

**Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química**

**Investigação do potencial antimicrobiano de plantas do  
Cerrado no controle de micro-organismos simbiótico  
da *Diabrotica speciosa*.**

**Anderson Luigi Luiz**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

São Carlos – SP  
2014

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

L953ip

Luiz, Anderson Luigi.

Investigação do potencial antimicrobiano de plantas do cerrado no controle de micro-organismos simbiótico da *Diabrotica speciosa* / Anderson Luigi Luiz. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
125 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Produtos naturais. 2. Microbiologia. 3. Ecologia química. I. Título.

CDD: 547.3 (20ª)

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

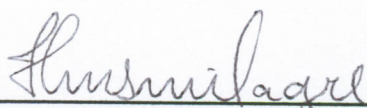
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato Anderson Luigi Luiz, realizada em 28 de março de 2014:*



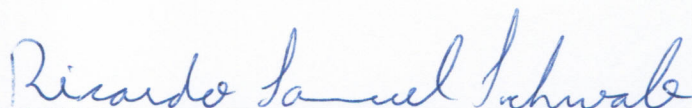
---

Prof. Dr. João Batista Fernandes



---

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos Milagre



---

Prof. Dr. Ricardo Samuel Schwab

*“Para ir da oportunidade ao êxito  
é preciso enfrentar os medos de  
mudança, romper com o mesmo e  
ter a capacidade de se antecipar.”*

Mario Sérgio Cortella

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha mãe Adriana, pelo apoio nos momentos alegres e nos mais difíceis, pelos conselhos, pelos incentivos, por todo esforço e dedicação que ela tem não só comigo, mas com todos seus filhos fazendo com quem sempre possamos fazer nosso melhor em cada etapa de nossa vida.

Aos meus irmãos, João Paulo e Lucas, que mesmo longe, sempre estiveram ao meu lado. Tal apoio fez com que a distância ficasse pequena e nos aproxima cada vez mais.

Ao meu pai, Sergio, e todos meus familiares que de alguma forma tornaram possível meu crescimento durante o trabalho.

Aos meus avós, Claudete e Roberto, não só pelo apoio durante meus estudos, mas por terem criado essa família tão fantástica a qual faço parte.

A Thais Pacifico, pela força nos momentos mais difíceis, pelos momentos felizes que passamos juntos. Por acreditar em mim. Pelo seu amor, obrigado por sempre estar ao meu lado durante essa incrível jornada que é a vida.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pela oportunidade de realizar meu trabalho de mestrado. Pelos ensinamentos, conselhos, e discussões que me fizeram desenvolver e evoluir meu lado profissional e pessoal durante os dois anos de trabalho.

Aos Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof. Dr. Humberto Marcio Santos Milagre e Prof. Dr. Ricardo Schwab pela disponibilidade em compor a banca.

Aos colegas do grupo Produtos naturais, pelo apoio científico, discussões e amizade desenvolvida durante os dois anos.

Em especial, devo agradecer ao Bruno Perlatti pelo apoio pessoal e científico, pela contribuição em parte do trabalho e também, pela grande amizade adquirida durante a o mestrado.

Aos alunos do grupo que diretamente contribuíram neste trabalho, Luiz Lopes e Chubraider. Aos demais do grupo pela convivência e discussões: Inajá, Patrícia, Eveline, meus agradecimentos.

Ao Dr. Leonardo Toffano, quem me ensinou e ajudou a trabalhar com microbiologia.

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

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelas análises no MALDI, em especial ao seu aluno de pós-doutorado Douglas Ferreira, pela ajuda nos experimentos e a disponibilidade de discussão.

Ao Prof. Dr. Paulo César, pela realização dos experimentos no fluorímetro, em especial à sua aluna de doutorado Suellem por estar sempre disposta à ajudar.

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

Aos meus amigos: Diego Glinelli, Elias Paiva, Gabriel Machado, Glauco Leal, Giorgio Morbioli, Guilherme Castellano, Guilherme Vital, Isaías de Castro Silva, Lucas Quintal, Luis Felipe, Marcio Bocelli, Marco Antonio, Marcus Vinicius, Mateus Simões, Maurício Daniel, Natan Costa, Pedro Baptistella, Pedro Barrenha, Pedro Farinazzo, Ricardo Kita e Thiago Pacifico. Pelos momentos de discussão, alegria e aprendizado.

A minha sogra, Carol, por ter ensinado uma forma simples de encarar a vida.

A Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

A todos os funcionários que trabalham no departamento e de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente com meu trabalho.

A todos que de alguma forma me ajudaram

## Lista de abreviaturas e símbolos

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
Acetona – d <sub>6</sub>	Acetona deuterada
B.O.D.	Biological oxygen demand
BDA	Batata Dextrose Ágar
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CD3OD	Metanol deuterado
CN	Caldo nutriente
Cz	Ágar Czpek Dox
DO	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
E	Extrato
Fr.DCM	Fração diclorometano
Fr.AcOEt	Fração acetato de etila
Fr.Hex	Fração hexânica
Fr.MET	Fração metanólica
h	Altura
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC – UV	High performance liquid chromatography acoplada à Detecção ultravioleta
HCCA	Ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MO	Micro-organismo
MALDI	
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Coupled with Time-Of-Flight Mass Spectrometry
<i>m</i>	Multiplete
MHB	Caldo Mueller Hinton
MH	Mueller Hinton
NA	Nutrient Agar
NAG	<i>N</i> -acetilglicosamina
NAM	<i>N</i> -acelilmurâmico
p-diax	acoplamento pseudo-diaxial
p-ax-eq	acoplamento pseudo-axial-equatorial

p-dieq	acoplamento pseudo-diequatorial
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
TSA	Ágar Triptona de Soja
TFA	Ácido trifluoroacético
T	Tratamento
UFC	Unidade formadora de colônia
$\delta_{\text{H}}$	Deslocamento químico de hidrogênio
$\delta_{\text{C}}$	Deslocamento químico de carbono
$\lambda$	Comprimento de onda



## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Descritivo quantitativo da composição nutricional dos meios de cultivos NA, CN, BDA, CZ, TSA e MHB. ....	21
TABELA 3.2 - Procedimentos para preparo dos reagentes usados na coloração de Gram. ....	31
TABELA 3.3- Espécies vegetais coletadas no cerrado da UFSCar. ....	42
TABELA 3.4 - Parâmetros cromatográficos de separação analítica do extrato de <i>P. laruotteanum</i> para análises quantitativas.....	48
TABELA 4.1 - Codificação dos micro-organismos isolados. ....	51
TABELA 4.2 - Resultados da avaliação de Gram para as bactérias isoladas. ....	55
TABELA 4.3 - Identificação a nível de Gênero pela comparação dos <i>MSPs</i> dos isolados com a base de dados (MALDI Biotyper, versão 3.1) do equipamento. ....	72
TABELA 4.4 - Ensaios de atividade bactericida contra MO do inseto <i>D. speciosa</i> avaliando o potencial de extratos vegetais de espécies do cerrado da UFSCar. A) Extratos : E1 a E11 (Tabela 3.3); B) Extratos: E12 a E22 (Tabela 3.3). ....	82
TABELA 4.5 - Valores de exatidão e precisão para a curva de calibração da resazurina nas diferentes concentrações avaliadas.....	85
TABELA 4.6 - Valores obtidos de precisão, exatidão e teste do duplo cego para do método validado. ....	87
TABELA 4.7 - ANOVA do modelo de regressão linear para curva de calibração do corante resazurina . ....	88
TABELA 4.8 - Resultados de atividade antibacteriana dos extratos de plantas do cerrado.....	89
TABELA 4.9 - Resultados de atividade antibacteriana das frações de <i>P. laruotteanum</i> . ....	90
TABELA 4.10 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H da catequina e comparação com a literatura.....	95
TABELA 4.11 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H da epicatequina e comparação com a literatura.....	96
TABELA 4.12 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C da a Ac.21.24 e comparação com os dados da literatura.....	99
TABELA 4.13 - Parâmetros da validação analítica para quantificação da chalcona.....	101

TABELA 4.14 - Dados de precisão e exatidão obtidos para a validação analítica por HPLC.....	102
TABELA 4.15 - Resultados quantitativos referentes às análises de determinação do teor da chalcona nas amostras de <i>P. laruotteanum</i> . .....	103
TABELA 4.16 - Avaliação do desenvolvimento do inseto <i>D. speciosa</i> seccionado entre machos e fêmeas – Teste t de tukey. ....	106
TABELA 4.17 - Experimento de sobrevivência da <i>D. speciosa</i> contra extratos de <i>Psidium laruotteanum</i> – Teste t de Tukey.....	107
TABELA 4.18 - (Experimento <i>Psidium laruotteanum</i> ) – Teste t de Student (não foi possível de realizar o cálculo de porcentagem de redução). .....	107

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Contribuições potenciais de micro-organismos simbiotes para melhorar a capacidade de insetos em se alimentar de plantas vivas. Adaptado de HANSEN e MORAN <sup>13</sup> .....	5
FIGURA 1.2 - Caminhos da contaminação de alimentos por pesticidas (Adaptado de MIDIO e MARTINS, 1997) <sup>34</sup> .....	10
FIGURA 1.3 - “Bio”pesticidas de interesse comercial. 1) ácido wyerona; 2) azadirachtina; 3) nicotina; 4) rotenona e 5) tetraidroberberina. ....	13
FIGURA 1.4 - Ciclo de desenvolvimento da <i>Diabrotica speciosa</i> . ....	14
FIGURA 1.5 - Proposta de interações planta-inseto praga, inseto praga-micro-organismos endossimbiontes e micro-organismos endossimbiontes-cultivos vegetais. ....	15
FIGURA 3.1 - Imagens de: A) <i>D. speciosa</i> fase adulta (“vaquinha patriota”); B) <i>D. speciosa</i> fase larval (“larva-alfinete”) e C) cativeiro de criação da <i>D. speciosa</i> . ....	22
FIGURA 3.2 - Procedimento de isolamento dos micro-organismos endossimbiontes de <i>D. speciosa</i> . ....	23
FIGURA 3.3 - Delineamento experimental para avaliação da eficiência de assepsia para isolamento de micro-organismos do trato digestivo do inseto <i>D. speciosa</i> . ....	25
FIGURA 3.4 - Rota de extração e isolamento de micro-organismos simbiotes do inseto <i>D. speciosa</i> para avaliação da origem do simbiote no inseto. ....	27
FIGURA 3.5 - Ciclo de avaliação de transferência e/ou aquisição microbiana entre duas gerações de <i>D. speciosa</i> . ....	28
FIGURA 3.6 - Cultivo da <i>D. speciosa</i> em (A) fase larval e (B) fase adulta. ....	28
FIGURA 3.7 - Codificação das cepas isoladas. ....	29
FIGURA 3.8 - Processo de coloração de Gram para células bacterianas. ...	32
FIGURA 3.9 - Placa de MALDI de 384 spots utilizada nas análises dos microrganismos. ....	33
FIGURA 3.10 - Procedimento de diluição seriada para seleção da concentração (UFC) microbiana como inóculo inicial. ....	35
FIGURA 3.11 - Fluxograma de separação fitoquímica para isolamento do marcador de referencia da espécie vegetal <i>P. laruotteanum</i> . ....	44
FIGURA 3.12 - Cromatografia em camada delgada. 1 – Fr.Hex. 2 – Fr.Dcm. 3 – Fr.AcOEt. 4 – Fr.Met. A) Fase móvel: Mistura contendo 70%	

de hexano com 30% de acetato. B) Fase móvel: Mistura contendo 90% de diclorometano com 10% de metanol.....	44
FIGURA 3.13 - Gradiente utilizado na eluição da frações DCM 5.....	45
FIGURA 3.14 - Gradiente utilizado na eluição da fração acetato. ....	46
FIGURA 4.1 – A e B) Colônias e coloração de Gram para as bactérias isoladas de <i>Diabrotica speciosa</i> .....	56
FIGURA 4.2 - Relação entre tempo de asepsia em hipoclorito de sódio e isolados microbianos.....	59
FIGURA 4.3 - Bactéria T3N1 cultivada em a) Czapek e b) Nutriente Agar. ....	62
FIGURA 4.4 - Esquema geral para identificação/agrupamento de microorganismos por MALDI – TOF – MS. ....	66
FIGURA 4.5 – Dendograma de <i>MSP</i> de todas as cepas microbianas isoladas nos tratamentos de avaliação da transmissão microbiana vertical ou horizontal.....	68
FIGURA 4.6 - Espectros de massa MALDI-TOF-MS do isolado T7.1IB1 de <i>D. speciosa</i> . ....	68
FIGURA 4.7 - Proposta de oxidação da resazurina em resorufina como resultado do crescimento de células microbianas viáveis.....	76
FIGURA 4.8 – Exemplo de avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana em placas de Elisa <sup>®</sup> investigando a inibição da atividade da enzima oxireductase sobre o corante resazurina.....	77
FIGURA 4.9 - Ilustração dos resultados dos ensaios qualitativos para identificação de extratos vegetais (E1 a E11) com potencial antimicrobiana contra bactérias de <i>D. speciosa</i> . A) Controle de Resazurina oxidada; B) Controle com resazurina reduzida; Ensaios com as bactérias: C) T1.1IC1; D) T2.1IN1; E) T5.1IC1; F) T7.1IN2; G) T7.1IN4 e H) T7.5IN2; I) T8.5IN1; J) T10.5IN1; K) T11.3IN1. ....	78
FIGURA 4.10 - Montagem das placas controles para os extratos: E1 a E11; CP = controle positivo (Tetraciclina).....	79
FIGURA 4.11 - Distribuição de extratos (E1 a E11) nas placas ensaiadas com os isolados. Legenda: CP: controle positivo (Tetraciclina); CD: Controle DMSO; CE: Controle esterilidade. ....	79
FIGURA 4.12 - Ilustração dos resultados dos ensaios qualitativos para identificação de extratos vegetais (E12 a E22) com potencial antimicrobiana contra bactérias de <i>D. speciosa</i> . A) Controle de Resazurina oxidada; B) Controle com resazurina reduzida; Ensaios com as bactérias:	

C) T2.IN1; D) T5.1IC1; E) T7.1IN2; F) T7.1IN4; G) T7.5IN2; H) T8.5IN1 e I) T10.5IN1.....	80
FIGURA 4.13 - Montagem das placas controles para os extratos: E12 a E22; CP = controle positivo (Tetraciclina). ....	81
FIGURA 4.14 - Distribuição de extratos (E12 a E22) nas placas ensaiadas com os isolados. Legenda: CP: controle positivo (Tetraciclina); CD: Controle DMSO; CE: Controle esterilidade. ....	81
FIGURA 4.15 - Curva de calibração obtida para o corante resazurina. ....	84
FIGURA 4.16 - Gráfico de correlação entre fator de resposta e concentrações de resazurina. ....	86
FIGURA 4.17 - Gráfico de resíduos demonstrando os resíduos distribuídos homocedasticamente. ....	87
FIGURA 4.18 - Histograma de atividade quantitativa antibacteriana sobre a IBDeL6 $\alpha$ de extratos de plantas do cerrado. ....	89
FIGURA 4.19 - Histograma de atividade antibacteriana sobre a IBDeL1 das frações de <i>P. laruotteanum</i> . ....	91
FIGURA 4.20 – A) Estrutura da Catequina; B) Estrutura da Epicatequina. ....	92
FIGURA 4.21 - Configuração adotada pelos hidrogênios no anel C; A) Catequina; B) Epicatequina.....	94
FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da amostra Ac50. ....	95
FIGURA 4.23 - Proposta estrutural, correlações entre carbono e hidrogênio (linha azul) e correlações entre hidrogênio e hidrogênio (linha vermelha) para a molécula isolada na fração Ac21.24 (Col. D). ....	97
FIGURA 4.24 - Cromatogramas obtidos referentes ao padrão de referência quantitativa de <i>P. laruotteanum</i> sendo a molécula isolada na fração Ac21.24. As condições operacionais de análises estão descritas na Tabela 3.4. ....	101
FIGURA 4.25 - Curva de calibração analítica por calibração externa para chalcona isolada na fração Ac21.24.....	102
FIGURA 4.26 - Cromatogramas do extrato bruto e da fração Acetato de Etila de <i>P. laruotteanum</i> submetidos à ensaio de atividade antibacteriano. A) eluição cromatográfica completa e B) ampliação. Condições de análise foram idênticas às especificações descritas na Tabela 3.4.....	103

## Resumo

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PLANTAS DO CERRADO NO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS SIMBIÓTICO DE *Diabrotica speciosa*. No bioma do cerrado brasileiro são estimadas aproximadamente 160.000 espécies de plantas, animais e fungos que, por intermédio da sua história tem sido exposto a complexas interações. Estas interações criaram um complexo sistema de comunicação química intra e inter-espécies, constituindo uma fascinante e fértil área de investigação científica. Deste modo, este projeto teve como propósito desenvolver uma iniciativa multidisciplinar. Forjando a ecologia química, química de produtos naturais e microbiologia numa ação conjunta para a compreensão das interações inseto praga-micro-organismos. Também visa investigar como a química de produtos naturais pode interferir neste ciclo propondo um novo mecanismo de ação de controle de insetos praga. A diversidade microbiana de *Diabrotica speciosa* foi avaliada e como resultados foram obtidos 56 micro-organismos. Os isolados foram agrupados em 12 diferentes grupos através da análise estatística dos respectivos espectros de massas obtidos no MALDI – TOF – MS. Os micro-organismos foram identificados, a nível de gênero, utilizando esta mesma técnica, como *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* e *Streptomyces*. A análise conjunta dos estudos entomo-microbiológicos e da técnica de MALDI – TOF – MS permitiu identificar as cepas bacterianas provenientes de uma transmissão vertical e horizontal. Extratos de 24 espécies plantas coletadas do cerrado foram submetidos a ensaio antimicrobiano para verificar inibição de crescimento das cepas isoladas. As espécies de planta que obtiveram melhores resultados foram *Anadenanthera falcata*, *Campomanesia pubescens* e *Psidium laruotteanum*. No estudo fitoquímico do extrato de *P. laruotteanum* foi

possível isolar dois flavonoides e uma chalcona, esta última foi usada como marcador de referência para ensaios de controle de qualidade de extrato e fração da planta. Os ensaios biológicos em *D. speciosa* mostrou que o extrato de *P. laruotteanum* alterou o desenvolvimento do inseto.

## Abstract

“INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF CERRADO PLANTS ON THE CONTROL OF SYMBIOTIC MICROORGANISMS FROM *Diabrotica speciosa*.” In the cerrado biome it is estimated approximately 160.000 species of plants, animals and fungi that, through their history have been exposed to complex interactions. Those interactions have created a complex system of intra and inter-species chemical communication, constituting a fascinating and fertile area of scientific investigation. Thus, this project aimed to develop a multidisciplinary initiative. Forging chemical ecology, natural products chemistry and microbiology to a joint action for the understanding of plague insects–microorganisms interactions. It also aims to investigate how the chemistry of natural products can interfere with this cycle proposing a new mechanism of action for controlling pest insects.

Microbial diversity of *Diabrotica speciosa* was evaluated and as results it was obtained 56 microorganisms. Isolates were assembled into 12 different groups through statistical analysis of the respective MALDI – TOF – MS mass spectra. The microorganisms were identified to genus level, using the same technique, such as *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum* and *Streptomyces*. The joint analysis of entomo-microbiological studies and the technique of MALDI – TOF – MS allowed to identify bacterial strains from vertical and horizontal transmissions. Extracts of 24 plant species collected in the cerrado were prepared and submitted to antimicrobial assays for verification of growth inhibition of isolated strains. The plant species that have shown best results were *Anadenanthera falcata*, *Campomanesia pubescens* and *Psidium laruotteanum*. In the phytochemistry study of *P. laruotteanum* extracts it was possible to isolate



two flavonoids and a chalcone, the latter was used as a reference marker for testing the quality control of the plant extract and fractions. The biological tests in *D. speciosa* showed that extract of *P. laruotteanum* altered insect's development. Thus the purpose of the study was achieved, since it can be concluded that the control of symbiotic microorganisms can interfere with the insect survival, and thus propose a new form of biorational pest control insects.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 - Interação inseto micro-organismos endossimbiontes .....	3
1.2 - Agricultura, meio ambiente e o uso dos produtos naturais.....	8
1.3 - <i>Diabrotica speciosa</i> .....	13
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 - Objetivo Geral.....	16
2.2 - Objetivos Específicos .....	16
<b>3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>17</b>
3.1 - Materiais e equipamentos: .....	17
3.2 - Isolamento de microrganismos simbiotes de <i>Diabrotica speciosa</i> ..	20
3.2.1 - Preparo dos meios de cultura .....	20
3.2.2 - Obtenção de insetos na fase larval de <i>D. speciosa</i> . .....	22
3.2.3 - Isolamento dos micro-organismos simbiotes .....	22
3.2.4 - Purificação e repicagem dos micro-organismos isolados.....	23
3.2.5 - Avaliação dos procedimentos de Isolamento .....	24
3.2.6 - Procedimentos de isolamento para avaliação da transmissão Vertical ou Horizontal.....	25
3.2.6.1 - Delineamento comportamental dos ensaios de avaliação de transferência simbiótica.....	28
3.2.7 - Codificação microbiana .....	29
3.2.8 - Preservação dos micro-organismos .....	29
3.3 - Caracterização microbiana.....	30
3.3.1 - Coloração de Gram para bactérias .....	30
3.3.2 - Análises de caracterização proteica microbiana por Espectrometria de Massas com Ionização por Laser.....	32

3.4 - Ensaio de inibição do crescimento microbiano por produtos naturais .....	34
3.4.1 - Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação quantitativa através da técnica de espectrofluorimetria .....	34
3.4.1.1 - Linearidade e intervalo de concentrações do corante revelador da atividade antibacteriana.....	35
3.4.1.2 - Aplicação do método para avaliação do potencial antimicrobiano de extratos vegetais .....	37
3.4.2 - Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação qualitativa utilizando resazurina como revelador .....	39
3.5 - Estudos fitoquímicos de Plantas do Cerrado .....	41
3.5.1 - Preparo dos Extratos Vegetais .....	42
3.5.2 - Fracionamento Fitoquímico dos Extratos Vegetais.....	43
3.5.2.1 - Fracionamento do extrato de <i>Psidium laruotteanum</i> .....	43
3.6 - Análises quantitativas de extratos e frações de <i>P. laruotteanum</i> submetidas aos ensaios de inibição microbiana.....	47
3.7 - Ensaio biológicos com <i>Diabrotica speciosa</i> .....	48
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1 - Isolamento de microrganismos simbioses de <i>Diabrotica speciosa</i> ..	50
4.2 - Coloração de Gram para bactérias .....	52
4.3 - Resultados da Avaliação dos procedimentos de Isolamento .....	57
4.4 - Procedimentos de isolamento para avaliação da transmissão Vertical ou Horizontal.....	60
4.5 - Agrupamento microbiano por caracterização de biomoléculas através do uso da técnica MALDI – TOF – MS.....	64
4.6 - Avaliação das metodologias de atividade bactericida .....	74
4.7 - Bioensaio – interpretação quantitativa utilizando resazurina como revelador – Desenvolvimento de uma metodologia analítica .....	83
4.8 - Aplicação da metodologia analítica desenvolvida no bioensaio de atividade antibacteriana para alguns extratos de plantas do cerrado .....	88

4.8.1 - Avaliação do potencial antibacteriano de frações e metabólito secundário de <i>Psidium laruotteanum</i> .....	90
4.9 - Estudos fitoquímicos de Plantas do Cerrado .....	91
4.9.1 - Identificação estrutural da Ac50 .....	92
4.9.2 - Determinação da Ac21.24.....	96
4.10 - Análises Quantitativas do extrato de <i>P. laruotteanum</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CLAE-UV).....	99
4.11 - Ensaios biológicos com <i>Diabrotica speciosa</i> .....	104
4.11.1 - Avaliação do comportamento biológico do inseto entre os diferentes tratamentos de criação sob condições assépticas ou não .....	104
4.11.2 - Avaliação alimentar dos insetos em cultivos tratados com extratos de <i>P. laruotteanum</i> .....	106
<b>5 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>111</b>
<b>Apêndice – A .....</b>	<b>124</b>
<b>Apêndice – B .....</b>	<b>125</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, existe uma indústria multimilionária baseada no conceito de que a introdução do uso de bactérias intestinais benéficas poderá melhorar nossa saúde. Isso ocorre porque coexistimos com um microbioma intestinal num sistema de mutualismo<sup>1</sup>. Trilhões de microorganismos simbióticos afetam profundamente nosso metabolismo e imunidade<sup>2</sup>. Neste sentido, bactérias podem apresentar funções positivas como antibacterianas, imunomoduladoras e metabólicas/nutricionais<sup>3</sup>. Por outro lado, bactérias anormais algumas vezes se tornam patogênicas causando doenças inflamatórias do intestino, câncer de cólon, síndrome do intestino irritado, doença hepática gordurosa não alcoólica, obesidade, diabetes, aterosclerose, etc.<sup>1,2,4</sup>. Fatores como idade, genética e dieta podem influenciar a composição do microbioma<sup>5</sup>. Destes, a dieta é mais fácil de modificar e apresenta a rota mais simples para a intervenção terapêutica.

De fato, a dieta e o estado nutricional estão entre os mais importantes determinantes da saúde humana. O valor nutricional do alimento é influenciado em parte pela comunidade microbiana intestinal de uma pessoa (microbiota)<sup>6</sup>. Desvendar as inter-relações entre a dieta, estrutura e as operações das comunidades microbianas intestinais, podem contribuir para desenvolver métodos de controle da saúde.

Recentemente, WU et al.<sup>1</sup> analisando as comunidades microbianas do trato digestivo humano, observaram serem as comunidades geralmente estáveis dentro de cada indivíduo havendo três Gêneros variantes predominantes, ou enterotipos, denominados por *Bacteroides*, *Prevotella*, e *Ruminococcus*<sup>1</sup>. As bases para o agrupamento dos enterotipos é desconhecida, mas parece ser independente da nacionalidade, sexo, idade ou mesmo índice de massa corporal. De fato, a única relação encontrada por WU et al.<sup>1</sup> entre o perfil e a estabilidade microbiana intestinal foi a

associação destes enterotipos com a dieta alimentar. WU et al.<sup>1</sup> buscou identificar nutrientes que substancialmente afetam a abundância das espécies microbianas. Eles descobriram que a maior ingestão de gordura e baixa ingestão de fibra estão associados a determinados grupos de bactérias<sup>1</sup>. Curiosamente, enterotipos pareceu a ser determinado pela dieta de longo prazo: os *Bacteroides* foram positivamente associados ao consumo de proteína animal e gorduras saturadas, enquanto a *Prevotella* foi associada a uma alimentação predominantemente à base de plantas com alto consumo de carboidratos e baixo consumo de carnes e de produtos lácteos. Esses resultados foram condizentes com um estudo anterior, onde DE FILIPPO et al.<sup>7</sup> compararam crianças italianas com as de Burquina-Fasso mostrando que as crianças africanas, que praticamente não têm nenhuma gordura animal e proteína em suas dietas, são colonizadas por micro-organismos membros de *Prevotella* (ou *Xylanibacter*, um género intimamente relacionado) enquanto que os seus homólogos europeus têm elevados níveis de *Bacteroides*<sup>7</sup>. O terceiro enterotipo, *Ruminococcus*, tende a estar relacionada com a ingestão de álcool e o consumo de gordura poli-insaturada<sup>1,2</sup>.

Ainda neste estudo, WU et al.<sup>1</sup> observaram que diversos fatores como, por exemplo, índice de massa corporal e o consumo de vinhos tintos e aspartame, mostraram significativa correlação com a composição microbiana, mas não com a partição entre os enterotipos. Assim, nem todas as associações entre o hospedeiro e a microbiota são capturadas nas distinções dos enterotipos. Comparando dados de dietas a curto e longo prazo mostrou que apenas a dieta em longo prazo foi correlacionada com o agrupamento dos enterotipos. No estudo de intervenção, as mudanças foram significativas e rápidas, mas a magnitude das mudanças foi modesta e não foi suficiente para intervir entre os enterotipos associados com a proteína/gordura e carboidratos. Estes dados indicaram que dietas de longo

prazo são fortemente e particularmente associadas com a composição dos enterotipos<sup>1</sup>.

Com base nestes estudos, se pode antecipar que um grande número de estudos futuros serão conduzidos para melhor se conhecer a relação dieta-microbioma, como a nutrição poderá afetar a composição microbiana intestinal e como esta relação poderá influenciar na saúde ou doença dos seres humanos. Por exemplo, se um enterotipo for intimamente relacionado com um determinado tipo de doença, uma dieta de longo prazo pode permitir a modulação dos enterotipos individuais melhorando a saúde. Por outro lado, uma má alimentação pode modular outros enterotipos piorando quadros de doenças.

Dentro do cenário acima descrito, onde quadros de desequilíbrio entre as comunidades microbianas está diretamente relacionado a fatores causadores de doenças em humano<sup>6,8</sup>, um intencional quadro de desequilíbrio no microbioma de insetos pragas não poderia levar a alterações comportamentais ou doenças nestes insetos, sendo este um novo modo de ação para controle biológico? Outra importante questão é: pode os produtos naturais, extratos, frações ou moléculas isoladas contribuir no controle do microbioma intestinal de insetos pragas? Uma nova questão surgiu durante o desenvolvimento deste projeto, podem os micro-organismos simbiotes estarem contribuindo com os insetos promovendo mecanismos de desenvolvimento de resistência contra inseticidas? Respostas a estas perguntas fazem parte dos objetivos deste projeto.

### **1.1 - Interação inseto micro-organismos endossimbiontes**

O sucesso evolucionário dos insetos tem sido atribuído ao fato de serem capazes de ocupar uma vasta disposição de habitat terrestres, alguns dos quais são fortemente limitados em nutrientes ou providos apenas por fontes de alimentos não balanceados<sup>9</sup>.

Por exemplo, insetos herbívoros alimentam-se de uma dieta não balanceada com excesso de carboidratos em comparação a compostos nitrogenados. Um modo de superar esta limitação seria modificar seus hábitos alimentares e modo de vida<sup>10</sup>. Todavia, consumir alimentos de diversas fontes como materiais vegetais e presas, requer especializações fisiológicas e morfológicas<sup>11</sup>. Uma rota evolucionária alternativa foi à exploração do potencial metabólico simbiótico de micro-organismos associados presentes no seu trato gastrointestinal, expertise esta que tem capacitado os insetos a se especializarem em fontes de alimentos não balanceados, ricos num determinado tipo de nutriente, mas isentos ou deficientes em outros. Como plantas exsudadas que contém carboidratos em abundância, todavia, compostos nitrogenados em quantidades muito limitadas<sup>12</sup>.

Os micro-organismos simbiontes de insetos pragas podem ser divididos em três categorias principais baseado na sua localização relativa no inseto sendo intracelular, trato gastrointestinal e simbiontes ambientais (Figura 1.1)<sup>13</sup>. Segundo DILLON E DILLON<sup>14</sup> um relacionamento simbiótico entre inseto e micro-organismo surge quando um MO adquirido é mantido em associação com seu hospedeiro e isso deve gerar novas estruturas especializadas (células especializadas, cecos gástricos e *ect.*) ou metabolismo. Estes micro-organismos, especialmente os presentes no trato gastrointestinal (endossimbiontes), podem beneficiar os insetos pragas provendo a síntese de nutrientes, fornecem vias metabólicas novas para a digestão de polímeros e moléculas recalcitrantes, neutralizando toxinas promovendo a desintoxicação do material vegetal, podem também auxiliar na defesa do inseto contra invasões de patógenos e ataque de parasitoides, *etc.*; os insetos, por sua vez, permitem a disseminação desses micro-organismos<sup>14,15,16</sup>.



Diversos exemplos são descritos na natureza da simbiose entre insetos pragas e micro-organismos endossimbiontes. Por exemplo, investigações prévias mostraram que formigas e insetos de plantas, sugadores de seiva ou sangue, contêm células especializadas ocupadas com bactérias transferidas verticalmente por células reprodutivas ou ovos dos hospedeiros<sup>17</sup>, os chamados endossimbiontes primários. Estas células, conhecidas como bacteriocitas, são providas de um hospedeiro como parte de seu programa de desenvolvimento normal durante embriogênese num respectivo inseto.<sup>9</sup> As bacteriocitas podem estar intercaladas entre células do intestino médio, como ocorre em formigas cortadeiras, ou elas podem formar estruturas orgânicas ligadas consistindo de agrupamentos celulares adjacentes no intestino ou em células gordurosas de reserva de energia, como no caso de pulgões ou baratas<sup>12</sup>.

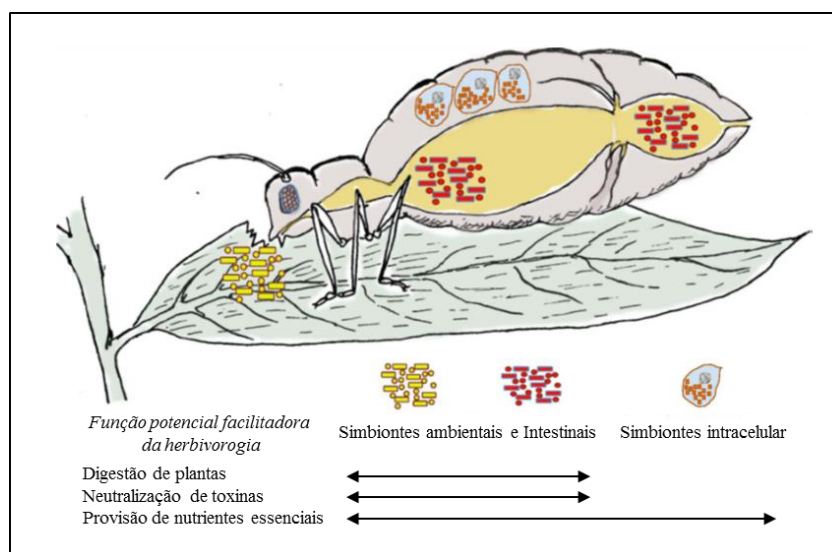


FIGURA 1.1 - Contribuições potenciais de micro-organismos simbiotes para melhorar a capacidade de insetos em se alimentar de plantas vivas. Adaptado de HANSEN e MORAN<sup>13</sup>.

Outro exemplo de interação inseto/micro-organismo endossimbiótico ocorre entre o pulgão *Acyrtosiphon pisum* e a bactéria *Regiella insecticola*. Esta bactéria confere ao pulgão *A. pisum* resistência contra fungos patogênicos sendo verticalmente transmitida durante reprodução do pulgão<sup>18</sup>.

Os vírus fitopatogênicos do gênero *Luteovirus* que colonizam e são transmitidos pelo pulgão *Myzus persicae*, dependem da bactéria endossimbiótica *Buchnera* spp do pulgão para serem estabilizados no fluido do sistema circulatório do inseto (hemolinfa) e assim serem transmitidos infectando a planta<sup>19</sup>. Um controle sobre a bactéria endossimbiótica pode culminar na perda da capacidade infectante do vírus.

A simbiose entre inseto e micro-organismos endossimbiótico também contribui para a desintoxicação do inseto causada por pesticidas e/ou promove o desenvolvimento de resistência contra inseticidas no inseto<sup>20,21</sup>. Muitas vezes, a aquisição de resistência contra pesticidas por insetos pragas é atribuída a mudanças mutacional no genoma do inseto. Contudo, uma nova linha de pesquisa vem mostrando que essa resistência também pode ser atribuída aos micro-organismos endossimbióticos que colonizam um específico inseto praga. KIKUCHI et al.<sup>21</sup> demonstraram a capacidade de adaptação do inseto praga *Riptortus pedestris* contra o inseticida inibidor da acetilcolina esterase, o fenitrotion (*O,O*-dimetil *O*-(4-nitro-3-toluil) fosforotioato), quando associado a bactérias do gênero *Burkholderia*. Esta bactéria é capaz de hidrolisar o fenitrotion eliminando sua toxicidade<sup>21</sup>. Contrariamente a transmissão vertical, a infecção do inseto *R. pedestris* com a bactéria *Burkholderia*, ocorre no solo durante o estágio de segundo instar. Esta infecção confere então, ao inseto, uma proteção contra o inseticida fenitrotion, sendo um mecanismo de resistência adquirido pelo inseto numa velocidade muito maior que possíveis mutações genéticas<sup>21</sup>.

