m1	49,1	49,11	11,00
F.o(a) m1	61,4		
F.o(a) m1	39,5		
F.o(f) m2	19,2	20,25	2,54
F.o(f) m2	24,1		
F.o(f) m2	20,3		
F.o(f) m1	29,4	28,26	12,4
F.o(f) m1	28,3		
F.o(f) m1	7,1		
C m2	23,0	26,74	10,63
C m2	26,7		
C m2	43,0		
C m1	40,0	40,00	5,62
C m1	41,4		
C m1	31,0		

Para *Ceratocystis paradoxa* o *P. polymyxa* não apresentou nenhuma atividade independente do meio em que foi cultivado, o controle negativo e o ensaio de antagonismo ficaram iguais, por esse motivo o mesmo não está presente na tabela 7.

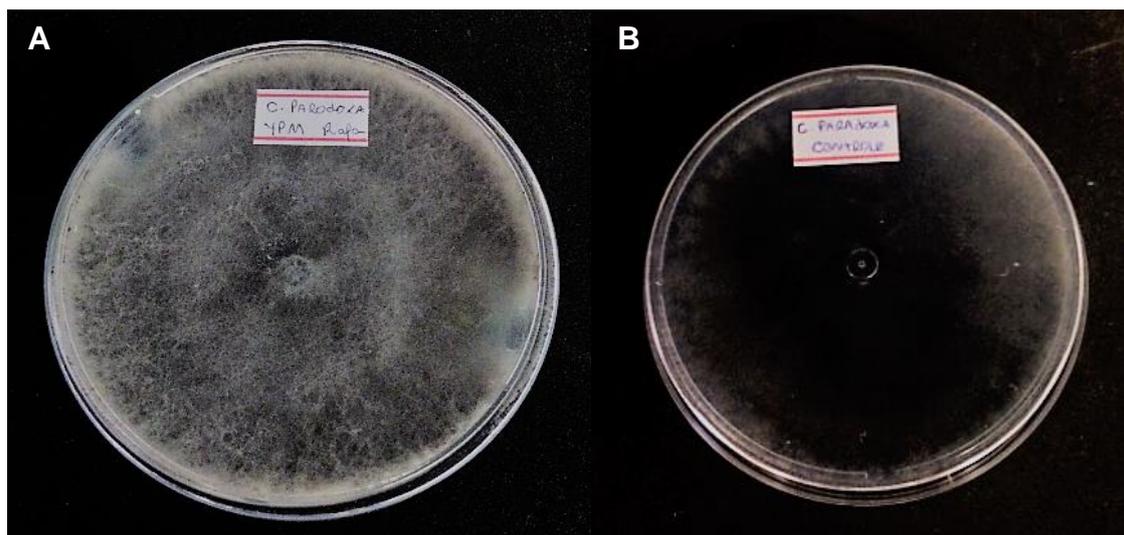


Figura 12. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* versus *C. paradoxa*. A- teste com *P. polymyxa*; B- controle.

O fitopatógeno *Colletotrichum* apresentou sensibilidade contra o *P. polymyxa* RNC-D, a média do índice de antagonismo foi de 40% com desvio padrão de 5,62, dos fitopatógenos testados este foi considerado como o que apresentou uma menor inibição.

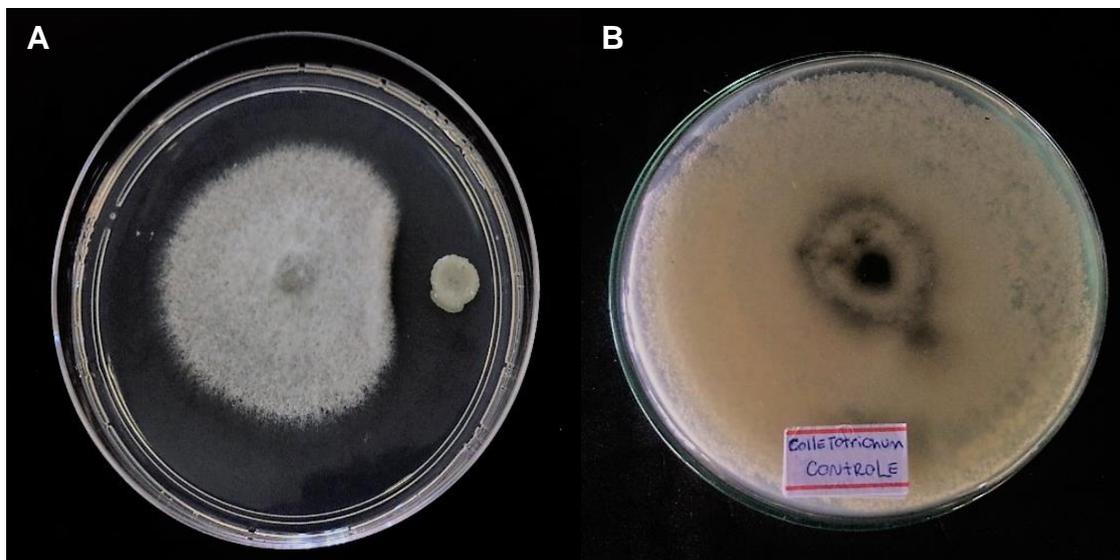


Figura 13. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* versus *Colletotrichum*. A- teste com *P. polymyxa*; B- controle.

O fitopatógeno *F. oxysporum* isolado a partir do algodão apresentou sensibilidade contra o *P. polymyxa* RNC-D, a média do índice de antagonismo foi de 49,11 % com desvio padrão de 11,0 para M1, para M2 a média foi de 51,7% com desvio padrão de 4,97. Essa variação do índice de antagonismo não é considerada significativa, sendo assim, o *P. polymyxa* independente do meio cultivado apresentou ótimo efeito sobre o fitopatógeno.

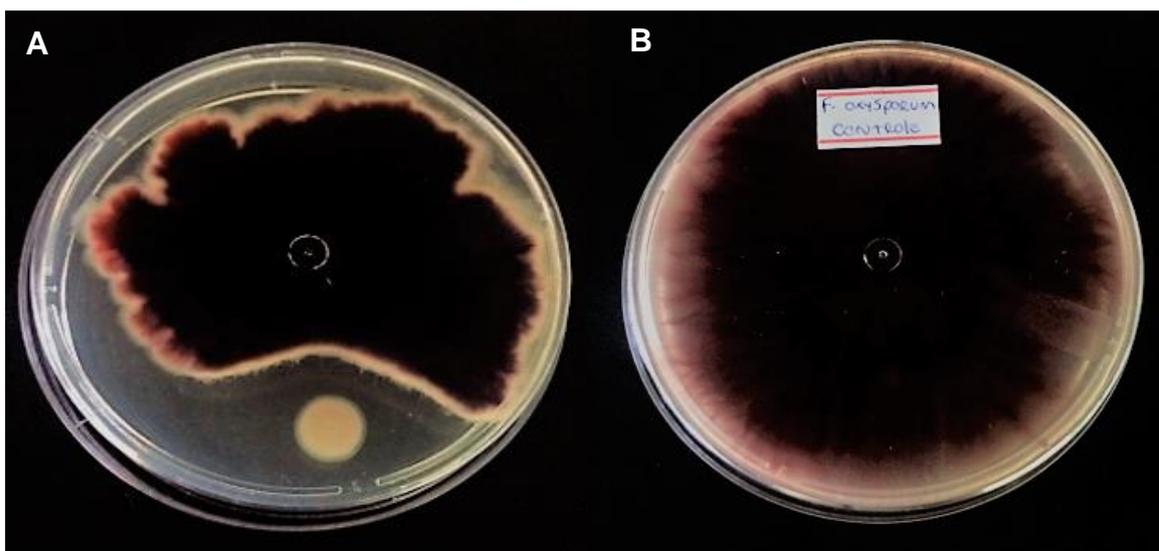


Figura 14. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* versus *F. oxysporum* do algodão. A- teste com *P. polymyxa*; B- controle.

O fitopatógeno *F. oxysporum* isolado a partir do feijão apresentou sensibilidade contra o *P. polymyxa* RNC-D, a média do índice de antagonismo foi de 28,26 % com desvio padrão de 12,4 para M1, para M2 a média foi de 20,25% com desvio padrão de 2,54. Assim é possível afirmar que o *P. polymyxa* quando cultivado em M1 é mais eficaz na inibição do fitopatógeno.

