

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

Isolamento, identificação fenogenotípica e potencial bioativo de
microrganismos endofíticos intrinsecamente associados à *Miconia albicans*
no Cerrado de São Carlos - SP.

Ana Candida Martins Toledo Piza

São Carlos

2009

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

Isolamento, identificação fenogenotípica e potencial bioativo de
microrganismos endofíticos intrinsecamente associados à *Miconia albicans*
no Cerrado de São Carlos - SP.

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

Orientada: Ana Candida Martins Toledo Piza
Orientadores: Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

São Carlos

2009

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

P695ii

Piza, Ana Candida Martins Toledo.

Isolamento, identificação fenogenotípica e potencial bioativo de microrganismos endofíticos intrinsecamente associados à *Miconia albicans* no Cerrado de São Carlos - SP / Ana Candida Martins Toledo Piza. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

53 f.

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

1. Microbiologia. 2. Microrganismos endofíticos. 3. *Miconia albicans*. 4. Cerrado. 5. Bioatividade. I. Título.

CDD: 576 (20ª)

Ana Candida Martins Toledo Piza

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

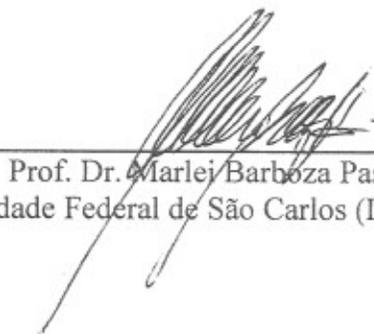
Aprovado em: 03/09/2009

BANCA EXAMINADORA



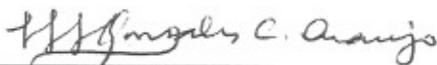
Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa (Orientadora)

Universidade Federal de São Carlos – Depto. de Morfologia e Patologia



Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto

Universidade Federal de São Carlos (DEQ-UFSCar)



Profa. Dra. Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo

Instituto de Química da UNESP - Araraquara

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, Maria Cândida, pela enorme força, incentivo, carinho e dedicação. Por ter conseguido, apesar de todas as dificuldades, formar seus filhos, sempre com muita humildade, amor e respeito;

Ao meu queridíssimo amigo e irmão Pedro Piza, pelas conversas, incentivos, carinho e amizade dedicados apesar da distância;

À minha cunhada, Magda, pelo apoio e atenção nos mais diversos momentos de minha vida;

Ao meu namorado, Mateus, pelo imenso carinho, atenção, paciência e aulas de dança;

À minha queridíssima orientadora, Profa. Dra. Cristina Paiva de Souza, por ter me recebido tão bem em seu laboratório. Pelas idéias, sugestões e trabalhos árduos, sem nunca perder seu jeito meigo e carinhoso. Uma mulher extremamente competente, com muita garra e determinação na qual faço questão de me espelhar.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka, por estar sempre aberto à discussões e disposto a nos auxiliar.

Às amigas Regiane e Nadja, pelo imenso companheirismo, apoio, carinho, amizade, incentivo e pelos momentos de alegria compartilhados.

As colegas de laboratório, Regiane Crisóstomo, Thaís e Cristiane, pelo carinho e amizade;

A todos os técnicos do laboratório de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar;

Aos colegas da Pós-Graduação pelos momentos de estudo e dedicação durante a obtenção dos créditos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

Principalmente a Deus, por ter me colocado ao lado de pessoas tão especiais!!!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos meus amigos e familiares que me acompanharam e me apoiaram nessa etapa de minha vida.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo Geral.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1. Sítio de coleta.....	10
3.2. Material vegetal.....	10
3.3. Isolamento dos microrganismos endofíticos.....	11
3.4. Caracterização fenotípica.....	12
3.4.1. Características macroscópicas.....	12
3.4.2. Características fisiológicas.....	12
3.4.3. Características bioquímicas.....	13
3.4.4. Características morfo-tintoriais.....	14
3.5. Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada).....	14
3.6. Identificação genotípica.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Aspectos morfológicos dos isolados.....	17

4.2. Teste de produção de pigmentos.....	26
4.3. Teste de assimilação de fontes de carbono.....	29
4.4. Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada).....	32
4.5. Identificação genotípica.....	39
5. CONCLUSÕES.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Brain Heart Infusion (Caldo Infusão Cérebro Coração)

Cat: Catalase

IAL: *Instituto Adolpho Lutz*

ISP2: Ágar extrato de malte e levedura

ISP2A : Ágar extrato de malte, levedura e amido

TSB: Tryptic Soy Broth (Caldo Triptona- soja)

YE: Ágar extrato de levedura

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Determinação fenotípica através de caracterização macroscópica, morfotintorial, fisiológica e bioquímica de microrganismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos, SP. Pág 19
- Tabela 2.** Antibiose apresentada por microrganismos endofíticos isolados de *M. albicans* contra microrganismos indicadores e mensurada por halos de inibição (cm). Pág 39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** amostra 1 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 20
- Figura 2:** amostra 2 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 21
- Figura 3:** amostra 3 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans* : (A) frente e (B) verso. Pág. 22
- Figura 4:** amostra 4 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 22
- Figura 5:** amostra 5 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 23
- Figura 6:** amostra 6 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 24
- Figura 7:** amostra 7 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 24
- Figura 8:** amostra 8 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso. Pág. 25
- Figura 9:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 1) não produtor de pigmentos. Pág. 26
- Figura 10:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 2) não produtor de pigmentos. Pág. 26
- Figura 11:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 3) não produtor de pigmentos. Pág. 27
- Figura 12:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 4) não produtor de pigmentos. Pág. 27

- Figura 13:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 5) produtor de pigmento esverdeado. Pág. 27
- Figura 14:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 6) produtor de pigmento alaranjado. Pág. 28
- Figura 15:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 7) produtora de pigmento alaranjado. Pág. 28
- Figura 16:** Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 8) produtor de pigmento alaranjado. Pág. 28
- Figura 17:** Amostra 1 - Halos formados pela degradação do amido. Pág. 30
- Figura 18:** Amostra 2 - Halos formados pela degradação do amido. Pág. 30
- Figura 19:** Amostra 3 - Halos formados pela degradação do amido. Pág.30
- Figura 20:** Amostra 5 - Halos formados pela degradação de amido. Pág.31
- Figura 21:** Amostra 6 - Halos sutis formados pela degradação do amido. Pág.31
- Figura 22:** Amostra 7 - Halos formados pela degradação do amido. Pág. 31
- Figura 23:** Amostra 8 - Ausência da produção de halos de degradação de amido. Pág. 32
- Figura 24:** Bioatividade mensurada por halo de inibição do endofítico isolado de *M.albicans* contra *E. faecalis* (amostra 1). Pág. 33
- Figura 25:** Halos de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 2) contra *S. marcesis*. Pág. 33
- Figura 26:** Atividade antagônica do microrganismo isolado contra o indicador *E. faecalis* (amostra 3). Pág. 34
- Figura 27:** Produção de halos de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 4) contra *S. aureus* (A) e *Enterococcus* (B). Pág. 35

Figura 28: Halo de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 4) contra *C. albicans* (A) e contra *S. sonnei* (B). Pág. 35

Figura 29: Halo de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 6) contra *E. faecalis* (A) e contra *S. aureus* (B). Pág. 36

Figura 30: Atividade antagônica do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 8) contra *E. faecalis* (A) e *S. aureus* (B). Pág. 38

Figura 31: Halos de bioatividade da amostra 8 contra *Candida albicans* (A) e *Shigella sonnei* (B). Pág. 38

“Os esforçados vão longe, os ousados vão além”

Autor desconhecido

RESUMO

Microrganismos endofíticos vivem em associação simbiótica com plantas e habitam nichos biológicos únicos, além de serem potenciais produtores de substâncias naturais bioativas com estrutura química e atividade biológica diversas. Este trabalho objetivou isolar e caracterizar microrganismos endofíticos a partir de *Miconia albicans* do Cerrado de São Carlos – SP. Amostras foram caracterizadas fenotipicamente a partir de tipicidade de morfologia colonial e determinações macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfo-tintoriais e genotipicamente através de análises de RNAr 16S. Foi avaliado o potencial antagônico dos isolados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 10231. Duas amostras (1 e 3) apresentaram bioatividade contra *E. faecalis*, com halos de inibição de 1,30 e 1,90 cm de diâmetro, respectivamente. Uma única amostra (2) apresentou atividade contra *S. marcescens* (3,60 cm), não apresentando bioatividade contra os demais microrganismos testados. Em uma amostra (4) observou-se atividade contra quatro dos seis microrganismos testados: *E. faecalis* (3,15 cm), *S. aureus* (3,50 cm), *C. albicans* (3,35 cm) e *S. sonnei* (3,20 cm). Em outra amostra (6) detectou-se bioatividade contra *E. faecalis* e *S. aureus*, com halos de inibição de 1,80 e 1,50 cm, respectivamente. Uma das amostras (8) apresentou bioatividade contra o maior número de microrganismos indicadores, com halos inibitórios de 2,60 cm contra *E. faecalis*, 1,50 cm contra *S. aureus*, 2,40 cm contra *C. albicans*, 2,10 cm contra *E. coli* e 2,50 cm contra *S. sonnei*. Em duas amostras (5 e 7) não foi evidenciada habilidade bioativa contra os microrganismos indicadores testados. Análises fenotípicas dos 8 microrganismos endofíticos isolados permitiram classificar 50% destes (amostras 4, 6, 7 e 8) no grupo *Actinomyces* e os outros foram classificados no gênero *Streptomyces* (amostras 1, 2, 3 e 5). Na análise genotípica dois dos isolados apresentando bioatividade foram caracterizados como *Nocardioopsis dassonvillei* (amostra 3) e *Amycolatopsis orientalis* (amostra 8), relatando pela primeira vez sua associação endofítica com partes aéreas de *Miconia albicans* do Cerrado de São Carlos, SP.

Palavras-chave: microrganismos endofíticos, *Miconia albicans*, Cerrado, bioatividade.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms live in symbiotic association with plants and in one unique biological niche, and they are potential producers of natural bioactive substances with different chemical structure and biological activity. This study aimed to isolate and characterize endophytic microorganisms from *Miconia albicans* from Cerrado of São Carlos - SP. Samples were characterized phenotypically from typical features of colony morphology and macroscopic measurements, physiological, biochemical and morpho-dyeing and genotypically by 16S rRNA analysis. We evaluated the antagonistic potential of the isolates against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 and *Candida albicans* ATCC 10231. Two samples (1 and 3) showed bioactivity against *E. faecalis*, with inhibition halos of 1.30 and 1.90 cm in diameter, respectively. A single sample (2) showed activity against *S. marcescens* (3.60 cm) with no significant bioactivity against the other microorganisms tested. In one sample (4) showed activity against four of the six microorganisms tested: *E. faecalis* (3,15 cm), *S. aureus* (3,50 cm), *C. albicans* (3,35 cm) e *S. sonnei* (3,20 cm). In another sample (6) was detected bioactivity against *E. faecalis* and *S. aureus*, with inhibition zones of 1.80 and 1.50 cm, respectively. One of the samples (8) showed bioactivity against the greatest number of indicator microorganisms with inhibitory halos of 2.60 cm against *E. faecalis*, 1.50 cm against *S. aureus*, 2.40 cm against *C. albicans*, 2.10 cm against *E. coli* and 2.50 cm against *S. sonnei*. In two samples (5 and 7) there was no evidence the bioactive ability against indicator microorganisms tested. Phenotypic analysis of 8 endophytic microorganisms isolated allowed us to classify 50% of these (samples 4, 6, 7 and 8) in the *Actinomyces* group and the others were classified in the genus *Streptomyces* (samples 1, 2, 3 and 5). In the genotypic analysis of two isolates with bioactivity were identified as *Nocardioopsis Dassionville* (sample 3) and *Amycolatopsis orientalis* (sample 8), reporting for the first time his association with endophytic aerial parts of *Miconia albicans* from Cerrado of São Carlos, SP.