Experimentos baseados na liberação de hospedeiros de suas bactérias pelo uso de antibióticos ou tratamento com calor, mostraram que as bactérias podem ser essencialmente requeridas pelos hospedeiros dado que animais tratados mostraram-se deficientes em seu desenvolvimento,

longevidade e/ou fecundação<sup>9,12</sup>. De fato, micro-organismos associados ao trato digestivo de insetos são variados e bastante difundidos. Trabalhos sobre a associação entre insetos e micro-organismos geralmente descrevem bactérias presentes no ceco gástrico, intestino grosso e no íleo<sup>22,23</sup>. Estudos de ultra-morfologia tem reportado a presença de bactérias associadas com o intestino médio de *Proclubiterines abitirienensis*, *Reticuliterines flavipes*, *Coptoterinesforinosanius* (Isoptera), *Acheta domestica* (Orthoptera) e larvas de *Xylotopus par* (Diptera)<sup>22</sup>. Estudos nutricionais com pulgões (*Schizaphis graminum*) sugerem serem os endossimbiontes associados, responsáveis pelo fornecimento de aminoácidos como, triptofano, cisteína e metionina ao seu hospedeiro<sup>23</sup>.

Além de auxiliar no processo digestivo, desintoxicação e no fornecimento de nutrientes aos insetos, micro-organismos simbióticos podem desempenhar outras funções como manipular o sistema reprodutor de hospedeiros<sup>24</sup>, aumentar a resistência contra parasitas<sup>25</sup>, patógenos<sup>18</sup>, calor<sup>26</sup>, *etc.* Estas relações simbióticas demonstram a importância da presença do micro-organismo endossimbionte para o desenvolvimento fisiológico e social de insetos pragas. Alterações nessa simbiose podem promover mudanças comportamentais nos insetos como, por exemplo, alimentar, ciclo de desenvolvimento, reprodução, *etc.*, culminando num controle populacional e/ou morte do inseto praga.

Alguns trabalhos envolvendo animais permitem propor um paralelo aos insetos reforçando esta proposta. Por exemplo, VAHJEN et al.<sup>27</sup> investigando o efeito do uso de diferentes doses de ZnO na dieta de leitões, observaram que diferentes doses deste óxido pode causar notáveis modificações entre a diversidade e a quantidade bacteriana modulando o microbioma intestinal<sup>27</sup>. Num estudo com ratos, HEIJTZ et al.<sup>28</sup> mostraram que a colônia intestinal de micro-organismos causa impactos no desenvolvimento cerebral destes animais e, conseqüentemente,

em seu comportamento. Os principais efeitos foram observados na atividade motora e em níveis de ansiedade<sup>28</sup>. Flavonoides de maçã foram relacionados por LEE et al.<sup>29</sup> como sendo um agente anti-inflamatório em doenças intestinas, sendo estes flavonoides responsáveis pela redução na quantidade da bactéria patogênica intestinal *Escherichia coli* O157:H7 que é responsável pela formação de um biofilme e, conseqüentemente, responsável pela infecção<sup>29</sup>.

Os micro-organismos presentes no trato digestivo contribuem para condições de saúde ou doença, física e mental, referidas coletivamente como síndrome metabólica, regulando diversas funções. Devido à sua grande área de superfície, exposição a diversos micro-organismos e a alimentação, o trato gastrointestinal é uma interface única entre o ambiente interno e externo de diversas espécies. Isto coloca o trato gastrointestinal como, por exemplo, de insetos pragas num patamar de vanguarda para pesquisa multidisciplinar na busca de novos conhecimentos fisiológicos e biotecnológicos.

## **1.2 - Agricultura, meio ambiente e o uso dos produtos naturais**

A agricultura normalmente é vista como consistindo de três tipos de sistemas: econômico, social e ecológico (ou meio ambiente). Os três são interligados, e as interações entre a agricultura e o meio ambiente são complexas. Problemas ambientais como a degradação de solos, desertificação, destruição de florestas tropicais e a conseqüente diminuição da vida selvagem e poluição de mananciais hídricos relacionam-se com práticas agrícolas inadequadas ou com o uso intensivo de insumos.

Nos últimos 50 anos, fazendeiros e agricultores ao redor do globo têm confiado substancialmente no uso de fertilizantes e compostos químicos de proteção melhorando a cada ano seus rendimentos de produção, suprimindo a demanda mundial de alimentos e fibras naturais<sup>30</sup>.

Neste período, o uso de pesticidas sintéticos tornou-se a principal ferramenta inseticida. A indústria química tem atendido a demanda dos consumidores aumentando o rendimento nos cultivos, sua qualidade e variedade, através do contínuo desenvolvimento e introdução de produtos químicos de proteção mais efetivos. Todavia, não só houve aumento nos rendimentos dos cultivos, mas também na população mundial que aumentou de 2,5 bilhões em 1950 para aproximadamente 6 bilhões em 2000<sup>31</sup>. Projeta-se para 2040 uma população mundial de aproximadamente 10 bilhões de pessoas elevando constantemente a pressão para melhores rendimentos e para produção de alimentos saudáveis num meio ambiente seguro<sup>30</sup>. Esta maior demanda exigirá uma maior produção de alimentos, ou através do desmatamento de florestas ou melhorando os índices de produtividade. Esses índices de produtividade poderão ser alcançados através de um controle mais eficiente de insetos pragas, fungos, ácaros, *etc.*, e da melhor disponibilidade de nutrientes. SCHREINEMACHERS e TIPRAQSA<sup>32</sup> estimaram que para o aumento em 1% nos rendimentos de cultivo é necessário um aumento de 1,8% de pesticidas. Por outro lado, elevadas quantidades de pesticidas, aumentam os problemas de contaminação ambiental.

Para a demanda atual de alimentos, o uso de inseticidas sintéticos tem sido eficiente no controle de algumas espécies de praga. Todavia, seu extensivo e algumas vezes indiscriminado uso, tem provocado diversos problemas de repercussão social e ambiental. Inúmeras e acumulativas são as consequências negativas do uso desses compostos. Dentre elas as contaminações do solo, do ar, da água, dos peixes, animais e do próprio homem (tanto no campo quanto em consumidores de produtos contaminados), reduções da biodiversidade, da população de inimigos naturais, da população e do número de espécies polinizadoras, além da resistência adquirida por insetos e o surgimento de pragas secundárias<sup>33</sup>.

Pesticidas em geral podem estar presentes em alimentos de origem vegetal, animal ou peixes, como resíduos após aplicação direta sobre as culturas, ou indiretamente através da contaminação dos solos. Animais como gado, podem consumir pastagens contaminadas, acumulando pesticidas junto à gordura animal. A presença de resíduos nas águas e, conseqüentemente na contaminação de peixes, se dá através da aplicação direta sobre leitos aquáticos, ou indiretamente como consequência de processos de erosão do solo, lixiviação, chuvas ou descargas industriais. Estes resíduos podem atingir o homem pelo simples consumo de alimentos contaminados ou pelo consumo de águas contaminadas. Em resumo, a ingestão de resíduos de pesticidas pode ocorrer através da água ou de outros alimentos, vegetais e animais (Figura 1.2), sendo que estes resíduos se referem ao próprio pesticida ou seus produtos de degradação.

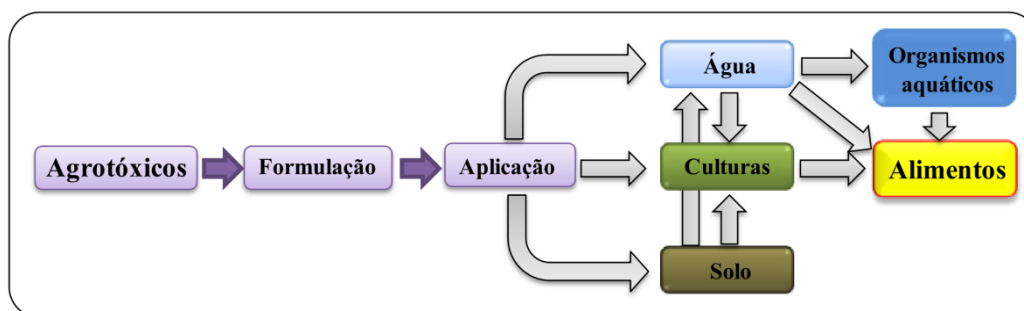


FIGURA 1.2 - Caminhos da contaminação de alimentos por pesticidas (Adaptado de MIDIO e MARTINS, 1997)<sup>34</sup>.

Todavia, os defensivos agrícolas a cada dia são mais necessários na agricultura. Estima-se que o prejuízo causado pelas pragas na produção mundial de alimentos ainda seja de pelo menos um terço da produção<sup>35,36,37</sup>. A produção agrícola tem na ocorrência de pragas e doenças um dos principais fatores limitantes ao seu desenvolvimento.

Neste contexto entra os conceitos básicos da química de produtos naturais. Muitos produtos naturais são investigados por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas, baixo impacto ambiental, ser uma

fonte renovável, possuir moléculas biodegradáveis, maior dificuldades para pragas alvo adquirir resistência, diversidade estrutural de moléculas orgânicas, baixo impacto sobre inimigos naturais, *etc.*<sup>37,38</sup>.

A natureza possui compostos orgânicos de quase toda classe concebível de estruturas químicas. O planeta Terra possui um incalculável número de fontes genéticas. A cada ano, novos animais (terrestres e marinhos), novas plantas e micro-organismos, em diferentes filos, são identificados. Ao mesmo tempo, é reconhecido que cada um desses organismos tem capacidade de produzir uma vasta gama e, muitas vezes, uma desconhecida riqueza de compostos químicos. Como consequência, qualquer discussão sobre a diversidade biológica é também uma discussão da diversidade química e do seu uso potencial para beneficiar a humanidade<sup>39</sup>. O estudo destes constituintes tornou-se uma fascinante e fértil área de investigação científica.

Muitos compostos secundários apresentam uma grande importância econômica em diversos projetos de desenvolvimento sustentável e ambientalmente corretos. Diversos trabalhos descrevem seu uso para diversas áreas de conhecimento como, por exemplo, medicina, medicina veterinária, cosmetologia, fármacos, controle de pragas agrícolas e vegetais (herbicidas), *etc.*<sup>40</sup>.

Sendo os insetos os maiores competidores do homem em relação à comida, além de serem vetores de inúmeras moléstias que atingem o ser humano e rebanhos, o controle eficiente dos mesmos através da busca de compostos biologicamente ativos (inseticidas, fungicidas, feromônios, *etc.*) constituem importantes aspectos a serem estudados. Portanto, esses estudos estão intimamente relacionados com a sobrevivência do ser humano. Esforços têm sido realizados para eliminar a toxicidade de produtos naturais, principalmente ao homem que possam controlar biorracionalmente o comportamento das espécies de insetos pragas<sup>41</sup>.

Numerosos metabólitos secundários de plantas estão envolvidos na interação entre inseto-planta, bem como planta-planta, planta-micro-organismo. Eles também podem interferir no comportamento, crescimento ou no desenvolvimento de outros seres. Neste sentido cita-se o exemplo da precisa interação entre as neurosecreções cerebrais, ecdisona e hormônio juvenil, na metamorfose de inseto, cujos precursores se originam de metabólitos secundários de planta associados a centros de ação no organismo dos insetos<sup>42</sup>.

Entre as atividades reconhecidas dos metabólitos secundários há substâncias utilizadas para o controle biorracional dos insetos e que agem no sistema nervoso sensorial, os fago-inibidores ("*antifeedings*") que inibem a alimentação por interagir com os receptores gustativos das pestes, metabólitos de repelência, fitoalexinas, antifúngos, moluscicidas, herbicidas, *etc.*<sup>43,44,45</sup> Como exemplo, se pode citar os inceticidas de origem natural como o ácido wyerona (**1**, *Vicia fabae*), azadirachtina (**2**, *Azadirachta indica*), nicotina (**3**, *Nicotiana tabacum*), rotenona (**4**, *Lonchocarpus nicou*) e o tetraidroberberina (**5**, *Corydalis bulbosa*, MIYAZAWA *et. al.*) (Figura 1.3), *etc.*<sup>46,47,48,49,50</sup>.



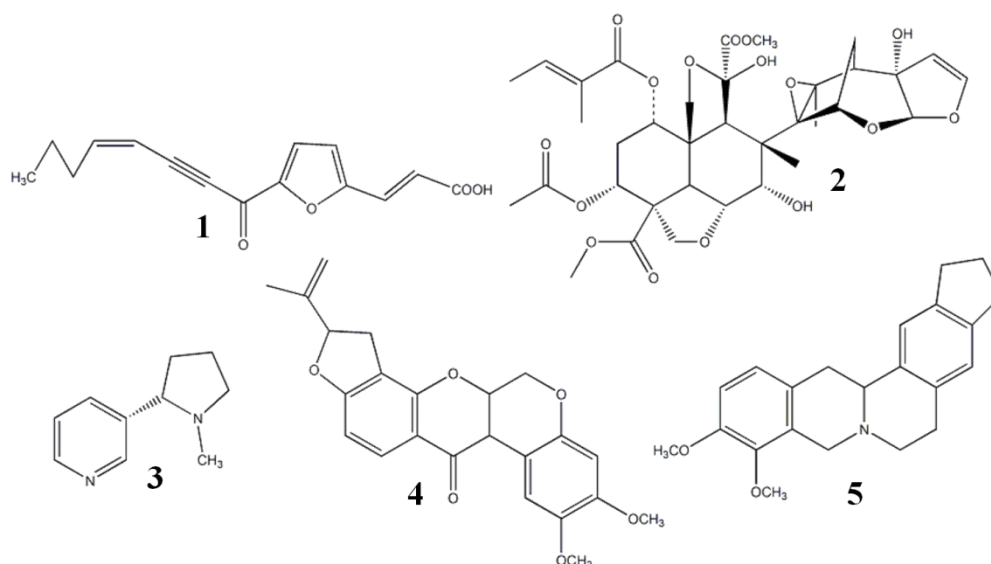


FIGURA 1.3 - “Bio”pesticidas de interesse comercial. 1) ácido wyerona; 2) azadirachtina; 3) nicotina; 4) rotenona e 5) tetraidroberberina.

### 1.3 - *Diabrotica speciosa*

A *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) é popularmente conhecida como “vaquinha” em sua fase adulta e “larva alfinete” em sua fase larval. Na sua fase adulta é um besouro de 5 a 6 mm de comprimento possuindo coloração verde com algumas manchas amarelas no corpo (Figura 3.1). O ciclo de vida do inseto (Figura 1.4) varia de 24 a 40 dias, passando por 3 estágios larvais, a fase pupal e por fim a fase adulta<sup>51</sup>.

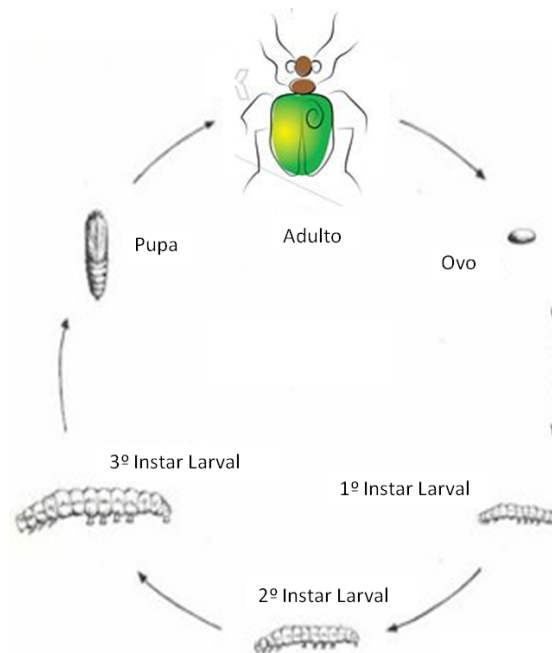


FIGURA 1.4 - Ciclo de desenvolvimento da *Diabrotica speciosa*.

Em sua fase larval, a *D. speciosa* possui hábitos subterrâneos causando prejuízos no sistema radicular das plantas. Já em sua fase adulta, o besouro ataca a folhagem das plantas. Dentre as culturas atacadas pelo inseto podemos citar o feijoeiro, soja, girassol e milho. Essa espécie é considerada praga na maioria dos estados brasileiros, atacando mais de 14 tipos de cultura diferentes colocando-a em posição de destaque como uma das 10 mais importantes pragas polívoras brasileiras<sup>52</sup>. Neste contexto o estudo da diversidade microbiana e a busca por produtos naturais que possam interferir nas relações simbióticas podem contribuir para uma nova forma de controle da praga.

A Figura 1.5 ilustra a relação entre a dieta, o inseto praga e seus micro-organismos em vias de dois sentidos, indicando a relação direta e inversa entre todos os atores envolvidos. Por exemplo, a flora microbiana, que coloniza o trato digestivo de um inseto praga, pode influenciar na decisão de escolha do inseto praga por um determinado tipo de alimento. Por outro lado, o material vegetal consumido pelo inseto pode produzir

metabólitos de defesa alterando a preferência alimentar deste inseto ou destruindo a flora microbiana simbiote presente.

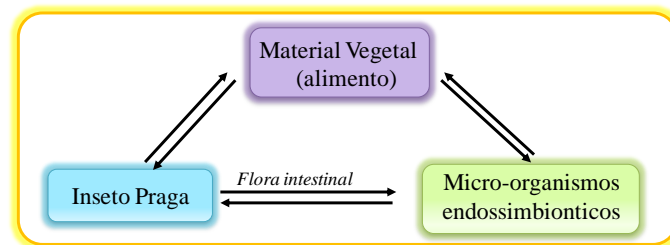


FIGURA 1.5 - Proposta de interações planta-inseto praga, inseto praga-micro-organismos endossimbiontes e micro-organismos endossimbiontes-cultivos vegetais.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Isolamento de micro-organismos simbiontes de *Diabrotica speciosa* e avaliação do potencial antimicrobiano de plantas do Cerrado no controle desses micro-organismos.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- a) Coleta do material vegetal;
- b) Estudos fitoquímicos de plantas do cerrado da UFSCar preparando extratos e isolando metabólitos secundários;
- c) Identificação de extratos, frações e moléculas biologicamente ativas de *Psidium laruotteanum*;
- d) Desenvolvimento e validação de métodos instrumentais para identificação do perfil químico dos extratos submetidos a estudos de atividade biocida;
- e) Isolamento, purificação e identificação de micro-organismos simbiontes do trato digestivo de inseto *Diabrotica speciosa*;
- f) Desenvolvimento de ensaios microbiológicos para controle microbiano *in vitro* de cepas isoladas de insetos praga;
- g) Ensaios *in vivo* contra insetos de *D. speciosa*;

### 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 - Materiais e equipamentos:

a) **Solventes e materiais diversos usados no estudo dos micro-organismos.**

- Água deionizada ultra pura proveniente de sistemas de filtragem e osmose reversa (0,08  $\mu$ S) foi obtida através de um equipamento (modelo Master System) da Gehaka<sup>®</sup>;
- Micropipetas Gilson<sup>®</sup> de 10, 100 e 1000  $\mu$ L;
- Safranina Merck Certistain<sup>®</sup>;
- Cristal violeta Merck Certistain<sup>®</sup>;
- Iodeto de potássio grau P.A. Synth<sup>®</sup>;
- Iodo metálico Synth<sup>®</sup>;
- Tubo criogênico 2,0 mL TPP<sup>®</sup>;
- Alça de Drigalski;
- Alça de platina 5 cm x 0,5 cm);
- Álcool grau P.A. Synth<sup>®</sup>;
- Bico de Bunsen;
- Cloreto de Sódio grau P.A. Synth<sup>®</sup>;
- Dimetilsulfóxido grau P.A. Synth<sup>®</sup>;
- Glicose – D – anidra P.A. Synth<sup>®</sup>;
- Hipoclorito de sódio teor de cloro ativo de 2,0% a 2,5% m/m Triex<sup>®</sup>;
- Papel de filtro;
- Pinça metálica;
- Placa de ELISA<sup>®</sup> de 96 poços, TPP<sup>®</sup>;
- Placas de Petri Petric<sup>®</sup> diâmetro 9 cm;
- Tetraciclina Sigma Aldrich<sup>®</sup>;
- Bastão de alumínio estéril;

- Peptona HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Ágar Nutriente HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Batata Dextrose Ágar HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Caldo Muller Hinton HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Extrato de carne HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Extrato de levedura HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Ágar Czapek Dox HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Ágar Triptona de Soja HIMEDIA<sup>®</sup>;
  - Fungicida Vitavax<sup>®</sup> Thiran;
- b) Equipamentos usados no estudos dos micro-organismos.**
- Autoclave vertical Phoenix Luferco<sup>®</sup>;
  - Capela de fluxo laminar vertical;
  - Estufa incubadora de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio 411D Nova Ética (B.D.O. sigla em inglês);
  - Espectrofotômetro 700 plus FEMTO<sup>®</sup>;
  - Microscópio Leica<sup>®</sup> DM500 com Câmera Digital para microscópio ICC50 HD;
  - Ultrafreezer Sanyo, Modelo: MDF – U56VC;
  - Espectrofluorímetro Spectramaz Multi-Mode Reader/Leitor de microplacas;
  - Espectrômetro de massas por tempo de voo com Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI – TOF – MS, sigla em inglês) (Autoflex Speed; Bruker Daltonics).
- c) Equipamentos utilizados no estudo fitoquímico**
- Estufas para secagem do material vegetal: Estufa de ar circulante operado a 40°C;
  - Moinhos de tritura e homogeneização: Moinho TECNAL TE-63;
  - Evaporadores rotativos: Büchi modelo rotavapor R-215;

- Extrator Ultra-Turrax, fabricante: IKA<sup>®</sup>; modelo: RW20;
- Espectrômetros de RMN: Brüker DRX 400MHz (9,4 Tesla) (usando TMS como padrão interno);
- Equipamentos de HPLC: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Reciclante – Shimadzu SCL-10Avp equipado com válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem de 200, 500 e 2000  $\mu$ L, bomba Shimadzu LC-6AD, e detector de UV-Vis Shimadzu SPD-10Avvp e detector Índice de Refração Shimadzu RID-10A.

**d) Materiais utilizados no estudo fitoquímico**

- Métodos Cromatográficos - No monitoramento do trabalho assim como no fracionamento dos extratos e frações tem sido utilizados os seguintes métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada: Sílica gel F254 20x20cm (CCDA); Cromatografia em coluna (CC): Sílica gel 70 – 230 mesh; Cromatografia em coluna tipo “flash”: Sílica gel 230 – 400 mesh; Cromatografia em coluna: Florisil<sup>®</sup> ( $Mg_2SiO_3$ ); Cromatografia em coluna: Sephadex-LH20<sup>®</sup>; Cromatografia líquida de Alta Eficiência – Preparativa; Cromatografia líquida de Alta Eficiência – Semi-analítica;
- Reveladores: Solução de vanilina e Câmara de luz ( $\lambda = 254$  nm e 365 nm);
- Solventes: Solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar: Acetona, acetato de etila, diclorometano, etanol, metanol, hexano. Solventes destilados grau P.A. e em grau HPLC Merck, Synth e J.T. Becker; Solventes deuterados Tedia ( $CDCl_3$ , Acetona –  $d_6$  e  $CD_3OD$ ).

## **3.2 - Isolamento de microrganismos simbiotes de *Diabrotica speciosa***

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

Para promover o crescimento dos micro-organismos simbióticos dos insetos *D. speciosa*, foram preparados cinco meios de cultivo, contendo cada um, diferentes nutrientes. Os meios de cultivo experimental utilizados foram: Ágar Nutriente (NA), Caldo Nutriente (CN), Ágar Batata Dextrose (BDA), Ágar Czpek Dox (CZ), Ágar Triptona de Soja (TSA), Caldo Mueller Hinton (MHB). A composição de cada meio é mostrada na Tabela 3.1.

Os meios foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. Após a distribuição dos meios em erlenmeyers, os mesmos foram esterilizados em autoclave por 20 min a uma temperatura de 120°C. Após a esterilização dos meios foram vertidos em placa de Petri previamente esterilizadas. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. A esterilidade dos meios que contém ágar foi verificada através do não aparecimento de qualquer contaminação após 96 h da solidificação.



TABELA 3.1 - Descritivo quantitativo da composição nutricional dos meios de cultivos NA, CN, BDA, CZ, TSA e MHB.

Ágar Nutriente	
Constituinte	Quantidade (g)
Extrato de carne	1,5
Extrato de levedura	1,5
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0
Água	1000
Caldo Nutriente	
Constituinte	Quantidade (g)
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Peptona	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Dextrose	5,0
Água	1000
Ágar Batata Dextrose	
Constituinte	Quantidade (g)
Infusão de batata	200,0
Dextrose	20,0
Ágar	25,0
Água	1000
Ágar Czpek Dox	
Constituinte	Quantidade (g)
Nitrato de sódio	2,0
Fosfato dipotássico	1,0
Sulfato de magnésio	0,5
Cloreto de potássio	0,5
Sacarose	30,0
Ágar	15,0
Água	1000
Ágar Triptona de Soja	
Constituinte	Quantidade (g)
Caseína enzimática hidrolisada	15,0
Digestão papaica da soja	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0
Água	1000
Caldo Mueller Hinton	
Constituinte	Quantidade (g)
Infusão de bife	300,0
Caseína Ácida Hidrolisada	17,5
Amido	1,5
Água	1000

### 3.2.2 - Obtenção de insetos na fase larval de *D. speciosa*.

Os indivíduos de *D. speciosa*, inseto alvo do estudo deste trabalho, foram capturados na área rural do município de Jaboticabal e fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça-Jr, pesquisador do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal. Os insetos foram mantidos em cativeiro, criados em vermiculita de granulometria média, com temperatura ambiente ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com umidade relativa do ar de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 h para estudos futuros de atividade inseticida. A Figura 3.1 ilustra a *D. speciosa* na fase adulta, larval e o cativeiro de criação do inseto (cultivo de milho).

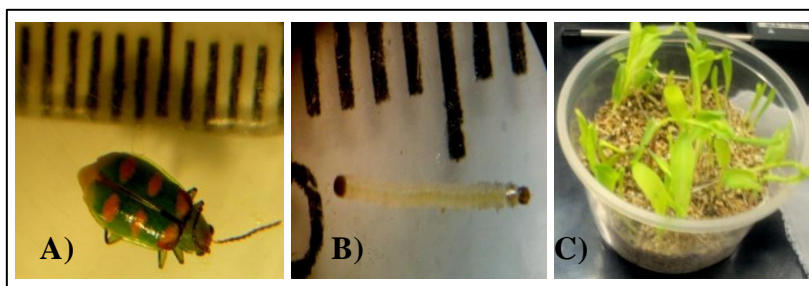


FIGURA 3.1 - Imagens de: A) *D. speciosa* fase adulta (“vaquinha patriota”); B) *D. speciosa* fase larval (“larva-alfinete”) e C) cativeiro de criação da *D. speciosa*.

### 3.2.3 - Isolamento dos micro-organismos simbiotes

O isolamento dos microrganismos foi realizado de maneira adaptada à metodologia de proposta por GUSMÃO et al.<sup>53</sup> para isolamento de micro-organismos simbióticos.

Os insetos, em sua fase larval, foram mortos criogenicamente utilizando um ultrafreezer vertical (Sanyo) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, já em capela de fluxo laminar, realizou-se as etapas de esterilização superficial (externa) das larvas a fim de eliminar micro-organismos e possíveis contaminantes externos. Assim, as larvas foram mergulhadas em soluções de esterilização na seguinte ordem: etanol 70% (v/v); solução aquosa de hipoclorito de sódio (com teor de cloro ativo de 2% m/m); água destilada;

água destilada. Por último, o excesso do solvente foi eliminado colocando rapidamente o material biológico em papel de filtro estéril. O tempo de cada imersão foi de 60 segundos.

Após a esterilização, a larva foi macerada, utilizando bastão de metal estéril, em tubos de plástico de 2 mL de volume (Eppendorf®) contendo água estéril. A suspensão foi colocada em contato com os diferentes meios de cultura em placas de Petri. A Figura 3.2 ilustra o processo de isolamento com larvas de *D. speciosa*.

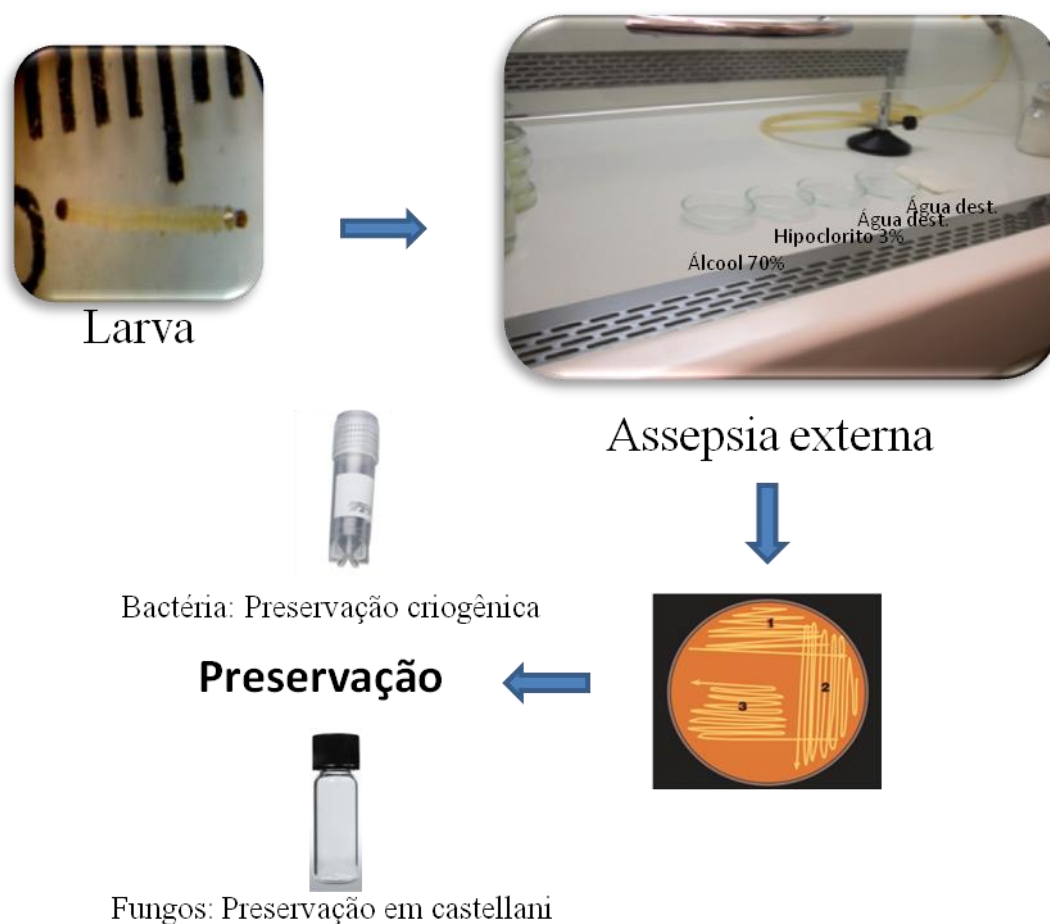


FIGURA 3.2 - Procedimento de isolamento dos micro-organismos endossimbiontes de *D. speciosa*.

As placas de Petri foram colocadas em estufa incubadora (B.O.D.) a 28°C, sendo diariamente observadas.

### 3.2.4 - Purificação e repicagem dos micro-organismos isolados

A purificação dos micro-organismos extraídos foi realizada utilizando dois diferentes procedimentos sendo:

a) **Bactérias:** as colônias bacterianas isoladas dos insetos foram purificadas por processos de semeadura por estrias em superfície. Amostras das colônias foram retiradas com o auxílio de uma alça de platina, previamente esterilizada ao fogo, seguida por um esfregaço em outras placas de Petri. O meio de cultivo utilizado no isolamento foi o mesmo para a extração. As placas de Petri foram sempre manipuladas em câmara de fluxo laminar próximas ao bico de Bunsen para evitar contaminação. Uma vez semeadas, as placas foram novamente incubadas em estufas B.O.D. a 28°C, com a tampa voltada para baixo. Este procedimento foi repetido mais uma vez para com as colônias pré-purificadas para obtenção de cepas puras.

b) **Fungos:** Um bloco do meio de cultura sólido (5 mm x 10 mm) contendo micélio de fungos foi retirado da placa de Petri de isolamento inicial do inseto e adicionado a uma nova placa com meio BDA. A placa foi mantida em uma incubadora B.O.D. a 28°C para o desenvolvimento dos fungos. Na sequência, os fungos foram novamente repicados em novas placas com o mesmo meio, até obter cepas purificadas.

### **3.2.5 - Avaliação dos procedimentos de Isolamento**

O procedimento de isolamento de MO simbioses foi avaliado realizando um experimento com diferentes tempos de esterilização (1, 3 e 5 min) em hipoclorito de sódio com teor de cloro ativo igual a 2% m/m.

Inicialmente a superfície das larvas foi pré-esterilizada em uma solução com 70% de álcool por 10 segundos e foram esterilizadas ou não em solução de NaClO. Em seguida, as larvas lavadas em água e depois foram maceradas em diferentes tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup>. As suspensões foram, então, inoculadas em placas para avaliar a presença de MO externos e a viabilidade microbiana. Deste modo foi possível identificar MO externos e internos e se os procedimentos de assepsia externa estavam

sendo eficientes. A Figura 3.3 ilustra o planejamento experimental delineado.

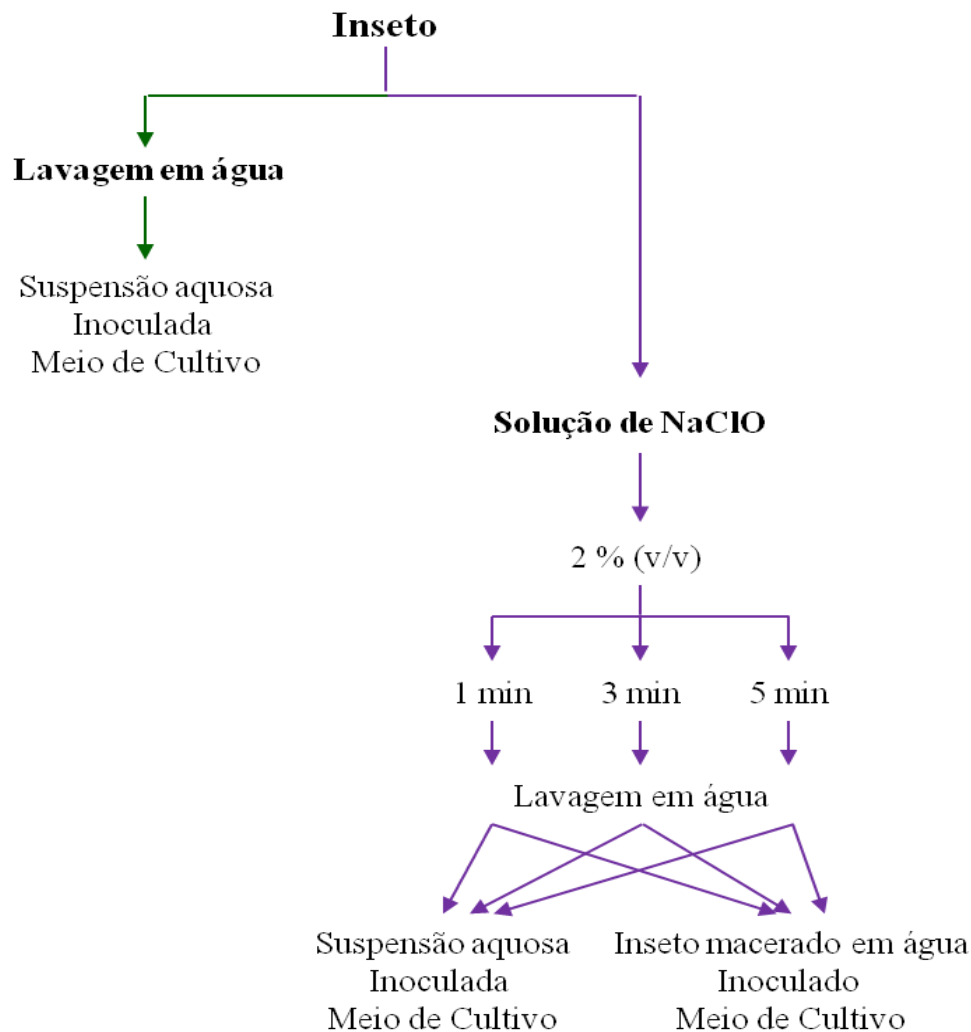


FIGURA 3.3 - Delineamento experimental para avaliação da eficiência de assepsia para isolamento de micro-organismos do trato digestivo do inseto *D. speciosa*.