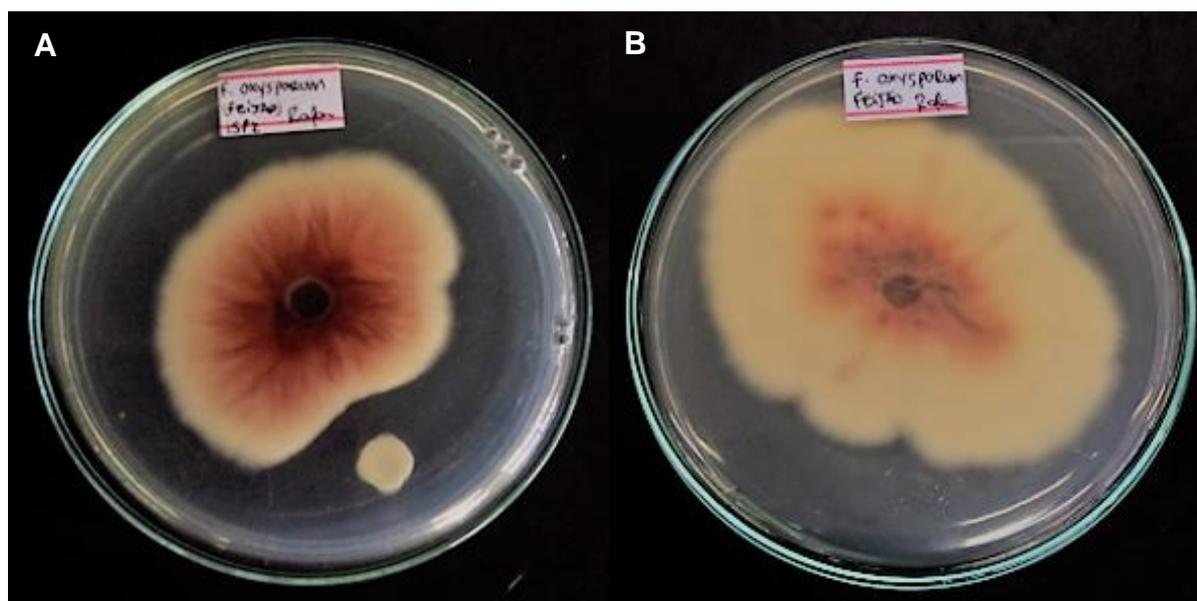


Figura 15. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* versus *F. oxysporum* do feijão. A- teste com *P. polymyxa*; B- controle.

O fitopatógeno *P. sojae* apresentou sensibilidade contra o *P. polymyxa* RNC-D, a média do índice de antagonismo foi de 61,39 % com desvio padrão de 12,50 para M1, para M2 a média foi de 59,66% com desvio padrão de 4,97. Essa variação do índice de antagonismo não é considerada significativa, sendo assim, o *P. polymyxa* independente do meio cultivado apresentou efeito significativo sobre o fitopatógeno.

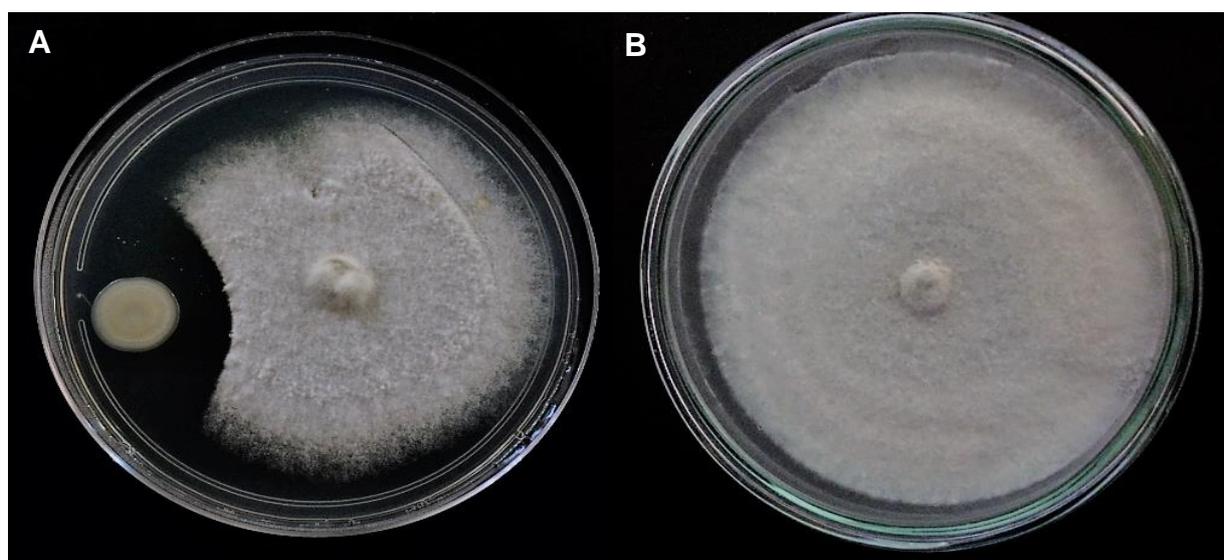


Figura 16. Teste de antagonismo de fitopatógeno, *P. polymyxa* versus *P. sojae* A- teste com *P. polymyxa*; B- controle.

Para *R. microsporus* o *P. polymyxa* não apresentou nenhuma atividade independente do meio em que foi cultivado, o controle negativo e o ensaio de antagonismo ficaram iguais, por esse motivo o mesmo não está presente na tabela 7.

6.3 Determinação da atividade anti-inflamatória

6.3.1 Edema de pata

Analisando as medições do diâmetro das patas, nota-se que no geral todos os grupos tiveram a espessura do edema de pata diminuído, porém nos grupos 3 e 4 (controles positivos para inflamação) foi observado que a espessura do edema praticamente se manteve, caindo apenas 0,4 mm em 24 horas para o grupo 2 e 0,2 mm em 48 horas para o grupo 3. Para o grupo 1 (controle negativo para inflamação) a queda se deu em 0,9 mm após 24 e 48 horas. Para os grupos que receberam tratamento a ser testado (extrato) a queda da espessura do edema se deu em 0,9 mm para o grupo 4 em 24 horas e 1,2 mm para o grupo 5 em 48 horas. Finalmente para os grupos que receberam o tratamento comercial, mostrou-se a diminuição de 0,7 mm em 24 e 48 horas para os grupos 6 e 7 respectivamente. Os dados para medições até 24 horas estão expressos na tabela 7, e para 48 horas na tabela 8. Nota-se que com o extrato assim como com o tratamento comercial obteve-se diminuição do edema após o tratamento.

Tabela 7. Determinação da média da espessura das patas em (mm) antes da indução da inflamação, logo após a indução, 1, 2, 3, 5, 11 e 24 horas após a indução, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G2 representa controle Carragenina 24 horas, G4 tratamento com o extrato 24 horas e G6 tratamento comercial (Celecoxibe) 24 horas. Ao lado de cada coluna a coluna DP representa o desvio padrão de cada média esboçada.

Espessura das patas						
	G2	DP	G4	DP	G6	DP
Antes da Carragenina	1,5	0,1	1,5	0,2	1,5	0,1
Após Carragenina	3,2	0,2	3,1	0,2	3,1	0,1
1 hora após	2,9	0,10	2,5	0,22	2,7	0,16
2 horas após	2,8	0,13	2,3	0,19	2,5	0,18
3 horas após	2,7	0,14	2,6	0,23	2,4	0,10
5 horas após	2,7	0,23	2,1	0,04	2,1	0,16
11 horas após	3,0	0,08	2,2	0,07	2,3	0,12
24 horas após	2,8	0,05	2,2	0,12	2,3	0,32

Tabela 8. Determinação da média da espessura das patas em (mm) antes da indução da inflamação, logo após a indução, 1, 2, 3, 5, 11, 24 e 48 horas após a indução, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G1 representa controle PBS, G3 representa controle Carragenina 48 horas, G5 tratamento com o extrato 48 horas e G7 tratamento comercial (Celecoxibe) 48 horas. Ao lado de cada coluna a coluna DP representa o desvio padrão de cada média esboçada

	Espessura das patas							
	G1	DP	G3	DP	G5	DP	G7	DP
Antes da Carragenina	1,6	0,1	1,5	0,1	1,5	0,1	1,5	0,1
Após Carragenina	3,0	0,2	3,2	0,2	3,4	0,1	3,1	0,3
1 hora após	2,4	0,18	3,0	0,17	2,6	0,17	2,6	0,15
2 horas após	2,1	0,08	3,1	0,22	2,3	0,26	2,4	0,26
3 horas após	2,1	0,08	3,2	0,21	2,4	0,23	2,2	0,19
5 horas após	2,4	0,13	3,2	0,18	2,5	0,16	2,1	0,32
11 horas após	2,4	0,13	3,2	0,19	2,5	0,11	2,2	0,33
24 horas após	2,1	0,15	3,0	0,15	2,1	0,11	2,3	0,18
48 horas após	2,1	0,11	3,0	0,13	2,1	0,09	2,3	0,19

6.3.2 Análise de temperatura

Durante as medidas, houve o cuidado de evitar qualquer ação que interferisse na medida da temperatura. Dessa forma, para que a temperatura do ambiente e a das mãos que manusearam os animais não interferisse nas temperaturas obtidas, os animais foram apoiados pela cauda no momento da obtenção da imagem com a câmera termográfica. Nas tabelas 9 e 10 estão expressos os valores das médias de temperatura obtidos com o auxílio da câmera térmica FLIR para grupos de 24 e 48 horas respectivamente.