Key-words: endophytic microorganisms, *Miconia albicans*, Cerrado, bioactivity.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a frequência da resistência microbiana em associação com sérias doenças infecciosas tem aumentado progressivamente (Jones, 2001). Essa resistência desenvolvida por muitos microrganismos tanto contra antibióticos de uso convencional como contra antibióticos de última geração tem causado graves problemas de saúde pública e aumento nos custos do sistema de saúde (Austin, 1999), deixando visível a necessidade de busca de novos compostos bioativos que proporcionem melhora na qualidade de vida da população.

O uso contínuo e não controlado de antibióticos favorece a disseminação da resistência de bactérias, e este fenômeno tem se tornado uma ameaça aos tratamentos de doenças infecciosas, com casos de patógenos resistentes a quase todos os antibacterianos existentes no mercado (Viksveen, 2003).

A resistência microbiana é particularmente mais preocupante em países em desenvolvimento, onde as doenças infecciosas são mais constantes e a prevenção exige o uso de agentes que maximizam custos (Sousa, 2008; Barbosa, 2009).

Staphylococcus aureus é um importante exemplo de microrganismo resistente, associado a altas taxas de mortalidade (Farias *et al.*, 1997). De acordo com Tavares (2000), no Brasil mais de 80% de *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% de pacientes domiciliares apresentaram resistência a penicilina, ampicilina e amoxicilina.

A seleção de microrganismos patogênicos resistentes a compostos antimicrobianos químicos tem tornado o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (Crisan *et al.*, 1995).

Essa seleção de bactérias resistentes, devido ao uso inadequado de antibióticos pela população, enfatiza a necessidade de exploração de nichos que alberguem

microrganismos produtores de novos metabólitos secundários bioativos. Sendo assim, o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a produção desses novos compostos provenientes de microrganismos produtores de moléculas bioativas é iminente.

As tecnologias para a busca de novos antibióticos melhoraram drasticamente durante a década passada, juntamente com a apreciação de uma riquíssima fonte de biodiversidade no mundo – particularmente a bacteriana – enfatizando a necessidade da descoberta de antibióticos oriundos de fontes naturais.

O Brasil é um país que apresenta uma biodiversidade imensa. Nele encontramos aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta. A variedade de biomas reflete a riqueza da flora e fauna brasileiras, tornando-as as mais diversas do mundo. Assim, o país possui um grande potencial de desenvolvimento de produtos biotecnológicos e a ampliação de conhecimentos e incremento da capacidade de produção industrial nacional de produtos naturais é evidente.

Atualmente os maiores produtores de substâncias com utilização em indústrias farmacêuticas, agroquímicas, entre outras, a partir de fontes naturais, são os países desenvolvidos mesmo não apresentando uma significativa biodiversidade (Pinto *et al.*, 2002).

Um dos biomas com uma grande riqueza de espécies é o Cerrado diferindo de outros biomas devido à elevada diversidade de espécies vegetais (Damascos *et al.*, 2005). O Cerrado ocupa aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados do território brasileiro e corresponde a 23% do país (Dias, 1992), perdendo apenas para a Amazônia (Klink & Machado, 2005).

Essa é uma região de clima estacional onde um período chuvoso (outubro a março) é alternado por um período seco (abril a setembro). A precipitação média anual

é de 1.500 mm, além de ser caracterizada por temperaturas amenas ao longo do ano, entre 22 e 27 °C em média (Klink & Machado, 2005).

Mendonça *et al.* (1998) relatam que nesse bioma o número de plantas vasculares é muito grande somando mais de 7000 espécies dentre herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós. Além disso, o endemismo de plantas é extremamente elevado, somando cerca de 44 %, tornando o Cerrado a mais diversificada savana tropical do mundo, gerando uma grande diversidade de habitats característicos e alternância de espécies (Klink & Machado, 2005).

De acordo com Ratter *et al.* (1997), o número de espécies congênicas crescendo juntas numa pequena área do Cerrado pode ser surpreendentemente alto. Na reserva ecológica de Brasília, por exemplo, seis espécies de *Miconia* e *Byrsonima* e 5 espécies de *Erythroxylum* e *Kielmeyera*, podem ser encontradas.

Apesar da biodiversidade desse bioma, seu potencial ainda é pouco explorado, embora haja crescentes interesses no seu estudo.

Miconia albicans, popularmente conhecida como “quaresmeira-branca” é uma espécie abundante e nativa do Cerrado com potencial bioativo. Em literatura consultada não são descritas relações desta planta com microrganismos endofíticos. Trabalhos descrevendo a atividade do extrato da planta podem ser encontrados, como o de Rodrigues *et al.* (2008), que demonstraram atividade antimicrobiana de extratos metanólicos e clorofórmicos das folhas de *Miconia* spp.

De acordo com Damascos *et al.* (2005), esta espécie cresce em áreas ensolaradas como arbustos ou pequenas árvores alcançando aproximadamente 3,0 metros. A inserção de suas folhas ocorre de forma oposta e através de inserções em cruz e apresenta textura frontal coriácea. Suas folhagens são permanentes durante o ano inteiro. Produz flores, galhos e folhas regularmente.

Estudos conduzidos por Vasconcelos *et al.*, (2003), sugerem a propriedade analgésica em extrato cru da planta. Estes mesmos autores verificaram que *M. albicans* apresentou características anti-inflamatórias satisfatórias em seus testes. A ausência de herbívoros nessa espécie vegetal pode indicar um mecanismo químico de defesa anti-herbívoro eficiente (Damascos *et al.*, 2005).

O uso de substâncias bioativas obtidas de plantas é uma das práticas mais antigas e universais praticadas pelo homem. Muitos medicamentos usados pela população têm suas origens em plantas medicinais, cujos princípios ativos são amplamente utilizados pela indústria farmacêutica, tais como: aspirina, efedrina, atropina, policarpina, dentre outros (Botsaris, 1998). No Brasil, o uso de plantas é bastante difundido na população, até pelo fato de, muitas vezes, ser o único recurso terapêutico em algumas comunidades (Maciel *et al.*, 2002).

Como podemos observar, essas plantas têm um grande valor econômico agregado, não só pela sua aplicação em indústrias farmacêuticas, mas também, indústrias alimentícias, agroquímicas, cosméticas, dentre outras (Phillipson, 1998).

No entanto, novos estudos (Piza *et al.*, 2008) têm relatado que muitas substâncias obtidas a partir de plantas têm sua origem no metabolismo de microrganismos que habitam o seu interior, conhecidos como endofíticos. Esses microrganismos vivem em associação íntima com as plantas, sem causar aparentemente nenhum dano aos seus hospedeiros (Hallmann *et al.*, 1997; Petrini, 1991) ou desenvolvendo com eles uma relação simbiótica (Owen & Hundley, 2004). Porém, Stone (1986) afirma a possibilidade de ocorrência de microrganismos oportunistas, ou seja, aqueles que se tornam patogênicos se o organismo estiver debilitado.

Embora tenham sido descritos no início do século XIX, foi nos últimos 20 anos que os microrganismos endofíticos vêm sendo mais estudados, quando seus efeitos

benéficos sobre plantas, através de interações simbióticas com o hospedeiro, foram reconhecidos pelo uso de técnicas biotecnológicas que têm apresentado um rápido desenvolvimento (Azevedo, 1999).

Uma das vantagens na utilização de microrganismos endofíticos está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas (Schutz, 2001), potencialmente úteis na produção de metabólitos de interesse biotecnológico, sendo utilizadas em indústrias farmacêuticas e alimentícias, no controle de pragas e fitopatógenos, na promoção de crescimento vegetal e produção de produtos biológicos (Cerigioli, 2005).

Fungos e bactérias são os microrganismos endofíticos mais conhecidos e com maior produção de substâncias bioativas (Dreyfus, 1994; Strobel, 2003). De acordo com Cao *et al.* (2003), essas substâncias, também conhecidas como metabólitos secundários, conduzem um aumento na resistência das plantas contra stress, infecções patogênicas, influenciando assim em seu desenvolvimento.

Clay (1992) disserta que endofíticos são importantes componentes da biodiversidade microbiana, uma vez que um número muito grande de espécies pode ser encontrado em uma única planta. Estes microrganismos geralmente colonizam espaços inter-celulares, porém, vêm sendo isolados de todos os compartimentos da planta, incluindo as sementes (Posada & Vega, 2005).

Os endófitos em geral, são de fácil cultivo, sendo necessário primeiramente à desinfecção da superfície das plantas para que haja a eliminação dos microrganismos epifíticos, isto é, que vivem na superfície dos tecidos e órgãos vegetais (Petrini & Muller, 1986). Esses endofíticos podem ser isolados a partir da maceração ou extração a partir de tecidos internos (Miche & Balandreau, 2001).

Em quase todas as espécies de plantas vasculares estudadas até agora foram encontradas bactérias e/ou fungos endofíticos (Sturz, 2000). Além disso, a colonização de endofíticos em algas marinhas (Smith *et al.*, 1989; Stanley, 1992) e musgos (Petrini, 1992; Raviraja *et al.*, 1996) também foram documentadas, demonstrando a grande extensão de nichos destes microrganismos.

Além desses, microrganismos provenientes de sedimento marinho também vêm sendo bastante estudados. Neurotoxinas, substâncias com atividade anti-cancerígena, antivirais, anticoagulantes e antitrombóticos são algumas das atividades apresentadas por eles. Seus metabólitos secundários apresentam características químicas únicas e sem precedentes em fontes naturais terrestres (Hopwood, 2007).

Recentemente, Hopwood (2007) detectou um novo gênero de actinomicetos provenientes de sedimentos marinhos. Esse novo gênero conhecido como *Salinispora* produz componentes com estruturas não usuais, como a salinosporina A que apresenta atividade anticancerígena.

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

Streptomyces pertence a um grande grupo de bactérias filamentosas, que fazem parte do grupo dos actinomicetos. As espécies de *Streptomyces* tem um micélio aéreo bem desenvolvido, não fragmentado produzem cadeias de esporos por segmentação de hifas e são aeróbios estritos. Seu habitat é o solo e produzem odor de terra característico. Algumas espécies (*Streptomyces somalienses*) podem produzir doenças no homem, no entanto a maior parte das espécies produz antibióticos. Os organismos

são Gram-positivos e filamentosos. Suas colônias são macias, mas se tornam pulverulentas ou algodonosas à medida que o micélio aéreo e os esporos se desenvolvem. As colônias têm crescimento lento, necessitando em torno de sete a dez dias para desenvolver suas hifas aéreas (Hopwood, 2007).