### 3.2.6 - Procedimentos de isolamento para avaliação da transmissão Vertical ou Horizontal

Um dos objetivos desta linha de pesquisa é avaliar se o controle de micro-organismos simbiotes de insetos praga pode ser uma nova linha de pesquisa para controle comportamental destes insetos e, como resultado, um novo mecanismo de inibição populacional. Todavia, era necessário conhecer se os micro-organismos vêm sendo transmitidos entre as gerações ou se tem sido adquirido do meio ambiente. Assim, o seguinte

delineamento experimental foi proposto para identificar a origem dos micro-organismos simbiotes:

- a) Tratamento 01 (**T1**): Ovos de *D. speciosa* sem tratamento e recém ovipositados;
- b) Tratamento 02 (**T2**): Ovos tratados com  $\text{CuSO}_4$  e recém ovipositados;
- c) Tratamento 03 (**T3**): Ovos tratados, solo esterilizado e sementes tratadas com  $\text{CuSO}_4$ ;
- d) Tratamento 04 (**T4**): Ovos tratados, solo esterilizado e sementes não tratadas;
- e) Tratamento 05 (**T5**): Ovos tratados, solo não esterilizado e sementes tratadas com  $\text{CuSO}_4$ ;
- f) Tratamento 06 (**T6**): Ovos tratados, solo não esterilizado e sementes não tratadas;
- g) Tratamento 07 (**T7**): Ovos tratados, solo esterilizado e sementes tratadas com fungicida;
- h) Tratamento 08 (**T8**): Ovos não tratados, solo esterilizado e sementes tratadas com  $\text{CuSO}_4$ ;
- i) Tratamento 09 (**T9**): Ovos não tratados, solo esterilizado e sementes não tratadas;
- j) Tratamento 10 (**T10**): Ovos não tratados, solo não esterilizado e sementes tratadas com  $\text{CuSO}_4$ ;
- k) Tratamento 11 (**T11**): Ovos não tratados, solo não esterilizado e sementes não tratadas;

O solo foi composto por vermiculita e argila na composição 1:2 v/v. O procedimento de esterilização do solo foi realizado em autoclave a  $120^\circ\text{C}$  durante 20 min sendo o procedimento de esterilização realizada três vezes. As sementes foram tratadas com  $\text{CuSO}_4$  sendo este um dos principais

bactericidas em uso em cultivos agrícolas. Para tratar a semente com fungicida foi utilizado o Vitavax<sup>®</sup> Thiran na dosagem de 275 mL para cada 100 kg de sementes. A criação foi realizada em cultivos de milho. A Figura 3.4 ilustra a rota de avaliação utilizada.

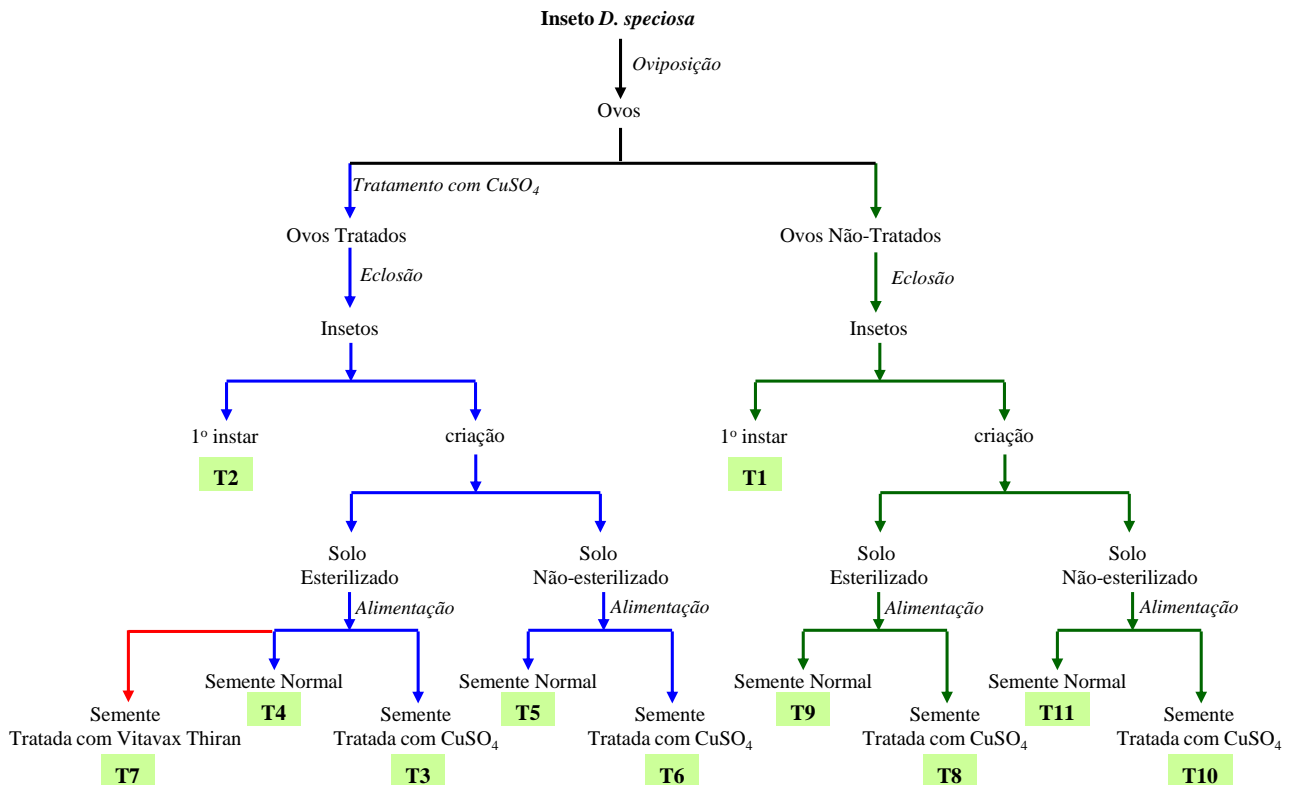


FIGURA 3.4 - Rota de extração e isolamento de micro-organismos simbiotes do inseto *D. speciosa* para avaliação da origem do simbiote no inseto.

Os tratamentos T3, T7 e T11 foram conduzidos até ocorrer a oviposição e a eclosão das larvas da segunda geração de insetos, gerando os tratamentos T13, T17 e T21 respectivamente. Os procedimentos de extração microbiana e isolamento foram os mesmos descritos no item 3.2.3. Deste modo, foi possível obter um ciclo completo da geração dos insetos sob os diferentes tratamentos (Figura 3.5).

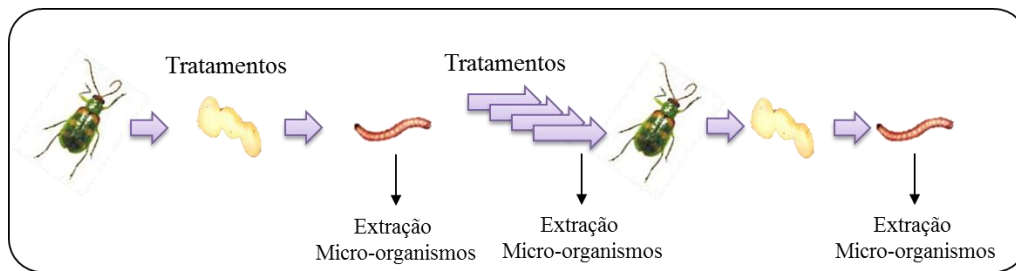


FIGURA 3.5 - Ciclo de avaliação de transferência e/ou aquisição microbiana entre duas gerações de *D. speciosa*.

### 3.2.6.1 - Delineamento comportamental dos ensaios de avaliação de transferência simbiônica

Os experimentos realizados no item 3.2.6 foram também avaliados do ponto de vista biológicos sendo os dados de razão sexual, número de insetos emergidos, viabilidade de adultos, período larval-adulto e longevidade, investigados. Os insetos foram mantidos confinados, em gaiolas plásticas e com tela de *nylon* ultra fina conforme ilustrado na Figura 3.6, sendo cada repetição realizada com 10 insetos.

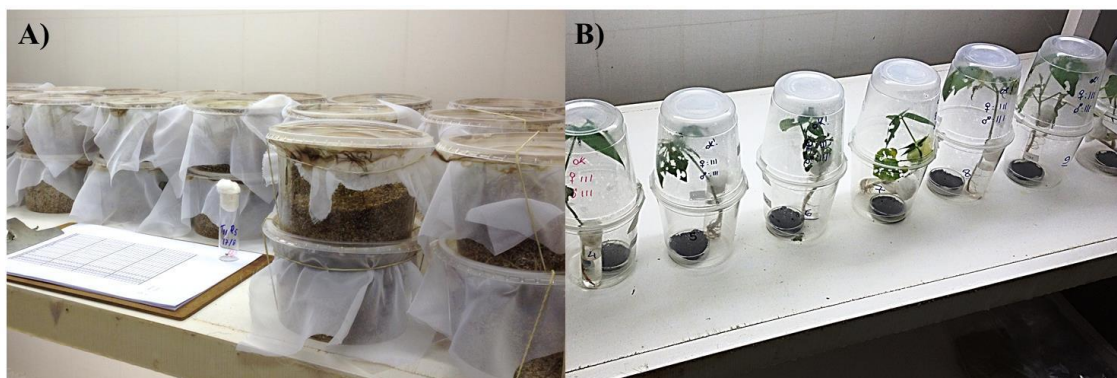


FIGURA 3.6 - Cultivo da *D. speciosa* em (A) fase larval e (B) fase adulta.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t de Tukey, ao nível 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas os dados foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$  onde  $x$  representa os dados observados que foram aplicados nas médias e análises estatísticas e a equação foi utilizada para ajustar os dados dentro de uma distribuição Gaussiana normal.



### 3.2.7 - Codificação microbiana

Os micro-organismos depois de purificados foram codificados acordo com sua origem e o meio de cultura em que foi criado, conforme mostrado na Figura 3.7.

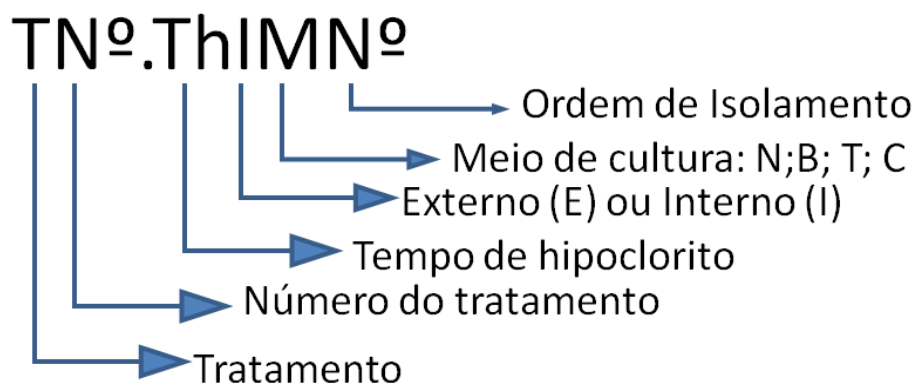


FIGURA 3.7 - Codificação das cepas isoladas.

Por exemplo o micro-organismo **T7.1IN3**. Seu código indica que este MO foi o isolado número 3 do meio de cultura Ágar Nutriente (N) e obtido da parte interna (I) da larva de *Diabrotica speciosa*. A larva usada foi criada nas condições do tratamento 7 e passou por uma assepsia com 1 minuto de hipoclorito de sódio.

### 3.2.8 - Preservação dos micro-organismos

A preservação dos fungos isolados foi realizada utilizando o método de CASTELLANI<sup>54</sup>. Esse método consistiu em colocar um bloco de meio de cultura sólido (BDA) de aproximadamente 5 mm x 10 mm da placa de Petri contendo, o fungo purificado, em um tubo de vidro com tampa de rosca, contendo 4 mL de água esterilizada. O tubo foi conservado a temperatura ambiente.

As células bacterianas podem ser preservadas por um longo período de tempo através do congelamento em ultrafreezers a temperaturas entre -60°C e -80°C. Dessa forma, as cepas bacterianas purificadas foram cultivadas em meio líquido de cultura (CN). Foram adicionados 900 µL da suspensão bacteriana em tubo criogênico contendo 100 µL de uma solução

com 1:1 água/glicerol esterilizada. Os tubos criogênico contendo as cepas bacterianas foram então rotulados e armazenados em um ultrafreezer na temperatura de -80°C.

### **3.3 - Caracterização microbiana**

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

A coloração de Gram permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. Neste processo, o esfregaço bacteriano é tratado com reagentes na seguinte ordem: adição de corante púrpura cristal violeta, a solução de iodo (cuja função é fixar o corante no interior da célula), o álcool (agente descolorante que remove o corante identificando bactérias gram-negativas) e o corante vermelho safranina. O procedimento de preparo destes reagentes se encontra descritos na Tabela 3.2. As bactérias gram-positivas retêm o cristal violeta e aparecem coradas em violeta-escuro. Bactérias gram-negativas perdem o cristal violeta quando tratadas com álcool e são coradas com o corante safranina e apresentando uma coloração vermelha. As etapas de preparo estão resumidas na Figura 3.8.

Para que uma célula seja corada elas são previamente mortas e fixadas. Os esfregaços devem ser feitos sobre uma lâmina de vidro. A fixação e coloração das células foram realizadas seguindo o seguinte protocolo:

- a) Colocou-se sobre uma lâmina de vidro limpa e seca uma gota d'água;
- b) Os micro-organismos, aderidos na alça, proveniente da cultura em meio sólido, foram emulsionados na gota;
- c) A suspensão foi espalhada na lamina de maneira a formar uma película fina sobre a lâmina;
- d) Deixou a lamina, secar a temperatura ambiente;

- e) O material foi fixado, passando rapidamente a lâmina 3 vezes sobre a chama do bico de Bunsen;
- f) Deixou a lamina, esfriar antes da coloração;
- g) Cobriu a lamina, com violeta de genciana por 1 min;
- h) A lamina foi lavada com água para tirar o excesso de corante;
- i) Cobriu a lamina de viro com lugol por 1 min;
- j) A lamina foi lavada com água para tirar o excesso de corante;
- k) Cobriu a lamina de vidro com a mistura de acetona e álcool por 30 s;
- l) A lamina foi lavada com água para tirar o excesso de corante;
- m) Cobriu a lamina com safranina por 1 min;
- n) A lamina foi lavada com água para tirar o excesso de corante.

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

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

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

Todas as bactérias avaliadas pela coloração de Gram foram previamente reativadas sendo retiradas do ultrafreezer (-80°C) e inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Nutriente. Após 48 h de crescimento, as mesmas foram repicadas para tubos de ensaio contendo caldo nutriente, e deixadas crescer por 12 h. Em seguida a suspensão formada foi analisada.

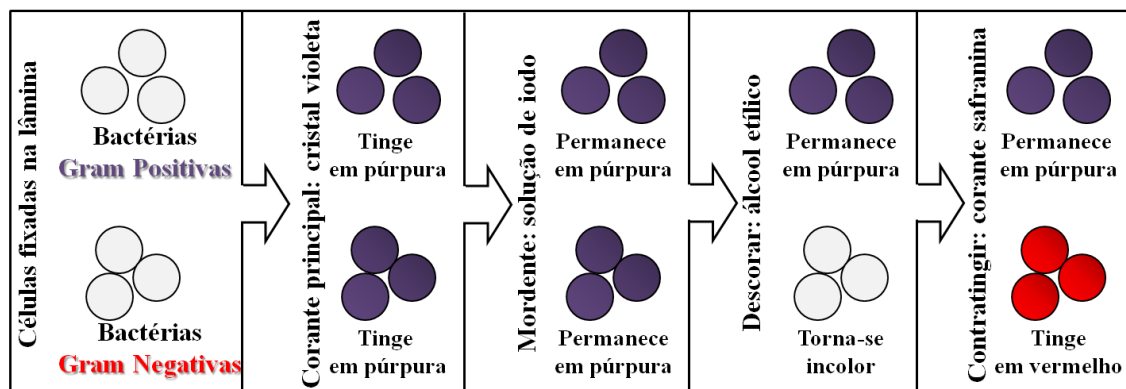


FIGURA 3.8 - Processo de coloração de Gram para células bacterianas.

### 3.3.2 - Análises de caracterização proteica microbiana por Espectrometria de Massas com Ionização por Laser

As análises de caracterização por MALDI – TOF – MS foram realizadas em colaboração com o Dr. Douglas Ferreira do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos coordenado pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho do Departamento de Química da UFSCar.

As amostras foram analisadas no espectrômetro de massas por tempo de voo com Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (autoflex™ speed MALDI-TOF(/TOF) com 1 kHz Smartbeam™-II laser 355 nm; Bruker Daltonics). A aquisição de dados foi realizada em modo positivo de análise. A matriz utilizada foi o ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA, Sigma-Aldrich) na concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O:ACN 1:1 v/v com 0,1% TFA a qual, após preparada, foi sonicada durante 10 min para garantir total solubilização.

As cepas bacterianas enviadas para análise foram preparadas seguindo a seguinte metodologia: Inicialmente foram reativadas em meio NA. Após um período de incubação de 24 h em B.O.D., as colônias foram repicadas para meio de cultura líquido (CN). Após 24 h de incubação em B.O.D. a suspensão bacteriana formada no meio líquido foi repicada, usando a alça de platina, para meio sólido (NA), utilizando a metodologia de esgotamento por estria. Esse método de semeadura foi escolhido, pois

permite diluir a suspensão bacteriana obtendo, assim, colônias isoladas. Cada bactéria foi repicada para duas placas de Petri contendo o meio NA. Após 24 h da segunda repicagem no meio sólido, quatro colônias isoladas de cada placa de Petri foram diretamente aplicadas em três spots da placa de metal utilizando um palito de madeira previamente autoclavado para esta finalidade. Assim, totalizando 24 aplicações de cada isolado na placa de análise. Além das colônias, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de uma solução da matriz orgânica (HCCA) sobre cada amostra que foi evaporada a temperatura ambiente. Após a cocristalização da amostra com a matriz, a placa foi inserida no equipamento na finalidade de aquisição dos espectros para cada isolado utilizando o software FlexControl (version 3.3, Bruker Daltonics).

Os espectros de massas resultaram da soma dos 1500 tiros do laser sendo disparados 80 tiros por rastro de amostragem com movimento de disparo no modo randômico. Como padrão de calibração aferindo o equipamento, foi utilizada a mistura de proteínas (*Protein Calibration Standard I*). A faixa de relação massa/carga ( $m/z$ ) analisada entre 2000 e 20.000 Da. A Figura 3.9 ilustra a placa utilizada para as análises por MALDI – TOF – MS.

Os dados adquiridos foram subsequentemente comparados com a base de dados para bactérias disponível no software MALDI Biotyper (versão 3.1, Bruker Daltonics GMBH).



FIGURA 3.9 - Placa de MALDI de 384 spots utilizada nas análises dos microrganismos.

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

Os ensaios de avaliação do potencial antimicrobiano por produtos naturais foram realizados seguindo uma metodologia qualitativa e quantitativa de microdiluição em caldo.

O princípio da técnica de microdiluição em caldo consiste em cultivar o micro-organismo na placa de 96 poços (placas de ELISA<sup>®</sup>) na presença dos extratos, frações e compostos de investigação. Posteriormente ao crescimento do micro-organismo, se adiciona um corante sendo este degradado pelas enzimas produzidas pelas células microbianas. Quanto maior a quantidade células, provenientes de um maior crescimento microbiano, maior será a degradação do corante. Utilizando um corante que quando degradado emite fluorescência, quanto maior a inibição do crescimento microbiano pelo composto teste, menor será a fluorescência emitida podendo assim, utilizar a intensidade de emissão de fluorescência para análises quantitativas de inibição.

#### **3.4.1 - Ensaio de inibição do crescimento bacteriano – interpretação quantitativa através da técnica de espectrofluorimetria**

Esse trabalho foi realizado em colaboração com a Mestra Fabiana Marques. O desenvolvimento deste experimento foi realizado inicialmente para a cepa bacteriana IBDeL6 $\alpha$  isolada de larva de *D. speciosa* em meio ágar nutriente. A cepa foi reativada em meio de cultura sólido (NA), incubada em B.O.D. a 28°C por 48 h, repicada para meio de cultura líquido (CN) e incubada novamente a 28°C. Após 48 h de incubação, foi realizado o procedimento de diluição seriada em solução salina, conforme ilustrado na Figura 3.10. O inóculo utilizado no ensaio correspondeu à quinta diluição.

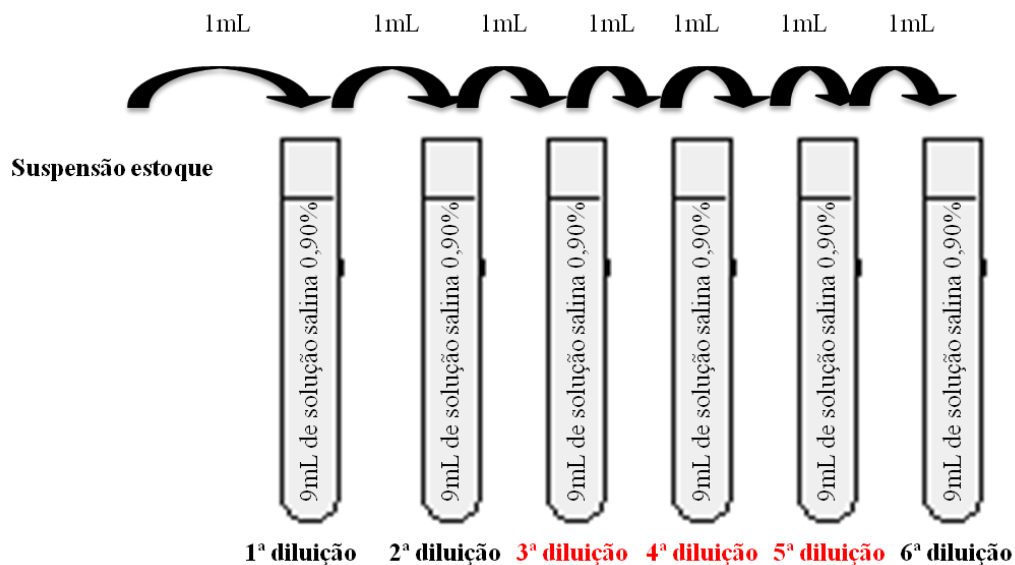


FIGURA 3.10 - Procedimento de diluição seriada para seleção da concentração (UFC) microbiana como inóculo inicial.

Para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, o bioensio foi testado de forma a obter resultados quantitativos. A metodologia foi realizada primeiramente a construção de uma curva analítica a fim de avaliar a melhor faixa linear de concentrações que o corante poderia ser utilizado. Esse procedimento é descrito nos próximos tópicos.

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

Este experimento foi realizado a partir da construção de uma curva analítica com uma faixa de concentrações do corante determinada empiricamente. Diferentes concentrações do corante foram expostas a mesma quantidade de bactéria para definição da faixa linear de trabalho.

A curva foi obtida avaliando a linearidade em um intervalo de 0,28-5,2% (v/v) de corante, ou seja, em uma concentração final nos poços de 0,01-0,195  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente.

#### a) Preparo da placa de ELISA<sup>®</sup>

Previamente ao preparo das soluções padrão de corante, a placa de ELISA<sup>®</sup> foi confeccionada. Três poços foram confeccionados para cada concentração de corante testada, ou seja, análise realizada em triplicata

(n=3). Em cada poço foram adicionados 160  $\mu\text{L}$  de meio de cultura (NA) e 10  $\mu\text{L}$  de inóculo correspondente à quinta diluição (Figura 3.10). A placa foi incubada em uma B.O.D. à 28°C por 48 h. Após esse período 30  $\mu\text{L}$  de cada solução de trabalho foram adicionadas à placa nos respectivos poços na placa de ELISA.

**b) Preparo da solução estoque e de trabalho de resazurina**

O preparo das soluções de trabalho do corante utilizadas na preparo da curva se deu a partir da solução estoque. Para tal, 2,51 mg de resazurina foram adicionados à um balão volumétrico de 100 mL, o qual teve seu volume completado com água destilada estéril.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque. Assim, foram obtidas soluções em concentrações de 0,070; 0,17; 0,30; 0,40; 0,50; 0,70; 0,90; 1,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  utilizadas no preparo da curva. Considerando que foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  das soluções de trabalho em cada poço da placa e o volume final por poço foi de 200  $\mu\text{L}$ . As concentrações reais nos poços passaram a ser: 0,010; 0,026; 0,045; 0,060; 0,075; 0,135; 0,195  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**c) Obtenção da curva analítica**

A relação entre os valores da concentração de corante nos poços (em) com os valores de fluorescência foi utilizada para construir a curva analítica. O intervalo linear foi calculado através da verificação da proporcionalidade entre a concentração de corante e a resposta analítica (fluorescência) a partir do cálculo do coeficiente linear (*b*), do coeficiente angular (*a*) e do coeficiente de correlação (*r*).

Para validação do método foram avaliados as figuras de mérito linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

**d) Leitura no Espectrofluorímetro**

O volume total de cada poço da placa de ELISA<sup>®</sup> é 300  $\mu\text{L}$ , a placa utilizada possui coloração preta, fundo plano e é opaca. A leitura foi



realizada em um fluorímetro Spectramax inserindo a placa em um compartimento termostaticado a 28°C (mesma temperatura de incubação da placa), onde a fluorescência foi medida 40 min após a adição do corante, nas devidas concentrações, nos poços da placa de ELISA. A fenda de excitação foi ajustada para  $\lambda_{ex}=530\text{nm}$  e de emissão para  $\lambda_{em}=590\text{ nm}^{55}$ . Essa leitura foi realizada em 5 min por placa e cada poço foi lido três vezes durante esse tempo.

### **3.4.1.2 - Aplicação do método para avaliação do potencial antimicrobiano de extratos vegetais**

O isolado IBDeL6 $\alpha$ , foi reativado do freezer a -80°C, repicado para uma placa de Petri contendo meio de cultura NA. Após 48 h de crescimento em B.O.D., uma colônia foi repicada da placa de Petri para um tubo contendo Caldo Nutriente. Após 24 h de crescimento, incubado em B.O.D., foi realizado o procedimento de diluição em série em solução salina obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  na qual, o inóculo utilizado correspondeu à quinta diluição. A absorbância do inóculo, monitorada por um espectrofotômetro em 600 nm, correspondeu à 0,1-0,5<sup>56,57</sup>.

#### **a) Preparo dos extratos para o ensaio antibacteriano**

As amostras de extratos e frações testadas foram preparadas pesando 5 mg de cada amostra e adicionando 125  $\mu\text{L}$  de DMSO P.A., a esta solução adicionaram-se 4,875 mL de meio de cultura líquido Caldo Nutriente esterilizado – concentração de trabalho igual a 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Todas as suspensões das amostras foram devidamente filtradas em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### **b) Preparo das soluções dos controles**

##### **- Controle positivo (antibiótico Tetraciclina)**

As cepas bacterianas conhecidas apresentam sensibilidade a uma faixa de concentração de antibióticos específicos<sup>58</sup>. No entanto, São poucos

os relatos na literatura sobre a bactéria analisada, sendo nenhum desses em relação à sua sensibilidade à antibióticos, desta maneira a concentração da solução de antibiótico foi preparada na maior concentração predita pela norma da NCCLS<sup>58</sup>. Assim, 1 mg de tetraciclina foi dissolvido em 50µL de DMSO previamente esterilizado em um tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> de 2 mL. A mistura foi homogeneizada em um agitador magnético por 3min e então completado o volume com 1950 µL de caldo nutriente previamente esterilizado.

- Controle de DMSO

Este controle consistiu na adicção de 125 µL de DMSO P.A. em 4,875 mL de meio de cultura (Caldo Nutriente). Este controle foi feito para avaliar a toxicidade do DMSO frente à cepa bacteriana, averiguando se há ou não interferência do mesmo no resultado de inibição.

c) Montagem da placa de ELISA<sup>®</sup>

Foram transferidos 100 µL das soluções contendo as amostras de extrato, controle, meio e frações e 90 µL de meio para os poços da placa de ELISA. Cada amostra foi ensaiada em triplicata. Os extratos brutos de *Casearia sylvestris*, *Davilla elliptica*, *Eugenia aurata*, *Ocotea pulchella*, *Psidium laruotteanum* e *Miconia ligustroides* e as frações Hexânica, acetato de etila, diclorometano e metanólica de *P. laruotteanum* foram avaliados bem como o controle positivo (solução de tetraciclina), controle de DMSO, controle de esterilidade do ambiente (apenas meio de cultura sem adição de inóculo).

Após a montagem de todas as triplicatas das soluções, na placa, foram adicionados 10 µL do inóculo, totalizando um volume final de 200 µL.

Os controles, positivo e DMSO são importantes, pois permitem fazer o escalonamento quantitativo através da diferença entre a emissão de fluorescência para esses controles – crescimento pleno (controle DMSO),

100% de emissão; e para controle positivo – inibição do crescimento (controle positivo), 0% de emissão; menor e maior ponto de concentração da faixa dinâmica de trabalho, respectivamente.

Na sequência, a placa foi tampada e protegida com um plástico *insulfin* nas laterais sendo incubadas por 48 h a uma temperatura de 28°C. Após esse período adicionaram-se 30 µL de resazurina na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> em cada poço. Por fim, a atividade foi quantitativamente avaliada, através da leitura no fluorímetro Spectramax sob mesmas condições descritas no item 3.4.1.1.

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

A investigação de atividade antimicrobiana de plantas do cerrado sobre os micro-organismos isolados foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo com resazurina como revelador. Porém, diferentemente do item 3.4.1, foi realizada uma análise qualitativa. Esta metodologia foi escolhida, pois se mostrou facilmente reprodutiva e rápida de ser realizada, características que permitem realizar os testes sobre várias espécies de bactérias contra várias espécies de plantas. Porém ela não nos permite quantificar qual a porcentagem de inibição do extrato. Por outro lado, para os ensaios de varredura realizados foi necessário apenas avaliar se o extratos ensaiados apresentam alguma atividade antimicrobiana. Portanto não é necessária a quantificação da porcentagem de inibição.

Assim, a concentração de corte escolhida para todos os extratos ensaiados foi de 1 mg/mL.

O ensaio foi realizado utilizando a metodologia similar ao item 3.4.1.2. Contudo, neste estudo, não foi realizada a leitura no fluorímetro e sim uma leitura visual utilizando placas de ELISA<sup>®</sup> transparentes.

Soluções de extratos de Plantas do cerrado, escolhida de forma aleatória, foram preparados pesando uma quantidade próxima a 40 mg e dissolvida em 500  $\mu\text{L}$  de DMSO. Em seguida o volume foi completado com 19,50 mL de meio de cultura. Gerando uma solução na concentração de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

O inóculo de cada bactéria se deu através da reativação delas em meio sólido (NA), 24 h depois foi feita a repicagem dos micro-organismos para o meio líquido (MHB). Os isolados foram mantidos em B.O.D. a  $28^\circ\text{C}$  por 24 h. Após o período de incubação foi medida a densidade ótica (DO) das suspensões dos micro-organismos. Utilizando um espectrofotômetro com um  $\lambda = 600 \text{ nm}$ . Após a medida da DO foi realizado o procedimento de diluição seriada em solução salina obtendo-se diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  (Figura 3.10) na qual a diluição escolhida foi dependente da absorbância medida. Para os isolados que tiveram uma absorbância maior que 0,6 foram utilizadas as diluições  $10^{-4}$  e para as que tiveram absorbância menor que 0,6 foram utilizadas as diluições  $10^{-3}$ .

A montagem da placa foi feita colocando 100  $\mu\text{L}$  do agente antimicrobiano, 80  $\mu\text{L}$  de meio de cultura e 20  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. Assim os extratos tiveram sua concentração no poço diluída pela metade, ou seja, a concentração testada foi de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Cada extrato foi testado em quintuplicata ( $n = 5$ ). Também foi feito o controle positivo usando o antibiótico de atividade conhecida (tetraciclina), este foi utilizado na concentração menor do que os extratos,  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A placa ficou incubada em B.O.D. por 24 h a  $28^\circ\text{C}$ . Então foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de resazurina com  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de concentração. Após 1 h da adição do corante a placa foi avaliada visualmente.

A análise visual se deu pela diferença de cor emitida pela forma oxidada da resazurina (azul) e pela forma reduzida (rosa). Porém os extratos também possuem sua coloração característica, que pode se

misturar com a cor da resazurina dificultando a análise. Por isso duas placas foram realizadas. Em uma delas foi adicionada 100  $\mu\text{L}$  de extrato, 100  $\mu\text{L}$  de meio MH e 20  $\mu\text{L}$  de resazurina oxidada. Na outra placa foi 100  $\mu\text{L}$  de extrato, 100  $\mu\text{L}$  de meio MH e 20  $\mu\text{L}$  de resazurina reduzida. Essas placas, chamadas de placa controle, foram analisadas visualmente, possibilitando uma comparação com as placas do ensaio.

### **3.5 - Estudos fitoquímicos de Plantas do Cerrado**

Foram coletadas 24 espécies vegetais no cerrado da UFSCar, *campus* São Carlos-SP (Tabela 3.3). Todas as amostras foram obtidas coletando somente folhas. Este procedimento visa não destruir a planta e a sustentabilidade do projeto. Todos os pontos de coleta foram devidamente registrados através de dados de localização geográfica por satélite e uma excisata de cada amostra foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar sob os cuidados da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Salgado Lima. Estes procedimentos contribuirão para a rastreabilidade dos dados bem como assegurar a reprodutividade de ensaios futuramente.

TABELA 3.3- Espécies vegetais coletadas no cerrado da UFSCar.