Analisando a tabela 9 pode-se notar que o grupo 2 teve uma temperatura elevada quando comparada a todos os outros grupo4. A figura 18 apresenta o gráfico exibindo os valores de temperatura apresentados pelos grupos 2, 4 e 6,

assim. Os dados citados à cima se repetem para os grupos de 48 horas, porém nota-se que após 24 horas os três grupos tiveram a temperatura elevada. Figuras 19.

Tabela 9. Determinação da média da temperatura das patas em (°C) 1, 2, 3, 5, 11 e 24 horas após a indução da inflamação, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G2 corresponde ao controle Carragenina 24 horas, G4 tratamento com o extrato 24 horas e G6 tratamento (Celecoxibe) 24 horas.

Temperatura das patas 24 horas						
	G2	DP	G4	DP	G6	DP
1 hora após	26,9	0,50	25,6	0,40	25,3	0,73
2 horas após	28,2	1,52	25,5	1,08	25,8	0,12
3 horas após	26,7	1,17	24,5	1,22	25	0,57
5 horas após	28,6	0,83	25,7	0,73	26,1	0,38
11 horas após	27,8	1,10	26,1	0,55	24,8	1,30
24 horas após	28,3	1,03	24,6	0,48	24,4	0,72

Tabela 10. Determinação da média da temperatura das patas em (°C) 1, 2, 3, 5, 11, 24 e 48 horas após a indução da inflamação, (G) designa cada um dos grupos analisados, onde G1 corresponde ao controle PBS, G3 Carragenina 48 horas, G6 tratamento com o extrato 48 horas e G6 tratamento comercial (Celecoxibe) 48 horas.

Temperatura das patas								
	G1	DP	G3	DP	G5	DP	G7	DP
1 hora após	25,3	0,38	27,1	0,44	25,7	0,61	25,8	0,27
2 horas após	25	0,60	27,3	0,80	25,4	0,80	25,9	1,58
3 horas após	25,2	0,70	27,1	0,76	26,4	0,51	26	0,56
5 horas após	24,8	0,86	27,1	0,55	26	0,76	26	1,13
11 horas após	27	0,56	27,9	0,73	25,1	1,45	26,2	0,83
24 horas após	25,2	0,50	27,9	0,90	23,9	0,68	24	0,33
48 horas após	26,3	1,98	28,3	0,43	27	0,53	27,5	0,61

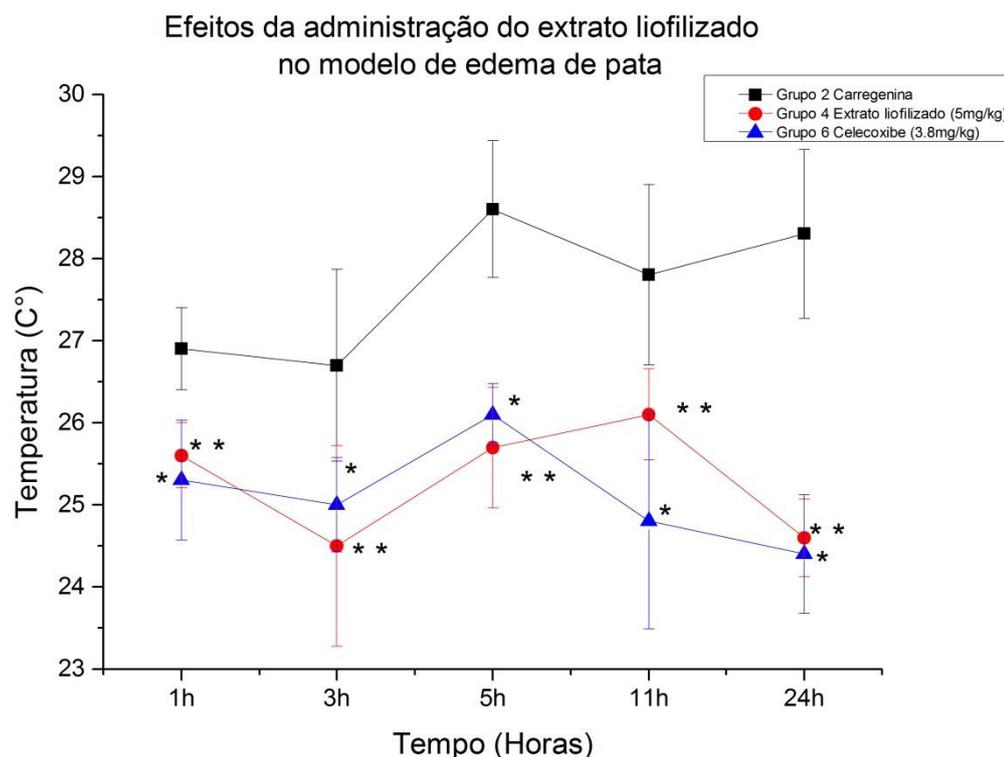


Figura 17. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a temperatura do membro inferior em camundongos injetados com carragenina (200µg/animal). Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias

das temperaturas (*) (**) indicam diferenças significativas em relação ao grupo carragenina ($p < 0,05$).

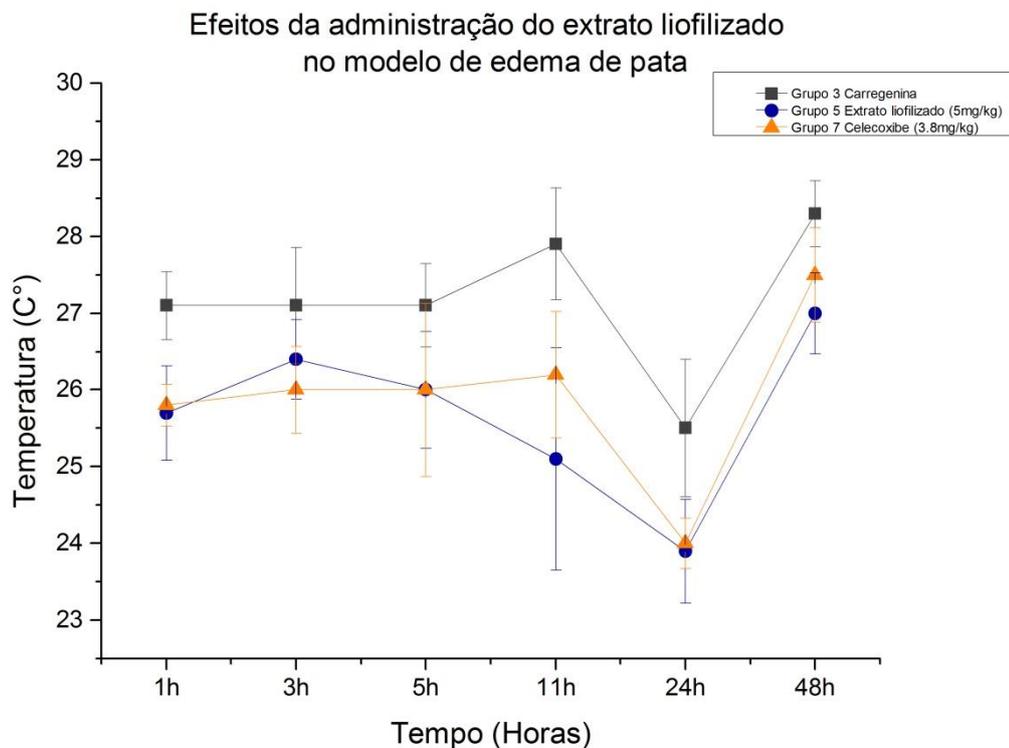


Figura 18. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a temperatura do membro inferior em camundongos injetados com carragenina (200 μ g/animal). Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das temperaturas.

As figuras 20 e 21 mostram as temperaturas obtidas e a escala utilizada. As temperaturas mais quentes são apresentadas por coloração vermelha, enquanto que as temperaturas mais frias são apresentadas por coloração azul.