Esse grupo de bactérias representa uma grande parte de microrganismos oriundos do solo, embora também possam ser encontrados naturalmente em outros nichos, inclusive em interações com plantas, demonstrando sua proteção contra patógenos e a influência da produção de seus produtos metabólicos no desenvolvimento das mesmas (Sardi *et al.*, 1992).

A maioria de espécies produtoras de antibióticos atualmente faz parte do grupo dos actinomicetos e em particular o gênero *Streptomyces* é o que apresenta maior interesse comercial, uma vez que, mais de 80% dos antibióticos produzidos industrialmente são processados por espécies desse gênero (Challis & Hopwood, 2003).

Gurney and Mantley *apud* Zhang *et al.* (2006) realizaram a identificação da substância 1-N-methylalbonoursina, produzida por *Streptomyces* spp. isolado de sementes de centeio. Esta descoberta despertou na comunidade científica um grande interesse pelos actinomicetos endofíticos. Desde então as pesquisas vêm enfocando a identificação das moléculas bioativas produzidas por estes microrganismos.

Castillo *et al.* (2002), por exemplo, isolaram *Streptomyces* spp. de *Kennedia nigriscans*, planta medicinal nativa do norte da Austrália, produtor de mununbicina E4 e E5, um antibiótico de amplo espectro contra patógenos humanos e de plantas.

Outro exemplo é o de Lin *et al.* (2005) que isolaram *Streptomyces* spp. endofítico de *Aegiceras comiculatum* produtor de 4 novos derivados do ciclopentanos.

Além desses, no trabalho realizado por Strobel (2007) ficou constatada a atividade antifúngica de três *Streptomyces* endofíticos isoladas das plantas medicinais *Thottea grandiflora*, *Polyalthia* spp. e *Mapania* spp.

Uma das vantagens na utilização de microrganismos endofíticos está associada a sua capacidade metabólica de produzir uma grande quantidade de moléculas bioativas, potencialmente úteis na produção de metabólitos de interesse biotecnológico. A descoberta e isolamento desses microrganismos endofíticos associados a plantas do Cerrado de São Carlos é importante e justifica a realização desse trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar o isolamento de actinomicetos endofíticos a partir da planta *Miconia albicans*, da região do Cerrado (São Carlos, SP) e avaliar o potencial de produção de substâncias bioativas pelos isolados.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar microrganismos endofíticos a partir da planta *Miconia albicans*, nativa do Cerrado da região de São Carlos, SP;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados enfatizando características de morfologia colonial e determinando características macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfo-tintoriais;
- Realizar a triagem dos actinomicetos isolados considerando suas características fenotípicas;
- Realizar a identificação genotípica por análise de RNAr 16S;
- Avaliar o potencial antagônico dos isolados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Shigella sonnei* ATCC 10231 e *Candida albicans* ATCC 10231.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sítio de coleta

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

3.2. Material vegetal

As plantas foram selecionadas em seu habitat natural utilizando-se como base sua importância farmacêutica ou natureza perenial, além da habilidade potencial de suportar ecossistemas bacterianos estáveis. Foram coletados folhas e galhos de *Miconia albicans* (Quaresmeira Branca), espécie típica do Cerrado da região de São Carlos, São Paulo. Este vegetal cresce em áreas ensolaradas como arbustos ou pequenas árvores alcançando cerca de 3,0 metros de altura. A inserção das folhas, cuja textura frontal é coriácea, ocorre de forma oposta e formando inserções em cruz. *M. albicans* apresenta folhagem perene durante todo o ano, produzindo botões florais, novos galhos, brotos e folhas regularmente. Microrganismos endofíticos, potencialmente produtores de substâncias bioativas, foram isolados a partir do consórcio desenvolvido com esta planta selecionada. Amostras de partes das plantas coletadas (caule e folhas) com aproximadamente 25 g foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e transportadas até ao laboratório para a realização dos procedimentos analíticos de isolamento e identificação de microrganismos endofíticos.

3.3. Isolamento dos microrganismos endofíticos

Os caules e folhas coletadas foram submetidos à lavagem superficial em água corrente para remoção de substâncias aderidas à superfície.

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

Posteriormente, 25 g das amostras foram trituradas em 225 mL de solução salina (0,85% m/v) e filtradas. Foram realizadas diluições decimais seriadas (10^{-2} à 10^{-6}) e alíquotas de 200 µl foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo os meios ISP2A (ágar extrato de malte e levedura adicionado de amido 10%) e YE (ágar extrato de levedura) (Shirling & Gottlieb, 1966).

As purificações das colônias isoladas dos tecidos vegetais foram realizadas por esgotamento utilizando-se alças de níquel cromo em ISP2A e YE e os microrganismos foram agrupados de acordo com características fenotípicas de actinomicetos: colônias pequenas (1 a 10 mm de diâmetro), inicialmente com aparência macia e sem brilho, passando a apresentar depois do desenvolvimento do micélio aéreo, um aspecto granuloso e forte adesão ao meio de cultura. Colônias que apresentaram estas características foram consideradas típicas e utilizadas nos bioensaios.

Posteriormente, realizaram-se caracterizações fenotípicas microbianas ao nível de gênero. Foram consideradas colônias típicas de *Streptomyces* spp. as que apresentaram coloração branco-acinzentada, ou coloridas, sem brilho, com aparência pulverulenta ou cotonosa com adesão colonial penetrando fortemente no ágar (Strobel, 2003) e odor característico de “terra molhada”, sugerindo a produção de geosmina.

(Jiang & Cane, 2008). Colônias identificadas apresentando estas características foram selecionadas para realização de testes de bioatividade.

3.4. Caracterização fenotípica

As cepas isoladas foram identificadas de acordo com critérios morfológicos, incluindo características coloniais, morfologia do micélio aéreo, coloração de esporos e produção de pigmentos (Goodfellow & Cross, 1984). As cepas pertencentes ao grupo de actinomicetos foram agrupadas distintamente de acordo com a morfologia colonial total e culturas representativas foram preservadas.

Na caracterização de *Streptomyces* spp. foram analisadas as seguintes características: i) macroscópicas; ii) fisiológicas; iii) características bioquímicas e iv) morfológicas-tintoriais (Hasegawa, 1983; Fisher *et al.*, 2003).

3.4.1. Características macroscópicas

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

3.4.2. Características fisiológicas

Para a análise de formação de pigmentos os microrganismos foram observados em meio líquido utilizando-se o caldo YE (Shirling & Gottlieb, 1966). De acordo com Goodfellow & Willians (1983), muitas linhagens de actinomicetos, incluindo

Streptomyces são capazes de degradar polissacarídeos complexos como amido, pectina e quitina, por produzirem a enzima amilase. Na assimilação de fontes de carbono foi utilizado o meio ISP2A. A utilização do amido como fonte de carbono pôde ser observada quando houve degradação deste carboidrato, resultando em formação de halo. Como controle negativo foi utilizado o meio ISP2 (sem o amido) sendo que a não formação do halo demonstra que o amido foi degradado no meio ISP2A.

3.4.3. Características bioquímicas

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

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

Alguns membros dos Actinomicetos como o *Streptomyces coelicolor*, espécie mais estudada, produz três catalases distintas (Hahn, *et al.*, 2000) para proteger-se do stress osmótico e oxidativo, e permitir crescimento e diferenciação apropriados. A catalase

mais importante (*cat A*) é induzida pelo peróxido de hidrogênio, e é requerida para eficiente crescimento aeróbico.

3.4.4. Características morfo-tintoriais

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

3.5. Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada)

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

Colônias de microrganismos endofíticos selecionadas foram diluídas em solução salina (0,85% m/v) e alíquotas de 20µL foram depositadas em placas de Petri contendo os meios ISP2A e YE e incubadas (28°C/4 dias). As colônias foram tratadas com clorofórmio (20 min) para inativação microbiana e as placas foram mantidas semi-abertas durante 30 minutos para a evaporação dos vapores da substância. Microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), Gram-negativos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* IAL 1475 e *Shigella sonnei* ATCC 1578) e um fungo leveduriforme (*Candida albicans* ATCC 10231), foram usados como indicadores e utilizados no teste de antibiose (Moura & Romeiro, 1999). Estes microrganismos foram selecionados pela

importância em Saúde Pública, uma vez que são relacionados com surtos de infecções hospitalares e alimentares, além de serem implicados em outras doenças. Para tal, as cepas que eram mantidas em bacterioteca a - 20°C foram reativadas em um tubo contendo caldo BHI (caldo infusão cérebro-coração). Após incubação (24 h / 37°C), 200 µL das culturas previamente reativadas foram transferidas a um tubo contendo 10 mL de BHI semi-sólido. Este foi agitado e a solução vertida na superfície de placas contendo cada um dos microrganismos previamente inativados. As placas foram incubadas (37 °C por 24–48 h) para verificação e mensuração de halos de inibição (Ratti *et al.*, 2008).

3.6. Identificação genotípica

Os endofíticos selecionados foram identificados pelo método de amplificação e seqüenciamento do RNA ribossomal 16S, na Universidade de Montreal, Canadá. A extração de DNA genômico total dos isolados bacterianos foi realizada utilizando o mini kit QIAamp DNA (Qiagen). 5µL da amostra contendo DNA molde foi adicionada a 15µL da mistura reacional (Qiagen Fast Cycling PCR Kit). Os primers usados na reação foram 27F 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3' e 519R 5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG – 3'.

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

As seqüências foram comparadas no NCBI GenBank usando-se como ferramenta o BLAST (National Center for Biotechnology Information - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos morfológicos dos isolados

Após análises microbiológicas, bioquímicas e taxonômicas de microrganismos endofíticos isolados de folhas e caules de *Miconia albicans*, 8 linhagens que apresentaram características fenotípicas próprias de actinomicetos foram selecionadas. Estas propriedades podem ser visualizadas na Tabela 1. Sardi *et al.* (1992), em trabalho isolando *Streptomyces* endofíticos de 28 espécies de plantas do noroeste da Itália, verificaram características culturais e morfológicas (presença de esporos, micélio aéreo, coloração das colônias e pigmentação) dos microrganismos, através de análises similares às realizadas no presente trabalho.

Pode-se observar na Tabela 1 que das oito amostras estudadas, seis (75 %) apresentaram um melhor crescimento no meio YE. As outras duas amostras (25 %) cresceram melhor em ISP2A. É interessante destacar que estas amostras apresentaram-se como Actinomicetos. Todas as amostras apresentaram-se como Gram +, não álcool-ácido resistentes, catalase + e produtoras de esporos. Estas características são a base inicial para caracterização de organismos como Actinomicetos.

Compostos complexos não são facilmente degradáveis pela maior parte de organismos bacterianos, mas *Actinomyces* possui esta habilidade. Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que a maior parte das amostras (87,5 %) degradou amido. A maioria das amostras apresentou tamanho colonial pequeno ou médio, com exceção das amostras 5 e 6, dados coincidentes com Sardi *et al.*, (1992). Das colônias cultivadas em caldo YE, específico para análise de produção de pigmentos, 50 % das amostras apresentaram produção. Sardi *et al.* (1992) observaram que a produção de pigmentos estava presente em apenas uma amostra. As amostras produtoras de pigmentos

apresentaram esta habilidade quando semeadas em YE e ISP2A. No entanto, a amostra dois apresentou comportamento diferente, produzindo pigmentos apenas no meio ISP2A.