<b>Espécie</b>	<b>Código</b>	<b>Localização Geográfica</b>	
<i>Eriotheca gracilipes</i>	E1	Sul: 21°58'16"	Oeste: 47°52'59"
Ainda não identificada <sup>a</sup>	E2	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°53'0"
<i>Bauhinia rufa</i>	E3	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Nectandra sp.</i> (a confirmar)	E4	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Campomanesia pubescens</i> <sup>b</sup>	E5	Sul: 21°58'16"	Oeste: 47°52'59"
Ainda não identificada <sup>a</sup>	E6	Sul: 21°58'16"	Oeste: 47°53'0"
<i>Annona coriaceae</i>	E7	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Symplocos pubescens</i>	E8	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°53'0"
<i>Schefflera vinosa</i>	E9	Sul: 21°58'16"	Oeste: 47°52'59"
<i>Anadenanthera falcata</i>	E10	Sul: 21°58'16"	Oeste: 47°52'59"
Ainda não identificada <sup>a</sup>	E11	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Campomanesia pubescens</i> <sup>b</sup>	E12	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Roupala Montana</i>	E13	Sul: 21°58'15"	Oeste: 47°52'59"
<i>Serjania lethalis</i>	E14	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°53'0"
<i>Xylopia aromatica</i>	E15	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°53'01"
<i>Ananas ananassoides</i>	E16	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°52'58"
<i>Solanum lycocarpum</i>	E17	Sul: 21°58'19"	Oeste: 47°53'01"
<i>Caryocar brasiliensis</i>	E18	Sul: 21°58'23"	Oeste: 47°53'02"
<i>Psidium laruotteanum</i>	E19	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°52'58"
<i>Ocotea pulchella</i>	E20	Sul: 21°58'14"	Oeste: 47°53'90"
<i>Eugenia aurata</i>	E21	Sul: 27°53'60"	Oeste: 47°52'56"
<i>Davilla elliptica</i>	E22	Sul: 27°58'14"	Oeste: 47°52'57"
<i>Miconia ligustroides</i>	E23	Sul: 27°53'16"	Oeste: 47°13'12"
<i>Casearea sylvestris</i>	E24	Sul: 21°58' e 22°00'	Oeste: 47°51' e 47°54'

<sup>a</sup> = Folhas de plantas não identificadas coletadas em região diferente

<sup>b</sup> = Folhas de plantas da mesma espécie coletadas em região diferente

E = Extrato

### 3.5.1 - Preparo dos Extratos Vegetais

Após a coleta das folhas das plantas, as mesmas foram secas em estufa de ar circulante a 40°C por 7 dias e trituradas em um moinho tipo Willey.

Na sequência, o material seco e triturado, foi submetido a um processo de turbólise e deixado para macerar em solvente orgânico (álcool etílico P.A.) mantendo uma proporção de 5:1 entre solvente e massa seca.

O procedimento foi realizado por 6 vezes sendo no final todo o extrato etanólico em solução agrupado e rotaevaporado rendendo extratos de aspectos semisólidos (pastoso). Entre cada etapa de maceração, o solvente era retirado por filtração e um novo solvente adicionado ao precipitado. O rendimento da extração foi calculado com base na diferença entre as massas de material seco utilizado e do extrato obtido. Os extratos foram armazenados em frasco âmbar e sob refrigeração.

### **3.5.2 - Fracionamento Fitoquímico dos Extratos Vegetais**

O extrato etanólico de *Psidium laruotteanum* foi submetido ao fracionamento fitoquímico clássico. O principal objetivo dos fracionamentos foi obter moléculas que podem ser utilizadas como padrões analíticos de referência e assim realizar um controle de qualidade do extrato.

#### **3.5.2.1 - Fracionamento do extrato de *Psidium laruotteanum***

Posterior à obtenção do extrato etanólico, 30 g do extrato de *P. laruotteanum* foi fracionado em uma coluna ( $\phi = 5$  cm;  $h = 30$  cm) de sílica gel (230 – 400 mesh) à vácuo, a qual foi eluída com quatro solventes distintos, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade (Figura 3.11). Foram obtidas quatro novas frações correspondentes a cada solvente. O volume utilizado de cada solvente foi de aproximadamente 4 L.

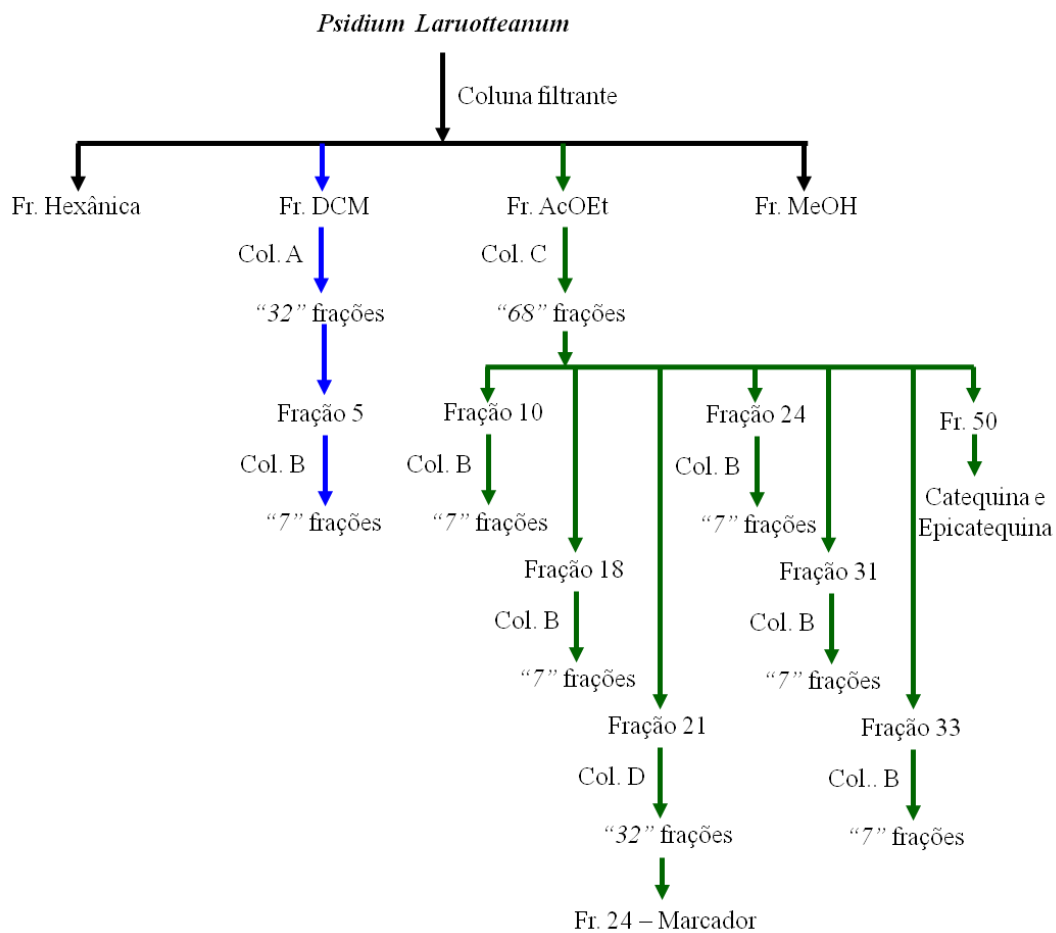


FIGURA 3.11 - Fluxograma de separação fitoquímica para isolamento do marcador de referencia da espécie vegetal *P. laruotteanum*.

Após análise de cromatografia em camada delgada das quatro frações (Figura 3.12), as frações acetato de etila (Fr.AcOEt) e diclorometano (Fr.DCM) apresentaram maior quantidade de bandas, e portanto foram re-fractionadas.

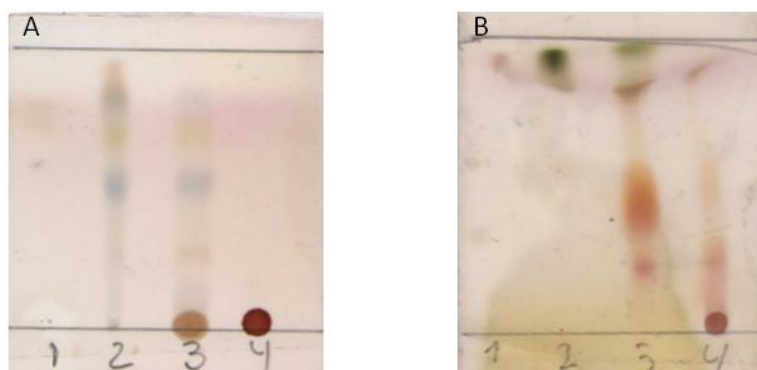


FIGURA 3.12 - Cromatografia em camada delgada. 1 – Fr.Hex. 2 – Fr.Dcm. 3 – Fr.AcOEt. 4 – FrMet. A) Fase móvel: Mistura contendo 70% de hexano com 30% de acetato. B) Fase móvel: Mistura contendo 90% de diclorometano com 10% de metanol.



### A) Fracionamento da fração diclorometano

Pela cromatografia em camada delgada (Figura 3.12) a Fr.Dcm apresentou boa separação no sistema de solvente contendo 70% de hexano e 30% de acetato de etila. Assim, 200 mg do extrato foi fracionada em uma coluna ( $\phi = 1\text{cm}$ ,  $h = 25\text{ cm}$ ) de cromatografia por adsorção, utilizando Sílica flash como fase estacionária. A amostra foi aplicada na forma de pastilha homogeneizada com sílica. O sistema de eluição foi isocrático com a mesma fase móvel usada na cromatografia em camada delgada. Foram recolhidas 32 frações desta coluna.

A fração DCM 5 foi separada novamente utilizando o método de extração em fase sólida usando como cartucho de fase reversa. A amostra foi diluída em metanol e aplicada. O sistema de eluição utilizado está descrito na Figura 3.13. O cartucho foi condicionado com 2 mL de água. Cada solvente foi adicionado, num volume de 0,5 mL, 3 vezes ao cartucho. O cartucho era seco a cada troca de solvente.

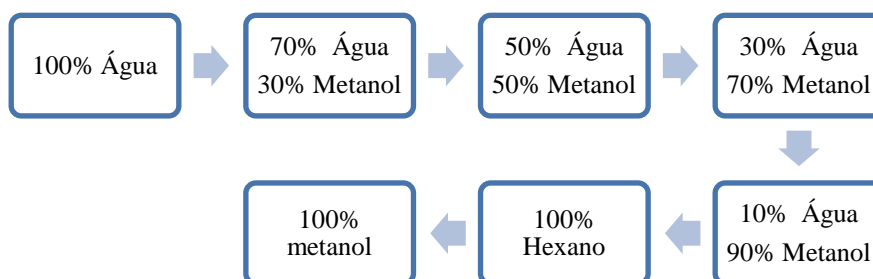


FIGURA 3.13 - Gradiente utilizado na eluição da frações DCM 5.

### B) Fracionamento da fração acetato de etila:

Pela cromatografia em camada delgada (Figura 3.12) a Fr.AcOEt apresentou boa separação na fase móvel contendo 70% de hexano e 30% de acetato de etila. No entanto, nem todos compostos presente a amostra foram eluidos neste solvente. Por isso, na eluição, foi utilizado um sistema de gradiente (Figura 3.14).

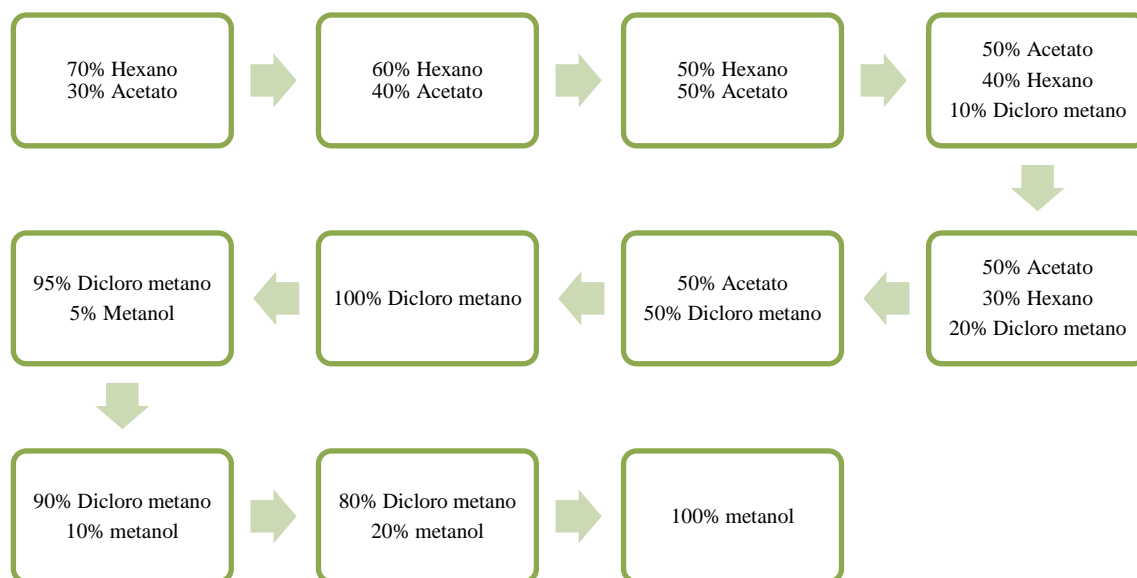


FIGURA 3.14 - Gradiente utilizado na eluição da fração acetato.

Para fracionar este extrato foi utilizada uma coluna ( $\phi = 3$  cm,  $h = 30$  cm) de cromatografia por adsorção utilizando sílica comum. Obtiveram-se 68 novas frações.

Uma das frações obtidas desta coluna, fração 21 (Ac21) foi analisada por cromatografia em camada delgada sendo possível observar que esta fração continha um composto majoritário. Além disso, essa fração apresentou sinais interessantes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Por isso foi refractionada em uma coluna ( $\phi = 0,5$  cm,  $h = 20$  cm) com sílica flash. O sistema de eluição iniciou-se com Hexano e acetato na proporção de 7/3 (v/v) passando por 6/4 (v/v) finalizando em 1/1 (v/v). Foram recolhidas 32 frações desta coluna.

As frações Ac 10, Ac 18, Ac 24, Ac 31 e Ac 33 foram re-fracionadas utilizando o método de extração em fase sólida no modo reverso de eluição. A amostra foi diluída em metanol e aplicada. O sistema de eluição foi de acordo com a Figura 3.13. O cartucho foi condicionado com 2 mL de água. Cada solvente foi adicionado, num volume de 0,5 mL, 3 vezes ao cartucho. O cartucho era seco a cada troca de solvente.

### **3.6 - Análises quantitativas de extratos e frações de *P. laruotteanum* submetidas aos ensaios de inibição microbiana**

Com o propósito de controle de qualidade do material vegetal e, conseqüentemente, da reprodutibilidade da atividade biológica, extratos e frações de *P. laruotteanum* submetidos aos ensaios de inibição microbiana, foram quantificados cromatograficamente utilizando a técnica de HPLC. Como padrão de referência foi utilizado o próprio marcador da classe chalcona, isolado da fração Ac21.24 de *P. laruotteanum*.

As análises por HPLC-UV foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido da marca Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) configurado com degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, autoinjeter G1329A, forno de coluna G1316A e detector de ultravioleta G1314B. A melhor separação cromatográfica dos compostos foi encontrada utilizando o modo gradiente de eluição. A Tabela 3.4 descreve os métodos finais obtidos para ambas as matrizes vegetais.

TABELA 3.4 - Parâmetros cromatográficos de separação analítica do extrato de *P. laruotteanum* para análises quantitativas.

<i>P. laruotteanum</i>	
Coluna	Phenomenex <sup>®</sup> Gemini (150x4,6 mm, d.i. 5 µm)
Coluna de segurança	Phenomenex C18 (4x3 mm, d.i. 5 µm)
Solventes:	Água ultrapura (A) Acetonitrila (B)
Gradiente (v/v)	t = 0 min A:B 95:05 t = 4 min A:B 95:05 t = 6 min A:B 90:10 t = 11 min A:B 90:10 t = 12 min A:B 70:30 t = 16 min A:B 70:30 t = 18 min A:B 30:70 t = 28 min A:B 30:70 t = 29 min A:B 00:100 t = 40 min A:B 00:100
Vazão (mL.min <sup>-1</sup> )	1,0
Comprim. de Onda (nm)	217 nm
Forno da Coluna	30°C
Volume de Injeção (µL)	20

Todos os pontos de cada curva de calibração e amostras de verificação da validação foram preparados a partir de soluções estoques preparadas na concentração de 1.000 µg.mL<sup>-1</sup>. Os métodos quantitativos foram validados observando figuras de mérito como linearidade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de quantificação e de detecção e análise de variância.

Para o preparo das amostras de extratos e frações que foram submetidas à análise por CLAE-UV, 1,0 mg de cada extrato e fração foi pesado e dissolvido em 1 mL de metanol grau HPLC. Posteriormente as amostras foram filtradas com membrana 0,22 µm e assim submetidas à análise.

### 3.7 - Ensaios biológicos com *Diabrotica speciosa*

O extrato bruto de *Psidium laruotteanum* foi ensaiado contra o inseto *D. speciosa* em colaboração com o Professor Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal – SP.

Nestes experimentos o inseticida sintético Fipronil foi utilizado como controle positivo; a testemunha foi realizada com água. Todos os ensaios foram realizados a temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\pm 10\%$  e fotoperíodo de 12 h.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Isolamento de microrganismos simbiotes de *Diabrotica speciosa*

Neste estudo, se trabalhou com a possibilidade de obtenção de diversas espécies de micro-organismos, uma vez que a microbiota intestinal representa um amplo aspecto de relação microbiana, tanto em termos de patógenos como de mutualismo. Sendo assim, algumas das placas inoculadas com as larvas, não apresentaram crescimento microbiano, em outras placas o isolamento foi realizado à medida que apareciam colônias de fungos ou bactérias. Fungos foram apenas isolados e preservados, porém não foram estudados. As placas que não apresentaram colônias microbianas se devem principalmente pelo tipo de meio de cultivo utilizado que, apesar de ser constituído de nutrientes universais, podem não atender de forma específica as necessidades nutricionais de algumas bactérias. Outro fator limitante, até o momento, é que em todas as placas de crescimento foram realizadas em condições aeróbicas. Os micro-organismos isolados até o presente momento bem como sua identificação, se encontra descritos na Tabela 4.1.

Até o presente momento foram extraídas e purificadas 56 bactérias (Tabela 4.1). Todos estes micro-organismos se encontram perfeitamente preservados para estudos futuros de caracterização, inibição antimicrobiana e avaliação do potencial biotecnológico. Foi observado que meio ágar nutriente e ágar batata dextrose foram os principais meios de isolamento para bactérias.

TABELA 4.1 - Codificação dos micro-organismos isolados.

<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Meio cultura</b>	<b>Código</b>	<b>Origem</b>	<b>Meio de cultura</b>
T1.1IT1	Larva (parte interna)	TSA	T9.1IN1	Larva (parte interna)	NA
T1.1IC1	Larva (parte interna)	Czpek	T9.1IN2	Larva (parte interna)	NA
T2.1IT1	Larva (parte interna)	TSA	T10.1IN1	Larva (parte interna)	NA
T2.1IT2	Larva (parte interna)	TSA	T10.1IB1	Larva (parte interna)	BDA
T2.1IC1	Larva (parte interna)	Czpek	T10.5IN1	Larva (parte interna)	NA
T2.1IN1	Larva (parte interna)	NA	T10.5IB1	Larva (parte interna)	BDA
T2.1IB1	Larva (parte interna)	BDA	T11.0EN1	Larva (parte externa)	NA
T3.1IN1	Larva (parte interna)	NA	T11.0EN2	Larva (parte externa)	NA
T3.1IB1	Larva (parte interna)	BDA	T11.1EB1	Larva (parte externa)	NA
T3.1IN2	Larva (parte interna)	NA	T11.1IN1	Larva (parte interna)	NA
T4.1IN1	Larva (parte interna)	NA	T11.1EN1	Larva (parte externa)	NA
T5.1IN1	Larva (parte interna)	NA	T11.3IN1	Larva (parte interna)	NA
T5.1IN2	Larva (parte interna)	NA	T11.3EN1	Larva (parte externa)	NA
T5.1IB1	Larva (parte interna)	BDA	T11.5IN1	Larva (parte interna)	NA
T5.1IC1	Larva (parte interna)	Czpek	T13.5IN1	Larva (parte interna)	NA
T5.1IT1	Larva (parte interna)	TSA	T13.5EN1	Larva (parte externa)	NA
T7.1.IN1	Larva (parte interna)	NA	T17.5IN1	Larva (parte interna)	NA
T7.1.IN2	Larva (parte interna)	NA	T17.5IN2	Larva (parte interna)	NA
T7.1.IN3	Larva (parte interna)	NA	T17.5IN3	Larva (parte interna)	NA
T7.1.IN4	Larva (parte interna)	NA	T21.1IN1	Larva (parte interna)	NA
T7.1.IB1	Larva (parte interna)	BDA	T21.1IN2	Larva (parte interna)	NA
T7.1.IB2	Larva (parte interna)	BDA	T21.1IN3	Larva (parte interna)	NA
T7.5.IN1	Larva (parte interna)	NA	T21.1IN4	Larva (parte interna)	NA
T7.5IN2	Larva (parte interna)	NA	T21.1IN5	Larva (parte interna)	NA
T7.5IN3	Larva (parte interna)	NA	T21.1EN1	Larva (parte externa)	NA
T8.1IN1	Larva (parte interna)	NA	T21.1IB1	Larva (parte interna)	BDA
T8.5IN1	Larva (parte interna)	NA	T21.5IN1	Larva (parte interna)	NA
T8.5IB1	Larva (parte interna)	BDA	T21.5IN2	Larva (parte interna)	NA

Entre os meios de cultivo selecionados para o crescimento microbiano foram escolhidos os:

- a) NA: meio complexo e não seletivo, é recomendado para crescimento de bactérias fastidiosa em geral. Sua característica de não seletividade faz com que uma gama de micro-organismos cresça neste meio. Portanto é um meio ideal para utilizar para isolamento de bactérias. Além disso, esse meio não é muito rico em nutrientes, o que não permitem que bactérias de crescimento rápido cresçam e inibam o crescimento de bactérias de crescimento lento;
- b) TSA: também um meio complexo e não seletivo recomendado para cultivo de bactérias. Esse meio é mais rico que o Ágar Nutriente e possui uma composição diferente que poderia viabilizar o crescimento de bactérias diferentes do que no NA;
- c) BDA: um meio de cultivo padrão, não seletivo e complexo recomendado para crescimento de fungos. Ele contém em sua composição, ingredientes diferentes dos meios anteriores, rico em polissacarídeos e pobre em peptídeos sendo, por isso, também foi utilizado para isolar bactérias e principalmente fungos;
- d) Cz: que é um meio quimicamente definido com poucos nutrientes e seletivo para micro-organismos que conseguem fixar nitrogênio, pois apresenta como única fonte nitrogênio inorgânico. Geralmente é recomendado para crescimento de fungos.

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

A coloração de Gram é um método de coloração de bactérias, desenvolvido em 1884, pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram. O método permite dividir as bactérias em dois grandes grupos: bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas devido à característica da parede celular desses micro-organismos<sup>59</sup>.



A parede celular de organismos procarióticos é uma estrutura rígida que mantém a forma característica de cada célula bacteriana. A estrutura é tão rígida que mesmo altas pressões ou outras condições físicas adversas raramente mudam a forma das células bacterianas<sup>60</sup>.

As paredes celulares não são estruturas homogêneas, mas são formadas por camadas de diferentes substâncias, que varia de acordo com o tipo de bactéria envolvida. Elas diferem em espessura e em composição. Estas diferenças ajudam a explicar alguns dos traços característicos das bactérias como a resposta à coloração de Gram e sua habilidade patogênica.

Entre as bactérias, as paredes celulares das espécies Gram negativas são geralmente mais finas (10-15 nm) que as das Gram positivas (20-25 nm). Nas Gram-positivas o principal componente da parede celular é o peptidoglicano que é um polímero poroso e insolúvel de grande resistência. O polímero chega a representar de 15 a 50% da massa seca da célula<sup>61</sup>. Este polímero pode diferir ligeiramente em composição química de uma espécie para outra, mas em sua estrutura básica contém três tipos de unidade estruturais: *N*-acetilglicosamina (NAG); ácido *N*-acililmurâmico (NAM) e um peptídeo formado de quatro resíduos de aminoácidos que contém alguns *D*-aminoácidos. Para formar a estrutura rígida ao redor da célula, os peptidoglicanos formam ligações cruzadas<sup>61</sup>.

Já nas bactérias Gram-negativas as paredes celulares são mais complexas. Possuem pouco peptidoglicano, sendo responsável por 10% da massa seca da célula e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos. O lipopolissacarídeo, por ser tóxico, também é conhecido por endotoxina podendo causar febres em animais, incluindo o homem<sup>61</sup>.

Nesta coloração, primeiramente é adicionado um corante púrpura cristal violeta junto com a solução de lugol. Esse procedimento visa deixar as células coradas com cor azulada. Quando a bactéria gram-negativa é

tratada com álcool (próxima etapa do procedimento), o lipídeo na membrana externa é dissolvido e removido. Isto rompe a membrana externa e aumenta sua permeabilidade. Assim, o complexo-corante é removido, na etapa de lavagem com água, descolorindo a bactéria gram-negativa que pode então, ser tingida com o corante de fundo safranina e, portanto adquirindo uma cor avermelhada. Em bactérias gram-positivas o etanol faz com que os poros no peptidoglicano se contraíam, e o complexo corante permaneça no interior da célula. Desse modo as gram-positivas permanecem na cor azul permitindo divisão das bactérias nestes dois grupos.

Deste modo, as bactérias isoladas foram caracterizadas de acordo com seu tipo de membrana celular, sendo os resultados descritos na Tabela 4.2. Além disso, essa técnica permite identificar o formato de algumas células por simples visualização no microscópio ótico Leica<sup>®</sup> com aumento da lente de 100<sup>o</sup> vezes.

TABELA 4.2 - Resultados da avaliação de Gram para as bactérias isoladas.

<b>Código</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Coloração de Gram</b>	<b>Forma da célula bacteriana</b>
T1.1IT1	TSA	A Gram (+)	Cocos
T1.1IC1	Czpek	A Gram (+)	
T2.1IT1	TSA	V Gram (-)	
T2.1IT2	TSA	V Gram (-)	
T2.1IC1	Czpek	V Gram (-)	
T2.1IN1	NA	V Gram (-)	
T2.1IB1	BDA	V Gram (-)	
T5.1IN1	NA	V Gram (-)	Bacilo
T5.1IB1	BDA	V Gram (-)	
T5.1IC1	Czpek	V Gram (-)	Cocos
T7.1IN1	NA	V Gram (-)	
T7.1IN2	NA	A Gram (+)	Bacilo
T7.1IN3	NA	A Gram (+)	Bacilo
T7.1IN4	NA	A Gram (+)	Bacilo
T7.1IB1	BDA	A Gram (+)	Bacilo
T7.1IB2	BDA	A Gram (+)	Bacilo
T7.5IN1	NA	V Gram (-)	Cocos
T7.5IN2	NA	A Gram (+)	
T7.5IN3	NA	V Gram (-)	Bacilo
T11.0EN1	NA	A Gram (+)	Cocos
T11.0EN2	NA	V Gram (-)	Bacilo
T11.1EB1	NA	A Gram (-)	Bacilo
T11.1IN1	NA	A Gram (+)	Cocos
T11.1EN1	NA	A Gram (+)	Cocos
T11.3IN1	NA	V Gram (-)	Bacilo
T11.3EN1	NA	V Gram (-)	

A morfologia de alguns micro-organismos não pode ser determinada devido a falta de resolução microscópica. As imagens das colônias e coloração de Gram podem ser observadas na Figura 4.1.

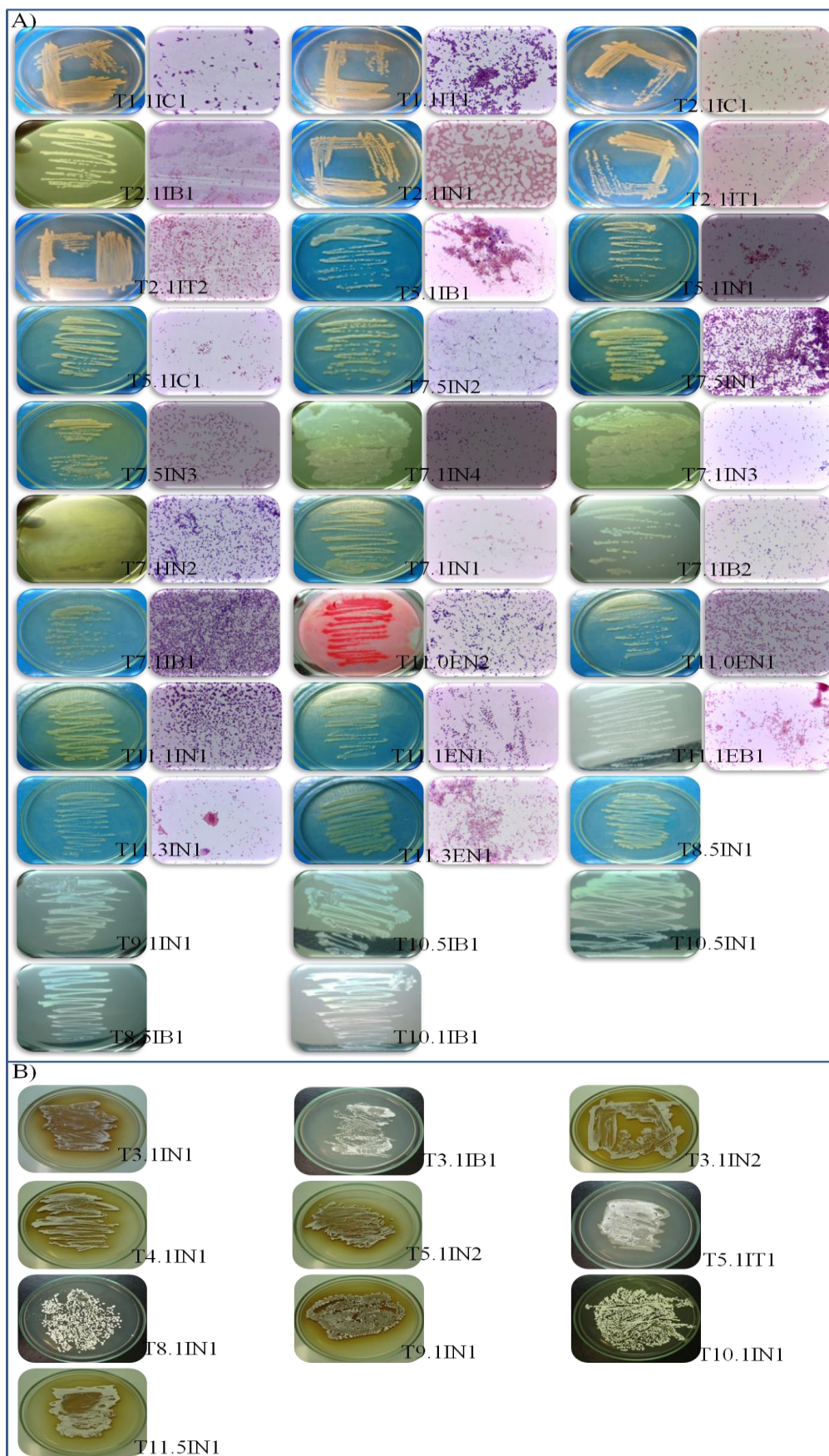


FIGURA 4.1 – A e B) Colônias e coloração de Gram para as bactérias isoladas de *Diabrotica speciosa*.

### **4.3 - Resultados da Avaliação dos procedimentos de Isolamento**

Insetos referentes ao Tratamento 11 foram submetidos a procedimentos de assepsia. O propósito deste estudo foi avaliar a eficiência das etapas de assepsia externa sem comprometer a viabilidade dos micro-organismos internos. Assim, se buscou um protocolo que eliminasse a viabilidade de micro-organismos externos (simbiontes ou não) onde a maioria seria proveniente do meio ambiente. Esta etapa ajudou a definir a origem microbiana – transferência vertical ou horizontal. Vale a pena destacar que, para um controle biológico eficiente do inseto praga, o alvo mais adequado seriam os micro-organismos de transmissão vertical. Pois provavelmente são simbiontes “universais” para a espécie de inseto em estudo. Se trabalharmos com micro-organismos de transmissão horizontal, poderíamos obter produtos naturais de controle não universais e sim seletivos a insetos que foram colonizados por uma determinada espécie microbiana específica de uma região.

Neste estudo foram avaliados a presença de simbiontes externos, obtidos pela simples lavagem do inseto em água, e de uma lavagem após os processos de limpeza com NaClO, avaliando a viabilidade de micro-organismos e a eficiência da assepsia. Também foram avaliados a viabilidade dos micro-organismos internos em decorrência do tempo de exposição ao NaClO. Um período longo pode inviabilizar o crescimento de colônias microbianas reduzindo a eficiência de extração e isolamento de novas cepas. A perda de novas cepas poderia acarretar no não isolamento de bons alvos microbianos para serem inibidos e, com resultado, na não identificação de bons produtos naturais para controle biológico do inseto praga sendo este, o principal objetivo desta linha de pesquisa.

Após o processo de isolamento, foi possível comparar os micro-organismos externos e internos para identificar os simbiontes presentes na

parte interna dos micro-organismos. Para auxiliar na interpretação dos dados, foram utilizados os espectros proteômicos gerados pelo MALDI – TOF – MS para cada bactéria.

A avaliação da relação entre a necessidade ou não de assepsia, como esperado, ficou evidente, já que a não assepsia proporciona a obtenção de uma grande quantidade extra de micro-organismos, que podem ser simbióticos ou não, presentes essencialmente na superfície externa do inseto. Na Figura 4.2 podemos observar que as placas que não passaram pelo procedimento de assepsia tiveram uma grande quantidade de micro-organismos e fungos apenas isolados da parte externa das larvas. Dificultando, assim, o isolamento dos simbiontes de interesse e por isso, ficou evidente a necessidade da assepsia para o isolamento de micro-organismos endossimbiontes.

Entre os tratamentos variando o tempo de exposição ao agente oxidante NaClO, 0, 1, 3 e 5 min, pode ser observada os seguintes resultados: Sem a realização da assepsia externa se pode observar o domínio de uma espécie de bactéria cultivada em ágar nutriente. Por outro lado, em meio BDA foi observada a presença e predomínio de fungos. Uma análise prévia indicou que este fungo apresenta características morfológicas e de cultivo similares a fungos isolados anteriormente.

Os ensaios com assepsia externa de 1 min ainda se pode observar a presença de fungos e bactérias. Fungos e bactérias foram encontrados em ambos os meios NA e BDA no isolamento interno do inseto após a assepsia com NaClO. No meio externo (suspensão aquosa) não foi observado à presença de fungos. Isto pode ter ocorrido em função da não total capacidade de esterilização para o tempo de 1 min, sendo apenas as partes mais expostas esterilizadas. Por outro lado, quando o inseto foi exposto a um tempo de 3 min, não houve mais o crescimento de fungos mantendo apenas o crescimento bacteriano. Isto indica serem as bactérias resistentes

ao tratamento, pois houve o crescimento de bactérias na suspensão aquosa mesmo após o tratamento (o mesmo ocorreu no tempo 5 min) e os fungos realmente presentes apenas na superfície externa do inseto.

Por outro lado, no tratamento de 5 min de exposição, novamente se observou o crescimento de fungos para isolamento interno. Uma hipótese é que estes fungos são simbiossiontes temporários (ou de transmissão horizontal) que tem seu crescimento inibido pelo desenvolvimento de bactérias. Com uma assepsia que pode ter promovido a inviabilização de algumas bactérias, agora estes fungos encontraram condições de se desenvolver. Mesmo assim, foi observada dificuldades de crescimento para o fungo, provavelmente ainda tendo seu desenvolvimento inibido pelas bactérias. A Figura 4.2 ilustra algumas placas de crescimento obtidas nestes experimentos. Como conclusão se definiu um processo de assepsia de 1 e 5 minutos em NaClO à 2% (m/v).