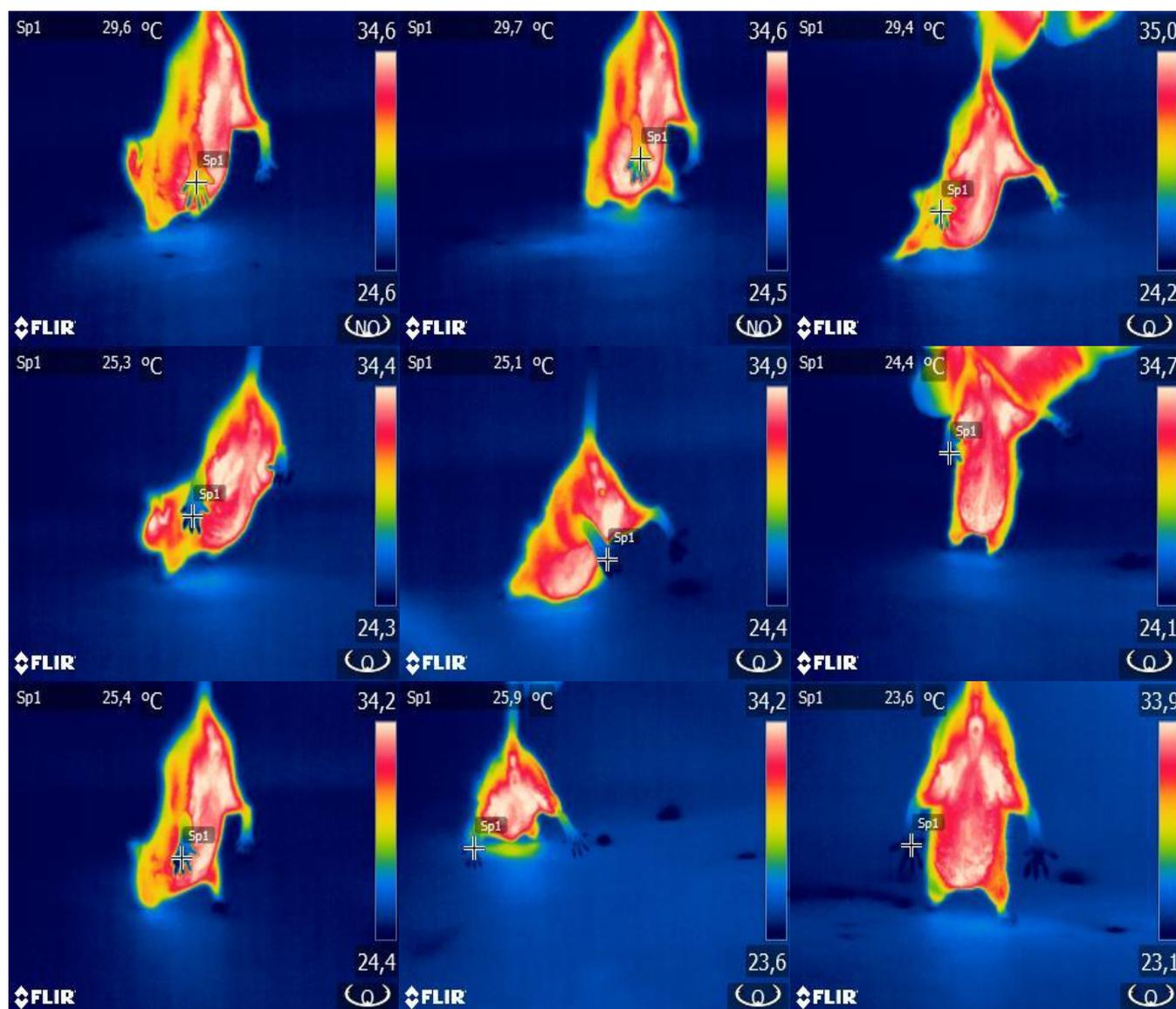


Figura 19. Fotografias térmicas obtidas com a câmera FLIR. A figura mostra a temperatura indicada no ponto sp1 (extremidade esquerda superior). Na extremidade direita da figura está esboçada a escala de temperatura da fotografia. Nas figuras A, B e C apresentam-se os animais pertencentes ao grupo 2 (controle Carragenina) em 5, 11, 24 horas respectivamente; D, E e F representam os animais pertencentes ao grupo 4 (tratamento com extrato) em 5, 11 e 24 horas respectivamente; G, H e I representam os animais do grupo 6, em 5, 11 e 24 horas respectivamente.

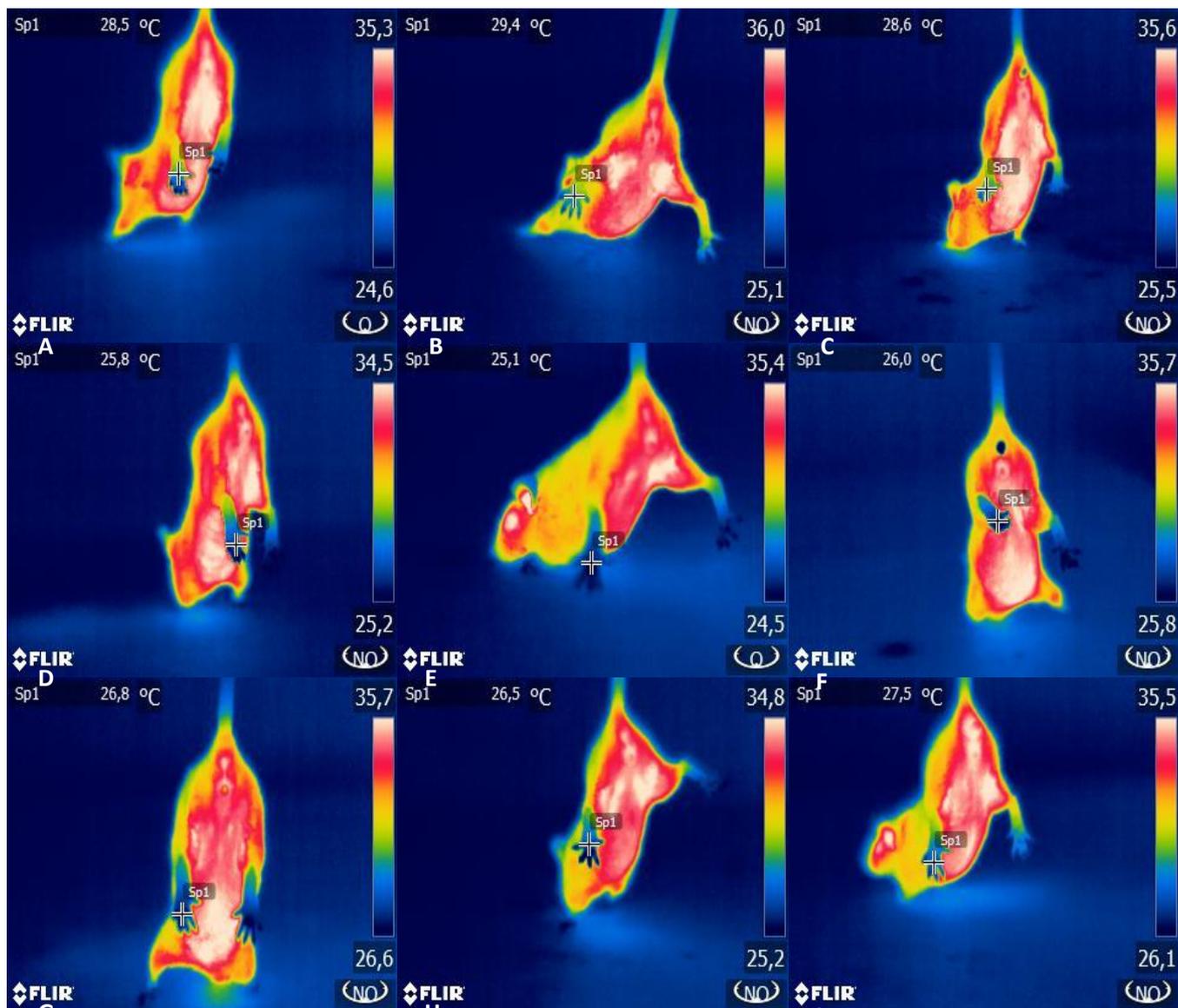


Figura 20. Fotografias térmicas obtidas com a câmera FLIR. A figura mostra a temperatura indicada no ponto sp1 (extremidade esquerda superior). Na extremidade direita da figura está esboçada a escala de temperatura da fotografia. Nas figuras A, B e C apresentam-se os animais pertencentes ao grupo 3 (controle Carragenina) em 5, 11 e 48 horas respectivamente; D, E e F representam os animais pertencentes ao grupo 5 (tratamento com extrato) em 5, 11 e 48 horas respectivamente; G, H e I representam os animais do grupo 7, em 5, 11 e 48 horas respectivamente.