Todos os microrganismos isolados apresentaram características típicas de bactérias da família dos Actinomicetos, e também do gênero *Streptomyces*, de acordo com critérios estabelecidos por Goodfellow & Cross (1984), Hasegawa (1983), Fisher *et al.* (2003) e Williams *et al.* (1989).

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

Amostras	Meio de Cultura	Taxonomia microbiana	Características macroscópicas coloniais	Características morfo-tintoriais	Características fisiológicas e bioquímicas
1	YE	<i>Streptomyces</i>	2 a 5 mm de diâmetro, bordas regulares, frente branco-acinzentada com aparência pulverulenta, reverso amarelado e forte aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Forte odor de geosmina, cat +, sem produção de pigmentos e degradação de amido
2	YE	<i>Streptomyces</i>	4 a 5 mm de diâmetro, bordas regulares, frente branca com aparência cotonosa, reverso amarelo escuro, e forte aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Forte odor de geosmina, cat +, sem produção de pigmentos e degradação de amido
3	YE	<i>Streptomyces</i>	2 a 3 mm de diâmetro, bordas regulares, frente branca acinzentada com aparência cotonosa e verso verde escuro, e forte aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Forte odor de geosmina, cat +, sem produção de pigmentos e degradação de amido
4	YE	<i>Actinomyces</i>	1 a 2 mm de diâmetro, com bordas irregulares, côncava. Frente branca-amarelada, reverso alaranjado e colônias com boa aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Leve odor geosmina, cat +, sem produção de pigmentos
5	YE	<i>Streptomyces</i>	6 a 8 mm de diâmetro, bordas regulares, côncava. Frente branca com aparência cotonosa, verso amarelo com colônias fortemente aderidas ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Forte odor de geosmina, cat +, produção de pigmento esverdeado e degradação de amido
6	ISP2A	<i>Actinomyces</i>	6 a 8 mm de diâmetro, côncavas, bordas irregulares. Frente branca com aparência cotonosa, reverso marrom, com boa aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Leve odor de geosmina, cat +, produção de pigmento alaranjado claro e degradação de amido
7	YE	<i>Actinomyces</i>	1 a 2 mm de diâmetro, côncavas, enrugadas, com bordas irregulares, frente branca com aparência cotonosa, verso esverdeado e fraca aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Leve odor de geosmina, cat +, produção de pigmentos alaranjado claro e degradação de amido
8	ISP2A	<i>Actinomyces</i>	2 a 3 mm de diâmetro, côncavas, enrugadas, bordas irregulares, com a frente branca de aspecto cotonoso e verso amarelo/alaranjado e fraca aderência ao ágar	Gram +; não álcool-ácido resistente e presença de esporos	Leve odor de geosmina, cat +, produção de pigmentos alaranjado escuro e não degradação de amido

Conn (1943) em um dos trabalhos pioneiros sobre produção de pigmentos, observou a produção dos mesmos por *Streptomyces coelicolor*. A composição de meios é um fator a ser considerado no estudo de produção de pigmentos, entre outros fatores.

Das amostras estudadas, todas apresentaram odor de geosmina. As que apresentaram forte odor da substância foram as amostras 1, 2, 3 e 5, confirmando-se como *Streptomyces*.

Gomes-Figueiredo *et al.* (2007), trabalhando com fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* (“Espinheira-Santa”) fizeram a identificação de microrganismos baseados em diversos métodos, como as características microscópicas e macroscópicas (morfológicas). Estes autores obtiveram boa caracterização realizando identificações fenotípicas assim como os dados apresentados no presente trabalho. As Figuras 1 a 8 apresentam características morfológicas utilizadas na identificação dos microrganismos endofíticos isolados de *M. albicans*.



Figura 1: amostra 1 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

Na Figura 1 (amostra 1) visualizam-se colônias com 2 a 5 mm de diâmetro, com aparência pulverulenta, bordas regulares e forte aderência ao ágar. Sua coloração é branco-acinzentada com o reverso amarelado. São Gram-positivas, não álcool-ácido resistentes e apresentam esporos. Além do forte odor de geosmina, são catalase

positivas, degradam o amido e não produzem pigmentos. Estas características são indicativas de colônias típicas de *Streptomyces*.

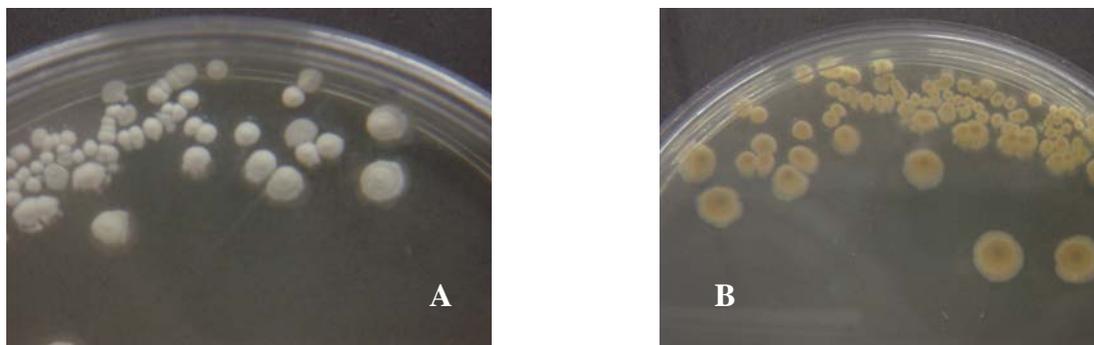


Figura 2 : amostra 2 - característica morfológica do microrganismo endofítico isolado da *M. albicans* : (A) frente e (B) verso.

Na Figura 2 (amostra 2) pode-se observar colônias com 4 a 5 mm de diâmetro, com aparência cotonosa, bordas regulares e forte aderência ao ágar. A frente da colônia é branca e seu verso se mostra amarelo-escuro. São bactérias gram-positivas, não álcool-ácido resistentes, apresentam esporos e tem forte odor de “terra molhada”, sugerindo a produção de geosmina, composto produzido por alguns microrganismos, inclusive a maioria das *Streptomyces* (Jiang & Cane, 2008).

Estes isolados se apresentaram como catalase positivos, degradadoras de amido, porém não produziram pigmentos. Esta observação, aparentemente, pode conduzir a futuras investigações sobre esta propriedade singular desta amostra em nosso trabalho. Neste contexto, quando a amostra 2 foi inoculada em caldo YE, não se observou produção de pigmentação característica esperada. No entanto, quando a mesma foi inoculada em ISP2A (específico para observação de degradação de amido), a amostra produziu pigmentação verde que foi paulatinamente difundindo-se no meio. Esta observação pode sugerir, talvez, que há uma relação estreita, nesta amostra, com a

produção de pigmentos e a degradação de amido. Talvez haja uma rota metabólica que induza o microrganismo a produzir pigmentos após a degradação do amido.



Figura 3: amostra 3 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

A Figura 3 (amostra 3), apresenta colônias com 2 a 3 mm de diâmetro, com aparência cotonosa, bordas regulares e forte aderência ao ágar. A coloração colonial é branca e seu verso é verde escuro. São bactérias gram-positivas, não álcool-ácido resistentes, produtoras de esporos e que detêm forte odor de geosmina. São ainda catalase positivas, degradadoras de amido e não produtoras de pigmentos.

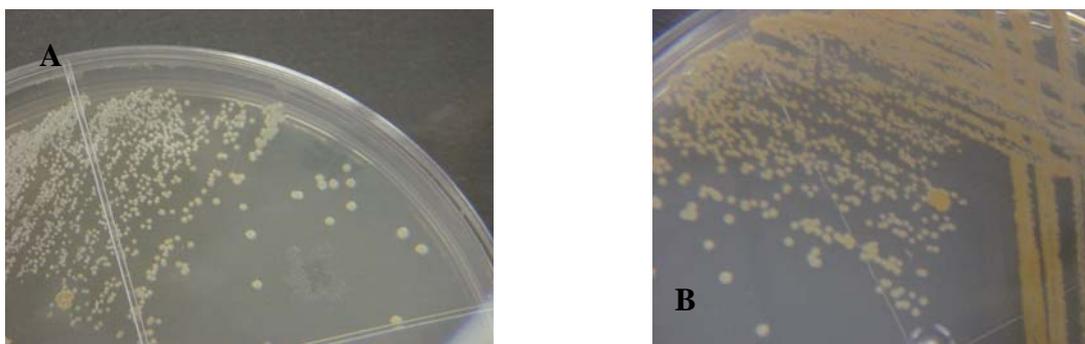


Figura 4: amostra 4 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

Na Figura 4 (amostra 4) pode-se observar colônias com 6 a 8 mm de diâmetro, bordas irregulares e boa aderência ao ágar. A coloração da frente da colônia é branco-amarelada e o verso é alaranjado. São bactérias gram-positivas, não álcool-ácido resistentes e produtoras de esporos. Produzem um leve odor de geosmina. São também catalase positivas, não produtoras de pigmentos. Essa amostra não cresceu no teste de degradação de amido. Esta característica de ausência de crescimento em meios seletivos pode sinalizar para um provável stress microbiano. Apesar de tentativas infrutíferas de crescimento do organismo, continua-se nesta direção, submetendo-o a estímulos de crescimento em meios enriquecidos como BHI.

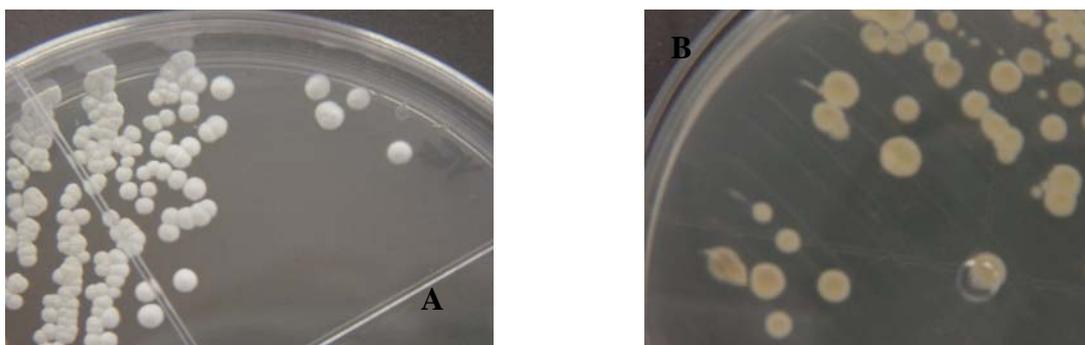


Figura 5: amostra 5 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado da *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

Na Figura 5 (amostra 5) pode-se observar frente e verso das colônias com 6 a 8 mm de diâmetro, aparência cotonosa, bordas regulares e forte aderência ao ágar. Observou-se a cor branca na frente (A) e verso amarelo (B). São Gram-positivas, não álcool-ácido resistentes e produtoras de esporos com forte odor de geosmina. São catalase positivas, degradam o amido e apresentam produção de pigmento esverdeado.