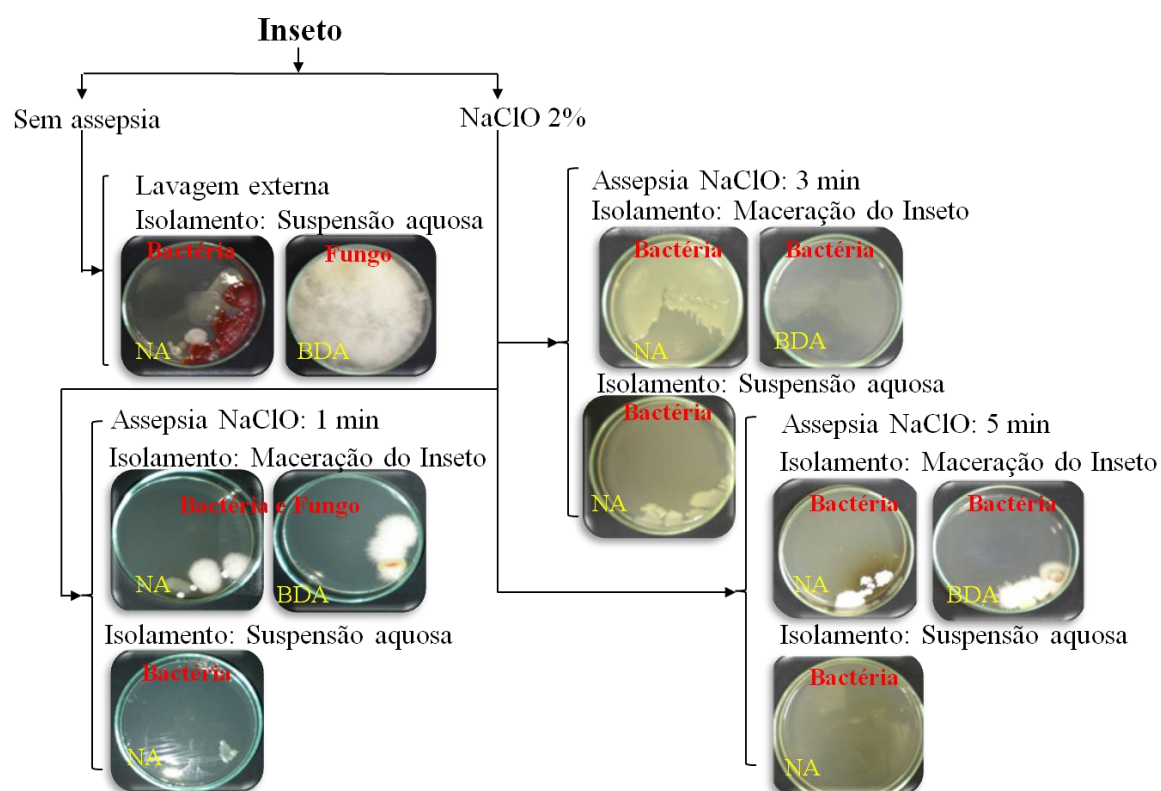


FIGURA 4.2 - Relação entre tempo de assepsia em hipoclorito de sódio e isolados microbianos.

#### **4.4 - Procedimentos de isolamento para avaliação da transmissão Vertical ou Horizontal**

De igual importância para o desenvolvimento de um novo mecanismo de inibição para controle populacional de insetos pragas, através do controle alimentar, é encontrar micro-organismos fundamentais que estão envolvidos nos processos de digestão e fornecimento de nutrientes para o inseto alvo. Assim, para o sucesso deste projeto é necessário identificar quais são os micro-organismos envolvidos nos processos alimentares e que são transferidos entre as gerações do inseto conhecidos por micro-organismos endossimbiontes de transmissão vertical. Micro-organismos de transmissão horizontal, ou seja, micro-organismos adquiridos pelo inseto através de contato com o meio ambiente, não se caracteriza como bom modelo de inibição, pois podem até ser comum entre gerações diferentes do inseto ou de insetos de mesma espécie, porém não são comuns em insetos de regiões distintas.

Com o propósito de identificar os endossimbiontes de transmissão vertical, uma série de experimentos foram realizados em um ciclo entre uma geração inteira do inseto *D. speciosa* criado sobre condições específicas de alimentação. Os tratamentos foram realizados em condições parciais, totalmente estéreis ou não estéreis. Permitindo uma maior precisão na avaliação da transferência vertical e a aquisição microbiana.

O tratamento inicial (T1 e T2) seccionou aleatoriamente os ovos de *D. speciosa* sendo uma parte esterilizada em solução de sulfato de cobre e outra não. Parte das lagartas eclodidas, de cada tratamento, foi congelada e enviada para extração dos micro-organismos e o restante delas foram mantidas em cativeiros de cultivo para sequência dos experimentos.

O  $\text{CuSO}_4$  tem conhecida atividade contra micro-organismos, principalmente fungos. Os tratamentos T1 e T2 envolveram lagartas recém-eclodidas, portanto tiveram o mínimo contato com o ambiente possível.



Desta forma, o objetivo foi eliminar os micro-organismos aderidos à superfície dos ovos já que a lagarta, ao eclodir, se alimenta dos ovos, e comparar com os micro-organismos presentes nos insetos de origem dos ovos não esterilizados.

No T2 foi possível obter 5 bactérias sendo duas no meio TSA (T2.1IT1 e T2.1IT2) e uma em cada meio utilizado (T2.1IB1, T2.1IN1 e T2.1IC1). As larvas, provenientes deste tratamento, tiveram o menor contato possível com o ambiente, assim, podemos sugerir que os MO isolados foram obtidos através da transmissão parental. Esses micro-organismos geralmente têm longa história evolutiva com seu hospedeiro, apresentando uma simbiose de contribuição positiva e mutua com seu hospedeiro e, portanto, são transmitidos de geração para geração, geralmente de mãe para filho. Esses simbiontes são muito interessantes para a proposta do trabalho, uma vez que eles não são adquiridos do ambiente podendo estar presentes em insetos da mesma espécie que vivem em ambientes diferentes. Do T1 foram isoladas 2 bactérias (T1.1IC1 e T1.1IT1) e 1 fungo. Estes micro-organismos foram mantidos como controle, já que passaram pelo procedimento de assepsia dos ovos. Todavia, não se pode descartar que as bactérias também fossem endossimbiontes, já que a larva não teve contato com o ambiente externo. Vale ressaltar que no tratamento 2 não foi isolado nenhum fungo o que mostra que o tratamento com  $\text{CuSO}_4$  eliminou este micro-organismo provavelmente aderido à parte externa do ovo.

Os tratamentos T3, T4 e T5 são de origem de ovos esterilizados sendo T3 e T4 de insetos cultivados em solo também estéril diferenciando de T5 onde o solo não foi submetido a procedimentos de assepsia. Foi possível isolar três bactérias em T3 (T3.1IN1, T3.1IN2 e T3.1IB1), uma em T4 (T4.1IN1) e cinco em T5 (T5.1IN1, T5.1IN2, T5B1, T5C1 e T5.1IT1). A T5.1IN2 e T5.1IT1 apresentaram considerável similaridade com T3.1IN1 e

T4.1IN1 sinalizando para serem uma única espécie microbiana. Além dos dados do MALDI – TOF – MS, elas também cresceram no mesmo meio e apresentaram a mesma semelhança morfológica. As larvas provenientes do tratamento 3 foram criadas em condições esterilizadas, portanto essas bactérias também foram consideradas um endossimbionte de transferência vertical. As bactérias T5.1IC1, T5.1IB1 e T5.1IN1 apresentaram um distanciamento significativo das bactérias de transmissão vertical podendo ser atribuída como transmissão horizontal. As larvas criadas nas condições do T5 entraram em contato com um solo não esterilizado, portanto entraram em contato com um número maior de micro-organismos no ambiente do que os outros dois tratamentos. Por isso um maior número de bactérias isoladas neste tratamento em relação ao tratamento 3 e 4.

O micro-organismo T3N1 foi isolado do meio Czapek e repicado para Ágar Nutriente. Ao mudar o meio de cultura os aspectos morfológicos do isolado foram modificados como podemos observar na Figura 4.3. Isso pode ter ocorrido, pois o meio Czapek é um meio quimicamente definido e pobre em nutrientes o que limita o desenvolvimento bacteriano. Quando repicada para o NA, a bactéria teve metabolismo ativado de forma diferente excretando diferentes produtos.

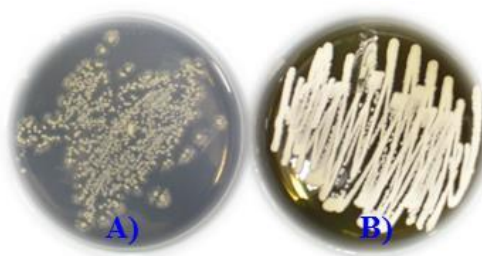


FIGURA 4.3 - Bactéria T3N1 cultivada em a) Czapek e b) Nutriente Agar.

O T7 apresentou como diferença o uso de sementes das plantas tratadas com um fungicida. Esta etapa buscou inibir o desenvolvimento de fungos durante as etapas de cultivo vegetal e identificar possíveis rotas de

transmissão horizontal de bactérias nos isolamentos. Ou, seja, o fungicida não inibe o crescimento de possíveis bactérias associadas a plantas. Essas bactérias podem ser adquiridas pelo inseto através da alimentação e serem mantidas como simbioses fruto de uma transmissão horizontal. Foram obtidos 9 isolados do tratamento 7 (T7.1IN1, T7.1IN2, T7.1IN3, T7.1IN4, T7.1IB1, T7.1IB2, T7.5IN1, T7.5IN2 e T7.5IN3).

No T8 foram obtidos três isolados, T8.1IN1, T8.5IN1 e T8.5IB1. As características morfológicas do T8.1IN1 são semelhantes as bactérias isoladas no tratamento 3 e 4 (Figura 4.1 B) indicando ser a mesma espécie de micro-organismo. Apesar do ovo não ter passado pela assepsia, a larva foi criada em ambiente estéril (solo e semente esterilizadas), portanto os isolados deste podem ser de transmissão vertical.

Nos T9 e T10 foram obtidos seis isolados (T9.1IN1, T9.1IN2, T10.1IN1, T10.1IB1, T10.5IN1 e T10.5IB1). O isolado T9.1IN1 e T10.1IN2 apresentaram características semelhantes dos isolados no tratamento 3 e 4. Nesses tratamentos a larva não foi criada em ambiente totalmente estéril, portanto os micro-organismos isolados podem ser de transmissão vertical ou horizontal.

O T11 foi o tratamento controle do experimento, ou seja, os insetos foram criados em condições totalmente não assépticas. Nestas condições os insetos tiveram contato com todos os tipos de micro-organismos presentes desde a casca do ovo, solo e alimentação. Este tratamento possibilitou o isolamento de 7 cepas (T11.0EN1, T11.0EN2, T11.1EB1, T11.1IN1, T11.1EN1, T11.3IN1 e T11.3EN1). As bactérias isoladas do tratamento 11 apresentaram rápido crescimento. As colônias precisam apenas 24 h para se desenvolverem em meio sólido. O isolado T11.0EN2 tem uma coloração avermelhada, bastante pigmentada, enquanto os outros isolados possuem uma coloração levemente amarelada.

#### **4.5 - Agrupamento microbiano por caracterização de biomoléculas através do uso da técnica MALDI – TOF – MS**

Os micro-organismos endossimbiontes do trato digestivo podem desempenhar uma importante função na manutenção da saúde ou atribuir doenças ao hospedeiro. É um grupo heterogêneo e, portanto, a taxonomia tem sido extensivamente modificada. Todavia, é fundamental que o microbioma seja corretamente identificado podendo associar sua presença com comportamentos fisiológicos e sociais do hospedeiro a que pertence. Deste modo, para saltos tecnológicos e de conhecimento biológico, novas ferramentas de identificação e classificação de um microbioma são a cada dia, mais solicitados. Como exemplo da necessidade de uma correta classificação microbiana, ainda hoje, os conceitos e definições de espécies procariontes continuam a ser debatidas. Inovações e desenvolvimentos são essenciais para desenvolver essas novas metodologias aumentando os níveis de sensibilidade, resolução e confiabilidade<sup>62</sup>. Neste contexto, entra a técnica de caracterização microbiana por MALDI – TOF – MS (do inglês: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Coupled with Time-Of-Flight Mass Spectrometry*). Esta técnica aplicada a sistemáticas microbiológicas é um campo de investigação emergente com aplicações promissoras em estudos da diversidade microbiológica de identificação e agrupamento. Em microbiologia, estas definições podem ser aplicadas a determinação de fenótipos, serotipos, patotipos, ecotipos, genótipos, *etc.*

O MALDI – TOF – MS utiliza um princípio de ionização branda, possibilitando detectar biomoléculas com peso molecular entre 2-130 kDa, sendo uma ferramenta difundida para análises de proteínas, oligopeptídeos e outros. Muitos avanços recentes do uso do MALDI – TOF – MS têm sido no campo da proteômica<sup>63</sup>, onde tem uma alta capacidade de

processamento e análise de proteínas permitindo identificar uma grande diversidade destas macromoléculas.

A aplicação de análises químicas de micro-organismos tem sido explorada por muitos anos. Tentativas prévias foram realizadas por espectrometria de massa para a caracterização de micro-organismos através do perfil de lipídeos polares<sup>64,65</sup>. Este tipo de análise provou ser útil para caracterização de níveis de gêneros e espécies, contudo, a abordagem espectral foi limitada para habilidade de analisar espectros de massas de biopolímeros ao redor de 1.000 Da<sup>66</sup>. O desenvolvimento das técnicas de ionização MALDI<sup>67,68,69</sup> e ionização por eletrosspray<sup>70,71</sup> permitiu a caracterização dos biopolímeros de alta massa molecular. Tornando a técnica rápida para uma análise de biomoléculas e complexos macromoleculares, por exemplo proteínas. A aplicação de uma matriz cristalizante com uma adsorção branda, provou ser uma estratégia essencial para preservação da integridade das moléculas durante os procedimentos analíticos. Uma matriz de cristal absorve energia fotônica de um laser de nitrogênio, efetuando uma ionização suave de grandes biomoléculas e, ao mesmo tempo, mantendo-as intactas<sup>72</sup>. Além disso, o laser provoca a lise das células do micro-organismo liberando as biomoléculas na matriz permitindo, assim, uma análise rápida já que as células são diretamente aplicadas na placa de análise. Esses princípios são as principais vantagens do MALDI – TOF – MS na caracterização do perfil protéico e, conseqüentemente, na caracterização e agrupamento de micro-organismos.

Uma limitação ainda hoje para uso do MALDI – TOF – MS na identificação microbiana são as bases de dados que ainda são limitadas em quantidade e em número de dados de referência. Assim, este projeto irá também contribuir para a construção e enriquecimento de uma biblioteca de referência para identificações rápidas de bactérias e fungos por MALDI – TOF – MS.

Até o presente momento, as análises por MALDI – TOF – MS possibilitou a identificação em nível de gênero para a maioria dos micro-organismos isolados. Além disso, através da similaridade dos espectros de massas se podem determinar a relação filogenética entre os micro-organismos. A Figura 4.4 ilustra o procedimento geral para caracterização taxonômica.

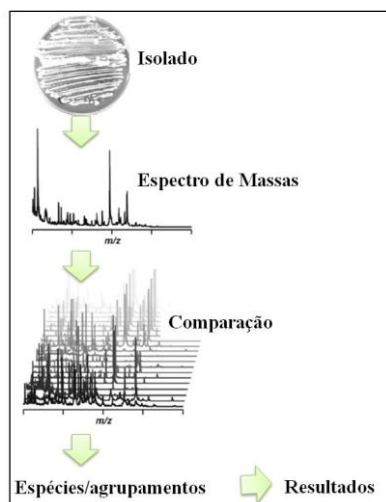


FIGURA 4.4 - Esquema geral para identificação/agrupamento de micro-organismos por MALDI – TOF – MS.

A aplicação da matriz de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em solução sobre o poço da placa de ionização contendo as células microbianas promoveu, após secagem do solvente, a formação homogênea contendo as biomoléculas num processo de cocristalização. Esta matriz pode então ser utilizada para análises dos micro-organismos e para uma ampla extensão de compostos, por exemplo, proteínas, peptídeos, lipídeos, carboidratos, *etc.*

Um essencial pré-requisito para identificação exata de amostras microbianas é a necessidade da inclusão de dados de referência na base de dados.

Uma vez finalizada a sequência de aquisição dos sinais brutos dos espectros de massas, estes foram processadas aplicando um “*smoothing*”, correção da linha de base e reconhecimento de picos. Como resultado, para comparação dos espectros de massas, diferentes critérios como presença ou

ausência de picos podem ser adotados. As informações essenciais utilizadas para a identificação microbiana foi o número de pico, a lista de valores de picos de relação  $m/z$  e suas intensidades a partir do espectro de massas chamado “*fingerprint*”. Este “*fingerprint*” foi então analisado por comparação possibilitando o agrupamento das espécies microbianas. A faixa de relação *massa/carga* utilizado foi de 2-20 kDa e um critério mínimo de 25% de frequência para participação no espectro principal “*MSP*” foi utilizado. Esse range de massa foi escolhido, pois é a região na qual se encontram as moléculas ribossomais que são características de cada gênero e espécie permitindo um maior nível de confiança na identificação dos micro-organismos. O número de picos foi suficiente para gerar um modelo de picos taxonômico específico que pode ser utilizado para construção computacional de um gráfico de agrupamento das espécies. A Figura 4.5 demonstra o gráfico de Dendograma de *MSP* obtido pelo agrupamento dos dados de massas para os micro-organismos isolados de *D. speciosa*. A Figura 4.6 ilustra alguns espectros de massas referentes ao micro-organismo T7.1IB1 sendo possível observar que cada replicata o espectro de massas apresentou picos bem definidos e reproduzíveis.

A análise dos “*fingerprints*” e, conseqüentemente, do Dendograma de *MSP* de agrupamento dos resultados do MALDI – TOF – MS indiretamente se refere a uma caracterização genotípica dos micro-organismos procariotos aqui investigados.

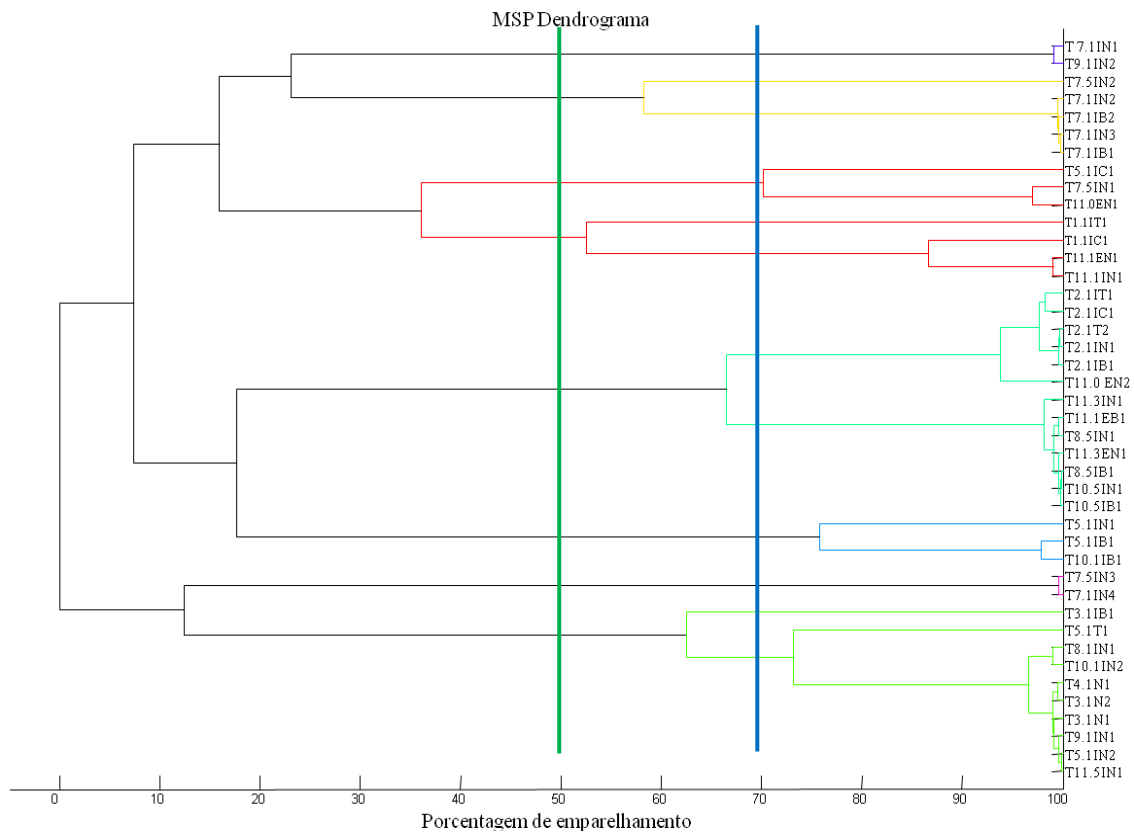


FIGURA 4.5 – Dendrograma de *MSP* de todas as cepas microbianas isoladas nos tratamentos de avaliação da transmissão microbiana vertical ou horizontal.

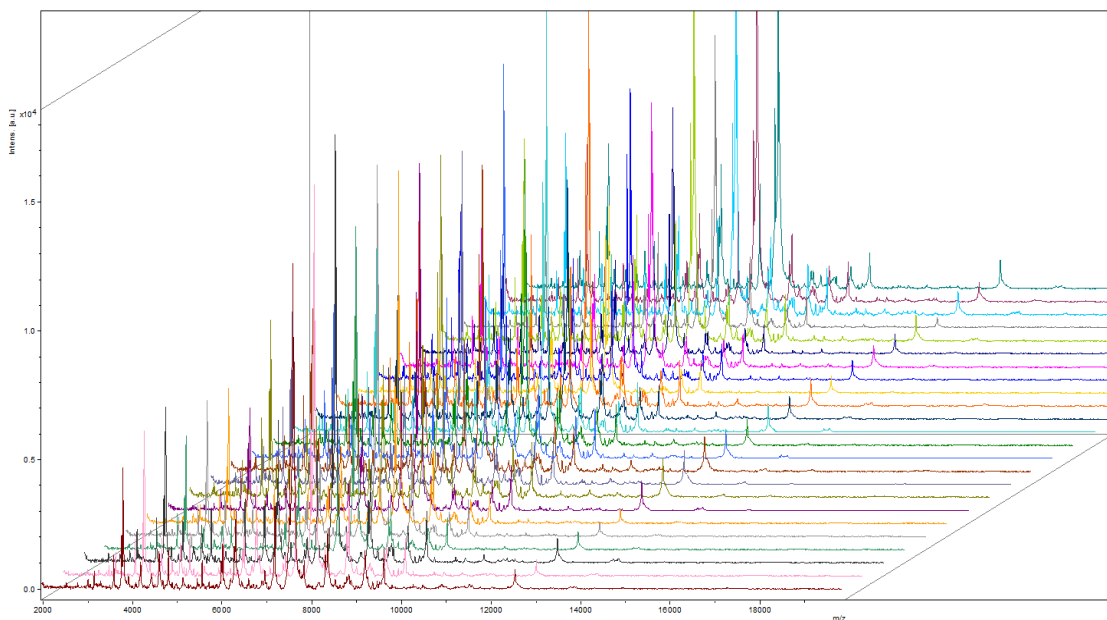


FIGURA 4.6 - Espectros de massa MALDI I-TOF-MS do isolado T7.11B1 de *D. speciosa*.

A análise do gráfico de Dendrograma de *MSP* para as amostras de estudo da transmissão vertical ou horizontal (Figura 4.5) permitiu identificar 8 agrupamentos de sinais com similaridade nos espectros de



massas menor que 50% (linha verde Figura 4.5) sinalizando para a existência de pelo menos 8 espécies microbianas diferentes.

Por outro lado, o conjunto de espécies similares que compartilham mais que 70% (linha azul Figura 4.5) de sinais de massas elevam o número de espécies para pelo menos 12 diferentes tipos de micro-organismos a um nível de confiança de gênero. As 45 bactérias isoladas entre os T1-T11, parecem se agrupar em 12 grupos.

A Tabela 4.3 mostra o resultado da comparação dos espectros de massas obtido para cada isolado com a base de dados do equipamento. Também podemos observar a separação de cada isolado em seus respectivos grupos respeitando a linha azul da Figura 4.5.

Podemos observar na Tabela 4.3 que os isolados obtidos no tratamento 2 foram identificados como pertencente ao mesmo gênero de bactéria. Assim, podemos dizer, pelas características deste tratamento (item 3.2.6) que as cepas de *Serratia sp* foram encontradas no primeiro instar larval de *Diabrotica speciosa*. Essas lagartas não tiveram contato com o meio externo, portanto podemos sugerir que os isolados estavam presentes dentro do ovo e foi transmitido verticalmente, através da geração parental. Esse gênero pertence à família das Enterobacteriaceae. Muitos dos simbiontes bacterianos conhecidos que desempenham um papel na nutrição dos insetos pertencem a essa família<sup>73</sup>. Além disso, esse gênero já foi isolado do intestino de *Diabrotica virgifera*<sup>74,75</sup>, no primeiro e segundo instar larval da mosca *Tetanops myopaeformis*<sup>76</sup> e de besouros (*Harpalus pensylvanicus* e *Anisodactylus sanctaecrucis*)<sup>73</sup>. Também foi relatado exemplo de transmissão vertical de *Serratia marcescens*. A espécie foi encontrada dentro de ovos da lagarta da espiga do milho *Heliothis zea*<sup>77</sup> e da lagarta da maçã *Heliothis virescens*<sup>78</sup>. Corroborando, portanto, com os resultados deste trabalho.

Muitas espécies deste gênero tem um papel importante como endossimbionte de insetos. No cupim *Zootermopsis angusticollis* a *Serratia grimesii* possui um papel importante para sobrevivência do inseto. Ela fornece o 5-formil-tetrahidrofolato, um precursor necessário para outro endossimbionte *Treponema primitia* se desenvolver. A *T. primitia* é responsável por fornecer nitrogênio e acetato, a principal fonte de carbono e energia dos cupins<sup>79</sup>. Também de cupins, foi isolada *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Essas são bactérias anaeróbicas facultativas e por isso são importantes para manter o nível de oxigênio baixo no intestino dos cupins. Criando um ambiente anaeróbico ideal para as bactérias (anaeróbicas obrigatórias) que degradam a celulose ingerida pelo inseto<sup>73</sup>.

Podemos observar que no grupo 7, além dos isolados obtidos do tratamento 2 também foi isolado *Serratia sp* no tratamento 11. Porém, como é possível observar na Figura 4.1, essa cepa possui características morfológicas diferentes da cepa isolada no T2. Sendo a coloração vermelhada sua principal característica. Além disso, essa cepa foi isolada da parte externa das larvas (T11.0EN2), indicando assim que essa cepa foi adquirida no ambiente.

Podemos observar na Figura 4.5 que o grupo 8 se encontra em um nível de similaridade alto, pouco mais de 65%, do grupo 7. A comparação dos espectros com a base de dados do equipamento indicou esses isolados como *Enterobacter sp*. Portanto esses isolados pertencem à mesma família (Enterobacteriaceae) do gênero *Serratia*, por isso um grau de semelhança tão alto no Dendograma de *MSP*. Essas bactérias também são amplamente distribuídas no ambiente e isoladas como simbiote de insetos, a *E. cloacae* é a espécie mais frequente no intestino dos insetos<sup>80</sup>. Foi relatada *Enterobacter sp* em mosca de fruta *Anastrepha ludens*, *Dacus tryoni* e *Dacus Jarvisi*<sup>81,82</sup> e de besouro *Dendroctonus valens*<sup>83</sup>. A *Enterobacter sp* também foi relatada em *Diabrotica virgifera*<sup>74,75</sup>. LAUZON et al.<sup>84</sup> relatou

*Enterobacter agglomerans* obtida na superfície de ovos da mosca *Ceratitis capitata*. Indicando uma possível transmissão vertical. Essa bactéria foi isolada dos tratamentos 8, 10 e 11. Todos não tiveram a superfície do ovo esterilizada. Portanto indica que essa bactéria foi transmitida verticalmente. Cepa de *Enterobacter sp* isolada de solo<sup>85</sup> mostrou capaz de degradar inseticidas. Portanto, embora não tenha sido inicialmente relatada como endossimbionte de insetos, é um candidato para metabolizar os inseticidas frequentemente encontrados por alguns besouros em agroecossistemas<sup>73</sup>.

Os grupos 4 e 5 foram identificados com o mesmo gênero *Acinetobacter*. Esse gênero é amplamente distribuído no ambiente encontrado em solos<sup>86</sup>, rizosfera<sup>87</sup> e insetos<sup>88,89,90,91</sup>. O isolado do tratamento 1 (grupo 5) foi obtido do primeiro instar larval indicando uma possível transmissão vertical. Existem relatos de *Acinetobacter sp* isoladas de ovos e do primeiro instar larval da broca européia do milho *ostrinia nubilalis*<sup>92</sup>. Já os isolados do grupo 4 pertencem aos tratamentos 5, 7 e 11, esses tratamentos não foram totalmente esterilizados, portanto os isolados podem ter sido adquiridos do ambiente. Indicando, assim, que esses isolados podem ser de espécies distintas e transmitidos horizontalmente.

Bactérias pertencentes ao gênero *Stenoprophomonas* são amplamente distribuídas no ambiente. Muitas espécies de *Stenotrophomonas*, como *S. maltophilia* e *S. rhizophila* se relacionam de forma benéfica com plantas<sup>93</sup>. Existem relatos de isolamento em insetos<sup>80,94,95</sup>. Os isolados T7.1IN1 e T9.1IN2 foram obtidos de dois tratamentos cuja a semente de plantas não foram tratadas com  $\text{CuSO}_4$ , o que sugere que esses isolados foram adquiridos através das plantas numa transmissão horizontal.

TABELA 4.3 - Identificação a nível de Gênero pela comparação dos *MSPs* dos isolados com a base de dados (MALDI Biotyper, versão 3.1) do equipamento.

Grupo	Bacteria	Gênero
1	T7.1IN1	<i>Stenotrophomonas</i>
	T9.1IN2	<i>Stenotrophomonas</i>
2	T7.5IN2	<i>Pseudomonas</i>
3	T7.1IN2	Não identificada
	T7.1IB2	Não identificada
	T7.1IN3	Não identificada
	T7.1IB1	Não identificada
4	T5.1IC1	<i>Acinetobacter</i>
	T7.5IN1	<i>Acinetobacter</i>
	T11.0EN1	<i>Acinetobacter</i>
5	T1.1IT1	<i>Acinetobacter</i>
6	T1.1IC1	Não identificada
	T11.1EN1	Não identificada
	T11.1IN1	Não identificada
7	T2.1IT1	<i>Serratia</i>
	T2.1IC1	<i>Serratia</i>
	T2.1IT2	<i>Serratia</i>
	T2.1IN1	<i>Serratia</i>
	T2.1IB1	<i>Serratia</i>
	T11.0EN2	<i>Serratia</i>
8	T11.3IN1	<i>Enterobacter</i>
	T11.1EB1	<i>Enterobacter</i>
	T8.5IN1	<i>Enterobacter</i>
	T11.3EN1	<i>Enterobacter</i>
	T8.5IB1	<i>Enterobacter</i>
	T10.5N1	<i>Enterobacter</i>
	T10.5IB1	<i>Enterobacter</i>
9	T5.1IN1	<i>Ochrobactrum</i>
	T5.1IB1	Não identificada
	T10.1IB1	Não identificada
10	T7.5IN3	<i>Sphingobacterium</i>
	T7.1IN4	<i>Sphingobacterium</i>
11	T3.1IB1	Não identificada
12	T5.1IT1	Não identificada
	T8.1IN1	<i>Streptomyces</i>
	T10.1IN2	<i>Streptomyces</i>
	T4.1IN1	Não identificada
	T3.1IN2	Não identificada
	T3.1IN1	Não identificada
	T9.1IN1	<i>Streptomyces</i>
	T5.1IN2	Não identificada
	T11.5IN1	Não identificada

Também do tratamento 7 foi obtido cepas com similaridade ao gênero *Pseudomonas*. Os grupos 2 e 3 contem isolados obtidos do mesmo tratamento. A similaridade entre eles é próxima a 60%, indicando que sejam do mesmo gênero, assim, apesar dos isolados, do grupo 3, não terem sido identificados, podemos considerar que eles pertençam ao gênero *Pseudomonas*. Embora existam vários relatos de *Pseudomonas sp* isoladas de insetos<sup>74,75,82</sup> esse gênero é mais comumente encontrado associado a plantas<sup>96,97,98,99,100</sup>. Por pertencerem ao tratamento 7, os isolados terem sido adquiridos pela larva através do ambiente (transmissão horizontal).

Finalizando o tratamento 7, os isolados do grupo 10 (Tabela 4.3) apresentaram similaridade de seus espectros de massas com bactérias do gênero *Sphingobacterium*. Existem alguns trabalhos na literatura de isolamento de *Sphingobacterium sp* do intestino de insetos<sup>101,102</sup>. Mas é mais comum encontrar esse gênero no solo e associado a plantas<sup>103,104,105</sup>. Sendo isolado do tratamento 7, indica que é adquirido através da transmissão horizontal.

No grupo 9 foi obtido bactérias cuja similaridade dos espectros de massa indicaram sendo pertencentes ao gênero *Ochrobactrum*. Apesar de dos isolados T5.1IB1 e T10.1IB1 não terem tido um nível de similaridade seguro para ser identificada na base de dados, sua similaridade com a T5.1IN1 no dendograma é alta sugerindo que as três pertencem ao mesmo gênero. Bactérias pertencentes a esse gênero foram relatadas em isolamento de solos<sup>106,107,108</sup>. Sabendo que os dois tratamentos (T5 e T10) não tiveram seu solo esterilizado, podemos sugerir que essa bactéria foi adquirida do meio externo, sendo uma transmissão horizontal.

Os isolados do grupo 12 foram obtidos de diversos tratamentos. Entre eles o Tratamento 3 em que a larva foi criada em ambiente esterilizado. Apesar de várias bactérias não terem sido seguramente identificadas, sua alta similaridade mostrada na Figura 4.1B junto com a

observação das mesmas características morfológicas consideramos os isolados sendo do mesmo gênero. Com isso podemos sugerir que as bactérias isoladas são simbiontes do inseto e provavelmente transmitidas verticalmente. Embora pouco estudadas, existem exemplos, relatados na literatura, de *Streptomyces sp* que foram isoladas de insetos<sup>109,110,111</sup>. Mas o exemplo mais bem descrito é de *Streptomyces sp* isoladas de formigas que são transmitidas verticalmente<sup>112</sup>. O gênero *Streptomyces* tem grande importância biotecnológica uma vez que são conhecidas por produzirem diversos metabólitos secundários como antifúngicos e antibióticos<sup>111,112</sup>.

#### **4.6 - Avaliação das metodologias de atividade bactericida**

Um composto químico para ser considerado um agente (quimioterápico) ideal para utilização no tratamento microbiano deve apresentar algumas características como: ser capaz de destruir ou inibir muitas espécies de micro-organismos (antibiótico de largo espectro); inibir os micro-organismos de tal maneira que evite o desenvolvimento de formas resistentes, não produzir efeitos colaterais indesejáveis (em nosso caso não ser, por exemplo, fitopatógeno) e não eliminar micro-organismos benéficos como micro-organismos da rizosfera. Este potencial biocida deve então ser cuidadosamente avaliado.

Um ensaio biológico, geralmente se baseia na comparação da atividade antimicrobiana do material em avaliação com uma preparação padrão e é realizado sob condições precisamente padronizadas. Deste modo, a quantidade do antibiótico em uma amostra “desconhecida” é determinada comparando-se a sua atividade antimicrobiana com aquela de um antibiótico padrão de concentração conhecida.

Todavia, diversos são os fatores que podem influenciar a suscetibilidade de um método para estudo da atividade biocida. Por exemplo, solubilidade, capacidade de difusão, adsorção, estabilidade, etc., são fatores que podem comprometer o sucesso de um ensaio biológico.

Uma análise prévia feita pelo grupo mostrou que os ensaios de microdiluição em caldo utilizando placas de ELISA<sup>®</sup> apresentaram melhores resultados frente aos ensaios de poço em dupla camada, poço convencional e disco em placa.

Para a execução do ensaio bactericida por técnicas espectrofotométricas, a técnica de fluorescência foi selecionada por possibilitar a identificação seletiva de um corante, a resazurina. Este composto, quando degradado por enzimas microbianas apresenta uma emissão de fluorescência em  $\lambda_E$  590nm.

O desenvolvimento deste procedimento se deu de modo qualitativo e quantitativo. Os ensaios qualitativos se mostraram uma poderosa ferramenta para “*Screening*” de potenciais extratos com atividades antimicrobianas. Esta ferramenta foi aplicada para todas as amostras vegetais coletadas no cerrado da UFSCar (Tabela 3.3).