6.3.3 Contagem global de leucócitos

A contagem global de células por mm³ foi realizada no período previamente definido, 24 e 48 horas após a indução da inflamação por meio da análise do sangue, cujo objetivo foi avaliar a resposta imune celular contra a inflamação, aos diferentes tratamentos. Observa-se que os animais do grupo 2, controle Carragenina 24 horas se diferem dos grupos 5 e 7 que representam tratados com extrato e tratados com Celecoxibe 48 horas respectivamente, demonstrando redução no número de células totais na contagem global do sangue. Foi analisada também a contagem total de leucócitos do lavado da cavidade peritoneal dos animais dos diferentes grupos onde os grupos 4, 5 e 7 se diferem do grupo 2 que apresentou uma contagem de leucócitos mais elevada.

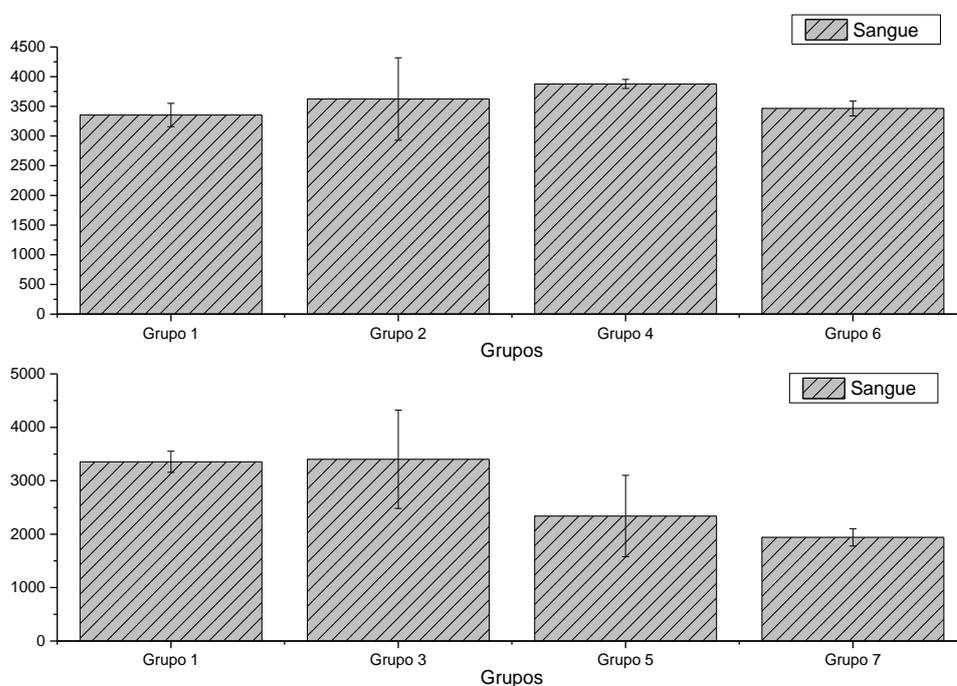


Figura 21. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a contagem global de leucócitos. Onde grupo 1 representa o grupo controle PBS, os grupos 2 e 3 representam os controles inflamados; 4 e 5 tratados com extrato; 6 e 7 tratados com Celecoxibe. Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das contagens.

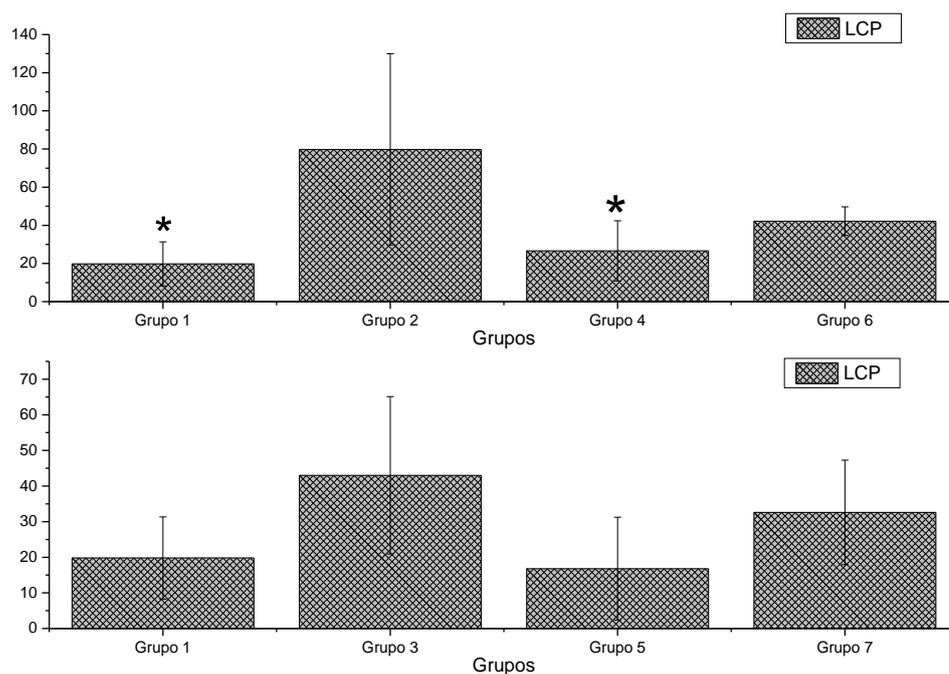


Figura 22. Efeitos da administração do extrato liofilizado (5 mg/kg), e o tratamento comercial (Celecoxibe 3,81 mg/kg), sob a contagem global de leucócitos. Onde grupo 1 representa o grupo controle PBS, os grupos 2 e 3 representam os controles inflamados; 4 e 5 tratados com extrato; 6 e 7 tratados com Celecoxibe. Os símbolos e barras verticais indicam as médias \pm desvio padrão das médias das contagens. (*)indicam diferenças significativas em relação ao grupo carragenina ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Em ensaios antimicrobianos com EBF quando utilizado M1 tem-se que dos 12 diferentes microrganismos patogênicos testados 7 apresentaram-se sensíveis ao extrato, inibindo o crescimento dos mesmos. Quando o EBF foi produzido utilizando o caldo M2, detectou-se que dos 12 patógenos testados, 10 apresentaram-se sensíveis ao EBF. Os mesmos extratos depois de liofilizados continuaram apresentando atividade contra os mesmos microrganismos.

O extrato produzido a partir do caldo M1 apresentou bioatividade contra: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Escherichia coli* ATCC 25922, *M. luteus*, *Salmonella sp*, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. epidermidis*. O extrato produzido a partir do caldo M2 apresentou bioatividade contra: *C. freundii*, *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 11775, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus*, *Salmonella sp*, *S. aureus* ATCC 29213 *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*. Possivelmente esses resultados se devem ao meio YPM ter uma maior concentração de substratos.

Segundo SERRANO (2014) uma vez que concentrações iniciais de glicose e inóculo demonstraram-se como variáveis de grande influência na produção de metabólitos antimicrobianos por *P. polymyxa* RNC-D, através dos métodos de design fatorial experimental e superfície-resposta, seguidos por otimização gráfica, foi determinada a condição operacional ótima.

A produção de metabólitos secundários por microrganismos varia qualitativa e quantitativamente de acordo com a cepa e condições de cultivo usadas (LAM et al., 1989; WANG et al., 2010). Conforme KAWAI (1992), muitos polissacarídeos bacterianos são produzidos seguindo um processo de fermentação descontínua utilizando diferentes açúcares como fontes de carbono e a produtividade destes pode ser afetada pelas condições culturais, pela composição do meio de cultura, temperatura, pH e aeração.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos para a otimização dos componentes do meio de crescimento, composição e condições culturais visando aumentar a produção de PAMs (SEN & SWAMINATHAN, 1997; OGUNBANWO et al., 2003; KORENBLUM et al., 2005; ERNANDES, 2006

VIJAYALAKSHMI, PREMALATHA & RAJAKUMAR, 2011;SERRANO, 2014; LUSA et al., 2016).

Em estudo conduzido por LUSA et al., (2016); foram utilizados dois caldos para cultivo das cepas, meio A (1% triptona) meio B (1% extrato de levedura), assim, foi observado que a absorção de radioiodeto foi afetada pelo caldo de nutrientes utilizado. Para *Paenibacillus* B6-7-W e *Rhodococcus* B6-7-CB, a absorção máxima foi encontrada no meio B. Para *Paenibacillus* V0-1-LW e *Pseudomonas* T5-6-I houve uma absorção claramente menor em comparação com outras bactérias estudadas. Para estas bactérias, a captação média observada em meio A e meio B foi apenas 10% da média observada para as outras bactérias estudadas nestes mesmos caldos nutritivos. Esses dados juntamente com os apresentados nesse estudo comprovam a afirmação de que concentrações diferentes de metabólitos são produzidos de acordo com o meio utilizado, além disso outros fatores também implicam nessa produtividade.