Essa amostra, apesar de apresentar características típicas de *Streptomyces*, não apresentou bioatividade contra nenhum dos microrganismos indicadores estudados. Esta

observação corrobora com o fato de que nem todas as cepas de *Streptomyces* spp. produzem substâncias bioativas.

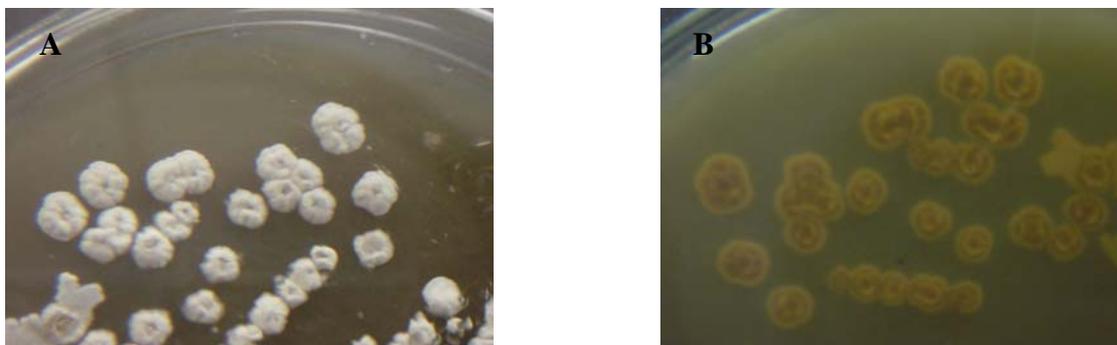


Figura 6: amostra 6 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans* : (A) frente e (B) verso.

Na Figura 6 (amostra 6) observam-se colônias com 6 a 8 mm de diâmetro, aparência cotonosa, bordas irregulares e boa aderência ao ágar. Observou-se coloração branca com verso marrom. São bactérias Gram-positivas, não álcool-ácido resistentes e com esporos. Detectou-se odor leve de geosmina, são catalase positivas, degradadoras de amido e produtoras de pigmento alaranjado.

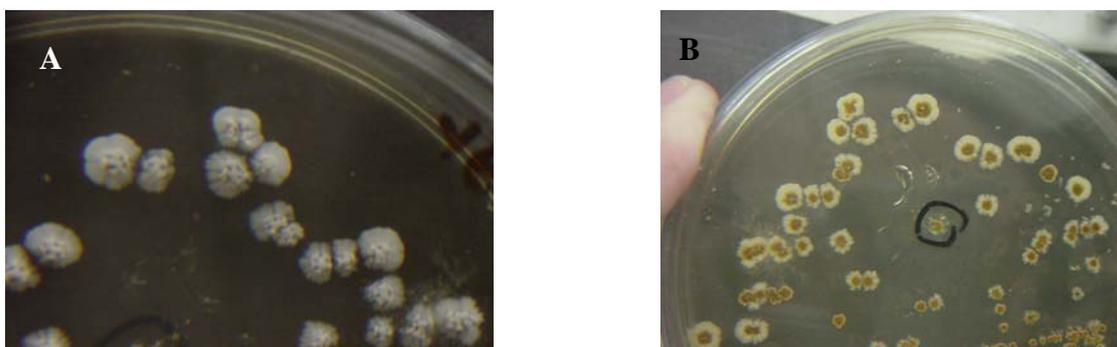


Figura 7: amostra 7 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

A Figura 7 (amostra 7) apresenta colônias com 1 a 2 mm de diâmetro, aparência cotonosa e enrugada, bordas irregulares e fraca aderência ao ágar. As colônias apresentaram cor branca na frente e verso esverdeado. São Gram-positivas, não álcool-ácido resistentes e produtoras de esporos. Têm fraco odor de geosmina, são catalase positivas, degradadoras de amido e produzem pigmento alaranjado. Essa amostra apresentou características típicas de *Actinomycetos*, e não se detectou bioatividade contra nenhum dos microrganismos indicadores estudados. Esta observação corrobora com trabalhos de Gomes-Figueiredo (2007) onde dentre 13 linhagens de fungos endofíticos isoladas, apenas duas foram bioativas.

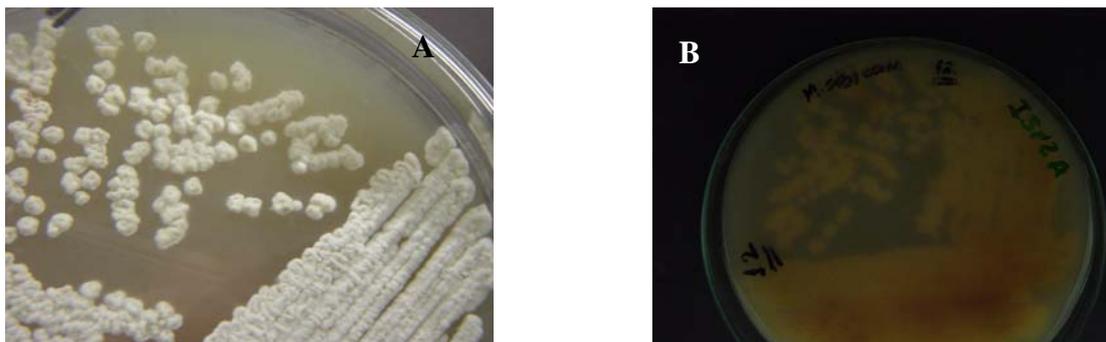


Figura 8: amostra 8 – característica morfológica do microrganismo endofítico isolado de *M. albicans*: (A) frente e (B) verso.

Na Figura 8 (amostra 8) pode-se observar colônias de 2 a 3 mm de diâmetro, aspecto cotonoso, enrugadas, bordas irregulares e fracamente aderidas ao ágar. A frente apresentou-se branca e verso amarelo/alaranjado. São bactérias gram-positivas, produtoras de esporos, leve odor de geosmina e catalase positivas. Não degradam o amido, embora essa seja uma característica entre os *Actinomycetos* (Oliveira, 2003). Embora tenha sido detectada fraca adesão ao ágar e ausência de degradação de amido, as colônias desta amostra podem ser classificadas como *Actinomicetos*. Estas características podem indicar o isolamento de um gênero diferente ou perda de

habilidades específicas. Observou-se produção de pigmento alaranjado escuro. Esta amostra mostrou-se a mais ativa contra o maior número de microrganismos indicadores.

4.2. Teste de produção de pigmentos

Nesse teste os microrganismos foram cultivados em meio líquido (caldo YE) e analisados quanto à produção de pigmentos. De acordo com as Figuras 9 a 16, pode-se verificar os resultados:



Figura 9: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 1) não produtor de pigmentos.



Figura 10: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 2) não produtor de pigmentos.



Figura 11: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 3) não produtor de pigmentos.



Figura 12: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 4) não produtor de pigmentos.



Figura 13: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 5) produtor de pigmento esverdeado.

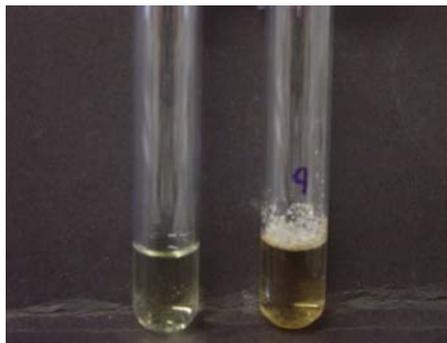


Figura 14: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 6) produtor de pigmento alaranjado.

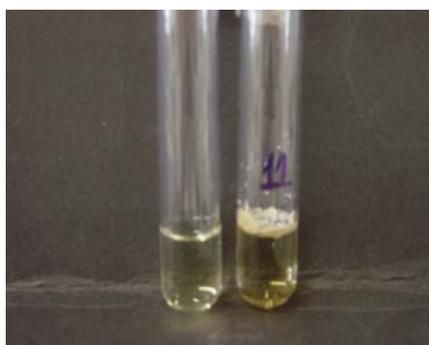


Figura 15: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 7) produtora de pigmento alaranjado.



Figura 16: Microrganismo isolado de *M. albicans* (amostra 8) produtor de pigmento alaranjado.

De acordo com Shirling & Gottlieb (1966), o caldo YE é utilizado para avaliação do crescimento e produção de pigmentos solúveis. Observa-se que 50 % das amostras visualizadas nas Figuras 9 a 16, produziram pigmentos. As amostras 5, 6, 7 e 8 produziram estas substâncias em culturas estacionárias em meio líquido não aerado. Estas amostras apresentaram crescimento com formação de película na superfície. Esta característica nos indica, provavelmente, a predileção aeróbia de Actinomicetos e de *Streptomyces* além da capacidade de formação de película. De acordo com Williams *et al.* (1989), o crescimento de actinomicetos e estreptomicetos são compatíveis com estas características observadas neste trabalho.

4.3. Teste de assimilação de fontes de carbono

No teste de assimilação de fontes de carbono, as amostras foram cultivadas em meio ISP2A. A formação de um halo no meio de cultura ocorre devido a degradação da fonte de carbono amido, mostrando sua utilização. Nesse teste, a amostra 4 não apresentou crescimento. Estes dados podem indicar que o microrganismo foi submetido a algum processo de stress.

A amostra 8 não demonstrou habilidade de degradar o amido, embora tenha apresentado características que permitiram classificá-la como Actinomiceto. Resultados diferentes foram obtidos por Clarkson *et al.* (1987). Estes autores estudando processos cariogênicos, verificaram que *Actinomyces viscosus* utilizou a substância. Uma possível explicação para os dados obtidos no presente estudo, poderia ser a diferença dos substratos utilizados neste trabalho, contendo o amido.

As Figuras 17 a 23 mostram o resultado desse teste realizado com as cepas isoladas.



Figura 17: Amostra 1 - Halos formados pela degradação do amido.

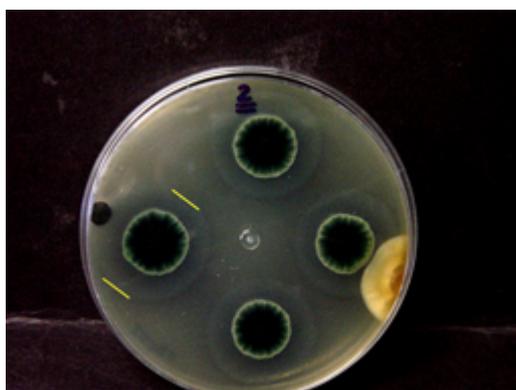


Figura 18: Amostra 2 - Halos formados pela degradação do amido.

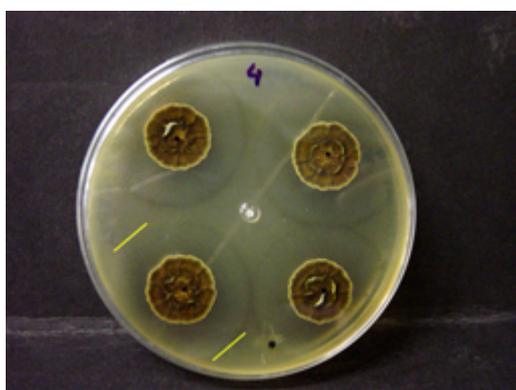


Figura 19: Amostra 3 - Halos formados pela degradação do amido.