Os controles positivo (tetraciclina), negativo (testemunha), de DMSO e esterilidade foram utilizados no procedimento quantitativo para dar confiabilidade a técnica. O controle esterilidade garante a não contaminação dos poços durante o experimento. O controle positivo de tetraciclina garante que o inóculo utilizado estava em uma concentração sensível à antibacterianos. Através do controle negativo é possível comprovar a viabilidade das células bacterianas. O controle de DMSO comprova a não interferência do DMSO 2,5% (v/v) na inibição do crescimento bacteriano.

No modo qualitativo se observa a variação da cor no meio de crescimento microbiano, na presença ou não dos agentes antimicrobianos. O indicador de crescimento microbiano, o corante resazurina, na presença de células bacterianas é submetido a uma reação redox (Figura 4.7), modificando assim sua coloração.

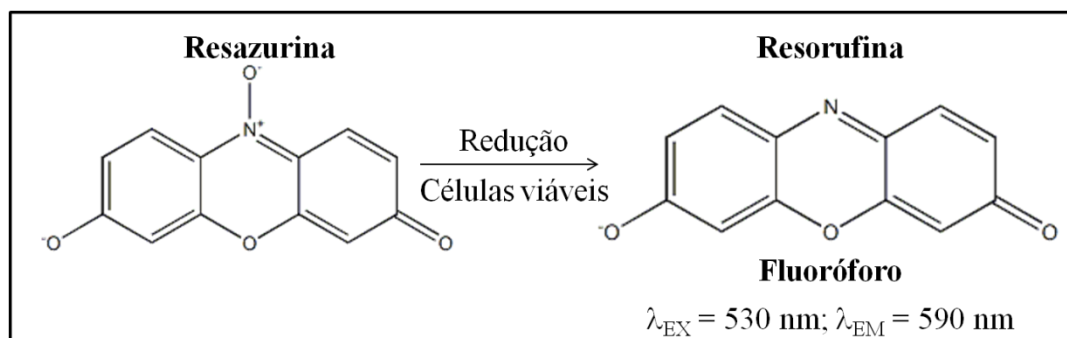


FIGURA 4.7 - Proposta de oxidação da resazurina em resorufina como resultado do crescimento de células microbianas viáveis.

Essa reação é mediada por enzimas oxiredutases presentes nas células viáveis, sendo assim, a redução (Figura 4.7) da resazurina (azul) para resorufina (rosa) indica presença de células viáveis e consequentemente o crescimento microbiano. Como pode ser observado na Figura 4.8, os extratos da coluna 2, 3, 8, 9 e 11 não apresentaram inibição do crescimento bacteriano. Por sua vez, o isolado apresentou sensibilidade aos extratos da coluna 1, 4, 5, 6, 7 e 10. Temos o controle positivo na coluna 12, mostrando a sensibilidade do isolado contra o antibiótico. O controle negativo (início da linha G) que mostra o crescimento normal bacteriano mesmo na presença de DMSO. E o controle esterilidade (final da linha H) que mostra a não contaminação da placa durante o experimento.





FIGURA 4.8 – Exemplo de avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana em placas de Elisa® investigando a inibição da atividade da enzima oxireductase sobre o corante resazurina.

Este ensaio foi aplicado para os micro-organismos e extratos. Estes resultados estão ilustrados a seguir. Os ensaios realizados foram conduzidos contra bactérias diversas, cada uma representando um diferente agrupamento obtido nas análises por MALDI – TOF – MS. A Figura 4.9 ilustra as colorações obtidas nos ensaios bem como os controles utilizados na avaliação qualitativa. Os extratos possuem colorações específicas que podem confundir a análise visual da cor gerada pela resazurina. Por exemplo, alguns extratos de coloração amarelada forte podem, ao entrar em contato com a resazurina, formar uma cor verde ou laranja dependendo da oxidação da resazurina, não assumindo a cor natural da resazurina (azul ou rosa). Assim, cada vez que os ensaios foram realizados, duas placas controle foram montadas com o objetivo de minimizar possíveis erros experimentais. Essas placas foram montadas apenas colocando o extrato em contato com a resazurina oxidada (azul) ou reduzida pela bactéria (rosa). Com estas placas (Figura 4.9A e B) foi possível verificar qual cor a mistura extrato com resazurina seria obtida sem a presença de bactéria e qual cor essa mistura emitiria na presença de bactéria.

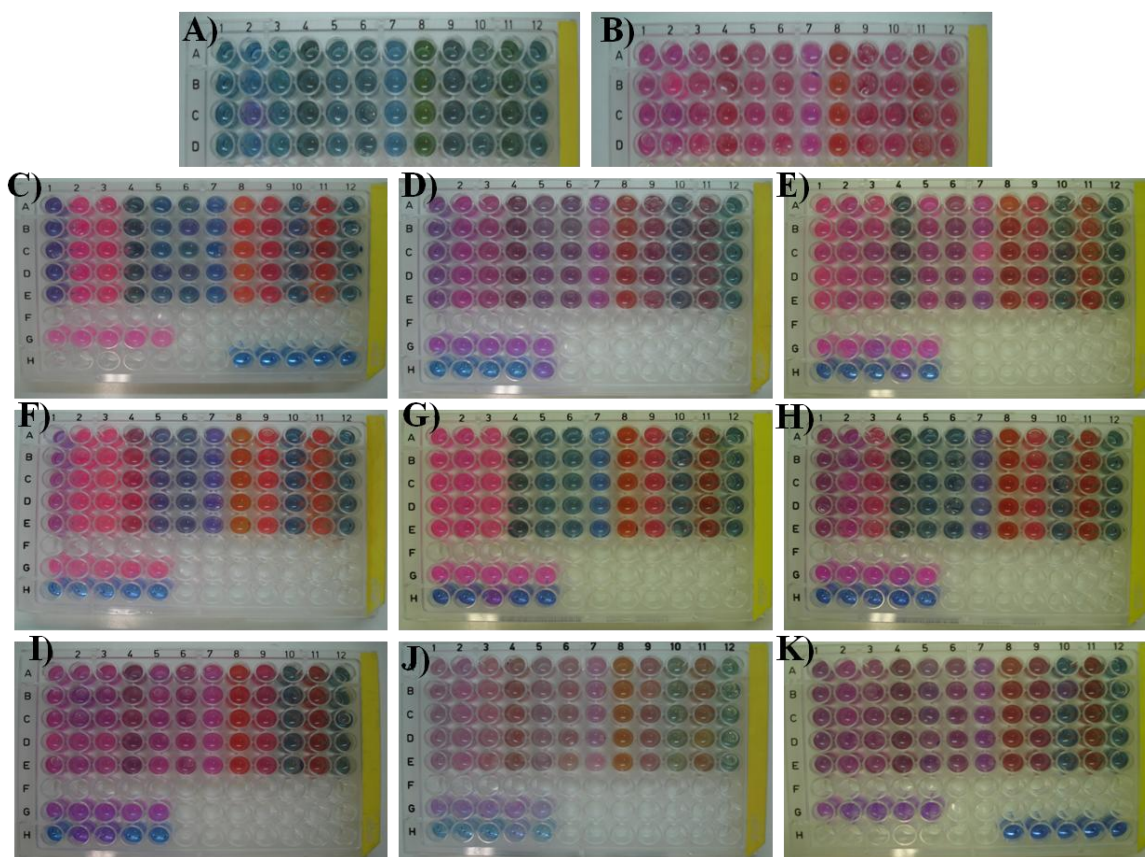


FIGURA 4.9 - Ilustração dos resultados dos ensaios qualitativos para identificação de extratos vegetais (E1 a E11) com potencial antimicrobiana contra bactérias de *D. speciosa*. A) Controle de Resazurina oxidada; B) Controle com resazurina reduzida; Ensaio com as bactérias: C) T1.1IC1; D) T2.1IN1; E) T5.1IC1; F) T7.1IN2; G) T7.1IN4 e H) T7.5IN2; I) T8.5IN1; J) T10.5IN1; K) T11.3IN1.

É possível observar na Figura 4.10 em quais poços da placa de ELISA<sup>®</sup> foram adicionados os extratos E1 a E11 (Tabela 3.3) nas placas controles (Figura 4.9A e B).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
B	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
C	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
E												
F												
G												
H												

FIGURA 4.10 - Montagem das placas controles para os extratos: E1 a E11; CP = controle positivo (Tetraciclina).

Na Figura 4.11 é possível observar a confecção dos extratos E1 a E11 na placa de ELISA<sup>®</sup> utilizadas para os ensaios.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
B	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
C	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
D	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	CP
F												
G	CD	CD	CD	CD	CD							
H	CE	CE	CE	CE	CE			CE	CE	CE	CE	CE

FIGURA 4.11 - Distribuição de extratos (E1 a E11) nas placas ensaiadas com os isolados. Legenda: CP: controle positivo (Tetraciclina); CD: Controle DMSO; CE: Controle esterilidade.

Por conta da limitação de 96 poços para cada placa. O restante dos extratos foram ensaiados em outras placas de ELISA. Os resultados são mostrados na Figura 4.12.

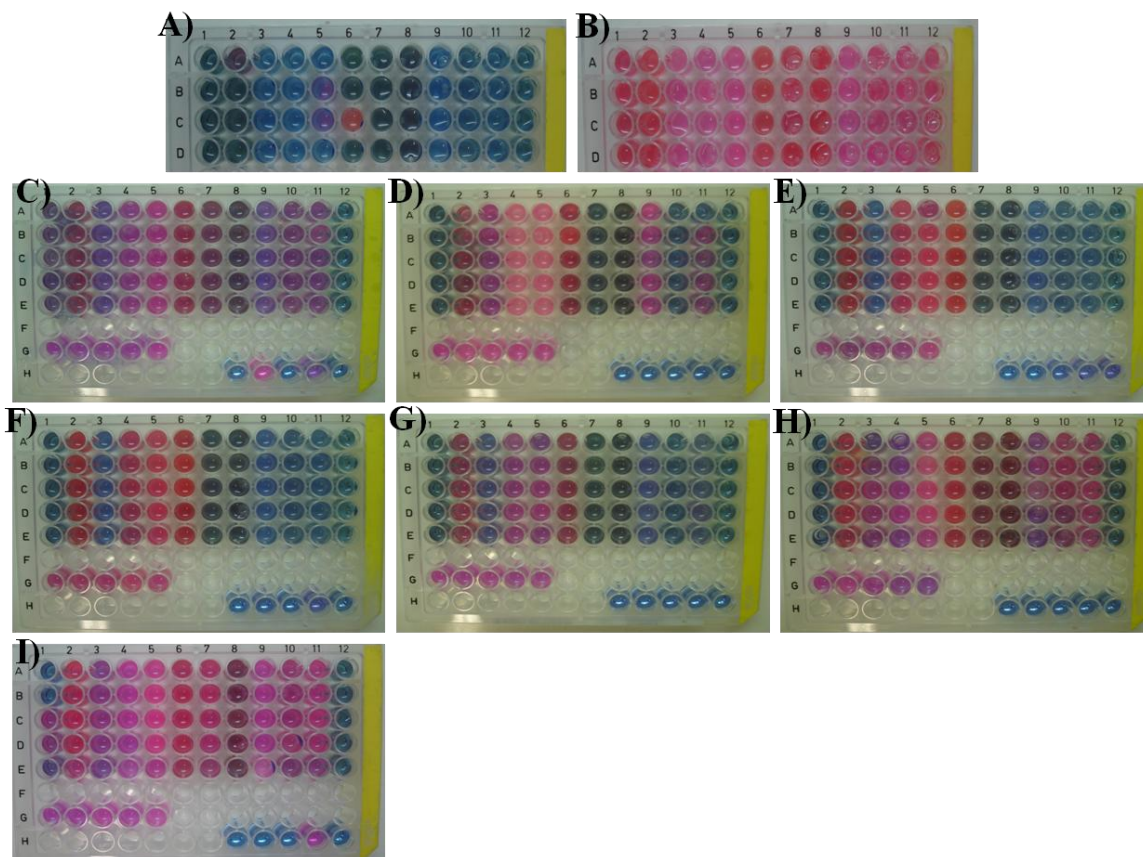


FIGURA 4.12 - Ilustração dos resultados dos ensaios qualitativos para identificação de extratos vegetais (E12 a E22) com potencial antimicrobiana contra bactérias de *D. speciosa*. A) Controle de Resazurina oxidada; B) Controle com resazurina reduzida; Ensaios com as bactérias: C) T2.IN1; D) T5.1IC1; E) T7.1IN2; F) T7.1IN4; G) T7.5IN2; H) T8.5IN1 e I) T10.5IN1.

É possível observar na Figura 4.13 em quais poços da placa de ELISA<sup>®</sup> foram adicionados os extratos E12 a E22 (Tabela 3.3) nas placas controles (Figura 4.12A e B).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
B	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
C	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
D	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
E												
F												
G												
H												

FIGURA 4.13 - Montagem das placas controles para os extratos: E12 a E22; CP = controle positivo (Tetraciclina).

Na Figura 4.14 é possível observar a confecção dos extratos E12 a E22 na placa de ELISA<sup>®</sup> utilizadas para os ensaios.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
B	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
C	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
D	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
E	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	CP
F												
G	CD	CD	CD	CD	CD							
H								CE	CE	CE	CE	CE

FIGURA 4.14 - Distribuição de extratos (E12 a E22) nas placas ensaiadas com os isolados. Legenda: CP: controle positivo (Tetraciclina); CD: Controle DMSO; CE: Controle esterilidade.

Depois que os protocolos foram devidamente elaborados, a metodologia qualitativa se configurou como um método fácil, rápido podendo ser utilizado em etapas de seleção inicial e de baixo custo. Como

aspecto negativo, ela não permite quantificar qual a porcentagem de inibição. Deste modo, foi estabelecido uma concentração de corte para a solução de trabalho dos extratos em avaliação, com valor máximo de 1.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta foi a concentração empregada nos “*screening*” iniciais. Os resultados para as espécies vegetais identificadas estão descritas na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 - Ensaio de atividade bactericida contra MO do inseto *D. speciosa* avaliando o potencial de extratos vegetais de espécies do cerrado da UFSCar. A) Extratos : E1 a E11 (Tabela 3.3); B) Extratos: E12 a E22 (Tabela 3.3).

A)	T1.1IC1	T2.1IN1	T5.1IC1	T7.1IN1	T7.1IN2	T7.1IN4	T7.5IN2	T8.5IN1	T10.5IN1	T11.3IN1
E1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E4	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
E5	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
E6	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
E7	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
E8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B)	T2.1IN1	T5.1IC1	T7.1IN2	T7.1IN4	T7.5IN2	T8.5IN1	T10.5IN1
E12	-	-	-	-	-	-	-
E13	+	+	+	+	+	+	+
E15	-	+	-	-	-	+	+
E16	+	+	+	+	+	+	+
E17	+	+	+	+	+	+	+
E18	+	+	+	+	+	+	+
E19	+	-	-	-	-	+	+
E21	-	-	-	-	-	+	+
E22	-	+	-	-	-	+	+
E23	+	-	-	-	-	+	+
E24	+	+	-	-	-	+	+

(+) = Resistência (Houve crescimento bacteriano);(-) = Sensível (Não houve crescimento bacteriano).

Os extratos que apresentaram os melhores resultados foram *Anadenanthera falcata*, *Campomanesia pubescens* e *Psidium laruotteanum* (Tabela 4.4). Estudos químicos para as três espécies são poucos ou

inexistentes na literatura. O Gênero *Anadenanthera* apresenta relatos de atividade contra *Staphylococcus aureus*<sup>113,114</sup>. O Gênero *Campomanesia* é descrito na literatura como inibidor microbiano contra *S. aureus* e *Escherichia coli*<sup>115,116</sup>. A espécie *Psidium guajava*, pertencente ao mesmo gênero da *P. laruotteanum*, vem sendo bastante estudada com vários relatos de atividade antimicrobiana<sup>117,118,119</sup>.

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

Quando reduzido a resazurina apresenta a capacidade de emitir fluorescência possibilitando o monitoramento da reação de redução através da fluorimetria. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de células viáveis na suspensão dentro do poço da placa de ELISA<sup>®</sup>. Essa característica faz do corante utilizado no ensaio, capaz de, indiretamente, monitorar a quantidade de células viáveis por meio da medida da intensidade de fluorescência nos poços da placa de ELISA<sup>®</sup>. Quanto maior a quantidade de células presente, maior a quantidade de resorufina e, portanto maior valor de fluorescência obtida.

O desenvolvimento da metodologia de quantificação de inibição dos extratos frente à bactéria IBDeL6 $\alpha$  foi realizado utilizando uma placa de ELISA<sup>®</sup> opaca de coloração preta. A placa transparente não foi escolhida, pois a medida de fluorescência foi realizada em cada poço. Essas medidas foram realizadas num equipamento o qual a fluorescência é dada pela incidência de um laser nos comprimentos de excitação e emissão desejados. Portanto, a medida de um poço poderia influenciar no resultado obtido aos poços adjacentes. Para anular tal interferência, a placa transparente foi substituída pela opaca.

Uma curva analítica foi construída para fazer a validação do método de bioensaio quantitativo. Neste experimento utilizou-se da regressão linear representada pela equação matemática (equação da reta:  $y = a \cdot x \pm b$ ) onde  $y$  está em função de  $x$  para descrever a relação dependente entre os eixos.

A curva foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados para obtenção dos coeficientes de regressão, o coeficiente linear ( $b$ ) e o coeficiente angular ( $a$ ) (Figura 4.15). A relação matemática entre  $x$  e  $y$  foi determinada empiricamente a partir das soluções de concentrações nominais conhecidas de resazurina.

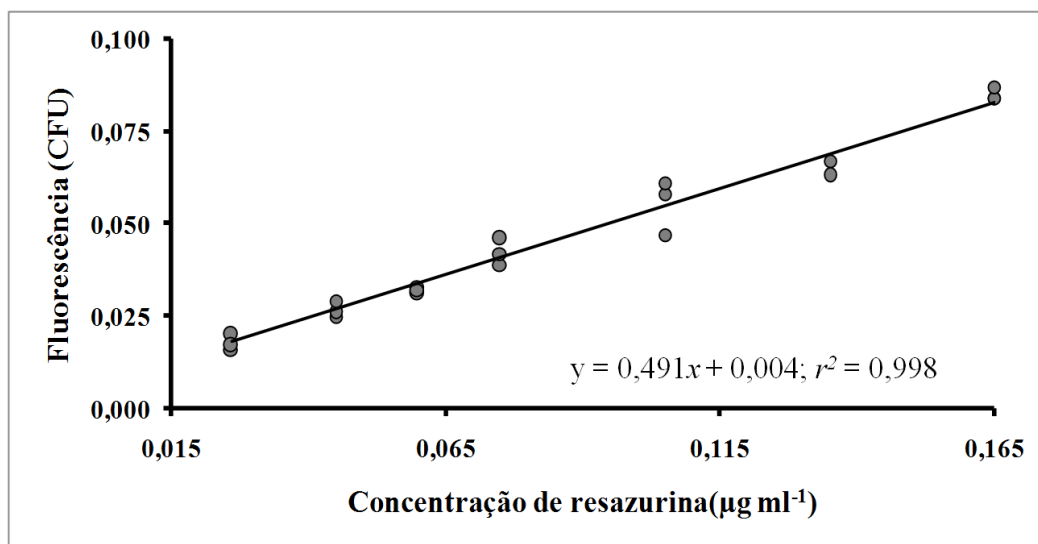


FIGURA 4.15 - Curva de calibração obtida para o corante resazurina.

O valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) foi de 0,998, o que indica uma excelente correlação entre os valores de fluorescência medidos e as concentrações nominais. A linearidade do método e a faixa linear de trabalho foram definidas a partir da curva analítica. Também, com base na curva analítica, foi possível selecionar uma das concentrações de resazurina para a realização dos ensaios com extratos. A Tabela 4.5 demonstra os valores de exatidão e precisão obtidos para cada concentração da faixa de trabalho dada por 26 – 165  $\text{ng.mL}^{-1}$ .



TABELA 4.5 - Valores de exatidão e precisão para a curva de calibração da resazurina nas diferentes concentrações avaliadas.

Concentração nominal (ng.mL <sup>-1</sup> )	Valores de fluorescência				Precisão (CV <sup>a</sup> %)	Exatidão (%)	Concentração calculada (ng.mL <sup>-1</sup> )	FR <sup>b</sup>
	Rep1	Rep2	Rep3	Média				
26	0,016	0,02	0,017	0,018	11,78	104,2	0,03	0,679
45	0,025	0,026	0,029	0,027	7,81	100,9	0,05	0,593
60	0,031	0,033	0,032	0,032	3,13	93,8	0,06	0,533
75	0,046	0,039	0,042	0,042	8,3	103,1	0,08	0,564
105	0,047	0,058	0,061	0,055	13,32	98,8	0,1	0,527
135	0,085	0,067	0,063	0,072	16,35	101,5	0,14	0,481
165	0,084	0,084	0,087	0,085	2,04	99,5	0,16	0,515

<sup>a</sup> Coeficiente de variação, <sup>b</sup> Fator de resposta.

O desvio padrão da resposta e o coeficiente angular foram usados para determinar os limites de detecção e quantificação. Os valores encontrados foram de 6 e 19 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

A precisão, também conhecida como coeficiente de variação, fornece informações em relação à dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio<sup>120</sup>. Se tratando de uma amostra biológica, o percentual aceitável para o coeficiente de variação se encontra de até 20%<sup>121</sup>. Portanto, os valores obtidos para tal parâmetro estão dentro do aceitável para uma validação analítica.

A exatidão foi obtida através do cálculo da comparação da concentração calculada a partir da equação da reta obtida na curva analítica com a concentração nominal já conhecido. A exatidão indica o quão próximo está o valor medido do valor de referência considerado verdadeiro, relacionando também com o erro absoluto da medida.

O fator de resposta das medidas, a relação entre as médias das replicatas e o fator de resposta calculado é demonstrado na Figura 4.16.

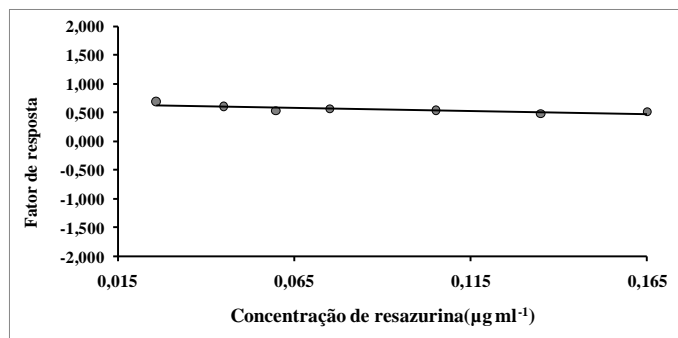


FIGURA 4.16 - Gráfico de correlação entre fator de resposta e concentrações de resazurina.

A curva analítica apresentou uma resposta linear por toda faixa de trabalho permitindo avaliar a precisão e exatidão do método. Além dessas análises, um teste de duplo cego foi realizado. Três concentrações distintas de resazurina foram selecionadas, sendo um controle de baixa, média e alta concentração baseadas nas concentrações utilizadas na construção na curva analítica. As concentrações escolhidas foram 32; 82 e 150  $\text{ng.mL}^{-1}$ , pois permitem a avaliar toda a faixa linear de trabalho, identificando possíveis desvios relacionados à inclinação da reta.

Para averiguar a confiabilidade do método um teste do duplo cego foi realizado. Duas amostras de concentrações desconhecidas pelo primeiro analista foram preparadas por um segundo analista. Assim o primeiro analista pode aplicar o método para as amostras desconhecidas por ele e utilizar os resultados de fluorescência obtidos e a equação de reta referente à curva analítica para encontrar a concentração correta. Na Tabela 4.6 são apresentados os valores obtidos. Observa-se que os valores obtidos foram bem próximos aos valores nominais, indicando uma confiável aplicabilidade do método.

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

Concentração nominal (ng.mL <sup>-1</sup> )	Valores de fluorescência				Concentração calculada (ng.mL <sup>-1</sup> )	CV (%)	Exatidão (%)
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Média			
Precisão e Exatidão							
32	0,028	-	0,026	0,027	0,029	5,24	91
82	0,035	-	0,041	0,046	0,085	11,16	103,4
150	0,088	0,086	0,091	0,088	0,171	2,85	114
Teste do duplo cego							
120	0,076	0,071	0,061	0,069	0,132	11,02	110,2
54	0,03	0,035	0,025	0,03	0,052	16,67	96,6

A análise de resíduo (Figura 4.17) foi aplicada para detectar possíveis problemas no ajuste da curva. Através desta análise é possível identificar possíveis desvios da linearidade do método. Com o resultado obtido pode-se observar que independente da concentração padrão de calibração, os resíduos seguem uma tendência randomizada e de forma homogênea e com baixa dispersão, propriedade conhecida como homoscedasticidade<sup>120</sup>.

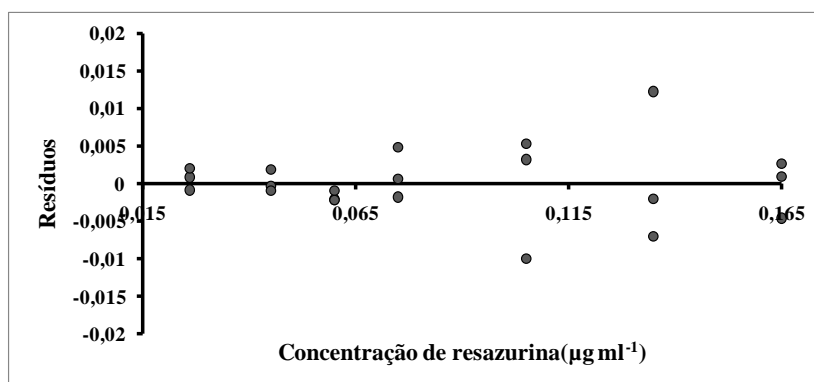


FIGURA 4.17 - Gráfico de resíduos demonstrando os resíduos distribuídos homocedasticamente.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para confirmar a linearidade do modelo obtido através da regressão linear. Na Tabela 4.7 se pode observar os parâmetros estatísticos avaliados.

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

ANOVA	Graus de liberdade (gl)	Soma dos quocientes (SQ)	Soma das médias (SM)	F	F de significação
Regressão	1	$10,9 \times 10^{-3}$	0,010907	457	$9,33 \times 10^{-15}$
Resíduos	19	$4,53 \times 10^{-4}$	$2,38 \times 10^{-5}$		
Total	20	$11,4 \times 10^{-3}$			
	Coeficientes	Stat t	P- Valor	95% inferior	95% superior
Intersecção	$4,36 \times 10^{-3}$	1,92	$6,96 \times 10^{-2}$	$-3,86 \times 10^{-4}$	$9,12 \times 10^{-3}$
Coeficiente angular	0,491	21,4	$9,33 \times 10^{-15}$	$44,3 \times 10^{-2}$	$53,9 \times 10^{-2}$

Através dos parâmetros estatísticos avaliados na ANOVA e mostrados na Tabela 4.7 é possível confirmar a linearidade do modelo obtido a partir da curva analítica. Os dados obtidos nesta tabela mostram que o valor da intersecção não difere estatisticamente de zero ( $P$ -valor  $> 0,05$ ) e o coeficiente angular apresentou um desvio significativo ( $P$ -valor  $< 0,05$ ) confirmando a linearidade do modelo. Assim, o método é considerado adequado para o ensaio dentro da faixa de trabalho proposta.

#### **4.8 - Aplicação da metodologia analítica desenvolvida no bioensaio de atividade antibacteriana para alguns extratos de plantas do cerrado**

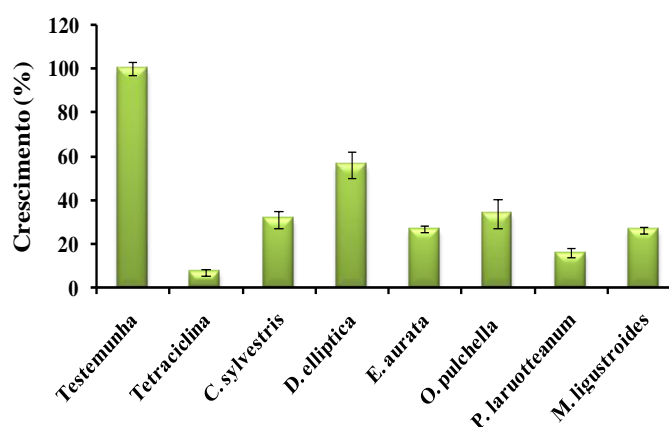
O desenvolvimento e validação da metodologia foram realizados em colaboração, como já mencionado anteriormente, com outro membro do grupo. A metodologia foi desenvolvida para determinar a faixa linear de trabalho para o corante revelador da atividade antibacteriana (resazurina), e a concentração do corante para ser aplicada em ensaios da atividade antimicrobiana de extratos, frações de plantas do cerrado. A concentração de resazurina selecionada, foi de  $135 \text{ ng.mL}^{-1}$ . As fluorescências obtidas foram utilizadas para avaliar a porcentagem de inibição dos extratos e frações, a partir da normalização com os resultados dos controles positivo e negativo. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.8.

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

Agentes antibacteriano	Fluorescência Média	CV *	% de inibição
Controle Negativo	0,081	3,13	0,0
Controle Positivo	0,010	23,9	93,0
Extrato <i>Casearia sylvestris</i>	0,028	12,9	69,0
Extrato <i>Davilla elliptica</i>	0,046	11,1	44,0
Extrato <i>Eugenia aurata</i>	0,025	6,19	73,3
Extrato <i>Ocotea pulchella</i>	0,030	20,0	66,3
Extrato <i>Psidium laruotteanum</i>	0,016	12,7	84,3
Extrato <i>Miconia ligustroides</i>	0,024	6,28	73,8

\* Coeficiente de variação.

O extrato que apresentou uma melhor inibição frente à bactéria IBDeL6 $\alpha$  foi o extrato de *Psidium laruotteanum* com 84,3% de inibição quando comparado ao controle. Seguido do extrato de *Miconia ligustroides* com uma porcentagem de inibição de 73,8 %, e *Eugenia aurata*, que não muito diferente com 73,3% de. Os resultados da tabela são melhores visualizados na Figura 4.18 onde estão demonstradas em forma de histograma.

FIGURA 4.18 - Histograma de atividade quantitativa antibacteriana sobre a IBDeL6 $\alpha$  de extratos de plantas do cerrado.

#### 4.8.1 - Avaliação do potencial antibacteriano de frações e metabólito secundário de *Psidium laruotteanum*

O extrato etanólico das folhas de *Psidium laruotteanum* foi particionado e suas frações submetidas à ensaio de inibição do crescimento da IBDeL6 $\alpha$ . Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.9 e Figura 4.19.

TABELA 4.9 - Resultados de atividade antibacteriana das frações de *P. laruotteanum*.

Agentes antibacteriano	Fluorescência Média	CV*	% de inibição
Controle Negativo	0,081	3,13	0,0
Controle Positivo	0,010	23,9	93,0
FrHex - <i>P. laruotteanum</i>	0,063	5,22	22,3
FrAcOEt - <i>P. laruotteanum</i>	0,007	23,1	97,0
FrDCM - <i>P. laruotteanum</i>	0,060	12,6	22,6
FrDCM - <i>P. laruotteanum</i>	0,046	15,9	47,2

\*Coeficiente de variação.

Pode-se observar que houve uma perda de eficiência de inibição para algumas frações quando comparada com o extrato bruto, contudo, uma alta atividade foi observada na fração acetato de etila. Essa fração apresentou maior quantidade de compostos em relação às outras partições (Figura 3.12). Além disso, algumas frações obtidas dessa partição apresentaram sinais de flavonóides no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Por isso essa espécie foi escolhida para realizar fitoquímica a ser seguida para determinação do metabólito secundário responsável pela atividade antimicrobiana. A Figura 4.19 demonstra em forma de histograma o resultado obtido das frações de *Psidium laruotteanum*.

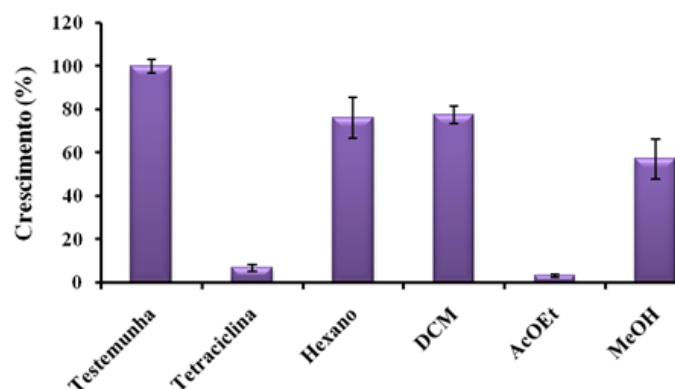


FIGURA 4.19 - Histograma de atividade antibacteriana sobre a IBDeL1 das frações de *P. laruotteanum*.

#### 4.9 - Estudos fitoquímicos de Plantas do Cerrado

Os produtos metabólicos secundários de plantas desempenham um importante papel no processo de descoberta de novos inseticidas, principalmente aqueles considerados ecologicamente corretos. Entre suas características, os compostos, em geral, não são tóxicos aos animais nem ao homem e não persistem na natureza, ou seja, que se degrada com maior velocidade que os sintéticos existentes não deixando resíduos nos alimentos ou no meio ambiente.

Dentro de um amplo universo de classes de compostos com características ou potencial inseticida, as espécies do bioma do cerrado devem ser consideradas. Este bioma tem sido bastante investigado sob o ponto de vista medicinal. Contudo poucos são os trabalhos avaliando seu potencial contra insetos pragas. Através de uma revisão bibliográfica e o grande número de atividades biológicas medicinais descritas, este bioma se mostra promissor para identificação de novas moléculas e novos modos de ação contra insetos pragas.

Entre as atividades biológicas, As espécies do cerrado são comumente descritas por apresentarem atividades gastroprotetoras, anti-inflamatória, imunomodulatória, ação anti helicobacter pylori, microbiana, fungicida, antiviral, antiulcerogênica, cardioprotetoras, antialérgica,

quimiopreventivas, radiopreventivas, hepatoprotetoras, antidiarréia, hipoglicêmicas, antidiabetes, bactericidas, antimalaria, bloqueador de contração muscular, translocação de  $\text{Ca}^{2+}$ , anti-HIV, *etc.* Entre os principais metabólitos secundários isolados se destacam o ácido gálico, taninos condensados, myricetinas glicosiladas, rutina, quercetinas glicosiladas, isoflavonas, petunidina, malvidina, delphinidina, karmpherol, flavonóides, terpernos, antocianinas, esteróides, alcalóides aporfinóides (nantenina, glaucina dicentrina, *etc.*), benzilisoquinolonas, *etc.*<sup>122,123,124,125,126,127,128</sup>.

O fracionamento do extrato de *P. laruotteanum* permitiu isolar o polifenol catequina e epicatequina e uma isoflavanona modificada pela presença de duas prenilas. A isoflavanona de *P. laruotteanum* foi utilizado como referência analítica nas análises quantitativas dos respectivos extratos e frações.

Para determinação estrutural dos compostos foi utilizada a técnica espectroscópica ressonância magnética nuclear em uma e duas dimensões.

#### 4.9.1 - Identificação estrutural da Ac50

A amostra Ac50 foi isolada da fração acetato de etila das folhas de *Psidium Laruotteanum*. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.22) mostrou presença de uma mistura dos epímeros catequina e epicatequina (Figura 4.20).