De maneira geral pode-se observar uma maior bioatividade quando o extrato foi produzido com o caldo YPM, isso provavelmente devido a uma maior quantidade de extrato de malte, extrato de levedura e peptona bacteriológica.

Os extratos também foram testados após dois métodos de esterilização, em um primeiro momento os extratos foram filtrados em membrana de celulose 0,22 μ m. Em um segundo experimento os extratos foram autoclavados a 121°C por 15 minutos para posterior avaliação da atividade antimicrobiana. Após análise observou-se que no geral depois de ser autoclavado os dois extratos perderam sua bioatividade parcialmente, além disso, os extratos que foram filtrados apresentaram bioatividade em concentrações mais baixas, ao contrário dos autoclavados.

Resultados encontrados por ROSADO E SELDIN (1993); caracterizaram a substância produzida por *P. polymyxa* SCE2, cuja massa molecular foi estimada como menor de 3,5 kDa, como resistente a tratamento térmico (65° C, 2 horas) e diversas enzimas, incluindo proteases.

P. polymyxa P13, cepa isolada a partir de linguiça fermentada, secreta um composto, denominado polixina, que é capaz de inibir o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*. Este composto antimicrobiano é efetivo contra diversos Gram-negativos e Gram-positivos incluindo deteriorantes de alimentos. Também apresenta propriedades de bacteriocinas, tais como

natureza proteínácea (sensível a proteinase K, tripsina e pronase E), insensibilidade a solventes orgânicos e estabilidade a elevação de temperatura 90 °C, 10 min (PIURI et al, 1998).

SERRANO (2014) observou que o ET produzido por *P. polymyxa* RNC-D manteve-se estável e ativo contra *E. coli* e *S. aureus* após tratamento com proteases, ao mesmo tempo em que sua bioatividade residual foi reduzida após digestão com lipase. Assim concluiu que a molécula com m/z 3376,453 Da, com espectro de atividade que abrange bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos, e cuja bioatividade é reduzida após tratamento com lipase, representa um novo lipopeptídeo que foi denominado polycerradin.

Neste estudo observou-se a perda parcial da atividade antimicrobiana do extrato bruto após tratamento térmico de 121°C por 15 minutos, principalmente em meio YPM, porém a temperatura utilizada foi maior que nos estudos citados. Além disso, mesmo com a perda parcial o extrato manteve-se ativo contra linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, em meio M1 até 10mg.mL⁻¹ e em meio M2 até 8mg.mL⁻¹. Em meio M1 não foi significativa a perda de bioatividade contra os patógenos, sendo que em alguns casos, o extrato autoclavado apresentou halos maiores que o extrato filtrado, porém essa diferença não é considerada significativa. Já se tratando do meio M2 a diferença entre autoclavado e filtrado foi maior. O extrato filtrado apresentou halos significativamente maiores em relação ao extrato autoclavado.

Espécies de *P. polymyxa* inibiram o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos do arroz *Rhizoctonia solani* e *Pyricularia grisea* e também das bactérias fitopatogênicas *Burkholderia glumae*, *Burkholderia gladioli*, *Acidovorax avenae* (COTTYN et al., 2009). A prospecção de potenciais agentes para biocontrole, utilizando como substrato de isolamento folhas de trigo, foi realizado por Gu et al. (2010). A cepa *P. polymyxa* EBL-06 demonstrou alto nível de atividade antagônica contra os fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cucumerinum* e *Fusarium* spp.

POLÔNIO et al. (2015) apresentaram resultados semelhantes ao presente trabalho utilizando gêneros de fungos endofíticos antagonistas à diferentes fitopatógenos, apresentando IA entre 34% a 61%.

Foi possível observar a atividade antagônica também de fungos endofíticos frente aos fitopatógenos, como exemplo, o gênero *Fusarium*

apresentando IA entre 19% e 44% (CRUZ *et al.*, 2007; LUCON *et al.*, 2007; PEDRO *et al.*, 2008) e o fungo do gênero *Colletotrichum*, apresentando IA de 8% a 53% (SILVA, 2015), enquanto no presente trabalho para o gênero *Fusarium* apresentou-se IA entre 39,5% e 61,4% e para o gênero *Colletotrichum* foi apresentado IA entre 31% e 41%.

O pré-tratamento com *P. polymyxa* NSY50 reduziu significativamente a ocorrência de doença causada por *Fusarium* sp em pepinos, com menos amarelamento presente nas folhas. Além disso, a altura da planta, o peso fresco e o peso seco responderam positivamente ao tratamento com NSY50 e a inoculação com NSY50 aumentou o crescimento do pepino (LU, *et al.*, 2017).

Embora o papel biológico fundamental de PAMs seja a atividade antimicrobiana, estudos têm proporcionado novas funções alternativas para estas moléculas, incluindo atividade imunomodulatória, cicatrização de feridas e propriedades anti-neoplásicas (BROWN & HANCOCK, 2006; DIAMOND *et al.*, 2009; MADER & HOSKIN, 2006; MOOKHERJEE & HANCOCK, 2007; STEINSTRASSER *et al.*, 2008).

O processo inflamatório pode ser denominado como uma reação fisiológica de um determinado organismo após uma infecção ou lesão tecidual desencadeando mecanismos que alteram componentes humorais e celulares. Pode-se citar o contato com um patógeno, que produz substâncias quimiotáticas no local lesionado, essas por sua vez promovem a migração de células circulantes, produzindo então alterações vasculares (CRUVINEL *et al.*, 2010). O processo inflamatório ainda pode ser diferenciado em processo inflamatório agudo e crônico. Se tratando de inflamação aguda, pode-se afirmar que tem início seguido do dano e resulta na cura, é mantida por um curto período de tempo e caracteriza-se pela infiltração leucocitária no local inflamado eliminando o agente causador, resultando então na restauração do tecido. A inflamação crônica persiste por tempo indeterminado no organismo e tem como propriedade o estímulo constante da inflamação, gerando danos e também tentativa de restauração tecidual (TABAS & GLASS, 2013).

A injeção de carragenina em camundongos causa o edema de pata, cuja primeira fase resulta da liberação concomitante de histamina, serotonina e quininas e segunda fase está correlacionada com a elevada produção de prostaglandinas, radicais livres, produção de cicloxigenase induzível (COX-2),

além da infiltração e ativação local de neutrófilos (VINEGAR et., 1997; KOICHI, et al., 2006). Na primeira hora após a injeção de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é mediada por histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade é mediado por cininas. A fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenina e caracteriza a ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971).

Se tratando da atividade anti-inflamatória todos os grupos tiveram a espessura do edema de pata diminuído, porém nos grupos 2 e 3 (controles positivos para inflamação) foi observado que a espessura do edema praticamente se manteve, caindo apenas 0,4 mm em 24 horas para o grupo 2 e 0,2 mm em 48 horas para o grupo 3. Para o grupo 1 (controle negativo para inflamação) a queda se deu em 0,9 mm após 24 e 48 horas. Para os grupos que receberam tratamento a ser testado (extrato) a queda da espessura do edema se deu em 0,9 mm para o grupo 4 em 24 horas e 1,2 mm para o grupo 5 em 48 horas. Finalmente para os grupos que receberam o tratamento comercial, mostrou-se a diminuição de 0,7 mm em 24 e 48 horas para os grupos 6 e 7 respectivamente. Os dados para medições até 24 horas estão expressos na tabela 7, e para 48 horas na tabela 8. Nota-se que com o extrato assim como com o tratamento comercial obteve-se diminuição do edema após o tratamento. Em 2004 BARROS et al., Conduziram um estudo analisando os efeitos do extrato metanólico de *Calotropis procera* durante a atividade inflamatória causada por carragenina. Assim como neste estudo foi observado que o extrato utilizado reduziu o edema de pata induzido por carragenina. A queda do edema se deu após 1, 2, 3, 4 e 5 horas em 55,1%; 43,5%; 43,7%; 62,2%; 63,6%, respectivamente. Um outro estudo realizado com casca de *Croton urucurana* e seus diterpenos inibiram a formação do edema de pata a partir dos 60 minutos, apresentando 58,6% de inibição (CORDEIRO K. W. 2017). Os resultados de efeito antiedematogênico, de espécies de *Schinus* nativas do Rio grande do Sul, observados através do método de edema de pata induzido pela carragenina, demonstraram inibição significativa na formação do edema na segunda hora, atingindo 84,7%. Após esse período, foi observado a redução da inibição do edema devido a absorção da carragenina pelo organismo (SOARES, 2017). Estes resultados, apresentados em ambos estudos, podem

indicar que os componentes do extrato estejam inibindo a liberação de mediadores químicos da inflamação via prostaglandinas, indicando assim a presença de constituintes com ação antiedematogênica nos extratos estudados.