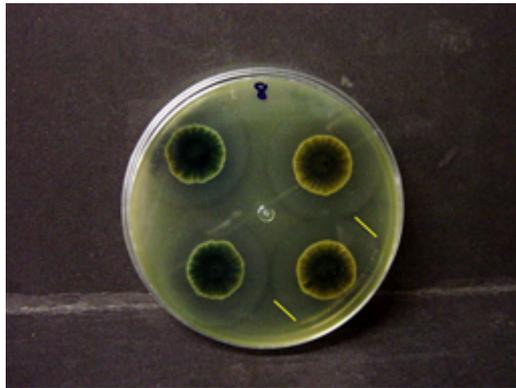


Figura 20: Amostra 5 - Halos formados pela degradação de amido.

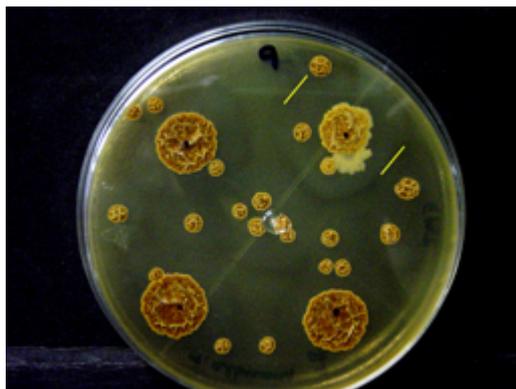


Figura 21: Amostra 6 - Halos sutis formados pela degradação do amido.



Figura 22: Amostra 7 - Halos formados pela degradação do amido.

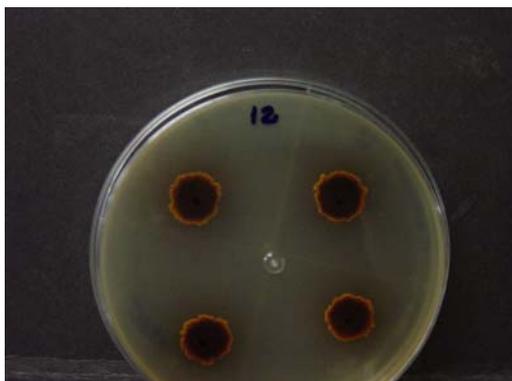


Figura 23: Amostra 8 - Ausência da produção de halos de degradação de amido.

4.4. Caracterização do potencial antagonista microbiano (teste da sobrecamada)

O teste de sobrecamada foi realizado para verificar o potencial antimicrobiano das amostras testadas.

A amostra 1 apresentou atividade antimicrobiana através de halos de inibição de 1,30 cm de diâmetro contra *E. faecalis* (Figura 24). Não foi detectada atividade inibitória contra *S. aureus*, *S. marcescens*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. sonnei*. Eftkhar *et al.* (2009), trabalhando com óleos essenciais de *Satureja spicigera* (planta originária do Irã), observaram boa atividade contra *E. faecalis*, resultados similares ao apresentado no presente trabalho. Estes autores detectaram que as maiores representantes de suscetibilidade foram *B. subtilis* e *S. aureus* seguido por *E. faecalis*, microrganismos que apresentam geralmente resistência a antibióticos. Estes dados são importantes, uma vez que sugerem boa atividade inibitória contra *E. faecalis*.

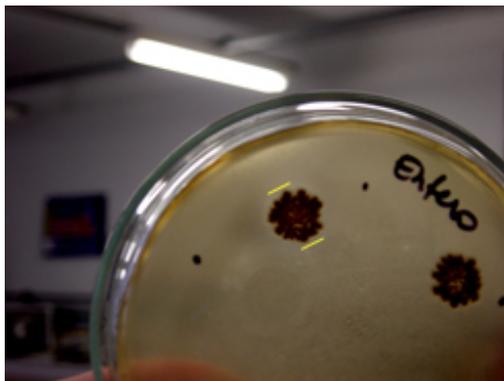


Figura 24: Bioatividade mensurada por halo de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* contra *E. faecalis* (amostra 1).

Na figura 25, a amostra 2 apresentou halos de inibição de 3,60 cm de diâmetro contra os indicador *S. marcescens*. No entanto, não apresentou atividade contra os demais microrganismos testados. Almeida *et al.* (2006) estudaram atividade *in vitro* de extratos comerciais de café contra Enterobactérias. Os autores observaram que a cafeína, ácido clorogênico e ácido protocatecico tinham forte atividade principalmente contra *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Estes dados são similares aos detectados nesta amostra estudada, e pode-se depreender que as substâncias são potenciais agentes antimicrobianos naturais.



Figura 25: Halos de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 2) contra *S. marcescens*.

Na amostra 3 evidencia-se atividade contra *E. faecalis*, com a presença de um halo inibitório de 1,90 cm de diâmetro (Figura 26). Castillo *et al.* (2003) trabalhando com *Streptomyces* endofítico isolado de *Grevillea pteridifolia*, árvore australiana, descreveram e caracterizaram parcialmente substâncias bioativas nelas detectadas. Estes observaram que a kakadumicina A apresentou um amplo espectro de atividade antibiótica, especialmente contra bactérias Gram positivas. Nossos dados corroboram com este achado.



Figura 26: Atividade antagônica do microrganismo isolado contra o indicador *E. faecalis* (amostra 3).

A amostra 4, por sua vez, apresentou atividade antimicrobiana contra 4 dos 6 microrganismos testados: *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *Shigella sonnei* com 3,50, 3,15, 3,35 e 3,20 cm de diâmetro respectivamente (Figuras 27 e 28). Contra *S. marcescens* e *E. coli* não foram observadas bioatividade.

Castillo *et al.* (2002) descreveram o isolamento do antibiótico munumbicina (A, B, C e D). Os autores verificaram que as substâncias isoladas de *Streptomyces* endofítico de planta nativa (*Kennedia nigriscans*) do norte da Austrália, apresentaram amplo espectro de atividade contra importantes patógenos humanos. Os resultados do presente trabalho indicam, similarmente com o observado na literatura, um potencial uso dos metabólitos bioativos isolados para utilização contra patógenos de importância

em Saúde Pública. Liu *et al.* (2008) estudaram atividade antimicrobiana do endofítico *Xylaria* spp., isolado de *Ginkgo biloba* L. Estes autores verificaram forte atividade antibacteriana e antifúngica contra vários microrganismos, inclusive *Shigella* spp. Os resultados encontrados no presente trabalho são similares nesta amostra estudada e os achados provavelmente são promissores para aplicações destas substâncias.

Alguns autores (Ratti *et al.*, 2008, Sousa *et al.*, 2009) isolaram do Cerrado microrganismo endofítico de *Prunus* spp. Estes autores demonstraram que a bactéria isolada apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* coagulase positiva, dados similares aos detectados nesta amostra.

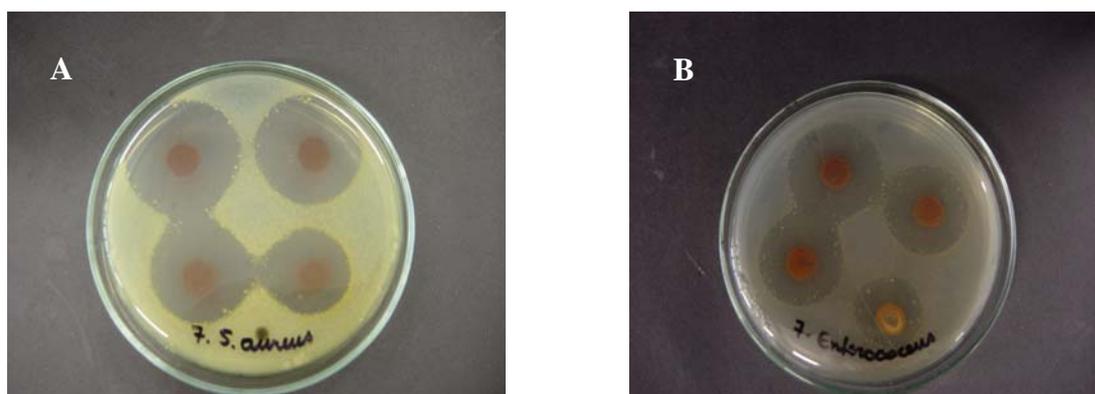


Figura 27: Produção de halos de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 4) contra *S. aureus* (A) e *Enterococcus* (B).

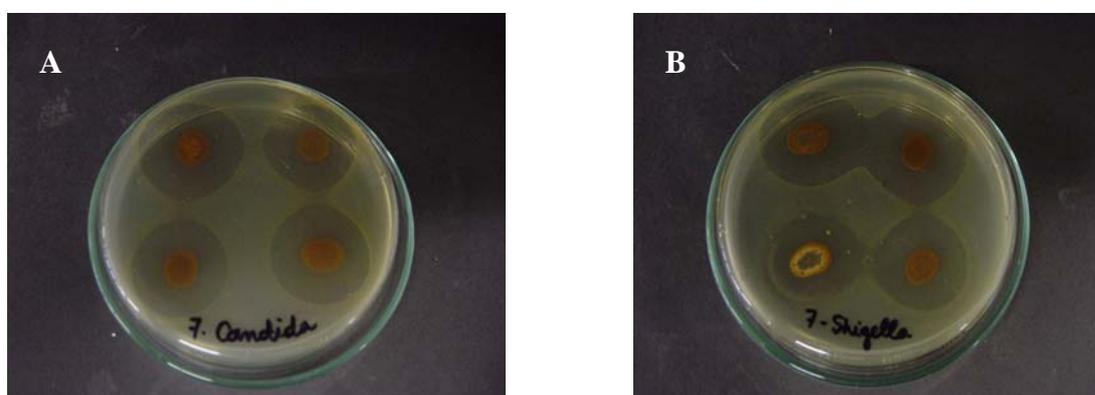


Figura 28: Halo de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 4) contra *C. albicans* (A) e contra *S. sonnei* (B).

Na figura 29 (A e B) pode-se observar a formação do halo de inibição de 1,8 cm de diâmetro da amostra 6 contra *E. faecalis*, e 1,5 cm contra *S. aureus* não demonstrando atividade contra *S. marcescens*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. sonnei*. Phongpaichit *et al.* (2006) verificaram a atividade antimicrobiana demonstrada por fungos endofíticos isolados de folhas e caules de Garcinia. Estes autores obtiveram atividade contra *S. aureus*, *C. albicans*, dentre outros. Estes resultados demonstram assim como os da presente amostra que microrganismos endofíticos isolados de plantas são uma fonte potencial de agentes antimicrobianos.

Treze linhagens de fungos do gênero *Pestalotiopsis* spp. foram isolados de planta medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart ("espinheira santa") e suas propriedades antimicrobianas foram investigadas. Dois isolados mostraram-se ativos na inibição do crescimento de alguns microrganismos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus aureus* metilina resistente) utilizando-se a técnica de ensaio em ágar e cromatografia em camada delgada (Gomes-Figueiredo, 2007).