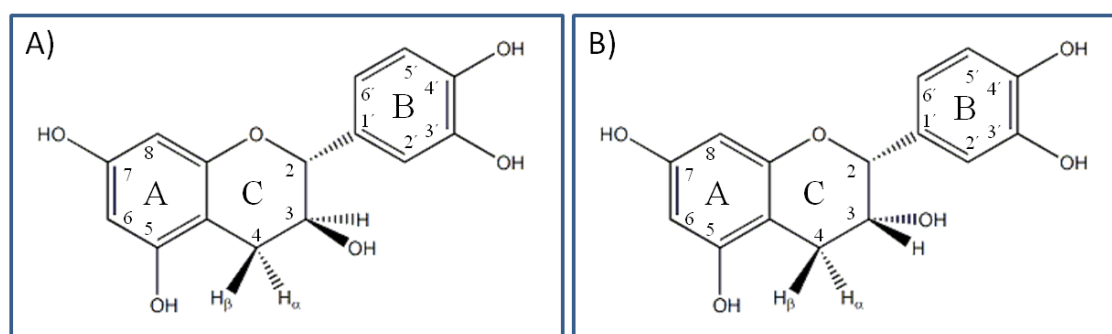


FIGURA 4.20 – A) Estrutura da Catequina; B) Estrutura da Epicatequina.



**a) Catequina (Figura 4.20A):**

A presença do sinal  $\delta_{\text{H}}$  6,74 (dd,  $J_1 = 8,2$  Hz e  $J_2 = 1,8$  Hz; H – 6') indica acoplamento meta com  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (d,  $J = 1,8$  Hz; H – 2') e acoplamento orto com  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (d,  $J = 8,1$  Hz; H – 5') indicando presença de grupos hidroxilas nas posições 4' e 5' do Anel B.

No anel A, a presença dos sinais  $\delta_{\text{H}}$  6,00 (d,  $J = 2,3$  Hz; H – 6) e  $\delta_{\text{H}}$  5,86 (d,  $J = 2,3$  Hz; H – 8) possuem constante de acoplamento meta, indicando presença de grupos hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel.

No anel C (Figura 4.20A) o sinal  $\delta_{\text{H}}$  4,54 (d,  $J = 7,9$  Hz; H – 2) acopla com o multiplete  $\delta_{\text{H}}$  3,97 (m,  $J = 2,3$  Hz; H – 3) com uma constante de acoplamento pseudo-diaxial indicando uma configuração 2,3-trans. O sinal  $\delta_{\text{H}}$  2,90 (dd,  $J_1 = 16,0$  Hz e  $J_2 = 5,6$  Hz; H – 4 $_{\alpha}$ ) foi atribuído ao H – 4 $_{\alpha}$  devido ao seu acoplamento geminal com H – 4 $_{\beta}$  ( $J_1 = 16,0$  Hz) e o acoplamento pseudo-equatorial-axial com H – 3 ( $J_2 = 5,6$  Hz). O sinal  $\delta_{\text{H}}$  2,51 (dd,  $J_1 = 16,0$  Hz e  $J_2 = 8,5$  Hz; H – 4 $_{\beta}$ ), por sua vez, foi atribuído ao H – 4 $_{\beta}$  devido ao seu acoplamento geminal com H – 4 $_{\alpha}$  ( $J_1 = 16,0$  Hz) e o acoplamento pseudo-diaxial com H – 3 ( $J_2 = 8,5$  Hz).

**b) Epicatequina (Figura 4.20B):**

No anel B, a epicatequina pouco se diferencia de seu isômero catequina. Apenas variação nos deslocamentos químicos e no valor das constantes de acoplamento dos sinais, o sinal  $\delta_{\text{H}}$  6,82 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz e  $J_2 = 1,8$  Hz; H – 6') indica acoplamento meta com  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (d,  $J = 1,7$  Hz; H – 2') e acoplamento orto com  $\delta_{\text{H}}$  6,78 (d,  $J = 8,1$  Hz; H – 5') indicando presença de grupos hidroxilas nas posições 4' e 5' deste anel.

No anel A, assim como no anel B, temos poucas variações nos sinais. O sinal de H – 6 continua o mesmo  $\delta_{\text{H}}$  6,00 (d,  $J = 2,3$  Hz; H – 6) já o sinal de H – 8 tem uma pela variação no deslocamento químico, porém sua constante de acoplamento permanece a mesma  $\delta_{\text{H}}$  5,86 (d,  $J = 2,3$  Hz; H –

8). Eles possuem constante de acoplamento meta, indicando presença de grupos hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel.

Os sinais dos hidrogênios correspondentes ao anel C são os que sofrem maior variação. Principalmente os sinais de H – 2 ( $\delta_{\text{H}}$  4,86) e H – 3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,19) passam de dubleto e multiplete para singlete largo (Figura 4.22). Isso ocorre, pois o acoplamento entre eles, antes 3,2 – trans, agora passa a ser 2,3 – cis, e a constante de acoplamento passa a ser tão pequena que os picos se unem em um singlete largo. Além disso, os valores das constantes de acoplamento dos sinais os hidrogênios diastereotópicos H – 4 $_{\alpha}$  e H – 4 $_{\beta}$  são alterados. O sinal  $\delta_{\text{H}}$  2,85 (dd,  $J_1 = 16,7$  Hz e  $J_2 = 4,7$  Hz; H – 4 $_{\alpha}$ ) foi atribuído ao H – 4 $_{\alpha}$  devido ao seu acoplamento geminal com H – 4 $_{\beta}$  ( $J_1 = 16,7$  Hz) e o acoplamento pseudo-diequatorial ( $J_2 = 4,7$  Hz) com H – 3. Já o sinal  $\delta_{\text{H}}$  2,72 (dd,  $J_1 = 16,7$  Hz e  $J_2 = 3,4$  Hz; H – 4 $_{\beta}$ ), atribuído ao H – 4 $_{\beta}$ , com acoplamento geminal com H – 4 $_{\alpha}$  ( $J_1 = 16,7$  Hz), teve seu acoplamento com H – 3 passando de pseudo-diaxial para pseudo-axial-equatorial com  $J_2 = 3,4$  Hz (Figura 4.21B).

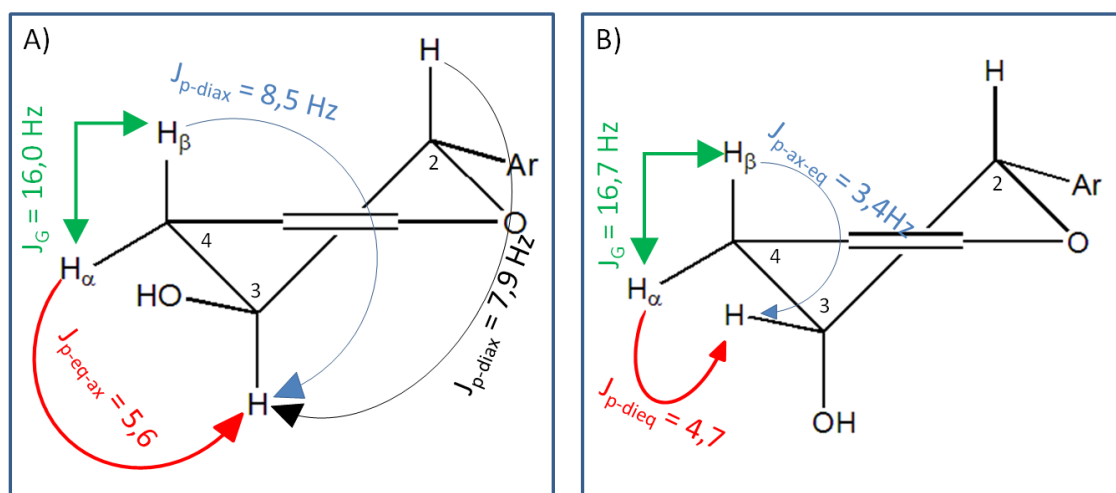


FIGURA 4.21 - Configuração adotada pelos hidrogênios no anel C; A) Catequina; B) Epicatequina.

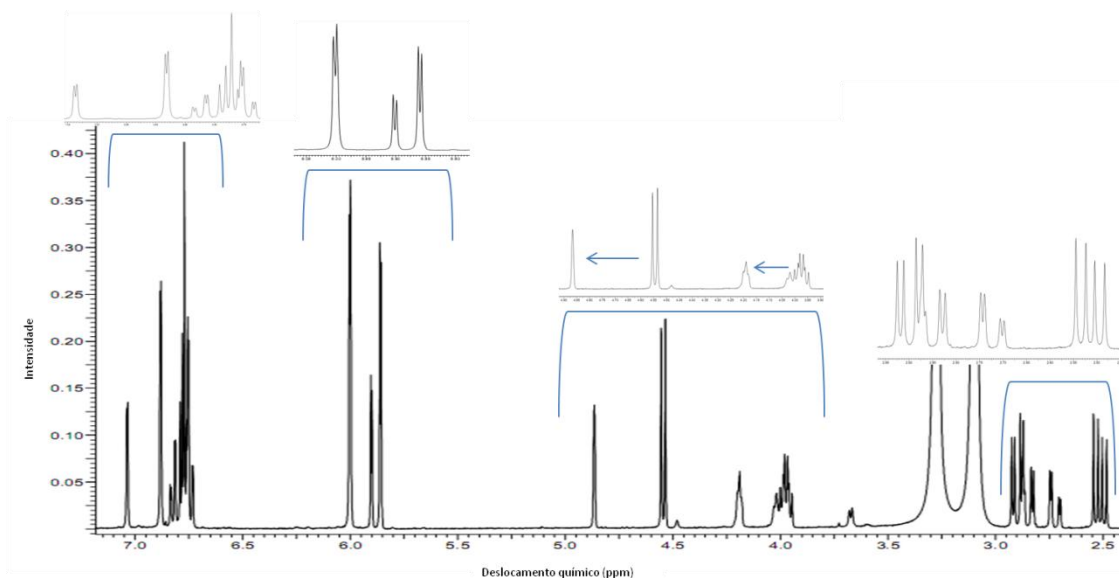


FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra Ac50.

A comparação dos sinais obtidos para catequina e epicatequina no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a amostra Ac50 com a literatura é mostrada na Tabela 4.10 e Tabela 4.11 respectivamente.

TABELA 4.10 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da catequina e comparação com a literatura.

Hidrogênio	Deslocamento químico (multiplicidade, constante de acoplamento)	LÔBO ET al 2008
2'	6,88 (d, $J = 1,8$ Hz)	6,83 (d $J = 1,8$ Hz)
5'	6,78 (d, $J = 8,1$ Hz)	6,76 (d $J 8,1$ Hz)
6'	6,74 (d, $J_1 = 8,2$ Hz; $J_2 = 1,8$ Hz)	6,71 (d, $J_1 = 8,2$ Hz; $J_2 = 1,8$ Hz)
6	6,00 (d, $J = 2,3$ Hz)	5,93 (d, $J = 2,2$ Hz)
8	5,86 (d, $J = 2,3$ Hz)	5,85 (d, $J = 2,2$ Hz)
2	4,54 (d, $J = 7,9$ Hz)	4,57 (d, $J = 7,5$ Hz)
3	3,97 (m)	3,97 (m)
4 $_{\alpha}$	2,90 (dd, $J_1 = 16$ Hz, $J_2 = 5,6$ Hz)	2,85 (dd, $J_1 = 16,1$ Hz, $J_2 = 5,5$ Hz)
4 $_{\beta}$	2,51 (dd, $J_1 = 16$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz)	2,51 (dd, $J_1 = 16,1$ Hz, $J_2 = 8,2$ Hz)

TABELA 4.11 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da epicatequina e comparação com a literatura.

Hidrogênio	Deslocamento químico (multiplicidade, constante de acoplamento)	LÔBO ET al 2008
2'	7,04 ( <i>d</i> , $J = 1,7$ Hz)	6,97 ( <i>d</i> , $J = 1,2$ Hz)
6'	6,82 ( <i>dd</i> $J_1 = 8,5$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz)	6,79 ( <i>dd</i> $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz)
5'	6,78 ( <i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)	6,75 ( <i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
6	6,00 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,93 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
8	5,90 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ Hz)	5,91 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
2	4,86 ( <i>sl</i> )	4,82 ( <i>sl</i> )
3	4,19 ( <i>sl</i> )	4,17 ( <i>sl</i> )
4 $_{\alpha}$	2,85 ( <i>dd</i> $J_1 = 16,7$ Hz e $J_2 = 4,7$ )	2,85 ( <i>dd</i> $J_1 = 16,8$ Hz e $J_2 = 4,5$ )
4 $_{\beta}$	2,72 ( <i>dd</i> $J_1 = 16,7$ Hz e $J_2 = 3,4$ )	2,72 ( <i>dd</i> $J_1 = 16,8$ Hz e $J_2 = 2,4$ )

### 4.9.2 - Determinação da Ac21.24

A fração Ac21.24 foi isolada na coluna Col. D. (Figura 3.11) da fração acetato de etila. Após a análise de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de uma e duas dimensões (espectros se encontram nos Apêndices A e B) e comparação dos dados obtidos com a literatura<sup>129,130</sup> foi possível propor a estrutura, baseada no esqueleto estrutural de uma dihidroxi-chalcona, ilustrada na Figura 4.23.

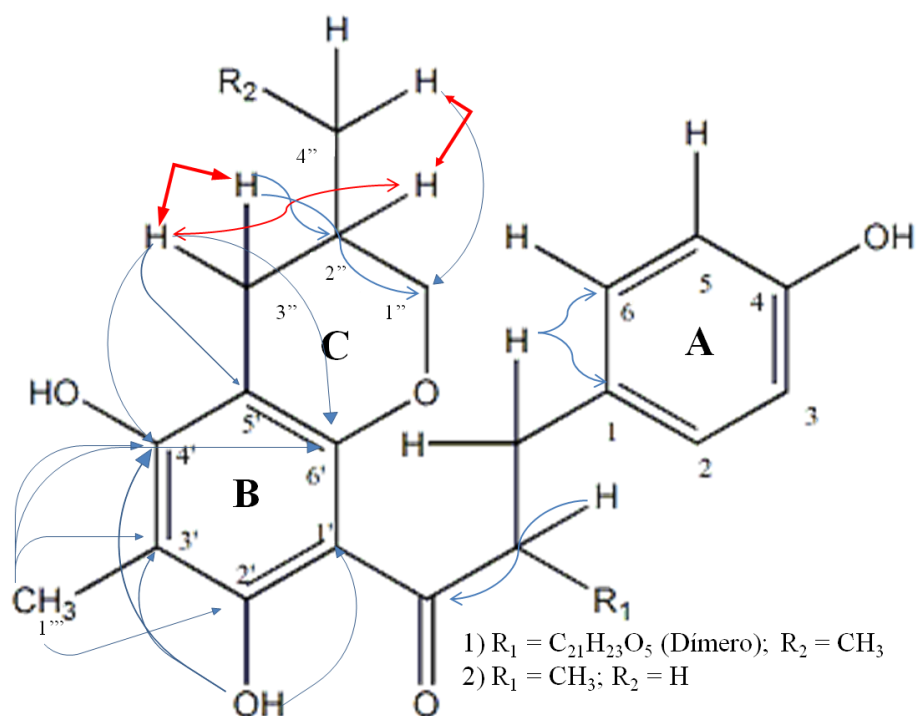


FIGURA 4.23 - Proposta estrutural, correlações entre carbono e hidrogênio (linha azul) e correlações entre hidrogênio e hidrogênio (linha vermelha) para a molécula isolada na fração Ac21.24 (Col. D).

No anel A os hidrogênios H-5 e H-6 apresentaram deslocamento químico no espectro de RMN de  $^1H$  (Apêndice – A) em  $\delta_H$  5,93 (*d*,  $J = 9,8$  Hz) e  $\delta_H$  5,81 (*d*,  $J = 9,8$  Hz) respectivamente. O valor da constante de acoplamento indica acoplamento orto entre os sinais. No espectro de HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) os sinais desses hidrogênios (H – 5 e H – 6) se correlacionam com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  135,56 ppm e  $\delta_C$  133,22 ppm respectivamente no espectro (Apêndice – B). O sinal  $\delta_H$  5,93 (*d*,  $J = 9,8$  Hz) foi atribuído ao hidrogênio H – 6 devido a correlação do carbono  $\delta_C$  133,22 com o sinal de hidrogênio  $\delta_H$  1,39 (*s*, H –  $\beta$ ).

No anel B, temos o singlete em  $\delta_H$  14, 25. Esse sinal desblindado é resultado da interação intermolecular do hidrogênio da hidroxila com o oxigênio da carbonila indicando que o grupo hidroxila se encontra na posição 2'. No espectro de HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) este hidrogênio correlaciona com os carbonos 1', 3' e 4'.

Ainda no HMBC, o sinal de hidrogênio  $\delta_H$  2,07 (*s*, H – 1'') correlaciona com os carbonos 2', 3' e 4' indicando a presença de uma metila na posição 3' e uma hidroxila na posição 4' do anel B. Esse hidrogênio apresenta uma correlação com o sinal  $\delta_H$  7,08 no espectro de HSQC confirmando a presença da metila ligada ao anel.

No anel C, os sinais  $\delta_H$  2,45 (*d*,  $J = 16,7$  Hz; H – 3'') e  $\delta_H$  2,93 (*dd*,  $J = 16,7$  Hz; H – 3'') foram atribuídos aos hidrogênios H – 3'' o valor alto da constante de acoplamento indica um acoplamento geminal entre os hidrogênios. Esses hidrogênio apresentaram correlação no espectro de HMBC com os carbonos 4',5',6',1'' e 2'' indicando que o metileno se encontra ligado a posição 5' do anel B. Além disso, o sinal  $\delta_H$  2,93 (*dd*,  $J = 16,7$  Hz; H – 3'') apresentou uma correlação com o multipletto  $\delta_H$  2,29 (*m*, H – 2'') que por sua vez correlacionou com hidrogênio H – 4'' (*m*,  $\delta_H$  1,39).

Os sinais de hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  carbonílicos sugerem duas opções. A primeira dela se trata de um dímero (1) cuja ligação se dá pelo carbono na posição alfa a carbonila de ambas moléculas do dímero pois existem dois duplo dupletos em  $\delta_H$  2,77 e  $\delta_H$  2,88 que correlacionam com o carbono carbonílico no HMBC e são duplicados. A outra opção é a mistura de isômeros (2) onde esses sinais duplicados são devido à mistura racêmica. Ambas opções podem ser observadas na Figura 4.23. A comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é mostrada na Tabela 4.12 tanto para o dímero brackenina<sup>129</sup> quanto para 2-Hidroxi-3,4,6-trimetoxidihidrochalcona<sup>130</sup>.

TABELA 4.12 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da a Ac.21.24 e comparação com os dados da literatura.

Nº Carbono	Deslocamento químico de hidrogênio (multiplicidade, constante de acoplamento)	Deslocamento químico Ac21.24	Brackenina <sup>129</sup>	2-Hidroxi-3,4,6-trimetoxidihidrochalcona <sup>130</sup>
1		119,7	129,53	142,7
4		150,4	156,03	126,7
3,5	5,93 ( <i>d</i> ; $J = 9,8$ Hz)	135,6	115,27	129,2
2,6	5,8 ( <i>d</i> ; $J = 9,9$ Hz)	133,2	130,06	129,3
1'		105,7	114,97	106,6
2'		162,9	165,39	159,6
3'		101,8	102,87	131,6
4'		158,2	166,03	159,9
6'		153,5	133,17	154,6
$\beta'$		206,2	206,43	206,1
$\alpha$	2,77 ( <i>dd</i> ; $J_1 = 14,1$ Hz; $J_2 = 7,00$ Hz) / 2,88 ( <i>dd</i> ; $J_1 = 14,0$ Hz; $J_2 = 7,1$ Hz)	53,4	59,76	46,07
$\beta$	1,70 ( <i>sl</i> )	32,3	36,67	31,3
1''		73,4		
2''	2,29 ( <i>m</i> )	30,3		
3''	2,93 ( <i>dd</i> ; $J_1 = 16,7$ Hz; $J_2 = 7,0$ Hz) / 2,45 ( <i>dl</i> ; $J = 16,6$ Hz)	22,69		
4''	1,39 ( <i>m</i> )	24,9		
1'''	2,07 ( <i>s</i> )	7,08		

#### 4.10 - Análises Quantitativas do extrato de *P. laruotteanum* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (HPLC-UV)

A análise quantitativa do extrato de *P. laruotteanum* foi realizada com o propósito de se conhecer o teor de um determinado marcador impondo um controle de qualidade aos extratos e frações submetidos aos

ensaios de inibição microbiana. Estes resultados permitem fazer uma correlação direta entre o perfil qualitativo do extrato e a atividade biológica observada, assegurando a reprodutibilidade dos resultados de inibição, a certificação do material vegetal e estabelece valores mínimos de qualidade para produtos. Como foi observado na Tabela 4.4, os isolados T2.1IN1, T5.1IC1, T8.5IN1 e T10.5IN1 responderam de forma diferente para os extratos E5 e E12. Quando testadas contra o E5 essas bactérias não tiveram seu crescimento inibido, mas quando testadas contra o E12 essas bactéria tiveram seu crescimento inibido. Esses extratos pertencem a mesma espécie de planta, mas coletadas em regiões diferentes. A diferença nos resultados obtidos pode ter ocorrido devido às variações no perfil metabólico das plantas. Esse resultado mostra a importância de realizar o controle de qualidade dos extratos utilizados em ensaios antimicrobianos. Sem esse controle de qualidade, extratos podem ser descartados por não apresentarem uma atividade esperada quando, na verdade, os compostos responsáveis pela atividade não foram expressos pela planta no momento da coleta.

Como marcador de referência para o extrato e fração de *P. laruotteanum* foi utilizado o padrão isolado do próprio material vegetal sendo a chalcona (fração Ac21.24). Este composto foi escolhido por ser característico da espécie vegetal analisada o que não ocorre, por exemplo, com a catequina, que pode ser encontrada em diversos extratos. Padrões específicos servem não apenas como referência quantitativa, mas também qualitativa, certificando a espécie vegetal. A Figura 4.24 apresenta a análise cromatográfica do padrão dentro da faixa linear de trabalho entre 0,5 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



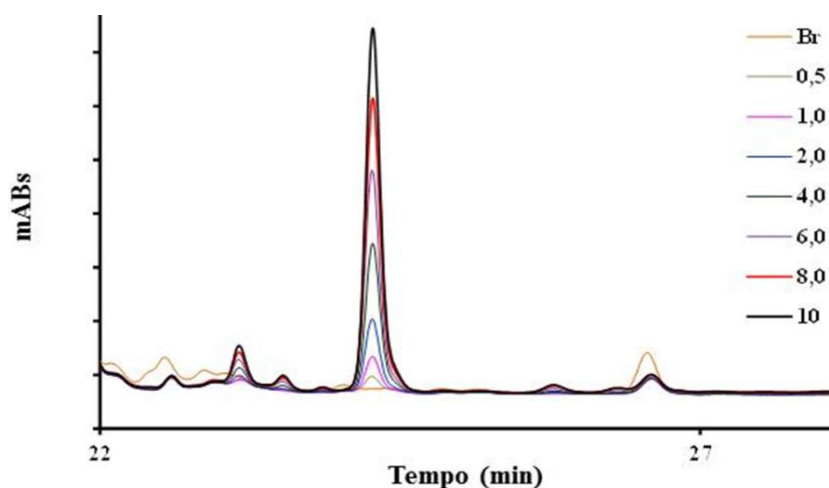


FIGURA 4.24 - Cromatogramas obtidos referentes ao padrão de referência quantitativa de *P. laruotteanum* sendo a molécula isolada na fração Ac21.24. As condições operacionais de análises estão descritas na Tabela 3.4.

Todavia, para a confiança analítica, não basta ter o padrão, mas há a necessidade de todo um desenvolvimento e validação instrumental. Assim, a partir de soluções de trabalho de  $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foram desenvolvidas diversas análises cromatográficas para validação do método. A Tabela 4.13 e a Tabela 4.14 resumem os dados obtidos para a validação dos métodos analíticos.

TABELA 4.13 - Parâmetros da validação analítica para quantificação da chalcona.

	Chalcona (Ac21.24)
Equação de reta	$y=583,8x - 98,5$
Faixa Linear de trabalho ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,5 – 10,0
Coefficiente angular ( $r^2$ )	0,9995
Limite de Quantificação ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,27
Limite de Detecção ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,09
Análise de Variância (ANOVA, $P$ -valor)	$2,98 \times 10^{-33}$

TABELA 4.14 - Dados de precisão e exatidão obtidos para a validação analítica por HPLC.

Conc. Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Conc. Calculada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precisão	Exatidão (%)
0,5	0,50	0,73	100,2
1	1,05	0,47	104,8
2	1,94	0,14	97,1
4	3,95	0,19	98,6
6	6,02	0,04	100,4
8	8,13	0,05	101,7
10	9,91	0,08	99,1

A Figura 4.25 ilustra a curva de calibração construída para o analito em investigação.

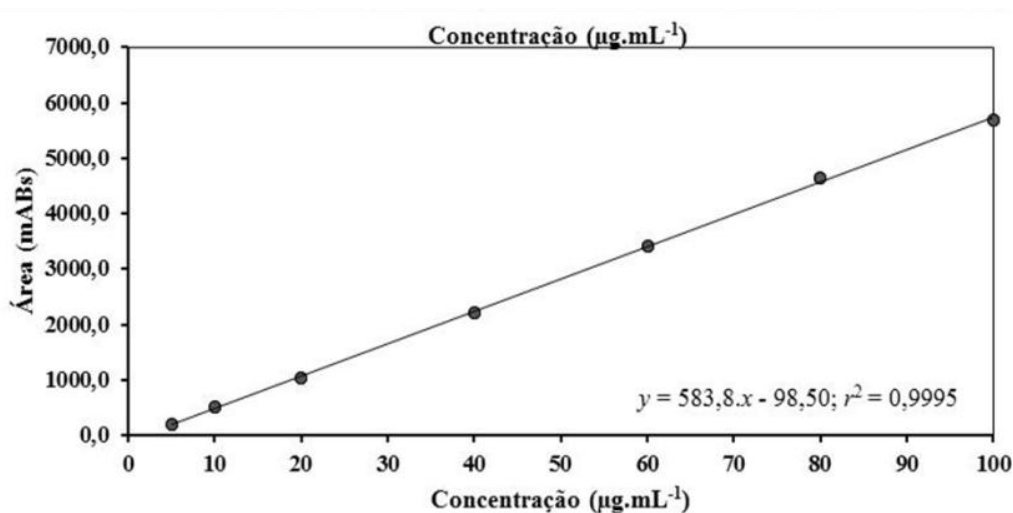


FIGURA 4.25 - Curva de calibração analítica por calibração externa para chalcona isolada na fração Ac21.24.

O método se mostrou confiável aos propósitos que foram desenvolvidos. Assim, pode ser aplicado nas análises dos materiais vegetais. As soluções do extrato e fração analisados foram preparadas na concentração de  $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A Figura 4.26 ilustra os cromatogramas das amostras *P. laruotteanum*.

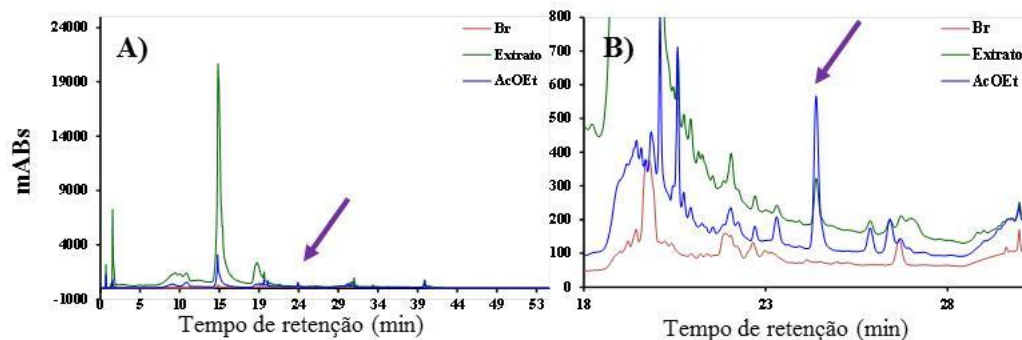


FIGURA 4.26 - Cromatogramas do extrato bruto e da fração Acetato de Etila de *P. laruotteanum* submetidos à ensaio de atividade antibacteriano. A) eluição cromatográfica completa e B) ampliação. Condições de análise foram idênticas às especificações descritas na Tabela 3.4.

Os resultados quantificados para a chalcona se encontra descritos na Tabela 4.15. Pode se observar que os procedimentos de fracionamento aumentaram a concentração do analito avaliado na fração acetato de etila. Essa fração apresentou um teor para a chalcona 1770 vezes superior a do seu extrato bruto de origem. Vale ressaltar que o valor de inibição microbiana (ver item 4.8) para o extrato de *P. laruotteanum* passou de 84% (Tabela 4.8) no extrato bruto para 97% (Tabela 4.9) na fração acetato de etila. Isso ocorreu devido à concentração dos compostos que tem atividade microbiana na fração acetato. A concentração da chalcona aumentou significativamente do extrato bruto para a fração acetato o que sugere que pode ser um dos compostos responsáveis pela atividade.

TABELA 4.15 - Resultados quantitativos referentes às análises de determinação do teor da chalcona nas amostras de *P. laruotteanum*.

<i>P. laruotteanum</i>	% (m/m) Isoflavanona
Extrato Bruto	0,13
Fr. Acetato de Etila	2,30

## **4.11 - Ensaios biológicos com *Diabrotica speciosa***

### **4.11.1 - Avaliação do comportamento biológico do inseto entre os diferentes tratamentos de criação sob condições assépticas ou não**

As pragas de solo (insetos edafícolas) são normalmente insetos que passam a vida inteira, ou grande parte dela, no solo interagindo direta e continuamente com raízes, tubérculos e caules subterrâneos<sup>131</sup>. Este tipo de praga, ainda hoje é o principal limitador na produção de vegetais<sup>132</sup>. Quando ataca as raízes adventícias, a praga, causa um crescimento irregular das plantas, que se tornam recurvadas (pescoço de ganso) diminuindo o seu peso e, como consequência, o peso da parte aérea, a altura das plantas e sua produção<sup>133</sup>. Além dos danos diretos aos cultivos do ataque das pragas de solo, prejuízos indiretos também podem ser creditados a este tipo de praga. Por exemplo, um ataque de *D. speciosa* facilita a entrada de fitopatógenos através dos orifícios que fazem ao se alimentar dos tecidos das raízes, reduzindo produtividade da planta<sup>133</sup>. Com o ataque das larvas e consumo de raízes, reduz a capacidade de a planta absorver água e nutrientes, tornando-se a planta menos produtiva como também mais suscetível às doenças radiculares e ao tombamento, o que acarreta aumento de perdas da produção<sup>134</sup>. Este quadro descreve os principais danos causados pela *D. speciosa* tornando este inseto praga, o principal alvo de estudo deste projeto.

Deste modo, para entender a devida correlação entre a *D. speciosa* e seus simbiossiontes, um estudo foi conduzido avaliando os micro-organismos simbiossiontes entre as diferentes fases de desenvolvimento deste inseto quando criado sob condições assépticas ou não. Num primeiro momento, foi possível isolar e caracterizar os simbiossiontes de transmissão vertical e

horizontal. A seguir são apresentados os dados de desenvolvimento do inseto sob estas condições.

A análise da Tabela 4.16 se observa que os insetos apresentaram um menor período larval de desenvolvimento em condições de assepsia que em condições não assépticas. O peso médio do inseto macho e fêmea não diferenciaram entre os tratamentos bem como não houve uma diferença significativa entre a razão macho/fêmea de insetos emergidos. Uma nova diferença foi observada para a longevidade onde novamente se observa tanto para machos e fêmeas, que a condições assépticas prorrogaram seu período de longevidade. As condições assépticas, principalmente de ovos e solo, também favoreceram no número de insetos emergidos e sua viabilidade. Estes resultados mostram que alguns micro-organismos que se encontram no meio não esterilizado podem estar atrapalhando o desenvolvimento dos insetos sendo entomopatógenos.

TABELA 4.16 - Avaliação do desenvolvimento do inseto *D. speciosa* seccionado entre machos e fêmeas – Teste t de tukey.

Tratamentos	<sup>b</sup> Total		
	Período larva-adulto (dias)	Peso (mg)	Longevidade (dias)
T3	28,00 ± 0,20 ab	7,44 ± 0,35 a	2,89 ± 0,19 ab
T4	28,12 ± 0,36 ab	8,15 ± 0,32 a	2,96 ± 0,18 ab
T5	28,26 ± 0,18 ab	7,21 ± 0,24 a	2,78 ± 0,11 ab
T6	28,22 ± 0,28 ab	7,28 ± 0,34 a	2,78 ± 0,17 ab
T7	27,71 ± 0,20 a	7,88 ± 0,35 a	3,54 ± 0,17 b
T8	28,21 ± 0,25 ab	7,10 ± 0,34 a	2,82 ± 0,18 ab
T9	28,25 ± 0,42 ab	6,85 ± 0,48 a	2,65 ± 0,25 a
T10	28,98 ± 0,27 b	7,19 ± 0,32 a	2,60 ± 0,16 a
T11	29,10 ± 0,25 b	6,36 ± 0,46 a	2,32 ± 0,19 a
<i>F</i> (Tratamento)	0,81 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>ns</sup>	2,01*
<i>C.V.</i> (%)	15,38	15,99	17,68
<i>P</i>	> 0,0500	> 0,0500	0,0463
	Razão sexual	Número de insetos emergidos	Viabilidade de adultos (%)
T3	0,25 ± 0,07 a	43,00 ± 4,49 abcd	53,75 ± 5,61 abcd
T4	0,35 ± 0,10 a	32,00 ± 4,41 ab	40,00 ± 5,51 ab
T5	0,33 ± 0,06 a	59,00 ± 3,96 de	73,75 ± 4,95 de
T6	0,42 ± 0,07 a	65,00 ± 3,51 e	81,25 ± 4,39 e
T7	0,44 ± 0,08 a	49,00 ± 4,38 bcde	61,25 ± 5,48 bcde
T8	0,26 ± 0,07 a	46,00 ± 4,45 abcd	57,50 ± 5,56 abcd
T9	0,50 ± 0,11 a	29,00 ± 4,33 a	36,25 ± 5,41 a
T10	0,49 ± 0,07 a	53,00 ± 4,26 cde	66,25 ± 5,32 cde
T11	0,48 ± 0,09 a	36,00 ± 4,48 abc	45,00 ± 5,60 abc
<i>F</i> (Tratamento)	1,46 <sup>ns</sup>	8,13**	8,13**
<i>C.V.</i> (%)	27,68	41,75	43,22
<i>P</i>	0,1721	< 0,0001	< 0,0001

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade. Dados transformados para  $(x+0,5)^{1/2}$ ; <sup>ns</sup>, não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; \*, significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. \*\*, significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

#### 4.11.2 - Avaliação alimentar dos insetos em cultivos tratados com extratos de *P. laruotteanum*

Os ensaios contra *D. speciosa* foram desenvolvidos com extratos de *P. laruotteanum* permitindo avaliar se a habilidade observada deste extrato em controlar o desenvolvimento dos micro-organismos endossimbiontes se transfere para o inseto. A Tabela 4.17 e a Tabela 4.18 apresentam os dados de sobrevivência do inseto e consumo alimentar, respectivamente. Neste ensaio, uma solução de *Psidium laruotteanum* foi borrifada no solo com a planta já cultivada (feijão), respeitava-se um tempo para fixação dos extratos e evaporação da umidade e, na seguida os insetos foram inseridos no meio.

TABELA 4.17 - Experimento de sobrevivência da *D. speciosa* contra extratos de *Psidium laruotteanum* – Teste t de Tukey.

Tratamentos	Insetos emergidos <sup>a</sup>	Sobrevivência (%) <sup>b</sup>
<i>Psidium laruotteanum</i>	9,00 ± 2,55 b	30,00 ± 8,51 b
Testemunha	17,00 ± 2,76 a	56,67 ± 9,20 a
F (Tratamento)	4,5268*	4,5268*
P	0,0376	0,0376

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade. <sup>a</sup>Dados transformados para  $(x+0,5)^{1/2}$ ; <sup>b</sup>Dados transformados para  $\arcseno(x/100)^{1/2}$ ; \* P < 0,05

TABELA 4.18 - (Experimento *Psidium laruotteanum*) – Teste t de Student (não foi possível de realizar o cálculo de porcentagem de redução).