De acordo com BAPTISTINI (2015) comparando a temperatura e a espessura média das patas dos camundongos, foi possível observar que houve o aumento dessas duas medidas no intervalo de tempo antes da aplicação e depois de uma hora da aplicação para os grupos que receberam o agente inflamatório e algum tipo de tratamento, sendo o agente inflamatório Carragenina, assim como foi observado nesse estudo.

No presente estudo, o grupo que recebeu tratamento com extrato (4) e o que recebeu tratamento comercial (6) apresentaram os mesmos comportamentos quanto à variação de temperatura, tendo de maneira geral uma queda de temperatura considerada significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo 2, controle carragenina. Uma vez que a temperatura é considerada um dos sinais clássicos da inflamação pode-se afirmar que o extrato apresentou efeito positivo na redução da temperatura durante o processo inflamatório

8. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos é possível concluir:

Dos 4 tipos de extrato testados contra a atividade antimicrobiana, o que apresentou maior índice de bioatividade foi o *Paenibacillus polymyxa* quando cultivado em meio YPM e esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm;

O extrato foi capaz de inibir o crescimento de 9 patógenos dos 12 testados: *C. freundii*, *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 11775, *E. coli* ATCC 25922, *M. luteus*, *Salmonella sp*, *S. aureus* ATCC 29213 *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*.

O *P. polymyxa*, independente do meio cultivado mostrou-se capaz de inibir o crescimento de 3 fitopatógenos testados: *Colletotrichum*, *F. oxysporum* (algodão) e *P. sojae*, sendo que para os dois últimos (*F. oxysporum* (algodão) e *P. sojae*) o índice de antagonismo foi maior que 50%.

O extrato liofilizado na concentração de 5 mg.mL⁻¹, apresentou eficácia em relação à diminuição de temperatura dos membros inferiores e edema de pata, onde foram induzidas inflamação por Carragenina.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSHIT P.; KIRAN P. P.; CHRIS P. C. Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus* L.) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. 2015.

ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds, **Microbiol. Res**, 169 (7–8) (2014) 483–495. 2014.

AMIN, S., SARVAT, R., Ethnomedicinal uses of plants for the treatment of malaria in Soon Valley, Khushab, Pakistan, **Journal of Ethnopharmacology**. 2017.

AMIT, K. S., et al. Hydroxyproline: A Potential Biochemical Marker and Its Role in the Pathogenesis of Different Diseases. **Current Protein and Peptide Science**. 2016.

AMORIM, L.; REZENDE, J. BERGAMIN, A. Manual de fitopatologia. 4. ed. **Piracicaba: Editora Agronômica Ceres**, 2011. 704 p.

ANANTHANARAYANAN, V.S. Structural aspects of hydroxyprolinecontaining proteins. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, 1983, 1(3), 843-855.

ARAÚJO, W.L; *et al.* Diversity of endophytic bacterial populations and their interection with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **In Appl. Environm. Microbiol.**, 68: 4906-4914. 2002.

ARNOLD, A.E. *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ASH, C. *et al.* Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit - ribosomal RNA sequences. **Lett. Appl. Microbiol.** 13:202-206.1991.

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

ASSUMPÇÃO, L. C., et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, 44: 203-510, 2009.

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

AZEVEDO, J.L. *et al.*; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 1-36, 2000.

BACON, C., WHITE, J. *Microbial endophytes*. **Marcel Dekker, Inc.**, New York (2000).

BADALYAN S. M. *et al.* Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea, Bologna**, v. 41, p. 200-225, 2002.

BAPTISTINI, N. Análise *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de compostos organocalcogênicos como possíveis anti-inflamatórios. **Tese de doutorado em biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos**. 2015.

BARROS, F. E. V. et al. Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, R. BR. (Cúme). **Revista Infarma**, v.16, nº 9-10, 2004.

BATISTA, T. F. C. *et al.* Ocorrência de fungos e nematóides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no

município de Coari (AM). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 47, p. 163-171, 2007.

BERNAL, P. et al. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. **The ISME Journal**. 2017.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr Opin Plant Biol**, v. 4, p. 343–350, 2001.

BOMBARDIER, C., et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **New Engl J Med**. 343:1520–1528, 2000.

BORGES, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes e metabólitos secundários e em processos de biotransformações. **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, Ribeirão Preto, 350 pp., 2008.

BOTSARIS, A. S. As formulas mágicas das plantas. 2 **Ed. Nova Era**. Rio de Janeiro. 619 p. 1998.

BUATONG, J. et al. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal Microbioly and Biotechnology**, n. 27, p.3005–3008, 2011.

CAMPOS, D.C.O., et al. *Morinda citrifolia* lipid transfer protein 1 exhibits anti-inflammatory activity by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines. **International Journal of Biological Macromolecules**. 1121–1129, 2017.

CARVALHO DE, P. L. N et al. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: Antioxidant and Antiproliferative Activities an Endophytic Fungus Associated with *Rheedia brasiliensis* Plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, p. 172-176, 2012.

CELOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-Inflammatory drugs: New multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacological Research**. 43(5):429 - 436. 2001.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **PNAS**, v. 100, p.14555-14561, 2003.

CHAPOLA, R. G. Controle da podridão abacaxi na cana de açúcar por meio da pulverização de fungicidas em mudas só sulco de pantio. 2010. 77pp. **Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)**, Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

CHATTERJEE, C. *et al.* Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chem Ver**, 105: 633-84. 2005.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus* Cohn 1872. In: Sneath PHA (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **Baltimore, The Williams and Wilkins Co.** Vol 2 (pp 1105-1139). 1986.

COELHO, M.R. *et al.* 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. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, n. 5, p. 753-760, 2007.

CORDEIRO, K. W. Atividade antiulcerogênica e anti-inflamatória da casca de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) e seus diterpenos clerodanos. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Mato Grosso. 2017.

COSTA, K. A. Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da roteína quinase c, pdd: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina. **Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas** - Universidade Federal de Minas Gerais. 2004.

COTTYN, B. *et al.* Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 885-897, 2009.

CRUVINEL, W. D. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CRUZ, T. M. L. *et al.* Atividade antagonica de Trichoderma e controle de Lasiodiplodia theobromae, Fusarium oxysporum e Botrytis cinerea in vitro. 2007, Campinas-SP. **Anais Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 2007.

DAMM, U. *et al.* Colletotrichum: Species, ecology and interactions. **IMA Fungus** 1(2) 161-65. 2010.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A.; GIROUD, J. P. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v.104, n.1, p.15-29, 1971.

DORRANCE, A. E. *et al.* Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for Phytophthora sojae in soybean. Online. **Plant Health Progress**. 2008.

DUBOIS, RN; *et al.* Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.** 12: 1063 – 1073. 1998.

DWIVEDI D., *et al.*, Evaluation of wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of Pongamia pinnata in wistar rats, **Journal of Traditional and Complementary Medicine** 2016.

EN, H.; AHMED, E. Yousef Biosynthesis of paenibacillin, a lantibiotic with N-terminal acetylation, by Paenibacillus polymyxa. **Microbiological Research** 18, 15–21. 2015.

FERRARI, J. T. Podridão negra do abacaxi. Divulgação Técnica. **Biológico, São Paulo**, v. 71, n.1, p. 49-51. 2009.

FRANZOTTI, E. M.; SANTOS, C.V.; RODRIGUES, H.M.; MOURAO, R.H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca), **J. Ethnopharmacol.** 273–277, 2000.

GABRIEL, S.E. & MATTESON, E.L. Economic and quality-of-life impact of NSAIDs in rheumatoid arthritis: A conceptual framework and selected literature review. **Pharmacoeconomics**. v. 8 (6), p. 479-490, 1995.

GIULIANI A, PIRRI G, NICOLETTO S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Cent Eur J Biol**, 2: 1–33. 2007.

GOMES R. C. *et al.* Chitinolytic activity of actinomycetes from cerrado soil and their potential in biocontrol. **Letter Applied microbiol** 30: 146-150. 2000.

GROVE D. C.; RANDALL, W. A. Assay methods os antibiotic: a laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia, 1955.