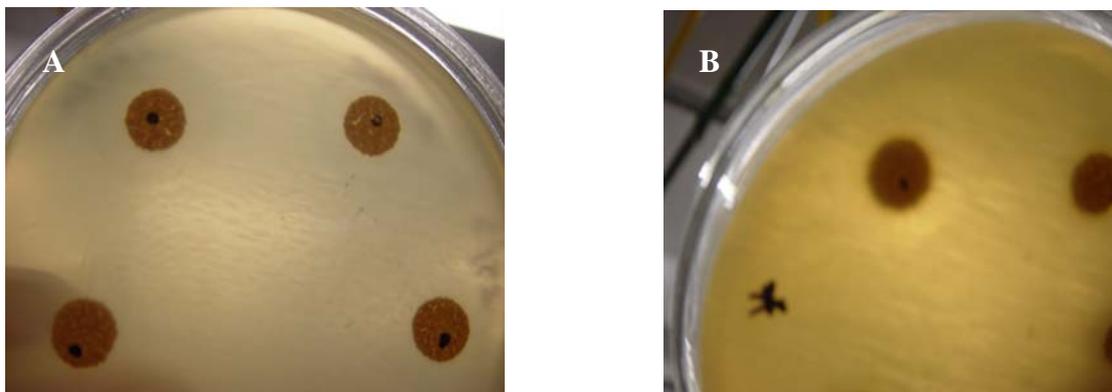


Figura 29: Halo de inibição do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 6) contra *E. faecalis* (A) e contra *S.aureus* (B).

De todas as amostras testadas, a 8 foi a que apresentou atividade contra um maior número de microrganismos. Dos 6 microrganismos indicadores testados, as substâncias bioativas se mostraram eficientes contra 5 deles. Sua atividade inibitória se deu através de halos de inibição de 2,6 cm de diâmetro contra *E. faecalis*; 1,5 cm de diâmetro contra *S. aureus*; 2,4 cm de diâmetro contra *C. albicans*; 2,1 cm de diâmetro contra *E. coli* e, finalmente, 2,5 cm de diâmetro contra *S. sonnei*. Não houve presença de halos inibitórios apenas contra *S. marcescens* (figuras 30 (A e B) e 31 (A e B)).

Sardi *et al.* (1992) observaram atividade antimicrobiana de *Streptomyces* endofíticos isolados de 28 espécies de plantas do noroeste da Itália contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Fusarium oxysporum*.

Castillo *et al.* (2002) verificaram que as substâncias isoladas de *Streptomyces* endofítico da planta nativa *Kennedia nigricans* apresentaram amplo espectro de atividade contra importantes patógenos humanos.

Bomfim (2008) obteve resultados contra *Candida* spp. a partir de metabólitos bioativos de *Streptomyces* spp. endofítico, dados semelhantes aos apresentados no presente estudo.

Guimarães *et al.*, (2008) isolaram de *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, árvores do estado de São Paulo, 39 fungos endofíticos. Dos extratos dos fungos estudados os autores detectaram atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os dados obtidos no presente trabalho, na amostra 8, apresentaram similaridade com os autores mencionados. No entanto, para esta amostra ainda foram estudados outros microrganismos indicadores. Dentre estes, *Shigella* e *Enterococcus* também apresentaram bioatividade. A bioatividade não foi detectada apenas contra *S. marcescens*.

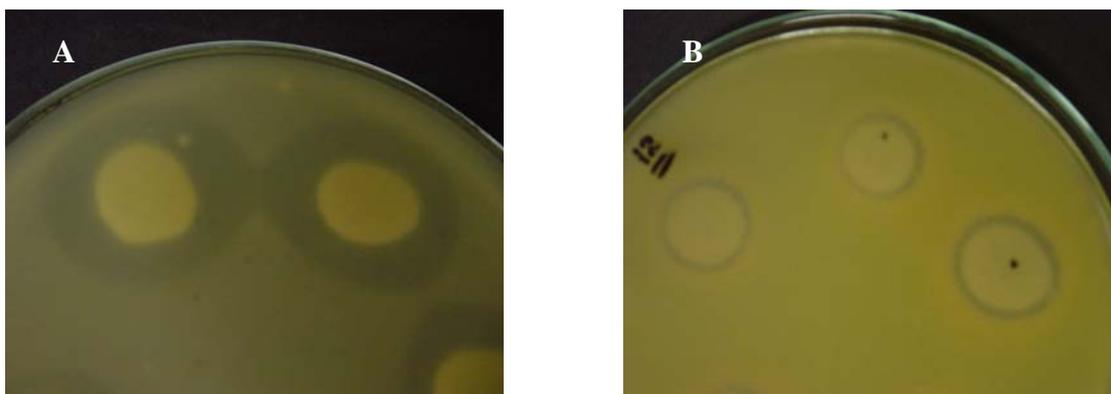


Figura 30: Atividade antagônica do endofítico isolado de *M. albicans* (amostra 8) contra *E. faecalis* (A) e *S. aureus* (B).

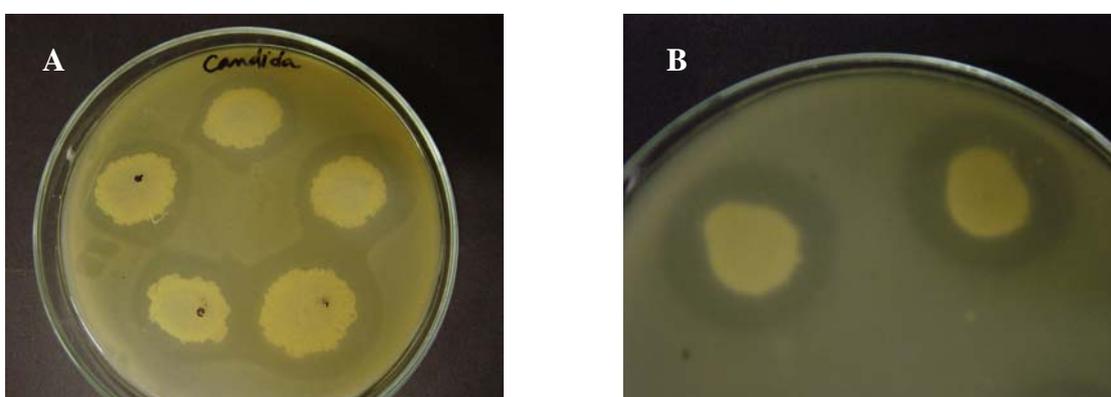


Figura 31: Halos de bioatividade da amostra 8 contra *Candida albicans* (A) e *Shigella sonnei* (B).

As amostras 5 e 7 não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos indicadores testados. Esta observação corrobora com trabalhos de Gomes-Figueiredo (2007) onde dentre 13 linhagens de fungos endofíticos isoladas, apenas duas foram bioativas.

Os resultados obtidos nos testes de antibiose com os microrganismos endofíticos isolados podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2: Antibiose apresentada por microrganismos endofíticos isolados de *M. albicans* contra microrganismos indicadores e mensurada por halos de inibição (cm).

Amostras	<i>E. faecalis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.marcensis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>
1	1,30	–	–	–	–	–
2	–	–	3,60	–	–	–
3	1,90	–	–	–	–	–
4	3,15	3,50	–	3,35	–	3,20
5	–	–	–	–	–	–
6	1,80	1,5 0	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–
8	2,60	1,50	–	2,40	2,10	2,50

Pode-se observar que as amostras 1, 3 e 6 se mostraram eficientes contra microrganismos Gram-positivos, enquanto a amostra 2 só apresentou resultados contra Gram-negativos. As amostras 4 e 8 apresentaram antibiose contra um maior número de microrganismos, sendo eficientes tanto contra microrganismos Gram-positivos quanto em Gram-negativos. As amostras 5 e 7 não apresentaram bioatividade.

4.5. Identificação genotípica

Dois dos microrganismos endofíticos isolados foram identificados genotipicamente como *Nocardioopsis dassonvillei* (amostra 3) e *Amycotopsis orientalis* (amostra 8), ambos pertencentes ao grupo dos actinomicetos e ao gênero *Streptomyces*, de acordo com as características previamente estudadas no presente trabalho.

Nocardioopsis dassonvillei é descrito em literatura como um microrganismo isolado do solo. Nesse estudo, Aghamirian & Ghiasian (2008), buscaram a

identificação, prevalência e distribuição geográfica de actinomicetos aeróbios no solo do Iran. Selvin *et al.* (2009) isolaram *Nocardioopsis dassonvillei* de esponja marinha, testando sua bioatividade contra uma série de patógenos. No entanto não foi encontrado descrição com relação à sua natureza endofítica.

Amycolatopsis orientalis por sua vez, foi descrito como produtor de vancomicina (Jung *et al.* 2007) que buscaram otimizar a produção dessa substância. Banskota *et al.* (2006) encontraram pelo menos 10 metabólitos secundários produzidos por *Amycolatopsis orientalis* além da vancomicina. Os dados obtidos no presente trabalho, sugerem que os microrganismos endofíticos isolados podem também ser produtores de antibióticos de interesse à indústria.

No trabalho apresentado, os resultados obtidos, de forma geral, podem nos levar a considerar a importância do estudo envolvendo o isolamento de microrganismos endofíticos albergados em plantas do Cerrado de São Carlos – SP. Esta associação ecológica, como ficou demonstrada, induz à produção de substâncias químicas específicas, metabólitos secundários bioativos que podem ser aplicados para diferentes utilizações. O comportamento fenotípico verificado nos diferentes isolados obtidos demonstra a pleora de informações genéticas fazendo parte no make-up dos Actinomicetos e particularmente em *Streptomyces*. A continuidade deste trabalho se dará com a caracterização genotípica dos isolados e um possível cultivo em condições variadas para verificar-se a capacidade microbiana para manutenção de produção de substâncias bioativas.

A identificação química das substâncias produzidas pelos endofíticos isolados de *M. albicans* será, provavelmente, realizada em estudos posteriores a nível de Doutorado.

5. CONCLUSÕES

Foram isoladas oito amostras de microrganismos endofíticos a partir de *Miconia albicans* do Cerrado de São Carlos – SP.

Os isolados foram caracterizados fenotipicamente a partir de tipicidade de morfologia colonial e determinações macroscópicas, fisiológicas, bioquímicas e morfotintoriais e genotipicamente através de análises RNAr 16S (amostras 3 e 8).

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

As amostras 1, 3 e 6 apresentaram bioatividade contra microrganismos Gram-positivos, enquanto a amostra 2 apresentou bioatividade contra Gram-negativos. As amostras 4 e 8 foram as mais inibitórias, sendo eficientes tanto contra microrganismos Gram-positivos quanto contra Gram-negativos. Estes dados foram avaliados através de produção e mensuração de halos de inibição em meio específico. Nas amostras 5 e 7 não foi evidenciada bioatividade contra os microrganismos indicadores testados.

A taxonomia dos microrganismos endofíticos isolados os caracterizaram como pertencentes do grupo *Actinomyces* (amostras 4, 6, 7 e 8) e gênero *Streptomyces* (amostras 1, 2, 3 e 5) através de análises fenotípicas. Na análise genotípica dois dos isolados apresentando bioatividade foram analisados e caracterizados *Nocardopsis dassonvillei* (amostra 3) e *Amycolatopsis orientalis* (amostra 8), relatando pela primeira vez sua associação endofítica com partes aéreas de *Miconia albicans* do Cerrado de São Carlos, SP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghamirian, M.R.; Ghiasian, S.A. (2009). Isolation and characterization of medically important aerobic actinomycetes in soil of Iran (2006 - 2007). In *Open. Microbiol. J.*, 3:53-7.