Tratamentos	Peso (mg)	
	Parte aérea	Sistema radicular
<i>Psidium laruotteanum</i>	59,56 ± 11,23 a	678,90 ± 94,12 a
Testemunha <sup>(a)</sup>	118,00 ± 12,98 a	630,80 ± 39,63 a
F (Tratamento)	1,28 <sup>ns</sup>	0,09 <sup>ns</sup>
P	0,2735	> 0,050

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade. Dados transformados para  $(x+0,5)^{1/2}$ ; <sup>(a)</sup> sem infestação de larvas; <sup>ns</sup>, não significante.

Foi possível observar que o tratamento com *Psidium laruotteanum* alterou a emergência de insetos e sua sobrevivência. Estes resultados primeiramente indicam que esta espécie vegetal pode ser utilizada para o controle populacional da *D. speciosa*. Além disso, conhecendo agora a atividade deste extrato contra os micro-organismos endossimbiontes da *D. speciosa*, podemos novamente propor que este controle esteja ocorrendo devido a disfunções causadas pelo extrato contra as bactérias do trato gastrointestinal do inseto que deve estar perdendo sua capacidade de processar o alimento e/ou absorver os nutrientes.

Este experimento, de fato permite propor um novo mecanismo de controle populacional do inseto praga *D. speciosa* através do controle de seus micro-organismos endossimbiontes.

Os dados da Tabela 4.18 reforçam estas conclusões e nova proposta, onde se observa que o inseto na fase larval não apresentou danos ao sistema radicular da planta. Vale a pena reforçar que é na fase larval que este inseto

causa os principais danos agrícolas. Na fase adulta, quando se alimenta de folhas, seus danos são considerados secundários.



## 5 - CONCLUSÃO

Os protocolos desenvolvidos de assepsia, extração, isolamento e armazenagem dos micro-organismos foram satisfatórios aos objetivos propostos. Foi possível isolar 56 bactérias oriundas da *Diabrotica speciosa*. Os estudos entomo-microbiológicos permitiram isolar micro-organismos simbiotes de transmissão vertical determinando bons alvos de inibição. A técnica de caracterização microbiana, MALDI – TOF – MS, foi fundamental para interpretação da simbiose inseto/micro-organismos. Foi possível, através desta técnica, agrupar os isolados em 12 grupos de micro-organismos. Os principais gêneros isolados foram *Serratia sp*, *Enterobacter sp*, *Acinetobacter sp* e *Streptomyces sp*.

Ensaio qualitativos utilizando a técnica de microdiluição com o corante resazurina, para análises rápidas de produtos candidatos a novos inibidores microbianos, e qualitativos, para avaliação do potencial de inibição destes produtos, foram desenvolvidos permitindo identificar novos produtos com potencial biocida. Os principais resultados para as espécies de planta encontrados foram para: *Anadenanthera falcata*, *Campomanesia pubescens* e *Psidium laruotteanum*. A coleta vegetal foi realizada de maneira aleatória no cerrado da UFSCar permitiu identificar bons candidatos a novos biocidas e inseticidas. O fracionamento do extrato de *P. laruotteanum* permitiu isolar metabólitos secundários, catequina, epicatequina e uma dihidroxi-chalcona isolada na fração Ac21.24, esta última foi utilizada como marcador da espécie utilizada como padrão de referência analítica, em métodos cromatográficos desenvolvidos e validados. Possibilitando, assim, o controle de qualidade dos extratos submetidos aos ensaios biológicos, para realizar uma relação direta entre a atividade biológica e o teor analítico do marcador e garantir a reprodutibilidade futura dos resultados biológicos.

Os ensaios biológicos realizados com o inseto praga *D. speciosa* e seus respectivos simbioses de transmissão vertical demonstraram que estes micro-organismos estão diretamente envolvidos no desenvolvimento do inseto e que sua inibição, compromete o desenvolvimento do inseto. Em condições assépticas, principalmente de ovos e solo, o inseto apresentou um melhor desenvolvimento dependendo apenas dos micro-organismos simbioses de transferência vertical para o processamento de alimentos e fornecimento de nutrientes, ou seja, a *D. speciosa* não necessita obter endossimbioses do meio ambiente para seu desenvolvimento. De fato, se observou micro-organismos do meio ambiente podem estar atrapalhando seu desenvolvimento pleno sendo entomopatógenos. Também foi possível concluir que o extrato vegetal *Psidium laruotteanum* alterou o desenvolvimento e alimentação da *D. speciosa*. Através da análise conjunta de todos os resultados foi possível concluir que o inseto já nasce e dependente dos os micro-organismos necessários para seu desenvolvimento, estes micro-organismos são bons alvos de estudo. A inibição e o controle bactericida destes micro-organismos podem afetar no desenvolvimento do inseto e, conseqüentemente ser um novo mecanismo para desenvolver novos “inseticidas”.

## 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y-Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J. D. "Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes". *Science*, **334** : 105, 2011.
2. GOPHNA, U. "The Guts of Dietary Habits". *Science* **334** : 45, 2011.
3. TANNOCK, G. W. "The normal microflora: an introduction". In: *Medical Importance of Normal Microflora*. TANNOCK, G. W. (Ed.). Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 1-23.
4. SEKIROV, I.; RUSSELL, S. L.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. "Gut Microbiota in Health and Disease". *Physiol. Rev.*, **90** : 859, 2010.
5. GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. L.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome". *Science*, **312** : 1355, 2006.
6. TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. "The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice". *Sci. Transl. Med.*, **1** : 1, 2009.
7. DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. "Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa". *PNAS*. **107** : 14691, 2010.
8. FRANK, D. N.; ST. AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A.; BOEDEKER, E. C.; HARPAZ, N.; PACE, N. R. "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases". *PNAS*, **104** : 13780, 2007.
9. FELDHAAR, H.; GROSS, R. "Insects as hosts for mutualistic bacteria". *Int. J. Med. Microb.* **299** : 1, 2009.
10. DENNO, R. F.; FAGAN, W. F. "Might nitrogen limitation promote omnivory among carnivorous arthropods?" *Ecology* **84** : 2522, 2003.
11. COLL, M.; GUERSHON, M. "Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets". *Annu. Rev. Entomol.* **47** : 269, 2002.

12. BAUMANN, P. "Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects". *Annu. Rev. Microbiol.* **59** : 155, 2005.
13. HANSEN, A. K.; MORAN, N. A. "The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects". *Molec Ecol.* Doi: 10.1111/mec.12421, 2013
14. DILLON, R. J.; DILLON, V. M. "The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions". *Ann. Rev. Entomol.*, **49** : 71, 2004.
15. FRAGO, E.; DICKE, M.; GODFRAY, C. J. "Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions". *Trends. Eco. Evol.* **27** : 705, 2012.
16. WERNEGREN, J. J. "Endosymbiosis: lessons in conflict resolution". *PLOS BIOLOGY* **2** : 307, 2004.
17. BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; LAI, C. Y.; ROUHBAKHSH, D.; MORAN, N. A.; CLARK, M. A. "Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids". *Annu. Rev. Microbiol.* **49** : 55, 1995.
18. SCARBOROUGH, C. L.; FERRARI, J.; GODFRAY, H. C. J. "Aphid protected from pathogen by endosymbiont". *Science* **310** : 1781, 2005.
19. VAN DER HEUVEL, J. F. J. M.; HOGENHOUT, S. A.; VERBEEK, M.; VAN DER WILK, F. "Azadirachta indica metabolites interfere with the host-endosymbiont relationship and inhibit the transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*". *Entomol. Exp. Appl.*, **86** : 253, 1998.
20. WERREN, J. H. "Symbionts provide pesticide detoxification". *PNAS*, **109** : 8364, 2012.
21. KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K.; FUKATSU, T. "Symbiont-mediated insecticide resistance". *PNAS* **109** : 8618, 2012
22. CAETANO, F. H.; ZARA, F. J.; BUTION, M. L. "A new strategy of endosymbiont midgut bacteria in ant (Ponerinae)". *Micron.* **41** : 183, 2010.
23. ROUHBAKHSH, D.; BAURNANN, P. "Characterization of a putative 23S-5S rRNA operon of *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids)unlinked to the 16S rRNA-encoding Gene". *Gene* **155** : 107, 1995.
24. STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; HURST, G. D. D. "Wolbachia pipientis: microbial manipulator of arthropod reproduction". *Annu. Rev. Microbiol.* **53** : 71, 1999.

25. OLIVER, K. M.; RUSSELL, J. A.; MORAN, N. A.; HUNTER, M. S. "Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100** : 1803, 2003.
26. MONTLLOR, C. B.; MAXMEN, A.; PURCELL, A. H. "Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress". *Ecol. Entomol.* **27** : 189, 2002.
27. VAHJEN, W.; PIEPER, R.; ZENTEK, J. "Increased dietary zinc oxide changes the bacterial core and enterobacterial composition in the ileum of piglets". *J. Anim. Sci.*, **89** : 2430, 2011.
28. HEIJTZ, R. D.; WANG, S.; ANUAR F.; QIAN, Y.; BJÖRKHOLM, B.; SAMUELSSON, A.; HIBBERD, M. L.; FORSSBERG, H.; PETTERSSON, S. "Normal gut microbiota modulates brain development and behavior". *PNAS*, **108** : 3047, 2011.
29. LEE, J-H.; REGMI, S. C.; KIM, J-A.; CHO, M. H.; YUN, H.; LEE, C-S.; LEE, J. "Apple Flavonoid Phloretin Inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats". *Infect Immun.*, **79** : 4819, 2011.
30. KNOWLES, A. "Recent development of safer formulations of agrochemicals". *Environmentalist* **28** : 35, 2008.
31. DEMENY, P.; MCNICOLL, G. "World Population 1950-2000: Perception and Response". *Population and Development Review*, **32** : 1, 2006.
32. SCHREINEMACHERS, P.; TIPRAQSA, P. "Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries". *Food Policy*, **37** : 616, 2012.
33. CARSON, R. *Silent spring*. Mariner Books – Houghton Mifflin Company, 2002.
34. MIDIO, A. F. E.; MARTINS, D. I. *Herbicidas em alimentos. Aspectos gerais, toxicológicos e analíticos*. São Paulo, Livraria Varela, 1997.
35. PERRIN, R. M. "Crop protection: taking stock for the new millennium". *Crop Protection* **16** : 449, 1997.
36. COOPER, J.; DOBSON, H. "The benefits of pesticides to mankind and the environment". *Crop Protection*, **26** : 1337, 2007.
37. CHARLESTON, D. S.; KFIR, R.; DICKE, M.; VET, L. M. E. "Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth". *Biol Control*, **33** : 131, 2005.

38. DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. "Natural products in crop protection". *Bioorg. Med. Chem.*, **17** : 4022, 2009.
39. CODELL, G. A. "The Convention on Biological Diversity and its Impact on Natural Product Research". In: *Natural Product Chemistry for Drug Discovery*. BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. (Eds). Cambridge, RSC Publishing, 2010. p. 81-139.
40. HARBORNE, J. B. "Systematic significance of variation in defense chemistry in the Solanaceae". In: *Solanaceae, biology and systematic*. D'ARCY, W. G. (Ed). New York, Columbia University Press, 1986. p. 328-344.
41. ARNASON, J. T.; ISMAN, M. B.; PHILOGENE, B. J. R. E.; WADDELL, T. G. "Mode of action of the sesquiterpene lactone tenulin from *Helenium amarum* against herbivorous insects". *J. Nat. Prod.* **54** : 690, 1987.
42. WIGGLESWORTH, V.B. "Endocrinology I" In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. KERKUT, G.A.; GILBERT, L. I. (Ed.). Oxford, Pergamon Press, 1985. p. 1-24.
43. VAN BEEK, T. A.; DE GROOT, A. "Terpenoid antifeedants, part I. An overview of terpenoid antifeedants of natural origin". *Rec. Travaux Chim. Pays-Bas.* **105** : 513, 1986.
44. GIBSON, R. W.; PICKETT, J. A. "Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone". *Nature* **302** : 608, 1983.
45. BROOKS, C. J. W.; WATSON, D. G. "Phytoalexins". *Nat. Prod. Rep.* **2** : 427, 1985.
46. HANSON, J. R. *Natural Products: The Secondary Metabolites*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2003.
47. MORGAN, E. D. "Azadirachtin, a scientific gold mine". *Bioorg. Med. Chem.*, **17** : 4096, 2009.
48. CROOKS, P. A. "Chemical properties of nicotine and other tobacco-related compounds". In: *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and their Metabolites*. GORROD, J. W.; JACOB III, P. (Eds.) Oxford, Elsevier, 1999. p. 69-147.
49. FUKAMI, H.; NAKAJIMA, M. "Rotenone and rotenoids". IN: *Naturally Occurring Insecticides*. JACOBSON, M.; CROSBY, D. G. (Eds). New York, Marcel Dekker Inc., 1971.

50. MIYAZAWA, M.; YOSHIO, K.; ISHIKAWA, Y.; KAMEOKA, H. "Insecticidal alkaloids against *Drosophila melanogaster*". *J. Agric. Food Chem.*, **46** : 1914, 1998.
51. VIANA, P. A.; "Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho". Embrapa, Circular técnica 141, 2010.
52. ZARBIN, P. H. G., RODRIGUES, M. A. C. M. "Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil". *Quim. Nova*, **32** : 722, 2009.
53. GUSMÃO, D. S.; SANTOS, A. V.; MARINI, D. C.; RUSSO, E. S.; PEIXOTO, A. M. D.; JÚNIOR, M. B.; BERBERT-MOLINA, M. A.; LEMOS, F. J. A. "First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association" *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **102** : 919, 2007.
54. CASTELLANI, A. "Viability of some pathogenic fungi in distilled water". *J. Trop. Med. Hyg.* **24** : 270, 1939.
55. WEBSTER, S. J.; DAIGNEAULT, M.; BEWLEY, M. A.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WALMSLEY, S. R.; READ, R. C.; WHYTE, M. K.; DOCKRELL, D. H. "Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease". *J. Immunol.* **185** : 2968, 2010.
56. HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; SARKER, S. D.; MOORE, J. E.; RAO, J. R.; MAZUMDAR, A. "Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth". *LWT - Food Science Technol.*, **44** : 1199, 2011.
57. SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals". *Methods*, **42** : 321, 2007.
58. NCCLS. Normas de Desempenho para Teste de Sensibilidade Antimicrobiana. 15º Suplemento Informativo. ANVISA: M100-S1525(1), 2005.
59. CHAN, S.; HORNER, S. R.; FAUCHET, P. M.; MILLER, B. L. "Identification of Gram Negative Bacteria Using Nanoscale Silicon Microcavities". *J. Am. Chem. Soc.* **123** : 11797, 2001.
60. PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 1ª ed. São Paulo, Pearson Makron Books. 2009.

61. CARVALHAL, M. L.; ALTERTHUM, F. “Morfolgia e estrutura da célula bacteriana”. IN: Microbiologia. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). 4ª Ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 2004. p. 6-19
62. WELKER, M.; MOORE, E. R. B. “Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology”. *Syst. App. Microb.* **34** : 2, 2011.
63. GRIFFIN, T. J.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R. “Advances in proteome analysis by mass spectrometry”. *Current Opinion in Biotechnology*, **12** : 6072001.
64. HELLER, D. N.; FENSELAU, C.; COTTER, R. J.; DEMIREV, P. A.; OLTHOFF J. K.; HONOVICH, J.; UY. M.; TANAKA, T.; KISHIMOTO. Y. “Mass spectral analysis of complex lipids desorbed directly from lyophilized membranes and cells”. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **142** : 194, 1987.
65. HELLER, D. N.; COTTER, R. J.; FENSELAU, C. “Profiling of bacteria by fast-atom-bombardment mass spectrometry”. *Anal. Chem.* **59** : 2806, 1987.
66. CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J.; FERRONI, A.; GUTMANN, L.; NASSIF, X. “MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory”. *Clinical Biochemistry*, **44** : 104, 2011.
67. CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDSJONES, V.; GORDON, D. B. “The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry”. *Nat. Biotechnol.*, **14** : 1584, 1996.
68. HOLLAND, R. D.; WILKES, J. G.; RAFII F.; SUTHERLAND, J. B.; PERSONS, C. C.; VOORHEES K. J.; LAY, J. O.; “Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry”. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **10** : 1227, 1996.
69. KRISHNAMURTHY, T.; ROSS, P. L.; RAJAMANI, U. “Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **10** : 883, 1996.
70. FENN J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. “Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules”. *Science* **246** : 64, 1989.



71. DESPEYROUX, D.; PHILLPOTTS, R.; WATTS, P. "Electrospray mass spectrometry for detection and characterization of purified cricket paralysis virus (CrPV)". *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **10** : 937, 1996.
72. DREISEWERD, K. "The desorption process in MALDI". *Chem. Rev.*, **103** : 395, 2003.
73. LUNDGREN, J. G.; LEHMAN, R. M.; CHEE-SANFORD, J. "Bacterial communities within digestive tracts of ground beetles (Coleoptera: Carabidae)". *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100** : 275, 2007.
74. PRISCHMANN, D. A.; LEHMAN, R. M.; CHISTIE, A. A.; DASHIELL, K.E. "Characterization of bacteria isolated from maize roots: emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica)". *Appl. Soil Ecol.*, **40** : 417, 2008.
75. CHU, C.; SPENCER, J. L.; CURZI, M.J.; ZAVALA, J.A.; SEUFFERHELD, M. J. "Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in western corn rootworm". *PNAS*, **110** : 11917, 2013.
76. IVERSON, K. L.; BROMEL, M. C.; ANDERSON, A. W.; FREEMAN, T. P. "Bacterial symbionts in the sugar beet root maggot, *Tetanops myopaeformis* (von Röder)". *Appl. Environ. Micro.*, **47** : 22, 1984.
77. BELL, J. V. "*Serratia marcescens* found in eggs of *Heliothis zea*: tests against *Trichoplusia ni*". *J. Invert. Pathol.*, **13** : 151, 1969.
78. SIKOROWSKI, P. P.; LAWRENCE, A. M. "Transmission of *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae) in adult *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) laboratory colonies". *Bio. Control*, **12** : 50, 1998.
79. GRABER, J. R.; BREZNAK, J. A. "Folate cross-feeding supports symbiotic homoacetogenic spirochetes". *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** : 1883, 2005.
80. OLIVEIRA, S. M. P.; MORAIS, B. A.; GONÇALVES, C. A.; GIORDANO-DIAS, C. M.; VILELA, M. L.; BRAZIL, R. P.; d'ALMEIDA, J.M.; ASENSI, M. D.; MELLO, R. P. "Microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes de colônia alimentadas com sangue e com sangue e sacarose". *Cad. Saúde Pública*, **17** : 229, 2001.
81. KUZINA, L. V.; PELOQUIN, J. J.; VACEK, D. C.; MILLER, T. A.; "Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae)". *Current Microbiol.* **42** : 290, 2001.

82. FITT, G. P.; O'BRIEN, R. W. "Bacteria associated with four species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae) and their role in the nutrition of the larvae". *Oecologia*, **67** : 447, 1985.
83. MORALES-JIMÉNEZ, J.; ZÚÑIGA, G.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUES, C. "Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeCote (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)". *Microb. Ecol.* **58** : 879, 2009.
84. LAUZON, C. R.; McCOMBS, S. D.; POTTER, S. E.; PEABODY, N. C. "Establishment and vertical passage of *Enterobacter* (*Pantoea*) agglomerans and *Klebsiella pneumonia* through all life stages of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae)". *Arthropod Biology*, **102** : 85, 2009.
85. SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W.; WRIGHT, D. "Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils". *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** : 4855, 2004.
86. BAUMANN, R. "Isolation of *Acinetobacter* from soil and water". *J. Bacteriol.*, **96** : 39, 1968.
87. GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R. C. "Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas". *Curr. Microbiol.* **58** : 371, 2009.
88. CURLEY, C. M.; BRODIE, E. L.; LECHNER, M. G.; PURCELL, A. H. "Exploration for facultative endosymbionts of glassy-winged sharpshooter (Hemiptera: Cicadellidae)". *Ann. Entomol. Soc. Am.* **100** : 345, 2007.
89. PIDIYAR, V. J.; JANGID, K.; PATOLE, M. S.; SHOUCHE, Y. S. "Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16S ribosomal RNA gene analysis". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **70** : 597, 2004.
90. GOUVEIA, C.; ASENSI M. D.; ZAHNER, V.; RANGEL, E. F.; OLIVEIRA, S. M. P. "Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian Population of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva)(Diptera: Psychodidae)". *Neotropical Entomology*, **37** : 597, 2008.
91. MURATOGLU, H.; DEMIRBAG, Z.; SEZEN, K. "The first investigation of the diversity of bacteria associated with *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae)". *Biologia* **66** : 288, 2011.

92. LYNCH, R. E.; LEWIS, L. C.; BRINDLEY, T. A. "Bacteria Associated with eggs and first-instar larvae of the European Corn Borer: identification and frequency of occurrence". *J. of Invert Pathol.* **27** : 229, 1976.
93. RYAN, R. P.; MONCHY, S.; CARDINALE, M.; TAGHAVI, S.; CROSSMAN, L.; AVISON, M. B.; BERG, G.; van der LELIE, D.; DOW, J. M. "The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*". *Nature Reviews*, **7** : 514, 2009
94. CAMPBELL, C. L.; MUMMEY, D. L.; SCHIDTMANN, E. T.; WILSON, W. C. "Culture-independent analysis of midgut microbiota in the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae)". *J. Med. Entomol.* **41** : 340, 2004.
95. CHUNG, S. H.; ROSA, C.; SCULLY, E. D.; PELFFER, M. TOOKER, J. F.; HOOVER, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W. "Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses". *PNAS*, **110** : 15728, 2013.
96. XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. "Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* Gr 12-2 that overproduce indoleacetic acid". *Current Microbiology*, **32** : 68, 1996
97. MARUGG, J. D.; SPANJE, M.; HOEKSTRA, W. P. M.; SCHIPPERS, B.; WEISBEEK, P. J. "Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-simulating *Pseudomonas putida* WCS358". *J. Bacteriol.* **164** : 563, 1985.
98. STURZ, A. V. CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. "Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth" *Bio. Fertil Soils*, **25** : 13, 1997.
99. FISHER, P. J.; PETRINI, O.; SCOTT, H. M. L. "The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.)". *New Phytol.* **122** : 299, 1992.
100. RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. "Bacterial endophytes: recent developments and applications". *FEMS Microbiol. Lett.*, **278** : 1, 2008.
101. ZHOU, J.; HUANG, H.; MENG, K.; SHI, P.; WANG, Y.; LUO, H.; YANG, P.; BAI, Y.; ZHOU, Z.; YAO, B. "Molecular and biochemical

characterization of a novel xylanase from the symbiotic *Sphingobacterium* sp. TN19". *Appl Microbiol Biotechnol.*, **85** : 323, 2009.

102. SCHLOSS, P. D.; DELALIBERA, I.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. F. "Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae)". *Environ. Entomol.* **35** : 625, 2006.

103. MARQUES, A. P. G. C.; PIRES, C.; MOREIRA, H.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. "Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant". *Soil Bio. Biochem.* **42** : 1229, 2010.

104. POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; AS, T. "Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion". *Plant Soil*, **286** : 167, 2006.

105. COSTA, L. E. O.; QUELROZ, M. V.; BROGES, A. C.; MORAES, C. A.; ARAÚJO, F. "Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*)" *Brazilian Journal of Microbiology*, 1562, 2012.

106. YUAN, Y. J.; LU, Z. X.; WU, N.; HUANG, L. J.; LÜ, F. X.; BIE, X. M. "Isolation and preliminary characterization of a novel nicotine-degrading bacterium, *Ochrobactrum intermedium* DN2" *Intern. Biodete. & Biodegra.*, **56** : 45, 2005.

107. LEBUHN, M.; ACHOUAK, W.; SCHLOTTER, M.; BERGE, O.; MEIE, H.; BARAKAT, M.; HARTMANN, A.; HEULIN, T. "Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov". *Intern. J. System. Evol. Microbio.*, **50** : 2207, 2000.

108. VEERANAGOUDA, Y.; PAUL, P. V. E.; GORLA, P.; SIDDAVATTAM, D.; KAREGOUDAR, T. B. "Complete mineralisation of dimethylformamide by *Ochrobactrum* sp. DGVK1 isolated from the soil samples collected from the coalmine leftovers". *Appl Microbiol Biotechnol.*, **71** : 369, 2006.

109. KURTBÖKE, D. I.; FRENCH, J. R. J. "Use of phage battery to investigate the actinoflora layers of termite gut microflora" *J. Appl. Microbio.* **103** : 722, 2007.

110. SCOTT, J. J.; OH, D.C.; YUCEER, M. C.; KLEPZIG, K. D.; CLARDY, J.; CURRIE, C. R. "Bacterial protection of beetle-fungus mutualism". *Science*, 322, 2008.
111. KALTENPOTH, M.; GÖTTLER, W.; HERZNER, G.; STROHM, E. "Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation" *Curr. Bio.* **15** : 475, 2005.
112. CURRIE C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. "Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites" *Nature*, **398** : 701, 1999.
113. ROCHA, E. A. L. S. S.; CARVALHO, A. V. O. R.; ANDRADE, S. R. A.; TROVÃO, D. M. B. M.; COSTA, E. M. M. B. "Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica". *Ver. Ciênc. Farm .Básica. Apl.*, **34** : 351, 2013.
114. FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F. KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F.. "Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan" *BioMed Res. Int.*, 1, 2013.
115. COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A.L.; RÉ-POPPI, N.; MELO, A. M.; VIEIRA, M. C.; HONDA, N.K.; COELHO, R. G. "Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira)" *Bra. J. Pharma.l Scie.* **45** : 767, 2009.
116. CARDOSO, C. A. L.; SALMAZZO, G. R.; HONDA, N. K.; PRATES, C. B.; VIEIRA, M. C.; COELHO, R. G. "Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae)". *J. Med. Food.* **13** : 1273, 2010.
117. JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, S.; RUANGSOMBOON, O. "Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajaVa* Linn. leaf extract". *J. Ethnopharma.* **67** : 203, 1999.

118. NIR, R.; CHANDA, S. "In-vitro antimicrobial activity of psidium guajava l. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains" *Bra.J. Microbio.*, **38** : 4522007.
119. PREETHI, R.; DEVANATHAN, V. V.; LOGANATHAN, M. "Antimicrobial and Antioxidant Efficacy of Some Medicinal Plants Against Food Borne Pathogens" *Advan. Biol. Res.*, **4** : 122, 2010.
120. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. "Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas". *Quim. Nova*, **32** : 1021, 2009.
121. International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
122. BOTEGA, G.; PAGLIOSA, F. M.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. "Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*". *Phytochemistry*, **32** : 1331, 1993.
123. CREVELIN, E. J.; TURATTI, I. C. C.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. "Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography". *Biomed. Chromatogr.*, **20** : 827, 2006.
124. CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, D. S. "A Study of the Trypanocidal Activity of Triterpene Acids Isolated from *Miconia* Species". *Phytother. Res.* **20** : 474, 2006.
125. BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATY, P. L. "Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review". *Food Res. Int.*, **44** : 1776, 2011.
126. KUSHIMA, H.; NISHIJIMA, C. M.; RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SASSÁ, M. F.; BAUAB, T. M.; STASI, L. C.; CARLOS, I. Z.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. "Davilla elliptica and Davilla nitida: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action". *J. Ethnopharm.* **123** : 430, 2009.
127. SOARES, M. L.; BUSTAMANTE, K. G. L.; FIGUEIREDO, A. D. L.; PIMENTA, F. C.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. "Análise da atividade antimicrobiana das folhas de

*Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae)". Ver. Ciênc. Farm. Básica. Apl., **30** : 183, 2009.

128. ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. "Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (LAURACEAE)". Quim. Nova, **30** : 92, 2007.

129. DREWES, S. E.; HUDSON, N. A. "Brackenin, a dimeric dihydrochalcone from *Brackenridgea zanguebarzca*". Phytochemistry, **22** (1) : 2823, 1983.

130. LIEN, T. P.; PORZEL, A.; SCHIMIDT, J.; SUNG, T. V.; ADAM, G. "Chalconoids from *Fissistigma bracteolatum*" Phytochemistry, **53** : 991, 2000.

131. MORÓN, M. A. "Insetos de solo". IN: Pragas de Solo no Brasil. SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; DA SILVA, M. T. B. (Eds.). Dourados: Embrapa Trigo, 2004.

132. CHELLEMI, D. O. "Adaptation of approaches to pest control in low-input agriculture". Crop Protection, **19** : 855, 2000.

133. MARQUES, G. B. C.; ÁVILA C. J.; PARRA J. R. P. "Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho". Pesquisa Agropecuária Brasileira **34** : 1983, 1999.

134. KHALER, A. L.; OLNESS, A. E.; SUTTER, G. R.; DYBING, C. D.; DEVINE, O. J. "Root damage by corn rootworm and nutrient content in maize". Agronomy Journal **77** : 769, 1985.

## Apêndice – A

Espectros de ressonância magnética nuclear de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  para a molécula isolada na fração Ac21.24.

Figura A.1 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para molécula isolada na Fração Ac21.24

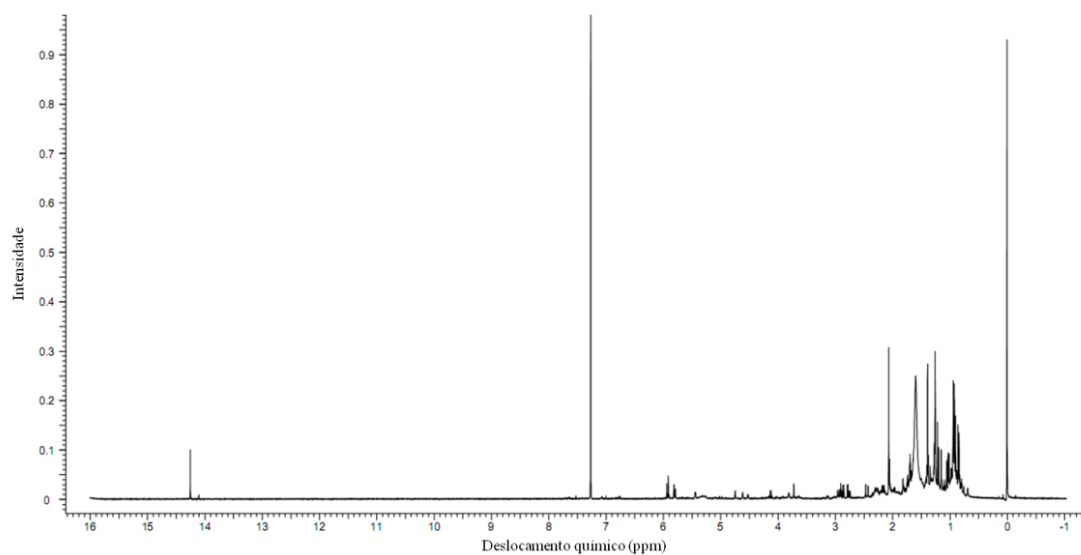
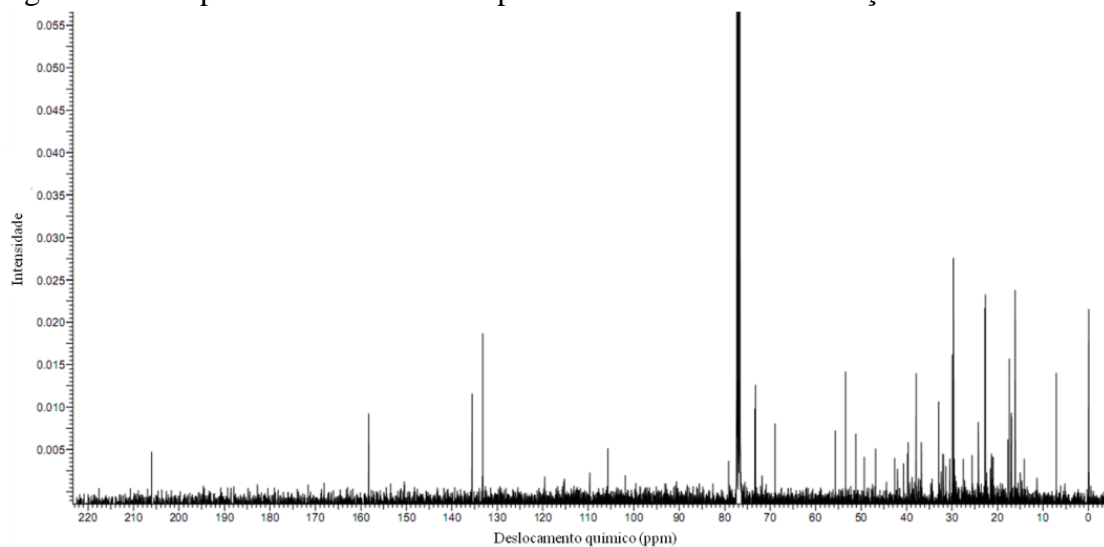


Figura A.2 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para molécula isolada na Fração Ac21.24





## Apêndice – B

Espectros de ressonância magnética nuclear de HSQC e HMBC para a molécula isolada na fração Ac21.24.

Figura B.1 – Mapa de correlação HSQC para molécula isolada na Fração Ac21.24

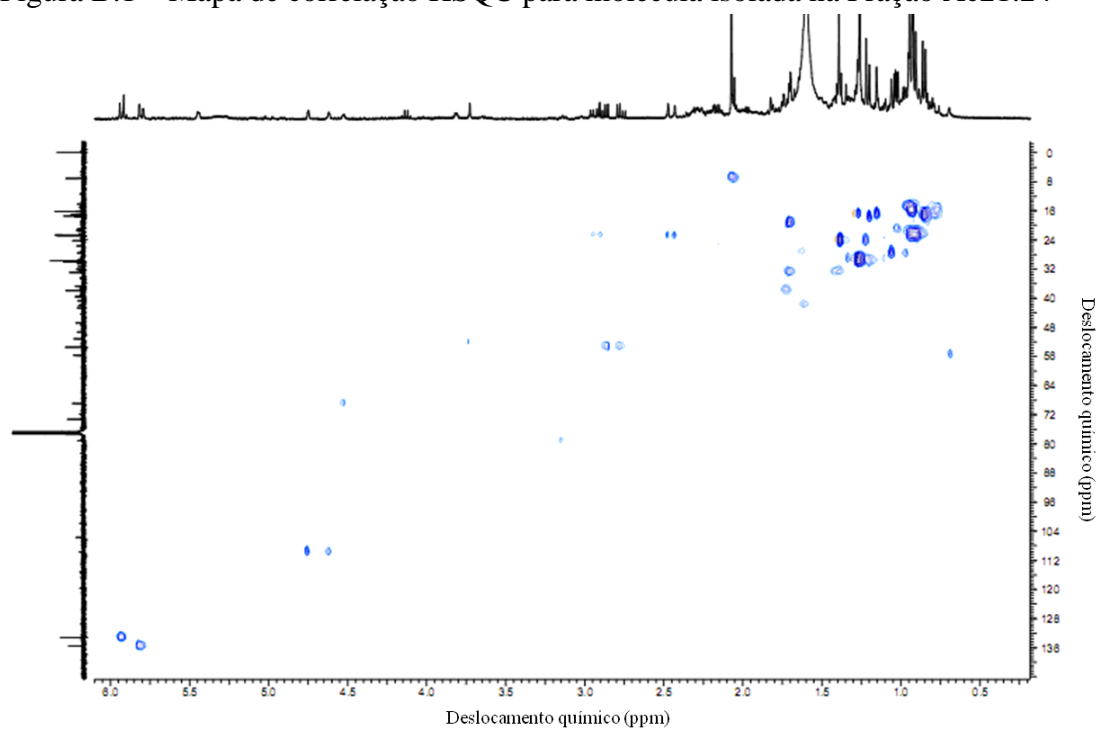


Figura B.2 – Mapa de correlação HMBC para molécula isolada na Fração Ac21.24