GUBIANI, J.R. Bioprospecção de fungos endofíticos *Camarops sp.*, *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma sp.* 2015. **Tese (Doutorado em Química)**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araraquara, 2015.

GUIMARÃES, D.O. *et al.* Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry, Netherlands**, v. 71, p. 1423-1429, 2010.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **J Nat Prod**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, Y. *et al.* Isolation of a *Paenibacillus* sp. strain and structural elucidation of its broad-spectrum lipopeptide antibiotic. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 3156–3165, 2012.

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ, R.; KLOEPPER, J. W. 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. 1999.

HE, Z. *et al.* Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and Polymyxin. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 1, p. 168-178, 2007.

HONG, C. E., KWON S. Y., PARK, J. M. Biocontrol activity of *Paenibacillus polymyxa* AC-1 against *Pseudomonas syringae* and its interaction with *Arabidopsis thaliana*. **Microbiological Research**. 2016.

HU L., *et al.* Complete Genome Sequence of *Paenibacillus polymyxa* YC0573, a Plant Growth–Promoting Rhizobacterium with Antimicrobial Activity. **Genome Announc.** 2017.

J. BUATONG, *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes, **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27 (12) (2011) 3005–3008.

JAIN, N. K.; ISHIKAWA, T.; SPIGELMAN, I.; HERSCHMAN, H. R. COX-2 expression and function in the hyperalgesic response to paw inflammation in mice. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 79, 6, 183-190, 2008.

JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P. Principais doenças de anonáceas no Brasil: descrição e controle. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, p. 55-64, 2014.

KAWAI, H. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus* strain isolated from soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tóquio, v. 56, p. 853-857, 1992.

KHAN, Z. et al. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. **Bioresource Technol.** 2008.

KIRAN P. P.; AKSHIT P.; CHRIS P. Plant growth promotion and nitrogen fixation in canola by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative in a long-term study. **Université Laval Bibliotheque.** 2016.

KOBAYASHI, D.Y.; PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agricultura. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. **Microbiol endophytes.** New York: Marcel Dekker Inc. p. 199-233. 2000.

KOICHI, T. et al., Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. **Biol. Pharm. Bull.** 29(1) 96—99, 2006.

KORENBLUM E. *et al.* Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B.licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **J. Appl. Microbiol.** 98, 667-675. 2005.

LACAVALA PT, SOUSA CP. Role of Endophytic Actinomycetes in Crop Protection: Plant Growth Promotion and Biological Control. **Plant Growth Promoting Actinobacteria.** pp 147-160. Elsevier. 2016.

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

LORENTZ, R. H. Seleção de isolados de *Paenibacillus* spp com atividade enzimática e antimicrobiana. 2005 103p. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,2006.

LU, S. *Paenibacillus polymyxa* NSY50 suppresses Fusarium wilt in cucumbers by regulating the rhizospheric microbial community. **Scientific Reports**. 2017.

LUCON, C. M. M. *et al.* Potencial de isolados de Trichoderma no controle de Fusarium oxysporum f. sp. cubense, in vitro. In: 9ª REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 9., 2007, Campinas-SP. Anais Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2007.

LUSA, M. *et al.* Uptake of radioiodide by *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., McAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; HILL, C () Lantibiotics: structure and mode of action. **FEMS Microbiol Ver**, 25: 285-308. 2005.

MOHAMED, R. *et al.* Physiological and molecular characterization of compost bacteria antagonistic to soilborne plant pathogens. **Can. J. Microbiol**. 2017.

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853–858, 2000.

NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and medium independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 22, p. 183–192, 1997.

OGUNBANWO, S. T.; SANNI A. I.; ONILUDE A. A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol**. 2, 179-184. 2003.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiol**, 16: 115-25. 2008.

OSAPAY G, *et al.* Lanthionine somatostatine analogs: synthesis, characterization, biological activity and enzymatic studies. **J Med Chem**, 40: 2241-51. 1997.

PEDRO, E. A. S. *et al.* Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. Com potencial para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 107-216, 2008.

PENGMIAN, F.; ZHENYI, W.; XIAOYU, Y. Predicting antimicrobial peptides by using increment of diversity with quadratic discriminant analysis method. **IEEE transactions on computational biology and bioinformatics**, manuscript ID, 2017.

PERNEZNY, K. *et al.* Review Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems: Part II. Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi, Bacteria and Viruses. **University of Florida Extension Publication**, p. 249, 2014.

PETERS B. M.; SHIRTLIFF M. E.; JABRA-RIZK M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? **PLoS Pathogens**, 6(10): e1001067. 2010.

PIURI, M.; SANCHEZ-RIVAS, C.; RUZAL, S.M. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. **Lett Appl Microbiol**, v. 27, p. 9-13, 1998.

PIZA ACMT, HOKKA CO, SOUSA CP. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, ISSN: 2320-0227, Vol.: 4, Issue.: 4, 281-291, 2015.

PIZA ACMT, LIMA LCPS, Hokka CO, Sousa CP. Endophytic *Nocardioopsis dassonvillei* and *Amycolatopsis orientalis* isolated from Brazilian tropical savannah presented antibiosis against pathogens. **Brown Walker Press**, 264-266, 2016.

PIZA, A. C. M. T.; *et al.* Atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados do Cerrado da região de São Carlos, SP. **Anais do III Seminário do Projeto Temático** (Proc. 05/55079-4) (Resumos estendido), 14-19, 2009.

POLONIO, J. C. *et al.* Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopatogens. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 7297-7309, 2015.

RANGEL, T. F. L. V. B *et al.* Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado. **Appl Geography**, v. 27, p. 12-24, 2007.

ROSADO, A. S.; SELDIN L.. Production of a potentially novel antimicrobial substance by *Bacillus polymyxa*. **World J Microbiol Biotech**, 9: 521–528. 1993.

SANCHEZ S.; DEMAÏN A. L. Valuable products from microbes, in: G. Neelam, A. Abhinav (Eds.), **Microbes in Process, Nova Scientific Publishers Inc, USA**, 2014, pp. 23–57. ISBN: 978-1-63117-127-7.

SANO, E. E. *et al.* Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environ. Monit Assess**, v. 166, n. 1-4, p. 113-124, 2010.

SEBASTIANES, F.L.S. *et al.* 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Current Microbiology*, n. 65, p. 622–632, 2012.

SEN R.; SWAMINATHAN T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 358-363. 1997.

SERRANO, N. F. G. *et al.* Optimal glucose and inoculum concentrations for production of bioactive molecules by *Paenibacillus polymyxa* RNC-D. **Chem Papers**, v. 66, n. 12, p. 1111–1117, 2012.

SERRANO, N. Produção de compostos antimicrobianos por *Paenibacillus polymyxa* RNC-D: otimização das condições de cultivo, purificação e caracterização dos bioprodutos. **Tese de doutorado**. 2014.

SILVA, M. C. S. Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* sp). **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, centro de energia nuclear na agricultura, Piracicaba, 2015.

SOARES, K. D. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de espécies de *Schinus*, nativas do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017.

STROBEL, G. A. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Products**, v. 67, p. 257–268, 2004.

STROBEL, G., *et al.* *Urnula* sp., an Endophyte of *Dicksonia antarctica*, Making a Fragrant Mixture of Biologically Active Volatile Organic Compounds. 2017.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 491 – 502, 2003.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacol. Reports.**, 59, 247-258, 2007.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E. G. H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n.11, p. 7292-7300, 2005.

VAN KRAAIJ, C.; *et al.* Engineering a disulfide bond and free thiols in the lantibiotic nisin Z. **Eur J Biochem**, 267: 901-09. 2000.

VARGA Z, SABZWARI S, VARGOVA V. Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Under-Recognized Public Health Issue. **Cureus** **9(4): e1144**. 2017.

VINEGAR, R. et al., Quantitative comparison of the analgesic and anti-inflammatory activities of aspirin, phenacetin and acetaminophen in rodents. **European Journal of Pharmacology**, 23—30, 1976.

VIZIOLI, E. O. Ensaio pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de antiinflamatórios não esteróides. **Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Universidade Estadual de São Paulo. 2009.

WHIPPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487-511, 2001.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 111, 544-547, 1962.

ZACARONI, L. M. *et al.* Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **ACTA AMAZÔNICA**. Volume 39 (1): 193-198. 2009.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** 415: 389–95. 2002.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil. **Journ of Soil and Sediment** 8: 379-388. 2008.

ZHENG, Y., et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol.* DOI 10.1007/s13213-015-1153-7, 2015.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

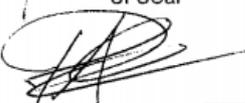
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Cavicchioli, realizada em 22/02/2017:



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Prof. Dr. Henrique Cezar Alves
USP