Almeida, A.A.; Farah, A.; Silva, D.A.; Nunan, E.A.; Glória, M.B. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. In *J. Agric. Food Chem.*, 54(23): 8738-43.

Araújo, W.L.; Marcon, J.; Maccheroni Jr.; Vanelsas, J.D.; Van Vuurde, Jw.L.; Azevedo, J.L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. In *Appl. Environm. Microbiol.*, 68: 4906-4914.

Austin, D.J.; Bonten, M.J.; Weinstein, R.A.; Slaughter, S.; Anderson, R.M. (1999). Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(12): 6908-6913.

Azevedo, J.L. (1999). Botânica: uma ciência básica ou aplicada? In *Rev. Bras. Bot.*, 22(2): 225-229.

Banskota, A.H.; McAlpine, J.B.; Sørensen, D.; Ibrahim, A.; Aouidate, M.; Pirae, M.; Alarco, A.M.; Farnet, C.M.; Zazopoulos, E. (2006). Genomic analyses lead to novel secondary metabolites. Part 3. ECO-0501, a novel antibacterial of a new class. In *J. Antibiot. (Tokyo)*, 59(9): 533-42.

Barbosa, M.; Sousa, C. P.; Hokka, C. O. (2009). *Preparation of clavulanate salt using a tertiary octylamine as an intermediate*. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 1 ed. : World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.,1: 754-759

Bomfim, S.M. *Isolamento de metabólitos antifúngicos de Streptomyces sp. UFPEDA 3347 endófito de Momordica Charantia L. (Cucurbitaceae)*. Recife, 2008. 60 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.

Botsaris, A. S. (1998). *As fórmulas mágicas das plantas*. 2 ed. Ed. Nova Era. Rio de Janeiro. 619 p.

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

Castillo, U.; Strobel, G.A.; Ford, E.J. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. In *Microbiology*.148: 2675-2685.

Castillo, U.; Harper, J.K.; Strobel, G.A.; Sears, J.; Alesi, K.; Ford, E.; Lin, J.; Hunter, M.; Maranta, M.; Ge, H.; Yaver, D.; Jensen, J.B.; Porter, H.; Robison, R.; Millar, D.; Hess, W.M.; Condrón, M.; Teplow, D. (2003). Kakadumycins, novel antibiotics from

Streptomyces sp NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 224(2): 183-90.

Cerigioli, M.M. *Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (Zea mays L.) e potencial para promoção de crescimento*. São Carlos, 2005. 132 p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos.

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

Clarkson, B.H.; Krell, D.; Wefel, J.S.; Crall, J.; Feagin, F.F. (1987). In vitro caries-like lesion production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. In *J. Dent. Res.*, 66(3): 795-798.

Clay, K. (1992). Fungal endophytes of plants: Biological and chemical diversity. In *Nat. Toxins*, 1: 147-149.

Conn, J.E. (1943). The Pigment Production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceus-ruber*. In *J. Bacteriol.*, 46(2): 133-149.

Crisan, I. *et al.* (1995). Natural propolis extract NIVCRISOL, in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. In *Rom. J. Virol.*, 46(3-4): 115-133.

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

Dias, B. F. de S. (1992). Cerrados: uma caracterização. In Dias, B. F. de S. *Alternativas de desenvolvimento dos Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis*. FUNATURA: IBAMA. Brasília: p.11-25.

Dreyfus, M. M.; Chapela, I.H. (1994). *The discovery of natural products with therapeutic potential*. In Gullo, V. P., ed. Butterworth-Heinemann: Boston. p. 49.

Eftekhari, F.; Raei, F.; Yousefzadi, M.; Ebrahimi, S. N.; Hadian, J. (2009). Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. In *Z Naturforsch [C]. J. Biosci.*, 64(1-2): 20-24.

Farias, W.V.L.; Sader H.S.; Leme I.L.; Pignatari A.C. (1997). Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas em 12 hospitais. In *Rev. Ass. Med. Brasil.*, 43(3): 199-204.

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

Gomes-Figueiredo, J.; Pimentel, I.C.; Vicente, V.A.; Pie, M.R.; Kava-Cordeiro, V.; Galli-Terasawa, L.; Pereira, J.O.; de Souza, A.Q.; Glienke, C. (2007). Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. In *Can. J. Microbiol.*, 53(10):1123-1132.

Goodfellow, M.; Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. In *Annu. Rev. Microbiol.*, 37:189-216.

Goodfellow, M. & Cross, T. (1984). Classification. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Ed. Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S. London: Academic Press. p. 7-164.

Guimarães, D.O.; Borges, W.S.; Kawano, C.Y.; Ribeiro, P.H.; Goldman, G.H.; Nomizo, A.; Thiemann, O.H.; Oliva, G.; Lopes, N.P.; Pupo, M.T. (2008). Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. In *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52(1): 134-144.

Hahn, J.S.; Oh, S.Y.; Chater, K.F.; Cho, Y.H.; Roe, J.H. (2000). H₂O₂-sensitive fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. In *J. Biol. Chem.*, 275(49):38254-38260.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. In *Can. J. Microbiol.*, 43: 895-914.

Hasegawa, T.; Takizawa, M.; Tanida, S. (1983). A rapid analysis for chemical grouping of aerobic *Actinomycetes*. In *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 29: 319-322.

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

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

Jones, R.N. (2001). Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. In *Chest*. 119: 397S- 404S.

Jung, H.M.; Kim, S.Y.; Moon, H.J.; Oh, D.K.; Lee, J.K. (2007). Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(4): 789-95.

Klink, C. A. & Machado, R.B. (2005). A conservação do Cerrado brasileiro. In *Megadiversidade*. 1(1): 147-155.

Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (1975). *Biotechnologia: tecnologia das fermentações*, v.1. Edgard Blucher e Ed. da USP (EDUSP), São Paulo. 285p.

Lin, W.; Li, L.; Satller, I.; Huang, X.; Grabley, S. (2005). New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant *Aegiceras comiculatum*. In *J. Antibiot.*, 58(9): 594-598.

Liu, X.; Dong, M.; Chen, X.; Jiang, M.; Lv, X.; Zhou, J. (2008). Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(2): 241-247.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga, V. F. J.; Grynberg, N. F.; Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: a necessidade de estudos disciplinares. In *Quím. Nova*, 25(3): 429-438.

Mendonça, R.; Felfili, J.; Walter, B.; Silva Jr., J.C.; Rezende, A.; Filgueiras, T.; Nogueira, P. (1998). Flora vascular do Cerrado. In S. Sano & S. Almeida (eds.). *Cerrado. Ambiente e flora*. pp. 288-556. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados, Planaltina.

Miche, L. & Balandreau, J. (2001). Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3046-3052.

Moura, A. B. & Romeiro, R. S. (1999). Avaliação in vitro de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum*. In *Ciência e Agrotecnologia*, 23: 281-288.

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

Owen, N.L. & Hundley, N. (2004). Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. In *Sci. Prog.*, 87(2): 79-99.

Petrini, L.E. & Müller, E. (1986). Haupt- und Nebenfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandte Pilzen. - *Mycologia Helvetica*. 1: 501-627.

Petrini, O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (Eds). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, p.179-197.

Petrini, O.; Fisher, P. J.; Petrini, L. E. (1992). Fungal endophytes of bracken (*Pteridium aquilinum*) with some reflections on their use in biological control. In *Sydowia*, 44: 282-293.

Phillipson, G. W.; Anderson, A. C. (1998). *J. Ethnopharmacol.*, 25: 61-65.

Phongpaichit, S.; Rungjindamai, N.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. In *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48(3): 367-372.

Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. (2002). Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. In *Quím. Nova*, 25(1): 45-61.

Pinto, L.D. *Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos endofíticos isolados de folhas de Lonchocarpus guilleminianus (Tul.) Malme (rabo-de macaco)*. Recife, 2003. 75p. Dissertação de Mestrado em Genética – Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Piza, A.C.M.T.; Ratti, R.P.; Serrano, N.F.G.; Favoretto, N.B.; Hokka, C.O.; Sousa, C.P. Atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados do Cerrado da região de São Carlos, SP. Anais do III Seminário do Projeto Temático (Proc. 05/55079-4) (Resumos estendido), 14-19, 2009.

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

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

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

Raviraja, N.S.; Sridhar, K. R.; Barlocher, F. (1996). Endophytic aquatic hyphomycetes of roots of plantation crops and ferns from India. In *Sydowia*, 48: 152-160.

Rodrigues, J.; Michelin, D.C.; Rinaldo, D.; Zocolo, G.J.; dos Santos, L.C.; Vilegas, W.; Salgado, H.R. (2008). Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). In *J. Med. Food.*, 11(1): 120-126.

Sardi, P.; Saracchi, M.; Quaroni, S.; Petrolina, B.;Borgonovi, G.E.; Merli, S. (1992). Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8): 2691-2693.

Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A.K.; Krohn, K. (2001). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. In *Mycol. Res.*, 106(2): 996-1004.

Selvin, J.; Shanmughapriya, S.; Gandhimathi, R.; Seghal Kiran, G.; Rajeetha Ravji, T.; Natarajaseenivasan, K.; Hema, T.A. (2009). Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardioopsis dassonvillei* MAD08. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83(3):435-45.

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

Smith, C. S.; Chand, T.; Harris, R. F.; Andrews, J. H. (1989). Colonization of a submersed Aquatic Plant, Eurasian water milfoil (*Myriophyllum spicatum*), by fungi under controlled conditions. In *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(9): 2326-2332.

Sousa, C. P. ; Badino Júnior, A. C.; Cruz-Hernandez, I. L.; Hokka, C. O. (2009). *Challenges attending upon studies on clavulanic acid production*. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 1 ed. Badajoz, Spain: World Scientific Publishing Co., 1: 739-743.

Sousa, C. P. (2008). Mecanismos de Patogenicidade de Células Bacterianas: Resistência a Agentes Antimicrobianos. Laes & Haes, São Paulo, 171: 130-142.

Stanley, S. J. (1992). Observations on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi. In *Can. J. Bot.*, 70: 2089-2096.

Stone, J.K.; (1986). Foliar endophytes of *Pseudotsuga mansziesli* (Mirb.) Franco. *Cytology and physiology of the host-endophyte relationship*. Eugene, 124p. (PhD). University of Oregon.

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

Strobel, G.A.; Zin, N.M.; Sarmin, N.I.M.; Gandhi, N.; Basri, D.F.; Sidik, N.M.; Hess, W.M. (2007). Bioactive endophytic streptomycetes from the Malay Peninsula. In *FEMS Microbiol. Lett.*, 274: 83-88.

Sturz, A. V.; Christie, B. R.; Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. In *Crit. Rev. Plant Sci.*,19: 1-30.

Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicorbianos. In *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33: 281-301.

Vasconcelos, M. A.; Ferreira Dda. S.; Andrade e Silva, M. L.; Veneziani, R. C.; Cunha W. R. (2003). Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans* (Melastomataceae). In *Boll. Chim. Farm.*, 142(8): 333-335.

Viskeen, P. (2003). Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be alternative? In *Homeopathy*, 92 (2): 99-107.

Williams, S. T.; Sharp, M.E.; Holt, J.G.; (1989) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

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